



# Identificación de nuevos genes diana del receptor nuclear FXR

Elena Pedraz Cuesta

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.





UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

# IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS GENES DIANA DEL RECEPTOR NUCLEAR FXR

Elena Pedraz Cuesta

2012



UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Programa de Doctorat de Biomedicina  
Màster de Biomedicina 2008-2009

# IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS GENES DIANA DEL RECEPTOR NUCLEAR FXR

Memoria presentada por Elena Pedraz Cuesta para optar al título de Doctor por la  
Universitat de Barcelona

Director  
Joan Carles Rodríguez Rubio

Doctoranda  
Elena Pedraz Cuesta



Esta tesis ha sido realizada gracias a la Ayuda para el Personal Investigador en Formación de la Universitat de Barcelona (APIF 2008-2012)





## Agradecimientos

Es difícil expresar cuánta gente ha colaborado en la tesis que presento. Creo que las personas con las que compartes tu día a día van marcando el camino. Hace ya tiempo que Don Luis me marcó para decidir mi elección de la carrera que escogería años después, hay personas que ya te transmiten tantas cosas. Aunque ya no estés, me acuerdo de ti. Pero el camino sigue y mis años de facultad me llevaron a una isla maravillosa donde conocí a personas que, hoy en día, siguen siendo importantísimas en mi vida. A vosotros dos, María y Javi, nuestros amigos, muchas gracias por seguir estando ahí a pesar de la distancia. Os aseguro que aunque ya no podamos tomarnos esos cafés en “La Folie” al salir de prácticas, o esas tartas de “Don Tito”, os sigo sintiendo muchas veces aquí. Un año, mi vida cambió de rumbo y me llevó a Barcelona. Allí terminé mi carrera y decidí adentrarme en el mundo del laboratorio, que hoy en día me sigue encantando. En el primer laboratorio en el que estuve, con la Dra. Anna Gumá, aprendí muchas cosas. Gracias a Vicente Martínez por estar siempre ahí, me enseñaste lo que es ser un buen compañero de laboratorio. Trabajar contigo fue muy enriquecedor. No solo a él, sino a todo el “antiguo” grupo de plantas de GMP de Biología, con el que compartíamos penas, alegrías y muchas horas. Cómo no acordarme de Anna Vidal, de todas las conversaciones que aún hoy seguimos teniendo. Muchas gracias por tu sinceridad y tu apoyo, y por esa niña que crece tanto cada vez que la vemos ¡¡Es increíble!!

Por cosas de la vida mi rumbo volvió a cambiar y me llevó al laboratorio donde he realizado todo el doctorado. Los años de laboratorio han sido muy importantes para mi realización como persona e investigadora. El departamento me ha dado todo el soporte que siempre he necesitado. Desde el personal de secretaría (¡gracias Brugués!), los técnicos, el profesorado y todos los doctorandos que he conocido durante estos años. Qué decir de cada uno de los grupos, con todos ellos he vivido infinidad de momentos especiales que recordaré, gracias. Gracias especiales a Diego, con el que siempre he conectado, a Mida, por todos los momentos de células y confesiones, a Pep, se te ha echado muuuuucho de menos, y a mis tres chicas de Citiiiiiss. Carlota, Nuria y Xenia, sois increíbles, en serio. Muchas gracias por arrancarme siempre tantas risas, mucha suerte en todo lo que hagáis, seguro que todo os irá muy bien. Es sorprendente todo lo que te das cuenta que has vivido cuando haces recuento de unos años. Gracias a mi director de tesis, el Dr. Joan Carles Rodríguez, por darme la posibilidad de aprender otra forma de hacer las cosas y por enseñarme a calmarme antes de discutir las ideas. Por obligarme a madurar y a luchar por lo que quiero. Gracias al Dr. Diego Haro por estar siempre cuando le he necesitado. Gracias al Dr. Pedro Marrero por mostrarme qué es la vocación por la ciencia y esas largas conversaciones. Ambos habéis sido una red de seguridad. Pero sobre todo gracias a todas las personas que han compartido “poyata” conmigo. Gracias a todos y cada uno de mis trabajos prácticos, y a los que hemos tenido en el lab, por ponerme a prueba y aprender juntos. Gracias a Yolanda, Laia, Miriam y, sobre todo, Alba. Con cada una he aprendido lo que sabía y podía dar, lo hemos hecho lo mejor que hemos podido. Alba, me alegro mucho de haberte conocido y estoy segura de que tienes un futuro impresionante, cómete el mundo como tú sabes. Gracias a Xana y Joana, me habéis ayudado muchísimo y os

deseo mucha suerte, ojalá nos volvamos a ver. Gracias a Albert, nuestro macho alfa, por ser siempre ese compañero paciente. Cualquiera cosa que necesites ya sabes dónde estamos. Gracias a los postdocs del lab, Cedric y Joana. Gracias por todo el apoyo Joana, espero que puedas continuar tu futuro aquí y tengas tu hueco, que te lo has ganado. Gracias a Xisca y a Mar, nuestras chicas de NY *city*, a pesar de que hemos coincidido poco, sé tanto de vosotras... Me hubiera encantado coincidir más en el lab. Mar, gracias por tus palabras de apoyo y tu determinación envidiable, como ves parece que he terminado así que espero el monumento que me prometiste con ansia. Por último, y por ello las más importantes, las *rookies*. Anna, ya sé que siempre intentabas pasarme el cargo de *rookie* pero al final me escapé. Sabes que estoy super orgullosa de ti y te doy las gracias por tu visión, que cada vez es más positiva. Mucho ánimo. Gracias Ana Lu y Mariona. Gracias por hacerme un hueco entre las dos, ahora ya somos un sándwich. Ana Lu, mira que nos costó eh!!! Gracias por abrirte, por enseñarme a respetar tus silencios, por compartir aficiones, por ser mi compañera de lab y de vida, ¡por darme tanto! Marionetiiss, gracias por tus sonrisas, abrazos, risas, por tantas canciones, por tu orden, alegría y amistad. Gracias a las dos, sabéis que os quiero.

Gracias a mi familia. A mi tía Mariana, que todo empezó con su sacrificio también. A mi abuela que ya puede presumir de nieta doctora. Mis hermanos que siempre han estado ahí. Álvaro, gracias por tus sueños, todavía me acuerdo cuando te presentabas a las primeras oposiciones en las que ibas a ganar millones y viajar por todo el mundo. Gracias porque vamos construyendo cosas juntos. A Raquel, gracias por entrar en la familia y por mediar muchas veces. A Jorge, gracias por insistir. Estoy muy orgullosa de ti, sigue estudiando y con las ideas cada vez más claras. Mi padre, creo que cada vez aprendo más cuando hablo contigo. Gracias por contarme tanto, por interesarte tanto y por luchar también sin pedir nada a cambio. Y a mi madre. Sabes que sin ti nada de esto sería posible. Las dos sabemos los sacrificios que habéis hecho y todo lo que hemos pasado, pero mira, al final, todo llega. Eres un modelo a seguir, gracias por tu fortaleza y tu confianza, por enseñarme que es lo importante. Gracias por luchar con uñas y dientes por mí. Gracias a todos, ¡va por ustedes!

Y a ti, Amado. Gracias, gracias, gracias. Por acompañarme en esto, porque sin ti no habría sido igual. Porque sabemos que somos doblemente doctores. Por lo orgullosa que me haces sentir tanto científica como personalmente. Porque vamos superando todo juntos y construyendo nuestras vidas, y entre dos todo es más fácil. Por las risas, las frikadas mutuas, el apoyo y todo el amor. Te quiero.

# ÍNDICE

---



<b>PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>Ácidos biliares</b> .....	<b>5</b>
<b>TGR5: receptor de membrana de ácidos biliares</b> .....	<b>5</b>
<b>Receptores nucleares: FXR</b> .....	<b>6</b>
<b>Importancia de FXR en el metabolismo glucídico</b> .....	<b>11</b>
<b>Importancia de FXR en el metabolismo lipídico</b> .....	<b>12</b>
FXR disminuye la síntesis de triglicéridos mediante la represión de SREBP-1c	12
FXR disminuye los niveles de TG en plasma a través de la inducción del receptor de las VLDL y de la actividad de la lipoproteinlipasa	12
FXR disminuye los niveles de HDL en plasma a través de la inducción de SR-B1 y la represión de apoA1	14
Los ácidos biliares regulan el receptor nuclear activado por ácidos grasos PPAR $\alpha$	15
Efectos contradictorios de FXR en la aterosclerosis	16
<b>GPLD1: fosfolipasa específica de glicosilfosfatidilinositol</b> .....	<b>17</b>
<b>Familia de FABPs: transporte de ácidos grasos y cáncer</b> .....	<b>19</b>
<b>RBP4: transporte de retinol</b> .....	<b>21</b>
<b>TCEA2: genotoxicidad derivada del exceso de ácidos biliares y cáncer</b> .....	<b>23</b>
<b>NDRG2: supresor tumoral</b> .....	<b>26</b>
<b>TM4SF4: regeneración hepática y litiasis</b> .....	<b>29</b>
<b>CICLO DE LA UREA: catabolismo de los aminoácidos</b> .....	<b>31</b>
<b>HP/HPR: implicación en el proceso inflamatorio</b> .....	<b>33</b>
<b>UBIQUITINAS</b> .....	<b>35</b>
<b>ADH1: metabolismo del etanol</b> .....	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>39</b>
<b>METODOLOGÍA DE DNA</b> .....	<b>41</b>
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
Electroforesis en gel de agarosa	42
Purificación de fragmentos de DNA	42
Modificación enzimática del DNA	42
Transformación en células <i>Escherichia coli</i>	43
Obtención a partir de cultivos bacterianos y cuantificación	43
Secuenciación automática	43
<b>METODOLOGÍA DE RNA</b> .....	<b>44</b>
Obtención y cuantificación de RNA	44
Obtención de cDNA a partir de RNA	44
PCR a tiempo real	45

<b>METODOLOGÍA DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>45</b>
Obtención de extractos totales .....	45
Obtención de proteínas de membrana .....	45
Cuantificación de proteínas .....	46
Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) .....	46
Inmunotransferencia (Western Blot) .....	47
<b>CULTIVOS CELULARES .....</b>	<b>48</b>
<b>TRATAMIENTOS DE LÍNEAS CELULARES.....</b>	<b>48</b>
<b>EXPERIMENTACIÓN ANIMAL .....</b>	<b>49</b>
<b>TRANSFECCIONES TRANSITORIAS –ENSAYOS REPORTERO .....</b>	<b>49</b>
<b>MICROARRAYS.....</b>	<b>50</b>
<b>SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE siRNAs .....</b>	<b>50</b>
<b>INFECCIÓN CON ADENOVIRUS .....</b>	<b>52</b>
<b>ENSAYOS DE GST- PULL DOWN .....</b>	<b>54</b>
<b>ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR (MTT) .....</b>	<b>54</b>
<b>ENSAYOS DE RETARDACIÓN EN GEL (EMSA) .....</b>	<b>54</b>
<b>INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP).....</b>	<b>56</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
<b><i>Microarray</i> en células Huh7 .....</b>	<b>61</b>
<b><i>Microarray</i> en células Caco-2 .....</b>	<b>64</b>
<b><i>Microarray</i> en células HK-2 .....</b>	<b>65</b>
<b><i>Microarray</i> en células hVSMC .....</b>	<b>66</b>
<b><i>Microarray</i> en células HUVEC.....</b>	<b>67</b>
<b>GPLD1: fosfolipasa específica de glicosilfosfatidilinositol.....</b>	<b>69</b>
La expresión de <i>GPLD1</i> se induce por ligandos de FXR en un contexto hepático .....	71
La inducción de <i>GPLD1</i> se pierde en células transfectadas con siFXR .....	72
Localización de un elemento de respuesta a FXR en el promotor de <i>GPLD1</i> .....	73
FXR se une directamente al IR1 del promotor de <i>GPLD1</i> caracterizado previamente .....	74
La regulación de <i>Gpld1</i> por FXR también se observa en ratón .....	76
<b>Metabolismo de los ácidos grasos.....</b>	<b>79</b>
Genes implicados en la liberación de ácidos grasos: .....	81
La expresión de <i>PLA2G1B</i> se reprime por activadores de FXR en células Huh7 .....	81
SHP media parcialmente en la represión de <i>PLA2G1B</i> por FXR .....	81
Genes implicados en la activación de los ácidos grasos .....	82
Ciertos genes involucrados en la activación de ácidos grasos se reprimen por GW4064 .....	82
Genes implicados en la translocación de ácidos grasos .....	83
El tratamiento con GW4064 disminuye la expresión de genes relacionados con la translocación de ácidos grasos .....	83

Genes implicados en la beta oxidación de ácidos grasos	84
Un gen involucrado en la $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos se reprime por GW4064	84
Genes implicados en la cetogénesis	85
Una enzima clave de la cetogénesis se reprime por GW4064	85
Regulación del metabolismo ácidos grasos	86
La expresión del receptor nuclear PPAR $\alpha$ se reprime por GW4064 en células Huh7	86
Los ligandos de FXR no disminuyen los niveles de PPAR $\alpha$ en hepatocitos primarios humanos	87
El GW4064 no compite con el ligando sintético de PPAR $\alpha$ , el WY14643	87
Análisis de la interferencia por CDCA de la unión de PPAR $\alpha$ a su coactivador PGC1 $\alpha$	88
<b>FABP3: transporte de ácidos grasos y cáncer.....</b>	<b>91</b>
La expresión de <i>FABP3</i> se induce por los ligandos de FXR en distintos modelos celulares	93
La inducción de <i>FABP3</i> por ligandos de FXR no se observa en células Huh7 transfectadas con siFXR	99
La regulación que ejerce FXR sobre <i>FABP3</i> se produce a nivel transcripcional	100
La inducción de <i>FABP3</i> por FXR se conserva en ratón	101
<b>RBP4: transportador de retinol.....</b>	<b>103</b>
La expresión de <i>RBP4</i> se induce por activadores de FXR en modelos celulares humanos	105
La respuesta de <i>RBP4</i> a ligandos de FXR desaparece con la transfección del siFXR	107
FXR regula a <i>RBP4</i> de forma post-transcripcional	108
FXR es capaz de inducir <i>Rbp4</i> en ratón	109
<b>TCEA2: genotoxicidad por exceso de ácidos biliares.....</b>	<b>111</b>
La expresión de <i>TCEA2</i> se induce por activadores de FXR en distintos modelos celulares	113
El silenciamiento de la expresión de FXR elimina la respuesta de <i>TCEA2</i> a ligandos de este receptor nuclear	115
FXR regula transcripcionalmente la expresión de <i>TCEA2</i>	116
Identificación de un elemento de respuesta a FXR en el segundo intrón de <i>TCEA2</i>	116
FXR se une directamente a su elemento de respuesta, localizado en el segundo intrón de <i>TCEA2</i>	117
GW4064 parece proteger de la toxicidad producida por un exceso de ácidos biliares	119
FXR es capaz de regular a <i>Tcea2</i> en ratón	120
<b>NDRG2: supresor tumoral.....</b>	<b>121</b>
La expresión de <i>NDRG2</i> está inducida por ligandos de FXR	123
La inducción de la expresión de <i>NDRG2</i> requiere la expresión de FXR	124
Identificación de un elemento de respuesta a FXR en el primer intrón de <i>NdrG2</i>	125
FXR es capaz de regular a <i>NdrG2</i> en células de hepáticas de ratón	126
<b>TM4SF4: regeneración hepática y litiasis.....</b>	<b>127</b>
La expresión de <i>TM4SF4</i> se induce por activadores de FXR en modelos celulares hepáticos e intestinales	129
La inducción de la expresión de <i>TM4SF4</i> por CDCA y GW4064 requiere la expresión de FXR	132
Identificación de un elemento de respuesta a FXR en el promotor de <i>TM4SF4</i>	132
FXR se une al elemento de respuesta del promotor de <i>TM4SF4</i>	134
FXR es capaz de regular a <i>TM4SF4</i> en ratón	135
<b>CICLO DE LA UREA: catabolismo de los aminoácidos.....</b>	<b>139</b>
El tratamiento con GW4064 disminuye la expresión de ciertos genes del ciclo de la urea	141
El gen <i>CPS1</i> podría estar regulado por FXR a través de SHP	142
<b>HP/HPR: implicación en el proceso inflamatorio.....</b>	<b>143</b>
La expresión de <i>HP</i> y <i>HPR</i> se reprime por ligandos de FXR en células Huh7	145
Efecto del silenciamiento de la expresión de FXR sobre la represión de <i>HP</i> por GW4064	146
La ganancia de función de FXR reprime la expresión de <i>HP</i>	147
La regulación que ejerce FXR sobre <i>HP</i> necesita la traducción de una proteína intermedia	147
La proteína que media en la represión de <i>HP</i> por FXR no es SHP	148
<b>Ubiquitinas.....</b>	<b>151</b>
La expresión de <i>UBE2L6</i> , <i>UBD</i> , <i>FBXO2</i> y <i>NEDD4L</i> se induce por activadores de FXR en células Huh7	153
Los niveles de <i>NEDD4L</i> se inducen por ligandos de FXR en otros modelos celulares	154

La inducción de <i>NEDD4L</i> por los ligandos de FXR está bloqueada cuando se silencia FXR	155
La ganancia de función de FXR induce la expresión de <i>NEDD4L</i>	156
La regulación que ejerce FXR sobre <i>NEDD4L</i> se produce a nivel transcripcional	156
Los niveles de <i>Nedd4l</i> se inducen por activadores de FXR en ratón	157
La expresión de la conjugasa <i>UBE2L6</i> se induce por activadores de FXR	158
La inducción de <i>UBE2L6</i> está bloqueada al silenciar FXR	159
La ganancia de función de FXR induce la expresión de <i>UBE2L6</i>	159
La regulación de <i>UBE2L6</i> por FXR se realiza a nivel transcripcional	160
Identificación de elementos de respuesta a FXR en <i>UBE2L6</i>	160

**ADH1: metabolismo del etanol ..... 163**

La expresión génica de las <i>ADH1</i> se induce por activadores de FXR	165
La inducción de <i>ADH1A</i> y <i>ADH1B</i> por ligandos de FXR se bloquea al silenciar FXR	166
Identificación de un elemento de respuesta a FXR en el promotor de <i>ADH1A</i> , <i>ADH1B</i> y <i>ADH1C</i>	167
FXR se une a los elementos de respuesta localizados en los promotores de <i>ADH1A</i> y <i>ADH1B</i> pero no de <i>ADH1C</i>	169
La regulación de los genes <i>ADH1</i> por FXR es especie-específica	170

**DISCUSIÓN ..... 173**

**GPLD1: fosfolipasa específica de glicosilfosfatidilinositol ..... 175**

**Metabolismo de los ácidos grasos ..... 176**

**FABP3: transporte de ácidos grasos y cáncer ..... 177**

**RBP4: transportador de retinol ..... 179**

**TCEA2: genotoxicidad derivada del exceso de ácidos biliares ..... 179**

**NDRG2: supresor tumoral ..... 181**

**TM4SF4: regeneración hepática y litiasis ..... 182**

**CICLO DE LA UREA: catabolismo de los aminoácidos ..... 183**

**HP/HPR: implicación en el proceso inflamatorio ..... 184**

**Ubiquitinas ..... 185**

**ADH1: metabolismo del etanol ..... 186**

**Discusión general ..... 188**

**CONCLUSIONES ..... 189**

**BIBLIOGRAFÍA ..... 193**

**ANEXOS ..... 213**

**ABREVIACIONES ..... 215**

**ARTÍCULOS EN PREPARACIÓN ..... 223**



# **PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS**



Las sales biliares son cruciales para la solubilización y absorción en el intestino de las grasas y las vitaminas liposolubles procedentes de la dieta. Estas sales biliares son sintetizadas a partir de colesterol en los hepatocitos, lo que representa la mayor vía de eliminación de colesterol del cuerpo. Además de este importante papel fisiológico, las sales biliares también actúan como moléculas de señalización endocrina que afectan a múltiples órganos. Para ejercer estos efectos, los ácidos biliares se unen al receptor de membrana TGR5 (*G protein-coupled bile acid receptor 1*) y al receptor nuclear FXR (*Farnesoid X receptor*). Dicho receptor nuclear es capaz de regular la síntesis de ácidos biliares, inhibiendo la expresión de una enzima clave del proceso y regulando su transporte desde el hepatocito al conducto biliar o desde la circulación sistémica al hepatocito. FXR también regula genes implicados en el transporte de los ácidos biliares a nivel intestinal. Por todo esto, se considera que FXR es un sensor de los ácidos biliares en el contexto enterohepático.

Además del papel crucial en la homeostasis de los ácidos biliares, FXR también está involucrado en la regulación del metabolismo de lípidos y glucosa. Es más, estudios recientes han demostrado la participación de FXR en procesos biológicos como la regeneración hepática (Huang W et al, 2006) y la progresión tumoral (Yang F et al, 2007; Modica S et al, 2008). Incluso, la identificación de su expresión en tejidos vasculares ha relacionado a FXR con enfermedades tan extendidas como la aterosclerosis (Bishop-Bailey, 2004). Debido a esto, FXR se ha convertido en una esperanza terapéutica en la lucha contra múltiples enfermedades.

Dado el interés que suscita la investigación de nuevas funciones de FXR, numerosos estudios han identificado nuevos genes diana de este receptor nuclear mediante estrategias genómicas en modelos murinos. Sin embargo, debido a la complejidad de las enfermedades humanas y a la regulación especie-específica frecuentemente observada en los genes diana de FXR, PPAR $\alpha$  (Pineda TI et al, 2003), lipasa hepática (Sirvent A et al, 2004), fibrinógeno (Anisfeld AM et al, 2005),  $\alpha$ -cristalina (Lee FY et al, 2005), o sindecan-1 (Anisfeld AM et al, 2003), el uso de modelos humanos adquiere una mayor importancia como herramienta para el descubrimiento de nuevas funciones de FXR.

En consecuencia, los objetivos trazados para el desarrollo de esta tesis son:

- ⌘ La identificación de nuevos genes humanos dianas de FXR.
- ⌘ La caracterización de los mecanismos de regulación de estos genes por FXR.



# **INTRODUCCIÓN**



## **Ácidos biliares**

Los ácidos biliares son moléculas anfipáticas biosintetizadas a partir de una modificación de la estructura molecular del colesterol, para ser posteriormente oxidados y su cadena acortada hasta finalmente ser conjugados con un aminoácido, taurina o glicina. Dichas moléculas conjugadas son capaces de solubilizar los lípidos, las vitaminas liposolubles y los esteroides procedentes de la dieta y facilitar así su absorción en el tracto digestivo. Un ser humano adulto sintetiza unos 500 mg de ácidos biliares cada día en el hígado que seguidamente serán excretados a la vesícula biliar donde se almacenarán. Después de la ingesta de comida, dichos ácidos biliares son secretados al intestino donde ejercerán su papel como detergentes. Posteriormente, dichos ácidos biliares son absorbidos por difusión pasiva y transporte activo en el íleon terminal y transportados de vuelta hacia el hígado por la vena porta, lo que se denomina circulación enterohepática (Ho KJ, 1976). Está descrito que tras la ingesta los niveles de ácidos biliares en el intestino y en el hígado se triplican en humanos, desde 5  $\mu\text{M}$  hasta 15  $\mu\text{M}$  (Ho KJ, 1976).

Hay dos tipos de ácidos biliares, los que derivan de su síntesis en el hígado a partir del colesterol, denominados primarios, y los derivados de transformaciones llevadas a cabo por bacterias intestinales, denominados secundarios. Los principales ácidos biliares primarios, son el ácido cólico (CA) y el quenodeoxicólico (CDCA). Y los principales secundarios, son el ácido deoxicólico (DCA) y el litocólico (LCA). Junto con el importante papel que dichas sustancias desarrollan en la homeostasis del colesterol también hay numerosos artículos que demuestran que pueden actuar como moléculas señalizadoras (Thomas C et al, 2008).

## **TGR5: receptor de membrana de ácidos biliares**

Hasta ahora se conocen dos rutas metabólicas que pueden ser activadas directamente por los ácidos biliares. Una es la activación de TGR5 y otra la activación de algunos receptores nucleares como CAR, PXR, VDR y FXR (Fiorucci S et al, 2009). En los años 2002 y 2003 dos grupos diferentes identificaron a TGR5 como una proteína de membrana acoplada a proteínas G que actuaba como receptor de ácidos biliares. TGR5 se expresa de forma ubicua aunque más acentuadamente en pulmón, hígado, estómago, intestino delgado y tejido adiposo. La activación de TGR5 permite la liberación de la subunidad G alfa que activa la adenilato ciclasa, produciendo un incremento de adenosin monofosfato cíclico (cAMP), la activación de la proteína kinasa A (PKA) y la fosforilación de la proteína CREB (*cAMP-response element-binding proteins*).

Se han propuesto tres funciones importantes para TGR5. Inicialmente se relacionó a este transportador de ácidos biliares con las células del sistema inmune debido a que su activación en células *Kupffer* suprime la inducción de citoquinas por la presencia de lipopolisacáridos (LPS) (Keitel V et al, 2008). De esta forma se establecía una relación entre los ácidos biliares y la inflamación, que tanto contribuye al desarrollo de disfunciones metabólicas en muchos tejidos.

Por otro lado se vio que TGR5 se expresa de forma muy elevada en la vesícula biliar y su ablación protege a los ratones frente al desarrollo de piedras de colesterol en la vesícula biliar cuando son

alimentados con una dieta litogénica (Vassileva G et al, 2006). Pero dicho receptor no solo tiene una función crucial en la vesícula biliar, sino también en el hígado, concretamente en las células endoteliales sinusoidales. Dichas células están sometidas a altas concentraciones de ácidos biliares de forma transitoria, ya que constituyen una barrera permeable entre el hepatocito y la sangre. En dichas células TGR5 parece tener un papel importante en la regulación de la producción del óxido nítrico mediante la activación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) vía activación del cAMP (Keitel V et al, 2007). Mediante este mecanismo TGR5 protege al hígado contra la peroxidación lipídica y el daño tóxico producido por el exceso de ácidos biliares.

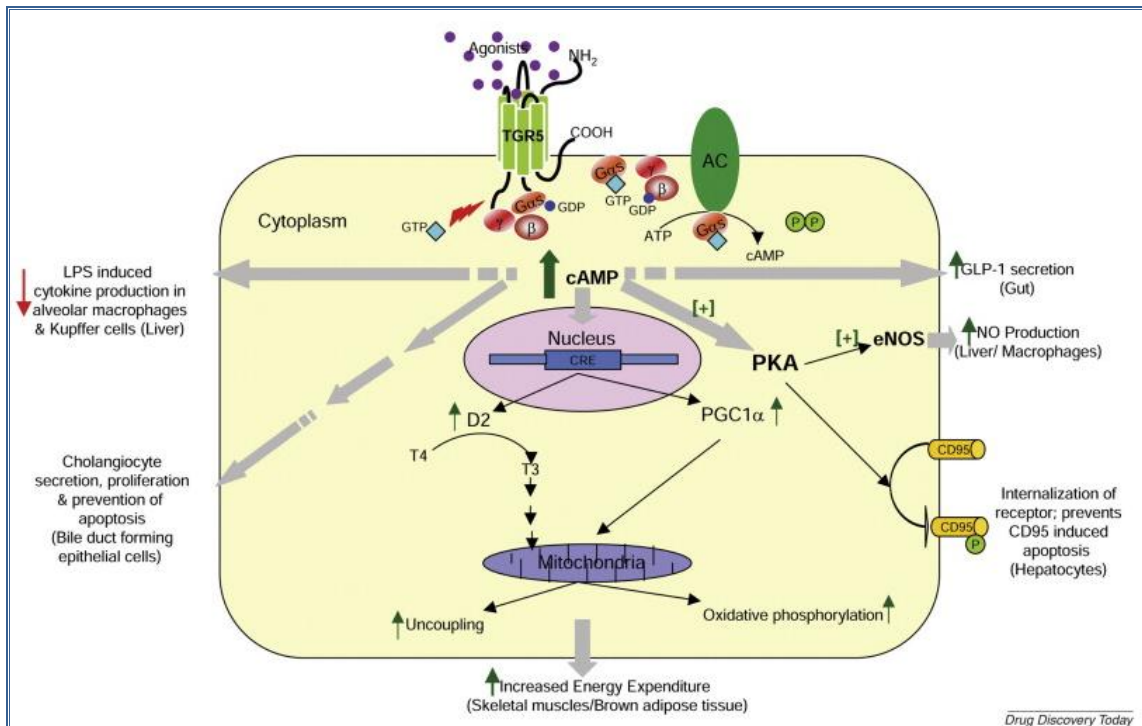


Imagen I.1: Representación de los distintos efectos de la activación del receptor TGR5 en el interior de la célula y su relevancia en otras vías señalizadoras (Tiwari A and Maiti P, 2009). Abreviaciones: AC: *Adenylate cyclase*; CRE: *Cyclic AMP response element*; eNOS: *endothelial nitric oxide synthase*; PGC1α: *Peroxisome proliferator activated-receptor gamma coactivator-1alpha*; PKA: *protein kinase A*.

Otros estudios han relacionado la señalización por TGR5 con la producción de incretinas como la GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*), hormona secretada por el intestino para regular la secreción de insulina en respuesta a la ingesta (Katsuma S et al, 2005), y con la homeostasis energética mitocondrial (Watanabe M et al, 2006). Finalmente, hay artículos que han relacionado a TGR5 con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Yasuda H et al, 2007) y con la vía de señalización de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) (Yang JI et al, 2007), lo que sugiere que TGR5 tiene un papel importante en la proliferación celular y la apoptosis.

## **Receptores nucleares: FXR**

La otra vía activada por ácidos biliares es la derivada de la activación de determinados receptores nucleares. Dichos receptores nucleares pertenecen a una superfamilia de más de 150 proteínas, 48 en humanos, responsables de mediar entre las señales extracelulares y la respuesta transcripcional. El



colesterol, los ácidos grasos y otros lípidos presentes en la dieta no solo tienen un valor nutricional muy importante, sino que también sirven de precursores de los ligandos que se unirán a los receptores en el núcleo. Estos receptores nucleares actúan como factores de transcripción activados por ligando que regulan la expresión de sus genes diana para intervenir en procesos tan diversos como la reproducción, el desarrollo y el metabolismo general. Por lo tanto, para mantener un estado fisiológico normal, la actividad espacial y temporal de los receptores nucleares debe ser estrechamente controlada a través de la expresión específica del tejido de los receptores y de la disponibilidad de ligando. Curiosamente, una evaluación de las vías involucradas en la disponibilidad de ligando revela la existencia de diferentes tipos de receptores nucleares humanos (Imagen I . 2):

- ✓ El primer tipo está representado por los clásicos receptores nucleares de hormonas esteroideas. Este grupo incluye los receptores de glucocorticoides (GR), mineralocorticoides (MR), estrógeno (ER), andrógenos (AR) y progesterona (PR). Los receptores de esteroides se unen al ADN como homodímeros, y sus ligandos se sintetizan exclusivamente de fuentes endógenas endocrinas que son regulados por el control de retroalimentación negativa del eje hipotálamo-hipófisis. Después de la síntesis, las hormonas esteroideas se distribuyen en el cuerpo de sus tejidos diana, donde se unen a sus receptores con alta afinidad.
- ✓ El segundo tipo está representado por los receptores nucleares huérfanos adoptados, que funcionan como heterodímeros con el receptor X retinoide (RXR). Se consideran adoptados debido a que antes no se sabía cuáles eran sus ligandos fisiológicos, pero hoy en día se sabe que, en contraste con los receptores endocrinos esteroideos, los receptores huérfanos adoptados responden a lípidos de la dieta. Los miembros de este grupo incluyen receptores para los ácidos grasos (PPARs), oxisteroles (LXRs), ácidos biliares (FXR), esteroides y xenobióticos (SXR/PXR y CAR). Además, los receptores nucleares de este grupo se unen a sus ligandos lipídicos con menor afinidad, comparable a las concentraciones fisiológicas las cuales pueden variar por la ingesta dietética.
- ✓ El tercer tipo lo conforman 3 receptores, el de la hormona tiroidea (TR), de ácido retinoico (RAR) y de vitamina D (VDR), que no se ajustan con precisión a los receptores endocrinos ya que las vías que regulan emplean elementos tanto del sistema endocrino como de la absorción de lípidos de la dieta. Estos receptores forman heterodímeros con RXR pero las vías transcripcionales que regulan o la procedencia de sus ligandos se asemejan más a las de los receptores endocrinos.
- ✓ El cuarto tipo está representado por receptores huérfanos cuyo ligando fisiológico es todavía desconocido.

	<b>Endocrine Receptors</b>	<b>Adopted Orphan Receptors</b>	<b>Orphan Receptors</b>
<b>Ligands:</b>	High-affinity, hormonal lipids	Low-affinity, dietary lipids	Unknown
	ER $\alpha, \beta$ PR AR GR MR	RXR $\alpha, \beta, \gamma$ PPAR $\alpha, \beta, \gamma$ LXR $\alpha, \beta$ FXR PXR/SXR CAR	SF-1 LRH-1 DAX-1 SHP TLX PNR NGFI-B $\alpha, \beta, \gamma$ ROR $\alpha, \beta, \gamma$ ERR $\alpha, \beta, \gamma$ RVR $\alpha, \beta$ GCNF TR 2,4 HNF-4 $\alpha, \gamma$ COUP-TF $\alpha, \beta, \gamma$

Imagen I.2: Clasificación de los distintos receptores nucleares humanos. Imagen modificada según los descubrimientos sucedidos desde la publicación del paper hasta la actualidad (Chawla A et al, 2001).

Los receptores nucleares tienen la habilidad de unirse directamente al DNA de sus genes diana regulando su expresión a través de los llamados elementos de respuesta (Evans R, 1988). Estas secuencias de DNA generalmente consisten en hexámeros cuyo consenso es AGGTCA. Dependiendo del modo en el que el receptor nuclear se une al DNA, las secuencias varían. De esta forma, hay miembros de esta familia que se unen en forma de monómeros, homodímeros o heterodímeros, que generalmente es con el receptor nuclear RXR (*retinoid X receptor*; NR2B1). La forma que presentan los elementos de respuesta muestra la especificidad de la unión receptor nuclear-DNA del gen diana. Se han descubierto que los hexámeros de los elementos de respuesta de los receptores nucleares que forman homodímeros o heterodímeros pueden estar como secuencias DR (*direct repeats*, AGGTCA<sub>n</sub>AGGTCA), como secuencias ER (*everted repeats*, TGACCT<sub>n</sub>AGGTCA) o como secuencias IR (*inverted repeats*, AGGTCA<sub>n</sub>TGACCT); siendo “n” el número de nucleótidos que separa los hexámeros (Glass CK, 1994). Hay varias hipótesis en cuanto a los mecanismos de acción de los receptores nucleares. Una de ellas defiende que los receptores nucleares están en el citosol, cuando se unen a su ligando cambian de conformación y esto les permite su translocación al núcleo para unirse a su gen diana (Jenster G et al, 1993). Otra hipótesis mantiene que el receptor nuclear no sale del núcleo, incluso puede estar previamente unido al DNA de sus genes diana junto a correpressores, y es el ligando el que atraviesa el núcleo, libera los correpressores y permite el reclutamiento de coactivadores permitiendo así la transcripción de sus genes diana (Klinge CM, 2000).

En el caso particular de los ácidos biliares, éstos actúan como ligandos del *farnesoid X receptor* (FXR; NR1H4) aunque también pueden activar otros receptores nucleares como el *constitutive androstane receptor* (CAR; NR1H3), el *pregnane X receptor* (PXR; NR1H2) y el *vitamin D receptor* (VDR; NR1H1). En esta tesis nos centraremos en FXR, el cual actúa como sensor de los ácidos biliares en el sistema enterohepático. Dicho receptor nuclear regula determinados genes por medio de su unión a elementos de respuesta, mayoritariamente IR-1. A dichos elementos de respuesta se puede unir como monómero (Laffitte BA et al, 2000) o, principalmente, como heterodímero junto con el receptor nuclear RXR (Seol W et al, 1995). Existen dos genes que codifican para FXR denominados FXR $\alpha$  y FXR $\beta$ ,

sin embargo el gen  $\text{FXR}\alpha$  es el único que se conserva desde peces hasta humanos, siendo el  $\text{FXR}\beta$  (Nr1h5) un pseudogen en humanos y un sensor de lanosterol en ratones. El gen  $\text{FXR}\alpha$  presenta cuatro isoformas ( $\text{FXR}\alpha$  1-4) que se derivaban de distintos promotores y diferentes *splicings* alternativos.

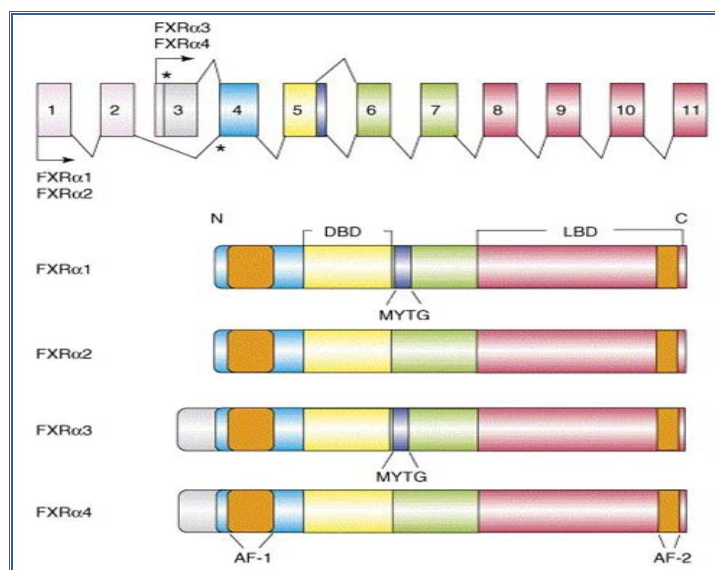


Imagen I.3: Esquema de la organización genómica y de las distintas isoformas proteicas de  $\text{FXR}\alpha$  (Lee FY et al, 2006).

$\text{FXR}$  es un receptor nuclear altamente expresado en hígado, intestino, riñón y glándulas adrenales (Forman BM et al, 1995). La principal función que tiene en los tejidos enterohepáticos consiste en mantener la homeostasis de los ácidos biliares. Para ello,  $\text{FXR}$  es capaz de regular transcripcionalmente un conjunto de genes relacionados con la biosíntesis, el transporte y la conjugación de los ácidos biliares (Lu TT et al, 2000). La síntesis de ácidos biliares es el primer paso de la vía catabólica del colesterol. Una de las enzimas claves en la vía clásica de conversión de colesterol a ácidos biliares es la  $\text{CYP7A1}$  (*cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase*). Su importancia en esta vía está altamente demostrada por numerosos estudios, ya que su ablación en ratones impide la buena absorción intestinal de lípidos y vitaminas resultando en un incremento en la mortalidad perinatal (Ishibashi S et al, 1996; Schwarz M et al, 1996). Algunas mutaciones identificadas en humanos implican un aumento en la hipercolesterolemia y aterosclerosis (Beigneux A et al, 2002; Pullinger CR et al, 2002).  $\text{FXR}$  es capaz de regular la actividad de la enzima  $\text{CYP7A1}$  por medio de la inducción transcripcional de otro receptor nuclear, *short heterodimer partner* (SHP, NROB2). Éste es un receptor nuclear atípico ya que no tiene dominio de unión al DNA por lo se une a otros factores de transcripción, como el *liver receptor homolog-1* (LRH-1), reprimiendo su actividad (Goodwin B et al, 2000; Lu TT et al, 2000).

El importante papel que desarrolla  $\text{FXR}$  en las funciones hepáticas consiste en proteger a los tejidos enterohepáticos de la acumulación de ácidos biliares, que resultan tóxicos cuando están en exceso (Eloranta JJ and Kullak-Ublick GA, 2005; Marschall HU et al, 2006; Zollner G and Trauner M, 2006). La acumulación hepática de ácidos biliares activa  $\text{FXR}$ , el cual incrementa la expresión de algunos transportadores, como BSEP (*bile salt extract pump*), que excretan ácidos biliares desde el hepatocito al conducto biliar para mejorando su flujo hacia la bilis. Una vez que los ácidos biliares son expulsados a la vesícula biliar y posteriormente dirigidos al lumen intestinal,  $\text{FXR}$  desarrolla funciones importantes a nivel del enterocito. Allí induce la expresión de proteínas transportadoras de ácidos

biliares, como son IBABP [*ileal bile acid binding protein*; (Grober J et al, 1999)] y los transportadores OST $\alpha$  y  $\beta$  [*organic solute transporter alpha y beta*; (Zollner G et al, 2006)].

En el enterocito FXR también activa FGF19 [*Fibroblast growth factor 19*, denominado Fgf15 en ratones; (Holt JA et al, 2003; Inagaki T et al, 2005)]. Dicho factor de crecimiento es capaz de salir del enterocito, viajar por el torrente sanguíneo de la vena porta y enlazarse a su receptor FGFR4 (*Fibroblast growth factor receptor 4*) situado en el hepatocito. Allí se cree que es capaz de inhibir la síntesis de ácidos biliares vía JNK [*Jun N-terminal Kinase*; (Holt JA et al, 2003; Inagaki T et al, 2005)]. La inducción de la expresión de SHP por FXR también tiene el objetivo de reprimir genes transportadores que introducen ácidos biliares en el hepatocito desde la circulación sanguínea, como el caso del transportador NTCP (*Na<sup>+</sup>-dependent cholate transporting protein*), o en el enterocito desde el lumen intestinal, como el transportador ASBT (*Apical sodium-dependent bile acid transporter*).

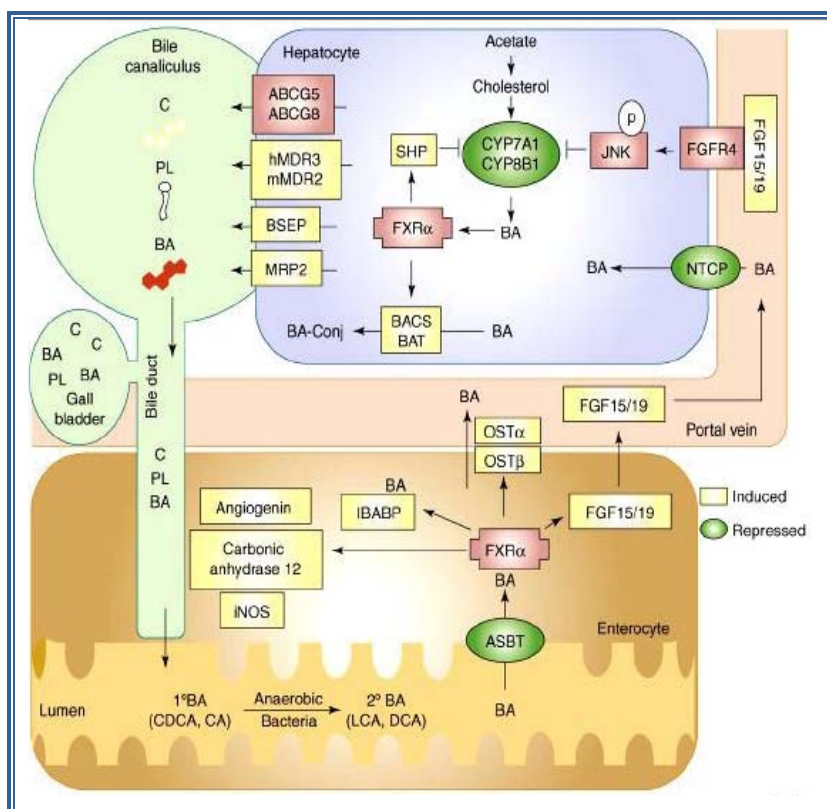


Imagen I.4: Representación de la circulación enterohepática de los ácidos biliares. También se representan los principales genes que FXR es capaz de regular en el metabolismo de los ácidos biliares para mantener su homeostasis (Lee FY et al, 2006). Abreviaciones: CA, cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; DCA, deoxycholic acid; LCA, lithocholic acid; PL, phospholipids; C, cholesterol.

Por todo esto, FXR es considerado un sensor de ácidos biliares que reduce tanto su síntesis como su absorción, a la vez que induce su salida tanto a nivel hepático como intestinal.

## Importancia de FXR en el metabolismo glucídico

El hígado juega un papel fundamental en la homeostasis de los niveles de glucosa en la sangre manteniendo un delicado equilibrio entre la glucosa que es absorbida y almacenada, y la que se genera y se secreta. En un estado de alimentación, el hígado almacena la energía en forma de glucógeno, sintetizado a partir de glucosa. La insulina y la glucosa actúan de una manera coordinada con el objetivo de promover la expresión de genes que controlen la utilización de la glucosa absorbida, como la glucocinasa que cataliza el primer paso del metabolismo de la glucosa.

De esta forma, cuando los niveles de glucosa en sangre disminuyen durante el ayuno, el hígado produce la glucosa a través de la gluconeogénesis o la glicogenólisis, lo que es crucial para tejidos incapaces de usar los ácidos grasos como fuente de energía como es el caso del cerebro o los glóbulos rojos. La enzima fosfoenolpiruvato kinasa (PEPCK) es el principal punto de control de la gluconeogénesis (Hanson RW and Reshef L, 1997), y su represión por insulina se considera un importante mecanismo para disminuir la producción de glucosa hepática (Granner D et al, 1983).

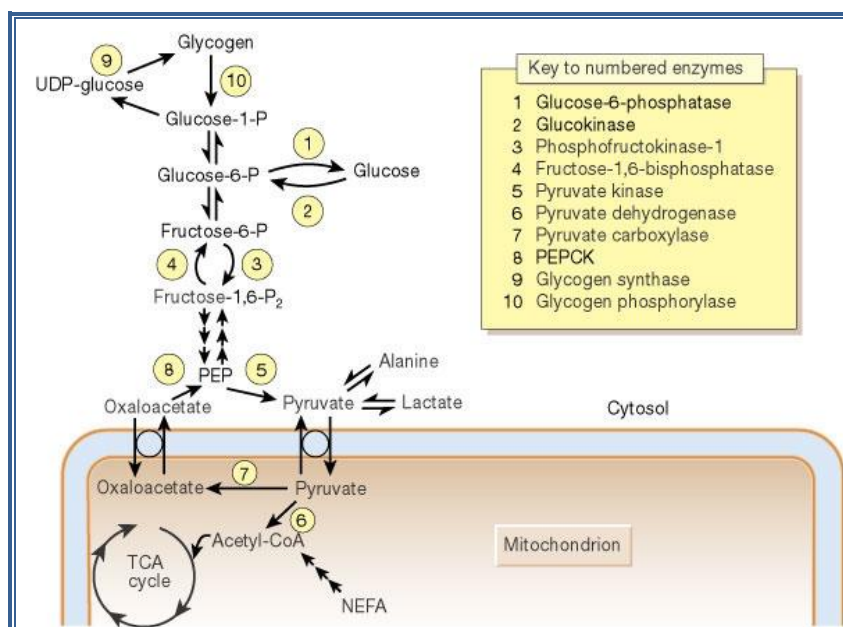


Imagen I.5: Esquema de los procesos de gluconeogénesis y glucólisis a nivel hepático, junto con la descripción de las enzimas claves en dichos procesos. (Moller DE, 2001).

FXR es capaz de modular la homeostasis de la glucosa a través del control de la gluconeogénesis y de la sensibilidad a la insulina en hígado, músculo y tejido adiposo (Ma K et al, 2006). La administración de ácidos biliares y de ligandos sintéticos de FXR a ratones alimentados con una dieta rica en grasas, disminuye la gluconeogénesis por reducción de la expresión de la PEPCK, la G6P (*glucose-6-phosphatase*) y de la fructosa-1,6-bisfosfatasa, tres de las enzimas más importantes de la gluconeogénesis (Zhang Y et al, 2006; Fiorucci S et al, 2007). Además, se ha observado que los ratones deficientes en SHP no muestran una regulación de la expresión de los genes envueltos en la gluconeogénesis por ácidos biliares, por lo que se postula que hay una cascada regulatoria FXR-SHP-genes de la gluconeogénesis (Yamagata K et al, 2004). Sin embargo, existen estudios que sostienen que FXR es capaz de inducir los niveles de la enzima PEPCK (Cariou B et al, 2005; Stayrook KR et al, 2005). Un estudio reciente muestra como FXR es capaz de regular la activación de los genes relacionados con

la gluconeogénesis hepática a través de la regulación de la expresión del receptor de glucocorticoides (GR), que regula la expresión de genes hepáticos de la gluconeogénesis, como PEPCK, en respuesta al ayuno (Renga B et al, 2012).

FXR también está implicado en la vía de acción de la insulina, lo que se muestra en estudios en los que la deficiencia de FXR en ratones conlleva el desarrollo de hiperglucemia, disminución de la tolerancia a la glucosa y fallos en la vía de señalización celular de la insulina (Duran-Sandoval D et al, 2005; Zhang Y et al, 2006; Ma K et al, 2006). Después de administrar insulina a ratones deficientes de FXR, los niveles de fosforilación del receptor de la insulina (IRS-1) y su asociación con la PI3K, e incluso la actividad de ésta en músculo, son inferiores al 50% con respecto a ratones control. Incluso se ha detectado una disminución de la fosforilación de la Akt en dichos ratones (Ma K et al, 2006).

### **Importancia de FXR en el metabolismo lipídico**

FXR altera la transcripción de varios de los genes implicados en la síntesis, transporte y degradación de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol. Se ha demostrado que la administración de un agonista sintético de FXR (GW4064, 6- ECDCA y WAY-362450) reduce los niveles de triglicéridos y colesterol en plasma en ratas y ratones (Bilz S et al, 2006; Zhang Y et al, 2006). Dicha regulación del metabolismo lipídico se lleva a cabo a través de diversos mecanismos:

### **FXR disminuye la síntesis de triglicéridos mediante la represión de SREBP-1c**

En ratones tratados con agonistas de FXR se observa una represión en los niveles hepáticos de SREBP-1c (*Sterol-regulatory-element-binding protein-1c*). SREBP-1c regula numerosos genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, como FAS [*fatty acid synthase*, (Gosmain Y et al, 2005)], ACC-1 [*acetyl-CoA carboxylase-1*; (Ikeda S et al, 2002)]. De esta forma, si se disminuyen los niveles de estos genes reguladores, también se reducen los niveles de triglicéridos y ácidos grasos en plasma. La disminución de SREBP-1c no se observa en ratones deficientes en SHP, sugiriendo que FXR activado induce la expresión de SHP y éste es capaz de reprimir la expresión de SREBP-1c (Watanabe M et al, 2004; Lefebvre P et al, 2009).

### **FXR disminuye los niveles de TG en plasma a través de la inducción del receptor de las VLDL y de la actividad de la lipoproteinlipasa**

El transporte de TG a través del organismo es un proceso complejo y altamente regulado. Las grasas ingeridas en la dieta son procesadas en el intestino delgado en el cual, gracias a las lipasas y los ácidos biliares secretados por la vesícula biliar en el lumen intestinal, permiten la ruptura de los TG en monoacilglicerol y ácidos grasos libres (FFA) (Gadaleta RM et al, 2011). Dichos FFA son absorbidos por



los enterocitos y, junto con el colesterol y la apolipoproteína ApoB-48, forman los denominados quilomicrones nacientes. Éstos son excretados por las células y recogidos por el sistema linfático que los transporta a los grandes vasos cercanos al corazón antes de ser mezclados en la sangre. En la sangre las lipoproteínas HDL (*High Density Lipoprotein*) ceden las apolipoproteínas apoE y apoCII a los quilomicrones que pasan a denominarse quilomicrones maduros. Cuando el cuerpo requiere ácidos grasos como fuente de energía, aumenta la actividad de la enzima lipoproteinlipasa (LPL) en los tejidos periféricos. Dicha enzima es activada por la apoCII y es capaz de romper los TG de las lipoproteínas en FFA que pueden ser fácilmente absorbidos por las células. Una vez que los quilomicrones han cedido parte de sus TG a los tejidos, devuelven la apoCII a las HDL y se convierte en quilomicrones remanentes que son asimilados por el hígado mediante el receptor de la apoB-48. En dicho órgano los quilomicrones liberan los TG que, junto con el colesterol sintetizado a partir del acetato y la apoB-100, forman VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*). Posteriormente las VLDL son liberadas al torrente sanguíneo donde madurarán gracias a la cesión de las apolipoproteínas apoE y apoCII procedentes de las HDL. Los tejidos periféricos que necesiten FFA, especialmente el tejido adiposo y el muscular, activarán su LPL por la apoCII de las VLDL y degradarán sus TG. Las VLDL que ahora contienen menos TG se denominan IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*), que devuelven apoCII a las HDL y pueden retornar al hígado donde son absorbidas por endocitosis y degradadas por las enzimas lisosómicas, o formar las llamadas LDL debido a la acción en el torrente sanguíneo de la lipasa hepática (HL) que degrada los TG. Las LDL son absorbidas por células que tengan su receptor (LDLr) en la membrana y liberan su contenido de colesterol dentro de las células.

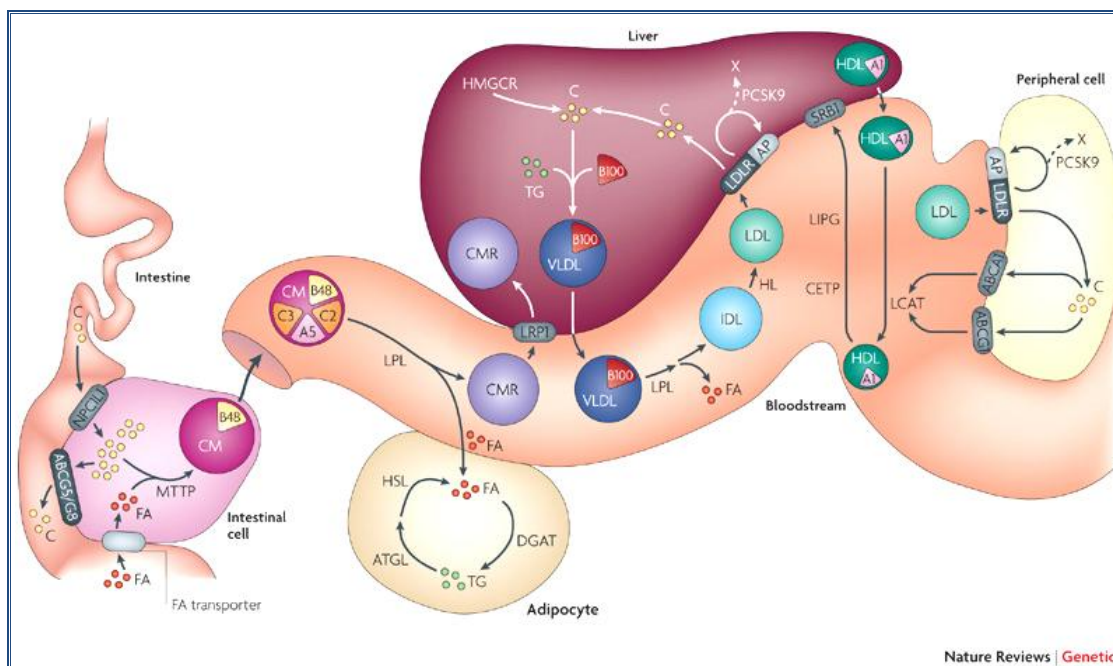


Imagen 1.7: Dibujo esquemático sobre el metabolismo de los triglicéridos, el colesterol y las lipoproteínas que los transportan por el torrente sanguíneo y los distintos órganos (Hegele RA, 2009). Abreviaciones: C, *cholesterol*; TG, *triglycerides*; FA, *fatty acids*.

La activación de FXR controla la lipogénesis hepática mediante la regulación de genes implicados en el metabolismo y en la absorción de lipoproteínas por el hígado. Se ha demostrado que FXR es capaz de disminuir los niveles séricos de apoCIII al igual que sus niveles de mRNA y proteína en el

hígado humano y de ratón (Claudel T et al, 2002). ApoCIII es una apolipoproteína que impide el catabolismo de los TG mediante la inhibición de la LPL (Ginsberg HN et al, 1986; Wang CS et al, 1985) o de la lipasa hepática (Kinnunen PK and Ehnolm C, 1976). También se ha observado que en ratones alimentados con ácido cólico la expresión de otro inhibidor de la LPL, la proteína ANGPTL3 (*Angiopoietin-likeprotein 3*), está disminuida de una manera dependiente de SHP (Watanabe et al, 2004). Por otro lado, FXR es capaz de inducir los niveles de apoCII, un obligado cofactor de la LPL que induce su actividad. También incrementa la expresión de los receptores de VLDL y sindecan-1, que interaccionan en la superficie celular con LPL, apoE y la HL (Anisfeld AM et al, 2003; Sirvent A et al, 2004). De esta forma, la activación de FXR disminuye los niveles de triglicéridos en plasma por el incremento de receptores que absorben partículas transportadoras de TG en plasma, a la vez que por el incremento de la lisis de triglicéridos en la sangre.

### **FXR disminuye los niveles de HDL en plasma a través de la inducción de SR-B1 y la represión de apoA1**

El colesterol sobrante de los tejidos periféricos es transformado en ésteres de colesterol por la LCAT (*Lecithin-cholesterol acyltransferase*) y es transportado por las lipoproteínas HDL hasta el hígado donde serán reconocidas por su receptor e hidrolizadas para liberar el colesterol que puede ser utilizado para empaquetarlo en forma de VLDL y liberado a la sangre, o transformado en ácidos biliares y secretado a la bilis. Estudios con ratones deficientes en FXR han mostrado un incremento de los niveles de HDL en plasma, lo que indica que FXR puede reducir los niveles de colesterol en plasma mediante la regulación del metabolismo de las HDL (Lambert G et al, 2003).

Con el objetivo de conocer los mecanismos de esta regulación se llevaron a cabo estudios con ratones deficientes en FXR, los cuales mostraban una reducida expresión de SR-B1 (*Scavenger receptor class B type I*), el receptor que media en la absorción celular de las HDL. De hecho, la activación de FXR induce la expresión hepática de SR-B1, el cuál disminuye los niveles de HDL en plasma (Malerod L et al, 2005). También se ha descrito que FXR es capaz de reprimir la expresión de la apoA1 a través de SHP (Claudel T et al, 2002). Dicha apolipoproteína es un componente principal de las HDL que activa la enzima LCAT la cual convierte el colesterol en ésteres de colesterol. Por otro lado, FXR es capaz de inducir la expresión de PLTP (*phospholipid transfer protein*), una proteína que facilita la transferencia de fosfolípidos entre las VLDL y las HDL.





## Efectos contradictorios de FXR en la aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad crónica, inflamatoria y trombótica, que cursa con un estrechamiento del lumen de las arterias debido a una acumulación de material graso, como el colesterol, en sus paredes. El exceso plasmático y la deficiencia en el transporte y en la asimilación de las lipoproteínas LDL y HDL promueven la formación de las llamadas placas dentro de los vasos sanguíneos.

Existe una gran controversia sobre los efectos de FXR en la aterosclerosis. Se ha observado que los ratones deficientes en FXR tienen un perfil pro-aterogénico caracterizado por unos niveles altos de TG, FFA y LDL, además de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina. A pesar de esto, no desarrollan lesiones ateroscleróticas incluso cuando se les alimenta con una dieta rica en grasa (Mencarelli A and Fiorucci S, 2010). La deficiencia de *Fxr* en ratones macho doble *Knockout* (DKO) de *Fxr* y *apoE* acelera el desarrollo de lesiones ateroscleróticas comparado con el ratón que es deficiente solo en *apoE* (Hanniman EA et al, 2005). En cambio ratones que no tenían *Fxr* ni el receptor de Ldl, después de 16 semanas alimentándose con dieta *Western*, mostraban una reducción de las lesiones ateroscleróticas en comparación con los ratones *Ldlr*<sup>-/-</sup>. Por otro lado, utilizando un modelo de DKO de ApoE y *Ldlr*, se ha demostrado que la activación de FXR con los ligandos sintéticos 6-ECDCA y WAY-362450 protege frente al desarrollo de placas ateroscleróticas en machos y hembras de este DKO alimentados con una dieta rica en grasas (Hartman HB et al, 2009).

## **GPLD1: fosfolipasa específica de glicosilfosfatidilinositol**

Las proteínas de la superficie celular se pueden unir covalentemente a la membrana celular mediante una estructura de glicolípidos denominada glicosilfosfatidilinositol (GPI). Dicho sistema de anclaje a la membrana es utilizado por enzimas, receptores, moléculas de adhesión y antígenos de diferenciación. Estas proteínas ancladas a la membrana plasmática mediante el glicolípido GPI participan en funciones celulares tales como el reconocimiento inmune o la señalización intracelular.

En mamíferos la única proteína responsable de hidrolizar esta unión entre GPI y la membrana plasmática es la enzima GPLD1 (*GPI-specific phospholipase D, GPI-PLD*). Cuando GPLD1 y las proteínas con GPI son expresadas a la vez, las proteínas unidas a GPI son liberadas al medio intracelular desde las membranas por GPLDI. El tratamiento con hormonas y citocinas induce la liberación de GPI y los inositolfosfoglicanos (IPG) producidos, así como los diacilgliceroles (DAG), actúan como mensajeros secundarios de la traducción de señales (Lisanti MP et al, 1989; Merida I et al, 1990; Represa J et al, 1991).

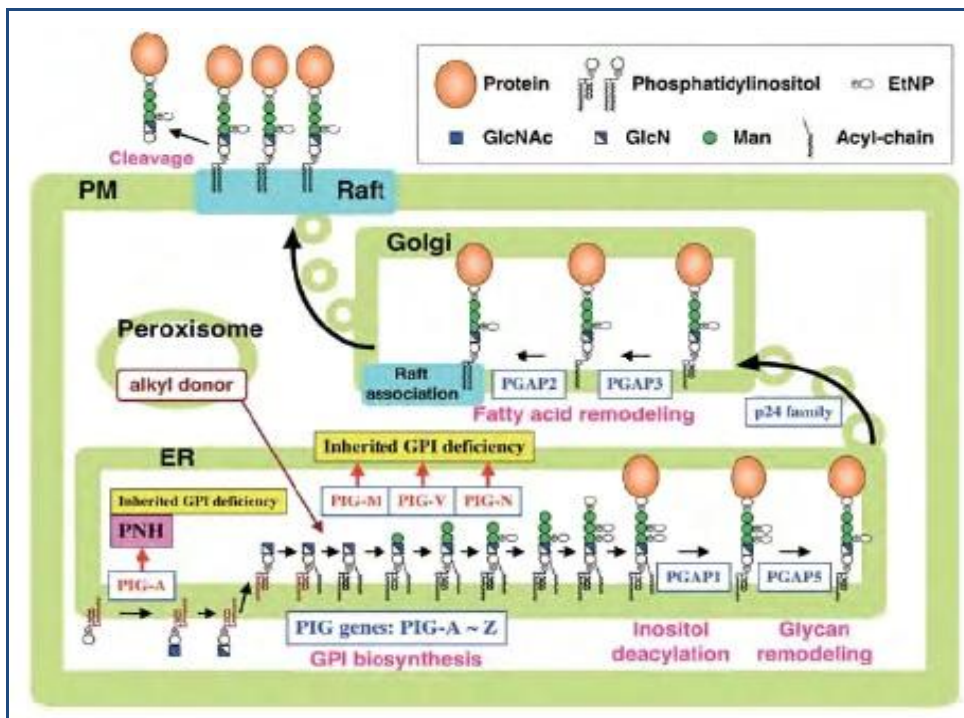


Imagen I.6: Dibujo simplificado de las proteínas ancladas por GPI a la membrana del retículo endoplasmático y su transporte hasta la membrana plasmática donde podrían ser liberadas por la acción de GPLD1 (Kanzawa N et al, 2009) ([http://www.biken.osaka-u.ac.jp/english/topics\\_e/3074.html](http://www.biken.osaka-u.ac.jp/english/topics_e/3074.html)).

GPLD1 es una enzima expresada principalmente en hígado y excretada al suero. A pesar de que sus niveles en suero son muy elevados, entre 5 y 10  $\mu\text{g}$  proteína/ml, se cree que esta forma no es capaz de hidrolizar, en la superficie celular, la unión de GPI con su proteína si la membrana no ha sido perturbada con detergentes (Low MG and Huang KS, 1991; Bergman AS and Carlsson SR, 1994; Deng JT et al, 1996). Estudios con diferentes modelos de membrana (monocapa, vesículas de fosfolípidos y micelas de fosfolípidos mezcladas con detergentes) han indicado que la organización de los fosfolípidos en la membrana es la responsable de la restricción de la actividad de múltiples fosfolipasas (Waite M et al, 1987) entre ellas GPLD1 (Low MG and Huang KS, 1991). De hecho se cree que GPLD1 también

desarrolla su función a nivel intracelular (Low MG and Huang KS, 1991; Bergman AS and Carlsson SR, 1994). En el proceso de secreción de proteínas, éstas son procesadas proteolíticamente y transferidas al GPI en el retículo endoplasmático para su posterior transporte a la superficie celular. Por esto se cree que hay una forma inmadura de GPLD1 en el retículo endoplasmático que posteriormente madura y puede entonces realizar su función de hidrólisis (Tsujioka H et al, 1998).

Aunque se desconoce la identidad de la enzima responsable de producir DAG y ácido fosfatídico (PA) a partir de proteínas unidas a GPI, se sabe que GPLD1 aumenta los niveles de DAG y convierte rápidamente PA en DAG (Merida I et al, 1990; Represa J et al, 1991). Hay estudios que muestran que la sobreexpresión de GPLD1 en células incrementa la producción de DAG y la translocación de la PKC $\alpha$  desde el retículo endoplasmático a la membrana celular (Tsujioka H et al, 1999). Varios estudios sugieren que PKC $\alpha$ , debido a su localización en el retículo endoplasmático, está involucrada en la fosforilación de proteínas que regulan el transporte vesicular (De Matteis MA et al, 1993; Sheff D et al, 1996; Salama NR et al, 1997). Por todo esto se ha sugerido que GPI-PLD tiene una función intracelular liberando proteínas de su unión a GPI y esto es una fuente de producción de DAG que activan PKC $\alpha$ .

Se ha descubierto que GPLD1 en suero se encuentra asociada con las lipoproteínas HDL (Deeg MA et al, 2001). De hecho, en este mismo estudio se muestra como GPLD1 está asociada específicamente con las apolipoproteínas AI y AIV. En estudios *in vitro* se ha comprobado que GPLD1 únicamente interacciona con apoAI (Deeg MA et al, 2001). La razón funcional por la cual se da esta interacción se desconoce, pero se ha propuesto que apoAI pueda ser un vehículo para acercar la forma sérica de GPLD1 a la membrana celular.

Se ha sugerido que la insulina estimula a fosfolipasas que hidrolizan proteínas unidas a la membrana por glicosilfosfatidilinositoles, resultando en la generación de un inositol-glicano que sirve como mediador de la acción de la insulina. Debido a esto, hay estudios que sugieren que un incremento en los niveles séricos de GPLD1 están asociados con una resistencia a la insulina (Kurtz TA et al, 2004). Sin embargo, estudios recientes apuntan a una mejora de la tolerancia a la glucosa cuando se sobreexpresa Gpld1 en ratones (Raikwar NS et al, 2010). También se ha descubierto que GPLD1 está presente dentro de los gránulos secretores de las células de los islotes  $\beta$  del páncreas y que tanto la glucosa como la insulina inducen su expresión génica, e incluso su actividad intracelular en el caso de la glucosa (Bowen RF et al, 2001).

## **Familia de FABPs: transporte de ácidos grasos y cáncer**

La familia de las proteínas FABP (*Fatty acid binding proteins*) tiene un papel fundamental en el transporte de los ácidos grasos dentro de la célula. Los miembros de esta familia tienen un perfil de expresión tejido específico y se unen de manera reversible a ligandos hidrofóbicos (Hertzel AV and Bernlohr DA, 2000; Ockner RK et al, 1972). Se han descrito FABPs en casi todos los tejidos del organismo como por ejemplo en hígado (FABP1 o L-FABP), intestino (FABP2 o I-FABP), corazón (FABP3 o H-FABP), adipocitos (FABP4 o A-FABP), keratinocitos (FABP5 o K-FABP) y cerebro (FABP7 o B-FABP) (Cunningham P and McDermott L, 2009). Sus funciones fisiológicas los involucran en la solubilización, el transporte y la homeóstasis energética de los ácidos grasos de cadena larga (Kaikaus RM et al, 1990).

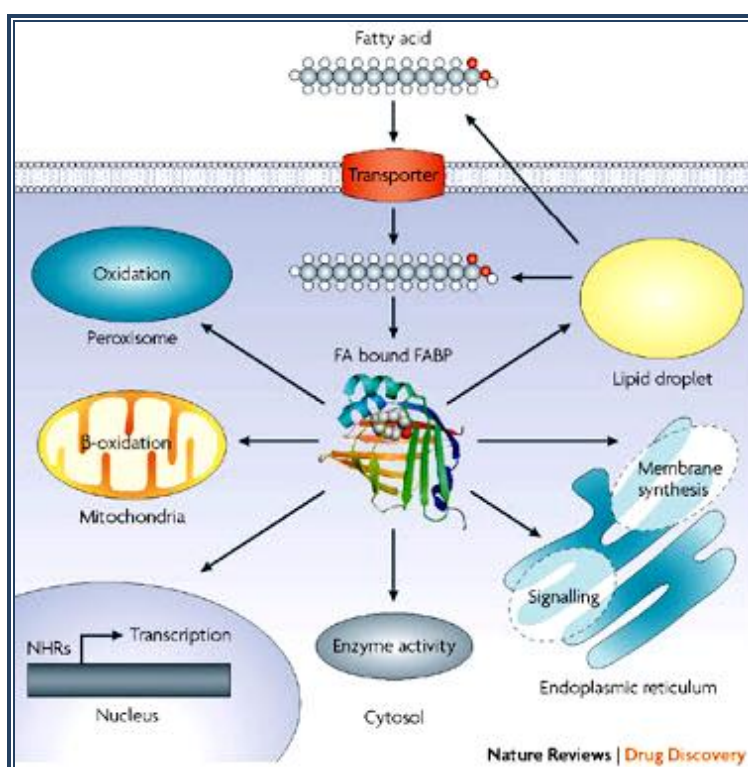


Imagen I.9: Representación de las funciones que desarrollan las proteínas FABP dentro de la célula (Furuhashi M and Hotamisligil GS, 2008).

La proteína FABP3 se expresa abundantemente en cardiomiocitos, por lo que se la conoce también como la FABP de corazón (Heart-FABP). Aunque en niveles más bajos, se expresa también en células musculares esqueléticas y lisas, epiteliales mamarias, aorta, corteza y túbulo renal, pulmón, estómago, placenta, ovario, testículo y cerebro. H-FABP se ha involucrado en el transporte activo de los ácidos grasos desde la membrana celular a la mitocondrial para poder llegar a ser oxidados por la célula (Binas B et al, 1999). La función de FABP3 en corazón es particularmente importante debido a que el 80% de la energía que utiliza el corazón proviene de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga (Neely JR and Morgan HE, 1974).

Cuando sucede un infarto de miocardio, los cardiomiocitos se rompen liberando los ácidos grasos y otros metabolitos a la sangre, donde su concentración aumenta dramáticamente causando daños

reversibles o irreversibles en el organismo (Corr PB et al, 1984; Kleine AH et al, 1992). Se ha propuesto al gen de FABP3 como un marcador de riesgo de infarto de miocardio debido a que se puede detectar en la sangre entre una y tres horas después de la aparición del dolor (Kilcullen N et al, 2007; Viswanathan K et al, 2010).

Por otro lado FABP3, también conocida como MDGI (*mammary-derived growth inhibitor*), ha sido objeto de numerosos estudios en células mamarias que la relacionan con una reducción proliferativa de células epiteliales. Así, ya en los años 90, se relacionó la expresión de esta proteína con la diferenciación de las células epiteliales mamarias apuntando que el mRNA de MDGI está regulado hormonalmente y su expresión es máxima justo antes de la lactancia (Kurtz A et al, 1990). Se ha propuesto a MDGI como un supresor de tumores debido a que su silenciamiento por hipermetilación en células humanas de cáncer de mama y en algunos tumores primarios (Huynh H et al, 1996). Hay numerosos estudios que apoyan este nuevo papel de FABP3/MDGI en dichos modelos celulares. Por ejemplo, se ha visto que una terapia de antiestrógenos en explantes mamarios de rata, puede estabilizar el mRNA de MdgI. Debido a que los estrógenos inducen fenómenos de proliferación celular sobre los órganos, principalmente endometrio, mama y el mismo ovario, MDGI podría estar involucrado en la actividad anticancerígena de los antiestrógenos (Huynh et al, 1996; Huynh and Pollak, 1997). En otro estudio se identificó que un péptido de once aminoácidos de la sección C-terminal de MDGI es capaz de reducir la formación de colonias de diferentes líneas celulares de cáncer de mama y la formación de tumores en ratones inmunodeprimidos (Wang HL and Kurtz A, 2000). Un estudio reciente ha mostrado la relación existente entre MDGI y las integrinas (Nevo J et al, 2010). En este estudio observan como MDGI es capaz de unirse a la subunidad  $\alpha$  de la integrina y modular así su actividad suprimiendo la invasión celular que puede derivar en metástasis.

## **RBP4: transporte de retinol**

La vitamina A (retinol) juega un papel esencial en el mantenimiento de la salud de los mamíferos ya que se requiere para funciones biológicas tan importantes como la visión, la reproducción, el crecimiento y la inmunidad (Goodman DS, 1984; Napoli JL, 1996). Debido a que los animales somos incapaces de sintetizar la vitamina A debemos obtenerla de la dieta de productos animales o como provitamina (carotenoides) en frutas y verduras (Goodman DS, 1984). Los carotenoides son absorbidos por las células de la mucosa intestinal. En el interior de los enterocitos los carotenoides se segmentan en el citoplasma en dos moléculas de retinaldehído, que se reesterifica con ácidos grasos de cadena larga para convertirse en ésteres de retinil (Ruiz A, 1999; Zolfaghari R and Ross AC, 2000). Posteriormente son incorporados a los quilomicrones junto con otros lípidos procedentes de la dieta y secretados en la circulación general a través del sistema linfático (Vogel S et al, 1999). Aproximadamente un 75% de los quilomicrones son absorbidos por el hígado, que actúa como el principal órgano de almacenaje y procesamiento metabólico de la vitamina A (Cooper DA, 1997). El 25% de los quilomicrones restantes son absorbidos por los tejidos extrahepáticos (Goodman DS and Huang HS, 1965). El hígado es el órgano encargado de metabolizar los ésteres de retinil y convertirlos en retinol que posteriormente será secretado a la circulación. Esta forma alcohólica de la vitamina A es inactiva, pero tiene el potencial de volverse a convertir en otros retinoides en las células de los tejidos diana. Así, el retinol es oxidado a retinaldehído y posteriormente a ácido retinoico en el interior de las células. El retinaldehído es activo en el ciclo visual (Wald G, 1968), mientras que los ácidos all-trans y 9-cis-retinoico son ligandos para determinados receptores nucleares como el RAR (*retinoic acid receptor*; NR1B1) y el receptor RXR (*retinoid X receptor*; NR2B1). Dichos receptores regulan la transcripción de infinidad de genes esenciales para determinados procesos metabólicos (Chen JD and Evans RM, 1995; Kastner P et al, 1995; Kurokawa R et al, 1995; Leblanc BP and Stunnenberg HG, 1995; Mangelsdorf DJ et al, 1995; Pfahl M and Chytil F, 1996).

Cuando el retinol circula por la sangre se une a su transportador específico RBP (*retinol-binding protein*; Chytil F and Ong DE, 1983). El complejo equimolar retinol-RBP es capaz de unirse con otra proteína presente en el suero, la transtiretina (TTR) que previene la pérdida del complejo a través de los glomérulos renales (Monaco HL et al, 1995). En condiciones de ayuno, las cantidades de retinol-RBP son aproximadamente el 99% de todos los retinoides presentes en la sangre. Sin embargo, después de una comida rica en vitamina A, las cantidades de retinol circulante y los niveles de ésteres de retinil en quilomicrones exceden enormemente a la cantidad de retinol-RBP presente en la sangre. En humanos y animales, los niveles séricos de retinol-RBP se mantienen constantes excepto en casos extremos de nutrición y en ciertos estados patológicos (Biesalski HK et al, 1999; Goodman DS, 1984). Cuando en estos procesos la vitamina A procedente de la dieta no está disponible, RBP es capaz de movilizar el retinol que está en las reservas hepáticas y suministrar así los retinoides necesarios a las células y tejidos periféricos (Vogel S et al, 1999). Sin embargo, un estudio con ratones deficientes en RBP afirma que el RBP no es requerido para la movilización del retinol dentro del hepatocito (Quadro L et al, 1999). Debido a esto, se cree que un transportador interno de retinol celular, CRBP-I (*celular retinol binding protein I*) es el encargado de realizar dicha función (Ghyselinck NB et al, 1999).



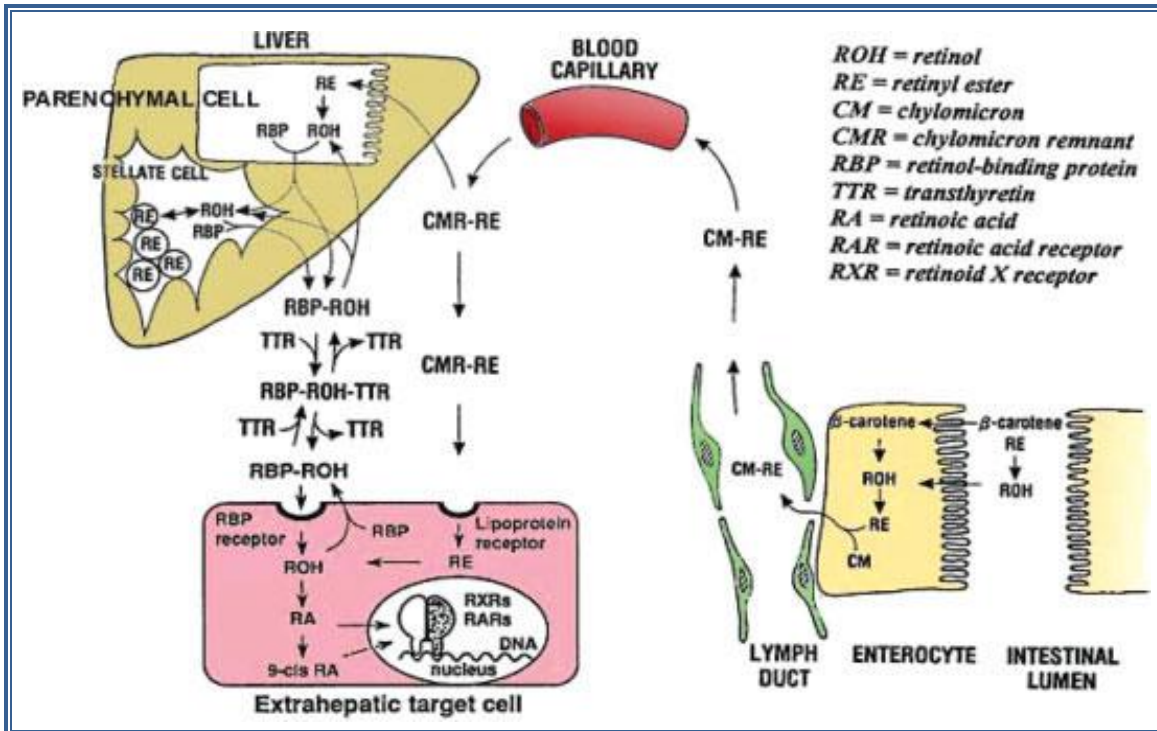


Imagen I.10: Figura ilustrativa de los mecanismos de acción de diferentes proteínas transportadoras de retinol (Blomhoff R and Blomhoff HK, 2006).

El gen *RBP4*, también conocido como *RBP*, es el único gen de la familia de genes transportadores de retinoides que es específico para el retinol y cuya función es exclusivamente extracelular. Aunque los hepatocitos son la fuente principal de *RBP4* circulante, se ha demostrado que el tejido adiposo es el segundo tejido que expresa *RBP4* (entre un 20 y un 40% de los niveles hepáticos) y que puede también almacenarlo, aproximadamente un 20% del volumen total del cuerpo (Tsutsumi C et al, 1992). Numerosos estudios sugieren que *RBP4* actúa como una adipokina que contribuye a la resistencia a la insulina. Se ha demostrado, que el receptor de membrana *STRA6* (*stimulated by retinoic acid 6*) es el encargado de la absorción del retinol hacia el interior de las células (Kawaguchi R et al, 2007). El complejo de retinol unido a *RBP* (holo-*RBP*) se une a *STRA6* e induce su fosforilación, permitiendo así el reclutamiento y activación de *JAK2* y *STAT5*. Esta cascada de señalizaciones resulta en una inducción de los genes diana de *STAT5* como por ejemplo *SOCS3*, conocido inhibidor de la señalización de la insulina (Berry DC, 2009). Diferentes modelos animales de resistencia a insulina, como el ratón deficiente en *GLUT4* (transportador de la glucosa) en el tejido adiposo, muestran un aumento en los niveles plasmáticos de *RBP4*. Dichos niveles también se encuentran elevados en humanos con obesidad y diabetes tipo 2 (Yang Q et al, 2005; Ou HY et al, 2011). También se ha observado que el aumento plasmático de *RBP4* induce la expresión hepática de la *PEPCK* (enzima clave de la gluconeogénesis) y muestra defectos en la señalización de la insulina en músculo (Yang Q et al, 2005).



## **TCEA2: genotoxicidad derivada del exceso de ácidos biliares y cáncer**

La colestasis es una enfermedad que se caracteriza por la acumulación de ácidos biliares en el hígado (Krahenbuhl S et al, 1994) que puede causar daños hepáticos graves y llegar a derivar en una fibrosis o cirrosis hepática (Trauner M et al, 1998). Los ácidos biliares son esteroides fisiológicos cuya función esencial es facilitar la digestión y la absorción de grasas procedentes de la dieta. Sin embargo, a pesar de sus propiedades beneficiosas, su presencia en cantidades excesivas causa diferentes efectos citotóxicos. Los ácidos biliares pueden interactuar con las membranas celulares y, de una forma inespecífica, ejercer un papel de degradación de dichas membranas debido a su función como detergentes. Por esto se asume que su toxicidad depende directamente de su carácter hidrofóbico (Barrasa JI et al, 2011).

Se ha demostrado que el exceso de ácidos biliares en el hígado no solo es perjudicial a nivel externo, sino que también se relaciona con un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y con el daño oxidativo al DNA (Bernstein H et al, 1999; Dvorak K et al, 2007). La generación de ROS es un producto normal del metabolismo celular por lo que la célula tiene mecanismos capaces de disminuir su producción y sus efectos dañinos. De esta forma las enzimas catalasa y superóxido dismutasa aminoran el efecto dañino del peróxido de hidrógeno y del superóxido convirtiéndolos en oxígenos y agua. Sin embargo, esta conversión no es eficiente al 100% y siempre queda una cantidad residual que, si aumenta por acumulación o por una excesiva producción en momentos de estrés, puede ser altamente perjudicial. Esto se traduce en daños en el DNA, oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, de aminoácidos, o incluso de co-factores lo que produce la inactivación de diversas enzimas que los necesitan para desarrollar sus funciones metabólicas. Estudios recientes han demostrado que los ácidos biliares en exceso, en concreto el CDA y el CDCA, producen genotoxicidad tanto en células normales como en células cancerígenas de tumores humanos de colon, por medio de la inducción del daño oxidativo al DNA (Rosignoli P et al, 2008).

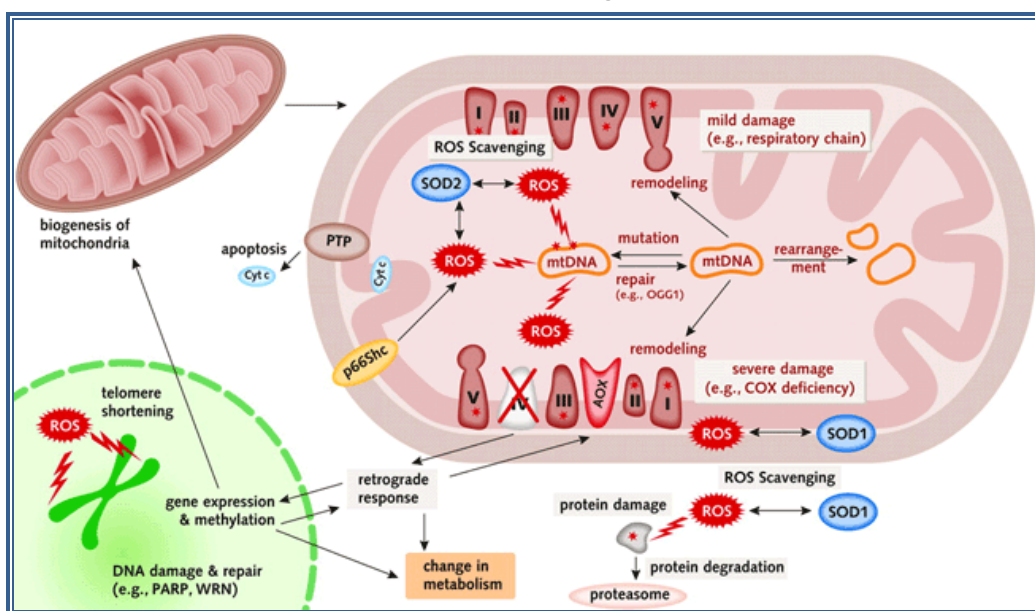


Imagen I.11: Esquema sobre los efectos perjudiciales de ROS a nivel celular. Imagen extraída de *EMBO Reports* (Jansen-Durr P and Osiewacz HD, 2002).

El mantenimiento de la integridad genómica en un ambiente de genotoxicidad producida por el estrés es un prerequisite para que la célula desarrolle sus funciones de forma correcta. Una de las prioridades de la investigación es descubrir su relación con el cáncer y con enfermedades relacionadas con el envejecimiento. El genoma de los mamíferos tiene diferentes vías para protegerse contra la genotoxicidad, una de ellas es la vía de respuesta al daño del DNA que implica mecanismos dirigidos a la detección de lesiones sufridas en el DNA, a través de sensores específicos, y su posterior reparación. Cuando la RNA polimerasa II (RNAPII) se encuentra con un daño en el DNA de la cadena que está transcribiendo, puede actuar de dos formas diferentes: estancarse en la lesión o sobrepasarla y continuar la transcripción (Doetsch PW, 2002; Tornaletti S, 2005). En el caso de estancarse en la lesión del DNA, la RNAPII puede reclutar a una variedad de factores integrantes del llamado complejo de reparación de la transcripción (TCR) que permiten la eliminación de la lesión de forma específica. Pero si la reparación del DNA no se produce, la RNAPII continuará estancada en la lesión y se parará la transcripción de determinados mRNAs que, si son esenciales, pueden ocasionar la muerte de la célula (Kuraoka I et al, 2003). Por otro lado, si la RNAPII es capaz de sobrepasar la lesión y continuar la síntesis del mRNA, el proceso puede generar un transcrito mutado y dar lugar a proteínas mutantes (Conti E and Izaurralde E, 2005; Lejeune F and Maquat LE, 2005).

El factor de elongación TFIIIS pertenece al complejo TCR. Su función es estimular la elongación de la transcripción, activar la eliminación del RNA naciente y facilitar la reparación de la incorporación defectuosa de ribonucleótidos durante la transcripción (Jeon C et al, 1994).

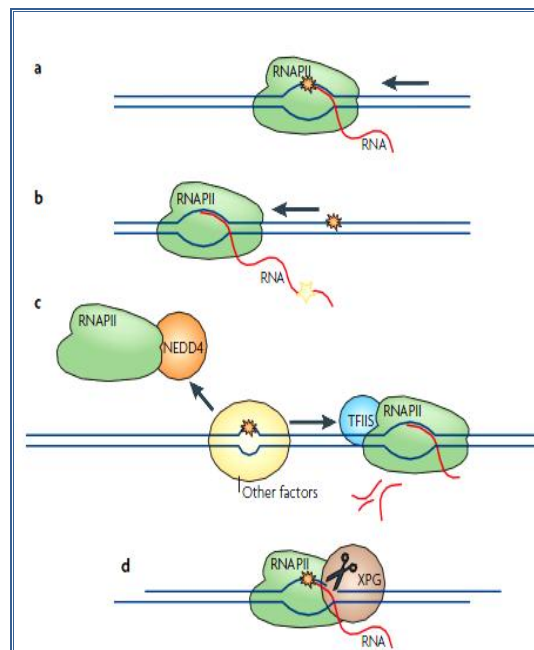


Imagen I. 12: Esquema de los posibles mecanismos de acción de la RNAPII al encontrarse con una mutación en el DNA que está transcribiendo. Imagen obtenida de *Nature Reviews* (Hanawalt PC and Spivak G, 2008)

En la imagen 12 se ejemplifica lo que sucede cuando la RNAPII entra en lo que se denomina arresto transcripcional (a). Para liberarse de este estado la célula pone en marcha varios mecanismos:

- Sobrepasa la lesión pero la copia en el mRNA y por tanto puede dar lugar a proteínas mutadas (b).
- Repara la lesión del DNA(c):
  - El factor TFIIIS estimula la degradación parcial del mRNA naciente y permite que la RNAPII retroceda dejando que otros factores del complejo TCR reparen la lesión.
  - La RNAPII se une a NEDD4, una proteína de ubiquitinación que permitirá su degradación en el proteosoma.
- Iniciación el proceso de reparación mediante el corte del fragmento de DNA que contiene la lesión (d) sin que haya un desplazamiento de la RNAPII.

Por tanto, se ha descrito a TFIIIS como un factor capaz de participar en la reparación de las lesiones ocasionadas en el DNA. Sin embargo, numerosos artículos han demostrado que no solo permite la degradación parcial del mRNA transcrito para permitir la entrada de otros elementos del complejo TCR, sino que TFIIIS es capaz de permitir que la RNAPII sobrepase las lesiones del DNA y continúe con la transcripción (Charlet-Berguerand N et al, 2006). Pero no todas las lesiones que bloquean la RNAPII son susceptibles de ser reparadas por el factor TFIIIS. Se ha comprobado que TFIIIS participa ayudando a la RNAPII a sobrepasar la lesión oxidativa de una guanina (8-oxoG), pero no otras lesiones como la 8-oxoadenina, 2- hidroxiaadenina o la timina glicol que también producen el arresto de la RNAPII en su presencia (Kuraoka I et al, 2007).

Un estudio mostraba que la producción de ROS inducida por ácidos biliares aumentaba considerablemente en ausencia de FXR (Nomoto M et al, 2009). Este artículo sugería que la continua generación de ROS en ratones deficientes en FXR está directamente ligada con los daños oxidativos generados en el DNA. Cuando analizaron los niveles de diferentes marcadores de estrés oxidativo, como la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8OHdG, derivado de la 8-oxoG) o el hidroperóxido, en ratones *FXR-KO* observan un aumento significativo en sus concentraciones hepáticas con respecto a los ratones control.

Por tanto, la exposición prolongada a niveles altos de ácidos biliares en el hígado está relacionada con la generación de estrés oxidativo y con el daño oxidativo producido al DNA. Debido a que FXR es el receptor nuclear que regula los niveles de ácidos biliares en el hepatocito mediante la inducción o la represión de determinados genes involucrados en su transporte y biosíntesis, debe tener un papel importante en estos procesos. Además de controlar los niveles de ácidos biliares, FXR puede estar directamente regulando procesos que disminuyan los efectos citotóxicos causados por los ácidos biliares aunque este mecanismo no ha sido descrito todavía.

## **NDRG2: supresor tumoral**

La familia Myc es un grupo de factores transcripcionales a la que pertenecen los genes C-Myc, N-Myc y L-Myc. Los miembros de esta familia se caracterizan por tener en su mRNA unas secuencias *IRES* (*internal ribosome entry site*) que permiten que el RNA se traduzca a proteína incluso en los momentos en que la transcripción dependiente de la cabeza 5' está inhibida, como por ejemplo durante una infección viral. La expresión de sus genes diana la realizan mediante la unión a secuencias E-box (*Enhancer Box*) y reclutando histonas aciltransferasas (*HATs*), aunque también son capaces de actuar como represores transcripcionales (Dang CV, 1999). Los genes Myc son activados por varias señales mitogénicas como Wnt, Shh y EGF (a través de la vía MAPK/ERK) que conducen a la regulación de genes implicados en la proliferación celular (inducen las ciclinas y reprimen p21), pero también regulan el crecimiento celular (induciendo el RNA y proteínas ribosomales), la apoptosis (reprimiendo Bcl-2), la diferenciación y la renovación celular. Por todo esto, los genes de la familia Myc son protooncogenes y muy a menudo su expresión está altamente inducida en numerosos tipos de cánceres (Grandori et al, 2000).

El gen NDRG2 (*N-myc downregulated gene 2*) pertenece a la familia NDRG, junto con NDRG1, NDRG3 y NDRG4. Estos genes se caracterizan por estar reprimidos por miembros de la familia Myc y numerosos estudios abogan por un papel crucial de estos genes en la proliferación celular y la diferenciación. El análisis filogenético de esta familia demuestra que en humanos, NDRG1 y NDRG3 pertenecen a la misma subfamilia; mientras que NDRG2 y NDRG4 pertenecen a otra. A nivel de secuencia aminoacídica los cuatro miembros comparten entre un 53 y un 65% de identidad (Qu X et al, 2002). En general son genes citoplasmáticos, aunque hay estudios que han demostrado su translocación al núcleo en situaciones especiales como por ejemplo NDRG2 en el estrés celular por hipoxia (Wang L et al, 2008).

NDRG2 se expresa en músculo, cerebro, corazón, hígado y, en menor medida, en el riñón. Su función primordial ha sido ampliamente estudiada por muchos grupos de investigación que han partido de la observación de su expresión disminuida en diferentes tipos de cáncer. Así, se ha demostrado que la expresión de NDRG2 estaba reducida en un 56% en glioblastomas humanos (Deng Y et al, 2003); la expresión génica y proteica de NDRG2 estaba reprimida en meningiomas de grado III (Lusis EA et al, 2005); se ha observado un descenso significativo de los niveles de mRNA de NDRG2 en adenomas y carcinomas colorectales (Lorentzen A et al, 2007), gástricos (Assamaki R et al, 2007; Choi SC et al, 2007), de páncreas (Hu XL et al, 2004), de piel (Hummerich L et al, 2006), de pecho (Liu N et al, 2007) y de hígado (Ohno T et al, 2012). La pérdida de expresión de NDRG2 observada en los distintos tipos de tejidos cancerígenos se asocia con una hipermetilación o una mutación del promotor de NDRG2 o una delección heterocigótica en dichos tejidos. También se cree que NDRG2 es capaz de suprimir la actividad de metaloproteinasas de matriz (MMP-9 y MMP-2) evitando así la migración y la invasión de las células tumorales (Ma JJ et al, 2012). Además se ha demostrado que es capaz de suprimir la fosforilación de IKK  $\alpha/\beta$  afectando así a toda la vía de señalización y disminuyendo marcadamente a la actividad del factor nuclear NF- $\kappa$ B (Kim A et al, 2009). Por todos estos resultados se ha identificado a NDRG2 como un supresor de tumores sugiriendo su utilidad y funcionalidad relevante como biomarcador para predecir las formas agresivas de diferentes tipos de cáncer.

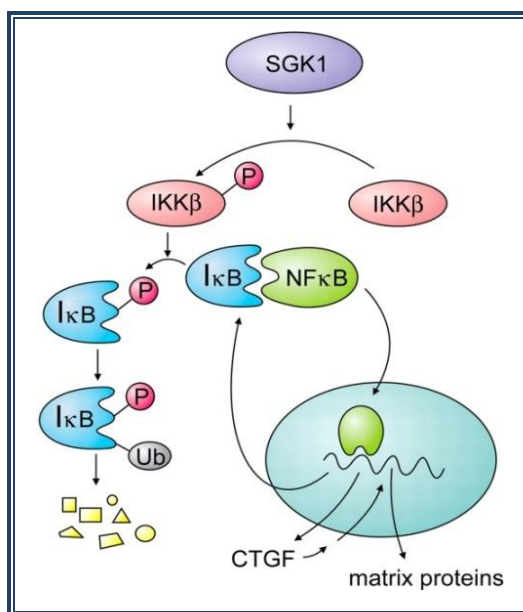


Imagen I. 13: Esquema de la función de SGK1 en el control de los genes regulados por el factor nuclear NFκB. SGK1 fosforila y activa a la quinasa IKKβ, la cual fosforila al inhibidor de NFκB, IκB (Lang F et al, 2006).

Ratones deficientes en FXR presentan una alta incidencia de tumores hepáticos espontáneos con la edad (Kim I et al, 2007; Yang F et al, 2007). Si se alimenta a estos ratones con una resina secuestrante de ácidos biliares (colestiramina) se ha demostrado que se produce una reducción en la malignidad de las lesiones tumorales (Yang F et al, 2007), lo que indicaba que los efectos tumorigénicos se debían a los elevados niveles en suero e hígado de ácidos biliares. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que FXR, y no solo la disminución de los niveles de ácidos biliares, es suficiente para reducir la tumorigénesis (Modica S et al, 2008). También se ha demostrado que FXR es capaz de antagonizar la señalización del factor nuclear NF-κB (Wang YD et al, 2008), reduciendo así la inflamación hepática y el riesgo de sufrir hepatocarcinogénesis.

Uno de los componentes mayoritarios de las placas aterogénicas son los macrófagos que han absorbido lipoproteínas oxidadas LDL (oxLDL), conocidas como células esponjosas. Dichas células secretan factores de crecimiento, como PDGF (*platelet-derived growth factor*) o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) implicado en la angiogénesis, y se ha publicado que la activación de las kinasas ERK1/2 y JNK/SAPK son las responsables de la expresión de PDGF (Mehta and Griendling, 2007). Un estudio reciente ha descubierto que el gen NDRG2 está inducido en macrófagos tratados con oxLDL y en las placas aterogénicas humanas, inhibiendo la activación de la vía de ERK e impidiendo así la producción de los factores de crecimiento PDGF y VEGF (Liu S et al, 2010), lo que es fundamental para el desarrollo de las placas aterogénicas.

Recientemente se ha sugerido una nueva función de NDRG2 en la histogénesis hepática y en la organogénesis. Se ha descrito que este gen está fuertemente expresado en el hígado de rata (Boulkroun S et al, 2002) y tanto el mRNA como la proteína se expresan en hígados de ratones y humanos fetales durante la diferenciación gestacional, siendo los niveles bajos durante las etapas tempranas del desarrollo y aumentando marcadamente durante las últimas etapas (Hu XL et al, 2006).

Además, también se ha demostrado que NDRG2 está implicado en diferentes situaciones como la regeneración hepática. Durante la regeneración, muchos de los hepatocitos se dividen durante las 48 horas después de una hepatectomía parcial. Después de este periodo, las células dejan de crecer y comienzan a diferenciarse para restablecer la función hepática (Fabrikant JI, 1968). Se ha descrito que NDRG2 está fuertemente inducido cuando las células entran en el proceso de diferenciación, mientras que durante la proliferación NDRG2 está inhibido (Yang J et al, 2010). También se ha observado que durante estas etapas el gen C-Myc presentaba un patrón de expresión inverso, demostrando así la correlación existente entre estos dos genes.

## **TM4SF4: regeneración hepática y litiasis**

La superfamilia de tetraspaninas se caracterizan por ser proteínas de la superficie celular con cuatro dominios transmembrana altamente conservados (Wright MD and Tomlinson MG, 1994). La función de estas proteínas se desconoce, pero se cree que muchas están implicadas con la transducción de señales mediante la proliferación celular, la movilidad celular, la metástasis y la adhesión celular mediante enlaces no covalentes con integrinas (Hemler ME et al, 1996). El epitelio intestinal de un ratón o un humano se renueva de forma continua y rápida. Las células deben decidir si proliferar, diferenciarse o entrar en muerte programada. Debido a esto, el epitelio intestinal es un modelo que permite examinar los mecanismos moleculares que regulan las decisiones que deben tomar las células a lo largo de su vida. En dicho modelo se identificó a la proteína il-TMP (*intestinal and liver tetraspan membrane protein*, también llamada TM4SF4), que codifica para una proteína de membrana glicosilada expresada no solo en células del epitelio intestinal humano, sino también en hepatocitos que no se dividen (Wice BM and Gordon JI, 1995). Su función no está bien definida, pero se cree que tiene un papel importante en la inhibición de la proliferación celular, regulando así densidades celulares como en el páncreas (Anderson KR et al, 2011), o en el crecimiento celular de los hepatocitos en la regeneración hepática (Liu Z et al, 2001).

El proceso de regeneración hepática es debido a procesos internos de la célula tales como el inicio de la división celular, la parada del crecimiento celular y la diferenciación. El cDNA de TM4SF4 de rata fue identificado como el gen que se sobreexpresaba 24 horas después de una hepatectomía parcial de hígado, es decir durante el proceso de regeneración hepática (Liu Z et al, 2001). Por otro lado, en un estudio en el que utilizaban como modelo de daño hepático agudo ratas tratadas con tetracloruro de carbono, observan como la expresión de TM4SF4 en estas condiciones estaba aumentada y dicho aumento estaba asociado con un elevado ratio ALT/AST (proteínas que cuantifican el daño hepático), un incremento en la necrosis y en la apoptosis hepática (Qiu J et al, 2007). Cuando sobreexpresaban TM4SF4 en estas ratas, observaban un aumento del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y de su vía de señalización, aumentando la expresión de genes proapoptóticos como Bax y disminuyendo la de genes antiapoptóticos como Bcl-X<sub>L</sub>.

En el desarrollo pancreático y la diferenciación de los tipos celulares de los islotes, el factor de transcripción Nkx2.2 es esencial. Se ha observado que en los ratones deficientes en dicho factor, durante el desarrollo pancreático, el gen Tm4sf4 está altamente expresado. En un modelo del pez cebra, modelo muy común para el estudio de la regeneración hepática y desarrollo de islotes pancreáticos, se observa que Tm4sf4 inhibe la especificación de las células  $\alpha$  y  $\beta$  de los islotes pancreáticos. Por lo tanto, según este estudio, Tm4sf4 es inhibido por el factor de transcripción Nkx2.2 en las células progenitoras endocrinas, permitiendo la migración y/o la diferenciación celular hacia tipos celulares especializados (Anderson KR et al, 2011).

Cabe destacar que TM4SF4 se ha relacionado con la enfermedad de piedras en la vesícula biliar (litiasis). En un estudio genómico sobre poblaciones alemanas y danesas se identificaron los transportadores hepáticos de colesterol ABCG5/8 y TM4SF4 como locus con una contribución estimada de un 7.5% en el desarrollo de la enfermedad (Schafmayer C et al, 2010). Aunque ya se conocía que una deficiencia en los transportadores ABCG5/8 es un factor de riesgo para esta enfermedad (Wittenburg H et al, 2003), la identificación de TM4SF4 como un factor de riesgo para la litiasis resulta novedoso. A este respecto cabe mencionar que el tratamiento con activadores de FXR previene la litiasis en ratones (Moschetta A et al, 2004) y está descrito que mutaciones en el gen de FXR predispone al desarrollo de litiasis en humanos y ratones (Kovacs P et al, 2008).



## CICLO DE LA UREA: catabolismo de los aminoácidos

El amoníaco es producido continuamente por todos los órganos durante el metabolismo. El músculo esquelético produce grandes cantidades de amonio, concretamente durante el ejercicio, debido a la desaminación oxidativa del AMP junto con el catabolismo de los aminoácidos. El ciclo de la urea es la vía metabólica usada para eliminar estos desechos nitrogenados del organismo que pueden atravesar la barrera hematoencefálica y causar graves problemas en el cerebro.

El amoníaco producido por las células es combinado con ácido glutámico para dar glutamina, un producto menos tóxico, por la acción de la enzima glutamina sintetasa (GS). Posteriormente la glutamina se libera a la circulación sistémica y llega al hígado donde se degrada en el ciclo de la urea. El amoníaco o los compuestos secundarios pueden entrar por casi cualquier parte del ciclo, y el producto final de desecho es la urea, que se excreta en los riñones.

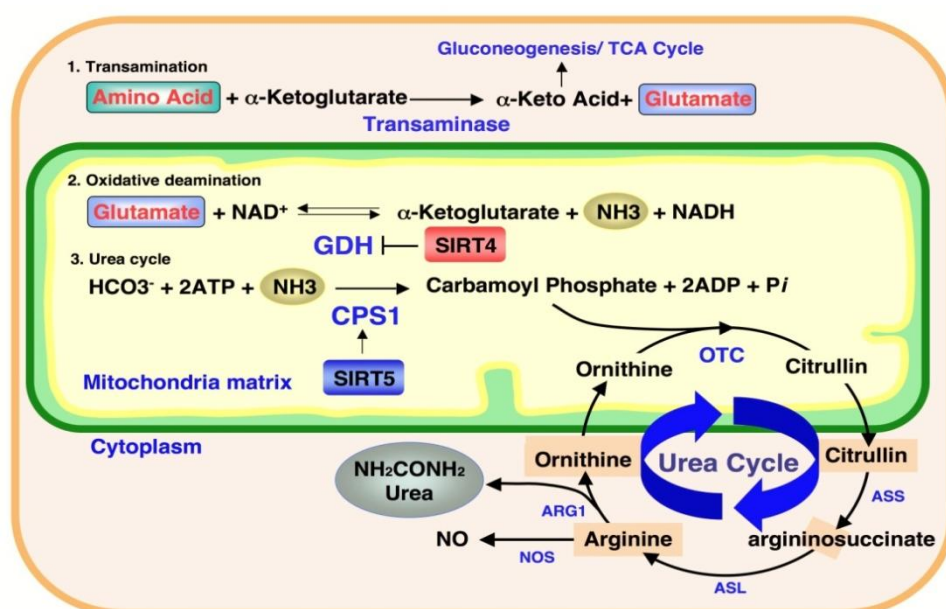


Imagen I. 14: Imagen representativa del ciclo de la urea en el interior de una célula (Nakagawa T et al, 2009).

En el ciclo de la urea, el nitrógeno puede entrar en forma de amoníaco y mediante la carbamoil-P sintetasa (CPS1) forma carbamoil-fosfato que se une a la ornitina y mediante la ornitina trans carbamilasa (OTC) forma citrulina. Posteriormente se forma argininasuccinato al unirse un aspartato a la citrulina, debido a la acción de la argininasuccinato sintetasa (ASS1). La enzima argininosuccinato liasa (ASL) descompone el succinato de arginina para dar fumarato, el cual se integra en el ciclo de Krebs, y la arginina, que es degradada por la enzima arginasa 1 (ARG1) en urea y ornitina, que se emplea en el inicio del ciclo. Por tanto, un adecuado suministro de ornitina y arginina es crítico para el buen funcionamiento del ciclo. Tanto la enzima CPS1 como la OTC desarrollan su función en la matriz mitocondrial, mientras que el resto de enzimas lo hace en el citosol. Estudios recientes han descubierto que la desacetilasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  SIRT5 es capaz de desacetilar en la mitocondria a la enzima CPS1 aumentando así su actividad y el catabolismo de los aminoácidos (Nakagawa T et al, 2009).

Los riñones no son el único órgano que participa en la eliminación de amoniaco del organismo, se ha detectado amoniaco en fase gas en el aliento y en la piel (Hunt JF et al, 2002; Nose K et al, 2005). Pero cuando hay un fallo hepático, la homeostasis del amoniaco se ve profundamente alterada dando lugar a hiperamonemia y al desarrollo de venas portas colaterales que desvían la sangre con alta concentración de amoniaco hacia la circulación sistémica (White LP et al, 1955). Diversos estudios han corroborado que la capacidad de síntesis de la urea está reducida en pacientes que sufren cirrosis hepática (Rudman D et al, 1973; Kaiser S et al, 1988). Por otro lado, otros estudios se han centrado en la relación entre el aumento en los niveles de amoniaco en plasma y la encefalopatía hepática, enfermedad neuropsiquiátrica derivada de una exposición del cerebro y del sistema nervioso a concentraciones elevadas de sustancias tóxicas como el amoniaco (Ong JP et al, 2003). A pesar de que no todos los pacientes que contienen una alta concentración en sangre de amoniaco desarrollan encefalopatía hepática, hay una moderada correlación entre estos dos sucesos que todavía no ha podido ser demostrada en estudios clínicos humanos (Adeva MM et al, 2012).

## **HP/HPR: implicación en el proceso inflamatorio**

La inflamación es una protección que tiene el organismo para eliminar los estímulos nocivos generados por agentes patógenos o irritantes, y para iniciar el proceso de curación. Dicho fenómeno forma parte de un proceso autoinmune que permite la destrucción progresiva del tejido dañado con el objetivo de eliminar el agente patógeno. Sin embargo, dicha destrucción podría comprometer la supervivencia del organismo.

Hay dos tipos de inflamación, la aguda y la crónica. La inflamación aguda es la respuesta inicial del cuerpo a los estímulos nocivos y consiste en un incremento de plasma y leucocitos de la sangre a los tejidos lesionados. Una cascada de eventos bioquímicos propaga y madura la respuesta inflamatoria, que implica el sistema vascular local, el sistema inmunológico, y varias células en el tejido lesionado. La inflamación crónica conduce a un cambio progresivo en el tipo de células presentes en el sitio de la inflamación y se caracteriza por la destrucción simultánea y la curación del tejido del proceso inflamatorio. La inflamación crónica también puede conducir a una serie de enfermedades, como la obesidad, la diabetes, la alergia, la aterosclerosis, la artritis reumatoide, e incluso el cáncer (Lin WW et al, 2007; González-Chávez A et al, 2011; Xu Z et al, 2012).

Las proteínas de fase aguda son proteínas plasmáticas cuya concentración se varía con una reacción inflamatoria. Puede haber positivas, si su concentración aumenta, o negativas, si su concentración disminuye con la inflamación. La interleuquina 6 (IL-6) es el principal estimulador de la producción de la mayoría de proteínas de la fase aguda. La haptoglobina (HP) es una de las proteínas positivas de fase aguda producida principalmente en el hígado (Levy AP et al, 2010). Se une a la hemoglobina (Hb) libre en plasma que se libera de los eritrocitos cuando hay una lisis celular. Su unión permite que se inhiba la actividad oxidativa que muestra la Hb libre y que puede dañar a muchas células a su paso, tanto hepáticas como renales, y así evita la pérdida de hierro a través de los riñones.

Las lipoproteínas HDL ejercen una función anti-inflamatoria mediante el transporte reverso de colesterol, desde los tejidos periféricos hacia el hígado, y previniendo la oxidación de las LDL (Navab M et al, 2000; Ansell BJ et al, 2003). Sin embargo, se ha observado que durante un proceso inflamatorio las propiedades anti-inflamatorias de las HDL disminuyen llegando a convertirse en partículas proinflamatorias que:

- Incrementan los niveles de proteínas proinflamatorias como la SAA (*serum amyloid A*) o la ceruloplasmina (CP) (Van Lenten BJ et al, 1995).
- Aumentan el contenido de fosfolípidos oxidados (Navab M et al, 2001).
- Disminuyen los niveles y la actividad de factores anti-inflamatorios y antioxidantes como la paraoxonasa 1 (PON-1) (Mackness MI et al, 2004).
- Reducen el transporte de colesterol (Navab M et al, 2005).

El receptor nuclear FXR juega un papel fundamental en la protección hepática mediante el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo hepático. Cuando se induce inflamación en ratones mediante la adición de lipopolisacáridos (LPS) se observa una disminución en los niveles hepáticos del mRNA de FXR después de 8h desde la administración (Kim MS et al, 2003). Es más, en este estudio describen que en células de hepatoma humano Hep3B, son TNF $\alpha$  y la interleuquina 1 las responsables

de la disminución de los niveles de FXR al igual que la expresión de algunos de sus genes diana como SHP o apoCII. En células del músculo liso de los vasos sanguíneos (VSMC), FXR se expresa y uno de sus genes diana, SHP, es inducido en estas células por el tratamiento con ligandos sintéticos de FXR (Li YT et al, 2007). Durante este estudio comprueban que los ligandos de FXR inducen la muerte de estas células y reprimen la expresión, inducida por la interleuquina 1 $\beta$ , de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa 2 (COX2), además de la activación de NF- $\kappa$ B. De hecho, un estudio posterior confirmó que los ratones deficientes en FXR mostraban una fuerte inflamación hepática y desarrollaban tumores hepáticos espontáneos con la edad (Yang F et al, 2007). Trabajando con estos ratones demostraron que FXR modulaba negativamente la inflamación hepática mediada por el factor NF- $\kappa$ B, pero que éste a su vez era capaz de suprimir la expresión génica mediada por FXR, existiendo entre estos dos factores un crosstalk negativo específico para la función inflamatoria de NF- $\kappa$ B (Wang YD et al, 2008). También se ha descrito que FXR regula la inflamación intestinal a través de la represión de la vía de NF- $\kappa$ B, y que la sobreexpresión de éste inhibe la actividad de FXR, demostrando una interacción entre las subunidades de NF- $\kappa$ B, p50 y p65, con FXR en un contexto in vitro (Gadaleta RM et al, 2011).

## UBIQUITINAS

La degradación de proteínas es esencial para muchos procesos celulares incluyendo el ciclo celular, la regulación de la expresión génica y la respuesta al estrés. La principal vía de degradación de proteínas es la ubiquitinación y subsiguiente degradación proteosómica (Glickman MH and Ciechanover A, 2002) aunque también se sabe que la ubiquitinación es una modificación postraduccional que no solo sirve para la proteólisis, sino también para aumentar la especificidad en la unión entre determinadas proteínas (Welchman RL et al, 2005) o la activación de quinasas o de procesos de reparación del DNA (Chen ZJ and Sun LJ, 2009).

Hay tres tipos de enzimas que participan en la unión de ubiquitinas a otras proteínas, también llamado proceso de ubiquitinación. La enzima E1 "activa" una sola proteína ubiquitina mediante la unión del grupo carboxilo de la ubiquitina con el grupo tiol de una de sus cisteínas requiriendo para ello una molécula de ATP. El resultado es un grupo tioéster. La enzima E1 entonces transfiere esta ubiquitina activada a la segunda enzima del mecanismo, la enzima E2, que es la encargada de conjugar la ubiquitina por lo que reciben el nombre de conjugasas. Dichas enzimas se encargan de suministrar ubiquitinas activadas a la enzima E3 que ya está unida a la proteína que va a ser ubiquitinizada. Las enzimas E3, también llamadas ligasas, reconocen específicamente secuencias de destrucción y anclan la ubiquitina activada en las lisinas de la proteína diana. Si la proteína debe contener varias moléculas de ubiquitina para ser dirigida al proteosoma para su destrucción, este último proceso puede repetirse las veces necesarias, generando un estado de poliubiquitinación (Hershko A, 1983; Pickart CM and Fushman D, 2004). Las cadenas de poliubiquitina o la propia ubiquitina pueden ser disociadas de la proteína diana gracias a las enzimas de desubiquitinación (DUB o también llamadas isopeptidasas).

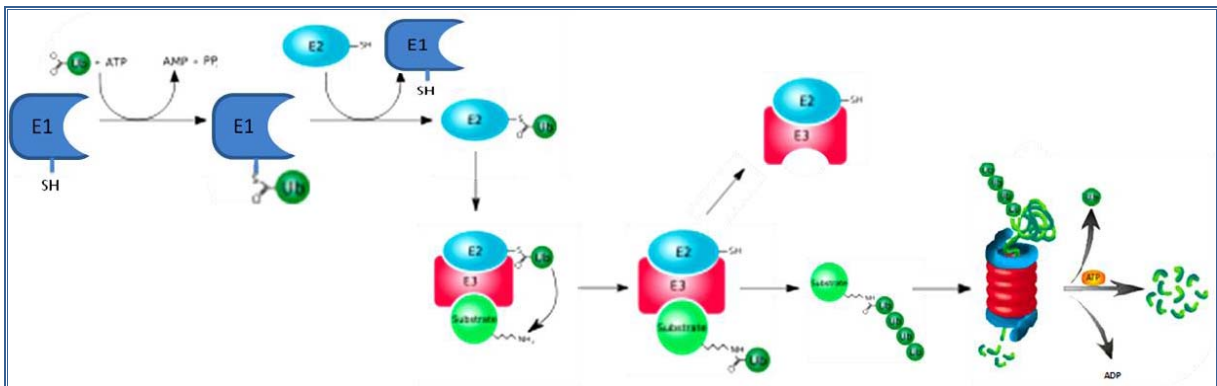


Imagen I.15: Diagrama que ejemplifica el mecanismo de poliubiquitinación de una proteína, denominada aquí sustrato, y su posterior degradación en el proteosoma. Imagen obtenida y modificada a partir de un review sobre ubiquitinación (Brooks SA, 2010) y una página web ([http://www.weizmann.ac.il/Biological\\_Chemistry/scientist/MichalSharon/](http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/MichalSharon/)). Abreviaciones: UB, Ubiquitin; ATP, Adenosine-5'-triphosphate; ADP, Adenosine-5'-diphosphate; AMP, Adenosine-5'-monophosphate; PPi, Phosphate inorganic.

La relación entre ácidos biliares y el proceso de ubiquitinación ha sido recientemente estudiada. Se ha descubierto que ciertos transportadores relacionados con el metabolismo de los ácidos biliares, como NTCP o BSEP (ver páginas 7 y 8), son ubiquitinizados. El receptor NTCP, un transportador de ácidos biliares desde el exterior del hepatocito al interior, colocaliza con la ubiquitina y se ha comprobado su poliubiquitinación (Kuhlkamp T et al, 2005). En el caso del receptor BSEP, un transportador de ácidos biliares desde el hepatocito al conducto biliar, es ubiquitinizado solo por 2 ó 3

ubiquitinas (Hayashi H and Sugiyama Y, 2009). La regulación de ambos transportadores de ácidos biliares es crucial para el desarrollo de enfermedades tan graves como la colestasis, que implica una acumulación de ácidos biliares en el hígado, y la ubiquitinación es uno de los procesos que controla sus niveles de expresión en las membranas plasmáticas.

La ubiquitinación puede influir en la estabilidad y en la actividad de genes cruciales en el metabolismo de los ácidos biliares como SHP (ver páginas 7 y 8). El receptor nuclear SHP es rápidamente degradado por el sistema de ubiquitina-proteosoma (vida media aproximada de 30 minutos). Los ácidos biliares bloquean la ubiquitinación de este receptor nuclear y sin embargo inducen la expresión del factor de crecimiento FGF19 que activa en el hepatocito la cascada de señalización de ERK. De esta forma SHP es fosforilado por ERK lo que resulta en un aumento de la estabilidad de la proteína SHP y también de su actividad represora (Miao J et al, 2009).

Muchos procesos de ubiquitinación guardan relación con el sistema inmunitario. La ISG15 (*IFN-stimulated gene, 15 kDa*) es una proteína similar a la ubiquitina (Ubl, *ubiquitin like protein*) que responde al estímulo de interferón IFN- $\alpha$  y  $\beta$ , factores que juegan un papel esencial en la inmunidad innata a patógenos como los virus, las bacterias o las células cancerosas. Se ha descubierto que esta Ubl se une específicamente a la enzima conjugasa tipo E2, UBE2L6 (Zhao C et al, 2004). También se encuentran otros tipos de Ubl más relacionadas con procesos inflamatorios y tumorales como la proteína UBD (también llamada FAT10), cuya expresión es inducida por estímulos asociados a inflamación como por ejemplo el interferón  $\gamma$  (Raasi S et al, 1999) y el factor de necrosis tumoral alfa, TNF- $\alpha$ , para posteriormente activar la vía de señalización de NF- $\kappa$ B (Gong P et al, 2010; Ren J et al, 2011). También se ha descubierto que dicha proteína es reprimida por p53, un factor transcripcional implicado en la regulación del ciclo celular, la respuesta al daño del DNA y la apoptosis (Zhang DW et al, 2006).

No solo las Ubl tienen implicaciones importantes en procesos biológicos, muchas enzimas ligasas (E3) tienen implicaciones en el ciclo celular o en procesos cancerígenos. Un ejemplo es la conocida FBXO2 (también llamada FBG1), capaz de unirse al gen APC2, un factor crucial en la división celular, e inhibirlo haciendo que las células permanezcan ancladas en la fase S del ciclo celular (Wen H et al, 2010). Otra ligasa importante es la Nedd4l (*Human neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4 like*) ya que se expresa en varios tipos de células cancerosas. Por un lado hay estudios en los que la disminución en su expresión la relacionan con un empeoramiento en la prognosis del cáncer de glioma humano y con su progresión (He S et al, 2012); mientras que otros estudios relacionan la disminución de su expresión con una disminución en las colagenasas, MMP1 y 13, que implican una inducción del carácter invasivo del cáncer, en este caso de vesícula biliar (Takeuchi T et al, 2011). Un estudio reciente ha relacionado a NEDD4L con los factores de transcripción Smad 2/3 inducidos por TGF $\beta$ . Este factor de crecimiento induce la fosforilación de Smad2 y Smad3 activándolos para que puedan unirse a Smad4, translocarse al núcleo y ejercer la regulación transcripcional de varios genes. Se ha descrito como Nedd4L reconoce específicamente a Smad2/3 fosforilados por TGF $\beta$  y los marca para su degradación, limitando así la vía de señalización de este factor de crecimiento (Gao S et al, 2009; Aragón E et al, 2011).

## **ADH1: metabolismo del etanol**

El abuso crónico de bebidas alcohólicas causa enfermedades hepáticas graves como la esteatosis, la hepatitis alcohólica, la cirrosis e incluso el cáncer hepático (Savolainen VT et al, 1993). El hígado es el órgano que más sufre los daños causados por el alcohol debido a que lo recibe directamente por la vena porta desde el tracto intestinal. Dicho órgano es el encargado de metabolizar el etanol y por tanto está en contacto con metabolitos potencialmente tóxicos como el acetaldehído, el acetato y las especies reactivas de oxígeno (Lieber CS, 1997).

En humanos la principal enzima encargada de metabolizar alcoholes es la alcohol deshidrogenasa (ADH, EC 1.1.1.1). Existen 5 clases diferentes de ADH y cada clase puede tener más de un gen que codifica para distintas subunidades de la enzima. En mamíferos la clase I (ADH1) cataliza la oxidación del etanol a acetaldehído en el hígado (Edenberg HJ, 2000). En ratas y ratones hay un único gen para esta clase de ADH (ADH1), pero en primates esta clase está constituida por tres genes ADH1A, ADH1B y ADH1C. En humanos estos tres genes están organizados en tándem dentro de un *cluster* en el cromosoma 4, y tienen una alta similitud de secuencia (exones: >90%; intrones: >70%), lo que sugiere que son el resultado de una duplicación génica a lo largo de la evolución (Oota H et al, 2007). Estos tres genes codifican para diferentes subunidades de la enzima ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente), que dimerizan y se unen al zinc para formar la enzima activa (Smith M et al, 1972).

Otra enzima importante en la metabolización del alcohol es CYP2E1 (cytochrome P450 2E1). Esta enzima se expresa principalmente en los microsomas de las células hepáticas (Neve EP and Ingelman-Sundberg M, 2000). Un estudio reciente ha mostrado que dicha enzima se correlaciona con un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y de peroxidación de lípidos (Bell NL et al, 2010).

Durante la reacción de oxidación del etanol a acetaldehído el hidrógeno liberado es transferido al cofactor  $\text{NAD}^+$  (*nicotinamide adenine dinucleotide*) convirtiéndolo en su forma reducida (NADH). Este aumento en la especie reducida NADH produce cambios en el potencial redox del citosol que derivan en desórdenes metabólicos importantes (Domschke S et al, 1974). Un ejemplo es la variación del ratio lactato/piruvato que puede derivar en hiperlactacidemia, que contribuye a la acidosis láctica y reduce la capacidad de los riñones de excretar el ácido úrico, dando lugar a la hiperuricemia (Lieber CS et al, 1962). Por otro lado el incremento del ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  favorece la acumulación hepática de triglicéridos ya que aumenta la síntesis de ácidos grasos y disminuye su degradación en el ciclo de Krebs debido a la necesidad que tienen determinadas reacciones del ciclo del cofactor NAD. Dichos efectos ocasionan alteraciones metabólicas graves como el aumento de la lipogénesis, la disminución de la liberación de lipoproteínas y disminución de la oxidación de ácidos grasos, lo que conlleva cambios permanentes en la estructura y en las funciones de la mitocondria (Lieber CS, 1992).

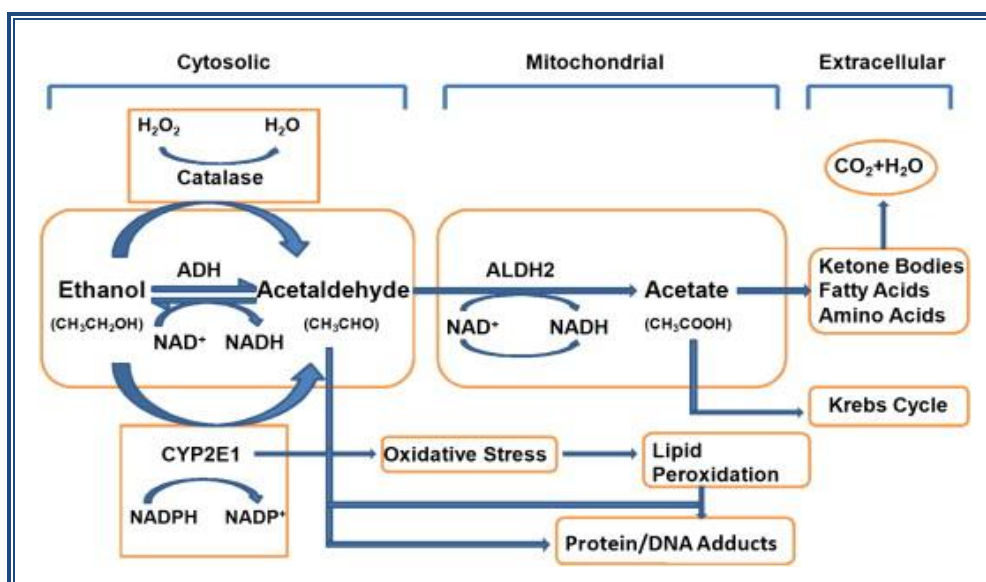


Imagen 1.16: Representación esquemática de la metabolización del etanol en las células hepáticas y sus efectos en los distintos metabolismos intra y extracelulares (Zhang Y and Ren J, 2011).

El receptor nuclear FXR no solo está encargado de la regulación de genes implicados en el metabolismo de los ácidos biliares, sino que numerosos estudios abogan por su papel crucial en la detoxificación de xenobióticos (Jung D et al, 2006; Modica S et al, 2009). Se ha demostrado que las diferentes isoenzimas de ADH1 participan en el metabolismo de los ácidos biliares. Así, el gen *ADH1B* está específicamente implicado en la oxidación del alcohol biliar 5 $\beta$ -colestano-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetrol, un intermediario clave en la formación del ácido cólico (Okuda A and Okuda K, 1983); mientras que *ADH1C* cataliza la oxidación de 3-beta-hidroxi-5-beta-esteroides para promover la epimerización de ácidos biliares 3 $\beta$ , generados por las bacterias intestinales, a ácidos biliares 3 $\alpha$ , los cuales serán secretados desde el hepatocito a la bilis (McEvily AJ et al, 1988).

Debido a todos los efectos que produce el etanol en las principales vías metabólicas, y a la importante función de FXR como detoxificador, el estudio de la posible regulación de las ADH1 por el receptor nuclear FXR cobra un interés enorme para regular los efectos dañinos del consumo de alcohol en el organismo humano.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## METODOLOGÍA DE DNA

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la DNA polimerasa permite la síntesis enzimática de secuencias de DNA definidas. La reacción utiliza dos oligonucleótidos (*primers*) como encebadores donde la enzima se unirá y comenzará la reacción de copiar el DNA. Mediante ciclos repetitivos de desnaturalización del DNA molde, hibridación de los *primers* y extensión de la acción de la enzima se consigue una acumulación exponencial ( $2^n$  moléculas de DNA; siendo "n" las moléculas de DNA molde) de los fragmentos de DNA limitados por las secuencias de los *primers*.

Para el diseño de los *primers* se va a tener en cuenta los siguientes criterios:

- La longitud óptima de los *primers* debe estar entre 18-20 pb
- El tanto por ciento ideal de G+C debe ser de 40-60%.
- En el extremo 5' se recomienda que haya un enriquecimiento de nucleótidos A/T para favorecer la unión de la enzima.
- Al colocar dianas de restricción en el extremo 5' de la secuencia se deben añadir también entre 4-6 nucleótidos que favorezcan la unión de la enzima Taq polimerasa y el posterior reconocimiento por la enzima de restricción.
- Comprobación de que no existen estructuras secundarias dentro de un *primer* que pueden dificultar la unión de la Taq polimerasa.
- Se deben comprobar la fidelidad de los *primers* diseñados, asegurándose que no reconocen otras secuencias no deseadas ( utilización de la web BLAST)

Las amplificaciones se realizan con la enzima *Biotherm™ Taq Polymerase (Attend Bio GC-002-0500)* en un termociclador *Minicycler MJ Research, Inc.* o un *PTC-100 MJ Research, Inc.* Cuando se subclonaron fragmentos de promotores, se usaron enzimas que tenían mayor fidelidad por el DNA molde como la ACUPRIME y la PFU 50x. Las condiciones generales que se usaron se detallan en la siguiente tabla para un volumen final de 50µl.

#### Reacción de PCR

DNA molde.....	5-10 ng
Tampón <i>Taq</i> 10x .....	.5 µL
MgCl <sub>2</sub> .....	1,5 mM
dNTPs.....	.0,2mM cada dNTP
Oligo <i>forward</i> .....	1 µM
Oligo <i>reverse</i> .....	1 µM
<i>Taq</i> DNA polimerasa.....	.2.5 U.l
Agua q.s.p.....	.50 µL
Aceite mineral .....	.50 µL

#### Condiciones de amplificación

Desnaturalización inicial ( <i>hot start</i> ).....	94°C.....	.5 min
Desnaturalización.....	94°C.....	.45 s
Hibridación.....	55°C-68°C.....	.45 s
Extensión.....	72°C.....	.1 min/Kbp
Amplificación.....	.25-30 cycles	
Extensión final.....	72°C.....	.10 min

### Electroforesis en gel de agarosa

Se realiza la electroforesis en gel de agarosa (Sigma, Ref.: A5093) para la separación de fragmentos de DNA de tamaños comprendidos entre 50bp y 25kb con el objetivo de analizar resultados y/o la posible purificación de fragmentos de DNA aislados. La resolución de estos geles depende de la concentración de agarosa. La mayor concentración de agarosa es indicada para separar mejor los fragmentos más pequeños de DNA mientras que a menor concentración de agarosa mayor separación de fragmentos de mayor tamaño. La electroforesis se desarrolla en un tampón TAE.

Para preparar las muestras para la electroforesis se les añadió un tampón de carga y para comparar los tamaños de los fragmentos de DNA de las muestras se utilizaron distintos marcadores de DNA:

- Marcador DNA 100bp (*Biotoools*, Ref.:31006) con bandas entre 100-1000pb
- Marcador DNA 1Kb (*Biotoools*, Ref.:31005) con bandas entre 250-10000pb
- Marcador DNA 50bp

El DNA se visualiza gracias a la incorporación de bromuro de etidio (0.5 µg/ml; Sigma, Ref.: E4134) que se intercala entre las cadenas de DNA e irradia cuando se le aplica luz ultravioleta (310nm).

### Purificación de fragmentos de DNA

Se utiliza el kit comercial *Wizard™ SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Ref.: A9282) siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial.

### Modificación enzimática del DNA

- Digestión: para ello se utilizaron enzimas de restricción de tipo II que permitieron identificar fragmentos de DNA y subclonar en diferentes vectores utilizados. El protocolo que se siguió es específico para cada una de las digestiones aunque siempre siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Fermentas, New England Biolabs) y digiriendo, como norma general, un µg de DNA.

- Defosforilación: mediante la utilización de la fosfatasa alcalina (Roche, Ref.: 713023) se hidrolizan los fosfatos del extremo 5' de las cadenas de DNA. En general se utilizan entre 100-200ng/µl de DNA por cada 0.1 U.I. de enzima/µg de DNA que se tiene que diluir en su tampón específico proporcionado por la casa comercial a una concentración de 10x. La reacción se incubó durante una hora en una estufa a 37°C, se inactiva posteriormente la enzima durante 10 minutos a 75°C y se realiza una extracción fenol-cloroformo.

- Generación de extremos romos: esta técnica utiliza la actividad klenow de la enzima DNA polimerasa (Promega, Ref.: M220A) para completar los extremos 5' protuberantes de las secuencias de DNA. Durante esta tesis se utiliza esta técnica para los ensayos de EMSA en los cuales se aprovechan los primers que se utilizan para la obtención de los *duplex* de primers pero rellenándolos con esta klenow DNA polimerasa y marcándolos con ATP radioactivo. La reacción se realiza en un volumen final de 20µl con entre 0.1 y 4 µg de DNA de doble cadena, una mezcla de dNTPs a 25µM cada uno, tampón específico de la enzima 1x y la enzima Klenow a 1U.I. Se incubó 30 min a 30°C y la enzima se inactiva manteniéndola a 75°C durante 15 min.

- Ligación: la ligasa del bacteriófago T4 (*Promega*, Ref.: M1801) cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre fragmentos de DNA. La reacción se lleva a cabo en un volumen final de 20 µl donde se añaden 40 µg de vector, entre 3-5 veces más de µg de inserto (teniendo en cuenta los tamaños de inserto y de vector), tampón específico de la enzima y la T4 DNA ligasa con 1µl. Posteriormente se incubó una hora a temperatura ambiente, o se deja toda la noche en hielo.

- Mutagénesis dirigida: el método seguido para obtener mutaciones puntuales en los plásmidos generados ha sido proporcionado por el kit *QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Stratagene*, Ref.: 200518) que permite la síntesis de DNA mutado a partir de un molde de doble cadena circular utilizando dos cebadores complementarios entre sí y que contengan la secuencia mutada (Fisher y Pei, 1997).

## Transformación en células *Escherichia coli*

La transformación de plásmidos realizada en esta tesis ha permitido introducir el DNA plasmídico generado en bacterias *E.coli* con el objetivo de que sean reproducidos en dichas células y obtener una mayor cantidad que posteriormente será utilizada en la transfección de distintos modelos celulares eucariotas.

Previamente a poner en contacto las bacterias con el DNA plasmídico, se realiza una permeabilización de las membranas bacterianas por el método de cloruro cálcico (Mandel y Higa, 1970). La cepa de *E. coli* usada habitualmente en nuestro laboratorio es la DH5 $\alpha$  que nos permite una eficiencia de transformación aproximada de  $10^6$ - $10^7$  de células transformadas por  $\mu\text{g}$  de DNA.

El protocolo consiste en poner en contacto el producto de ligación con las células DH5 $\alpha$  competentes y realizar un tratamiento de choque térmico con el objetivo de favorecer la entrada del DNA plasmídico. Por cada 100 $\mu\text{l}$  de bacterias, se añaden 7 $\mu\text{l}$  de ligación. Posteriormente se someten a 10 minutos en hielo, 5 minutos a 37°C y dos minutos más en hielo. Se añaden 800 $\mu\text{l}$  de medio LB no selectivo atemperado a 37°C y se incuban en agitación durante 1 hora a 37°C. Por último se crecen unos 200 $\mu\text{l}$  en una placa de medio de cultivo LB-Agar con el antibiótico correspondiente que permita la selección de solo aquellas bacterias que hayan introducido en su interior el plásmido que posee resistencia al antibiótico.

## Obtención a partir de cultivos bacterianos y cuantificación

Para obtener DNA plasmídico lo realizamos a través del crecimiento de la cepa bacteriana DH5 $\alpha$  (*GibcoBRL*) crecida en medio líquido LB autoclavado y al que adicionamos el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido que estemos usando para seleccionar solo aquellas bacterias que tengan el plásmido que nos interesa.

<u>Antibiótico</u>	<u>Concentración de trabajo</u>	<u>Referencia</u>
Ampicilina	100mg/L	Roche, Ref.: 10 835 242 001
Kanamicina	50mg/L	Sigma, Ref.: K1377

Para obtener el DNA de las bacterias utilizamos dos tipos de técnicas, dependiendo del volumen que se haya utilizado para cultivar las bacterias. Si se parten de 2ml realizamos una miniprep siguiendo el protocolo del kit comercial (Wizard<sup>TM</sup> Minipreps DNA Purification; *Promega*, Ref.: A1460) para obtener entre 1-10 $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico. Mientras que si se parte de 200ml se realiza una maxiprep siguiendo el protocolo del kit comercial (*kit Nucleobond AX 500 / 50 cart.*; *Cultek*, Ref.:740531.50), obteniéndose entre 100-500 $\mu\text{g}$  de DNA plasmídico.

La cuantificación se realiza por la determinación espectrofotométrica de la absorbancia de la muestra a 260nm y 280nm (1 unidad de densidad óptica a 260nm = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de DNA). La relación entre las dos absorbancias indica la pureza de la muestra y se considera aceptable a partir del valor de 1.8. Se usó 2 $\mu\text{l}$  de cada muestra usando un *NanoDrop 1000* (*NanoDrop Technologies*, Inc).

## Secuenciación automática

Para el análisis de la secuencia del DNA de los plásmidos amplificados en la transformación, posterior crecimiento en grandes volúmenes de LB y obtención mediante los kits descritos en el apartado anterior, se lleva a cabo la secuenciación automática en la empresa especializada *Macrogen*.

## **METODOLOGÍA DE RNA**

### **Obtención y cuantificación de RNA**

La obtención de RNA se puede realizar a partir de un cultivo celular o a partir de tejido animal. En ambos casos se utiliza el reactivo comercial Trizol® (*Life Technologies*, Ref.:15596-026) que consiste en una solución de fenol e isocianato de guanidina que mantiene la integridad del RNA cuando se lisan las células.

En el caso de la obtención de RNA a partir de un cultivo celular se utiliza 1ml de Trizol® por placa de 100mm y posteriormente se procede a la recolección de las células lisadas con un rascador. En el caso de la obtención a partir de tejido, se rompe un fragmento del tejido en un mortero en presencia de N<sub>2</sub> líquido y escoge un fragmento de este inferior al 10% del volumen de Trizol®. Posteriormente se homogeneiza la mezcla del tejido y el Trizol® en un *polytron RPT-MR 2100* (*Kinematica AG*).

En ambos casos, después de la homogeneización se añade un volumen de cloroformo realizando la extracción del RNA (fase acuosa superior) de los otros componentes celulares, proteínas y DNA. Posteriormente se precipita con isopropanol y se resuspende en agua libre de RNAsas (*Sigma*, Ref.: W4502).

La concentración de RNA de las muestras se determina por medición de su absorbancia a 260nm y 280nm considerando una OD<sub>260</sub> equivalente a 40µg/ml de RNA. El ratio entre las dos absorbancias indica la pureza de la muestra, considerándose aceptable a partir del valor 1.8. La lectura se realiza con 2µl de la muestra en un *NanoDrop 1000* (*NanoDrop Technologies*, Inc).

### **Obtención de cDNA a partir de RNA**

Esta técnica permite la obtención de cDNA a partir de muestras de RNA mediante la utilización de la enzima vírica transcriptasa reversa (*Invitrogen*, Ref: 28025-013). Con el objetivo de obtener un cDNA representativo del RNA total presente en la muestra se utilizan para realizar la PCR unos encebadores degenerados (*Random primers*, *Roche Diagnostics*, Ref: 11 034 731 001).

#### Reacción de retro-transcripción (Vf= 20µL)

RNA total.....	1-2 µg
<i>Random primers</i> .....	0.25 µg
dNTPs 10mM cada uno.....	1 µL
Agua q.s.p.....	13 µL

#### Desnaturalización (65°C, 5 min)

<i>First strand buffer 5x*</i> .....	4 µL
DTT 0.1M.....	2 µL
M-MLV.....	1 µL (200U.I.)

\* Tampón suministrado por la casa comercial

Incubación.....37°C, 50 min

Inactivación de la enzima.....70°C, 15 min

## PCR a tiempo real

Esta técnica permite el análisis de la expresión de un gen de la manera muy rápida y sensible. El RNA total retrotranscrito es amplificado por PCR y medida su amplificación en cada ciclo es ésta gracias al uso de reactivos fluorescentes que o bien se unen a la secuencia amplificada (*TaqMan probes*®), o bien se intercalan en el DNA de doble cadena generado (*Sybr Green*®).

Durante la realización de esta tesis se han llevado a cabo PCRs con ambos reactivos y la secuencia de los *primers* usados se detalla en las tablas situadas en la sección de anexos. Las reacciones se han llevado a cabo según los protocolos proporcionados por la casa comercial que nos ha suministrado los reactivos siendo ésta la casa *Applied Biosystems*.

Se han utilizado los aparatos *ABI PRISM® 7700 Sequence detection system (Applied Biosystems)* y *Step One plus* normalizando siempre los valores obtenidos por el gen ribosomal 18S que no varía con los tratamientos llevados a cabo durante esta tesis y por tanto funcionando como control interno.

Los resultados fueron analizados con el método comparativo  $\Delta\Delta Ct$  (Pfaffl, 2001) y expresados en veces de cambio con respecto al control experimental que se haya usado en cada experimento.

## METODOLOGÍA DE PROTEÍNAS

### Obtención de extractos totales

Para la obtención de un extracto de proteínas totales las células se recogen en PBS 1x y se centrifugan durante 10 minutos a 2000g. Posteriormente se resuspende el pellet celular en un tampón NP40 (1ml/p100) completado con PMSF (*Sigma*, Ref.: P7626) e inhibidores de proteasas (*Sigma*, Ref.: P8340).

#### Tampón NP40

Tris-HCl pH 8.....	50mM
NP40* .....	1%
NaCl.....	150mM

\*(*Calbiochem*, Ref.: 492016)

Este tampón se suplementa extemporáneamente con 0,1mM PMSF (*Sigma*, Ref: P7626) y otros inhibidores de proteasas (*Sigma*, Ref. P8340).

Se mantienen girando en un orbital a 4°C durante 15-20 minutos y se centrifuga durante 15 minutos a 4°C a 1500rpm. El sobrenadante se pasa a otro tubo y se cuantifica por el método de bradford o BCA. Los extractos proteicos deben conservarse a -80°C.

### Obtención de proteínas de membrana

El protocolo para la obtención de proteínas de membrana se obtuvo del artículo de (Wice BM and Gordon JI, 1995). En él lavan las células dos veces con PBS 1x frío y añaden RIPA buffer ( 1ml/p100) suplementado con inhibidores de proteasas.

#### Tampón RIPA

PBS.....	1x
Deoxicolato sódico.....	1%
Tritón X-100.....	1%
SDS.....	0,1%

Este tampón se suplementa extemporáneamente con 0,1mM PMSF (*Sigma*, Ref: P7626) y otros inhibidores de proteasas (*Sigma*, Ref. P8340).

Posteriormente se hace pasar la disolución celular a través de una jeringuilla con una aguja 27G unas 25 veces. El material insoluble se centrifuga durante 5 min a 12000g. La parte soluble contiene el extracto membranosos cuya concentración debe mantenerse por debajo de 300mg/ml para evitar la agregación de la proteína TM4SF4, y no debe calentarse antes de cargarse en el gel de SDS-PAGE.

### Cuantificación de proteínas

El método mayoritariamente usado para la cuantificación de proteínas fue el método de *Bradford*. El protocolo seguido en esta tesis es el descrito por el fabricante (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*, Ref. 500-0006), utilizando como proteína patrón la albúmina sérica bovina, BSA (*Sigma*, Ref.: A7906).

Cuando la proporción de detergente existente en el tampón de lisis celular era excesivo con respecto a los límites establecidos por el fabricante del reactivo Bradford, se utilizaba la solución de BCA (*Thermo Scientific*; Ref: 23227) siguiendo las instrucciones del fabricante para realizar la cuantificación.

### Electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS permite la separación de proteínas según su peso molecular (Laemmli 1970). Previamente a la carga del gel de acrilamida las proteínas deben ser desnaturalizadas mediante la presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (*Merck*, Ref.: 8.05740), un agente reductor de puentes disulfuro, de SDS (*Panreac*, Ref.: 142363.1209), detergente que se une a las proteínas confiriéndolas carga negativa y el calentamiento durante 10 min a 90-100°C.

#### Tampón de carga para proteínas 2X (Laemmli Buffer)

Tris-HCl pH6.8.....	50mM
SDS.....	2%
Glicerol.....	10%
Azul de bromofenol.....	0.012%
$\beta$ -mercaptoetanol.....	5%

Los geles de acrilamida son fabricados en el laboratorio y contienen dos fases, la fase apiladora y la fase separadora. Se diferencian en la concentración de acrilamida ya que la fase separadora tiene definido su porcentaje de acrilamida en función del tamaño de la proteína a separa, oscilando entre 5% para proteínas de alto peso molecular (superior a 100KDa) y 15% para proteínas de bajo peso molecular (menores de 15KDa).

#### Gel apilador

Acrilamida ( <i>Bio-Rad</i> , Ref.: 161-0156).....	5%
Tris-HCl pH 6.8.....	0,12M
SDS.....	0,1%
Persulfato amónico 10% ( <i>Sigma</i> , Ref.: A3678).....	0,1%

#### Gel separador

Acrilamida.....	5-15%
Tris-HCl pH8.8.....	0,37M
SDS.....	0,1%
Persulfato amónico 10%.....	0,1%



## Materiales y métodos

Además de estos reactivos, para la polimerización de estos geles se añade un agente polimerizante, TEMED (*Sigma*, Ref.: T9281) que variaba en función de la concentración de acrilamida añadida, 0,08 al 0,04%.

Para llevar a cabo la electroforesis a 30mA se coloca el gel de acrilamida embebido en el tampón de electroforesis:

### Tampón de electroforesis

Tris-HCl pH8.8.....	25mM
Glicina ( <i>Panreac</i> , Ref.: 141340.1211).....	0.19M
SDS.....	0.1%

Como patrón de los pesos moleculares de proteínas se utiliza el marcador *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (*Fermentas* Ref.: SM0441).

## Inmunotransferencia (Western Blot)

La técnica de Western Blot permite la transferencia de las proteínas de un gel de poliacrilamida-SDS a una membrana de PVDF (*Immobilon-P*, 0.45µm, *Millipore*, Ref.: IPVH00010) que posteriormente se incubará con los anticuerpos específicos de la proteína a estudiar.

La transferencia se va realizar en un *Mini Trans blot* (*Bio-Rad*) durante un tiempo mínimo de 2h, a 4°C y 120mA con un tampón de transferencia:

### Tampón de transferencia

Tris.....	25mM
Glicina.....	0.2M
Metanol.....	20% (v/v)

Una vez realizada la transferencia se satura la membrana con PBS-T (PBS-1%*Tween20 Scharlau*, Ref.: TW00201000) suplementada con un 5% de leche en polvo desnatada. Después de un mínimo de una hora en esta solución de bloqueo se incuba con el anticuerpo primario siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Después de 3 lavados con PBS-T de 10 min cada uno, se incuba con el anticuerpo secundario. Para la inmunodetección de las proteínas se usa el kit *EZ-ECL™ Western blotting detection reagent* (*Reactiva*, Ref.: 20-500-120).

Los anticuerpos utilizados durante esta tesis se resumen en esta tabla:

	Especie	Referencia	Dilución Primario	Tiempo de incubación	Secundario	Ref. Secundario	Dilución Secundario
<b>NDRG2</b>	Humano	Abnova H0057447-M03	1/200	O/N	Ratón	<i>Amersham Biosciences</i> , NA931V	1/2000
<b>TM4SF4</b>	Humano	Santa Cruz Sc-103272	1/500	O/N	Cabra	Santa Cruz A1810	1/2000
<b>panADH1</b>	Humano	Santa Cruz Sc-22750	1/200	O/N	Cabra	Santa Cruz A1810	1/2000
<b>FXR</b>	Humano	Invitrogen # A9033A	1/1000	1h	Ratón	<i>Amersham Biosciences</i> , NA931V	1/2000
<b>FXR</b>	Humano	Santa Cruz Sc-13063	1/1000	O/N	Conejo	<i>Amersham Biosciences</i> , NA934V	1/5000
<b>Actinas</b>	Humano	Sigma Aldrich # A2066	1/5000	1h	Conejo	<i>Amersham Biosciences</i> , NA934V	1/10000

## **CULTIVOS CELULARES**

Durante el desarrollo de esta tesis se han manejado numerosas líneas celulares cuyo nombre, tejido, especie, tipo, procedencia y medio de cultivo se resumen en la siguiente tabla.

Nombre	Tejido	Especie	Tipo	Procedencia	Medio
Huh7	Hígado	Humano	Carcinoma	Japan health Sciences Foundation, HSRRB	DMEM completo + 10% FBS
HepG2	Hígado	Humano	Carcinoma	Laboratorio <sup>1</sup>	MEM completo + 10% FBS
Caco-2	Colon	Humano	Carcinoma	Laboratorio <sup>1</sup>	DMEM completo + 10% FBS
HT29	Colon	Humano	Carcinoma	Grupo de la Dra. Rosa Jiménez <sup>1</sup>	DMEM completo + 10% FBS
HUVEC	Endotelio de vena umbilical	Humano	Primario	Grupo del Dr. José Martínez <sup>2</sup>	** M199 + Hepes + 20% FBS
VSMC	Músculo liso de arteria aorta	Humano	Primario	Grupo del Dr. José Martínez <sup>2</sup>	M199 + 20% FBS + 2% Suero humano
HK-2	Túbulo proximal renal	Humano	Inmortalizadas	Grupo de la Dra. Anna Meseguer <sup>3</sup>	DMEM/F12 + Hepes + 2%FBS + ITS*
MDA-MB-231	Mamario	Humano	Carcinoma	Grupo del Dr. Carles Ciudad <sup>1</sup>	F12 + 7% FBS
MCF7	Mamario	Humano	Carcinoma	Laboratorio <sup>1</sup>	DMEM completo + 10% FBS
AC16	Músculo de corazón	Humano	Inmortalizadas	Grupo del Dr. Manuel Vázquez Grupo de PhD MM Davidson <sup>4</sup>	***DMEM/F12 + 12,5% FBS
Hepatocitos Primarios	Hígado	Humano	Primarios	Ready Hepes <sup>TM</sup> Fresh Hepatocytes, Lonza	Hepatocyte Complete Medium (Lonza)
AML12	Hígado	Ratón	Inmortalizadas	Grupo de la Dra. M <sup>a</sup> Luz Martínez Chantar <sup>5</sup>	DMEM/ F-12 + 100mM dexametasona + ITS*
Hepa 1-6	Hígado	Ratón	Carcinoma	Grupo del Dr. Jorge Ferrer <sup>6</sup>	DMEM completo + 10% FBS

\* ITS: Insulina, transferrina y selenita sódica (Roche); \*\*: Añadir ECGS + heparina. Cultivo en placas con 1% gelatina; \*\*\*: Añadir 1% fungizona

<sup>1</sup>: Laboratorios pertenecientes al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la UB, Barcelona.

<sup>2</sup>: CSIC-ICCC, Hospital Sant Pau, Barcelona.

<sup>3</sup>: CIBBIM, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona.

<sup>4</sup>: Departamento de farmacología y farmacognosia de la Facultad de Farmacia de la UB, Barcelona. Davidson MM, Department of Radiation Oncology, Columbia University, NY, USA.

<sup>5</sup>: CIC-BioGUNE, Bilbao.

<sup>6</sup>: IDIBAPS-CIBERDEM, Hospital Clínic, Barcelona.

## **TRATAMIENTOS DE LÍNEAS CELULARES**

Los tratamientos habituales realizados en las líneas celulares usadas:

	Producto	Casa comercial	Referencia	Concentración en células
Ligandos FXR	DMSO	Panreac	161954.1611	Vehículo
	GW4064	Glaxo SmithKline	278779-30-9	1, 2 ó 5 µM
	CDCA	Sigma Aldrich	C8261	50 ó 100 µM
Ligando PPAR $\alpha$	WY14643	Sigma Aldrich	C7081	10 µM
	Actinomicina D	Sigma Aldrich	A9415	5 µg/ml
	Cicloheximida	Sigma Aldrich	C1988-16	10 µg/ml

### **EXPERIMENTACIÓN ANIMAL**

Para los experimentos con animales se usaron ratones C57BL/6 macho de edad pareja (8-10 semanas) *wild-type* y FXR<sup>-/-</sup> (The Jackson Laboratory, Ann Harbor, MI, EE.UU.; Ref #007214) que fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar y mantenidos en un ciclo estándar de 12 h luz/ 12 h oscuridad. El tratamiento llevado a cabo con el ligando de FXR se ha realizado una vez, al inicio de la fase lumínica, mediante inyección peritoneal del vehículo (aceite de maíz) o vehículo conteniendo GW4064 a una dosis de 50 mg/kg de peso corporal (n = 5 por grupo genético y farmacológico: wt+vehículo; wt+GW4064; FXR<sup>-/-</sup>+vehículo; FXR<sup>-/-</sup>+GW4064). Después de la inyección se les retiró la comida y pasadas 8h desde dicha inyección los ratones fueron sacrificados para la extracción de tejidos, los cuales fueron congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta ser procesados. Se ha obtenido por separado hígado, intestino y riñón. El intestino delgado se extrajo, se lavó con PBS frío y se dividió en tres segmentos de igual longitud que se designaron como duodeno (proximal), yeyuno (medio) e íleon (distal). El fragmento ileal se abrió longitudinalmente y se extrajo la mucosa que fue congelada también en nitrógeno líquido.

Este protocolo experimental con ratones se llevó a cabo con la aprobación del comité ético de animales de la Universidad de Barcelona (número de pedido DMAH 5453).

### **TRANSFECCIONES TRANSITORIAS – ENSAYOS REPORTERO**

Las células en las que se ha llevado a cabo la técnica de transfecciones transitorias con plásmidos comerciales o contruidos en el laboratorio son células de hepatoma humano Huh7 o HepG2. El protocolo seguido en las transfecciones consta de los siguientes pasos:

1. **Plaqueo de células:** en el caso de las Huh7 se plaqueaban  $2 \times 10^5$  células/pocillo en una placa de 24 pocillos.
2. **Transfección:** al día siguiente del plaqueo se transfectaban las células con *Lipofectamine™ LTX Reagent* (*Invitrogen*, Ref.: 15338-100) en una relación de 1,2µl de Lipofectamina por cada 1µg de DNA. Por cada pocillo siempre se han transfectado 10ng del plásmido de Renila (pRL-CMV) como control interno, 100ng del plásmido reportero y 200ng del plásmido de expresión. La cantidad total de DNA en cada pocillo se mantiene constante mediante la adición de vectores vacíos reporteros o de expresión.
3. **Tratamiento:** después de mínimo 6 horas después de la transfección, o al día siguiente, se realiza el tratamiento de las células con el medio usado habitualmente pero con un 10% de FBS Charcoal Stripped y con el tratamiento correspondiente según el experimento.

Después de 24h de tratamiento, las células son lavadas con PBS frío dos veces y lisadas con 100µl de 1x Passive lysis buffer (*Promega*, Ref.: E1941). Los extractos celulares obtenidos se analizan con el kit comercial *Dual-Luciferase™ Reporter Assay System* (*Promega*, Ref.: E1960), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las cantidades usadas son 10µl de extracto celular por 20µl de los reactivos proporcionados en el kit. La luminiscencia emitida se mide en un luminómetro *Sirius* de *Berthold Detection System*. Los resultados obtenidos se procesan dividiendo la luminiscencia emitida por la luciferasa producida por los reporteros entre la renila emitida por el plásmido usado como control pRL-CMV. Esto muestra la actividad luciferasa emitida por cada plásmido reportero.

Los plásmidos utilizados durante esta tesis son:

1. **Vector de subclonaje:** a veces, cuando la subclonación se ha complicado, se ha usado el vector **pGEM®-T** (*Promega* Ref.: A3600) para facilitar tal clonación en el vector final reportero siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial.
2. **Vectores reporteros:** para la subclonación de los plásmidos generados en el laboratorio se ha usado el vector **pGL3-basic** (*Promega*, Ref.:E1751) ya que no tiene un promotor que regule la expresión del gen de la luciferasa.

3. **Vectores de expresión:** como vector habitual de expresión se ha usado el vector **pSG5** que contiene un promotor T7 que regula la expresión de los cDNAs clonados *in vitro*, y un promotor SV40 que regula la expresión *in vivo*. También se ha usado el vector **pCDNA3** cuya expresión *in vitro* la controla un promotor T7 o SP6, y un promotor CMV que regula la expresión *in vivo*; y el vector **pGL3-TK** originado a partir del pGL3-basic y con el promotor TK.
4. **Plásmidos usados en el laboratorio:** en la siguiente tabla se detallan los plásmidos generados en el laboratorio o cedidos por otros grupos y sus dianas de clonación.

Plásmidos reporteros:	Clonación	Especie	Dianas de clonaje	Coordenadas (bp) *	IR1	Posición IR1
<b>NDRG2</b>	Promotor, exones e intrones	ratón	Kpn I / Nhe I	-437 / +1966	+757 bp	2º intrón
<b>TM4SF4</b>	Promotor	humano	Kpn I / Nhe I	-1975 / +208	-81 bp	promotor
<b>GPLD1</b>	Promotor	humano	Mlu I / Xho I	-1986 / +93	-6 bp	promotor
<b>TCEA2</b>	IR1	humano	-	+9079	+9079 bp	2º intrón
<b>RBP4</b>	Promotor	humano	Nco I	-1192 / -1	-	-

Los óligos utilizados para construir estos plásmidos se detallan en el apartado de anexos así como los óligos usados para su secuenciación como forma de comprobación de la fiabilidad de la secuencia subclonada.

## **MICROARRAYS**

Los *microarrays* realizados en células Huh7 y Caco-2 se llevaron a cabo en la Plataforma Funcional Genomics Core Facility del Institut de Recerca Biomèdica situado en el Parc Científic de Barcelona. Con ambas células se llevó a cabo un tratamiento con GW4064 (2µM) y se procedió a la extracción del RNA con Trizol. Posteriormente se llevó a cabo una doble precipitación para mejorar la pureza del RNA. En el caso de las Huh7 se realizaron los estudios con 2 muestras por cada condición y en el caso de Caco-2 se realizaron con 3 muestras por condición.

Los *microarrays* realizados en células HK-2, hVSMC y HUVEC se llevaron a cabo en la Unitat de Genòmica de l'IDIBAPS perteneciente al Hospital Clínic de Barcelona. Con estos tres tipos celulares se realizaron infecciones con el AdVP16FXR que sobreexpresa FXR, y el control AdVP16 durante 48h. En las últimas 24h de la infección se realiza un tratamiento con GW4064 (2µM) y se procedió a la extracción del RNA con Trizol. Posteriormente se llevó a cabo una doble precipitación para mejorar la pureza del RNA. Las condiciones que se analizaron en los *microarrays* fueron AdVP16+DMSO, AdVP16FXR+DMSO y AdVP16FXR+GW4064 con tres muestras por condición.

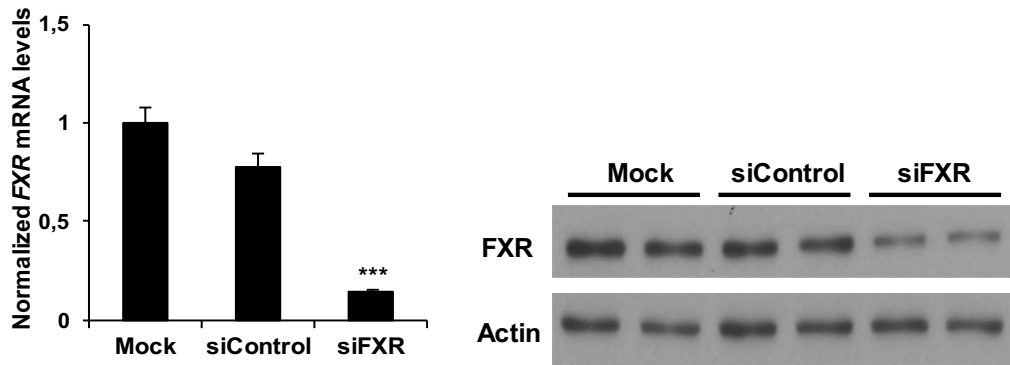
Para todos los *microarrays* realizados se utilizaron chips de la casa comercial Affymetrix denominados Genechip® Human gene 1.0 ST. Estos chips representan 28.869 genes con una media de 26 sondas repartidas a lo largo de la secuencia entera de cada gen.

## **SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE siRNAs**

Los experimentos de silenciamiento se llevaron a cabo en células Huh7 con los siRNAs específicos de FXR (siGENOME SMARTpool, M-003414-01), SHP (siGENOME SMARTpool, M-003410-01) o control (siGENOME Non-Targeting siRNA #1, D-001210-01) de la casa comercial Dharmacon (Thermo Fisher). La transfección se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante usando 5µl del reactivo de transfección DharmaFECT-4 (Dharmacon) y los siRNAs a una concentración de 25nM por pocillo para el siRNA de FXR y 100nM por pocillo para el siRNA de SHP. A las 48h de la transfección se realizaron los tratamientos con GW4064 a 5µM y 2µM respectivamente durante 24h. Posteriormente, tras las 72h transcurridas, se lavan las células con PBS y se obtienen RNA o extractos totales para analizar por PCR a tiempo real o por WB.

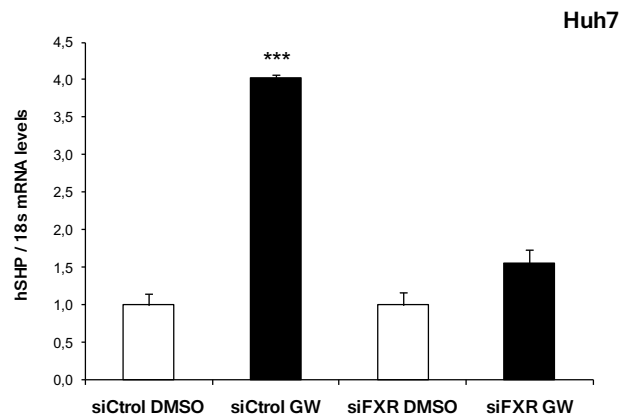
## Materiales y métodos

Antes de analizar los diversos genes en presencia del siRNA específico de FXR se analizó la eficiencia de transfección cuantificando los niveles de FXR a nivel de mRNA y proteína.



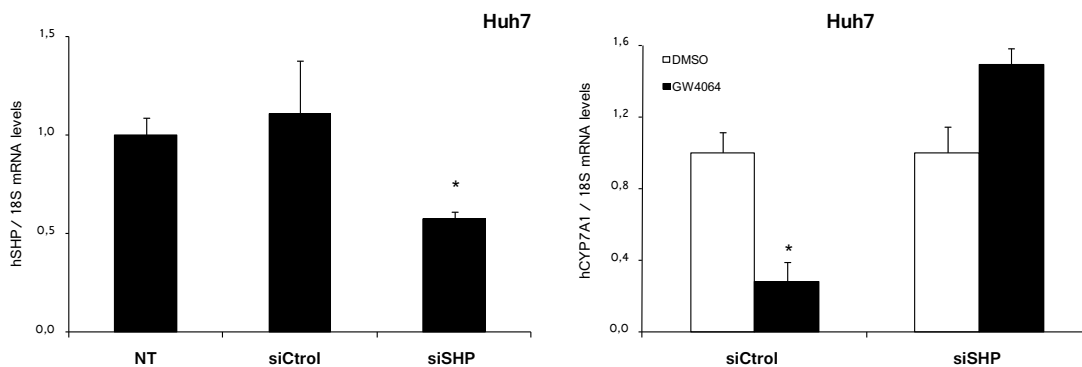
Niveles de mRNA y proteína, extractos totales, de FXR en Huh7 tras la transfección de los siRNA control y siFXR. Mock: células Huh7 sometidas únicamente al reactivo de transfección Dharmafect 4. Media  $\pm$  SEM. Estudio estadístico realizado con *T Student* con respecto a células Mock; \*\*\* $P < 0.001$ .

La funcionalidad del siFXR se comprobó analizando los niveles de *SHP* por PCR a tiempo real.



Niveles de mRNA de *SHP* en Huh7 tras la transfección de los siRNA control y siFXR durante 48h. Las células fueron tratadas con GW4064 (2 $\mu$ M) o su vehículo DMSO durante las últimas 24h de la infección. Media  $\pm$  SEM. Estudio estadístico realizado con *T Student* con respecto a células transfectadas con siCtrl y tratadas con DMSO; \*\*\* $P < 0.001$ .

En el caso del siRNA específico de *SHP* se analizó la eficiencia de transfección cuantificando los niveles de *SHP* y *CYP7A1* a nivel de mRNA.



Niveles de mRNA de *SHP* y *CYP7A1* en Huh7 tras la transfección de los siRNA control y siSHP (100nM). NT: células Huh7 no transfectadas. Media  $\pm$  SEM. Estudio estadístico realizado con *T Student* con respecto a células NT; \* $P < 0.05$ .

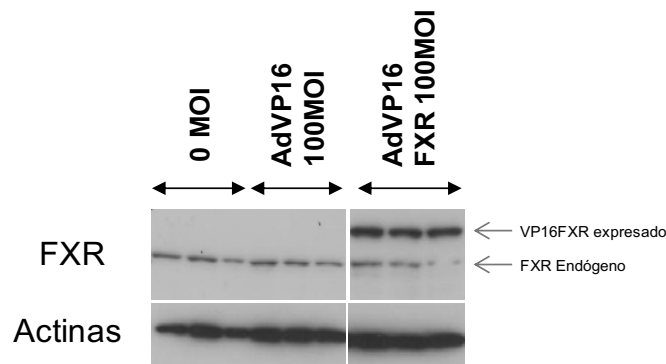
## **INFECCIÓN CON ADENOVIRUS**

La infección con adenovirus se llevó a cabo en diferentes modelos celulares con los adenovirus que expresan VP16 (AdVP16) y la quimera VP16FXR (AdVP16FXR), de manera que la expresión de FXR está constitutivamente activada, cedidos por el laboratorio del Dr. A. Moschetta (Consorzio Mario Negri Sud, Chieti, Italia) que fueron obtenidos como se detalla en su artículo (Modica S et al, 2008). Las células fueron infectadas durante 48h y tratadas con GW4064 en las últimas 24h de la infección.

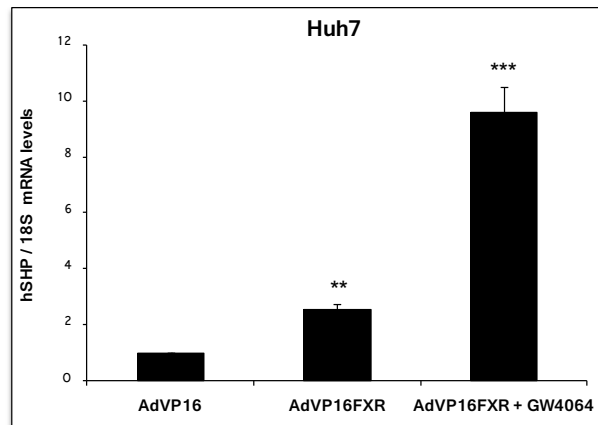
Se amplificaron y la titulación obtenida para ambos adenovirus fue:

AdVP16	1.089 10 <sup>10</sup> pfu/ml
AdVP16FXR	3.95 10 <sup>10</sup> pfu/ml

Se comprobó la eficiencia de la infección y la expresión de la quimera VP16FXR por WB de extractos totales de Huh7 con el anticuerpo contra FXR, utilizando un anticuerpo contra actinas como control:



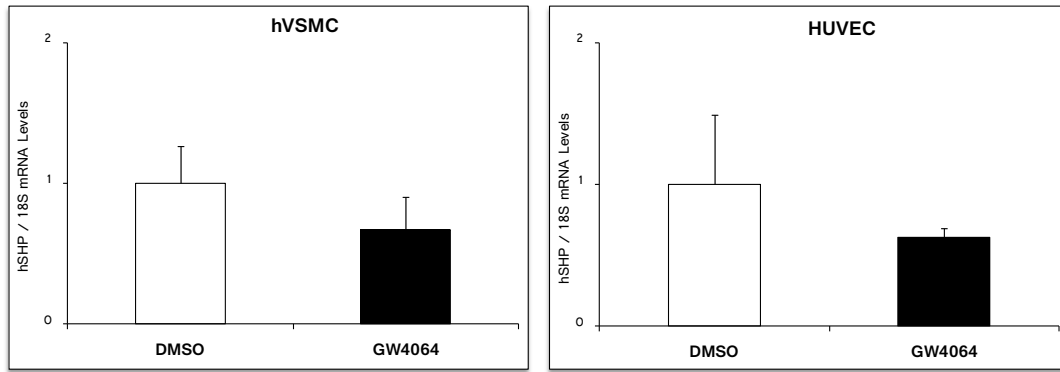
También se comprobó que la sobreexpresión de FXR era funcional midiendo los niveles del mRNA de SHP, uno de los genes diana de FXR, en Huh7 infectadas con AdVP16 y AdVP16FXR (ambos con 100MOIs) durante 48h y tratadas durante las últimas 24 horas con GW4064 (2µM).



Niveles de mRNA de *SHP* en Huh7 tras la infección de los AdVP16 y AdVP16FXR (100MOIs). Media  $\pm$  SEM; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001. Estudio estadístico realizado con *T Student* con respecto a células infectadas con AdVP16.

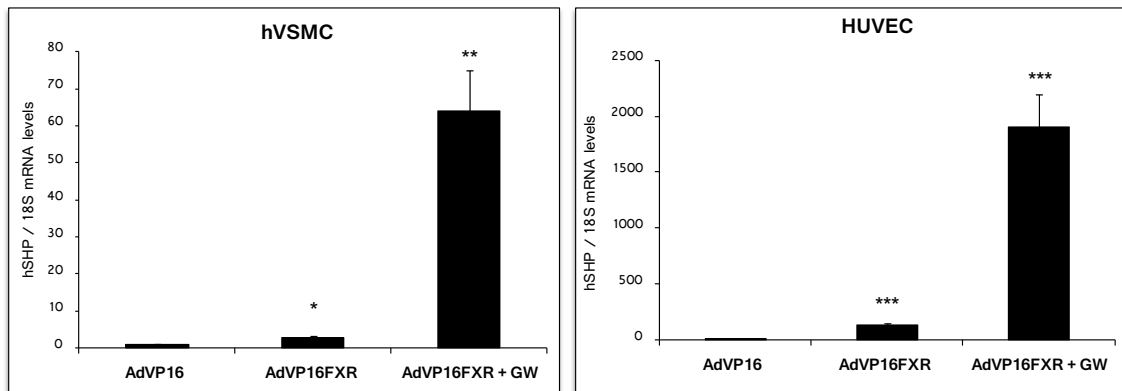
Al trabajar con las células HUVEC y VSMC en cultivo no se obtuvo respuesta al ligando sintético de FXR, a pesar de que su expresión está demostrada (Bishop-Bailey D et al, 2004; He F et al, 2006; Li YT et al, 2007) y de trabajar con pases muy bajos.

## Materiales y métodos



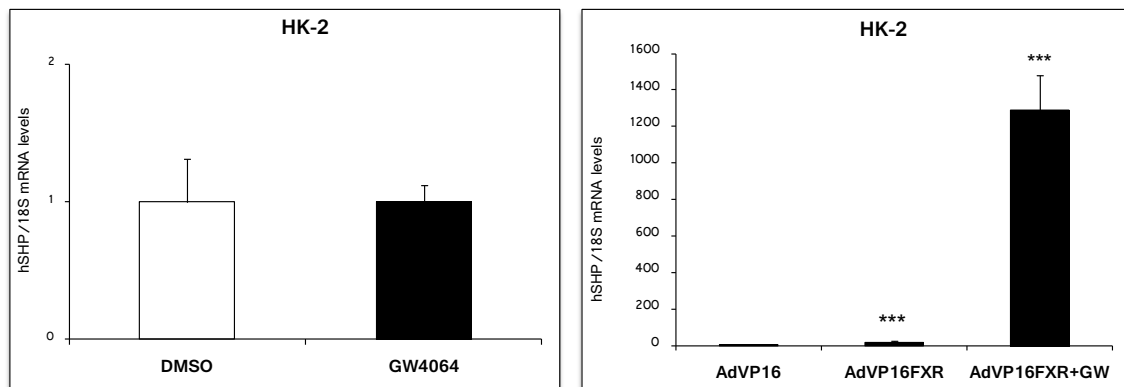
Células hVSMC y HUVEC tratadas con GW4064 (5 $\mu$ M) durante 24 horas. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos con n=3/condición; la estadística con respecto a los valores DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Debido a esto, para conseguir una expresión adecuada de FXR, se infectaron las células con AdVP16FXR y se comprobó la inducción de SHP en ambos modelos.



Células HUVEC y VSMC infectadas con AdVP16 y AdVP16FXR (100 y 40 MOIs respectivamente) durante 48h y tratadas durante las últimas 24 horas con GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de dos experimentos con n=3/condición; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; estadística con T-test de Student en comparación con los niveles de AdVP16.

La expresión de FXR en riñón está reportada (Bishop Bailey D et al, 2004; Lee H et al, 2006), sin embargo las células humanas de túbulo proximal (HK-2) mostraban niveles muy bajos de FXR (Ct=29) frente a Huh7 (Ct=21) y no había inducción de los niveles de SHP al tratar dichas células con GW4064. Debido a esto las células fueron infectadas con AdVP16FXR y tratadas posteriormente con GW4064 para completar la activación de FXR. En estas situaciones se midieron los niveles de SHP.



Células HK-2 tratadas con GW4064 (5 $\mu$ M) o infectadas con AdVP16 y AdVP16FXR (50 MOIs respectivamente) durante 48h y tratadas durante las últimas 24 horas con GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de dos experimentos con n=3/condición; \*\*\*P<0.001; estadística con T-test de Student en comparación con los niveles de DMSO o de AdVP16.

## **ENSAYOS DE GST- PULL DOWN**

Esta técnica permite identificar la interacción existente entre dos proteínas de una forma *in vitro*. El método se basa en construir una quimera mediante la fusión de una de las proteínas de interés con la Glutación-S-transferasa (GST). Posteriormente se realiza una transcripción y traducción *in vitro* de la otra proteína de interés marcándola radiactivamente. El complejo se incuba con una resina de glutatión sefarosa durante 4h a 4°C.

### Reacción de unión

GST eluida.....	50µg
TnT.....	4µl
Tampón de unión.....	1ml

### Tampón de unión (preparación en el momento del uso)

Leche desnatada.....	0.5%
DTT.....	1mM
Inhibidores de proteasas.....	1x
NETN .....	q.s.p.

Para precipitar el complejo se centrifuga durante 1min, a 2000rpm. La resina se limpia a temperatura ambiente con NETN dos veces y se mezcla con el tampón de carga de proteínas para realizar la electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS.

Una vez terminada la electroforesis se fija el gel con una solución de ácido acético al 7% durante 1h y se deshidrata con DMSO durante 30 minutos, dos veces. Seguidamente se incuba el gel durante 3h con una solución PPO al 20% en DMSO para rehidratarlo después con agua durante 1h. Posteriormente se sumerge el gel en una solución glicerol-metanol (5%-30%) durante 30 minutos evitando la ruptura del gel. Por último se procede al secado a 80°C durante 2h en un secador al vacío. Se revela el resultado poniéndolo en contacto con una película autorradiográfica durante toda la noche.

## **ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR (MTT)**

Los estudios de viabilidad celular se llevaron a cabo utilizando el método basado en la reducción de sales de terazolol (MTT) a formazán mediante las deshidrogenasas mitocondriales que son activas solo en células viables. A las células Huh7 tratadas con los ligandos de FXR, CDCA y GW4064, se las incubó en medio DMEM sin rojo de fenol (Sigma D2902) + 10% *Charcoal Stripped*. Posteriormente se añade 0.5mg de MTT por cada ml de medio y se incuban 2-3h en un incubador a 37°C. Pasado este tiempo y comprobando el cambio de color de las células (se vuelven marrones) se absorbe el medio con cuidado y se añade 1ml de isopropanol ácido (isopropanol absoluto + 0.1N de HCl). Se recogen las células en un tubo y se centrifugan durante 2min a 13000rpm. Posteriormente se lee la absorbancia a 570nm en un espectrofotómetro.

## **ENSAYOS DE RETARDACIÓN EN GEL (EMSA)**

El protocolo seguido en esta técnica consta de varias fases de preparación de las muestras, desde la transcripción y traducción *in vitro* de proteínas hasta el marcaje de los oligos.

### ▪ Transcripción y traducción de proteínas *in vitro* (TNT):

Los plásmidos pSG5, pSG5-FXR y pSG5-RXR, fueron transcritos y traducidos *in vitro* usando el kit comercial TNT Quick Master Mix (Promega).

#### **TNT Reaction:**

40µL TNT@ T7 Quick Master Mix
1µL Metionina 1mM



1µL plásmido (1µg/µL)

8µL H<sub>2</sub>O

Mezclar bien con la pipeta y dejar 90min a 30°C en agitación. Conservar a -80°C hasta su uso.

▪ Preparación del gel nativo:

Para preparar 40ml de gel:

TBE 5x.....	4ml
Acilamida/Bis (40%; 29:1).....	4.5ml
H <sub>2</sub> O.....	31.3ml
APS 30% .....	200µl
TEMED.....	37µl

Se debe dejar polimerizar durante 30min como mínimo.

▪ Preparación de la sonda y marcaje:

Cada par de oligonucleótidos (1.5µl de cada uno a 100µM) se añaden a 47µl de tampón de hibridación.

Annealing buffer:

Tris HCL pH8 1M.....	50µl
KCl 2M.....	25µl
MgCl <sub>2</sub> 1M.....	5µl
H <sub>2</sub> O.....	895µl

La mezcla se pone en un termociclador y se somete a un calentamiento previo de 98°C durante 5min, posteriormente 65°C durante 10min, 60°C durante 2min, 55°C durante 2min, 50°C durante 2min, 37°C durante 2min, 22°C durante tiempo indefinido.

El marcaje de la sonda se realiza:

- 1.5µL H<sub>2</sub>O
- 1µL tampón 10x de la enzima Klenow DNA pol I
- 2.5µL sonda 10ng/µL
- 1µL dNTP mix (dATP, dGTP, dTTP; 10mM cada uno)
- 3µL α <sup>32</sup>P- dCTP
- 1µL Klenow DNA pol I (5U/µL; Promega M2201)

Se incuban los TNT con el tampón de unión:

**Binding buffer 5x:**

Tris HCL pH7.4 1M.....	50µl
KCl 1M.....	200µl
NP40.....	0,25 %
Glicerol al 50%.....	600µl
DTT 100mM.....	50µl
H <sub>2</sub> O.....	97,5µl

**Binding Reaction:**

- 4µL Binding buffer 5x
- 2µL TNT® T7 Quick Master Mix
- 1µL polyIdC (1µg/µL) (Amersham 27-7880-01)
- 12µL H<sub>2</sub>O

Posteriormente se incubaba durante 15min exactos en hielo. En ensayos de competición esta incubación se realiza en presencia de oligos sin marcar radiactivamente. Pasado este tiempo se añaden los oligos marcados y se incubaba durante 20min a temperatura ambiente. Finalmente se cargan en el gel nativo junto con un marcador *6xLoading buffer Bromo Phenol Blue dye*. Cuando el primer colorante llegue al final del gel, se para la electroforesis, se seca el gel con 2 *whatman* 3mm y se seca durante 2h a 80°C en el *Dryer Bio-Rad 583*. La imagen se revela con un *Phosphorimager*.

## **INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP)**

### ▪ Cross-linking:

Las células Huh7 se plaquean,  $5 \times 10^6$  / placa de 100mm, con su medio de crecimiento durante 24h. Se añade formaldehído a una concentración final de 1% para fijar las uniones de las proteínas con el DNA. Se dejan 10min a 37°C. La reacción se para añadiendo glicina a una concentración final de 0.125M y se deja la placa en agitación durante 5min a temperatura ambiente.

### ▪ Recolección de células:

Se lavan las células con PBS 1x suplementado con PMSF 0.5mM y se recogen las células con la ayuda de un rascador y en el tampón CEI. Se centrifugan a 4°C durante 5min a 2000g para bajar las células y resuspenderlas con PBS frío. Se vuelven a centrifugar a 4°C durante 5min a 2000g y se resuspenden en el tampón NCPI suplementado con inhibidores de proteasas. Se vuelven a centrifugar a 4°C durante 5min a 2000g y esta vez se resuspenden con el tampón NCPII suplementado con inhibidores de proteasas. Se centrifugan de nuevo a 4°C durante 5min a 2000g.

### ▪ Lisado de células y sonicación:

Las células centrifugadas se lisan con 600µl de tampón de lisis suplementado con inhibidores de proteasas y se agitan durante 10min a temperatura ambiente a velocidad lenta para evitar espuma. Se sonican las células usando un Bioruptor® Next Gen (Diagenode) en 10 ciclos de 30s *on/off* en la posición *high*. Posteriormente se centrifugan a 10000g a 4°C durante 10min, y el sobrenadante se transfiere en un nuevo tubo.

Para analizar la eficiencia del sonicado antes de proceder con la inmunoprecipitación, se procede al *descrosslinked* y a la obtención del DNA, por extracción fenol/cloroformo y precipitación con etanol, de una alícuota de 50µl del sonicado. Posteriormente se analiza el tamaño del DNA sonicado (aproximadamente 1µg) en un gel de agarosa al 1%. Tras comprobar que las bandas del DNA están a 500pb, se procede a la inmunoprecipitación con las muestras sonicadas que se han congelado a -80°C.

### ▪ Inmunoprecipitación:

Se diluyen 25µg de cromatina sonicada, por cada condición, con tampón de inmunoprecipitación (hasta 1ml). Se le añaden 30µg de la IgG de la que proceda el anticuerpo que se vaya a usar para inmunoprecipitar, y 20µl de proteína A/G agarosa *beads* (Santa Cruz Biotechnology) para realizar un prelavado que evitará uniones inespecíficas. Se deja rotando durante al menos 2h a 4°C y a baja velocidad. Posteriormente se centrifuga a 4°C durante 2min a 800g.

El sobrenadante se pasa a un tubo nuevo y se añaden 5µg de anticuerpo específico (anti-FXR, sc-13063) o IgG de suero de conejo, como control no específico. Se deja rotando O/N a 4°C y velocidad baja. Al día siguiente se adicionan 20µl de la proteína A/G agarosa *beads* en cada muestra y se deja rotando 4h a 4°C. Posteriormente se centrifuga a 4°C durante 2min a 800g.

### ▪ Lavados del ChIP y extracción:

Las *beads* precipitadas se lavan con tampones WBI, WBII, WBIII y 2xTE a pH=8 centrifugando durante 2min a 800g y 4°C entre cada lavado. Se añaden 100µl de tampón de elución se re agita en un *termomixer* durante 2min a temperatura ambiente. Se centrifuga durante 2min a 800g y se guarda el sobrenadante en un tubo nuevo. Esta acción se repite 3 veces hasta tener un volumen de 300µl. El DNA inmunoprecipitado se deja a 65°C, o/n para que se separe de las proteínas, y posteriormente se extrae utilizando fenol/cloroformo para precipitarlo después con etanol y acetato sódico (3M, pH=5.2). Seguidamente se realiza la PCR para analizar los genes que se han enriquecido con la inmunoprecipitación.

## Materiales y métodos

Los tampones usados en esta técnica se resumen en esta tabla:

<b><u>CEI buffer</u></b>	<b><u>NCPI buffer</u></b>	<b><u>NCPII buffer</u></b>	<b><u>Lysis buffer</u></b>	<b><u>IP buffer</u></b>
Tris-HCL 100mM pH 9.4	EDTA 10mM	EDTA 1mM	SDS 1%	Tris-HCL 20mM pH 8
DTT 10mM	EGTA 0.5mM	EGTA 0.5mM	EDTA 10mM	EDTA 2mM
	Hepes 10mM pH 6.5	Hepes 10mM pH 6.5	Tris-HCL 50mM pH 8	NaCl 150mM
	Triton X-100 0.25%	NaCl 200mM	PMSF 1mM	Triton X-100 1%
	<b><u>WBI buffer</u></b>	<b><u>WBII buffer</u></b>	<b><u>WBIII buffer</u></b>	<b><u>Elution buffer</u></b>
	Tris-HCL 20mM pH 8	Tris-HCL 20mM pH 8	Tris-HCL 20mM pH 8	SDS 1%
	EDTA 2mM	EDTA 2mM	LiCl 0.25mM	NaHCO <sub>3</sub> 0.1M
	NaCl 150mM	NaCl 500mM	NP40 1%	(freshly prepared)
	Triton X-100 1%	Triton X-100 1%	Deoxycholate 1%	
	SDS 0.1%	SDS 0.1%	EDTA 1mM	



## **RESULTADOS**



Con el objetivo de identificar nuevos genes diana humanos del receptor nuclear FXR, un sensor enterohepático de ácidos biliares, empleamos aproximaciones genómicas y farmacológicas que nos permitieron analizar diferencias en la expresión génica. Mediante el uso de la tecnología de micromatrices, se realizó un experimento en células de hepatoma humano Huh7 tratadas con un ligando sintético y específico de FXR (GW4064). Con estas muestras se realizó el estudio de comparación de expresión génica entre muestras tratadas con GW4064 y tratadas con el vehículo (DMSO). El chip utilizado para la realización de este *microarray* es el *GeneChip® Human Gene 1.0 ST* (Affymetrix) que representa 28.869 genes.

Algunos de los resultados de dicho experimento se plasman en la tabla siguiente, que permite la visualización de determinados genes que han sido objeto de estudio durante la tesis.

### **Microarray en células Huh7**

Gene Symbol	Log 2	Gene assignment	RefSeq
<b>BSEP</b>	2,258	ATP-binding cassette, sub-family B, member 11 (ABCB11)	NM_003742
<b>OST beta</b>	2,095	Organic solute transporter beta	NM_178859
<b>OST alpha</b>	1,825	Organic solute transporter alpha	NM_152672
<b>ICAM1</b>	1,714	Intercellular adhesion molecule 1	NM_000201
<b>FGF19</b>	1,294	Fibroblast growth factor 19	NM_005117
<b><u>NDRG2</u></b>	1,234	NDRG family member 2	NM_201540
<b><u>UBE2L6</u></b>	0,925	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	NM_004223
<b><u>ADH1B</u></b>	0,898	Alcohol dehydrogenase 1 B	NM_000668
<b><u>TCEA2</u></b>	0,877	Transcription elongation factor A (SII), 2	NM_198723
<b>NDRG4</b>	0,874	NDRG family member 4	NM_020465
<b>SHP</b>	0,857	Nuclear receptor subfamily 0 (NROB2)	NM_021969
<b><u>UBD</u></b>	0,833	Ubiquitin D	NM_006398
<b><u>FABP3</u></b>	0,798	Fatty acid binding protein 3	NM_004102
<b>KNG1</b>	0,743	Kininogen 1	NM_000893
<b>EGR1</b>	0,679	Early growth response 1	NM_001964
<b><u>NEDD4L</u></b>	0,566	Neural developmentally down-regulated 4-like	NM_015277
<b><u>GPLD1</u></b>	0,535	Glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	NM_001503
<b><u>ADH1A</u></b>	0,501	Alcohol dehydrogenase 1 A	NM_000667
<b><u>TM4SF4</u></b>	0,442	transmembrane 4 L six family member 4	NM_004617
<b><u>ADH1C</u></b>	0,269	Alcohol dehydrogenase 1 C	NM_000669
<b><u>FBXO2</u></b>	0,243	F-box protein 2	NM_012168
<b>CD40</b>	0,220	TNF receptor superfamily member 5	NM_001250
<b>CRABP2</b>	0,216	Cellular retinoic acid binding protein 2	NM_001878
<b>TFRC</b>	0,211	Transferrin receptor (p90, CD71)	NM_003234
<b><u>CPT2</u></b>	0,000	Carnitine palmitoyltransferase II	NM_000098
<b>CD163</b>	0,000	CD163 molecule (acute phase-regulated receptor)	NM_004244

## Resultados

<b>CYP7A1</b>	0,000	Cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	NM_000780
<b>ASL</b>	-0,078	Argininosuccinate lyase	NM_001024943
<b>CPT1B</b>	-0,099	Carnitine palmitoyltransferase 1B	NM_152247
<b>STAT3</b>	-0,107	Signal transducer and activator of transcription 3	NM_139276
<b>ACADM</b>	-0,108	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	NM_000016
<b>OTC</b>	-0,137	Ornithine carbamoyltransferase	NM_000531
<b>APOA1</b>	-0,156	Apolipoprotein A-I	NM_000039
<b><u>PPAR<math>\alpha</math></u></b>	-0,158	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	NM_005036
<b><u>SIRT5</u></b>	-0,184	Sirtuin 5	NM_031244
<b><u>CRAT</u></b>	-0,187	Carnitine acetyltransferase	NM_000755
<b><u>CROT</u></b>	-0,193	Carnitine O-octanoyltransferase	NM_021151
<b><u>ACSL5</u></b>	-0,209	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 5	NM_016234
<b><u>SLC25A20</u></b>	-0,244	Solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase)	NM_000387
<b>HNF4A</b>	-0,289	Hepatocyte nuclear factor 4, alpha	NM_000457
<b>ACAD11</b>	-0,308	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 11	NM_032169
<b><u>HMGCS2</u></b>	-0,329	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	NM_005518
<b><u>ASS1</u></b>	-0,339	Argininosuccinate synthetase 1	NM_000050
<b>ARG1</b>	-0,373	Arginase, liver	NM_000045
<b>APOC3</b>	-0,407	Apolipoprotein C-III	NM_000040
<b><u>CPT1A</u></b>	-0,452	Carnitine palmitoyltransferase 1A	NM_001876
<b>ACSS2</b>	-0,473	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	NM_018677
<b><u>EHHADH</u></b>	-0,490	Enoyl-Coenzyme A hydratase (EHHADH)	NM_001966
<b><u>SLC27A2</u></b>	-0,553	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter)	NM_003645
<b>PON1</b>	-0,587	Paraoxonase 1	NM_000446
<b><u>ACSM3</u></b>	-0,614	Acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	NM_005622
<b><u>PLA2G1B</u></b>	-0,675	Phospholipase A2, group IB	NM_000928
<b><u>HPR</u></b>	-0,698	Haptoglobin-related protein	NM_020995
<b><u>HP</u></b>	-0,732	Haptoglobin	NM_005143
<b>NDRG1</b>	-0,790	N-myc downstream regulated 1	NM_001135242
<b>TNFSF10</b>	-0,835	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	NM_003810
<b>VCAM1</b>	-0,999	Vascular cell adhesion molecule 1	NM_001078
<b>BHMT</b>	-1,105	Betaine-homocysteine methyltransferase	NM_001713
<b><u>CPS1</u></b>	-1,581	Carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	NM_001875

Fig. 1: Tabla-resumen de los resultados obtenidos en el experimento de micromatrices realizado en células Huh7 tratadas durante 24 horas con GW4064 (2 $\mu$ M). Los genes subrayados se estudiarán con detalle posteriormente.



Con el propósito de continuar con la identificación de nuevos genes diana de FXR ampliamos la búsqueda a otros tejidos en los que FXR se expresa. Se realizaron otros experimentos de *microarrays*, del mismo tipo que el utilizado para el *microarray* de Huh7.

Como FXR está expresado principalmente en hígado, intestino y riñón, se procedió a realizar *microarrays* en modelos celulares de los otros dos tejidos. Para ello se realizaron estudios con células de cáncer de colon (Caco-2), las cuales fueron diferenciadas por confluencia durante 30 días y posteriormente tratadas con GW4064. Las células HK-2 fueron elegidas como modelo celular del tejido renal. Dichas células pertenecen a túbulo proximal renal y fueron cedidas por el laboratorio de la Dra. Anna Meseguer (CIBBIM, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona). Debido a que el tratamiento con un ligando sintético de FXR, el GW4064, no permitió observar la inducción de uno de los genes diana canónicos de FXR utilizado como control, *SHP*, procedimos a realizar la infección con un adenovirus que sobreexpresaba FXR (AdVP16FXR) o con el adenovirus control (AdVP16FXR) durante 48h. En las últimas 24h de la infección las células fueron tratadas con GW4064 o con su vehículo DMSO.

Debido a la identificación de la expresión de FXR en tejidos vasculares humanos como la aorta y las arterias coronarias (Bishop-Bailey D et al, 2004), además de la activación de algunos de sus genes diana tras el tratamiento de células vasculares del músculo liso con ligandos de FXR y de la identificación de algunos de sus genes diana en células endoteliales vasculares (Li J et al, 2008), decidimos realizar un experimento de *microarray* en dos modelos celulares humanos de las paredes vasculares. Uno de ellos consistía en las células hVSMC, procedentes del músculo liso del tejido vascular de la aorta humana, proporcionadas por el laboratorio del Dr. José Martínez (CSIC-ICCC, Hospital Sant Pau, Barcelona). Dichas células se obtuvieron por explantes de la aorta de un paciente. El otro modelo fueron células endoteliales de cordón umbilical humano, HUVEC, procedentes del mismo laboratorio. En este caso las células HUVEC consistían en una mezcla de 40 donantes. Después de comprobar que no existía expresión de FXR ni inducción de *SHP* en los primeros pases de las células en cultivo, se decidió infectar las células con el adenovirus AdVP16FXR y con el control AdVP16. Durante la infección con los adenovirus se llevó a cabo el tratamiento con el GW4064 o DMSO durante las últimas 24h de las 48h que duró la infección.

En las siguientes tablas se resumen algunos de los resultados más representativos del estudio de micromatrices llevado a cabo en los modelos celulares explicados.

**Microarray en células Caco-2**

Gene Symbol	Log 2	Gene assignment	RefSeq
FABP6	2,048	Fatty acid binding protein 6	NM_001040442
OST beta	1,434	Organic solute transporter beta	NM_178859
OST alpha	1,397	Organic solute transporter alpha	NM_152672
FGG	1,018	Fibrinogen gamma chain	NM_021870
FGA	0,948	Fibrinogen alpha chain	NM_000508
FGB	0,891	Fibrinogen beta chain	NM_005141
<u>HMGCS2</u>	0,731	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	NM_005518
RHOF	0,698	Ras homolog gene family, member F	NM_019034
KNG1	0,579	Kininogen 1	NM_000893
<u>RBP4</u>	0,460	Retinol binding protein 4	NM_006744
GRK5	0,437	G protein-coupled receptor kinase 5	NM_005308
LXR $\beta$	0,432	Lanosterol X receptor (NR1H2)	NM_007121
ACSF3	0,388	Acyl-CoA synthetase family member 3	NM_174917
<u>CPT1A</u>	0,386	Carnitine palmitoyltransferase 1A	NM_001876
TFRC	0,370	Transferrin receptor (p90, CD71)	NM_003234
ADSS	0,367	Adenylosuccinate synthase	NM_001126
FASN	0,350	Fatty acid synthase	NM_004104
<u>TCEA2</u>	0,344	Transcription elongation factor A (SII), 2	NM_198723
ICAM1	0,321	Intercellular adhesion molecule 1	NM_000201
HNF4A	0,235	Hepatocyte nuclear factor 4, alpha	NM_000457
NDRG4	0,192	NDRG family member 4	NM_020465
NOR1	-0,166	Oxidored-nitro domain containing protein 1 (NR4A3)	NM_173198
IL10RA	-0,185	Interleukin 10 receptor, alpha	NM_001558
RGR	-0,203	Retinal G protein coupled receptor	NM_002921
ITIH5	-0,271	Inter-alpha (globulin) inhibitor H5	NM_030569
SP7	-0,307	Sp7 transcription factor	NM_152860
HSD17B3	-0,347	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 3	NM_000197
FBXO39	-0,408	F-box protein 39	NM_153230
KGFLP1	-0,481	Keratinocyte growth factor-like protein 1	NR_003674

Fig. 2: Tabla-resumen de los resultados obtenidos en el experimento de micromatrices realizado en células Caco-2 diferenciadas durante 30 días y tratadas durante 24 horas con GW4064 (2 $\mu$ M). Los genes subrayados se estudiarán con detalle posteriormente.

**Microarray en células HK-2**

Gene Symbol	Log 2	Gene assignment	RefSeq
<b>OST beta</b>	5,623	Organic solute transporter beta	NM_178859
<b>FXR</b>	4,254	Farnesoid X Receptor (NR1H4)	NM_005123
<b>FABP6</b>	4,099	Fatty acid binding protein 6	NM_001040442
<b>ALDH1A3</b>	3,463	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	NM_000693
<b><u>TCEA2</u></b>	3,264	Transcription elongation factor A (SII), 2	NM_198723
<b><u>FABP3</u></b>	2,854	Fatty acid binding protein 3	NM_004102
<b>OST alpha</b>	2,842	Organic solute transporter alpha	NM_152672
<b>ANGPTL4</b>	2,571	Angiopoietin-like 4	NM_139314
<b>ANGPTL2</b>	2,265	Angiopoietin-like 2	NM_012098
<b>SHP</b>	1,779	Nuclear receptor subfamily 0 (NROB2)	NM_021969
<b>RHOF</b>	1,559	Ras homolog gene family, member F	NM_019034
<b>VCAM1</b>	1,447	Vascular cell adhesion molecule 1	NM_001078
<b><u>UBD</u></b>	1,305	Ubiquitin D	NM_006398
<b>ICAM1</b>	1,116	Intercellular adhesion molecule 1	NM_000201
<b>VEGFA</b>	1,007	Vascular endothelial growth factor A	NM_001025366
<b><u>CROT</u></b>	0,945	Carnitine O-octanoyltransferase	NM_021151
<b><u>NEDD4L</u></b>	0,805	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like	NM_015277
<b><u>RBP4</u></b>	0,594	Retinol binding protein 4	NM_006744
<b>UBR1</b>	0,591	Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1	NM_174916
<b>RICTOR</b>	0,586	RPTOR independent companion of MTOR, complex 2	NM_152756
<b>IL6R</b>	-0,589	Interleukin 6 receptor	NM_000565
<b>ENO2</b>	-0,597	Enolase 2 (gamma, neuronal)	NM_001975
<b>ITGB6</b>	-0,600	Integrin, beta 6	NM_000888
<b>CREB3L1</b>	-0,668	cAMP responsive element binding protein 3-like 1	NM_052854
<b>MYC</b>	-0,703	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	NM_002467
<b>UBTD2</b>	-0,748	Ubiquitin domain containing 2	NM_152277
<b>AMIGO2</b>	-1,018	Adhesion molecule with Ig-like domain 2	NM_181847
<b>CEBPD</b>	-1,471	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	NM_005195
<b>CRABP2</b>	-1,491	Cellular retinoic acid binding protein 2	NM_001878
<b>EGR1</b>	-1,526	Early growth response 1	NM_001964
<b>CXCL2</b>	-2,015	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	NM_002089
<b>PLAT</b>	-2,472	Plasminogen activator, tissue	NM_000930
<b>IL8</b>	-3,420	Interleukin 8	NM_000584
<b>IL6</b>	-4,208	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	NM_000600

Fig. 3: Tabla-resumen de los resultados obtenidos en el experimento de micromatrices realizado en células HK-2 infectadas con AdVP16FXR+GW4064 (2 $\mu$ M) frente a las infectadas con AdVP16+DMSO. Los genes subrayados se estudiarán con detalle posteriormente.

***Microarray en células hVSMC***

Gene Symbol	Log 2	Gene assignment	RefSeq
<b>FXR</b>	<b>6,745</b>	Farnesoid X receptor (NR1H4)	NM_005123
<b>OST beta</b>	<b>5,566</b>	Organic solute transporter beta	NM_178859
<b>FABP3</b>	<b>5,176</b>	Fatty acid binding protein 3	NM_004102
<b>OST alpha</b>	<b>4,472</b>	Organic solute transporter alpha	NM_152672
<b>RHOF</b>	<b>3,967</b>	Ras homolog gene family, member F	NM_019034
<b>RBP4</b>	<b>3,303</b>	Retinol binding protein 4	NM_006744
<b>FGF21</b>	<b>2,807</b>	Fibroblast growth factor 21	NM_019113
<b>ICAM1</b>	<b>2,640</b>	Intercellular adhesion molecule 1	NM_000201
<b>VEGFA</b>	<b>2,317</b>	Vascular endothelial growth factor A	NM_001025366
<b>TCEA2</b>	<b>2,203</b>	Transcription elongation factor A (SII), 2	NM_198723
<b>SLC25A24</b>	<b>1,939</b>	Solute carrier family 25 , member 24	NM_013386
<b>ADSS</b>	<b>1,797</b>	Adenylosuccinate synthase	NM_001126
<b>ALDH1A2</b>	<b>1,761</b>	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	NM_003888
<b>ALDH1A1</b>	<b>1,709</b>	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	NM_000689
<b>ACSL3</b>	<b>1,628</b>	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	NM_004457
<b>ASNS</b>	<b>1,462</b>	Asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	NM_133436
<b>NEDD4L</b>	<b>1,339</b>	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4-like	NM_015277
<b>ALDH1A3</b>	<b>1,333</b>	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	NM_000693
<b>CRABP2</b>	<b>1,257</b>	Cellular retinoic acid binding protein 2	NM_001878
<b>UBE2L6</b>	<b>0,996</b>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	NM_004223
<b>PPARG</b>	<b>0,900</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_138712
<b>INSIG2</b>	<b>0,657</b>	Insulin induced gene 2	NM_016133
<b>HIF1A</b>	<b>0,645</b>	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	NM_001530
<b>STAT6</b>	<b>-0,704</b>	Signal transducer and activator of transcription 6	NM_003153
<b>APOL1</b>	<b>-0,735</b>	Apolipoprotein L, 1	NM_145343
<b>VCAM1</b>	<b>-0,893</b>	Vascular cell adhesion molecule 1	NM_001078
<b>BCL2L11</b>	<b>-0,955</b>	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	NM_138621
<b>SLC7A2</b>	<b>-1,012</b>	Solute carrier family 7 , member 2	NM_003046
<b>IL1B</b>	<b>-1,323</b>	Interleukin 1, beta	NM_000576
<b>UCP2</b>	<b>-1,394</b>	Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	NM_003355
<b>IL6</b>	<b>-1,579</b>	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	NM_000600
<b>EGR1</b>	<b>-1,615</b>	Early growth response 1	NM_001964
<b>IFITM1</b>	<b>-1,844</b>	Interferon induced transmembrane protein 1	NM_003641
<b>DDIT4L</b>	<b>-2,072</b>	DNA-damage-inducible transcript 4-like	NM_145244
<b>TNFSF10</b>	<b>-2,907</b>	Tumor necrosis factor superfamily, member 10	NM_003810
<b>PI15</b>	<b>-3,118</b>	Peptidase inhibitor 15	NM_015886

**Microarray en células HUVEC**

Gene Symbol	Log 2	Gene assignment	RefSeq
<b>FXR</b>	5,937	Farnesoid X receptor (NR1H4)	NM_005123
<b>ICAM1</b>	3,783	Intercellular adhesion molecule 1	NM_000201
<b>MAP2</b>	2,518	Microtubule-associated protein 2	NM_002374
<b>FABP3</b>	2,453	Fatty acid binding protein 3	NM_004102
<b>ANGPTL4</b>	2,071	Angiopoietin-like 4	NM_139314
<b>RHOF</b>	1,898	Ras homolog gene family, member F	NM_019034
<b>ITGA1</b>	1,774	Integrin, alpha 1	NM_181501
<b>PHKA1</b>	1,737	Phosphorylase kinase, alpha 1	NM_002637
<b>ACSL3</b>	1,682	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	NM_004457
<b>FABP6</b>	1,496	Fatty acid binding protein 6, ileal	NM_001040442
<b>VEGFA</b>	1,348	Vascular endothelial growth factor A	NM_001025366
<b>RBP4</b>	1,329	Retinol binding protein 4, plasma	NM_006744
<b>ADSS</b>	1,240	Adenylosuccinate synthase	NM_001126
<b>HIF1A</b>	1,247	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	NM_001530
<b>TCEA2</b>	1,211	Transcription elongation factor A (SII), 2	NM_198723
<b>SHP</b>	1,196	Short heterodimer partner (NROB2)	NM_021969
<b>RBP5</b>	1,018	Retinol binding protein 5, cellular	NM_031491
<b>INSIG2</b>	0,940	Insulin induced gene 2	NM_016133
<b>AADAT</b>	0,940	Amino adipate aminotransferase	NM_016228
<b>VLDLR</b>	0,907	Very low density lipoprotein receptor	NM_003383
<b>ACSL4</b>	0,903	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	NM_022977
<b>HMGCS1</b>	0,851	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 (soluble)	NM_001098272
<b>SOCS3</b>	0,810	Suppressor of cytokine signaling 3	NM_003955
<b>UBR5</b>	0,670	Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 5	NM_015902
<b>CEBPG</b>	0,596	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	NM_001806
<b>SLC27A4</b>	-0,585	Solute carrier family 27, member 4	NM_005094
<b>ASNS</b>	-0,588	Asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	NM_133436
<b>TP53</b>	-0,590	Tumor protein p53	NM_001078
<b>RASIP1</b>	-0,591	Ras interacting protein 1	NM_017805
<b>PIGQ</b>	-0,601	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Q	NM_004204
<b>LGALS9</b>	-0,607	Lectin, galactoside-binding, soluble, 9	NM_009587
<b>SLC25A10</b>	-0,695	Solute carrier family 25, member 10	NM_012140
<b>IL6</b>	-0,705	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	NM_000600
<b>PLA2G4C</b>	-1,769	Phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)	NM_003706

Fig. 4: Tablas-resumen de los resultados obtenidos en los experimentos de micromatrices realizados en células hVSMC y HUVEC infectadas con AdVP16FXR+GW4064 (2µM) frente a las infectadas con AdVP16+DMSO. Los genes subrayados se estudiarán con detalle posteriormente.

Algunos de los genes más inducidos en estos estudios de *microarrays* habían sido descritos y caracterizados previamente en la bibliografía como genes diana de FXR, tales como BSEP, OST $\alpha$ , OST $\beta$ , ICAM1, FGF19, SHP, KNG1, VCAM1 y PON1. Estos resultados corroboraban la eficiencia de la técnica para identificar genes diana de FXR. No obstante, gran parte de los genes mostrados en estas tablas no han sido descritos como genes diana de FXR en ningún estudio publicado.

Por esto, siguiendo los objetivos trazados inicialmente en la tesis, los siguientes apartados muestran la caracterización de la posible regulación por FXR de algunos de los genes subrayados en las tablas anteriores.

**GPLD1: fosfolipasa específica de glicosilfosfatidilinositol**





Muchas proteínas de superficie son ancladas covalentemente a las membranas celulares mediante GPI. En mamíferos, la única enzima capaz de hidrolizar el enlace entre GPI y la proteína a la que está unido es la GPLD1. Dicha enzima se expresa en numerosos tejidos, pero el hígado presenta una mayor concentración y es el principal contribuidor de sus niveles séricos. En el suero se presenta asociada a las apolipoproteínas AI y AIV (Deeg MA et al, 2001).

Entre las proteínas ancladas a la membrana plasmática podemos encontrar enzimas, receptores, moléculas de adhesión y antígenos de diferenciación. Dichas proteínas ancladas a la superficie celular mediante el GPI participan en funciones celulares tan importantes como el reconocimiento inmune o la señalización intracelular.

### La expresión de *GPLD1* se induce por ligandos de FXR en un contexto hepático

Al analizar los resultados obtenidos en el *microarray* realizado en el modelo de hepatoma humano Huh7 tratadas con GW4064, se descubrió que *GPLD1* presentaba un aumento en sus niveles de expresión debido al tratamiento.

Con el objetivo de confirmar la posible regulación de *GPLD1* por FXR, analizamos los niveles de este gen por PCR cuantitativa en las células Huh7 tratadas durante 24 horas con CDCA y GW4064, activadores natural y sintético respectivamente de FXR.

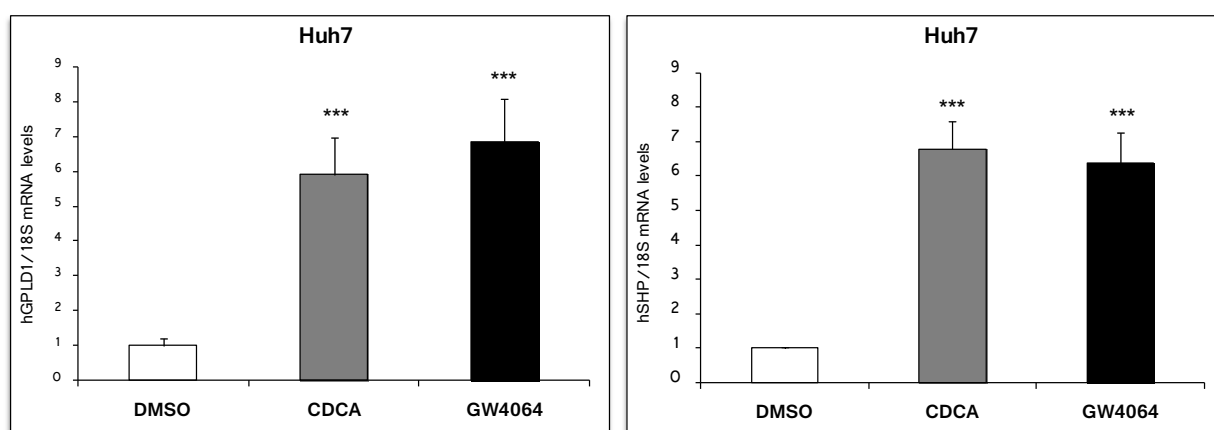


Fig. 5: Células Huh7 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM con n=3 muestras por cada condición; \*\*\*P<0.001; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Como se puede observar en la figura 5, tras los tratamientos con ambos ligandos de FXR los niveles de *GPLD1* son inducidos significativamente con respecto al tratamiento con el vehículo DMSO. Esta inducción es marcadamente significativa y comparable en magnitud a los obtenidos para el gen *SHP*, analizado en las mismas condiciones y usado como control positivo.

Análogamente se analizaron los niveles de mRNA de *GPLD1* en un contexto más fisiológico como el proporcionado por hepatocitos primarios humanos tratados con CDCA y GW4064 durante 24h.

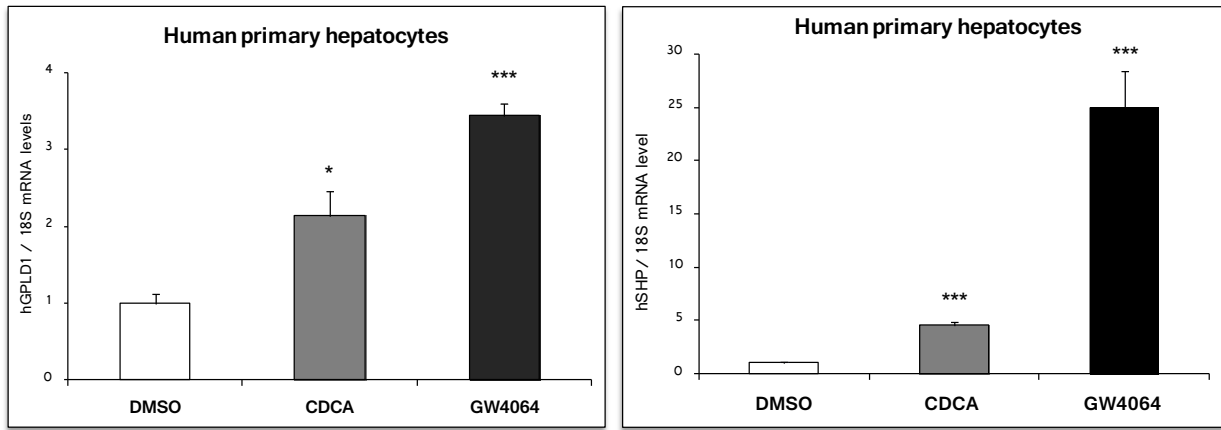


Fig. 6: Hepatocitos primarios humanos tratados durante 24 horas con CDCA (50 $\mu$ M) y GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=4 muestras por condici3n; \*P<0.05; \*\*\*P<0.001; la estadística de los valores con respecto a la condici3n DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

La figura 6 muestra como en el modelo de hepatocitos primarios humanos, la expresi3n g3nica de *GPLD1* es tambi3n inducida por ambos activadores de FXR, observ3ndose una activaci3n mayor en respuesta al tratamiento con GW4064. Del mismo modo se analizaron los niveles de *SHP* en este modelo como un control positivo del tratamiento.

### La inducci3n de *GPLD1* se pierde en c3lulas transfectadas con siFXR

Para profundizar en el mecanismo por el cual se observa esta inducci3n de *GPLD1* por los activadores de FXR, se realiz3 un experimento de disminuci3n de la expresi3n de FXR en c3lulas Huh7. Mediante la transfecci3n transitoria de estas c3lulas con un siRNA específcico de FXR, y un siRNA control inespecífcico, se analiz3 la expresi3n g3nica de *GPLD1* despu3s de los tratamientos con los GW4064 y CDCA. La eficiencia de la transfecci3n con siRNAs se comprob3 analizando los niveles de mRNA y proteicos de FXR en Huh7 transfectadas, y tambi3n se comprobaron los niveles de mRNA de *SHP* con el objetivo de analizar la actividad transcripcional de FXR en c3lulas transfectadas con siFXR (ver materiales y m3todos, apartado de “silenciamiento g3nico mediante siRNAs”).

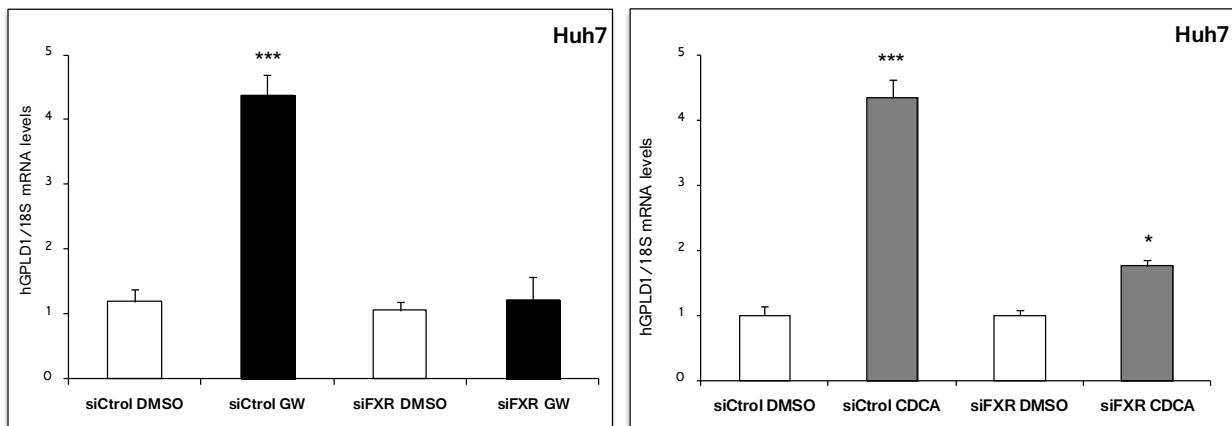


Fig. 7: C3lulas Huh7 tratadas durante 48 horas con siRNA control (siCtrl) y siRNA FXR (siFXR) a una concentraci3n de 25nM y tratadas durante las últimas 24h con el ligando GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (100 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condici3n; \*P<0.05; \*\*\*P<0.001; estadística realizada con *T-test de Student* de valores comparados con los valores de las c3lulas transfectadas con sus respectivos siRNAs y tratados con DMSO.

Tal y como se indica en la figura 7, los niveles de mRNA de *GPLD1* son significativamente inducidos por los activadores de FXR, pero dicha inducción no se observa al transfectar el siRNA contra FXR en el caso del tratamiento con GW40464. En el tratamiento con CDCA la inducción se ve reducida cuando se transfectan las células con el siRNA de FXR. Para comprobar la eficiencia de la transfección, se analizaron los niveles de un gen diana de FXR, como es *SHP* (ver materiales y métodos, apartado “silenciamiento génico mediante siRNAs”). Dicho resultado corroboraba que la expresión de FXR era necesaria para la inducción de *GPLD1* en dicho modelo celular y con los ligandos de FXR usados.

### Localización de un elemento de respuesta a FXR en el promotor de *GPLD1*

Con el objetivo de caracterizar la regulación que ejerce FXR sobre *GPLD1*, se llevó a cabo un análisis *in silico* del promotor del gen humano de *GPLD1* utilizando el programa bioinformático NUBIScan, para buscar posibles elementos de respuesta a FXR (FXRE). En dicho análisis se localizó un putativo FXRE (IR1) con una secuencia similar a la del *consensus a* -6bp del inicio de transcripción (TSS), por lo que se procedió a la subclonación de unas 2000bp (exactamente desde -1986bp hasta +93bp del TSS) en un vector reportero, generando la construcción phGPLD1. Posteriormente se analizó la actividad luciferasa de esta construcción en respuesta a diferentes ligandos de FXR.

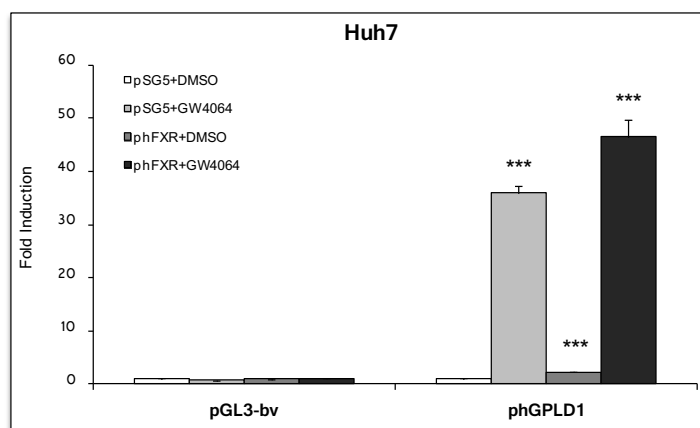


Fig. 8: Huh7 transfectadas con el vector vacío (pGL3-bv), la construcción de phGPLD1 que contiene el IR1 y un plásmido de expresión de FXR (phFXR) o su vector vacío (pSG5). Posteriormente fueron tratadas durante 24 horas con GW4064 (1 $\mu$ M) o el vehículo DMSO. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos con n=3 cada uno; \*\*\*P<0.001; la estadística con respecto a los valores de cada reportero transfectado con pSG5 y tratado con DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

La figura 8 muestra una media de ensayos reportero realizados con la construcción que contenía el promotor del gen humano de *GPLD1*. En dicha figura se puede apreciar como el tratamiento con GW4064 es capaz de inducir significativamente la actividad reportera del promotor subclonado, y que la cotransfección con el vector que expresa FXR induce, en mayor medida, dicha actividad luciferasa cuando está en presencia de GW4064.

Posteriormente se llevó a cabo una mutagénesis dirigida sobre el elemento IR1, generando la construcción phGPLD1-MUT, con el objeto de analizar si dicho elemento de respuesta a FXR era el único responsable de la actividad luciferasa observada.

Por tanto, el experimento consistió en analizar la actividad luciferasa del plásmido con el promotor humano de *GPLD1* que contiene el elemento IR1 en la forma control (phGPLD1-WT) y en la forma mutada (phGPLD1-MUT).

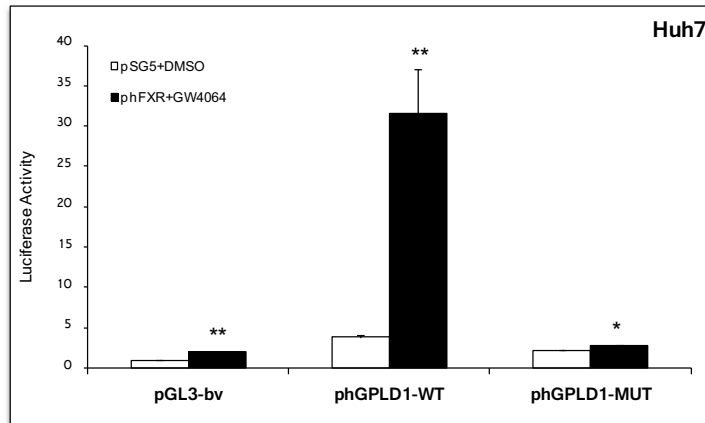


Fig. 9: Huh7 transfectadas con la construcción de -1986/+93 del gen humano de *GPLD1* que contiene el IR1 y la construcción reportera con el IR1 mutado. Cotransfección con un plásmido de expresión de FXR (phFXR) y posterior tratamiento de 24 horas con GW4064 (1 $\mu$ M) o el vehículo DMSO. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos con n=3 cada uno; \*P<0.05; \*\*P<0.01; la estadística con respecto a los valores de pGL3-bv tratados con DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

La figura 9 muestra los resultados obtenidos en el ensayo luciferasa donde se observa una inducción significativa del promotor de *GPLD1* por la transfección del plásmido de expresión de FXR junto con el tratamiento con GW4064. Cuando se realiza el ensayo con el promotor que contiene el IR1 mutado la inducción se pierde hasta igualarse a los niveles del vector vacío.

### FXR se une directamente al IR1 del promotor de *GPLD1* caracterizado previamente

Con el objetivo de analizar si FXR se unía a este elemento de respuesta, se realizó un ensayo de retardación en gel (*EMSA*) en el cual se marcó radiativamente un *dúplex* de *primers* que contenían la secuencia del elemento de respuesta a FXR identificado previamente, y se realizaron competiciones a concentraciones crecientes con el mismo *dúplex* de *primers* sin marcar radiativamente. La competición del ensayo se realizó con las sondas frías: *primers* WT (*GPLD1*-WT) y *primers* con mutaciones puntuales que impedían la respuesta a FXR al IR1 (*GPLD1*-MUT). Junto con estos *primers* se incubaban las proteínas de FXR y RXR transcritas y traducidas *in vitro* (*TNT*) a partir de plásmidos que las expresan (pSG5-RXR y pSG5-FXR). Como control positivo del experimento se analizó la competición con el FXRE de uno de sus genes dianas, *IBABP*.

## Resultados

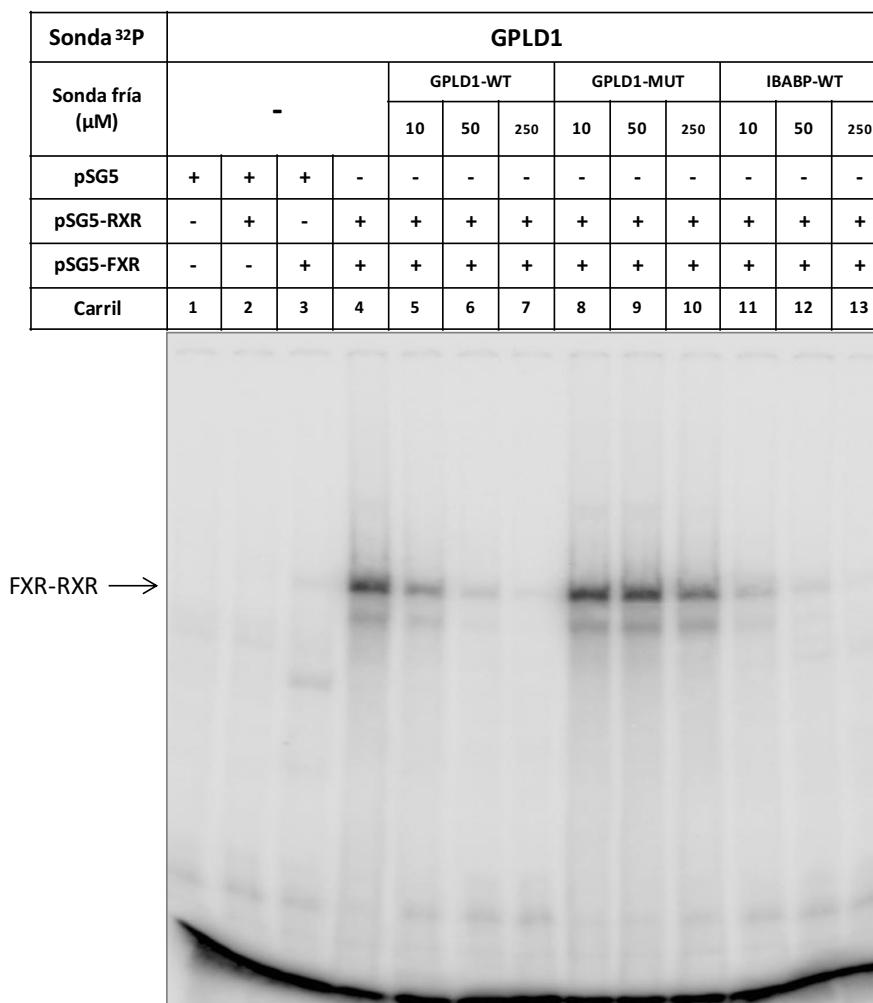


Fig. 10: EMSA realizado con *TNTs* de pSG5, pSG5-hRXR, pSG5-hFXR junto con *primers* marcados radioactivamente, con <sup>32</sup>P, del elemento de respuesta a FXR localizado en el promotor del gen humano de GPLD1 y del elemento de respuesta en el gen *IBABP*. La competición se realiza con *primers* no marcados radioactivamente (sondas frías) que contenían el IR1 a concentraciones de 10, 50 y 250μM.

Como se puede apreciar en la figura 10, la banda que aparecía en el carril 3 se identificaba como la unión de FXR como monómero al IR1. En presencia de RXR (carril 4) la banda era más intensa y se observaba una retardación en el gel que indicaba la dimerización de FXR-RXR, caracterizada previamente en la bibliografía (Seol W et al, 1995). Posteriormente, en los carriles 5-7 se observaba la competición que realizaba la sonda fría con la sonda marcada radioactivamente. En el caso de los carriles 8-10 no se observaba una disminución significativa de la intensidad de la banda debido a que la competición se realizaba con los *primers* que contienen la secuencia del IR1 mutado, por lo que FXR-RXR no se unía a la sonda fría. Estos resultados muestran la especificidad de la unión de FXR-RXR por este IR-1. Por otra parte, en los carriles 11-13 se observaba la competición realizada con el control positivo (*IBABP*), que mostraba un comportamiento idéntico al observado con la sonda de GPLD1-WT.

La regulación de *Gpld1* por FXR también se observa en ratón

Tras observar la inducción de *GPLD1* por los activadores de FXR en modelos de células y de hepatocitos primarios humanos, se estudió si la regulación de este gen también se daba en el modelo murino. Para ello se utilizaron las células Hepa 1-6, una línea celular hepática de ratón que expresa unas 600 veces menos *Fxr* que el hígado de ratón (Pérez MJ et al, 2011). Sin embargo, en contraste con las Huh7, no se pudo detectar la proteína FXR ni la inducción de la expresión de *Shp* en respuesta a los activadores de FXR en dichas células (figura 11 y 12).

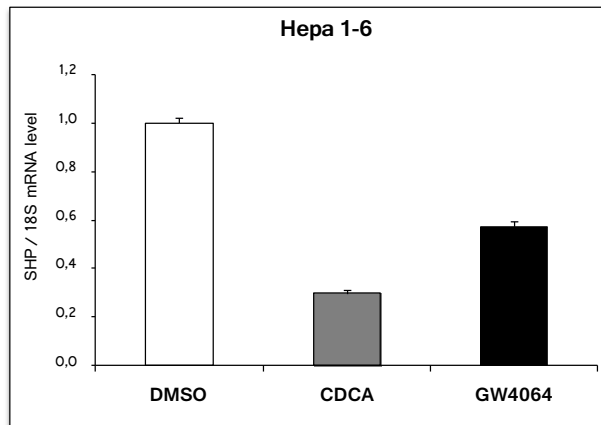


Fig. 11: Células Hepa 1-6 tratadas con CDCA (100µM) y GW4064 (5µM) durante 24 horas. Media ± SEM de n=3/condición; la estadística fue realizada con *T-test de Student* comparando con los niveles de células tratadas con DMSO.

Debido a esto, las células fueron infectadas con el adenovirus que sobreexpresaba FXR (AdVP16FXR) y la sobreexpresión se comprobó por WB comparándola con la expresión de este receptor nuclear en células Huh7.

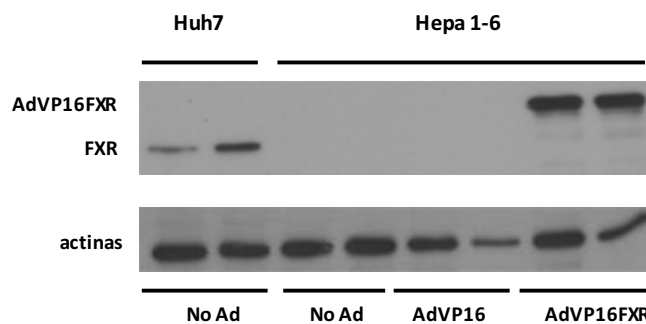


Fig. 12: WB de extractos totales de células Huh7 no infectadas y Hepa 1-6 no infectadas e infectadas con AdVP16 o AdVP16FXR (75 MOIs) durante 48h.

Una vez comprobada la eficiencia de la infección se analizó la expresión génica de *Gpld1* en células Hepa 1-6 infectadas con AdVP16 o AdVP16FXR y tratadas o no con GW4064.

## Resultados

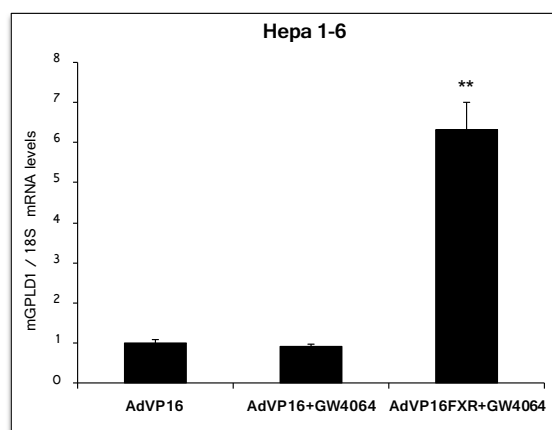


Fig. 13: Células Hepa 1-6 infectadas con AdVP16 y AdVP16FXR (75 MOIs) durante 48h. En las últimas 24 horas de la infección las células fueron tratadas con GW4064 (5 $\mu$ M) o DMSO. Media  $\pm$  SEM de n=3/condición; \*\*P<0.01; la estadística fue realizada con *T-test de Student* comparando cada condición con los niveles de AdVP16 tratado con DMSO.

En la figura 13 se muestra un incremento significativo de los niveles de *Gpld1*, debido a la infección de las células de hepatoma de ratón Hepa 1-6 con el adenovirus que sobreexpresa FXR y con el tratamiento con el ligando sintético GW4064.

Con el objetivo de estudiar si dicha regulación observada tiene lugar en un modelo *in vivo*, se trataron ratones control (WT) y deficientes en FXR (KO) con el ligando GW4064. Dicho tratamiento se realizó por inyección intraperitoneal y a las 8 horas de la administración, los animales fueron sacrificados y se obtuvo el RNA del hígado. Se analizaron los niveles del mRNA de *Gpld1* y, del control positivo *Shp*, en estas muestras.

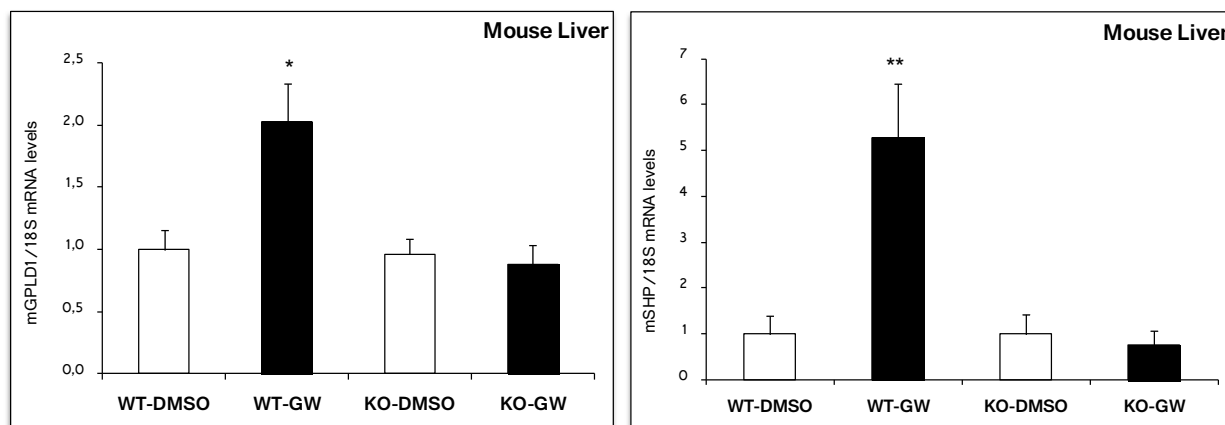


Fig. 14: Niveles hepáticos de ratones control (WT) y deficientes en FXR (KO) inyectados con 50mg de GW4064/kg y sacrificados a las 8h. Media  $\pm$  SEM de n=4 ratones/condición.; \*P<0.05; \*\*P<0.01; estadística realizada con *T-test de Student* con respecto a los ratones de cada condición tratados con el vehículo.

Como se puede visualizar en las gráficas de la figura 14, los ratones WT tratados con GW4064 presentan una inducción significativa en los niveles de *Gpld1* y *Shp* en comparación con los ratones WT inyectados con el vehículo. La inducción de *Gpld1* y *Shp* con GW4064 no se observa en los ratones FXR-KO tratados con el mismo ligando.





**Metabolismo de los ácidos grasos**



FXR tiene un papel crucial en el metabolismo de los ácidos grasos ya que es capaz de regular genes implicados en su síntesis, transporte y degradación. Como se puede observar en los datos obtenidos del *microarray* realizado en Huh7, el tratamiento de estas células con el ligando sintético y específico de FXR, el GW4064, es capaz de reprimir los niveles de mRNA de numerosos genes involucrados en la liberación, activación, transporte y oxidación de ácidos grasos (Fig. 1; página 2).

## Genes implicados en la liberación de ácidos grasos:

### La expresión de *PLA2G1B* se reprime por activadores de FXR en células Huh7

La fosfolipasa A2 del grupo 1B (*PLA2G1B*) cataliza la hidrólisis de glicero-3-fosfolípidos permitiendo la disponibilidad de ácidos grasos. En los resultados del *microarray* en Huh7, *PLA2G1B* mostraba una represión derivada del tratamiento con el ligando de FXR. Para comprobar este resultado se analizó su expresión génica en células Huh7 tratadas con GW4064.

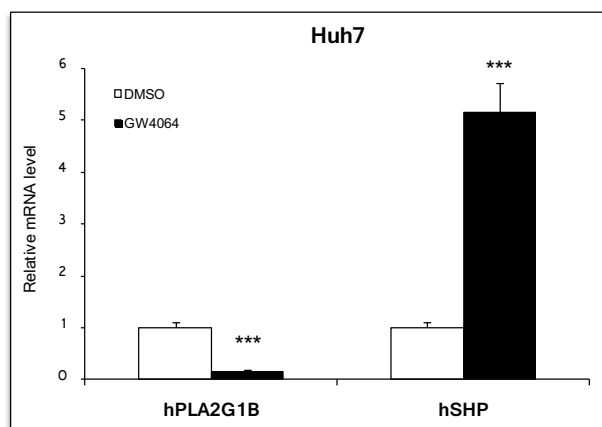


Fig. 15: Células Huh7 tratadas durante 24 horas con GW4064 (2 $\mu$ M). Niveles de mRNA normalizados por los niveles de 18S. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \*\*\*P<0.001; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Como se aprecia en la figura 15, los niveles de *PLA2G1B* disminuyeron en más de un 80% debido al tratamiento con el GW4064, mientras que los niveles del mRNA del gen *SHP*, usado como control positivo, son inducidos más de 5 veces frente al tratamiento con el vehículo DMSO en estas mismas muestras.

### *SHP* media parcialmente en la represión de *PLA2G1B* por FXR

Debido a que FXR utiliza al receptor nuclear atípico *SHP* para llevar a cabo la represión de genes como *CYP7A1* (Goodwin B et al, 2000), se planteó la hipótesis de que la represión de *PLA2G1B* por GW4064 podría explicarse a través de este mecanismo. Para ello, se llevó a cabo la transfección transitoria de un siRNA específico de *SHP* en células Huh7, cuya eficiencia se comprobó previamente (ver materiales y métodos, apartado "silenciamiento génico mediante siRNAs").

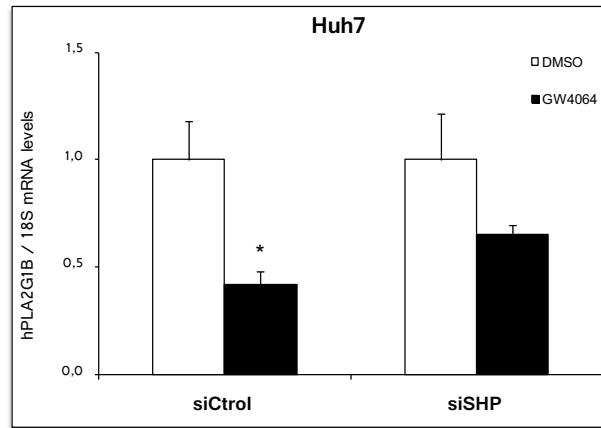


Fig. 16: Células Huh7 tratadas durante 48 horas con siRNA control (siCtrl) y siRNA SHP (siSHP), ambos a una concentración de 100nM, y tratadas durante las últimas 24h con GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por experimento; \*P<0.05; estadística con *T-test de Student* respecto a los valores del tratamiento con DMSO en la transfección de los respectivos siRNAs.

Como se puede observar en la figura 16, las células transfectadas con el siRNA control muestran una disminución de los valores de *PLA2G1B* al someterlas al tratamiento con el GW4064. Cuando las células son transfectadas con el siRNA específico de SHP, los niveles de *PLA2G1B* siguen estando reprimidos por el tratamiento con el GW4064, aunque no de forma significativa.

## Genes implicados en la activación de los ácidos grasos

### Ciertos genes involucrados en la activación de ácidos grasos se reprimen por GW4064

En el experimento del *microarray* en Huh7 se observó que varios genes relacionados con la activación de los ácidos grasos, entre ellos los genes *SLC27A2*, *ACSM3* y *ACSL5*, aparecían reprimidos por el tratamiento con GW4064. El gen *SLC27A2* codifica para una enzima que convierte los ácidos grasos libres de cadena muy larga (más de 22 carbonos) en ésteres grasos de acil-CoA, lo que se denomina activación de los ácidos grasos. Por otro lado, *ACSL5* activa ácidos grasos de cadena larga (entre 11 y 22 carbonos) y *ACSM3* activa los de cadena de una longitud media (entre 4 y 11 carbonos). Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en el *microarray*, se extrajo el RNA de células Huh7 tratadas con diferentes ligandos de FXR, CDCA y GW4064, y se realizaron PCR cuantitativas para analizar las diferencias de expresión con respecto al tratamiento con el vehículo.

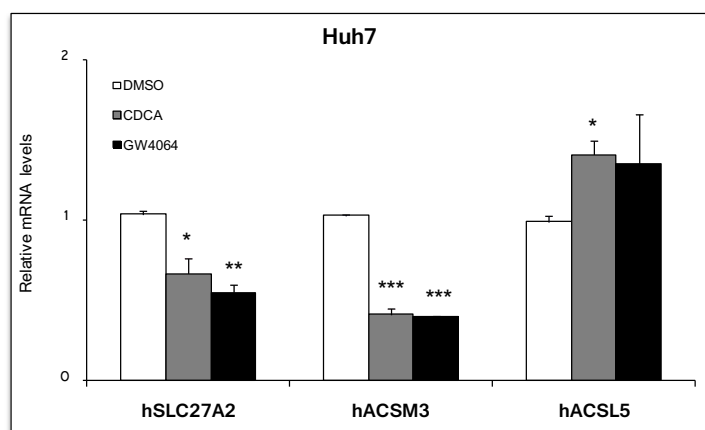


Fig. 17: Células Huh7 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M). Niveles de mRNA normalizados por los niveles de 18S. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

En la figura 17 se puede observar como los genes SLC27A2 y ACSM3 quedan confirmados como genes reprimidos por ambos ligandos de FXR en este modelo celular, mientras que ACSL5 muestra una ligera inducción de sus niveles de mRNA, oponiéndose a los resultados obtenidos en el *microarray*.

## Genes implicados en la translocación de ácidos grasos

### El tratamiento con GW4064 disminuye la expresión de genes relacionados con la translocación de ácidos grasos

La translocación de los ácidos grasos es un proceso por el cual son transportados desde el citoplasma hasta matriz mitocondrial con el objetivo de ser oxidados. En este proceso participan varias proteínas de la membrana mitocondrial que forman un sistema de aciltransferasas.

Los ácidos grasos de cadena larga activados, en forma de tioésteres unidos a CoA, no pueden difundir por la membrana mitocondrial desde el citoplasma, por lo que necesitan transportadores específicos para entrar en la matriz mitocondrial. La primera proteína transportadora de los acil-CoA es la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1A, si es la isoforma hepática). Dicha enzima intercambia la coenzima A (CoA) por carnitina para formar acil-carnitina. Cuando se conjugan con carnitina, los aciles pueden atravesar la membrana externa mitocondrial hasta el espacio intermembranal. En la membrana interna se encuentra una translocasa (SCL25A20) que transporta los acil-carnitina hacia la matriz mitocondrial. En la membrana interna, los acil-carnitina se encuentran con otra aciltransferasa, la carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT2), que transfiere un CoA a los acil-carnitina. De esta forma libera los aciles-CoA a la matriz mitocondrial recuperando así la molécula libre de carnitina para que la translocasa pueda transportarla hasta el espacio intermembranal.

Los peroxisomas metabolizan una gran variedad de lípidos, actuando como un sistema de acortamiento de la cadena de los ácidos grasos y produciendo acil-CoAs de longitudes variables. Para realizar estas tareas, los peroxisomas contienen las enzimas carnitina acetiltransferasa (CRAT) y carnitina octanoiltransferasa (CROT), que producen ésteres de carnitina que son transportados fuera de los peroxisomas

En los resultados obtenidos en el *microarray* realizado con células de hepatoma humano tratadas con el ligando específico de FXR, se observó que los principales genes relacionados con la translocación de ácidos grasos estaban reprimidos por acción del tratamiento (Fig. 1; página x2). Para comprobar estos resultados se midieron sus niveles de mRNA en células Huh7 tratadas con CDCA y GW4064.

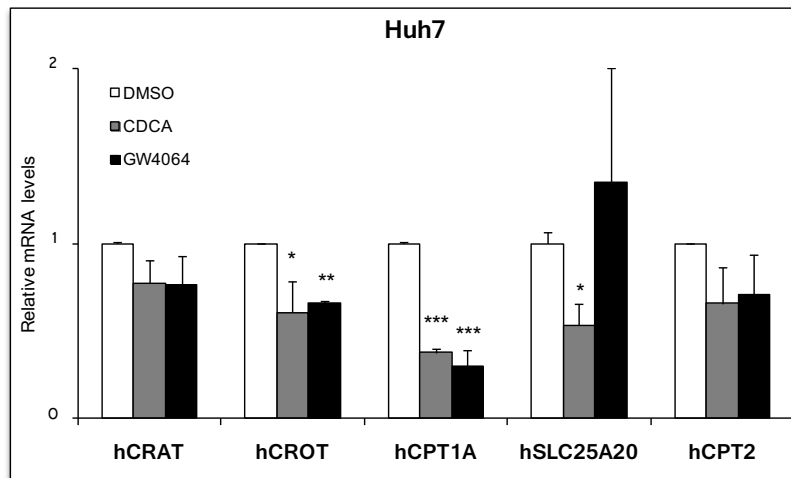


Fig. 18: Células Huh7 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M). Niveles de mRNA normalizados por los niveles de 18S. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

En la figura 18 se observa una tendencia a la disminución de la expresión de los genes *CRAT* y *CPT2*, en respuesta a ambos ligandos de FXR, que no llega a alcanzar la significancia. En el caso de la translocasa *SLC25A20*, el tratamiento con GW4064 presentaba una elevada variabilidad, de manera que no se pudo concluir cual era la respuesta, sin embargo, el CDCA disminuía significativamente sus niveles de mRNA. En el caso de *CROT* y *CPT1A*, la disminución en su expresión debido al tratamiento con ambos ligandos de FXR es significativa, siendo más acuciante en el gen *CPT1A*, donde sus niveles llegan a reducirse aproximadamente en un 70%.

## Genes implicados en la beta oxidación de ácidos grasos

### Un gen involucrado en la $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos se reprime por GW4064

La  $\beta$ -oxidación es un proceso por el cual los ácidos grasos, en forma de acil-CoA, se degradan en la matriz mitocondrial o en los peroxisomas para generar acetil-CoA que pasa al ciclo de Krebs para obtener energía en forma de ATP.

En el proceso de la  $\beta$ -oxidación se llevan a cabo cuatro reacciones consecutivas: la deshidrogenación, la hidratación, la oxidación y la tiólisis. Dichas etapas están catalizadas por la acil-CoA deshidrogenasa (ACAD), la enoil-CoA hidratasa (EHHADH) o enzima bifuncional, la hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (HADH) y la quetoacil-CoA tiolasa (KAT o ACCA), respectivamente.

En los resultados del *microarray* de las células Huh7, la expresión de los genes que codifican para ACAD, EHHADH y HADH está disminuida por el tratamiento con GW4064, siendo la de la enzima biofuncional la expresión más disminuida. Con el propósito de corroborar los resultados del *microarray* se analizaron los niveles de mRNA de la *EHHADH* en células Huh7 tratadas con CDCA y GW4064. Como control positivo se midieron paralelamente los niveles del receptor nuclear atípico SHP.

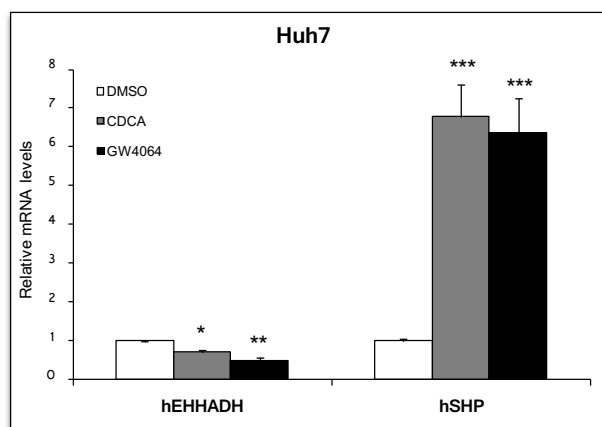


Fig. 19: Células Huh7 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M). Niveles de mRNA normalizados por los niveles de 18S. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

En la figura 19 se muestra como los niveles del mRNA de *EHHADH* disminuyen por los tratamientos con CDCA y GW4064 en un 30% y un 50%, respectivamente, con respecto al tratamiento con DMSO. Los valores de *SHP* aumentan unas 7 veces con respecto al tratamiento con DMSO.

## Genes implicados en la cetogénesis

### Una enzima clave de la cetogénesis se reprime por GW4064

La cetogénesis es el proceso metabólico por el cual se forman los cuerpos cetónicos (acetoacetato, acetona y betahidroxibutirato) a partir de la oxidación de los ácidos grasos. Los cuerpos cetónicos son producidos principalmente en las mitocondrias de las células hepáticas como consecuencia de la deficiencia de glucosa en sangre, ya que en esta situación las células obtienen la energía de los ácidos grasos almacenados formando acetil-CoA. En condiciones normales este acetil CoA sigue oxidándose en el ciclo de Krebs, pero si la cantidad es muy grande o no hay suficiente cantidad de intermediarios de dicho ciclo, el acetil-CoA se destina a la biosíntesis de cuerpos cetónicos.

La enzima clave de la producción de cuerpos cetónicos a partir de acetil CoA es la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa mitocondrial (HMGCS2). El gen que codifica esta enzima aparece reprimido por el tratamiento con GW4064 en el *microarray* de células Huh7. Se realizó una medida de los niveles de mRNA de dicho gen por PCR cuantitativa para comprobar este resultado en células Huh7 tratadas con CDCA y GW4064.

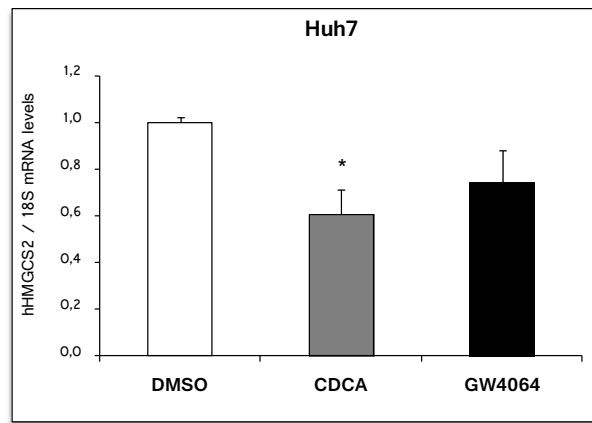


Fig. 20: Células Huh7 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \* $P < 0.05$ ; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Como se puede observar en la figura 20, los niveles del gen *HMGS2* disminuyen con los tratamientos con CDCA y GW4064, llegando a ser significativos en el caso del tratamiento con el ligando natural de FXR.

## Regulación del metabolismo ácidos grasos

### La expresión del receptor nuclear PPAR $\alpha$ se reprime por GW4064 en células Huh7

PPAR $\alpha$  es un receptor nuclear activado por ácidos grasos cuya función es regular el metabolismo de estos lípidos a nivel hepático. La activación de este receptor nuclear promueve la absorción, utilización y catabolismo de los ácidos grasos mediante la inducción de genes involucrados en su transporte y  $\beta$ -oxidación, tanto mitocondrial como peroxisomal. También hay estudios que demuestran que PPAR $\alpha$  se activa en condiciones de deficiencia de nutrientes y es necesario para el proceso de cetogénesis, como respuesta adaptativa a un ayuno prolongado (Kersten S et al, 1999).

Los datos obtenidos del *microarray* realizado Huh7 tratadas con GW4064 muestran una disminución de los niveles de *PPAR $\alpha$* . Se realizó una PCR cuantitativa para medir los niveles del mRNA de *PPAR $\alpha$*  en estas células tratadas con ligandos de FXR, CDCA y GW4064.

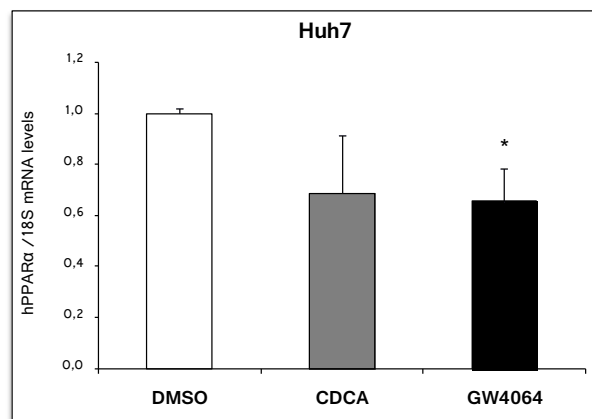


Fig. 21: Células Huh7 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \* $P < 0.05$ ; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.



Como queda plasmado en la figura 21, los tratamientos con los ligandos de FXR son capaces de disminuir los niveles de *PPARα*, de una forma significativa en el caso del tratamiento con el ligando sintético y específico de FXR, el GW4064.

### Los ligandos de FXR no disminuyen los niveles de *PPARα* en hepatocitos primarios humanos

Para profundizar en el estudio de la disminución de los niveles de *PPARα* debida a los ligandos de FXR, se utilizó un modelo más fisiológico como son los hepatocitos primarios humanos. Este modelo fue tratado con los mismos ligandos de FXR con los que se trataron las Huh7 y por el mismo periodo de tiempo. Posteriormente se analizaron los niveles de *PPARα* por PCR cuantitativa.

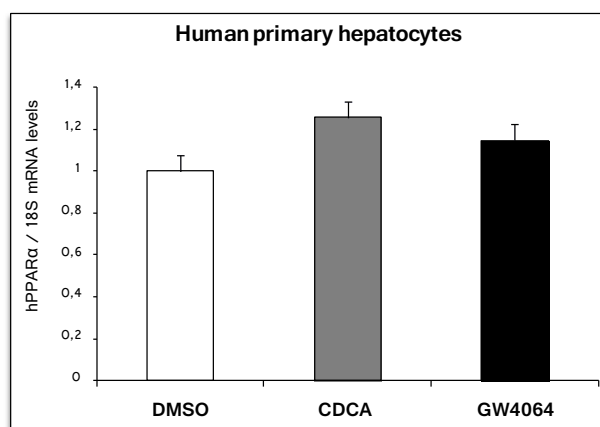


Fig. 22: Hepatocitos primarios humanos tratados durante 24 horas con CDCA (50μM) y GW4064 (5μM). Media ± SEM de n=4 muestras por condición; \*P<0.05; \*\*P<0.01; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

En la figura 22 se muestra como los niveles del mRNA de *PPARα* no presentan cambios significativos en los hepatocitos primarios humanos tratados con CDCA y GW4064. Como control positivo del experimento se midieron los niveles del mRNA de *SHP* en las mismas condiciones, obteniéndose inducciones muy significativas de sus niveles de mRNA (ver Fig.6).

### El GW4064 no compete con el ligando sintético de *PPARα*, el WY14643

En la bibliografía se observaba una gran controversia en los estudios llevados a cabo con ácidos biliares y el receptor nuclear *PPARα*. Por un lado, existen autores que afirman que los ácidos biliares son capaces de incrementar los niveles de *PPARα* tanto de mRNA como proteicos en células de hepatoma humano, HepG2, tratadas con el GW4064 (Pineda Torre I et al, 2003). Sin embargo, otros estudios muestran como los ácidos biliares, como el CDCA, son capaces de antagonizar a *PPARα* y disminuir la expresión de genes diana de la β-oxidación (Sinal C J et al, 2001).

En base a estos estudios y en los resultados obtenidos en las PCR cuantitativas realizadas en los apartados anteriores, se planteó la hipótesis de que el ligando de FXR, GW4064, podría estar uniéndose a *PPARα* en el mismo sitio en el que se une su propio ligando, ácidos grasos o un ligando sintético WY14643, de tal forma que impediría así la regulación de la expresión de sus genes diana.

Con el objetivo de demostrar si la hipótesis era correcta, se realizaron experimentos con un sistema GAL4 que se componía de:

- un plásmido reportero con 5 elementos de respuesta a GAL4, denominados UAS.
- un plásmido de expresión con el dominio de unión al DNA (DBD) de la proteína GAL4 fusionado con el dominio de unión a ligando (LBD) de PPAR $\alpha$ , que responde a los estímulos de diferentes ligandos.
- un plásmido que expresa el DBD de GAL4 fusionado con un dominio de activación vírico, el VP16, que se utiliza como control positivo de la transfección.

Con este sistema GAL4 se realizaron ensayos de actividad luciferasa en células Hek-293 tratadas durante 48h con los ligandos WY14643, GW4064 y una mezcla de éstos en un medio con suero deslipidizado para que no interfiera en la activación de PPAR $\alpha$ .

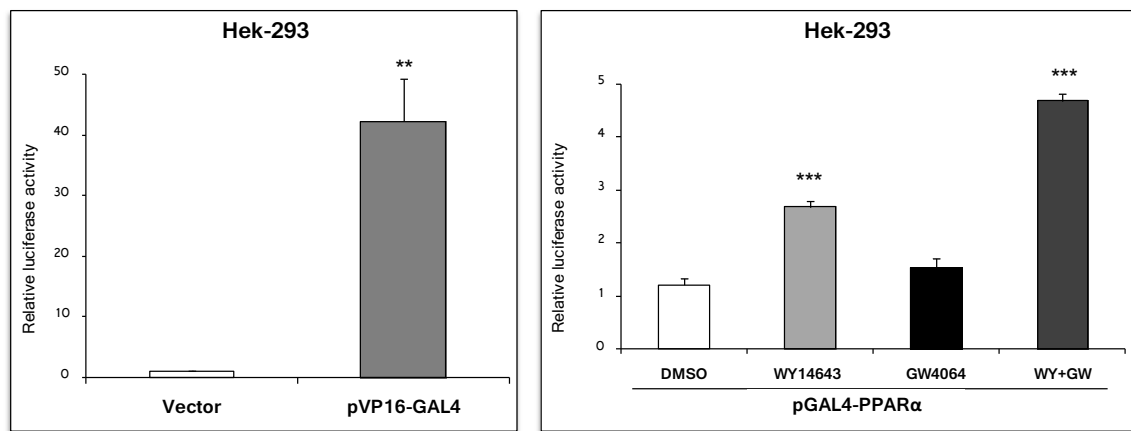


Fig. 23: Células Hek-293 transfectadas con un reportero con 5 elementos de respuesta a GAL4, y los vectores de expresión: pFA-CMV (vector), pVP16-GAL4 y pGAL4-PPAR $\alpha$ . Los tratamientos se llevaron a cabo durante 48 horas con WY14643 (10 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de tres experimentos con n=3 cada uno; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; la estadística fue realizada con *T-test de Student* respecto a los valores de las células transfectadas con el vector y tratadas con DMSO.

La gráfica de la derecha de la figura 23 muestra como el tratamiento con WY14643 casi duplicó la actividad luciferasa del reportero en presencia del plásmido que expresaba la proteína de fusión GAL4 (DBD)-PPAR $\alpha$  (LBD). El tratamiento con GW4064 no inducía la actividad luciferasa con respecto al tratamiento con el vehículo DMSO. Sin embargo, cuando se trataban las células con los dos ligandos se observaba una mayor inducción de la actividad luciferasa que cuando se realizaba únicamente con el WY14643. En la gráfica de la izquierda de esta figura se presentan los efectos del control negativo (vector) y positivo (pVP16-GAL4) sobre el plásmido reportero.

### Análisis de la interferencia por CDCA de la unión de PPAR $\alpha$ a su coactivador PGC1 $\alpha$

En el estudio realizado y publicado en el 2001 (Sinal C J et al, 2001) se mostraba como los ácidos biliares eran capaces de interferir en la unión de PPAR $\alpha$  con sus coactivadores, disminuyendo así su capacidad de transactivación.

Debido a que la hipótesis anterior no había podido ser confirmada, se llevó a cabo un experimento que permitía evaluar la unión de PPAR $\alpha$  con sus coactivadores e intentar interferirla mediante la

adición de ácidos biliares. Dicho experimento consistía en un ensayo de *GST Pull-down* en el cual se usó una *GST* control (*GST*), otra *GST* unida a *PPARα* (*GST-PPARα*) y la proteína *PGC1α* expresada mediante transcripción y traducción *in vitro* (*TNT*). Posteriormente se realizaron las incubaciones en presencia de *WY14643*, *CDCA* o los dos juntos.

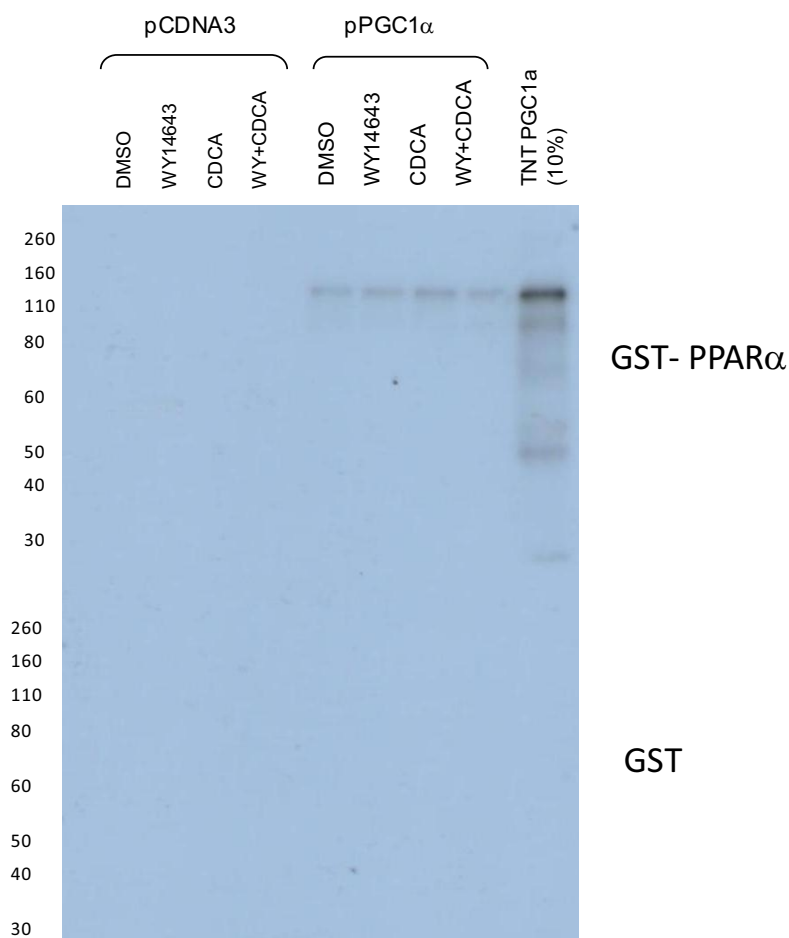


Fig. 24: Ensayo de *GST Pull-down* con el TNT de pCDNA3 y pCDNA3-PGC1α (pPGC1α), la proteína *GST* y *GST-PPARα*, y los reactivos *DMSO*, *WY14643* (10μM) y *CDCA* (100μM).

En la figura 24 se presentan los resultados obtenidos en el *GST pull down*, donde se puede apreciar la unión de *PGC1α* con la proteína *GST-PPARα* por la presencia de una banda entre 110 y 160KDa, mostrada también en el TNT (10%) de *PGC1α* utilizado como control positivo. Como se puede visualizar en el film, la intensidad de la banda no aumenta con el tratamiento con el ligando sintético de *PPARα*, el *WY14643*. En los casos del tratamiento con el *CDCA* no se aprecia ninguna variación con respecto a la intensidad de la banda obtenida con *DMSO*, ni tampoco al combinarse *CDCA* con *WY14643*.



**FABP3: transporte de ácidos grasos y cáncer**



FABP3 es una proteína de bajo peso molecular, citoplasmática y mayoritariamente expresada en corazón. Dicha proteína está involucrada activamente en el metabolismo de los lípidos, participando en el transporte de los ácidos grasos de cadena larga desde la membrana celular a los distintos orgánulos que los necesiten, como la mitocondria, los peroxisomas o el núcleo (Veerkamp JH and Maatman RG, 1995; Storch J and Thumser AEA, 2000). Debido a que es una proteína liberada por los miocitos tras un episodio de isquemia, FABP3 se utiliza como un sensible biomarcador de infarto de miocardio al poder detectarse en sangre dentro de las tres primeras horas siguientes al suceso (Kilcullen et al., 2007; Viswanathan et al, 2010). Además, se ha descrito un papel crucial de este gen en la parada del crecimiento de células epiteliales mamarias, donde se le conoce como MDGI, proponiéndose a este gen como un supresor de tumores en cáncer de mama humano (Huynh et al, 1996; Huynh and Pollak, 1997).

### La expresión de *FABP3* se induce por los ligandos de FXR en distintos modelos celulares

En el estudio de expresión génica desarrollado en el *microarray* de Huh7 se observó que el gen *FABP3* se inducía por el ligando específico y sintético de FXR por lo que se analizaron sus niveles en las células de hepatoma humano Huh7 tratadas con CDCA y GW4064. Aunque no se observó que en los resultados del experimento del *microarray* hubiera ninguna variación en los niveles de *FABP1*, el miembro de la familia de las FABP expresado mayoritariamente en hígado, se evaluaron sus niveles en las mismas condiciones.

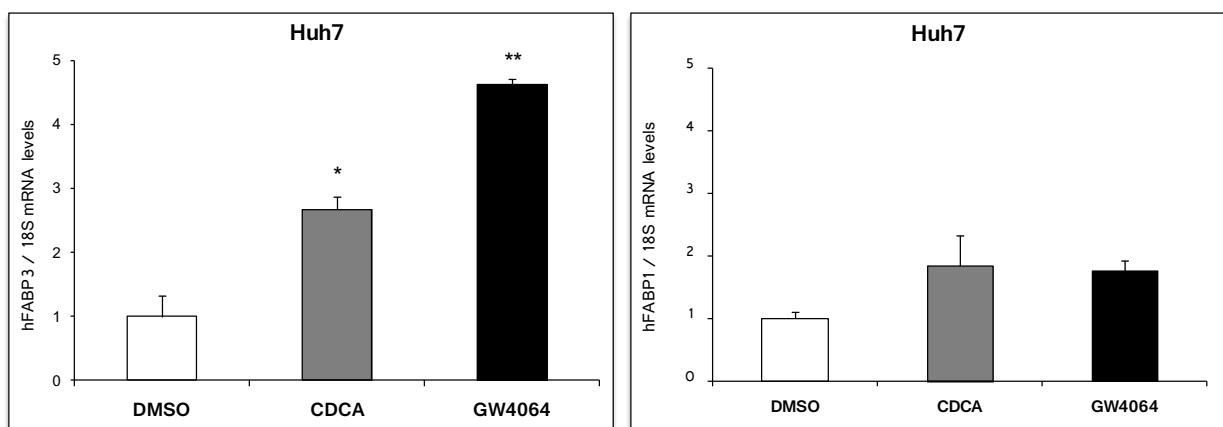


Fig. 25: Células Huh7 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de dos experimentos con n=3 por cada condición; \*P<0.05; \*\*P<0.01; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Como se puede observar en la figura 25, los niveles de mRNA de *FABP3* son inducidos por los activadores de FXR, natural y sintético (CDCA y GW4064) de manera significativa, mientras que los niveles de *FABP1* no varían significativamente con los mismos tratamientos. Estos datos corroboran los resultados obtenidos en el experimento de micromatrices realizado con el mismo modelo celular.

La sobreexpresión de FXR mediante la infección con adenovirus que expresaba una quimera con el dominio de activación de VP16 y FXR, de manera que su expresión está constitutivamente activado, permitió evaluar si *FABP3* se inducía en ausencia de ligando. La eficiencia de la sobreexpresión se comprobó mediante el análisis de los niveles proteicos de FXR en extractos totales de Huh7 (ver materiales y métodos; apartado "infección con adenovirus").

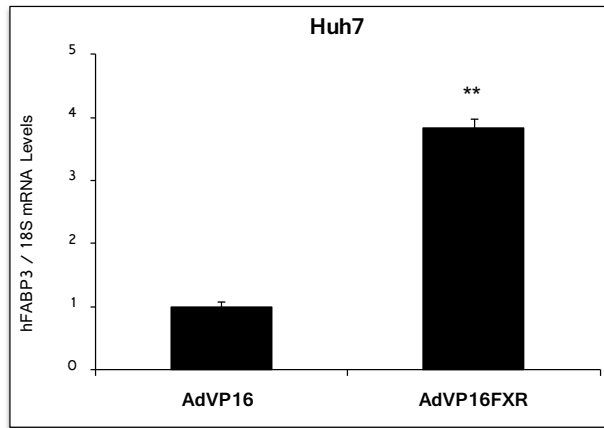


Fig. 26: Células Huh7 infectadas con AdVP16 y AdVP16FXR (ambos con 100MOIs) durante 48h. Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; la estadística con *T-test de Student* se realizó con respecto a los valores de las células infectadas con AdVP16 y tratadas con DMSO.

En la figura 26 podemos observar que la sobreexpresión de FXR induce de manera significativa la expresión génica de *FABP3* en dichas condiciones celulares. Utilizando un modelo más fisiológico, se analizaron los niveles de *FABP3* en hepatocitos primarios humanos tratados con CDCA y GW4064 durante 24 horas.

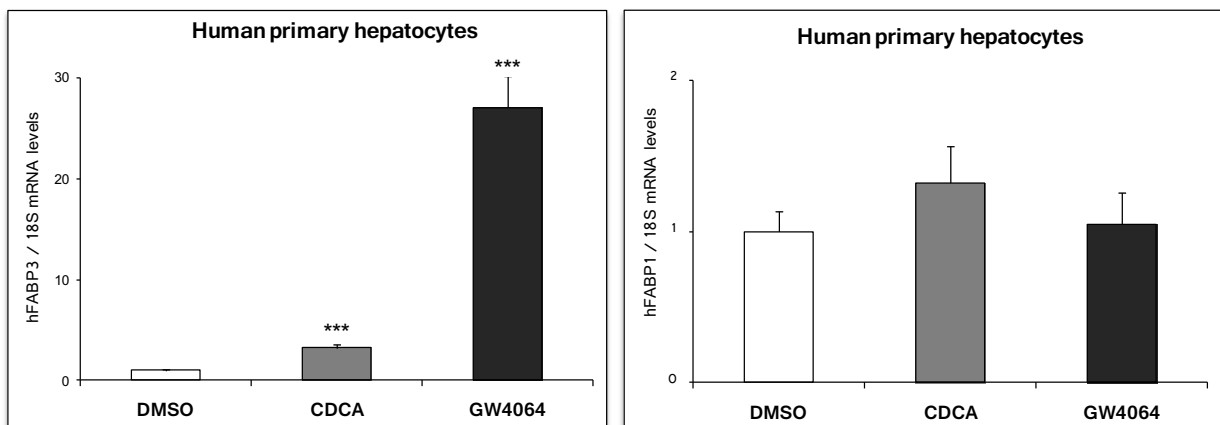


Fig. 27: Hepatocitos primarios humanos tratados durante 24 horas con CDCA (50 $\mu$ M) y GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=4 muestras por condición; \*\*\*P<0.001; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con T-test de Student.

Como se puede observar en la figura 27, los niveles de *FABP3* son marcadamente inducidos por ambos ligandos de FXR, sobre todo con el tratamiento con GW4064, con el que sus niveles son inducidos casi 30 veces con respecto al vehículo. Los niveles de *FABP1* no se inducen significativamente en este contexto, corroborando la especificidad de la regulación de *FABP3* por ligandos de FXR.

Previamente se ha descrito en la bibliografía que *FABP6* (también denominada IBABP) es una de las proteínas de la familia *FABP* capaz de transportar ácidos biliares en el interior del enterocito, además de ser inducida fuertemente por FXR (Hwang ST et al, 2002). Debido a esto, comprobamos si *FABP6* era la única proteína *FABP* que se inducía por FXR en células intestinales. Para ello realizamos una diferenciación durante 30 días de células Caco-2 para posteriormente tratarlas con los ligandos de FXR, CDCA y GW4064, y analizar los niveles de *FABP1*, *FABP3* y *FABP6* en estas condiciones.



## Resultados

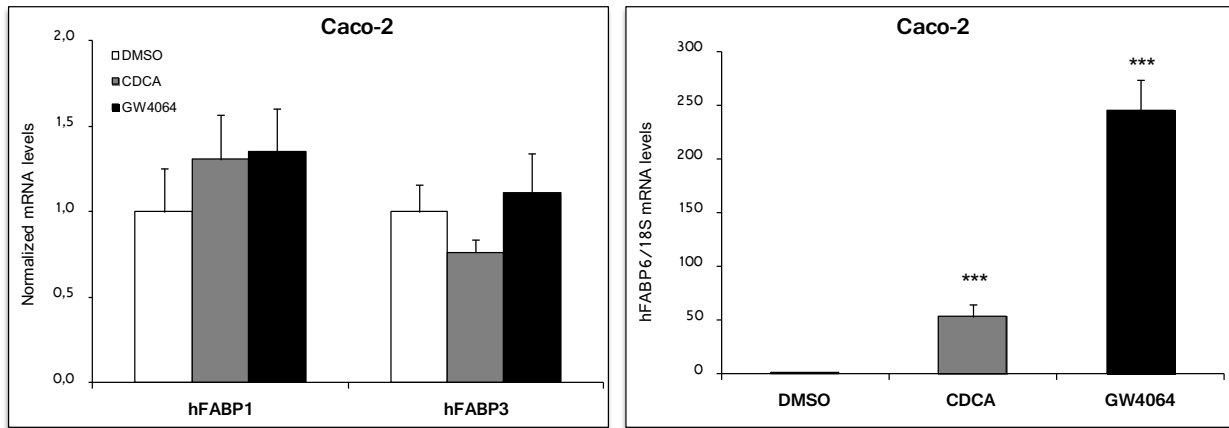


Fig. 28: Células Caco-2 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M) después de una diferenciación por confluencia durante 30 días. Niveles de mRNA normalizados por el contenido de 18S. Media  $\pm$  SEM de n=3 por condición; \*\*\*P<0.001; estadística con respecto a la condición DMSO realizada con *T-test de Student*.

Como se puede ver en la figura 28, no se observa ninguna diferencia significativa entre los valores de las células tratadas con GW4064 o CDCA en el mRNA de los genes *FABP1* y *FABP3*. Sin embargo, *FABP6* responde significativamente a los tratamientos con los ligandos de FXR, llegando a aumentar sus niveles más de 200 veces en el caso del tratamiento con GW4064.

Está demostrado que los ácidos grasos están implicados en la aterosclerosis y pueden causar daños en células del músculo liso y células endoteliales de los vasos sanguíneos (Corr PB et al, 1984; Kleine et al, 1992). En base a estudios que muestran la expresión de *FABP3* en células de aorta de rata (Sakai K et al, 1995) y a los resultados obtenidos en los *microarrays* de células VSMC y HUVEC, se estudió su posible regulación por FXR en dichos modelos. A pesar de que varios autores han mostrado que FXR se expresa en este tipo de células (He F et al, 2006; Li YT et al, 2007), no se obtuvo respuesta a los activadores de FXR con estas células en cultivo (ver materiales y métodos, apartado "infección con adenovirus). Para solventar estos problemas técnicos se infectaron estas células con un adenovirus que expresaba el gen humano de FXR constitutivamente activado por el dominio del herpes virus VP16 (AdVP16FXR) para conseguir una expresión óptima de dicho gen. Puesto que en la bibliografía ya se encuentran referencias en las cuales complementan esta infección con el tratamiento con GW4064 (Modica S et al, 2008), se siguió esta estrategia con nuestros modelos celulares. Una vez comprobada la eficiencia de infección se analizaron los niveles de *FABP3* en estas células.

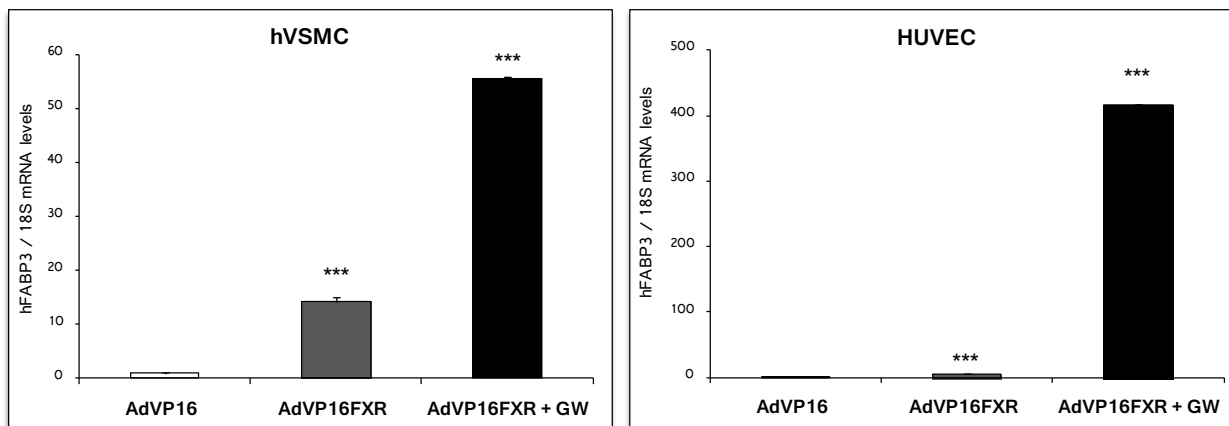


Fig. 29: Células hVSMC y HUVEC infectadas con AdVP16 y AdVP16-hFXR (100 y 40MOIs respectivamente) durante 48h y tratadas durante las últimas 24 horas con GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de dos experimentos con n=3/condición; \*\*\*P<0.001; la estadística con respecto a los valores AdVP16 fue realizada con *T-test de Student*.

En la figura 29 los niveles de expresión de *FABP3* son inducidos por la infección del adenovirus que sobreexpresaba FXR en ambas líneas celulares. Cuando se realiza el tratamiento con GW4064 juntamente con la infección, el aumento en la inducción de los niveles de *FABP3* es mucho mayor que el observado solo con la infección, llegando sus niveles a incrementarse más de 50 veces en el caso de las hVSMC y más de 400 en el caso de HUVEC.

Se han descrito a *FABP1* y *FABP3* como biomarcadores de daño renal (Pelsers MM, 2008). Debido a que se ha publicado que FXR se expresa en riñón humano (Bishop Bailey D et al, 2004) pero no se obtuvo respuesta a los activadores de FXR con estas células en cultivo (ver materiales y métodos, apartado “infección con adenovirus”), se infectaron estas células con el adenovirus que sobreexpresaba FXR parcialmente activado con el dominio de activación VP16. Observando que los niveles de *FABP3* estaban aumentados en el *microarray* de las células de túbulo renal HK-2, se analizaron por PCR cuantitativa los niveles de la *FABP1* y *FABP3* en estas células infectadas con AdFXR y posteriormente tratadas con GW4064.

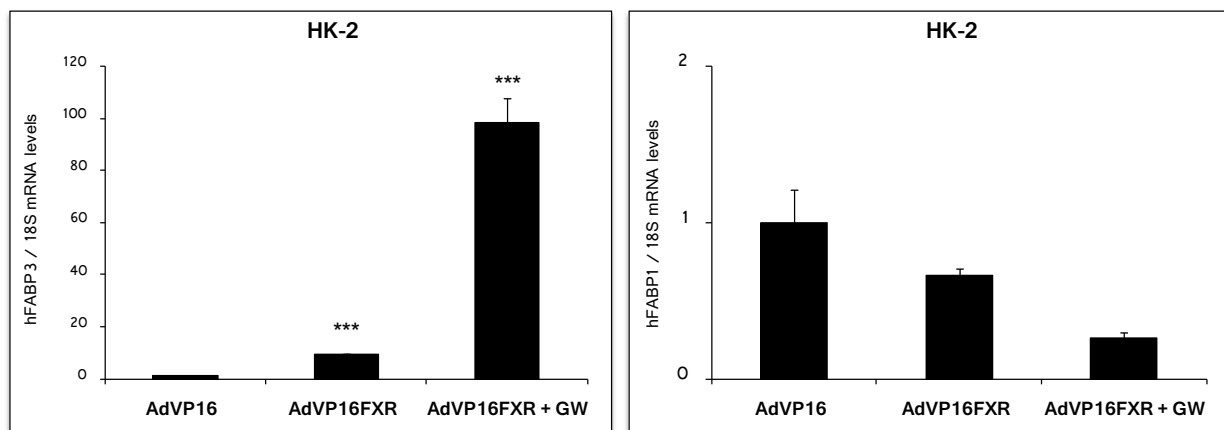


Fig. 30: Células HK-2 infectadas con AdVP16 y AdVP16-hFXR (50MOIs respectivamente) durante 48h y tratadas durante las últimas 24 horas con GW4064 (5µM). Media ± SEM de dos experimentos con n=3/condición; \*\*\*P<0.001; la estadística con respecto a los valores AdVP16 fue realizada con *T-test de Student*.

Como se observa en la figura 30 el gen *FABP3* muestran una inducción significativa de su expresión tras la infección con el adenovirus que sobre expresa una quimera de FXR con el dominio de activación VP16. Dicha inducción es marcadamente superior cuando tras la infección se completa la activación de FXR con el tratamiento con GW4064. Los valores de *FABP1* no varían significativamente con la infección.

Debido a la implicación funcional de *FABP3* en otros tejidos, como el muscular cardiaco, se ha estudiado también su posible regulación por FXR en un modelo celular de corazón humano, como las células ventriculares AC16, que fueron tratadas con los ligandos de FXR (CDCA y GW40464) durante 24h. Se analizaron por RT-PCR los niveles de *FABP3* y, para evaluar la funcionalidad de FXR en este modelo, se hizo lo mismo con los correspondientes a *SHP*.

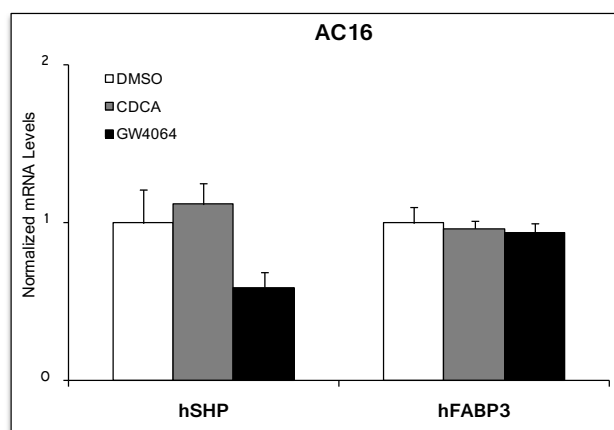


Fig. 31: Células AC16 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (5 $\mu$ M). Niveles de mRNA normalizados por el contenido de 18S. Media  $\pm$  SEM con n=3 por cada condición; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

En la figura 31 se muestran los resultados obtenidos en el tratamiento de cardiomiocitos con ligandos de FXR. Como se puede observar, ni el gen *SHP* ni *FABP3* muestran ninguna inducción en su expresión génica tras los tratamientos. Se analizaron los niveles de FXR comprobando que su expresión en dichas células era baja (Ct=34) en comparación con las células Huh7 (Ct=21), lo que puede indicar que FXR no se exprese suficientemente como para inducir ambos genes.

También se llevaron a cabo estudios de la posible regulación de *FABP3* por FXR en células de cáncer de mama. Debido al papel crucial que tiene *FABP3* en la inhibición del crecimiento en células epiteliales de cáncer de mama (Kurtz et al, 1990), se investigó si en varios modelos celulares FXR podría estar regulando la expresión de *FABP3*. Para estudiar dicha regulación analizamos los niveles de mRNA del gen *FABP3* en células MCF-7 y MDA-MB-231, donde la expresión de FXR ha sido descrita (Swales KE et al, 2006), tratadas con CDCA y GW4064.

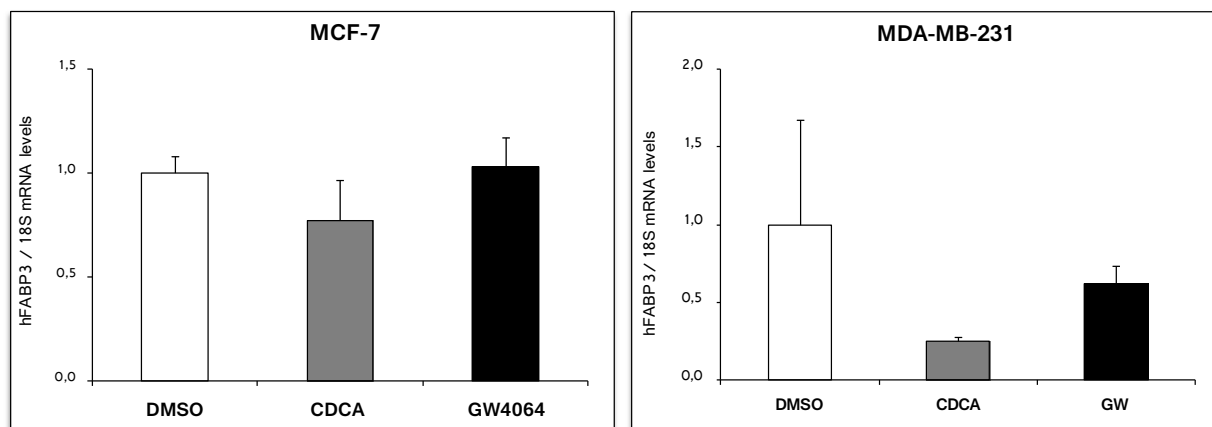


Fig. 32: Células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (100 $\mu$ M) durante 24h. Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; la estadística con respecto a los valores DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Como se puede ver en la figura 32, la expresión de *FABP3* en ambos tipos celulares no es inducida por los ligandos de FXR. Se apreció que, debido a la baja expresión del mRNA de *FABP3* en estos tipos celulares (Ct=36), su cuantificación estaba en el límite de detección. Con el objetivo de saber si en

## Resultados

estos modelos FXR era funcional o no era capaz de inducir lo suficiente a FABP3 para sobrepasar la hipermetilación a la que está sometido en cáncer de mama (Huynh H et al, 1996), se midió la expresión de uno de sus genes diana más conocido, *SHP*, del cual se ha descrito su expresión y se regulación positiva por FXR en estos tipos celulares (Swales KE et al, 2006).

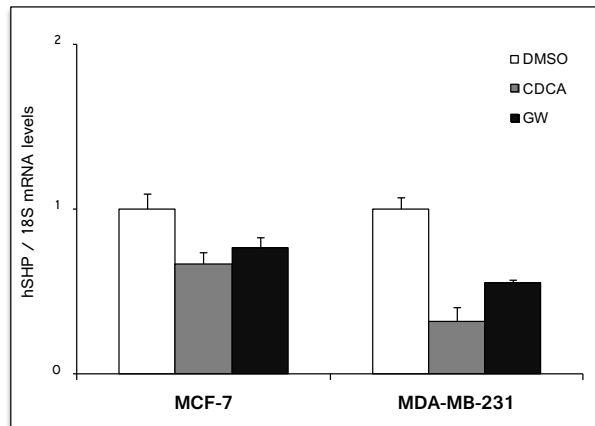


Fig. 33: Células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 tratadas con GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (100 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; la estadística con respecto a los valores DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

La figura 32 muestra que los valores del mRNA de *SHP* no son inducidos por el tratamiento. Los niveles de mRNA de *FXR* en estas células se midieron por PCR a tiempo real, descubriendo que estaban en el límite de detección. Para solventar este problema técnico se llevó a cabo la infección de dichos modelos celulares con un adenovirus que sobreexpresaba FXR. Se analizaron los niveles de *FXR* y de *SHP* para comprobar la eficiencia de la infección y la actividad transcripcional de FXR en dichas condiciones. Tras comprobar que la infección era óptima, se midieron los niveles de *FABP3* en ambos tipos celulares.

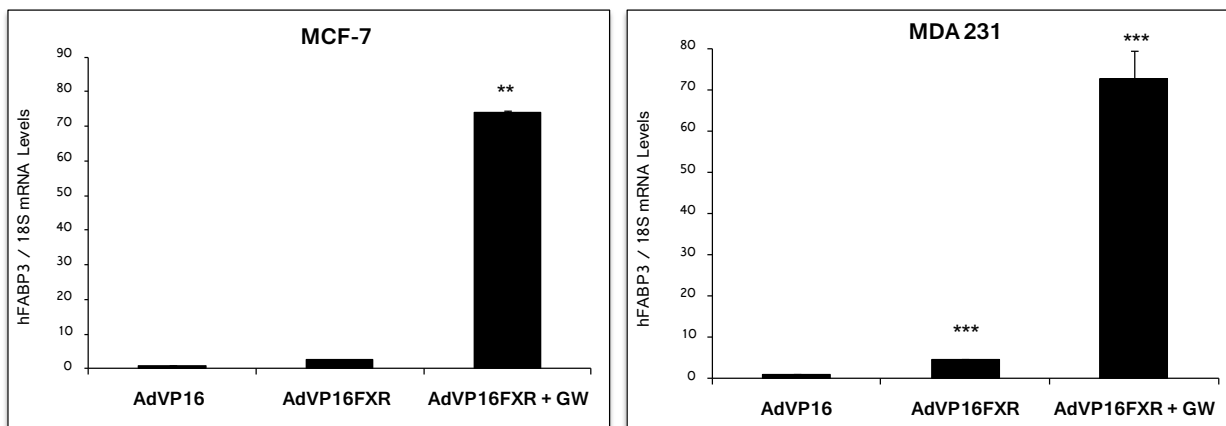


Fig. 34: Células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 infectadas con adenovirus AdVP16 y AdVP16-hFXR (20MOI en ambos tipos celulares) durante 48 h y tratadas con GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (100 $\mu$ M) durante 24 h más. Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; la estadística con respecto a los valores AdVP16 fue realizada con *T-test de Student*.

Como se puede apreciar en la figura 34, hay una gran inducción del gen *FABP3* en ambos tipos celulares sometidos a infección con el adenovirus que sobreexpresaba FXR. Para comprobar si esta inducción era exclusiva del gen *FABP3*, se examinaron los niveles de *FABP5*, el miembro de la familia de las FABPs mayoritario en tejido mamario, observando que no varía con la infección (figura 35).

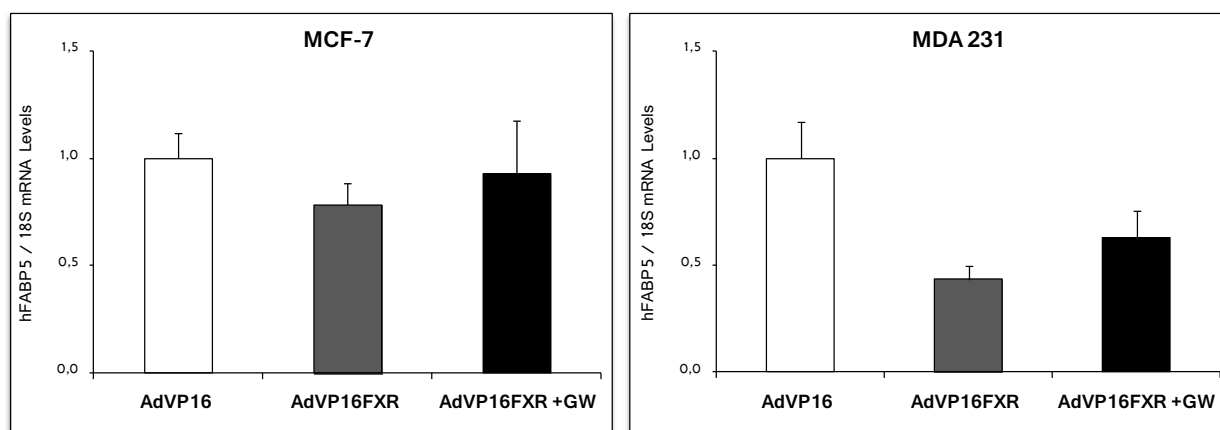


Fig. 35: Células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 infectadas con adenovirus AdVP16 y AdVP16-hFXR (20MOIs en ambos tipos celulares) durante 48 y tratadas con GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (100 $\mu$ M) durante 24h más. Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; la estadística con respecto a los valores AdVP16 fue realizada con *T-test de Student*.

### La inducción de *FABP3* por ligandos de FXR no se observa en células Huh7 transfectadas con siFXR

Con el objetivo de caracterizar la regulación de *FABP3* por los activadores de FXR en el modelo celular de hepatoma humano Huh7, se analizó su expresión en las condiciones en las que la expresión de FXR se ve significativamente disminuida por la transfección transitoria de un siRNA. Como control negativo se transfectó un siRNA control. Juntamente con las transfecciones se realizaron tratamientos posteriores con los ligandos de FXR, CDCA y GW4064. La eficiencia de la transfección con siRNAs se comprobó analizando los niveles de mRNA y proteína de FXR en Huh7 transfectadas, y también se comprobaron los niveles de mRNA de *SHP* (ver materiales y métodos, apartado “silenciamiento génico mediante siRNAs”).

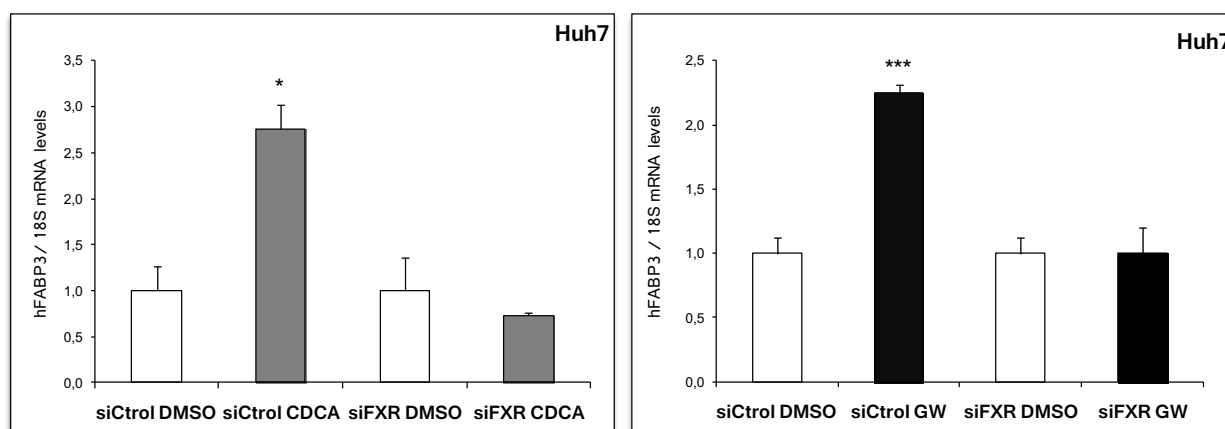


Fig. 36: Células Huh7 tratadas con siRNA control (siCtrl) y siRNA FXR (siFXR) a una concentración de 25nM durante 48 horas y tratadas con el ligando GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (100 $\mu$ M) durante las últimas 24h. Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; \*P<0.05; \*\*\*P<0.001; estadística realizada con *T-test de Student* de valores comparados con los valores de las células transfectadas con sus respectivos siRNAs y tratadas con DMSO.

Como se puede observar en la figura 36, los niveles de mRNA de *FABP3* se inducen significativamente por ambos activadores de FXR pero dicha inducción no se observa al transfectar el siRNA específico contra FXR y realizar el tratamiento con el ligando conjuntamente. Dicho resultado

corroboraba que la expresión de FXR es necesaria para la inducción de *FABP3*, en dicho modelo celular y con los ligandos de FXR usados.

La regulación que ejerce FXR sobre *FABP3* se produce a nivel transcripcional

Para analizar si la regulación observada era a nivel transcripcional, realizamos un tratamiento de las Huh7 a distintas horas con actinomicina D, reactivo que inhibe la transcripción. Mediante este experimento se analizaba la degradación del RNA de las células en presencia o no de ligandos de FXR.

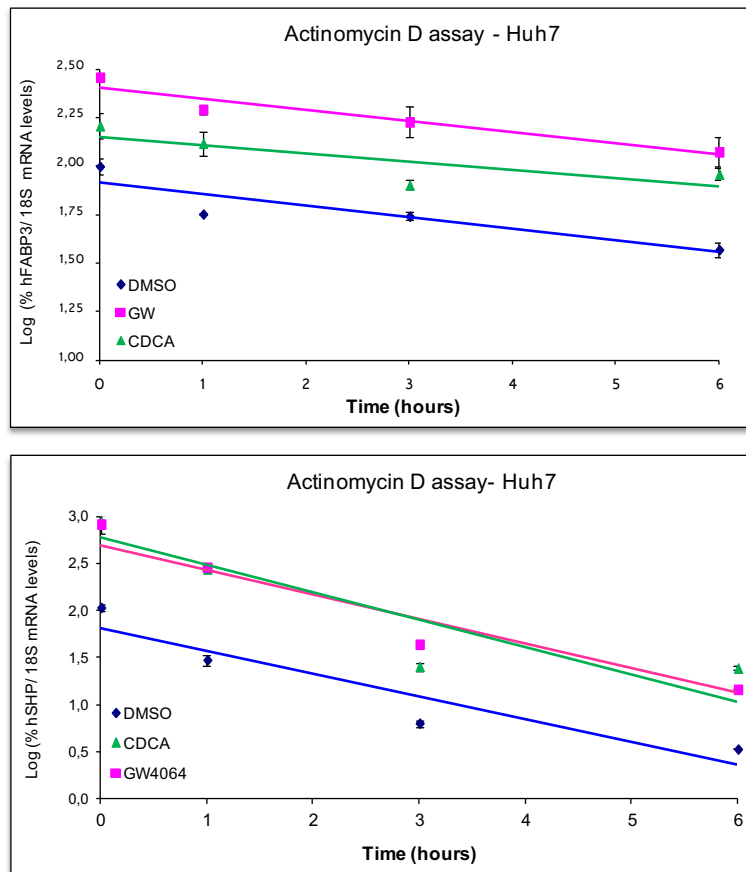


Fig. 37: Huh7 tratadas con DMSO, GW4064 (5µM) y CDCA (50 µM) durante 24h y posteriormente con actinomicina D durante 1, 3 y 6 horas a una concentración de 5 µg/ml. Representación del logaritmo de la variación en los niveles del mRNA de *FABP3* y *SHP* con respecto a 18S (en tanto por ciento) con respecto a las horas de tratamiento con actinomicina D. Media ± SEM de n=3/condición. Estadística realizada con *T-test de Student* con respecto a los niveles del tratamiento con DMSO.

En la gráfica superior de la figura 37, se observa cómo la pendiente de las rectas de la degradación del RNA de *FABP3* no varía significativamente entre la recta del DMSO y las de los tratamientos. Esto indica que la velocidad de degradación del RNA no varía con los tratamientos y por tanto la regulación de la expresión de *FABP3* por los ligandos de FXR es a nivel transcripcional. Como control positivo del tratamiento se evaluó la degradación del RNA de *SHP*, gráfica inferior. Se puede observar cómo a pesar de que la pendiente de las rectas es mayor que la pendiente de las rectas de *FABP3* (por una degradación del RNA de *SHP* más rápida) tampoco hay diferencias en el valor de las pendientes para las distintas condiciones del tratamiento.

Para profundizar en el mecanismo de dicha regulación, se realizó un análisis *in silico* del promotor y otras partes reguladoras del gen humano de *FABP3*, utilizando el programa bioinformático NUBIScan, en la búsqueda de posibles elementos de respuesta a FXR (principalmente IR1). Debido a que no se encontró en el promotor humano ninguna secuencia similar a la del *consensus*, se analizaron los intrones. De este análisis se obtuvo un posible elemento de respuesta a +4275 pares de bases (segundo intrón) del TSS. Dicho elemento se clonó en tándem delante del promotor heterólogo de la timidina kinasa (TK) de un plásmido reportero generando construcciones con varias copias del putativo elemento de respuesta. Posteriormente, por ensayos de transfección transitoria se analizó la actividad luciferasa de estas construcciones.

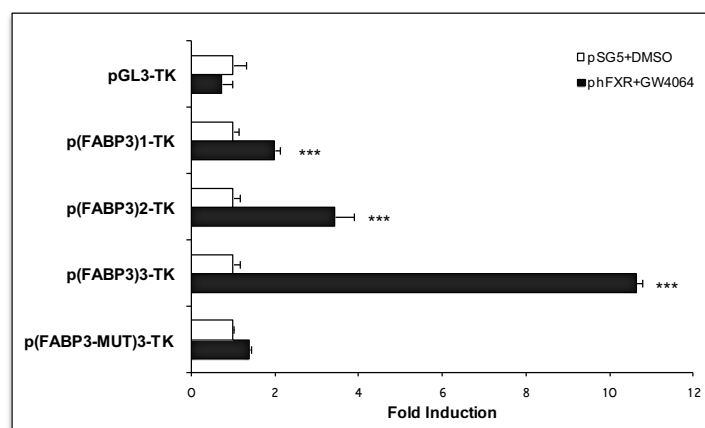


Fig. 38: Huh7 transfectadas con las construcciones de elementos de respuesta a FXR clonados en tándem, un plásmido de expresión de FXR (phFXR) o el vector correspondiente vacío (pSG5). Posteriormente fueron tratadas durante 24h con GW4064 (1 $\mu$ M) o el vehículo DMSO. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos con n=3 cada uno; \*\*\*P<0.001; la estadística con respecto a los valores de cada plásmido reportero con pSG5+DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

La figura 38 ilustra que el elemento IR-1 localizado *in silico* en el gen de *FABP3* es capaz de conferir respuesta a FXR a un promotor heterólogo. Además, la actividad luciferasa de los reporteros va en aumento a la vez que aumenta el número de copias clonadas en el plásmido. Cuando se mutan las tres copias de dicho elemento de respuesta, p(FABP3-MUT)<sub>3</sub>-TK, se pierde toda la inducción de la actividad luciferasa. Esto sugiere que la regulación transcripcional que ejerce FXR sobre *FABP3* se lleva a cabo a través de dicho elemento de respuesta.

### La inducción de *FABP3* por FXR se conserva en ratón

Se estudió si la regulación de *FABP3* por FXR también sucedía *in vivo*, en un modelo murino. Para ello se analizaron los niveles de mRNA de *Fabp3* en ratones control (WT) y ratones deficientes en FXR (KO) inyectados intraperitonealmente con GW4064 y tras 8 horas de tratamiento, fueron sacrificados para obtener el RNA del hígado.

## Resultados

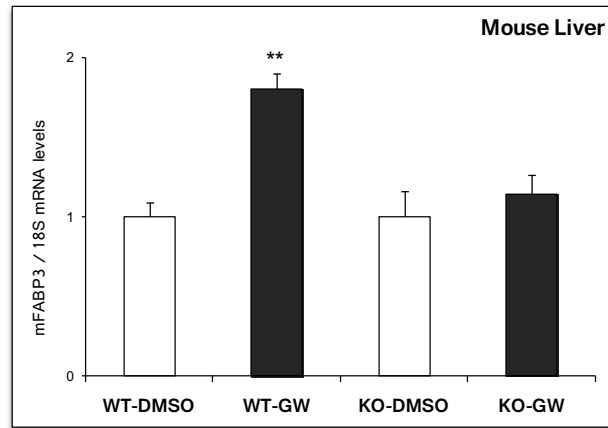


Fig. 39: Niveles hepáticos de ratones control (WT) y deficientes en FXR (KO) inyectados con 50mg de GW4064/kg y sacrificados a las 8h. Media  $\pm$  SEM de n=4 ratones/condición.; \*\*P<0.01; estadística realizada con *T-test de Student* con respecto a los ratones de cada condición tratados con el vehículo.

Como vemos en la figura 39, los ratones control inyectados con GW4064 muestran una inducción significativa de los niveles hepáticos de mRNA de *Fabp3* frente a los ratones control inyectados con el vehículo. En los ratones deficientes en *Fxr* los niveles de *Fabp3* no varían con el tratamiento con GW4064.



**RBP4: transportador de retinol**



La vitamina A es esencial para cualquier mamífero debido a sus importantes funciones en la visión, el mantenimiento de las superficies epiteliales, su participación en la respuesta inmunológica, en la reproducción y en el crecimiento y desarrollo embrionario. Debido a que los mamíferos no somos capaces de sintetizar dicha vitamina, debemos ingerirla con la dieta. Después de toda una serie de procesos metabólicos en diferentes órganos, el hígado es capaz de almacenar retinol y secretarlo para que sea transportado por la sangre a otros tejidos periféricos. Se ha demostrado que RBP4 es el único transportador del retinol, por lo que el estudio de su posible regulación por FXR resulta altamente interesante y novedoso.

### La expresión de *RBP4* se induce por activadores de FXR en modelos celulares humanos

Al analizar los resultados de los *microarrays* realizados en las células de Caco-2, HK-2, hVSMC y HUVEC, descubrimos que el gen *RBP4* aparecía inducido en todos ellos. En la bibliografía se encuentran trabajos que demuestran que la deficiencia o el exceso de vitamina A en el organismo producen cambios drásticos en la diferenciación de las células epiteliales (Wolbach and Howe, 1925). Considerando que en los vasos sanguíneos la vitamina A y sus derivados son transportados en forma de retinol unido a su transportador RBP4, quisimos estudiar si FXR estaba implicado en la regulación de *RBP4* en un contexto vascular. Para ello usamos células HUVEC y células VSMC infectadas con el adenovirus que sobreexpresaba FXR y tratadas posteriormente con GW4064.

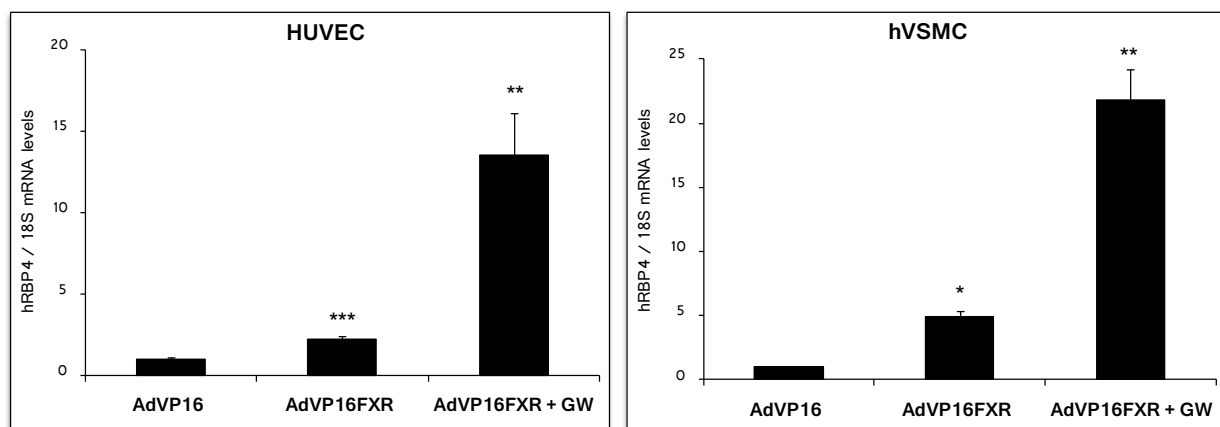


Fig. 40: Células HUVEC y VSMC infectadas con AdVP16 y AdVP16-hFXR (100 y 40 MOIs respectivamente) durante 48h y tratadas durante las últimas 24 horas con GW4064 (2µM). Media ± SEM de dos experimentos con n=3/condición; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; estadística con T-test de Student en comparación con los niveles de AdVP16.

En la figura 40 se muestra cómo la infección con el adenovirus de FXR induce significativamente la expresión de *RBP4* en ambos modelos celulares. En el caso de la sobreexpresión de FXR junto con el tratamiento con su ligando sintético, la inducción es marcadamente mayor.

Se analizaron los niveles de *RBP4* en Huh7 sometidas a tratamientos con CDCA y GW4064 con el objetivo de verificar si en un modelo hepático se inducía *RBP4* por el tratamiento con ligandos de FXR.

## Resultados

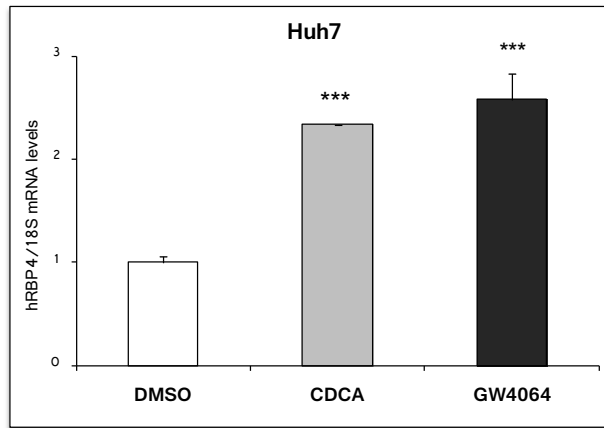


Fig. 41: Células Huh7 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Como se puede observar en la figura 41, ambos tratamientos con los activadores de FXR muestran inducciones marcadamente significativas de los niveles de *RBP4* en este modelo de hepatocarcinoma humano. Los tratamientos realizados previamente permiten suponer que FXR está implicado en las inducciones de los niveles de expresión de *RBP4*. Para demostrarlo se realizaron experimentos de sobreexpresión de FXR en células Huh7. La eficiencia de la sobreexpresión se comprobó mediante el análisis de los niveles proteicos de FXR en extractos totales de Huh7 (ver materiales y métodos, apartado “infección con adenovirus”).

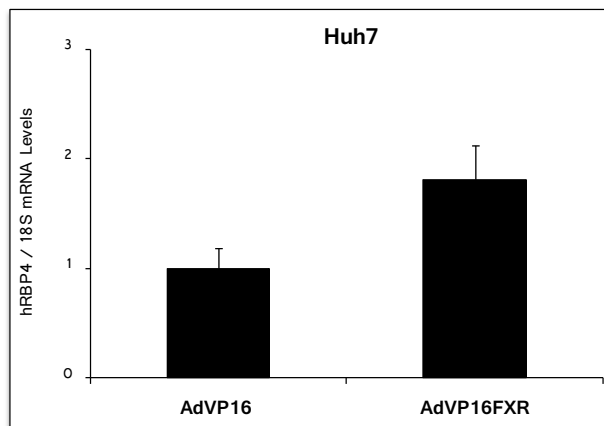


Fig. 42: Células Huh7 infectadas con AdVP16 y AdVP16FXR (ambos con 100MOIs) durante 48h. Media  $\pm$  SEM de  $n=3$  muestras por condición; la estadística con *T-test de Student* se realizó con respecto a los valores de las células infectadas con AdVP16.

Como se observa en la figura 42, los niveles del mRNA de *RBP4* se inducen, aunque no significativamente, con la infección del adenovirus que expresa la proteína quimérica VP16FXR.

Debido la función que realiza *RBP4* en el hígado, se quiso estudiar si la inducción en la expresión génica observada se reproducía en un contexto más fisiológico. Para ello se realizaron los tratamientos en hepatocitos primarios humanos, con los mismos ligandos y con la misma duración que los realizados a las células Huh7.

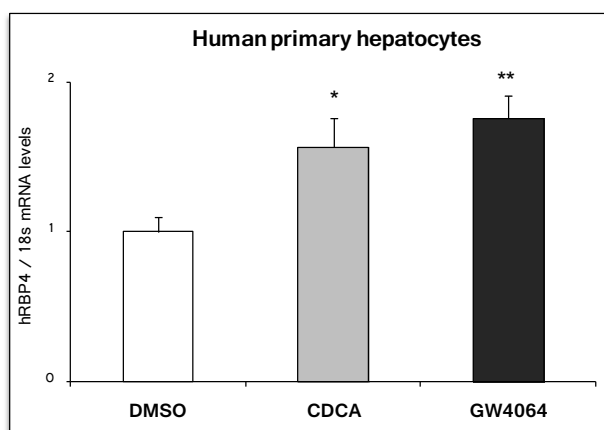


Fig. 43: Hepatocitos primarios humanos tratados durante 24 horas con CDCA (50 $\mu$ M) y GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=4 muestras por condición; \*P<0.05; \*\*P<0.01; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Los resultados reflejados en la figura 43 muestran una inducción significativa de los niveles de mRNA del gen *RBP4* para ambos tratamientos, por lo que estos resultados validaban los obtenidos en las células de hepatoma humano.

### La respuesta de *RBP4* a ligandos de FXR desaparece con la transfección del siFXR

Se midieron los niveles del mRNA de *RBP4* cuando en Huh7 se produce una deficiencia significativa de la expresión de FXR por una transfección transitoria con un siRNA contra FXR, seguido de un tratamiento con los diferentes activadores de este receptor nuclear. Se comprobó la eficiencia de la transfección con siRNAs, analizando los niveles de mRNA y proteicos de FXR en Huh7 transfectadas. También se comprobaron los niveles de mRNA de *SHP* con el objetivo de analizar la actividad transcripcional de FXR en estas células (ver materiales y métodos, apartado “silenciamiento génico mediante siRNAs”).

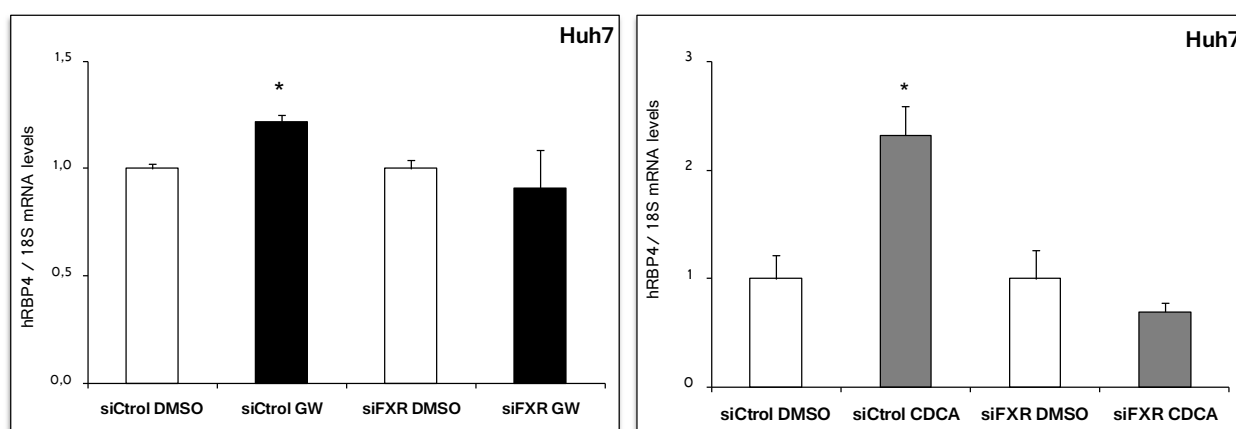


Fig. 44: Células Huh7 tratadas durante 48 horas con siRNA control (siCtrl) y siRNA FXR (siFXR) a una concentración de 25nM y tratadas durante las últimas 24h con el ligando GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (100 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; \*P<0.05; estadística realizada con *T-test de Student* de valores comparados con los valores de las células transfectadas con sus respectivos siRNAs y tratados con DMSO.

Aunque en ambos casos, mostrados en la figura 44, los tratamientos inducen significativamente la expresión génica de *RBP4*, dicha inducción de la expresión desaparece cuando la expresión de FXR está disminuida en estas células.

### FXR regula a *RBP4* de forma post-transcripcional

Para estudiar el mecanismo de regulación de *RBP4* por FXR se realizó un análisis *in silico* del promotor humano del gen, con el programa bioinformático NUBIScan, en busca de putativos elementos de respuesta a FXR. La región estudiada no mostraba ningún elemento de respuesta parecido al consenso, pero una colaboración con el grupo del doctor Francesc Villarroya permitió disponer de un plásmido que contenía unas 1200bp antes del TSS del promotor humano de *RBP4* clonado en pGL3-bv. Se analizó la actividad reportera de esta construcción mediante transfecciones transitorias en presencia de un plásmido que expresaba FXR, combinado con un tratamiento posterior de las células Huh7 con GW4064.

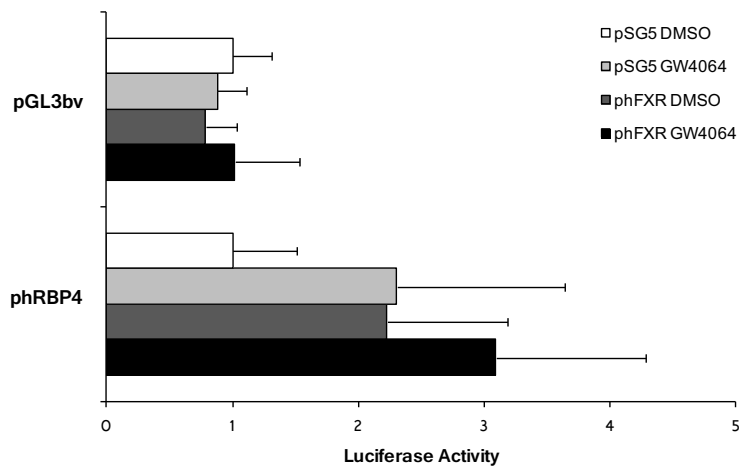


Fig. 45: Huh7 transfectadas con el plásmido que contiene el promotor humano de *RBP4* y el vector pGL3-bv junto con un plásmido de expresión de FXR (pSG5-hFXR) o su vector vacío (pSG5). Posteriormente fueron tratadas durante 24h con GW4064 (1 $\mu$ M) o el vehículo DMSO. Media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes con n=3 muestras por condición; estadística de valores con respecto al vector pGL3-bv con pSG5-DMSO realizada con *T-test de Student*.

Como podemos observar en la figura 45, la actividad luciferasa del promotor clonado en este plásmido no varía significativamente con respecto a la actividad del vector vacío. Debido a este resultado, y a que no se localizó ningún elemento de respuesta *in silico*, se realizó un experimento de células Huh7 tratadas con actinomicina D, un reactivo que inhibe la transcripción, para profundizar en la posible regulación del gen *RBP4* por FXR. Mediante este experimento se estudió la degradación del RNA de las células Huh7 en presencia o no de ligandos de FXR y de actinomicina D.

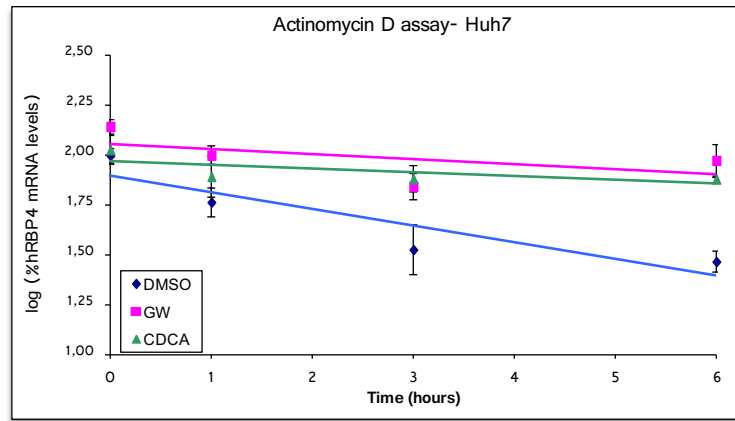


Fig. 46: Huh7 tratadas con DMSO, GW4064 (5µM) y CDCA (50 µM) durante 24h y posteriormente con actinomicina D durante 1, 3 y 6 horas a una concentración de 5 µg/ml. Representación del logaritmo de la variación en los niveles del mRNA de *RBP4* con respecto a 18S (en tanto por ciento) con respecto a las horas de tratamiento con actinomicina D. Media ± SEM de n=3/condición. Estadística realizada con *T-test de Student* con respecto a los niveles del tratamiento con DMSO.

En la figura 46 se puede apreciar como la pendiente de la recta de degradación del mRNA de las células tratadas con los ligandos de FXR (GW4064 y CDCA) es diferente a la de las células tratadas con vehículo (DMSO). Las pendientes de las rectas de los tratamientos son menores que la pendiente del vehículo, lo que indica que la vida media de degradación del mRNA de las células tratadas con los ligandos de FXR es mayor que el de las células tratadas con vehículo. Por tanto, este resultado sugiere que los ligandos de FXR son capaces de estabilizar el mRNA evitando su degradación y que FXR regula *RBP4* a través de otros mecanismos postranscripcionales.

### FXR es capaz de inducir *Rbp4* en ratón

Para confirmar si FXR era capaz de regular *Rbp4* en un modelo murino, se analizó su expresión génica en dos modelos celulares de hígado de ratón. Por un lado, se usaron las células AML12, que fueron tratadas con CDCA y GW4064 durante 24 horas. Por otro lado, se utilizaron las células Hepa 1-6, infectadas con el adenovirus que sobreexpresaba FXR y tratadas durante 24 horas con GW4064, para analizar los niveles de *Rbp4* en dicho contexto.

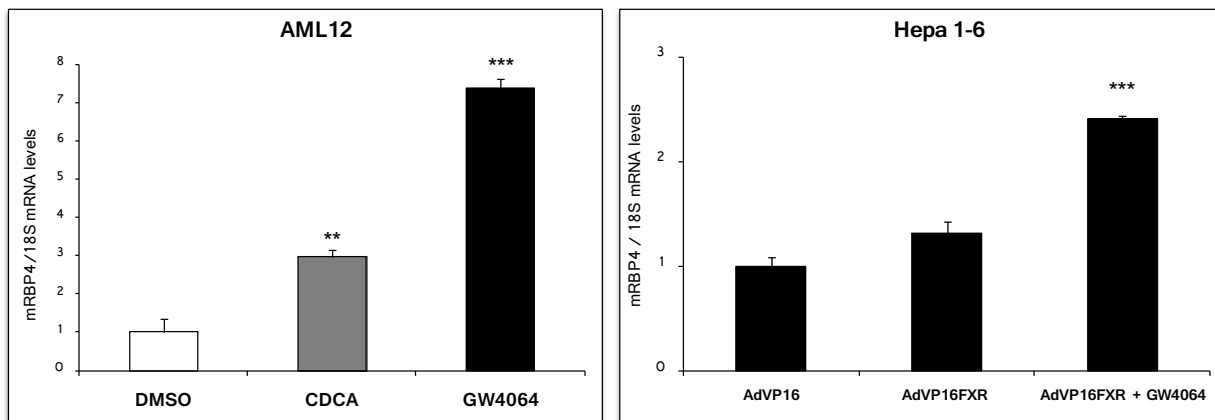


Fig. 47: Células AML12 tratadas durante 24 con CDCA (50µM) y GW4064 (5µM). Media ± SEM de n=3/condición; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; la estadística de valores con respecto al tratamiento con DMSO fue realizada con *T-test de Student*. Células Hepa 1-6 infectadas con AdVP16 y AdVP16FXR (75 MOIs) durante 48h. En las últimas 24 horas de la

## Resultados

infección las células fueron tratadas con GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3/condición; \*\*P<0.01; la estadística fue realizada con *T-test de Student* comparando cada condición con los niveles de AdVP16 tratado con DMSO.

En estos tipos celulares, mostrados en la figura 47, los niveles de *Rbp4* se inducen por los tratamientos con los ligandos de FXR en AML12, o por la sobreexpresión de FXR combinada con el tratamiento con GW4064 en Hepa1-6. En base a este resultado se quiso comprobar si en un modelo *in vivo* también tenía lugar inducción de *Rbp4* por FXR. Por ello se cuantificaron sus niveles de RNA en el hígado de ratones tratados con GW4064 durante 8h mediante inyección peritoneal.

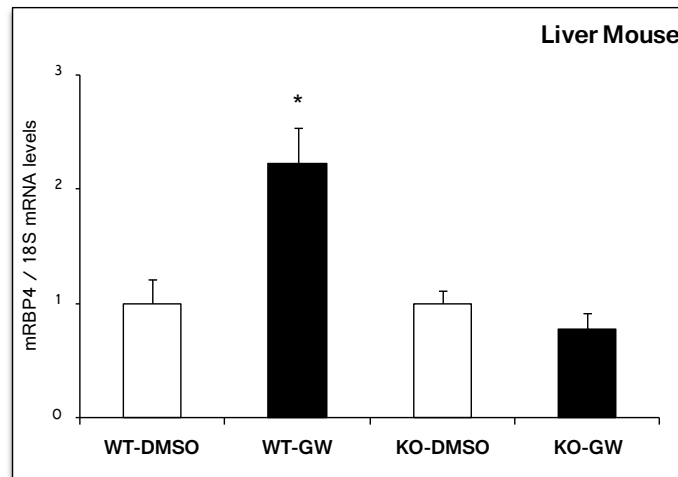


Fig. 48: Niveles hepáticos de ratones control (WT) y deficientes en FXR (KO) inyectados con 50mg de GW4064/kg y sacrificados a las 8h. Media  $\pm$  SEM de n=4 ratones/condición.; \*P<0.05; estadística realizada con *T-test de Student* con respecto a los ratones de cada condición tratados con el vehículo.

Como se puede deducir de la figura 48, los ratones WT inyectados con GW4064 mostraban una inducción significativa de los valores de *Rbp4* en comparación con los ratones WT inyectados con el vehículo. Dicha inducción no se observaba en los ratones deficientes en FXR y tratados con el GW4064, situación similar a la observada con el gen *Shp*, utilizado como control positivo de este experimento (ver Fig. 14). Ambos resultados, en el modelo celular y animal, indicaban que existía una regulación de *Rbp4* por FXR en el hígado murino.



**TCEA2: genotoxicidad por exceso de ácidos biliares**



La exposición continuada a un exceso de ácidos biliares induce la producción de especies reactivas de oxígeno y el daño oxidativo al DNA, altamente perjudiciales para la célula ya que pueden derivar en un bloqueo de la elongación de la transcripción. Cuando la RNA Polimerasa II no puede continuar con la transcripción, la célula puede activar mecanismos que den lugar a apoptosis. En la bibliografía se ha descrito que el factor de elongación TCEA2 permite que la RNAPII sobrepase este daño oxidativo y continúe la transcripción (Charlet-Berguerand N et al, 2006). En todos los *microarrays* llevados a cabo descubrimos que el gen *TCEA2* estaba altamente inducido.

### La expresión de *TCEA2* se induce por activadores de FXR en distintos modelos celulares

Con el objetivo de analizar la regulación de *TCEA2* por FXR y confirmar los resultados obtenidos en el *microarray* de Huh7, se estudiaron sus niveles de expresión en las células de hepatoma humano Huh7 y HepG2 sometidas a tratamientos con diferentes activadores de FXR, CDCA y GW4064.

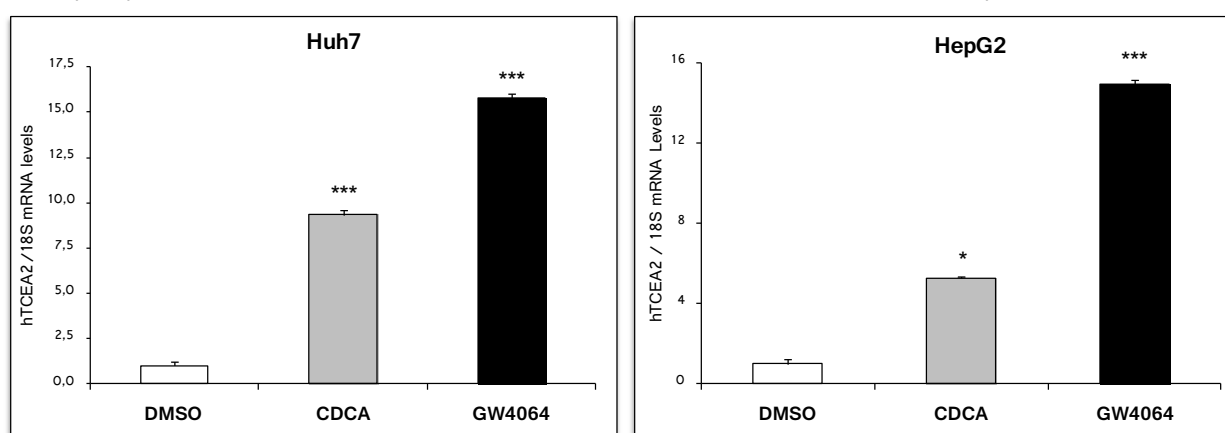


Fig. 49: Células Huh7 y HepG2 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 por cada condición; \*P<0.05; \*\*\*P<0.001; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Como se puede observar en la figura 49, los niveles de mRNA de *TCEA2* se inducen por los activadores de FXR en ambos modelos celulares de manera significativa. Para profundizar en el papel de FXR en la regulación de *TCEA2* por GW4064 y CDCA, se utilizó la sobreexpresión de FXR en Huh7. Se infectaron las células con un adenovirus que sobreexpresaba la proteína de fusión VP16-hFXR (AdVP16FXR) y con un adenovirus control que solo contenía VP16 (AdVP16).

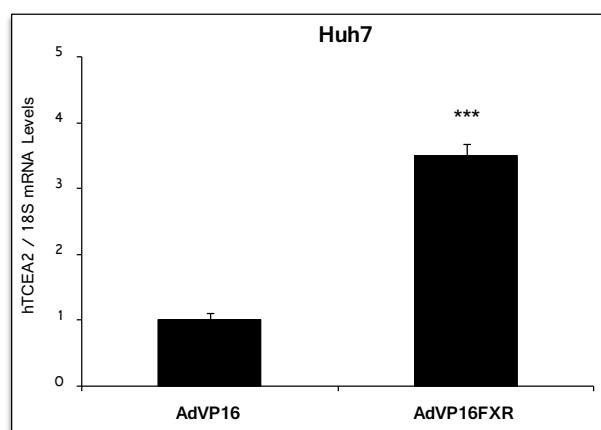


Fig. 50: Células Huh7 infectadas con AdVP16 y AdVP16-hFXR (100MOIs) durante 48h. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos con n=3; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; estadística con *T-test de Student*.

En la figura 50 se puede observar que la sobreexpresión de FXR induce de manera significativa la expresión de *TCEA2*.

Considerando que la función de *TCEA2* es indispensable para la supervivencia celular en casos de toxicidad, se analizaron los niveles de mRNA de este gen en modelos celulares de diferentes tejidos. Se usaron modelos celulares humanos de tipo endotelial, como HUVEC; de tipo muscular, como VSMC; de tipo renal, como HK-2; y de tipo mamario, como MDA-MB231. Debido a que la expresión de FXR en dichos modelos no es detectable en los clones celulares empleados, se utilizó un adenovirus constitutivamente activado que expresaba la proteína FXR (AdVP16-hFXR). Debido a que la expresión de FXR en dichos modelos no es detectable en los clones celulares empleados, se utilizó un adenovirus constitutivamente activado que expresaba la proteína FXR (AdVP16-hFXR).

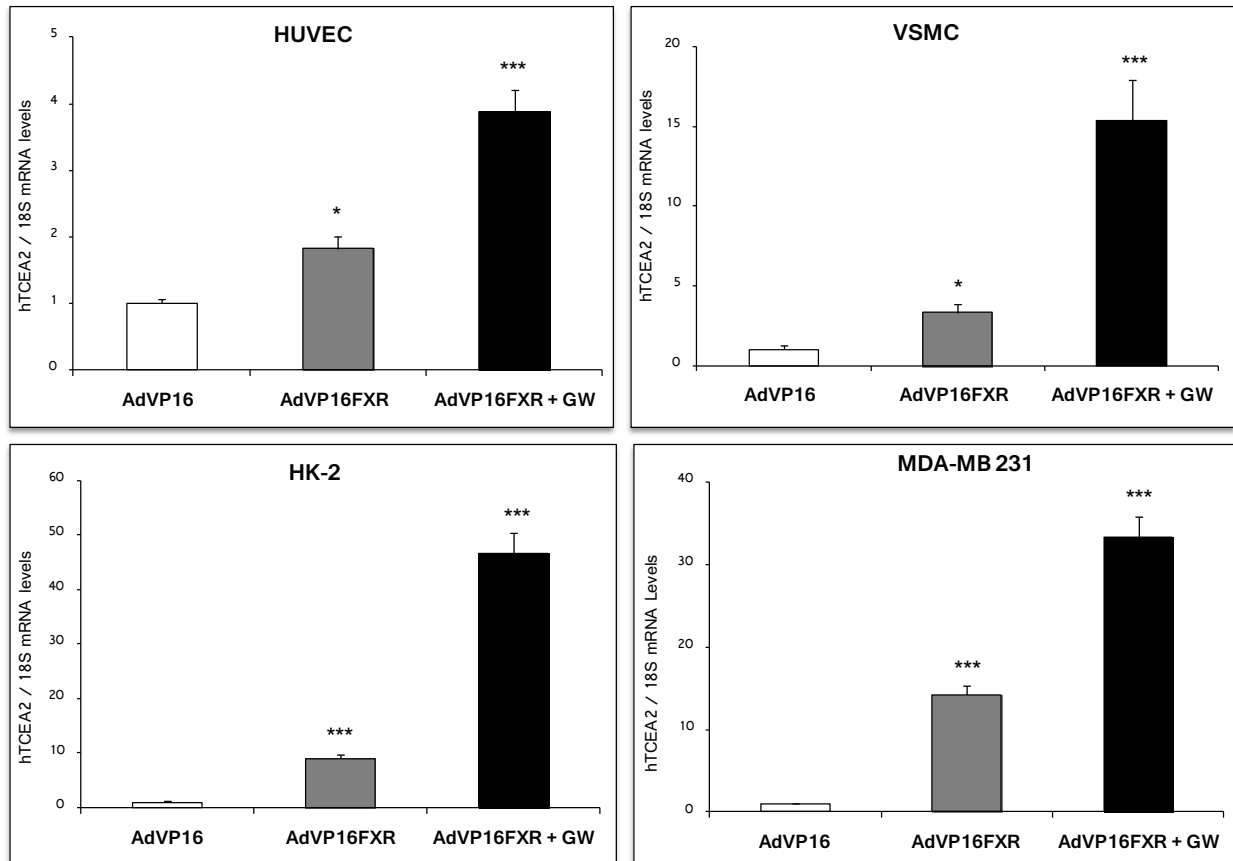


Fig. 51: Células HUVEC, VSMC, HK-2 y MDA-MB-231 infectadas con AdVP16 y AdVP16-hFXR (100, 40, 50 y 20MOIs respectivamente) durante 48h y tratadas durante las últimas 24 horas con GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras/condición; \*P<0.05; \*\*\*P<0.001; estadística con *T-test de Student* en comparación con los niveles de AdVP16 tratadas con DMSO.

Como se puede ver en la figura 51, en todos los modelos celulares utilizados se observa un aumento significativo de la expresión de *TCEA2* cuando las células están infectadas con el adenovirus que sobreexpresa FXR. Esta inducción es todavía más marcada cuando la infección se lleva a cabo conjuntamente con el tratamiento con GW4064.

Para comprobar que FXR era capaz de regular a *TCEA2* en un modelo humano más fisiológico, se analizaron los niveles *TCEA2* en hepatocitos primarios humanos tratados con CDCA y GW4064.

## Resultados

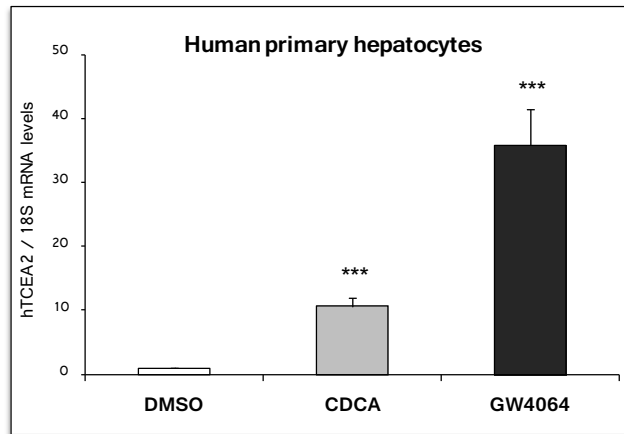


Fig. 52: Hepatocitos primarios humanos tratados durante 24 horas con CDCA (50 $\mu$ M) y GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=4 muestras por condición; \*P<0.05; \*\*P<0.01; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Como vemos en la figura 52, destaca la gran inducción que muestran los niveles del mRNA de *TCEA2* en los hepatocitos primarios humanos. Esto indica la importancia fisiológica de la regulación de *TCEA2* por FXR

### El silenciamiento de la expresión de FXR elimina la respuesta de *TCEA2* a ligandos de este receptor nuclear

Para profundizar en la regulación de *TCEA2* por los activadores de FXR, se analizó la expresión de este gen en células Huh7 cuya expresión de FXR estaba disminuida mediante la transfección transitoria de un siRNA específico.

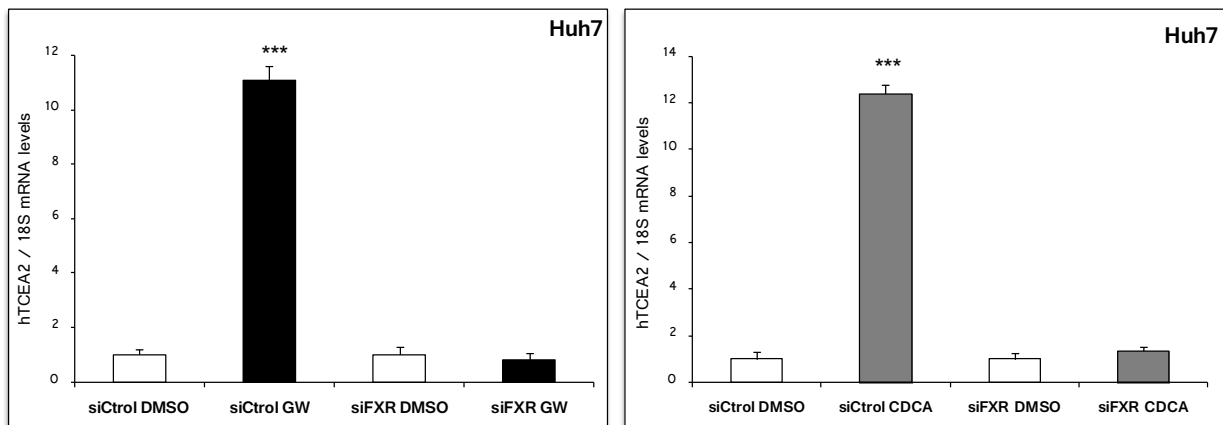


Fig. 53: Células Huh7 tratadas durante 48 horas con siRNA control (siCtrl) y siRNA FXR (siFXR) a una concentración de 25nM y tratadas durante las últimas 24h con el ligando GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (100 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; estadística realizada con T-test de Student de valores comparados con los valores de las células transfectadas con sus respectivos siRNAs y tratados con DMSO.

Como se muestra en la figura 53, los niveles de mRNA de *TCEA2* aparecían fuertemente inducidos por ambos activadores de FXR (GW4064 y CDCA), pero dichas inducciones no se observaban al transfectar las células con el siRNA contra FXR (siFXR). Dicho resultado corroboraba que la expresión de

FXR era necesaria para la inducción de *TCEA2*, en dicho modelo celular y con los ligandos de FXR usados.

### FXR regula transcripcionalmente la expresión de *TCEA2*

Para estudiar si la regulación observada se producía a nivel transcripcional, se realizó un tratamiento de las Huh7 con activadores de FXR (CDCA y GW) y posteriormente con un inhibidor de la transcripción celular, la actinomicina D, midiéndose los niveles de *TCEA2* a distintas horas.

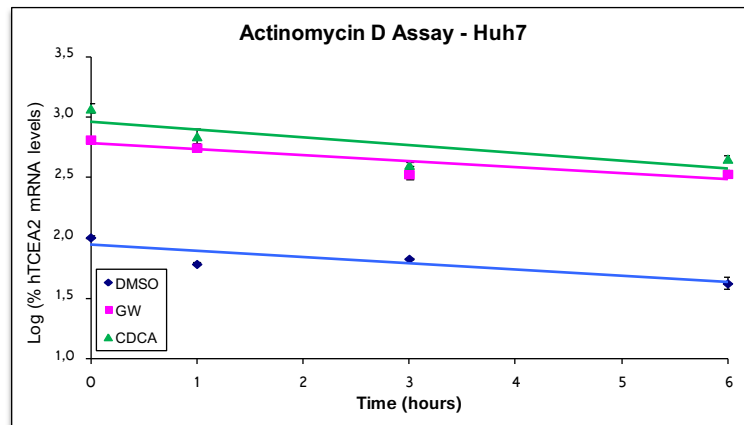


Fig. 54: Huh7 tratadas con DMSO, GW4064 (5  $\mu$ M) y CDCA (50  $\mu$ M) durante 24h y posteriormente con actinomicina D durante 1, 3 y 6 horas a una concentración de 5  $\mu$ g/ml. Representación del logaritmo de la variación en los niveles del mRNA de *RBP4* con respecto a 18S (en tanto por ciento) con respecto a las horas de tratamiento con actinomicina D. Media  $\pm$  SEM de n=3/condición. Estadística realizada con *T-test de Student* con respecto a los niveles del tratamiento con DMSO.

La pendiente de las rectas ilustradas en la figura 54, que indican el tiempo medio de degradación del RNA de las células sometidas a los tratamientos de los ligandos de FXR, no varía significativamente con respecto a las células tratadas con el vehículo. Esto sugería que existía una regulación a nivel transcripcional de *TCEA2* por FXR.

### Identificación de un elemento de respuesta a FXR en el segundo intrón de *TCEA2*

Con el objetivo de buscar elementos de respuesta que pudieran explicar el mecanismo de regulación de *TCEA2* por FXR, se realizó un análisis *in silico* del gen humano de *TCEA2* usando el programa bioinformático NUBIScan. Debido a que en la región promotora estudiada no se encontró ningún IR1 con una secuencia similar a la del *consensus*, se analizaron los intrones. De este análisis se obtuvo un posible elemento de respuesta a +9079bp (segundo intrón) del TSS consistente en un IR1 perfectamente conservado (GGGTCAgTGACCT). Dicho elemento se clonó en tándem delante del promotor heterólogo de la timidina kinasa del plásmido reportero pGL3-TK. Mediante ensayos de transfección transitoria, se analizó la respuesta a FXR de los distintos plásmidos reporteros cotransfectados con un plásmido que expresaba FXR (pSG5-hFXR) activado con el ligando GW4064 en células Huh7.

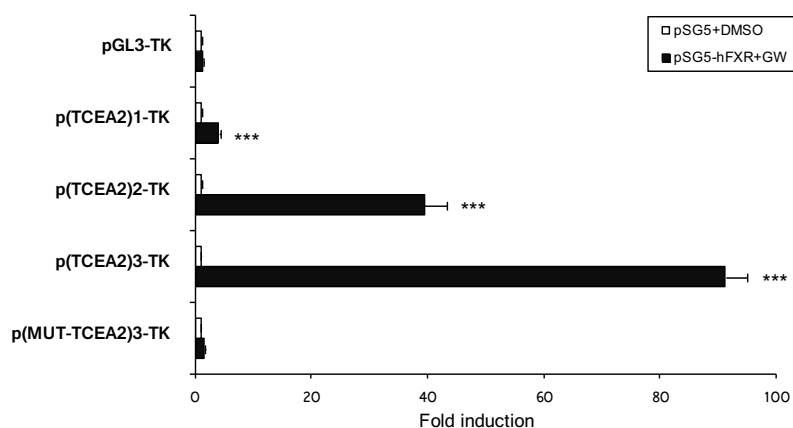


Fig. 55: Huh7 transfectadas con las construcciones de IR1 colocados en tándem, un plásmido de expresión de FXR (pSG5-hFXR) o su vector vacío (pSG5). Posteriormente fueron tratadas durante 24h con GW4064  $1\mu\text{M}$  o el vehículo DMSO. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos con  $n=3$  muestras/condición; \*\*\* $P<0.001$ ; estadística de valores con respecto al respectivo plásmido con pSG5-DMSO con *T-test de Student*.

Como se observa en la figura 55, a medida que los plásmidos contienen un mayor número de copias del elemento de respuesta, hay una mayor actividad luciferasa en presencia de FXR activado por ligando. En la construcción p (MUT-TCEA2)<sub>3</sub>-TK, que contiene todas las copias del IR1 mutadas, la respuesta a FXR activado se pierde completamente hasta equipararse al nivel del plásmido que no contiene ningún FXRE, el vector pGL3-TK.

### FXR se une directamente a su elemento de respuesta, localizado en el segundo intrón de TCEA2

Con el objetivo de analizar si FXR se unía directamente a este elemento de respuesta, se realizó un ensayo de retardación en gel (*EMSA*). Se marcó radioactivamente un *dúplex* de *primers* que contenían la secuencia del elemento de respuesta a FXR identificado previamente, y se realizaron competiciones con concentraciones crecientes del mismo *dúplex* de *primers* sin marcar radioactivamente. La competición del ensayo se realizó con las sondas frías: *primers* WT (TCEA2-WT), *primers* con mutaciones puntuales que impedían la respuesta a FXR del IR1 (TCEA2-MUT) y la sonda del FXRE del gen IBABP. Junto con estos *primers* se incubaron las proteínas de FXR y RXR transcritas y traducidas *in vitro* (*TNT*).

## Resultados

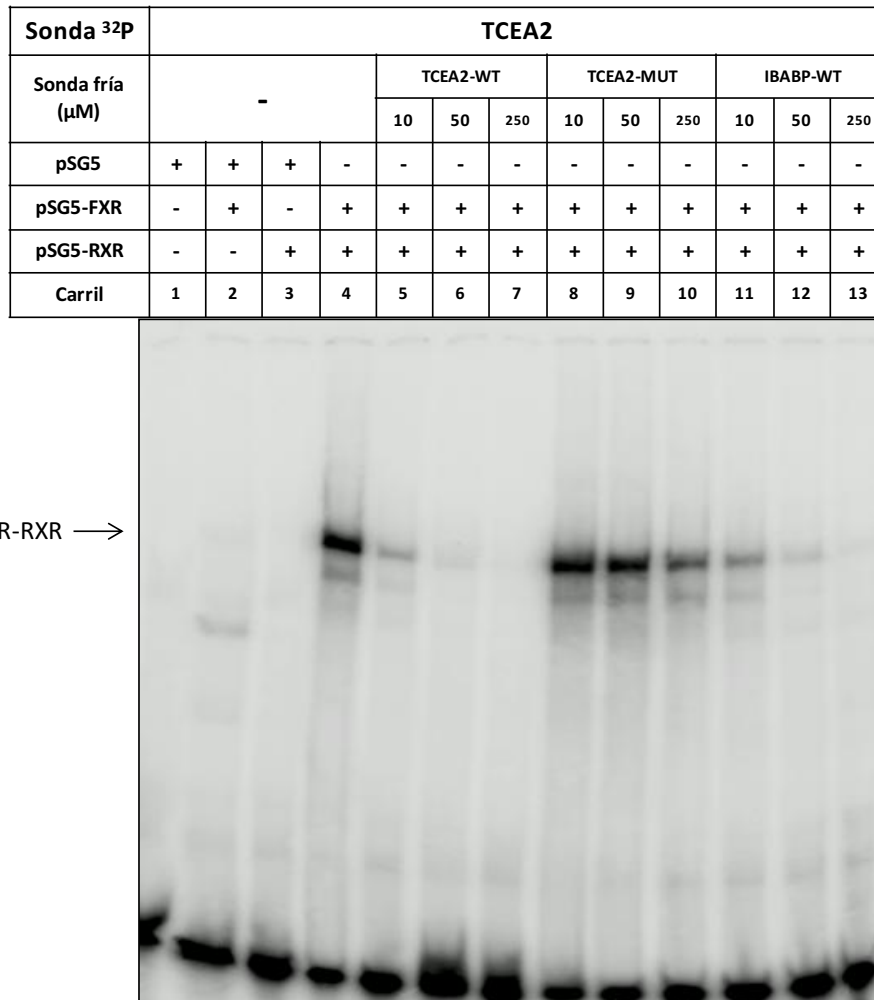


Fig. 56: EMSA realizado con *TNTs* de pSG5, pSG5-hRXR, pSG5-hFXR junto con *primers* marcados radioactivamente, con <sup>32</sup>P, del elemento de respuesta a FXR localizado en el segundo intrón del gen humano de *TCEA2* y del elemento de respuesta a IBABP. La competición se realiza con 10, 50 y 250uM de *primers* no marcados radioactivamente (sondas frías) que contenían el IR1 WT, MUT o el FXRE de IBABP.

La aparición de una banda en el carril 2 del EMSA mostrado en la figura 56 indicaba una débil unión monomérica de FXR al IR1. En presencia de FXR y RXR la banda era más intensa y se producía una retardación en el gel que indicaba una dimerización de FXR-RXR (carril 4). Posteriormente, en los carriles 5-7 se observaba la competición que realizaba la sonda fría TCEA2-WT con la sonda marcada radioactivamente. En el caso de los carriles 8-10 no se observaba una disminución significativa de la intensidad de la banda, debido a que la competición se realizaba con la sonda fría que contenía la secuencia del IR1 mutada, por lo que FXR no se unía a la sonda fría.

Para poder estudiar la unión endógena de FXR al elemento de *TCEA2* se realizó un experimento de inmunoprecipitación de cromatina con células Huh7 y unos *primers* que flanqueaban el IR1 identificado previamente en el segundo intrón del gen. Para completar el análisis se utilizaron como control positivo unos *primers* que amplificaban una región del gen de *SHP* que contenía al elemento de respuesta a FXR.



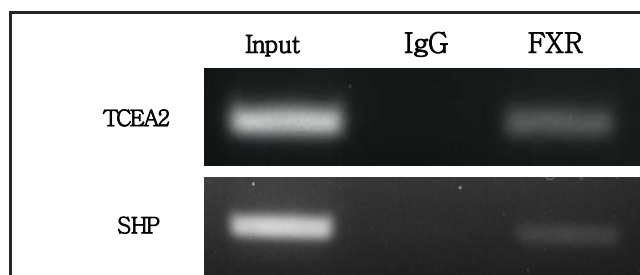


Fig. 57: ChIP realizado en Huh7, inmunoprecipitadas con IgG y con anticuerpo contra FXR. El DNA obtenido se amplificó por PCR con primers que se unían a TCEA2 y SHP, junto con un 5% de input.

En la figura 57 se aprecia una banda intensa en la muestra inmunoprecipitada con el anticuerpo de FXR en el caso de *TCEA2* y *SHP*, mientras que no se observa ninguna banda en las muestras inmunoprecipitadas con IgG.

### GW4064 parece proteger de la toxicidad producida por un exceso de ácidos biliares

La exposición prolongada a niveles altos de ácidos biliares en el hígado puede derivar en efectos citotóxicos, ya que pueden interactuar con las membranas celulares y degradarlas, de una forma inespecífica, debido a sus propiedades como detergentes (Barrasa JI et al, 2011) o producir especies reactivas de oxígeno que causen genotoxicidad y eventualmente la muerte celular (Bernstein H et al, 1999; Dvorak K et al, 2007). Para comprobar la toxicidad que el exceso de ácidos biliares producía en el modelo celular Huh7, se trataron las células durante 24h con concentraciones crecientes del ácido biliar CDCA o con la combinación de CDCA y GW4064. Pasado ese margen de tiempo, se realizaron fotos de las células con un microscopio confocal Leica SP2. En la siguiente figura (Fig. 58) se muestran imágenes representativas de cada pocillo.

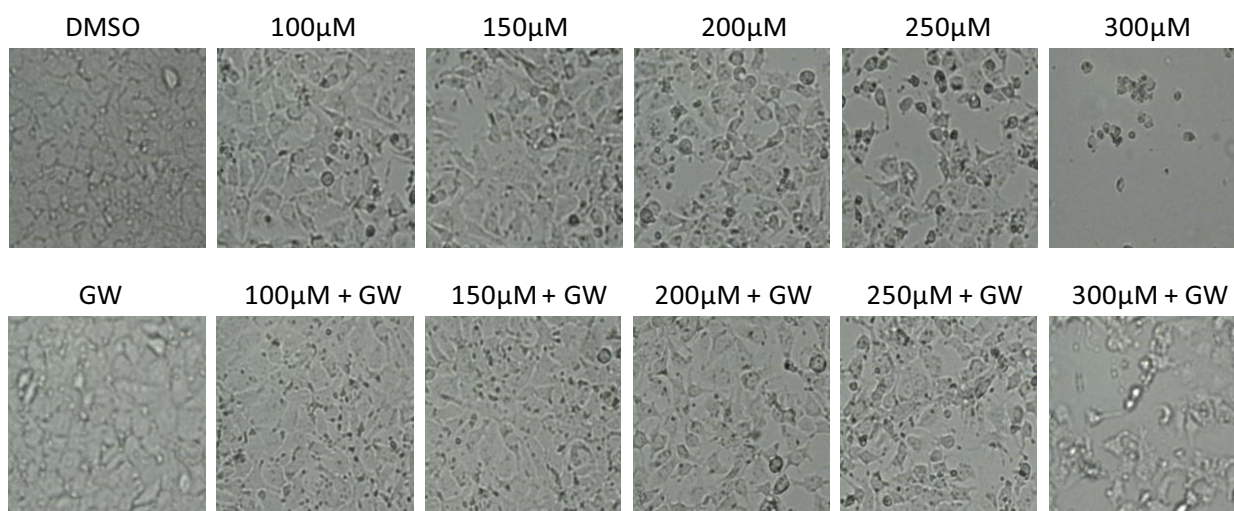


Fig. 58: Secciones representativas de imágenes obtenidas de células tratadas con CDCA, a concentraciones crecientes (100, 150, 200, 250 y 300μM), y con GW4064, a una concentración fija (2μM) durante 24h.

El examen visual de la densidad celular indica que los tratamientos con altas concentraciones de CDCA (200-300μM) causaban muerte celular. Dichos efectos eran mitigados por el cotratamiento con el activador de FXR, GW4064. La viabilidad celular se midió por ensayos MTT en estas células Huh7 tratadas con GW4064, con CDCA o con una combinación de ambos ligandos de FXR.

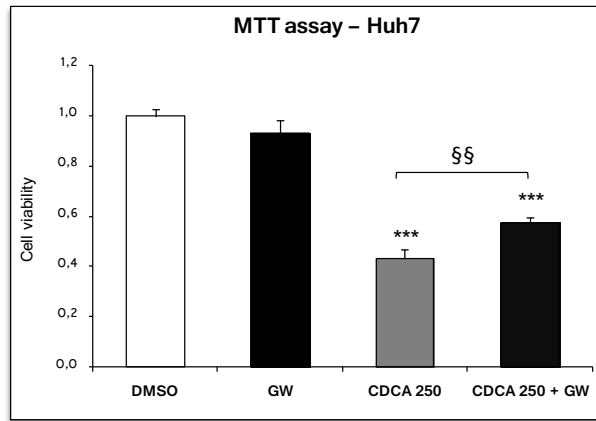


Fig. 59: Ensayo MTT realizado en células Huh7 tratadas con CDCA (250  $\mu$ M) y con GW4064 (2 $\mu$ M) durante 24h. Tratamiento con MTT durante 3h y medición de la absorción a 570nm. Media  $\pm$  SEM de cinco experimentos con n=3 muestras/condición; \*\*\*P<0.001; estadística de valores con respecto a células tratadas con DMSO con *T-test de Student*. <sup>§§</sup>P<0.01; estadística de valores con respecto a células tratadas con CDCA (250  $\mu$ M) con *T-test de Student*.

Como se muestra en la figura 59, la viabilidad celular no aumenta con el tratamiento con GW4064 en condiciones basales. La viabilidad se reduce significativamente cuando las células son tratadas con CDCA (250 $\mu$ M). Esta reducción de viabilidad por CDCA quedaba mitigada significativamente por la adición de GW4064 en el tratamiento.

### FXR es capaz de regular a *Tcea2* en ratón

Se utilizaron ratones control (WT) y ratones deficientes en FXR (KO) para estudiar la respuesta de *Tcea2* a FXR en un modelo *in vivo*. Se practicó una inyección intraperitoneal en ambos tipos de ratones con el GW4064 o su vehículo. Pasadas 8 horas desde la inyección, los ratones fueron sacrificados y se procedió a la extracción de su hígado para obtener posteriormente muestras de RNA y analizarlas por PCR cuantitativa.

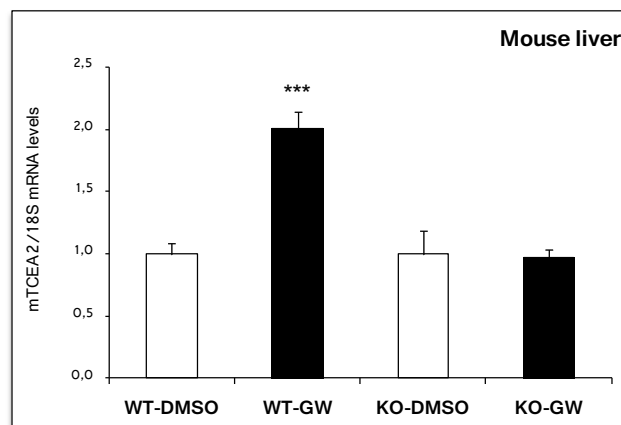


Fig. 60: Niveles hepáticos de ratones control (WT) y deficientes en FXR (KO) inyectados con 50mg de GW4064/kg y sacrificados a las 8h. Media  $\pm$  SEM de n=4 ratones/condición.; \*\*\*P<0.001; estadística realizada con *T-test de Student* con respecto a los ratones de cada condición tratados con el vehículo.

Como podemos ver en la figura 60, los ratones WT tratados con el ligando GW4064 muestran una inducción de la expresión génica de *Tcea2*. En el caso de los ratones KO no se aprecia ninguna diferencia entre los ratones que fueron tratados con ligando GW4064 y los que se trataron con vehículo.

**NDRG2: supresor tumoral**



La alteración de la regulación de genes implicados en el crecimiento y en la diferenciación celular produce la transformación de una célula normal en cancerígena. En este proceso se puede dar una activación de genes que promueven el crecimiento y la reproducción celular (oncogenes), o la inhibición de genes supresores de tumores que inhiben la división y la supervivencia celular. El gen de *NDRG2* pertenece a la familia de genes reprimidos por el oncogén *N-Myc* y codifica para una proteína citoplasmática. Su sobre expresión inhibe el crecimiento celular en glioblastomas humanos (Deng Y et al; 2003), en cánceres gástricos (Assamaki et al, 2007; Choi et al, 2007), de colon (Lorentzen et al, 2007), de mama (Liu et al, 2007) y hepáticos (Ohno T et al, 2012).

La expresión de *NDRG2* está inducida por ligandos de FXR

Con el objeto de analizar la posible regulación de *NDRG2* por FXR y corroborar los resultados obtenidos en el experimento de micromatrices realizado en Huh7 tratadas con el agonista sintético de FXR, GW4064, se estudiaron los niveles de *NDRG2* en células Huh7 y HepG2. En consecuencia, se trataron ambos modelos de hepatoma humano con CDCA y GW4064 durante 24h.

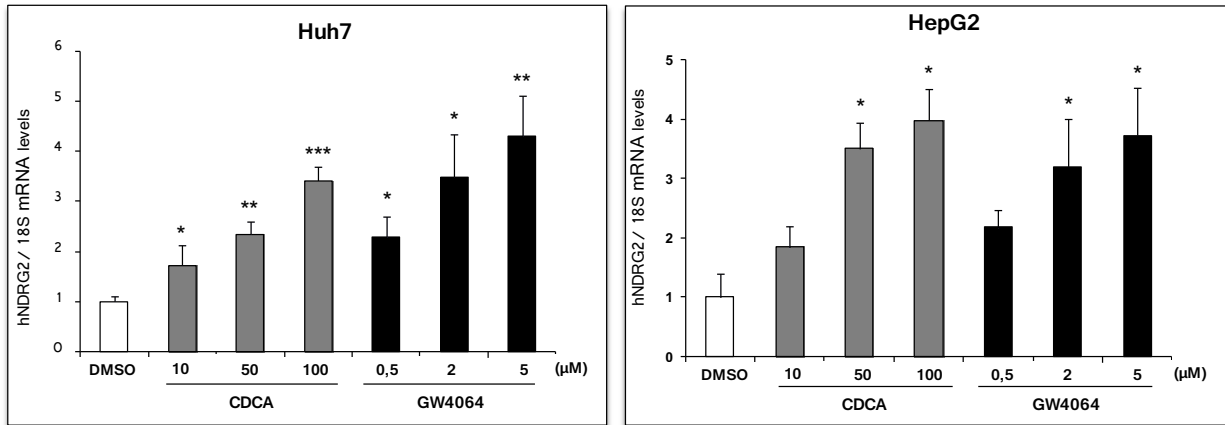


Fig. 61: Células Huh7 y HepG2 tratadas durante 24 horas con CDCA (10, 50 y 100μM) y GW4064 (0,5, 2 y 5μM). Media ± SEM de dos experimentos en triplicado; \*P<0.05; \*\*\*P<0.001; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Los datos mostrados en la figura 61 manifiestan la inducción que presentan los niveles de mRNA de *NDRG2* en las células tratadas por los activadores de FXR en ambos modelos celulares. Para completar el estudio, se examinaron los niveles proteicos de este gen en presencia de CDCA y GW4064 en células HepG2.

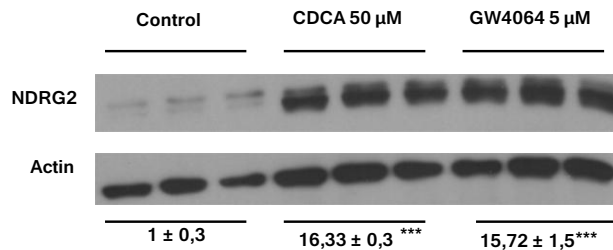


Fig. 62: WB de extracto total de células HepG2 (50μg/carril) tratadas durante las últimas 24 horas con GW4064 (5μM) y CDCA (50μM). Media ± SEM de n=3; \*\*\*P<0.001; estadística con *T-test de Student* de los valores normalizados por actinas y relativos a los niveles de células tratadas con DMSO

Tal y como muestra la figura 62, los niveles de proteína NDRG2 aumentan unas 16 veces con ambos tratamientos con respecto al tratamiento control (DMSO). Debido a estos resultados, se estudió si la regulación de *NDRG2* por FXR también tenía lugar en un modelo humano más fisiológico. Para ello se analizaron los niveles de *NDRG2* en hepatocitos primarios humanos tratados durante 24 horas con GW4064 y CDCA.

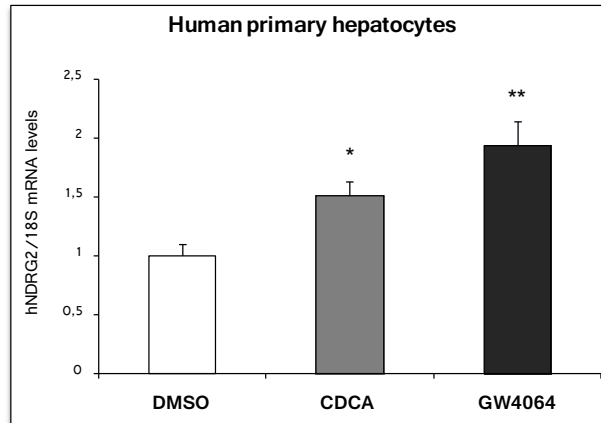


Fig. 63: Hepatocitos primarios humanos tratados durante 24 horas con CDCA (50 $\mu$ M) y GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=4 muestras por condición; \*P<0.05; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Ambos tratamientos son capaces de inducir los niveles de *NDRG2* de una manera significativa (figura 63).

### La inducción de la expresión de *NDRG2* requiere la expresión de FXR

Para profundizar en el estudio de la regulación de *NDRG2* por los activadores de FXR, se evaluó la expresión de este gen en células Huh7 con la expresión de FXR disminuida mediante la transfección transitoria de un siRNA específico. Posteriormente a la transfección, se realizó un tratamiento con los activadores de FXR, para analizar los niveles de *NDRG2* por PCR cuantitativa.

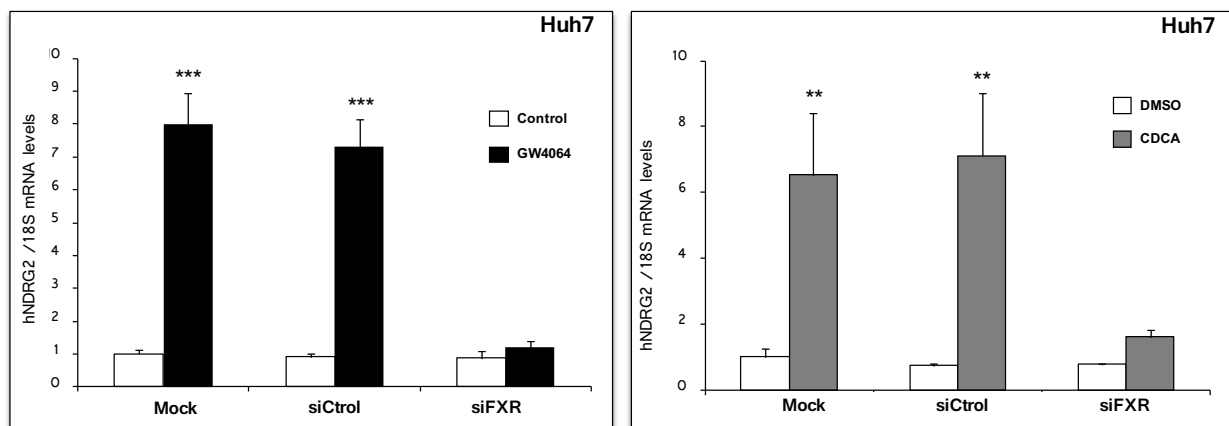


Fig. 64: Células Huh7 tratadas durante 48 horas con siRNA control (siCtrl) y siRNA FXR (siFXR) a una concentración de 25nM y tratadas durante las últimas 24h con el ligando GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (100 $\mu$ M). Condición Mock: células transfectadas únicamente con el reactivo de transfección. Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; estadística realizada con *T-test de Student* de valores relativos a las células transfectadas con sus respectivos siRNAs y tratadas con DMSO.

Al observar la figura 64, se aprecia que los niveles de mRNA de *NDRG2* son significativamente inducidos por los activadores de FXR, pero dicha inducción no se observa al transfectar el siRNA contra FXR. Dicho resultado corroboraba que la expresión de FXR era necesaria para la inducción de *NDRG2*, en dicho modelo celular y con los ligandos de FXR usados.

Identificación de un elemento de respuesta a FXR en el primer intrón de *NdrG2*

Se realizó un análisis *in silico* del promotor del gen humano y de ratón de *NDRG2* con el programa bioinformático NUBIScan, para identificar elementos de respuesta putativos a FXR. Se evaluaron las secuencias exónicas no traducidas e intrónicas debido a que no se localizó ningún FXRE en la secuencia del promotor del gen de ratón o humano. En dicho análisis se localizó un IR1 en el primer intrón (+757bp del TSS) del gen de ratón que está conservado en el segundo intrón del gen humano.



Fig. 65: A la izquierda se muestra un esquema representativo de la secuencia del IR1 localizado y su conservación en distintas especies. A la derecha la localización de este IR1 en el gen humano y de ratón de *NDRG2*.

En la figura 65 se puede apreciar cómo la secuencia del IR1 localizado se conserva en distintas especies pero su localización varía, como se muestra para los genes de humano y ratón. Se subclonó la secuencia del gen de ratón desde el 476bp corriente arriba del TSS hasta 1966bp corriente abajo del TSS en el vector reportero pGL3-bv y se midió su actividad luciferasa junto con un plásmido que expresaba FXR.

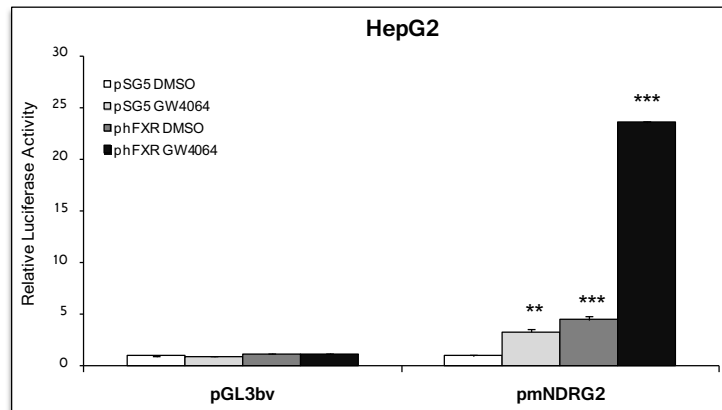


Fig. 66: Ensayo reportero en HepG2 transfectadas con las construcciones del promotor, el exón 1, el intrón 1 y parte del exón 2 del gen de ratón. Se cotransfectó un plásmido de expresión de FXR (pSG5-hFXR) o el vector vacío pSG5 y las células fueron tratadas durante 24h con GW4064 (1µM) o el vehículo DMSO. Media ± SEM de dos experimentos con n=3 por condición; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; la estadística de valores con respecto al plásmido reportero cotransfectado con pSG5 y tratado con DMSO, fue realizada con *T-test de Student*.

La figura 65 ilustra cómo la cotransfección con un plásmido que expresa FXR, junto con el tratamiento con GW4064, aumentaba de manera significativa la actividad luciferasa de la construcción

pmNDRG2. Por tanto, la regulación transcripcional que ejerce FXR sobre *NDRG2* se lleva a cabo a través de dicho elemento IR-1 y con la mutación puntual de éste se podría evaluar si es el único responsable del aumento observado en la actividad luciferasa.

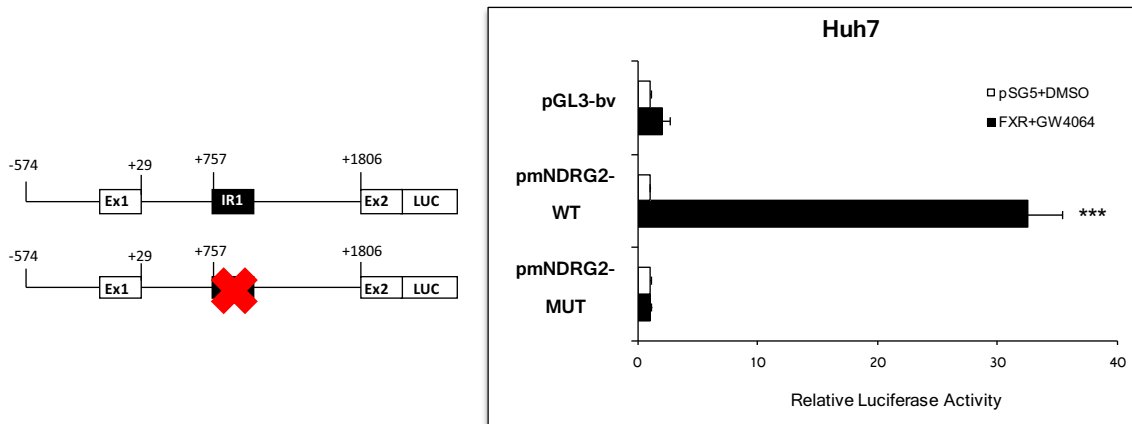


Fig. 67: HepG2 transfectadas con la construcción reportera que contiene el IR1 (pmNDRG2-WT) y el plásmido reportero con la misma secuencia con el IR1 mutado (pmNDRG2-MUT). Cotransfección con un plásmido de expresión de FXR o el vector vacío (pSG5) y tratamiento de 24h con GW4064 (1 $\mu$ M) o DMSO. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos con n=3/ condición; \*\*\*P<0.001; la estadística de valores referidos a su respectivo plásmido con pSG5+DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Como se muestra en la figura 67, la construcción que contiene el elemento de respuesta a FXR presentaba una actividad luciferasa altamente inducida por la cotransfección con el plásmido que expresaba FXR y con el tratamiento de GW4064. Sin embargo, cuando en esta misma construcción se realizaba una mutación dirigida del elemento de respuesta, la actividad luciferasa disminuía hasta niveles similares a los obtenidos con el vector vacío (pGL3-bv).

### FXR es capaz de regular a *NdrG2* en células de hepáticas de ratón

Tras observar la inducción de *NDRG2* por los activadores de FXR se estudió si en células de hepatoma de ratón también se obtenía esta inducción. En la figura 68 se puede ver como en el caso de las células de hepatoma de ratón AML12, el tratamiento con los ligandos de FXR, natural y sintético, incrementaba significativamente los niveles de *NdrG2*.

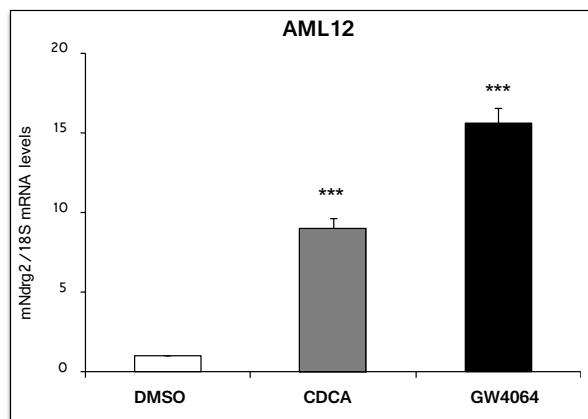


Fig. 68: Células AML12 tratadas durante 24h con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \*\*\*P<0.001; la estadística con respecto a las células tratadas con el vehículo (DMSO) fue realizada con *T-test de Student*.



**TM4SF4: regeneración hepática y litiasis**



El gen *TM4SF4* codifica para una proteína de membrana glicosilada que se expresa en células del epitelio intestinal humano y en hepatocitos que no se están dividiendo (Wice BM y Gordon JI, 1995). Su función no está bien definida aunque se cree que tiene un papel importante en la inhibición de la proliferación celular, tanto en el crecimiento pancreático (Anderson KR et al, 2011) como en la regeneración hepática (Liu Z et al, 2001). Se ha descrito la implicación de FXR en la supresión de procesos cancerígenos, inflamatorios y regenerativos en distintos tejidos (Gadaleta RM et al, 2010) pero se desconocen los mecanismos. Por otro lado, se ha identificado a *TM4SF4* como un factor de riesgo para la litiasis (Schafmayer C et al, 2010). Se ha descrito que el tratamiento con activadores de FXR en ratones previene la litiasis (Moschetta A et al, 2004) y que mutaciones en el gen de FXR predispone al desarrollo de litiasis en humanos y ratones (Kovacs P et al, 2008). Así pues, sería interesante poder describir nuevos genes diana de FXR implicados en proliferación celular y regeneración hepática.

### La expresión de *TM4SF4* se induce por activadores de FXR en modelos celulares hepáticos e intestinales

Con el objetivo de analizar la posible regulación de *TM4SF4* por FXR, se estudiaron los niveles de *TM4SF4* en las células de hepatoma humano Huh7 y HepG2 sometidas a tratamientos con diferentes activadores de FXR, CDCA y GW4064.

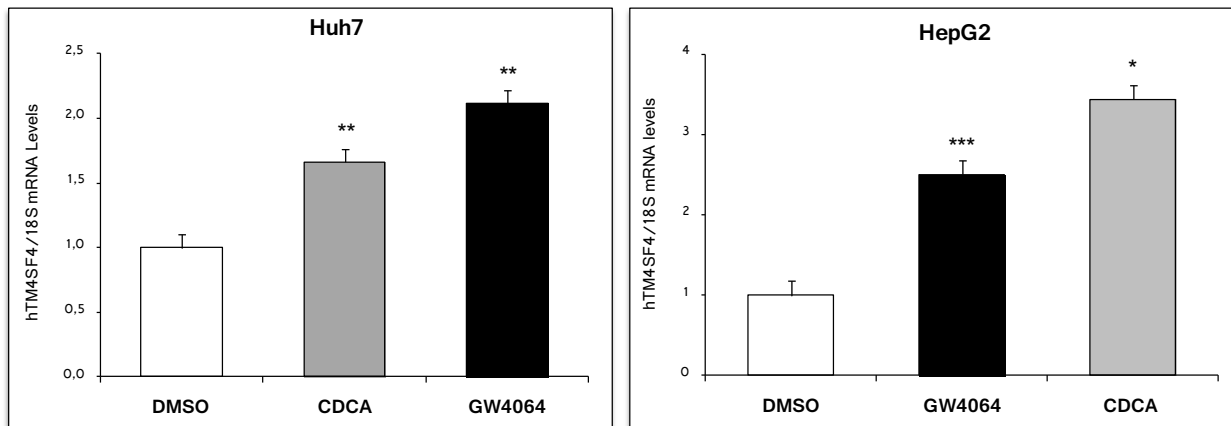


Fig. 69: Células Huh7 y HepG2 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Observando la figura 69 se aprecia cómo los niveles de mRNA de *TM4SF4* se inducen por los activadores de FXR en ambos modelos celulares. Estos resultados confirmaban los valores obtenidos en el experimento de *microarray* realizado en las células Huh7 tratadas con GW4064.

Para completar el estudio de su regulación en modelos de hepatoma humano se realizó un análisis de los niveles proteicos de *TM4SF4* en presencia de CDCA y GW4064. Se procesó la fracción membranosa de células Huh7 mantenidas durante 4 días en confluencia y tratadas a continuación con los ligandos de FXR durante 24 horas. Finalmente, el extracto de proteínas de membrana obtenido se analizó por WB.

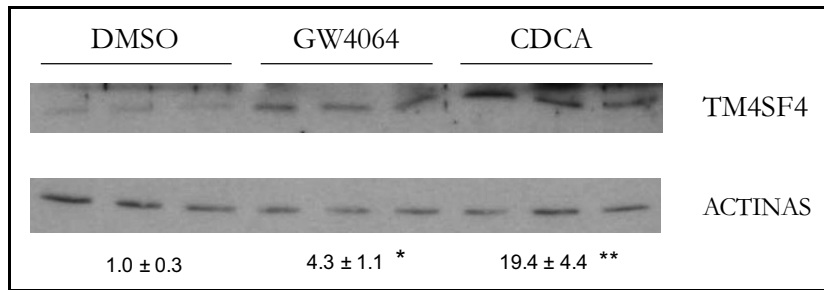


Fig. 70: WB de extracto membranoso de células Huh7 (5µg/carril) en confluencia durante 5 días y tratadas durante las últimas 24 horas con GW4064 (2µM) y CDCA (100µM). Media ± SEM de n=3; \*P<0.05; \*\*P<0.01; estadística con *T-test de Student* de los valores normalizados por actinas y relativos a los niveles de células tratadas con DMSO.

Como se puede observar en la figura 70, los niveles proteicos de TM4SF4 también se inducen por GW4064 y CDCA de manera significativa. Por tanto, realizando un estudio en un modelo más fisiológico, se analizaron los niveles de mRNA de *TM4SF4* en hepatocitos primarios humanos tratados GW4064 y CDCA durante 24h.

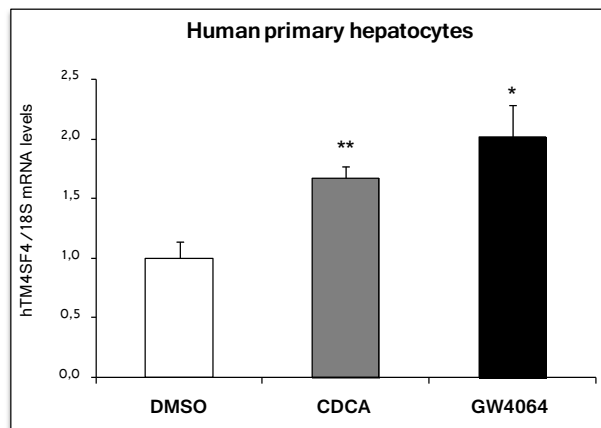


Fig. 71: Hepatocitos primarios humanos tratados durante 24 horas con CDCA (50µM) y GW4064 (5µM). Media ± SEM de n=4 muestras por condición; \*P<0.05; \*\*P<0.01; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

En la figura 71 se puede comprobar cómo en este modelo FXR, activado tanto por CDCA como por GW4064, también es capaz de inducir de manera significativa la expresión de *TM4SF4*.

Tal y como se ha descrito en anteriores trabajos, TM4SF4 se expresa en células intestinales diferenciadas (Wice BM and Gordon JI, 1995). Para comprobar si en dichas condiciones celulares FXR era capaz de regular la expresión de *TM4SF4*, diferenciamos por confluencia las células Caco-2. Se ha descrito que este modelo celular necesita diferenciación por confluencia para expresar niveles aceptables de FXR y ver la activación de uno de sus genes diana intestinal, *IBABP* (De Cottardi A et al, 2004). Debido a esto, se mantuvieron las células en confluencia durante 11 y 30 días y se analizaron los niveles de *SHP* tras un tratamiento de 24h con CDCA y GW4064.

## Resultados

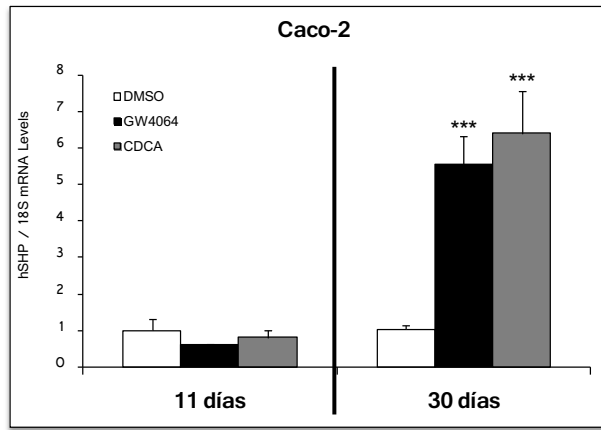


Fig. 72: Células Caco-2 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M) después de una diferenciación por confluencia durante 11 o 30 días. Media  $\pm$  SEM de n=3 por condición; \*\*\*P<0.001; estadística con respecto a la condición DMSO realizada con *T-test de Student*.

Una vez confirmada la inducción de *SHP* en estas condiciones (Fig 72), se analizaron los niveles de mRNA de *TM4SF4* en estas mismas muestras.

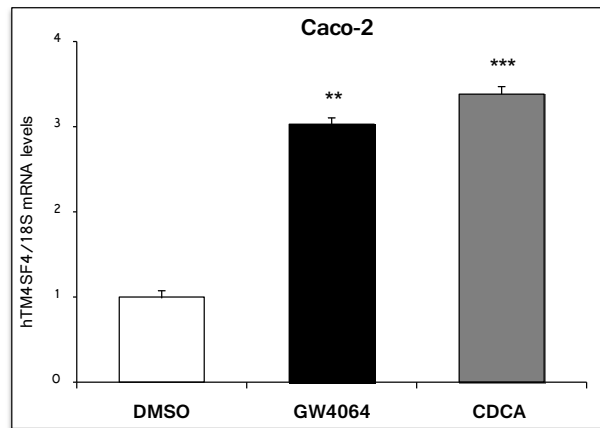


Fig. 73: Células Caco-2 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (2 $\mu$ M) después de una diferenciación por confluencia durante 30 días. Media  $\pm$  SEM de n=3 por condición; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; estadística con respecto a la condición DMSO realizada con *T-test de Student*.

En la figura 73 los niveles de mRNA de *TM4SF4* se inducían tanto por el tratamiento con GW4064 y como por CDCA. También se analizaron los niveles proteicos de *TM4SF4*, realizándose una extracción de la fracción membranosa de las células HT29 (otro modelo de cáncer de colon) diferenciadas durante 30 días, y tratadas con el activador sintético de FXR, GW4064.

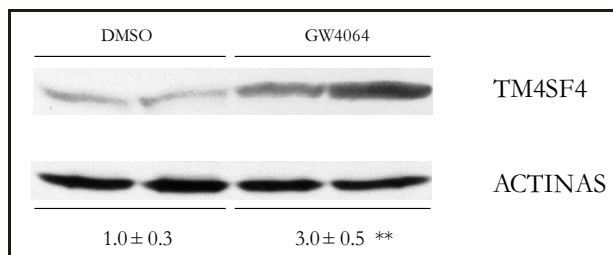


Fig. 74: WB de extracto membranoso de células HT29 (15 $\mu$ g/carril) mantenidas en confluencia durante 30 días y tratadas durante las últimas 24 horas con GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=2; \*\*P<0.01; estadística realizada con *T-test de Student* de los valores normalizados por actinas y relativos a los niveles de células tratadas con DMSO.

Los niveles proteicos de TM4SF4 en células HT29 (extracto membranoso) están representados en la figura 74. En las condiciones descritas previamente, la expresión de TM4SF4 se inducía por GW4064 de una manera significativa.

### La inducción de la expresión de *TM4SF4* por CDCA y GW4064 requiere la expresión de FXR

Para profundizar en la regulación de *TM4SF4* por los activadores de FXR se analizaron sus niveles de mRNA en el modelo celular de hepatoma humano Huh7 cuando la expresión de FXR estaba prácticamente suprimida. Dicho experimento se realizó mediante la transfección transitoria de un siRNA específico y el posterior tratamiento con CDCA y GW4064 durante 24 horas de las células transfectadas. De esta forma se pudo analizar si FXR estaba implicado en la inducción de *TM4SF4* por el tratamiento con GW4064 y CDCA.

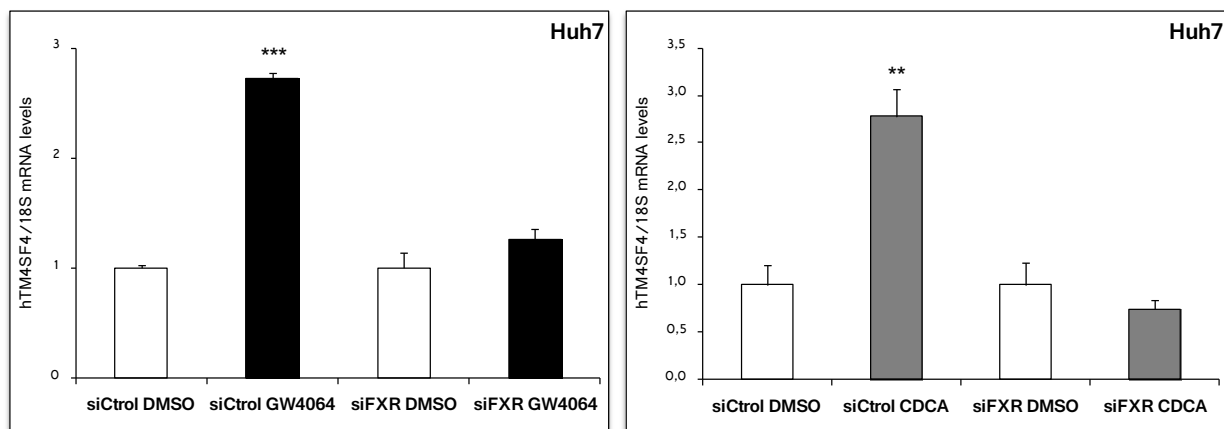


Fig. 75: Células Huh7 tratadas durante 48 horas con siRNA control (siCtrl) y siRNA FXR (siFXR) a una concentración de 25nM y tratadas durante las últimas 24h con el ligando GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (100 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; estadística realizada con *T-test de Student* de valores comparados con los valores de las células transfectadas con sus respectivos siRNAs y tratados con DMSO.

Como se puede visualizar en la figura 75, los niveles de mRNA de *TM4SF4* aparecían significativamente inducidos tanto por GW4064 como por CDCA en células transfectadas con siCtrl. Sin embargo, dicha inducción no se observaba al transfectar el siFXR previamente con los tratamientos. El resultado de la figura 74 corroboraba que la expresión de FXR era necesaria para la inducción de *TM4SF4* en dicho modelo celular y con los ligandos de FXR usados.

### Identificación de un elemento de respuesta a FXR en el promotor de *TM4SF4*

Se realizó un análisis *in silico*, con el programa bioinformático NUBIScan, de aproximadamente 5Kb corriente arriba del TSS del gen humano de *TM4SF4*, para encontrar posibles elementos de respuesta a FXR. Se localizó un IR1 a -81bp del TSS con una secuencia similar a la del *consensus* y se clonaron unas 2,2Kb del promotor en el vector pGL3-bv. Posteriormente, mediante ensayos de transfección transitoria en células HepG2, se analizó la actividad luciferasa de esta construcción reportera junto con la expresión de FXR (pSG5-hFXR) activado con el tratamiento de GW4064. También se fabricó una

## Resultados

construcción reportera con una mutación puntual en dicho elemento de respuesta putativo, mediante mutagénesis dirigida, y se analizó su actividad luciferasa conjuntamente.

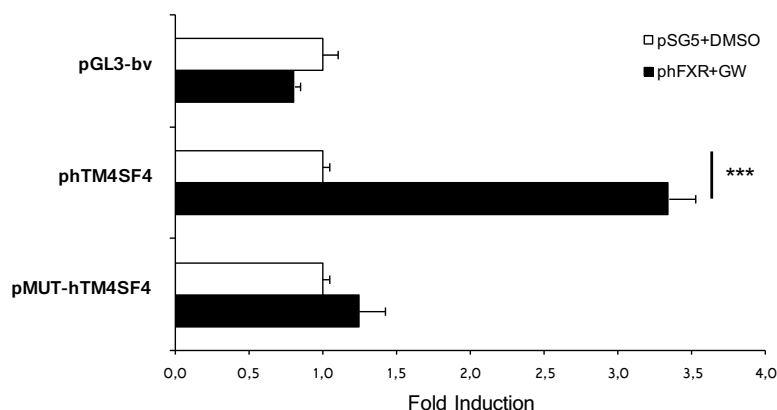


Fig. 76: Ensayo reportero en HepG2 transfectadas con las construcciones de 2.2kb del TSS del promotor humano del gen *TM4SF4* y la misma construcción pero con el IR1 mutado. También se cotransfectó un plásmido de expresión de FXR (pSG5-hFXR) o el vector vacío (pSG5) y las células fueron tratadas durante 24h con GW4064 (1 $\mu$ M) o el vehículo DMSO. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos con n=3 por condición; \*\*\*P<0.001; la estadística de valores referidos a su respectivo plásmido con pSG5+DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Como se observa en la figura 76 el plásmido que contiene el putativo elemento de respuesta a FXR muestra una actividad luciferasa significativamente superior al vector pGL3-bv. Cuando el elemento de respuesta IR1 se mutó, construcción pMUT-hTM4SF4, la respuesta a FXR activado se perdió completamente hasta equipararse al nivel del vector vacío. Lo que indicaba que este elemento IR1 era necesario y suficiente para que el promotor de *TM4SF4* responda a FXR activado.

Con el objetivo de estudiar en profundidad si el elemento de respuesta a FXR situado en el promotor humano de *TM4SF4* era capaz de conferir respuesta a un promotor heterólogo, se clonó este elemento de respuesta en un vector que contenía un promotor TK del herpes virus. Tras introducir varias copias de este elemento de respuesta en el vector pGL3-TK se analizó su actividad luciferasa mediante ensayos reportero.

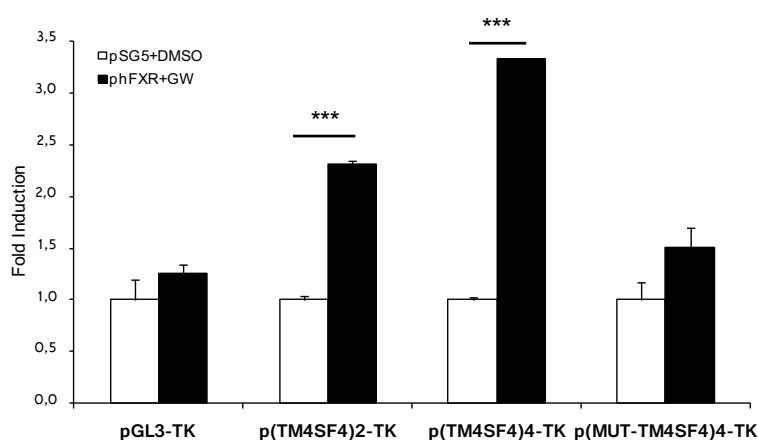


Fig. 77: HepG2 transfectadas con las construcciones de IR1 colocados en tándem y un plásmido de expresión de FXR (pSG5-hFXR) o su vector vacío (pSG5). Posteriormente fueron tratadas durante 24h con GW4064 (1 $\mu$ M) o DMSO. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos con n=3/condición; \*\*\*P<0.001; estadística de valores referidos a su respectivo plásmido con pSG5 + DMSO con *T-test de Student*.

En la figura 77 se aprecia cómo la construcción con 2 copias del elemento de respuesta, p(TM4SF4)<sub>2</sub>-TK, respondía a FXR activado por GW4064, y la construcción con 4 elementos de respuesta [p(TM4SF4)<sub>4</sub>-TK] exhibía una actividad luciferasa mayor que la obtenida con la construcción que posee dos copias. En cambio, la construcción que contenía 4 elementos de respuesta mutados [p(MUT-TM4SF4)<sub>4</sub>-TK], presentaba una actividad luciferasa similar a la del vector vacío, confirmando así la funcionalidad de dicho elemento de respuesta a FXR.

### FXR se une al elemento de respuesta del promotor de *TM4SF4*

Para evaluar la unión directa de FXR al elemento de respuesta IR1 localizado en el promotor humano de *TM4SF4*, se realizó un ensayo de retardación en gel (EMSA). Se marcaron radioactivamente un dúplex de *primers* que contenían la secuencia de este elemento de respuesta a FXR, y se realizaron competiciones a concentraciones crecientes con el mismo dúplex de *primers* sin marcar radioactivamente. La competición del ensayo se realizó con las sondas frías: *primers* WT (TM4SF4-WT), *primers* con mutaciones puntuales que impedían la respuesta de FXR al IR1 (TM4SF4-MUT) y la sonda del FXRE del gen IBABP. Junto con estos *primers* se incubaron las proteínas de FXR y RXR transcritas y traducidas *in vitro* (TNT).

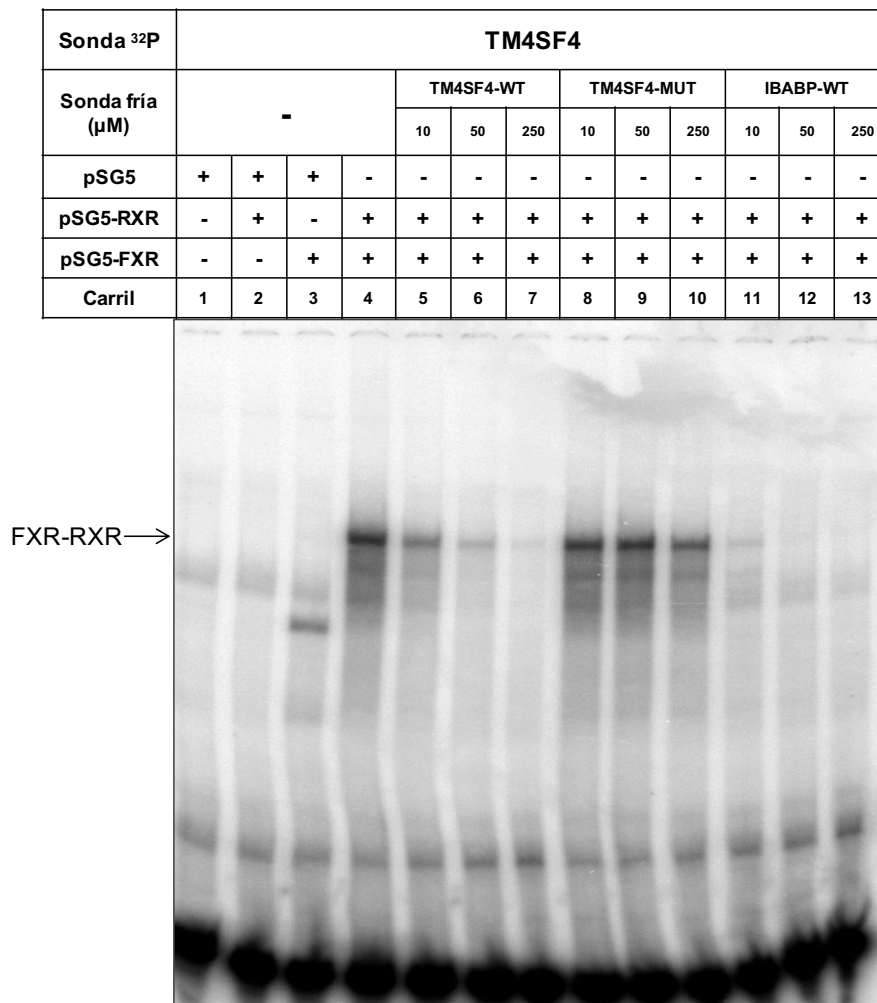


Fig. 78: EMSA realizado con TNTs de pSG5, pSG5-hRXR, pSG5-hFXR junto con *primers* marcados radioactivamente, con <sup>32</sup>P, del elemento de respuesta a FXR localizado en el promotor del gen humano de *GPLD1* y del elemento de respuesta a IBABP. La competición se realiza con 10, 50 y 250uM de sondas frías que contenían el IR1.



La aparición de una banda en el carril 3 de la figura 78 se asoció con una débil unión monomérica de FXR al IR1. En presencia de FXR y RXR la banda era más intensa y la retardación en el gel indicaba una dimerización de FXR-RXR (carril 4). Posteriormente, en los carriles 5-7 se observaba la competición que realizaba la sonda fría de TM4SF4-WT con la sonda marcada radioactivamente. En el caso de los carriles 8-10 no se observaba una disminución significativa de la intensidad de la banda, debido a que la competición se realizaba con los *primers* que contenían la secuencia del IR1 mutada, por lo que FXR no se unía a la sonda fría. En los carriles 11-13 se observaba el comportamiento del control positivo, la sonda del gen *IBABP*, que mostraba un comportamiento idéntico al observado con la sonda de TM4SF4-WT.

Se realizó un experimento de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en células Huh7 para evaluar si FXR se unía al elemento de respuesta localizado en el promotor humano de *TM4SF4* endógeno. Se realizó una PCR cuantitativa con primers que flanqueaban el IR1 identificado previamente en el promotor del gen

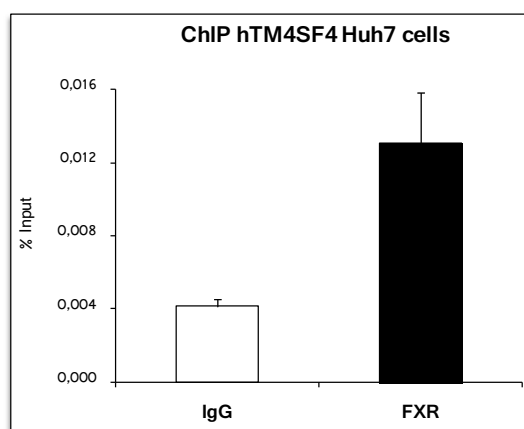


Fig. 79: Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina de células Huh7 con anti-FXR. El DNA fue analizado por PCR a tiempo real y se graficó con respecto al input (10%) usando 5ul de inmunoprecipitado. Como control negativo de la inmunoprecipitación se usaron las IgG. Media  $\pm$  SEM. Valor del input: 100%.

En la figura 79 se observaba un enriquecimiento en la fracción inmunoprecipitada con el anticuerpo de FXR frente a la fracción de cromatina con IgGs. Esto demostraba la unión de FXR a su elemento de respuesta del gen *TM4SF4* en células de hepatoma humano. Por lo tanto, los experimentos de reportero junto con estos resultados del EMSA y del ChIP demostraban que FXR se unía específicamente al elemento de respuesta localizado a -81bp del inicio de transcripción del gen humano de *TM4SF4*.

### FXR es capaz de regular a *TM4SF4* en ratón

Para estudiar si la regulación de *Tm4sf4* por FXR activado tenía lugar en células hepáticas de ratón, se utilizaron las células Hepa 1-6 que al no expresar FXR fueron infectadas con el adenovirus que lo expresaba (AdVP16FXR) y tratadas posteriormente con GW4064.

## Resultados

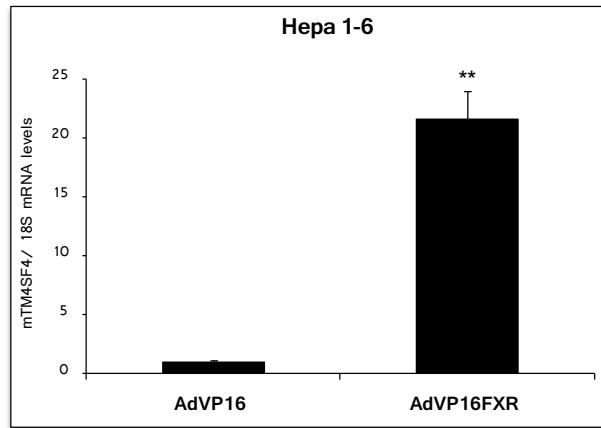


Fig. 80: Células Hepa 1-6 infectadas con AdVP16 y AdVP16FXR (75 MOIs) durante 48h. En las últimas 24 horas de la infección las células fueron tratadas con GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3/condición; \*\*P<0.01; la estadística fue realizada con *T-test de Student* comparando cada condición con los niveles de AdVP16 tratado con DMSO.

Como muestra la figura 80, las células de hepatoma de ratón presentaban una gran inducción de los niveles de *Tm4sf4* cuando se trataban con GW4064 en presencia de FXR.

Para estudiar esta regulación *in vivo*, se realizó una inyección intraperitoneal en ratones control y deficientes en FXR con GW4064 y su vehículo. Pasadas 8 horas los ratones se sacrificaron y se recogió su hígado para obtener posteriormente muestras de RNA.

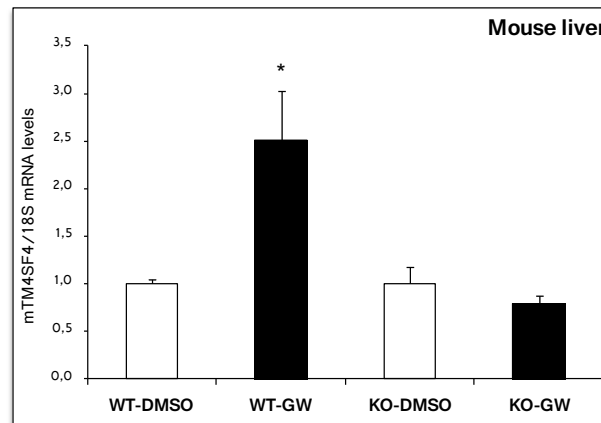


Fig. 81: Niveles hepáticos de ratones control (WT) y deficientes en FXR (KO) inyectados con 50mg de GW4064/kg y sacrificados a las 8h. Media  $\pm$  SEM de n=4 ratones/condición.; \*P<0.05; estadística realizada con *T-test de Student* con respecto a los ratones de cada condición tratados con el vehículo.

Los ratones control tratados con el ligando GW4064 (figura 81) mostraban una inducción en los niveles de *Tm4sf4* al compararlos con ratones control tratados con el vehículo. En cambio, en los ratones deficientes en FXR el tratamiento con GW4064 no inducía los niveles de *Tm4sf4*, demostrando así la importancia de FXR en la regulación de este gen en el hígado de un modelo *in vivo*.

Debido a que el gen *Tm4sf4* también se expresa en tejido intestinal, se analizaron sus niveles en el íleon de los mismos animales inyectados con GW4064.

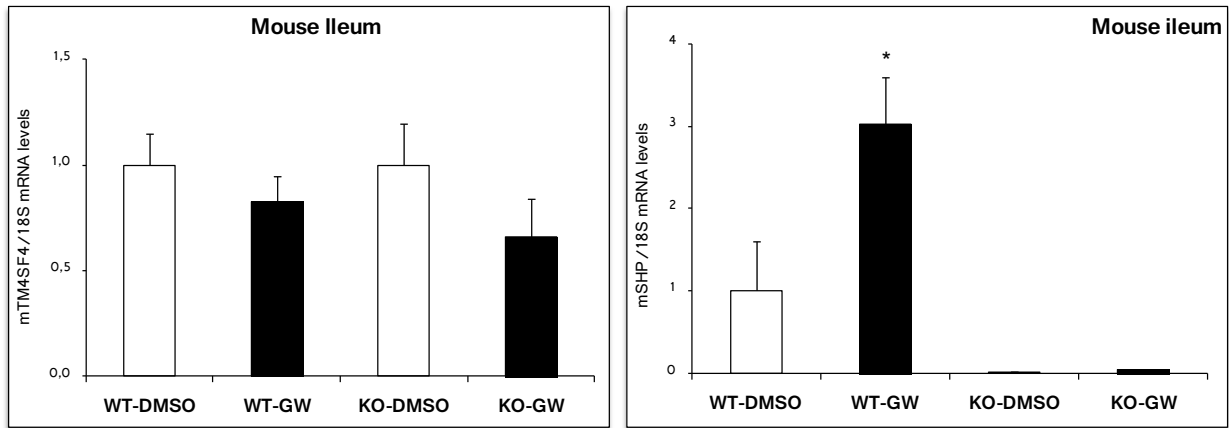


Fig. 82: Niveles ileales de ratones control (WT) y deficientes en FXR (KO) inyectados con 50mg de GW4064/kg y sacrificados a las 8h. Media  $\pm$  SEM de n=4 ratones/condición.; \*P<0.05; estadística con respecto a los ratones de cada condición tratados con el vehículo realizada con *T-test de Student*.

En la figura 82 se puede distinguir cómo los ratones WT tratados con GW4064 no mostraban ninguna inducción en los niveles de *Tm4sf4* en este tejido. Tampoco se apreciaban cambios significativos entre los ratones WT y KO tratados con GW4064, lo que indicaba que Fxr no regulaba a *Tm4sf4* en el íleon de estos ratones. Para verificar la eficiencia del tratamiento en este tejido se analizaron los niveles de *Shp* en el íleon de estos mismos animales inyectados con GW4064, comprobando que el tratamiento inducía sus niveles en el íleon de los ratones WT pero no de los KO.



**CICLO DE LA UREA: catabolismo de los aminoácidos**



El ciclo de la urea es la vía metabólica usada para eliminar los desechos nitrogenados del organismo. Tiene lugar en el hígado y los principales compuestos que se degradan en él son los aminoácidos, los cuales descomponen su parte amínica en el ciclo de la urea y su parte carboxílica en el ciclo de Krebs. Los compuestos nitrogenados pueden entrar por casi cualquier parte del ciclo y el producto final de desecho es la urea, que se excreta por los riñones.

En el ciclo de la urea el nitrógeno entra en forma de amonio y mediante la carbamoil-P sintetasa (CPS1) forma carbamoil-fosfato. Éste se une a la ornitina que, a través de la ornitina trans-carbamilasa (OTC) forma citrulina. Posteriormente se forma argininasuccinato al unirse un aspartato gracias a la acción de la argininasuccinato sintetasa (ASS1). La enzima argininasuccinato liasa (ASL) descompone el succinato de arginina para dar fumarato, el cual va a parar al ciclo de Krebs; y arginina, la cual es degradada por la enzima arginasa 1 (ARG1) en urea y ornitina, siendo ésta empleada al inicio del ciclo. Estudios recientes han descubierto que la desacetilasa dependiente de NAD, SIRT5, es capaz de desacetilar a la enzima CPS1 en la mitocondria, aumentando así su actividad y el catabolismo de los aminoácidos (Nakagawa T et al, 2009).

### El tratamiento con GW4064 disminuye la expresión de ciertos genes del ciclo de la urea

El análisis de los resultados obtenidos en el *microarray* en células Huh7 tratadas con el ligando específico de FXR, el GW4064, puso de manifiesto que las principales enzimas del ciclo de la urea (CPS1, OTC, ASS1, ASL y ARG1) mostraban una disminución en su expresión génica. Con el objetivo de comprobar la veracidad de estos resultados, se procedió a examinar la diferencia en los niveles de mRNA de los genes que presentaban una mayor disminución en el *microarray* (CPS1, ASS1 y SIRT5). Esto se realizó por PCR cuantitativa del RNA de células Huh7 tratadas durante 24 horas con CDCA y GW4064.

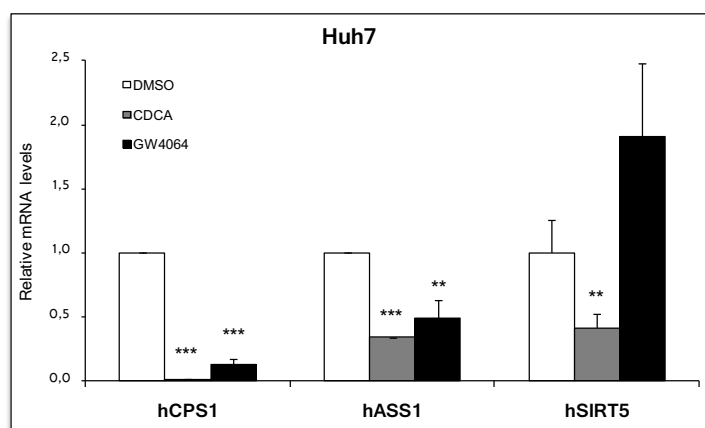


Fig. 83: Células Huh7 tratadas durante 24 horas con CDCA (100µM) y GW4064 (2µM). Niveles de mRNA normalizados por el contenido de 18S. Media ± SEM de dos experimentos en triplicado; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Como se muestra en la figura 83, las enzimas *CPS1* y *ASS1* sufrían una disminución muy significativa de sus niveles de mRNA debido a los tratamientos con CDCA y GW4064. Cabe destacar que los niveles del mRNA de *CPS1* disminuían más de un 85% con el tratamiento con GW4064 y más de un 98% con CDCA. En el caso de *SIRT5* los niveles de mRNA disminuían significativamente por el tratamiento con CDCA pero tendían a aumentar con el tratamiento con GW4064.

### El gen *CPS1* podría estar regulado por FXR a través de SHP

El mecanismo de represión génica más utilizado por FXR es la inducción del receptor nuclear atípico SHP (Goodwin B et al, 2000). Con el objetivo de estudiar si FXR reprimía *CPS1* a través de la inducción de *SHP* se llevó a cabo la transfección transitoria de un siRNA específico de *SHP* y de un control, un siRNA inespecífico, en células Huh7. Posteriormente se procedió a tratar dichas células con GW4064 durante 24 horas. Para verificar la eficiencia de la transfección se analizaron los niveles de *SHP* en estas condiciones (ver materiales y métodos, apartado “silenciamiento génico mediante siRNAs”). Posteriormente se analizaron los niveles de *CPS1* en las mismas muestras.

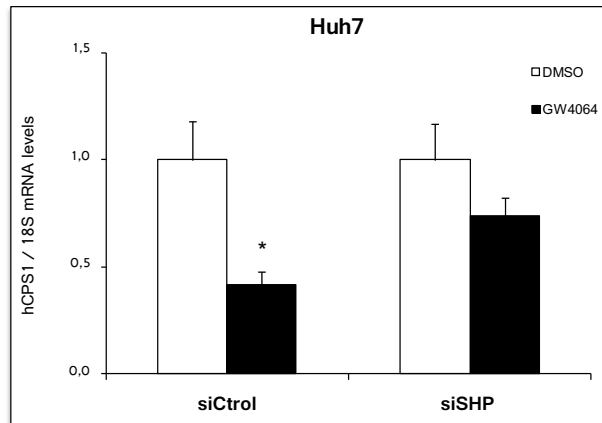


Fig. 84: Células Huh7 tratadas durante 48 horas con siRNA control (siCtrl) y siRNA SHP (siSHP), ambos a una concentración de 100nM, y tratadas durante las últimas 24h con GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por experimento; \*P<0.05; estadística con *T-test de Student* respecto a los valores del tratamiento con DMSO en la transfección de los respectivos siRNAs.

En la figura 84 se observa cómo las células transfectadas con el siRNA control mostraban una disminución de los valores de *CPS1* al someterlas al tratamiento con el GW4064. Cuando las células eran transfectadas con el siSHP y tratadas con el ligando sintético de FXR se producía una menor disminución en los niveles del mRNA de *CPS1*. Como control del experimento se analizaron los niveles de un gen reprimido por SHP, el gen *CYP7A1* (ver Materiales y métodos, apartado de “silenciamiento génico con siRNAs”) que mostraba una disminución significativa de su expresión en células que contenían SHP, pero recuperaba su expresión, incluso por encima de los niveles basales, cuando en las células se bloqueaba la expresión de SHP.



**HP/HPR: implicación en el proceso inflamatorio**



La haptoglobina es una proteína que se encuentra unida a la hemoglobina libre en el plasma sanguíneo procedente de una hemólisis fisiológica o patológica. La HP se une con gran afinidad a la Hb libre evitando así su actividad oxidativa y previniendo la pérdida de hierro a través de los riñones, a la vez que los protege del carácter tóxico de la propia Hb libre. La formación del complejo Hp-Hb promueve su unión a un receptor específico de monocitos y macrófagos, el receptor CD163, permitiendo así la internalización de dicho complejo.

La HPR es una proteína sérica con más de un 90% de homología con la haptoglobina y, al igual que ésta, es una proteína de fase aguda en procesos inflamatorios.

La expresión de HP y HPR se reprime por ligandos de FXR en células Huh7

Tras analizar los resultados del *microarray* realizado en Huh7 tratadas con GW4064, se observó que algunos de los genes que aparecían reprimidos eran *HP* y *HPR*. Para validar este resultado se trataron células Huh7 durante 24 horas con diferentes ligandos de FXR, CDCA y GW4064. Seguidamente se obtuvo el RNA de las células tratadas y se analizaron los genes de interés por PCR cuantitativa. Como control positivo del tratamiento se analizó paralelamente la expresión de *SHP*.

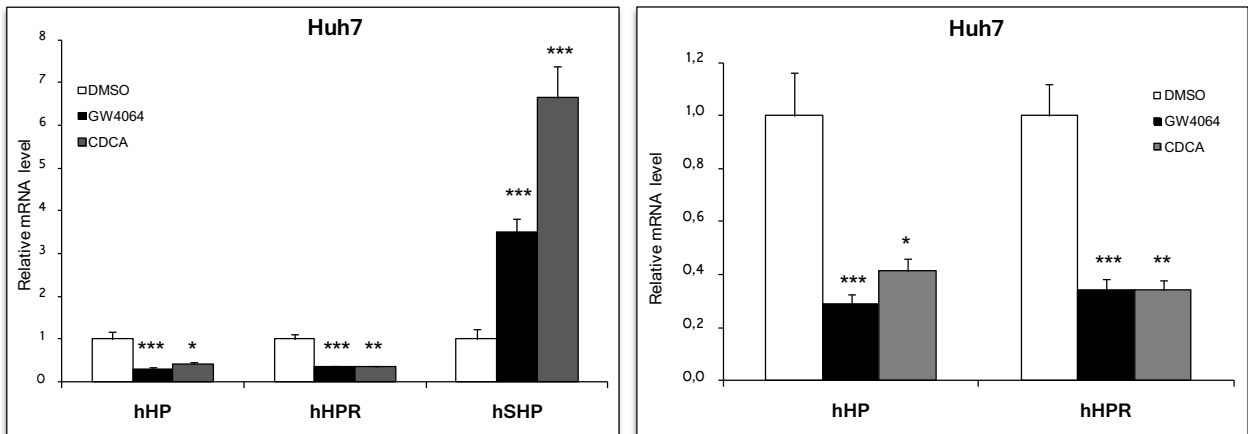


Fig. 85: Células Huh7 tratadas durante 24 horas con CDCA (100µM) y GW4064 (2µM). Niveles de mRNA normalizados por el contenido de 18S. Media ± SEM de dos experimentos en triplicado; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Como se puede observar en las gráficas de la figura 85, los genes *HP* y *HPR* eran reprimidos en un 70% por los tratamientos con ambos ligandos de FXR (la gráfica de la derecha presenta una ampliación de los resultados), mientras que el gen *SHP* se inducía en dichas condiciones.

A continuación, se estudió el comportamiento de este gen en hepatocitos primarios humanos tratados con CDCA y GW4064 durante 24 horas.

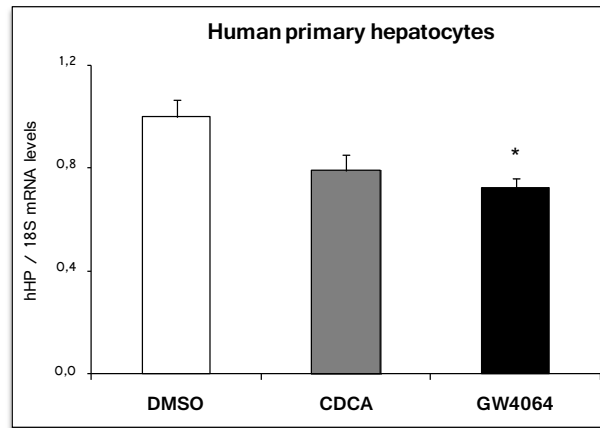


Fig. 86: Hepatocitos primarios humanos tratados durante 24 horas con CDCA (50 $\mu$ M) y GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=4 muestras por condición; \*P<0.05; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Tal y como se muestra en la figura 86, existía una disminución en los niveles del mRNA de *HP* al tratar los hepatocitos con ambos activadores de FXR, aunque solo era significativo en el tratamiento con GW4064.

### Efecto del silenciamiento de la expresión de FXR sobre la represión de HP por GW4064

Para profundizar en el estudio de esta regulación se analizaron los niveles del gen *HP* en células Huh7. Para ello la expresión de este receptor nuclear fue silenciada a través de la transfección transitoria de un siRNA específico. Posteriormente se trataron las células transfectadas con los ligandos de FXR, GW4064 y CDCA, para analizar los niveles de mRNA de *HP* en dichas condiciones.

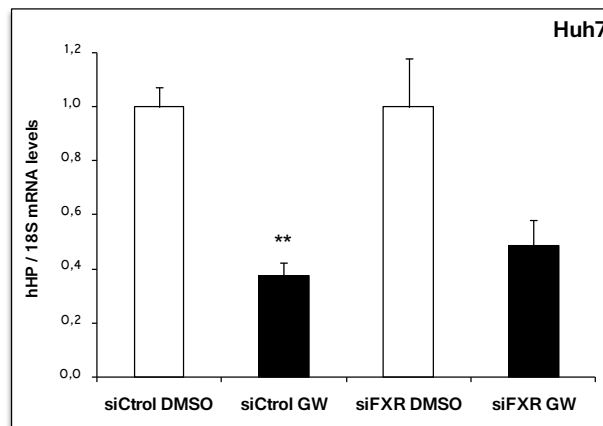


Fig. 87: Células Huh7 tratadas durante 48 horas con siRNA control (siCtrl) y siRNA FXR (siFXR) a una concentración de 25nM y tratadas durante las últimas 24h con el ligando GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; estadística realizada con *T-test de Student* de valores comparados con los valores de las células transfectadas con sus respectivos siRNAs y tratadas con DMSO.

En la figura 87 los niveles de mRNA de *HP* eran reprimidos por GW4064 cuando la transfección se realizaba con el siRNA control (siCtrl). En cambio, cuando las células eran transfectadas con siFXR y tratadas con GW4064 la represión perdía la significancia. Como control se observó que la inducción de

*SHP* quedaba bloqueada cuando se silenciaba la expresión de FXR (ver materiales y métodos, apartado “silenciamiento génico con siRNAs”).

### La ganancia de función de FXR reprime la expresión de HP

Para completar el estudio de la regulación se analizaron los niveles de *HP* en células Huh7 en las que se sobreexpresaba FXR fusionado al dominio de activación de VP16 mediante la infección con adenovirus.

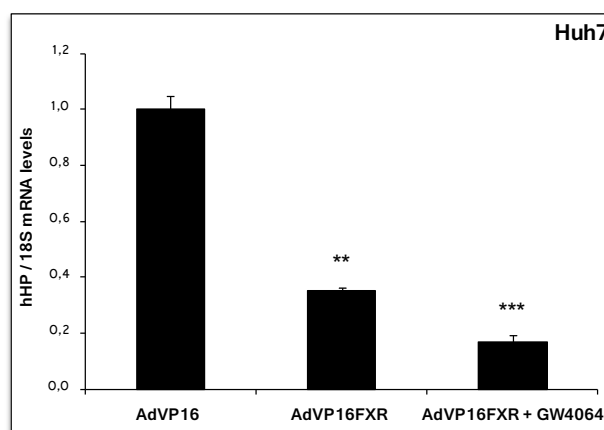


Fig. 88: Células Huh7 infectadas con AdVP16 y AdVP16FXR (ambos con 100MOIs) durante 48h y tratadas durante las últimas 24 horas con GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; la estadística con *T-test de Student* se realizó con respecto a los valores de las células infectadas con AdVP16 y tratadas con DMSO.

Como se muestra en la figura 88 los niveles de *HP* eran reprimidos significativamente mediante la sobreexpresión adenovírica de FXR parcialmente activado, aproximadamente en un 70%. Como se esperaba, esta represión era más aguda cuando las células eran infectadas y tratadas con GW4064, obteniéndose una reducción de los niveles de mRNA de *HP* del 90%. En el caso del control positivo *SHP* su comportamiento era totalmente contrario (ver materiales y métodos, apartado “infección con adenovirus”), ya que se inducía por la sobreexpresión con AdVP16FXR de manera más significativa cuando se trataba con GW4064 tras la infección.

### La regulación que ejerce FXR sobre *HP* necesita la traducción de una proteína intermedia

Con el objetivo de saber si FXR estaba regulando al gen *HP* a través de una proteína intermedia se realizó un experimento con el reactivo cicloheximida, inhibidor de la síntesis proteica, en células HepG2. Estas células fueron tratadas durante 8h con los activadores de FXR (CDCA y GW4064) en presencia o no de cicloheximida. Tras obtener el RNA de estas células tratadas se analizaron los niveles de *HP*, como gen de interés, y de *SHP*, como control del experimento.

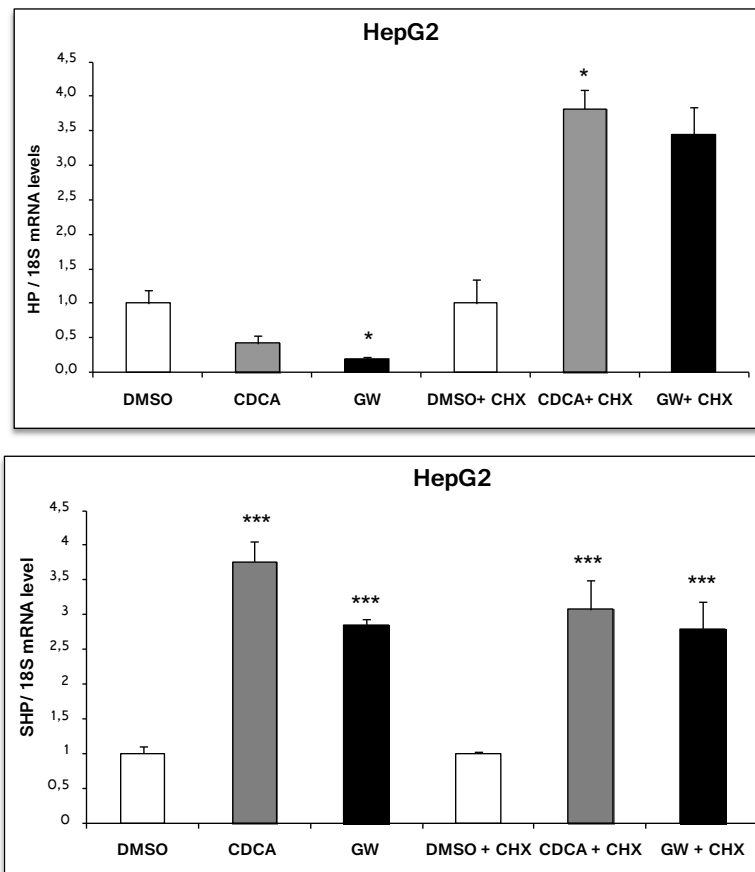


Fig. 89: Células HepG2 tratadas durante 8 horas con GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (100 $\mu$ M) en presencia o no de cicloheximida (10 $\mu$ g/ml). Media  $\pm$  SEM de n=4 muestras por condición; \*P<0.05; \*\*\*P<0.001. Estadística realizada con *T-test de Student* de los valores con respecto al tratamiento con DMSO.

Tal y como se muestra en la figura 89, los niveles de *HP* se observa como los ligandos de FXR, CDCA y GW4064, son capaces de reducir los niveles del mRNA de este gen de manera significativa en el caso del tratamiento con GW4064. Cuando los mismos tratamientos se realizaban en presencia de cicloheximida, se podía apreciar que la represión por los ligandos desaparecía. En cambio, en el caso de *SHP* la inducción observada por el tratamiento con los ligandos de FXR no varió en presencia de cicloheximida. Estos resultados sugerían que la represión que ejerce FXR sobre *HP* necesitaba de un intermediario proteico para llevarse a cabo.

### La proteína que media en la represión de *HP* por FXR no es *SHP*

Con el objetivo de estudiar si *SHP* podía mediar en la represión de *HP* por FXR, se llevó a cabo la transfección transitoria de un siRNA específico de *SHP* en células Huh7.

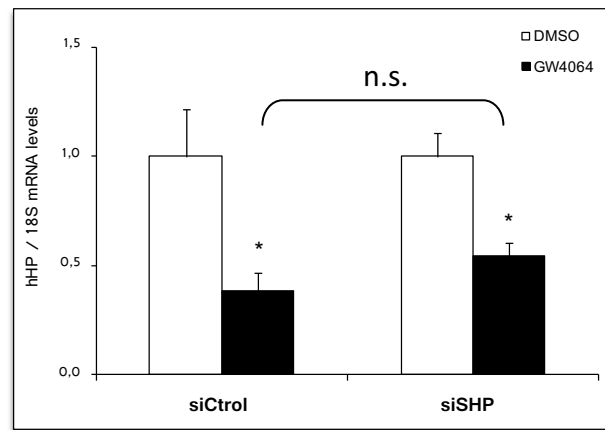


Fig. 90: Células Huh7 tratadas durante 48 horas con siRNA control (siCtrl) y siRNA SHP (siSHP), ambos a una concentración de 100nM, y tratadas durante las últimas 24h con GW4064 (2µM). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por experimento; \*P<0.05; estadística con *T-test de Student* respecto a los valores del tratamiento con DMSO en la transfección de los respectivos siRNAs.

Se comprobó la eficiencia de la transfección analizando los niveles de *SHP* en Huh7 transfectadas con el siRNA específico de este receptor nuclear (ver materiales y métodos, apartado “silenciamiento génico mediante siRNAs”). Como se puede apreciar en la figura 90, la disminución de la expresión de SHP no eliminaba la represión de HP causada por el agonista de FXR. Por lo tanto, esto sugiere que SHP no era la proteína que mediaba en la represión de *HP* por la acción de FXR activado.





**Ubiquitinas**



La ubiquitinación es un proceso por el cual las proteínas celulares son marcadas con una o varias moléculas de ubiquitina para ser degradadas en el proteosoma. La ubiquitina es una pequeña proteína presente en la mayoría de los tejidos de los organismos eucariotas. El sistema de ubiquitinación no solo está relacionado con la degradación de proteínas anómalas, sino que está involucrado también en procesos tan diversos como el control del ciclo celular, la transcripción o el tráfico de proteínas.

Tres tipos de enzimas intervienen en la adición de ubiquitina a las proteínas (conjugación). La enzima E1 activa una proteína ubiquitina y la transfiere a la segunda enzima del mecanismo, la enzima E2, que es la encargada de conjugar la ubiquitina. La última enzima, E3, es la responsable de la unión de la ubiquitina a aminoácidos específicos de la proteína diana y de liberar a la enzima E2. Este proceso se repite para generar el estado poliubiquitinado que marca las proteínas para su destrucción.

### La expresión de *UBE2L6*, *UBD*, *FBXO2* y *NEDD4L* se induce por activadores de FXR en células Huh7

Al analizar los resultados obtenidos en el *microarray* de las Huh7 tratadas con GW4064, se observaba una inducción de varios genes relacionados con la ubiquitinación. Algunos de ellos son la UBD (proteína tipo ubiquitina), la UBE2L6 (E2) o las proteínas FBXO2 y NEDD4L (E3). Con el objetivo de estudiar la regulación de estos genes por FXR, se evaluaron sus niveles de mRNA en las células de hepatoma humano Huh7 sometidas a tratamientos con diferentes activadores de FXR, CDCA y GW4064.

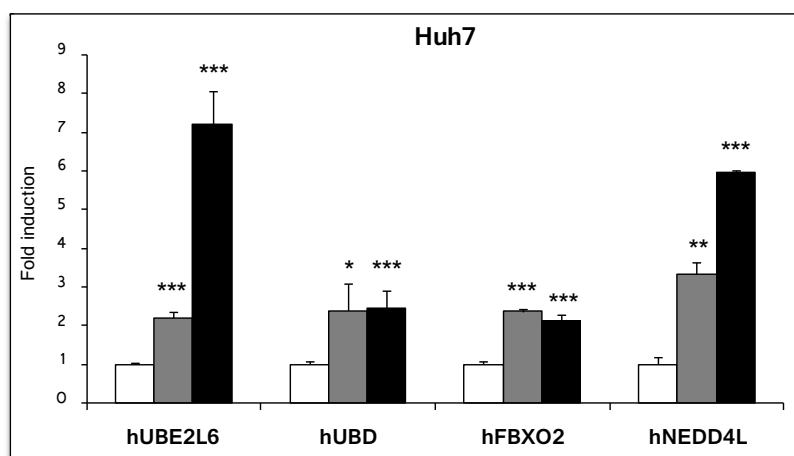


Fig. 91: Células Huh7 tratadas durante 24 horas con CDCA, barras blancas, y GW4064, barras gris (100µM), y GW4064, barras negras (2µM). Niveles de mRNA normalizados por el contenido de 18S. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO, barras blancas, fue realizada con *T-test de Student*.

Como se puede observar en la figura 91, todos estos genes estaban inducidos por los tratamientos con los ligandos de FXR. Cabe destacar que los genes más inducidos por los tratamientos, especialmente por GW4064, son la conjugasa *UBE2L6* y la ligasa *NEDD4L*.

### Los niveles de *NEDD4L* se inducen por ligandos de FXR en otros modelos celulares

Para caracterizar la regulación de *NEDD4L* por FXR, se analizó la variación en la expresión de dicho gen en distintos modelos celulares tratados con los ligandos de este receptor nuclear. Dichos modelos celulares consistían en las células de hepatoma humano HepG2 y células vasculares humanas VSMC, siendo estas últimas infectadas con el adenovirus que sobreexpresaba FXR.

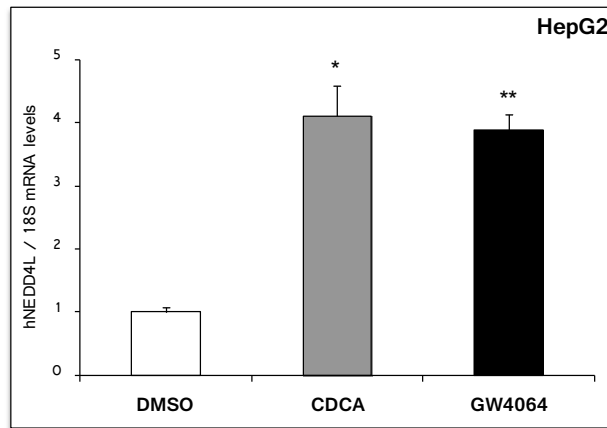


Fig. 92: Células HepG2 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por cada condición; \*P<0.05; \*\*P<0.01; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

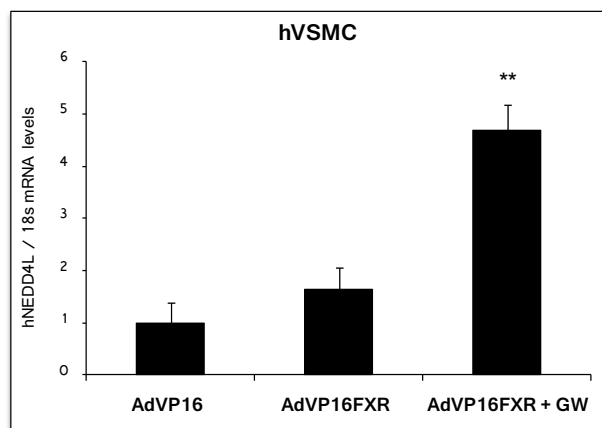


Fig. 93: Células VSMC infectadas con AdVP16 y AdVP16-hFXR (40MOIs) durante 48h y tratadas durante las últimas 24 horas con GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \*\*P<0.01; estadística con *T-test de Student* en comparación con los niveles de células infectadas con AdVP16 y tratadas con DMSO (AdVP16).

En las figuras 92 y 93 se pone de manifiesto cómo *NEDD4L* se inducía tanto por el tratamiento con los ligandos de FXR en células de HepG2, con unos niveles de inducción similares a los obtenidos en Huh7, como por la infección con adenovirus en las células VSMC cuando se combinaba con el tratamiento con GW4064.

A continuación, se trataron hepatocitos primarios humanos con los ligandos de FXR usados previamente.

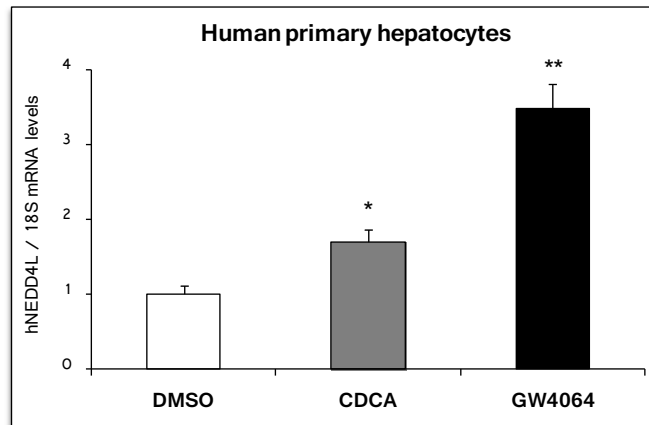


Fig. 94: Hepatocitos primarios humanos tratados durante 24 horas con CDCA (50 $\mu$ M) y GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=4 muestras por condición; \*P<0.05;\*\*P<0.01; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

Como se observa en la figura 94, en hepatocitos primarios humanos los niveles del mRNA de *NEDD4L* también se inducían por CDCA y GW4064, confirmando así la regulación de este gen en un contexto hepático humano más fisiológico.

### La inducción de *NEDD4L* por los ligandos de FXR está bloqueada cuando se silencia FXR

Se analizó el comportamiento de *NEDD4L* en células Huh7 transfectadas con un siRNA específico de FXR y posteriormente tratadas con GW4064 y CDCA. Se analizaron los niveles de *NEDD4L* por PCR cuantitativa en dichas condiciones.

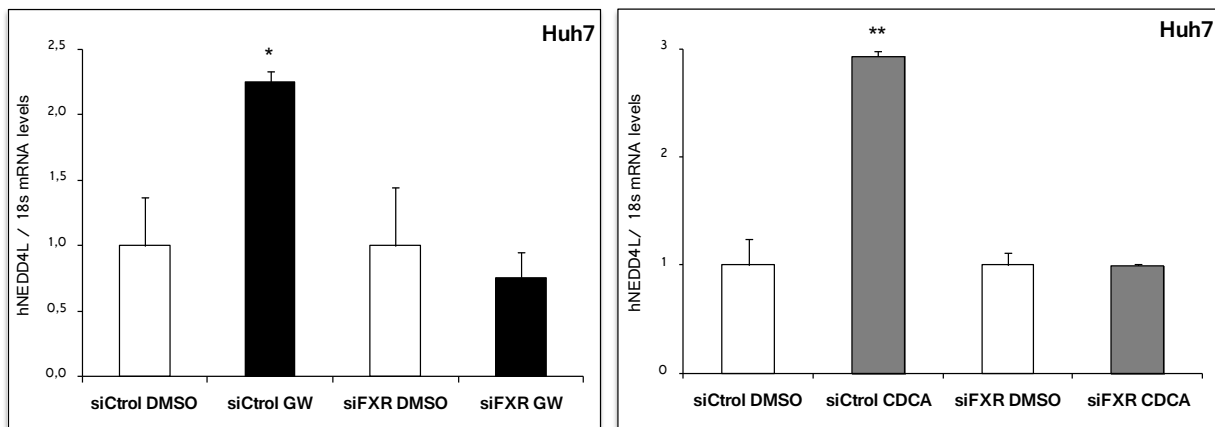


Fig. 95: Células Huh7 tratadas durante 48 horas con siRNA control (siCtrl) y siRNA FXR (siFXR) a una concentración de 25nM y tratadas durante las últimas 24h con el ligando GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (100 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; estadística realizada con *T-test de Student* de valores comparados con los valores de las células transfectadas con sus respectivos siRNAs y tratados con DMSO.

Tal y como se aprecia en la figura 95, los niveles de *NEDD4L* se inducían por los activadores de FXR en células transfectadas con el siRNAs control (siCtrl). En cambio, no se detectaba la inducción cuando las células eran transfectadas con siFXR. Esto indicaba que FXR era necesario en la respuesta de *NEDD4L* a CDCA y GW4064.

### La ganancia de función de FXR induce la expresión de *NEDD4L*

Para completar el estudio de la regulación se analizaron los niveles de *NEDD4L* en células en las que se sobreexpresaba una quimera de FXR con el dominio de activación de VP16.

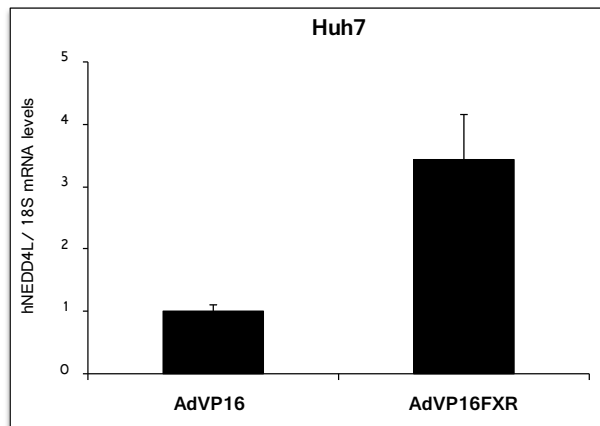


Fig. 96: Células Huh7 infectadas con AdVP16 y AdVP16-hFXR (100MOIs) durante 48h y tratadas durante las últimas 24 horas con GW4064 (2 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; estadística con *T-test de Student* respecto a los valores de las células infectadas con AdVP16.

En la figura 96 se muestra cómo los niveles de *NEDD4L* se inducían por la infección de las células Huh7 con el adenovirus que sobreexpresaba FXR.

### La regulación que ejerce FXR sobre *NEDD4L* se produce a nivel transcripcional

Con el objeto de caracterizar la regulación de *NEDD4L* por FXR, se trataron células Huh7 con los ligandos de FXR, CDCA y GW4064, durante 24h y posteriormente con un reactivo que bloqueaba la transcripción (actinomicina D).

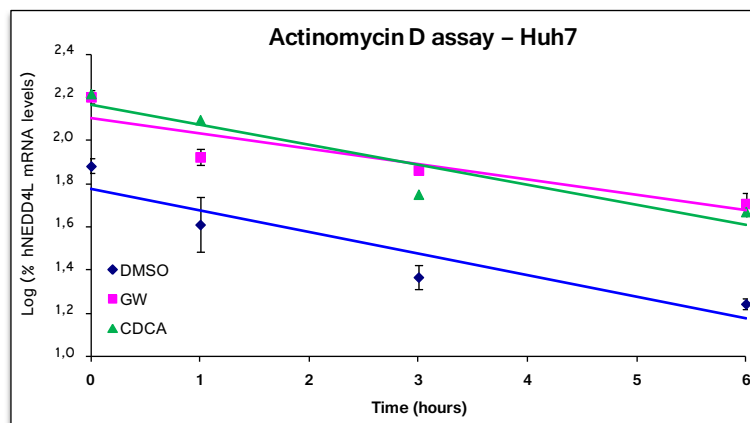


Fig. 97: Huh7 tratadas con DMSO, GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (50  $\mu$ M) durante 24h y posteriormente con actinomicina D durante 1, 3 y 6 horas a una concentración de 5  $\mu$ g/ml. Representación del logaritmo de la variación en los niveles del mRNA de *NEDD4L* con respecto a 18S (en tanto por ciento) con respecto a las horas de tratamiento con actinomicina D. Media  $\pm$  SEM de n=3/condición. Estadística realizada con *T-test de Student* con respecto a los niveles del tratamiento con DMSO.

Este experimento mostraba cómo se degradaba el mRNA de *NEDD4L* a medida que el tratamiento con actinomicina D se prolongaba (figura 97). Las pendientes de todas las rectas, tanto la del vehículo DMSO como las de los ligandos GW4064 y CDCA, no variaban dependiendo del tratamiento. Por tanto, se podía deducir que no había efectos post-transcripcionales de los ligandos de FXR que estabilizasen el mRNA de *NEDD4L*.

### Los niveles de *Nedd4l* se inducen por activadores de FXR en ratón

Se realizó un estudio de los niveles de mRNA de *Nedd4l* en un modelo *in vivo*. Para ello se trataron ratones control y ratones deficientes en FXR con inyecciones intraperitoneales del ligando de FXR, GW4064 o su vehículo. Los ratones se sacrificaron a las 8 horas de la inyección, se obtuvo el hígado y se analizaron los niveles de mRNA de *Nedd4l*.

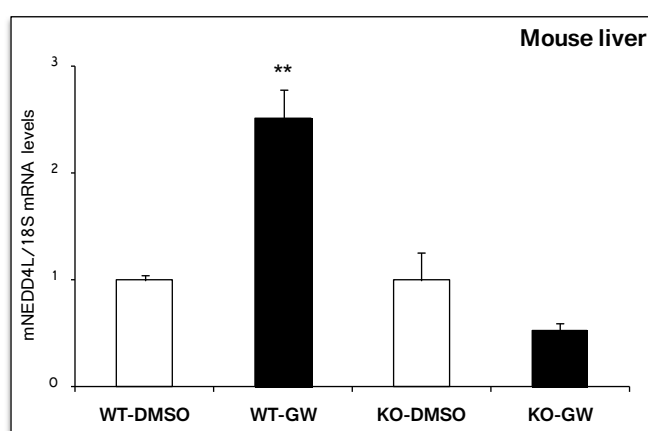


Fig. 98: Niveles hepáticos de ratones control (WT) y deficientes en FXR (KO) inyectados con 50mg de GW4064/kg y sacrificados a las 8h. Media  $\pm$  SEM de n=4 ratones/condición.; \*\*P<0.01; estadística realizada con *T-test de Student* con respecto a los ratones de cada condición tratados con el vehículo.

Como se aprecia en la figura 98, los niveles hepáticos del mRNA de *Nedd4l* se inducían en los ratones control en respuesta al tratamiento con GW4064 (WT-GW). Sin embargo, esta inducción no se observaba en los ratones que no contenían FXR. Estos resultados confirmaban la respuesta a agonistas de FXR y la dependencia de FXR en la regulación de *Nedd4l* por GW4064 *in vivo*.

### La expresión de la conjugasa *UBE2L6* se induce por activadores de FXR

Se realizó un estudio de la regulación por FXR de la expresión de *UBE2L6* en otro modelo de hepatoma humano, las HepG2.

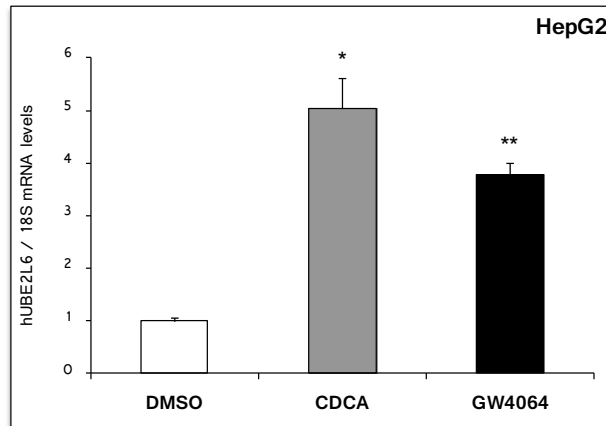


Fig. 99: Células HepG2 tratadas durante 24 horas con CDCA (100 $\mu$ M) y GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por cada condición; \*P<0.05; \*\*P<0.01; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

En la figura 99 se muestra la inducción significativa de los niveles de *UBE2L6* al tratar las células HepG2 con ambos ligandos de FXR.

Para estudiar esta regulación en un contexto más fisiológico, se analizaron los niveles de *UBE2L6* en hepatocitos primarios humanos tratados con los activadores de FXR.

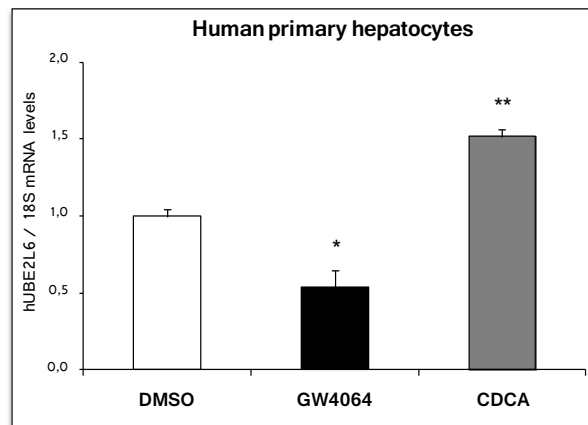


Fig. 100: Hepatocitos primarios humanos tratados durante 24 horas con CDCA (50 $\mu$ M) y GW4064 (5 $\mu$ M). Media  $\pm$  SEM de n=4 muestras por condición; \*P<0.05; \*\*P<0.01; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

La figura 100 muestra cómo el tratamiento con GW4064 reprime los niveles de *UBE2L6*, mientras que el tratamiento con CDCA los induce.



### La inducción de *UBE2L6* está bloqueada al silenciar FXR

Para caracterizar la regulación de *UBE2L6* por FXR se realizó un ensayo de silenciamiento de este receptor nuclear en Huh7. Para ello se procedió a la transfección de estas células con un siRNA específico de FXR y se trataron posteriormente con GW4064 y CDCA.

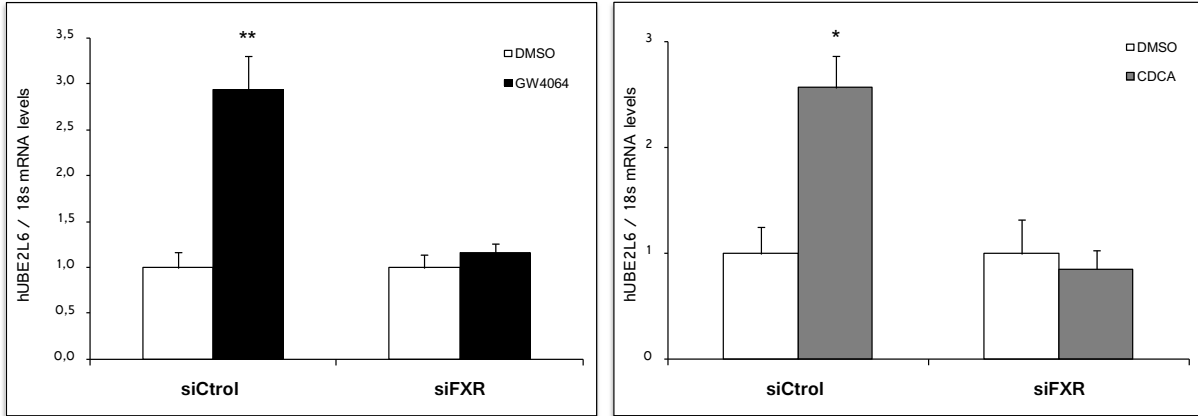


Fig. 101: Células Huh7 tratadas durante 48 horas con siRNA control (siCtrl) y siRNA FXR (siFXR) a una concentración de 25nM y tratadas durante las últimas 24h con el ligando GW4064 (5µM) y CDCA (100µM). Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; \*P<0.05; \*\*P<0.01; estadística realizada con *T-test de Student* de valores comparados con los valores de las células transfectadas con sus respectivos siRNAs y tratados con DMSO.

En la figura 101, se muestran cómo los niveles de *UBE2L6* se inducían por el tratamiento con GW4064 y CDCA cuando las células habían sido transfectadas con un siRNA control. En cambio, esta inducción no se reproducía cuando la expresión de FXR estaba silenciada, demostrando así la necesidad de FXR en la inducción de *UBE2L6* por los ligandos.

### La ganancia de función de FXR induce la expresión de *UBE2L6*

Por otro lado se estudiaron los niveles de *UBE2L6* en Huh7 con FXR sobreexpresado mediante la infección con adenovirus.

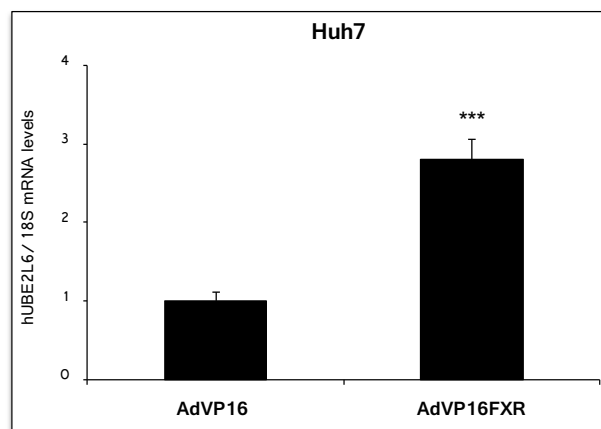


Fig. 102: Células Huh7 infectadas con AdVP16 y AdVP16-hFXR (100MOIs) durante 48h y tratadas durante las últimas 24h con GW4064 (2µM). Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \*\*\*P<0.001; estadística con *T-test de Student* respecto a los valores de las células infectadas con AdVP16.

Como vemos en la figura 102, la infección de las Huh7 con un adenovirus que sobreexpresaba una quimera de FXR con el dominio de activación VP16, inducía la expresión de *UBE2L6*.

### La regulación de *UBE2L6* por FXR se realiza a nivel transcripcional

Debido a que FXR puede inducir la transcripción de sus genes diana por unión directa a sus elementos respuesta, se analizó si la regulación observada hasta ahora era a nivel transcripcional. Para ello, se realizó un tratamiento de las células Huh7 con actinomicina D, a distintas horas y se midieron los niveles de *UBE2L6* en presencia de activadores de FXR (CDCA y GW).

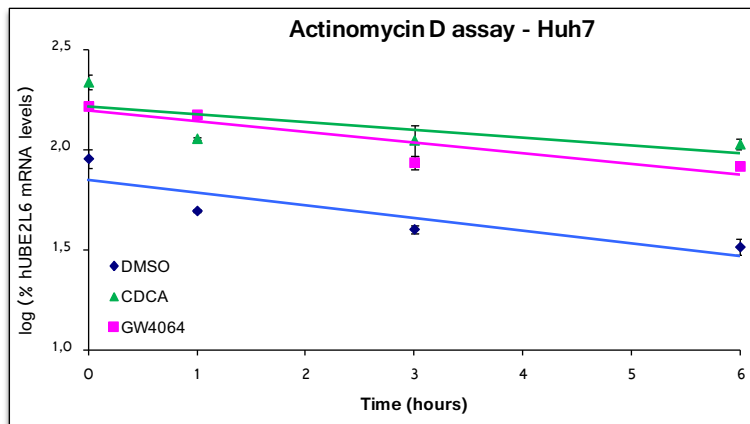


Fig. 103: Huh7 tratadas con DMSO, GW4064 (5 $\mu$ M) y CDCA (50  $\mu$ M) durante 24h y posteriormente con actinomicina D durante 1, 3 y 6 horas a una concentración de 5  $\mu$ g/ml. Representación del logaritmo de la variación en los niveles del mRNA de *RBP4* con respecto a 18S (en tanto por ciento) con respecto a las horas de tratamiento con actinomicina D. Media  $\pm$  SEM de n=3/condición. Estadística realizada con *T-test de Student* con respecto a los niveles del tratamiento con DMSO.

Las pendientes de las rectas de la figura 103 indican el tiempo medio de degradación del RNA de *UBE2L6*. Como vemos en esta figura los tratamientos con los ligandos de FXR no variaban significativamente las pendientes de las rectas con respecto al valor obtenido para las células tratadas con el vehículo. Esto indicaba una regulación a nivel transcripcional de *UBE2L6* por FXR.

### Identificación de elementos de respuesta a FXR en *UBE2L6*

Se realizó un análisis *in silico*, mediante el uso del programa bioinformático NUBIScan, del promotor y los intrones del gen *UBE2L6*. En este análisis se localizaron dos elementos de respuesta a 5644bp corriente arriba del TSS y a 1922bp corriente abajo. Con el objeto de analizar si FXR se unía a estos posibles elementos de respuesta se realizó un ensayo de retardación en gel utilizando sondas de *primers* que contenían dichos elementos IR1 y se marcaron radioactivamente con  $^{32}$ P. También se usaron plásmidos que expresaban los receptores nucleares RXR y FXR por transcripción y traducción *in vitro*. Para demostrar la especificidad de la unión del heterodímero FXR-RXR a dichos IR1 se realizaron competiciones con sondas frías que también contenían estos IR1 en una forma WT o mutada (MUT). Como control positivo de la competición se usó una sonda con el elemento de respuesta a FXR de *IBABP*.

## Resultados

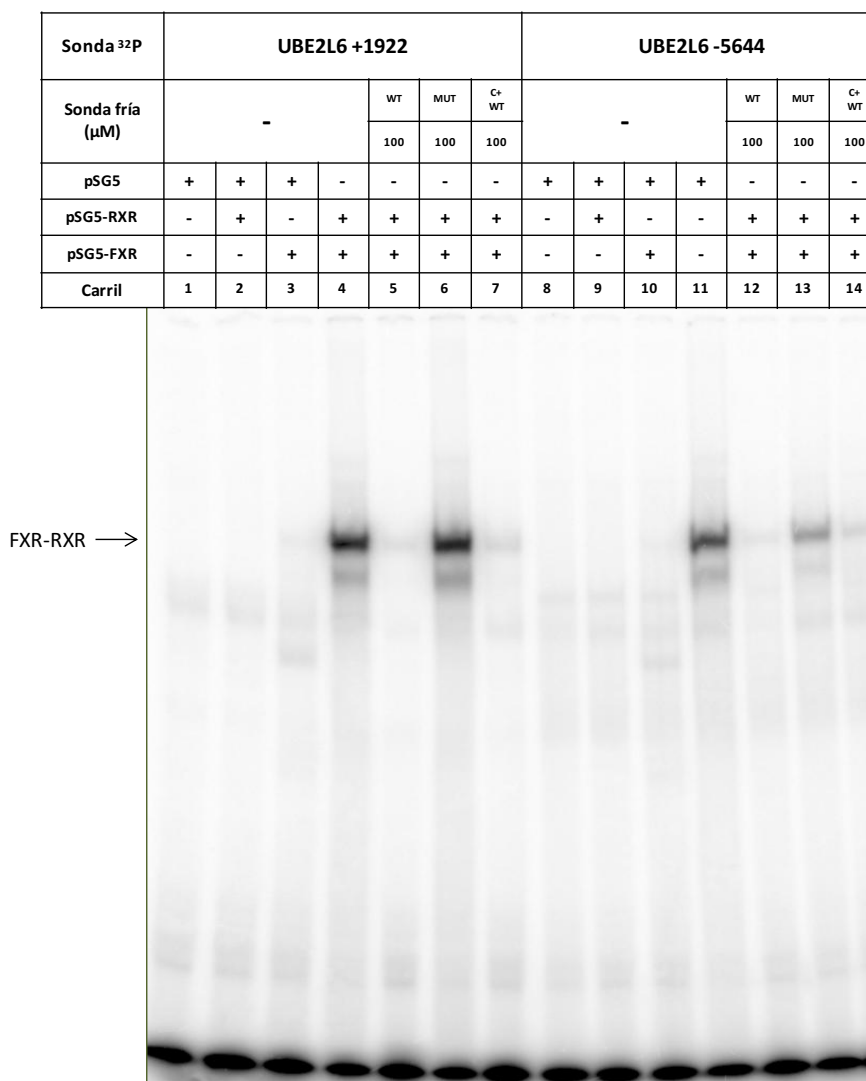


Fig. 104: EMSA realizado con *TNTs* de pSG5, pSG5-hRXR, pSG5-hFXR junto con *primers* marcados radioactivamente con <sup>32</sup>P, de los elementos de respuesta a FXR del gen humano de *UBE2L6* y del elemento de respuesta del gen *IBABP*. La competición se realizaba con 100μM de sondas frías de la forma WT y MUT de los *primers* que contenían el IR1 de *UBE2L6* y de la forma WT de los primers con el IR1 de *IBABP* (C+).

En el carril 4 de la figura 104 se observa una banda retardada que indica la unión de FXR-RXR al IR1. En los carriles 5-6 se observan los ensayos de competición de las sondas frías WT y MUT (a la misma concentración) con la sonda marcada radioactivamente. En el carril 7 se muestra la competición de la sonda fría WT del gen *IBABP* usada como control positivo de la competición. Los carriles del 8-14 mostraban las mismas condiciones usadas en los carriles 1-7 pero con la sonda que contenía el elemento de respuesta a -5644bp del inicio de transcripción del gen *UBE2L6*. Este experimento muestra que FXR es capaz de unirse a ambos elementos de respuesta.



**ADH1: metabolismo del etanol**



El alcoholismo es una de las principales enfermedades de mayor prevalencia a nivel mundial. En mamíferos, el etanol se metaboliza en el hígado por la alcohol deshidrogenasa (ADH), que lo oxida para convertirlo en acetaldehído, el cual puede ser subsiguientemente oxidado a acetato por la aldehído deshidrogenasa (ALDH). La alcohol deshidrogenasa clase I consiste en tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) que son codificadas por los genes *ADH1A*, *ADH1B* y *ADH1C* dispuestos en un *cluster* de genes. Las proteínas que codifican estos genes, homo- o heterodimerizan para dar lugar a la enzima funcional. Las ADH1 no solo participan en la metabolización del etanol, sino también en el metabolismo del retinol y en la síntesis de ácidos biliares.

### La expresión génica de las *ADH1* se induce por activadores de FXR

Tras observar que la expresión de *ADH1A*, *ADH1B* y *ADH1C* estaban inducidas en el microarray de células Huh7 tratadas con GW4064, se analizaron sus niveles de expresión en las células Huh7 y HepG2 sometidas a tratamientos con diferentes activadores de FXR, CDCA y GW4064, durante 24h por PCR cuantitativas.

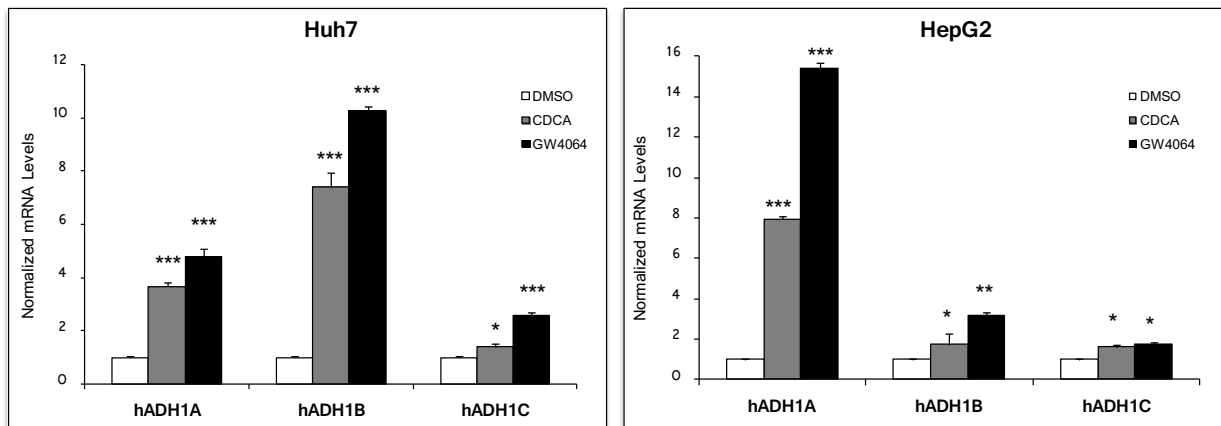


Fig. 105: Células Huh7 y HepG2 tratadas durante 24 horas con CDCA (50 $\mu$ M) y GW4064 (5 $\mu$ M). Niveles de mRNA normalizados por el contenido de 18S. Media  $\pm$  SEM de n=3 muestras por condición; \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; la estadística se realizó con *T-test de Student* con respecto a la condición DMSO.

Como se puede observar en la figura 105, los niveles de mRNA de *ADH1A*, *ADH1B* y *ADH1C* se inducían por los activadores de FXR, en ambos modelos celulares, confirmando así los valores obtenidos en el experimento de micromatrices realizado con el modelo de Huh7.

En concordancia con estos resultados, se analizaron los niveles proteicos de ADH1 en células Huh7 con un anticuerpo que reconocía las tres isoenzimas (panADH1). El análisis se realizó mediante un WB del extracto total de células Huh7 tratadas durante 24h con CDCA y GW4064.

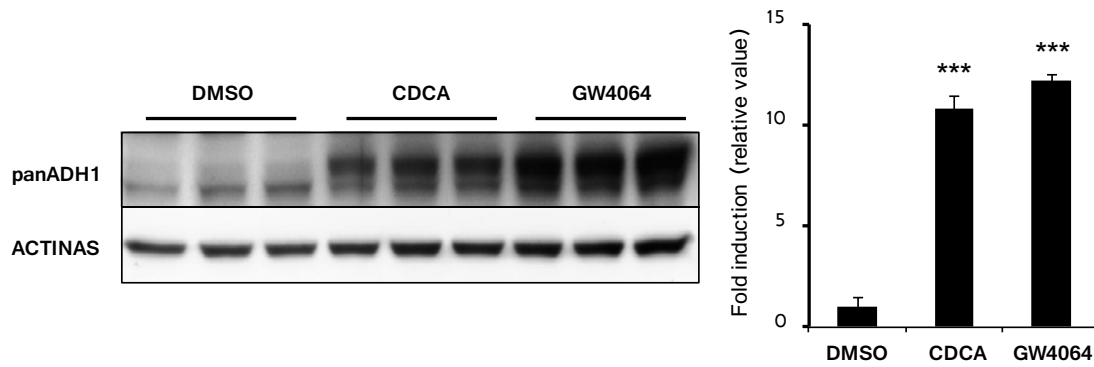


Fig. 106: WB y cuantificación de extracto total de células Huh7 (50µg/carril) tratadas durante las últimas 24 horas con CDCA (50µM) y GW4064 (5µM). Media ± SEM de n=3; \*P<0.05; \*\*P<0.01; estadística con T-test de Student de los valores normalizados por actinas y relativos a los niveles de células tratadas con DMSO.

Los resultados obtenidos en el WB realizado en Huh7 (Fig. 106) mostraban inducciones de los niveles proteicos de las ADH1 por los ligandos de FXR 10 veces superiores a los obtenidos cuando se trataban las células con el vehículo.

El tratamiento de hepatocitos primarios humanos con activadores de FXR también inducía significativamente la expresión de *ADH1A* y *ADH1B*, pero no de *ADH1C* (figura 107).

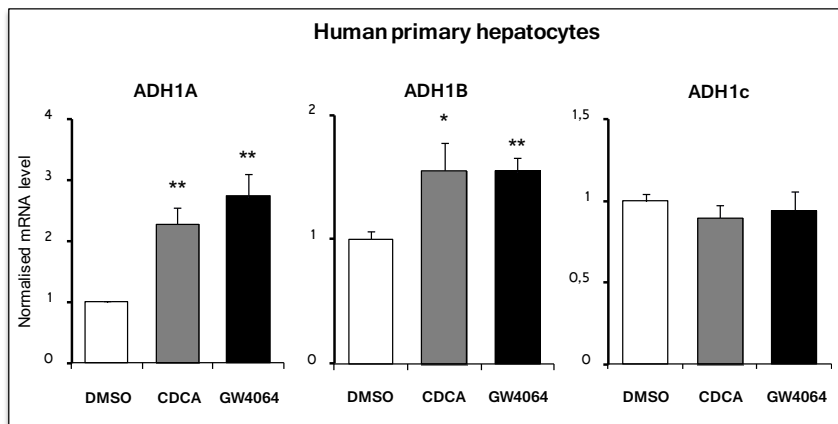


Fig. 107: Hepatocitos primarios humanos tratados durante 24 horas con CDCA (50µM) y GW4064 (5µM). Niveles de mRNA normalizados por el contenido de 18S. Media ± SEM de n=4 muestras por condición; \*P<0.05; \*\*P<0.01; la estadística de los valores con respecto a la condición DMSO fue realizada con *T-test de Student*.

### La inducción de *ADH1A* y *ADH1B* por ligandos de FXR se bloquea al silenciar FXR

Para profundizar en la regulación de las *ADH1* por los activadores de FXR se analizó su expresión génica en Huh7 cuando la expresión de FXR disminuía a causa de la transfección transitoria de un siRNA específico. Debido a que los niveles de *ADH1C* no estaban inducidos en los hepatocitos primarios, se decidió profundizar en el estudio de los otros dos genes.



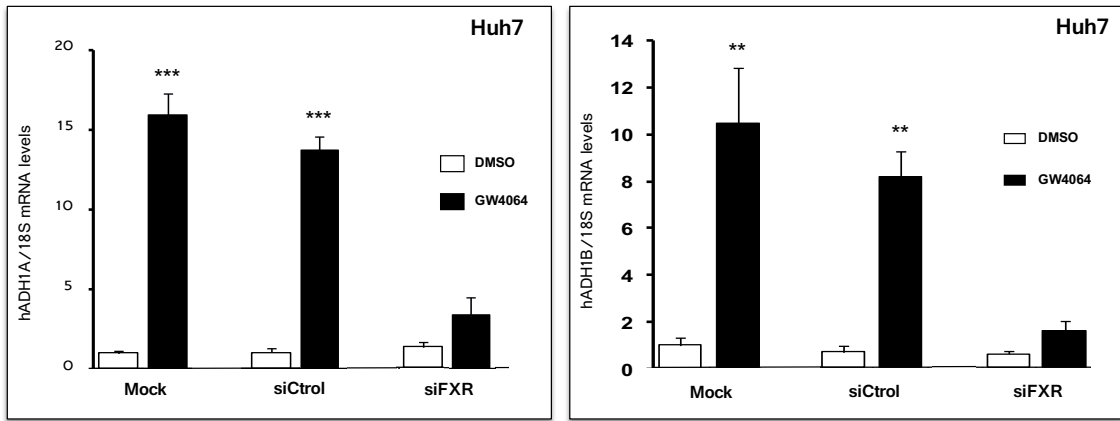


Fig. 108: Células Huh7 tratadas durante 48 horas con siRNA control (siCtrl) y siRNA FXR (siFXR) a una concentración de 25nM y tratadas durante las últimas 24h con el ligando GW4064 (5µM). Mock: células transfectadas únicamente con el reactivo de transfección. Media ± SEM de n=3 muestras por condición; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; estadística realizada con *T-test de Student* de valores relativos a las células Mock tratadas con DMSO.

Los niveles de mRNA de *ADH1A* y *ADH1B* presentaban una marcada inducción significativa cuando las células eran transfectadas con el siRNA control y tratadas con GW4064 (Fig. 108). Sin embargo, cuando la transfección se realizaba con un siRNA específico para silenciar FXR, la inducción por GW4064 se bloqueaba. Estos resultados corroboraban la necesidad de la expresión de FXR para la inducción de *ADH1A* y *ADH1B*, en dicho modelo celular y con el ligando sintético de FXR usado.

### Identificación de un elemento de respuesta a FXR en el promotor de *ADH1A*, *ADH1B* y *ADH1C*

Se realizó un análisis *in silico*, con el programa NUBIScan, de los promotores de los genes humanos *ADH1A*, *ADH1B* y *ADH1C* con el objetivo de buscar elementos de respuesta a FXR. Se localizaron tres putativos IR1 situados en cada uno de los promotores de cada gen.

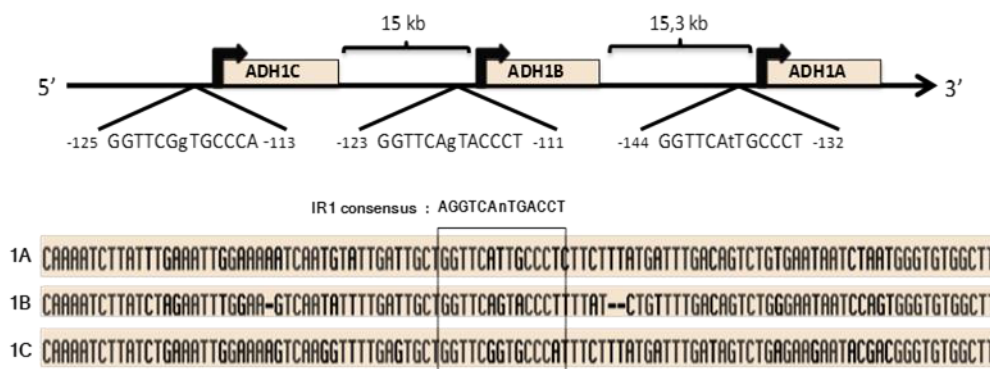


Fig. 109: Esquema representativo de la posición de los elementos putativos de respuesta a FXR en los promotores de los genes *ADH1A*, *ADH1B* y *ADH1C*. Alineación de las secuencias de dichos promotores donde están situados los putativos IR1.

La alineación de las secuencias de los promotores de los tres genes, *ADH1A*, *ADH1B* y *ADH1C*, muestra la similitud de las secuencias y del propio del IR1 con respecto al *consensus* (figura 109). Sin embargo, la secuencia del gen *ADH1C* presenta una variación en la adenina situada en la posición 6 de la secuencia *consensus* (sustituida por una guanina). Estudios sobre las secuencias IR1 de numerosos

genes diana de FXR sostienen que dicha posición tiene un papel crítico para la funcionalidad del elemento de respuesta (Thomas AM et al, 2010). Se subclonaron unas 2.5Kb corriente arriba de los TSS de los promotores de cada uno de los genes en el vector pGL3bv, generando así las construcciones phADH1A, phADH1B y phADH1C. Posteriormente, mediante ensayos de transfección transitoria, se analizó la respuesta a FXR activado.

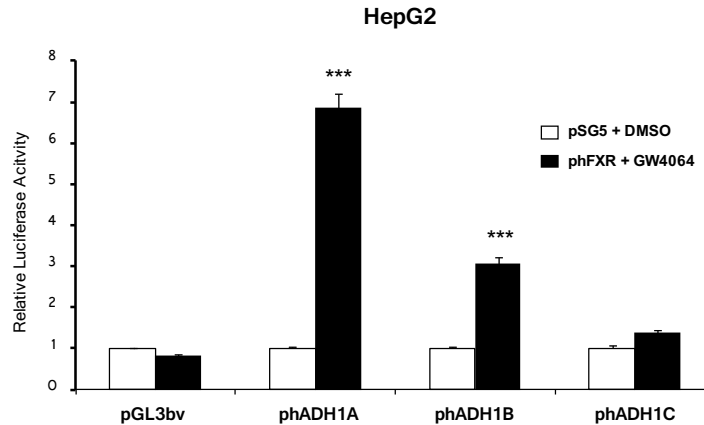


Fig. 110: Huh7 transfectadas con las construcciones de los promotores de los genes *ADH1A*, *ADH1B* y *ADH1C* que contenían los putativos IR1 y con un plásmido de expresión de FXR (pSG5-hFXR) o su vector (pSG5). Posteriormente fueron tratadas durante 24h con GW4064 1 $\mu$ M o su vehículo DMSO. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \*\*\*P<0.001; estadística de valores con respecto al respectivo plásmido con pSG5-DMSO con *T-test de Student*.

La figura 110 muestra cómo las construcciones que contienen los promotores de los genes *ADH1A* y *ADH1B* presentaban una inducción en respuesta a FXR activado. En cambio, la construcción del promotor del gen *ADH1C* no mostraba ninguna inducción significativa.

Con el objetivo de confirmar que la inducción mostrada en la actividad de los promotores de los genes *ADH1A* y *ADH1B* clonados se debía a los elementos putativos de respuesta a FXR, se realizaron mutaciones puntuales en dichos elementos y se midió de nuevo su actividad luciferasa en un ensayo reportero. Se utilizó la cotransfección con el plásmido que expresa FXR y el posterior tratamiento con GW4064.

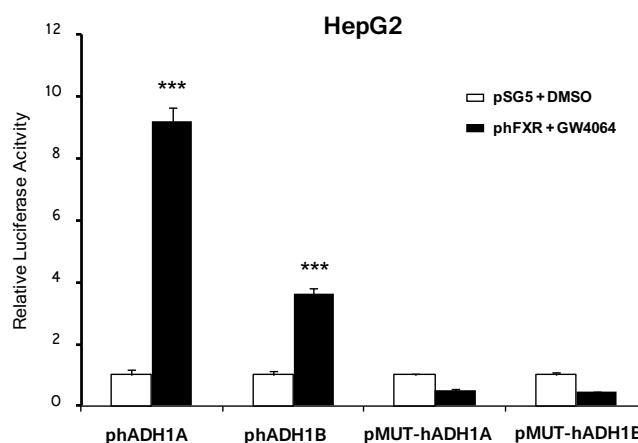


Fig. 111: Huh7 transfectadas con las construcciones de los promotores de los genes *ADH1A* y *ADH1B* que contenían los putativos IR1, y construcciones con los mismos promotores pero con el elemento de respuesta a FXR mutado (pMUT-hADH1A y pMUT-hADH1B). Se realizó la cotransfección con un plásmido de expresión de FXR (pSG5-hFXR) o su vector (pSG5), y posteriormente las células fueron tratadas durante 24 horas con GW4064 1 $\mu$ M o su vehículo DMSO. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \*\*\*P<0.001; estadística de valores con respecto al respectivo plásmido con pSG5-DMSO con *T-test de Student*.

Como se puede comprobar en la figura 111 las construcciones que contenían el elemento de respuesta a FXR mutado no presentaban ninguna respuesta a FXR activado. En referencia a la construcción que contenía el promotor del gen *ADH1C*, debido a que no se observaba ninguna inducción en su actividad luciferasa, se realizaron unas mutaciones puntuales en el elemento IR1 para convertirlo en la secuencia del IR1 del gen *ADH1A*. Se examinó nuevamente su actividad con un ensayo luciferasa en las mismas condiciones que los descritos anteriormente.

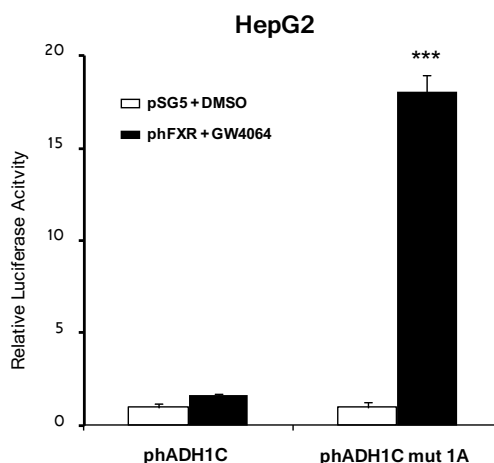


Fig. 112: Huh7 transfectadas con la construcción del promotor del gen *ADH1C*, y la construcción del mismo promotor con el elemento de respuesta a FXR mutado para conseguir la misma secuencia que el IR1 del phADH1A (phADH1C-mut-1A). Se realizó la cotransfección con un plásmido de expresión de FXR (pSG5-hFXR) o el vector vacío (pSG5) y, posteriormente las células fueron tratadas durante 24h con GW4064 1 $\mu$ M o DMSO. Media  $\pm$  SEM de dos experimentos en triplicado; \*\*\*P<0.001; estadística de valores con respecto al respectivo plásmido con pSG5-DMSO con *T-test de Student*.

La conversión del IR1 del promotor de *ADH1C* en el homólogo del promotor de *ADH1A* otorgaba respuesta al promotor de este gen frente al tratamiento con FXR activado.

### FXR se une a los elementos de respuesta localizados en los promotores de *ADH1A* y *ADH1B* pero no de *ADH1C*

Con el objetivo de analizar si FXR se unía directamente a estos elementos de respuesta localizados en los promotores de cada gen, se realizó un ensayo de retardación en gel (*EMSA*). Se marcó radioactivamente un *dúplex* de *primers* que contenían la secuencia del elemento de respuesta a FXR identificado previamente. Junto con estos *primers* se incubaron las proteínas de FXR y RXR transcritas y traducidas *in vitro* (*TNT*). Como control positivo del experimento se analizó la unión del complejo FXR-RXR al FXRE de uno de sus genes dianas ya descrito, *IBABP*.

## Resultados

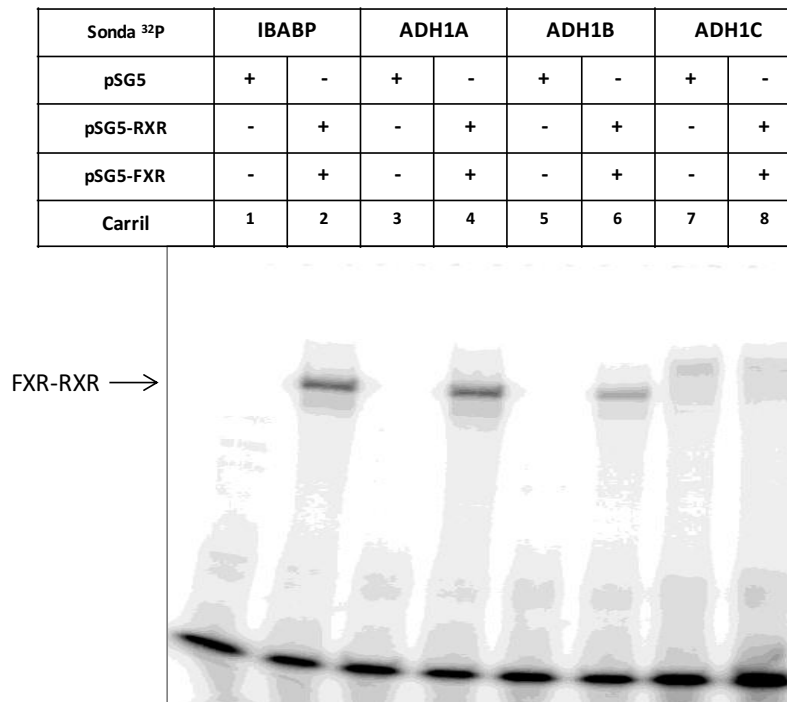


Fig. 113: EMSA realizado con extractos de lisados de proteínas transcritas y traducidas *in vitro* de pSG5, pSG5-hRXR, pSG5-hFXR junto con *primers* marcados radioactivamente, con <sup>32</sup>P, de los elementos de respuesta a FXR localizados en los promotores de los genes *ADH1A*, *ADH1B* y *ADH1C* y del elemento de respuesta de *IBABP*.

Como podemos apreciar en los carriles 2, 4 y 6 de la figura 113, aparece una banda de retardación que indicaba la unión del heterodímero FXR-RXR a las sondas indicadas. En cambio, no se observó una unión específica del heterodímero FXR/RXR a la sonda correspondiente al IR1 del gen *ADH1C*, confirmando así los resultados obtenidos en los estudios reporteros de los promotores de los genes.

### La regulación de los genes *ADH1* por FXR es especie-específica

En los ratones la enzima ADH1 codifica para un único gen (*Adh1*). Se realizó un estudio de la posible regulación por FXR de estos genes en este modelo *in vivo*. Para ello se inyectaron ratones intraperitonealmente con el ligando sintético de FXR (GW4064) o su vehículo (DMSO). Pasadas 8 horas los ratones fueron sacrificados y se recogió su hígado para obtener posteriormente muestras de RNA que fueron cuantificadas por PCR a tiempo real. Como control positivo se midieron los niveles de *Shp*.

## Resultados

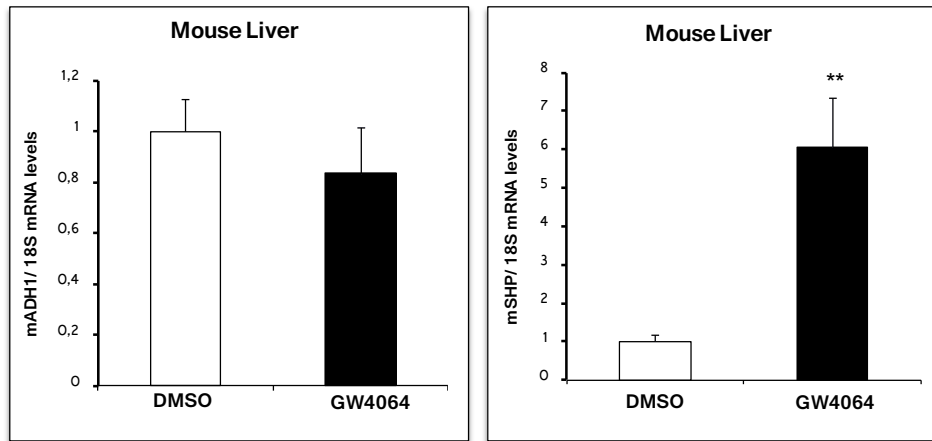


Fig. 114: Niveles hepáticos de ratones control inyectados con 50mg de GW4064/kg y sacrificados a las 8h. Número de ratones/condición=4. Media  $\pm$  SEM; \*\*P<0.01; estadística con *T-test de Student*.

La figura 114 muestra cómo los ratones tratados con el ligando GW4064 presentaban una inducción de la expresión génica de *Shp* que no se reproducía en el gen *Adh1*. Esto indicaba que la regulación que ejercía FXR sobre los genes humanos de ADH1 no se reproducía en ratones.



## **DISCUSIÓN**





## **GPLD1: fosfolipasa específica de glicosilfosfatidilinositol**

Las proteínas de la superficie celular pueden unirse covalentemente a la membrana mediante una estructura de glicolípidos denominada glicosilfosfatidilinositol. En mamíferos, la única proteína responsable de hidrolizar la unión entre GPI y la membrana plasmática es la enzima GPLD1, que se expresa principalmente en hígado y se excreta al suero (Low MG and Huang KS, 1991; Bergman AS and Carlsson SR, 1994; Deng JT et al, 1996). Actualmente se desconoce la razón fisiológica por la cual FXR puede regular esta fosfolipasa. Se ha descrito que la enzima GPLD1 excretada al suero es inactiva, aunque esto varía cuando la membrana celular está perturbada por detergentes (Low MG and Huang KS, 1991; Bergman AS and Carlsson SR, 1994).

Los resultados derivados del *microarray* realizado en Huh7 (Fig. 1) ponen de manifiesto cómo la expresión de *GPLD1* está inducida por el ligando específico y sintético de FXR, GW4064. Dicho resultado fue corroborado por PCR a tiempo real de estas células tratadas tanto con este ligando como con un ácido biliar, el CDCA (Fig. 5), y en un contexto más fisiológico utilizando hepatocitos primarios humanos (Fig. 6). Además, se observó que la deficiencia de FXR en Huh7 bloqueaba completamente la inducción derivada del tratamiento con GW4064 (Fig. 7). Sin embargo, la inducción de los niveles de *GPLD1* derivada del tratamiento con CDCA, si bien sufría una disminución muy marcada en ausencia de FXR, mantenía una ligera inducción con respecto al tratamiento con el vehículo DMSO. Esto podría deberse a que los ácidos biliares inducían la expresión de *GPLD1* a través de mecanismos que podían implicar o no a FXR. Por otro lado, se ha caracterizado el mecanismo de regulación de *GPLD1* por FXR al localizarse un elemento de respuesta funcional para este receptor nuclear (Fig. 8 y 9). Además, la unión de FXR a dicho elemento de respuesta se ha corroborado a través de un EMSA, demostrando la especificidad del heterodímero FXR-RXR por la secuencia identificada (Fig. 10). Por último se estudió la regulación de *Gpld1* en Hepa 1-6 y en un modelo *in vivo* (Fig. 13 y 14), observándose la inducción de este gen por ligandos de FXR en las células y en ratones control tratados con GW4064. Sin embargo, los ratones deficientes en FXR sometidos al tratamiento no muestran niveles inducidos de *Gpld1*.

Por otro lado, se ha descrito cómo *GPLD1* está implicado en el proceso de secreción de proteínas (Tsujioka H et al, 1998). En el proceso proteolítico se liberan DAG que pueden activar a la enzima PKC $\alpha$ , permitiendo su translocación desde el citoplasma al retículo endoplasmático (Tsujioka H et al, 1999). Diversos estudios han mostrado cómo la sobreexpresión de *GPLD1* en células incrementaba la producción de DAG (Merida I et al, 1990; Represa J et al, 1991), que activaban la translocación de la PKC $\alpha$  al retículo endoplasmático, donde varios estudios la involucran en la fosforilación de proteínas que regulan el transporte vesicular (De Matteis MA et al, 1993; Sheff D et al, 1996; Salama NR et al, 1997). Inicialmente se describió que *GPLD1* solo se expresaba en hígado y cerebro, pero tras el descubrimiento de su expresión dentro de los gránulos secretores de las células de los islotes  $\beta$  del páncreas (Bowen RF et al, 2001), se ha demostrado que tanto la glucosa como la insulina inducen su expresión génica. Estudios recientes sugieren que FXR tiene un papel importante en la mejora de la capacidad secretora de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas (Renga B et al, 2010; Düfer M et al, 2012). Esto se atribuye a que este receptor nuclear incrementa la fosforilación de Akt, lo que induce la translocación de GLUT2 a la membrana plasmática. El aumento de la expresión de este receptor en la membrana incrementa la absorción de glucosa en las células  $\beta$  pancreáticas y contribuye a la secreción de insulina (Renga B et al, 2010). Teniendo en cuenta el papel que desarrolla *GPLD1* en estas células, la

regulación de esta fosfolipasa por FXR podría ser el mecanismo por el cual este receptor nuclear contribuiría a la secreción de la insulina en islotes  $\beta$ -pancreáticos.

Por lo tanto, los resultados obtenidos caracterizan a *GPLD1* como un gen diana de FXR, si bien no se ha podido describir la significancia fisiológica de esta regulación. No obstante, las hipótesis planteadas en este apartado podrían explicar los mecanismos que implican a FXR en los procesos anteriormente descritos.

## **Metabolismo de los ácidos grasos**

FXR tiene un papel crucial en el metabolismo de los lípidos ya que altera la transcripción de genes involucrados en la síntesis, transporte y degradación de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol. Se ha descrito que este receptor es capaz de disminuir los niveles de TG y ácidos grasos en plasma a través de la represión de genes como los que codifican para las proteínas SREBP-1c (Watanabe M et al, 2004; Lefebvre P et al, 2009; Lambert et al, 2003) o FAS (Gosmain Y et al, 2005; Shen LL et al, 2010). A pesar del papel de FXR en el metabolismo lipídico, no hay una razón fisiológica establecida que justifique dicha relación.

Analizando los resultados del *microarray* de las células de hepatoma humano Huh7 se puede apreciar cómo el tratamiento con GW4064 disminuía la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos (Fig. 1). Se observó que genes relacionados con su obtención (*PLA2G1B*), activación (*SLC27A2*, *ACSM3* y *ACSL5*), transporte (*CRAT*, *CROT*, *CPT1A* y *SLC25A20*),  $\beta$  oxidación (*EHHADH*) y conversión a cuerpos cetónicos (*HMGCS2*) se reprimían por la acción del ligando de FXR.

En el caso del gen *PLA2G1B*, que codifica para una fosfolipasa que cataliza la hidrólisis de glicero-3-fosfolinas liberando ácidos grasos, se observó una gran represión de su expresión génica por GW4064 (Fig. 15). Se estudió en mayor profundidad el mecanismo de regulación planteándose la hipótesis de que SHP, un receptor nuclear atípico diana de FXR, podría mediar en la represión de *PLA2G1B*. Se ha descrito que FXR emplea este mecanismo para reprimir genes como *CYP7A1* (Goodwin B et al, 2000). Al disminuir la expresión de SHP en células Huh7, la represión de *PLA2G1B* por el tratamiento con GW4064 mantuvo la represión aunque de forma no significativa (Fig. 16). Esto podría interpretarse como que SHP no media en la represión de FXR, pero también es posible que la eficiencia de la disminución de los niveles de SHP al transfectar las células con el siRNA específico de este receptor nuclear no sea suficiente para eliminar la respuesta de represión.

Por otro lado, al analizar los genes relacionados con la activación de ácidos grasos en Huh7 (*SLC27A2* y *ACSM3*), se observó que los niveles de estos genes disminuían en un 40 y un 60% debido al tratamiento con los activadores de FXR (Fig. 17). Sin embargo, los niveles de *ACSL5* aumentaban por los tratamientos, contradiciendo el resultado obtenido en el *microarray* (Fig. 17).

En el caso de los genes que participan en la translocación de los ácidos grasos activados se descubrió que los genes *CRAT* y *CPT2* tenían disminuida su expresión génica por los tratamientos, aunque no significativamente. En el caso de los genes *CROT* y *CPT1A* su expresión está disminuida tanto por CDCA como por GW4064, pero el gen de la translocasa (*SLC25A20*) presenta un comportamiento variable al estar inducido por GW4064 y reprimido por CDCA (Fig. 18). Cabe destacar

que los niveles de *CPT1A* son marcadamente reprimidos por ambos ligandos de FXR (aproximadamente en un 70%) y, sin embargo, los niveles de *SLC25A20* y *CPT2* no llegan a tal represión (Fig. 18). Debido a que *CPT1A* es la enzima limitante en el proceso de traslocación de ácidos grasos, es posible que la represión de este gen afecte drásticamente al proceso de traslocación. Esta hipótesis coincidiría con los resultados obtenidos de las represiones de estos genes por los ligandos de FXR.

Para el gen *EHHADH*, implicado en la  $\beta$  oxidación de los ácidos grasos, su expresión génica se reduce por el tratamiento con CDCA (en un 30%) y con GW4064 (en un 50%) (Fig. 19). Dicho resultado es similar al obtenido para el gen que codifica la enzima clave de la cetogénesis, la *HMGCS2*, que presenta reducciones entre un 25 y un 40% para ambos ligandos de FXR (Fig. 20).

Por otro lado, el receptor nuclear  $PPAR\alpha$  es crucial para la regulación del metabolismo de los ácidos grasos, ya que muchos de los genes implicados en dicho metabolismo son diana de este receptor (Napal L et al, 2005; Rodríguez JC et al, 1994; Hsu MH et al, 2001). En la literatura existe controversia sobre los efectos que ejerce FXR sobre  $PPAR\alpha$  ya que mientras que unos autores defienden que FXR induce a  $PPAR\alpha$  (Pineda Torra I et al, 2003), otros afirman que los ácidos biliares antagonizan la actividad de  $PPAR\alpha$  (Sinal CJ et al, 2001). A pesar de que los resultados obtenidos en el *microarray* de células Huh7 y las PCR cuantitativas de  $PPAR\alpha$  (Fig. 21) y que algunos de sus genes diana (como *CPT1A*, *SLC25A20* y *HMGCS2*) mostraban una represión en sus niveles de, no se demostró el mecanismo por el cual se producía esta represión. El experimento con el sistema GAL4 (Fig. 23) no muestra ninguna competición entre el ligando sintético de  $PPAR\alpha$  (WY14643) y de FXR (GW4064), lo que podría explicar la represión observada en el *microarray* de estos genes (Fig. 1). La técnica de *GST-Pull down* tampoco esclarece que haya un impedimento en la unión de  $PPAR\alpha$  con uno de sus coactivadores,  $PGC1\alpha$ , por la presencia de un ácido biliar como CDCA (Fig. 24), argumento defendido por Sinal CJ et al. (2001). A pesar de la represión por ligandos de FXR de numerosos genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos en un contexto hepático, ningún estudio previo ha podido explicar el sentido fisiológico de esta posible regulación.

### **FABP3: transporte de ácidos grasos y cáncer**

La proteína FABP3 se expresa abundantemente en cardiomiocitos y también, en niveles más bajos, en células vasculares del músculo liso, hígado, mama, aorta, riñón, pulmón, estómago, placenta, ovario, testículo y cerebro (Pelsers MM et al, 2005). FABP3 está involucrada en el transporte de ácidos grasos, desde la membrana celular a la mitocondrial, para su posterior oxidación (Binas B et al, 1999). En los resultados obtenidos en los *microarrays*, la expresión de *FABP3* se inducía por GW4064 en Huh7, o por la sobreexpresión de FXR junto con el tratamiento con dicho ligando en los modelos celulares VSMC, HUVEC y HK-2 (Fig. 1, 3 y 4). Dichas inducciones fueron corroboradas por los resultados obtenidos en las PCR cuantitativas de estas líneas celulares (Fig. 25, 29 y 30). También se observó una inducción de los niveles de *FABP3* cuando se sobreexpresaba FXR parcialmente activado mediante un adenovirus en células Huh7 (Fig. 26). En un modelo más fisiológico, hepatocitos primarios humanos tratados con GW4064 y CDCA también se inducía *FABP3* por el tratamiento con estos ligandos (Fig. 27). En el hígado, la proteína de la familia de las FABPs expresada mayoritariamente no es FABP3 sino FABP1. Al analizar la expresión de ambos genes se confirmó que solo *FABP3* se inducía tanto en las células Huh7 como en hepatocitos primarios humanos (Fig. 25). Sin embargo, en el modelo intestinal

Caco-2 no se apreciaba ninguna inducción ni en el *microarray* ni en la PCR cuantitativa (Fig. 2 y 28). En dicho tejido existe otro miembro de la familia de las proteínas FABP que está altamente regulado por FXR, FABP6 (o IBABP) (Hwang ST et al, 2002). Dicha proteína se encarga de transportar ácidos biliares en el enterocito y su regulación por FXR se ha comprobado en nuestro modelo celular (Fig. 28).

Se ha propuesto al gen *FABP3* como un marcador de riesgo de infarto de miocardio (Kilcullen N et al, 2007; Viswanathan K et al, 2010). Con el objetivo de investigar si *FABP3* era regulado por FXR en un contexto cardiaco, se trataron células de ventrículo de corazón humano inmortalizadas (AC16) con los ligandos de FXR. En tales condiciones no se observó una inducción en la expresión de *FABP3* ni de *SHP* (Fig. 31), y los niveles de expresión de FXR eran muy bajos en comparación con las células Huh7. Todo esto podría indicar que FXR no se expresa suficientemente como para inducir ambos genes en este contexto celular.

En lo referente a la caracterización de la regulación de *FABP3* por FXR en un contexto hepático, los experimentos de pérdida de función de FXR en Huh7 demostraban el papel de este receptor nuclear en la regulación (Fig. 36). Además, se caracterizó el carácter transcripcional de la inducción de la expresión de *FABP3* por FXR mediante un ensayo con un inhibidor de la transcripción (Fig. 37). Seguidamente se identificó un elemento de respuesta, su tipología y su localización intrónica en el gen humano de *FABP3* (Fig. 38). Se ha descrito anteriormente la regulación de genes diana de FXR a través de elementos de respuesta situados en intrones, como el gen *Insig2* (Hubbert ML et al, 2007) o los genes *DDAH1* o  $\alpha$ A-cristalina (Hu T et al, 2006; Lee FY et al, 2005), cuyos elementos de respuesta se localizan en el segundo y primer intrón respectivamente. También se examinó la regulación de *Fabp3* en un modelo *in vivo* en el cual se compararon ratones control con ratones deficientes en FXR. Ambos fueron tratados con GW4064 pero solo los ratones control mostraron una inducción en los niveles de expresión de *Fabp3* en el hígado (Fig. 39). La razón fisiológica por la cual FXR regula a *FABP3* a nivel hepático puede deberse a que este gen podría transportar ácidos biliares de la misma manera que FABP6 lo hace en las células intestinales. Actualmente no hay ningún estudio que haya demostrado que FABP3 puede llevar a cabo esta función.

Por otro lado *FABP3*, también conocida como MDGI (*mammary-derived growth inhibitor*), es una proteína relacionada con la reducción proliferativa de células epiteliales mamarias (Kurtz et al, 1990) y está silenciada por hipermetilación en células humanas de cáncer de mama y en algunos tumores primarios (Huynh H et al, 1996). De esta forma se ha presentado a FABP3/MDGI como un supresor de tumores. Se ha trabajado con dos modelos de células mamarias humanas, las MDA-MB-231 y las MCF-7, donde la expresión de FXR y su actividad fueron descritas previamente (Swales KE et al, 2006), además de un estudio en el que muestran cómo FXR inhibe el crecimiento de las células MCF-7 (Giordano C et al, 2011). Debido a que las células con las que se trabajó, no mostraban expresión de FXR se procedió a la infección con el adenovirus que expresaba FXR (AdVP16FXR) observando que inducía significativamente la expresión génica de *FABP3* (Fig. 34). En dichas células FABP5 es el miembro de la familia de las FABP que se expresa mayoritariamente (Liu RZ et al, 2011) pero no se induce por los ligandos de FXR (Fig. 35). Esto muestra la especificidad en la inducción de *FABP3* por FXR activado en este contexto celular. Debido a que un estudio reciente ha mostrado como FABP3/MDGI es capaz de unirse a la subunidad  $\alpha$  de la integrina y modular así su actividad suprimiendo la invasión celular que puede derivar en metástasis (Nevo J et al, 2010), nuestro estudio ofrecería una explicación del mecanismo por el cual FXR podría estar implicado en estos procesos.

## **RBP4: transportador de retinol**

El gen *RBP4* codifica para la única proteína transportadora de retinol en la sangre (Chytil F and Ong DE, 1983). El complejo equimolar retinol-RBP se une a otra proteína presente en el suero para prevenir la pérdida del complejo a través de los glomérulos renales (Monaco HL et al, 1995).

En los resultados obtenidos en los estudios de *microarrays* realizados en células intestinales, de riñón, de músculo liso vascular y endoteliales, se descubrió que el gen de *RBP4* se inducía por los tratamientos con GW4064 o por la infección con AdVP16FXR+GW4064 (Fig. 2, 3 y 4). Este dato fue corroborado para las células hVSMC y HUVEC por PCR a tiempo real (Fig. 40). Puesto que el hígado es el principal órgano productor y exportador de RBP4, y debido a los resultados obtenidos en los *microarrays* de los otros modelos celulares, fue inesperado observar que en el *microarray* realizado en Huh7 no aparecía inducido este gen. Sin embargo, al analizar estas células tratadas con GW4064 y CDCA, se descubrió la inducción significativa de *RBP4* por el tratamiento con ambos ligandos de FXR (Fig. 41). La ganancia de función y sobreexpresión de FXR parcialmente activado inducían los niveles de RBP4, demostrando que la inducción por GW4064 o CDCA era una respuesta específica (Fig. 42). Dicho resultado se obtuvo también con los estudios realizados en los hepatocitos primarios humanos tratados con los mismos ligandos (Fig. 43).

Un estudio más detallado del mecanismo de regulación de *RBP4* por FXR en un contexto celular hepático mostró resultados ambiguos a las distintas aproximaciones utilizadas. Mientras que las células con la expresión mermada de FXR (mediante transfección de siFXR) mostraban una pérdida de la inducción observada por el tratamiento con ligandos en células transfectadas con el siRNA control (Fig. 44), el estudio *in silico* del promotor y el ensayo de luciferasa con la construcción subclonada no mostraban ningún elemento de respuesta parecido al *consensus* ni una inducción significativa en la actividad luciferasa (Fig. 45). Debido a esto se analizó si la regulación de *RBP4* por FXR podría no ser transcripcional, lo que fue confirmado por el ensayo con actinomicina D (Fig. 46). Esto indicaría que los ligandos de FXR, GW4064 y CDCA, podrían estabilizar el mRNA de *RBP4* impidiendo su degradación. Ante esto, un mecanismo post-transcripcional factible sería la represión por FXR activado de un miRNA que estuviese reprimiendo la expresión de RBP4. La identidad de este posible miRNA se desconoce por el momento.

En el caso de los estudios realizados en el modelo de ratón, las células de hígado de ratón AML12 y Hepa 1-6 mostraban una inducción de los niveles del mRNA de *Rbp4* (Fig. 47). Los ratones control, tratados con GW4064, presentaban una inducción de los niveles de mRNA de *Rbp4* que era bloqueada en los ratones deficientes en FXR (Fig. 48).

## **TCEA2: genotoxicidad derivada del exceso de ácidos biliares**

El factor de elongación TCEA2 está involucrado en los mecanismos de reparación al DNA acoplados con la transcripción. Dicho factor participa en la reparación de las lesiones oxidativas ocasionadas en el DNA para permitir la entrada de otros elementos del complejo de factores que reparan el DNA (Jeon C et al, 1994). Este factor de elongación también permite que la RNAPII sobrepase lesiones del DNA y continúe con la transcripción (Charlet-Berguerand N et al, 2006; Kuraoka

I et al, 2007), evitando así su estancamiento y la posible muerte celular derivada de éste. La exposición prolongada a niveles altos de ácidos biliares en el hígado está relacionada con la generación de estrés oxidativo y con el daño producido al DNA. Se ha demostrado que la producción de ROS inducida por ácidos biliares aumenta considerablemente en ratones deficientes en FXR y, por tanto, dicha ausencia está directamente ligada con el daño oxidativo generado al DNA (Nomoto M et al, 2009). Por todo esto se planteó la hipótesis de que FXR regulaba genes implicados en mecanismos protectores frente a la toxicidad causada por el exceso de ácidos biliares.

Los resultados obtenidos en los *microarrays* realizados en los diferentes modelos celulares mostraban que *TCEA2* estaba inducido en todos ellos (Fig. 1, 2, 3 y 4). Estos resultados fueron corroborados en todos los modelos celulares mostrando inducciones muy significativas de los niveles de mRNA de *TCEA2* ocasionadas por los tratamientos con los ligandos de FXR. Además, también se verificó su inducción en otro modelo de hepatoma humano, HepG2 (Fig. 49), en células de cáncer de mama, MDA-MB-231 (Fig. 51), y en hepatocitos primarios humanos, donde la inducción de su expresión superaba las 30 veces frente al tratamiento con el vehículo (Fig. 52).

Profundizando en el mecanismo de la regulación de *TCEA2* por FXR, los experimentos de pérdida de función de este receptor nuclear confirmaron su importancia en dicha regulación (Fig. 50 y 53). Además, el experimento con el inhibidor de la transcripción, la actinomicina D, demostraba que la regulación se producía a nivel transcripcional (Fig. 54). Se localizó, mediante un análisis *in silico*, el elemento responsable de la regulación en el segundo intrón del gen humano de *TCEA2*. Esta localización intrónica del FXRE no era inesperada, ya que se había descrito la regulación por FXR de otros genes como *Insig2* (Hubbert ML et al, 2007) o los genes *DDAH1* o *αA-cristalina* (Hu T et al, 2006; Lee FY et al, 2005), cuyos elementos de respuesta también se sitúan zonas intrónicas. La funcionalidad de dicho elemento de respuesta se confirmó con ensayos reportero en los que la actividad luciferasa aumentaba con el número de copias del IR1 presentes en la construcción. No obstante, al mutar las construcciones se perdía cualquier inducción en la actividad luciferasa (Fig. 55). Con el objetivo de confirmar que FXR se unía al elemento de respuesta intrónico, se realizó un ensayo EMSA que confirmó la unión del heterodímero FXR-RXR al elemento de respuesta y su especificidad (Fig. 56). Para completar el estudio se realizó una inmunoprecipitación de la cromatina de células Huh7, ratificando que FXR se unía al elemento de respuesta del mismo modo que se unía al elemento de otro de sus genes diana, SHP (Fig. 57).

Los experimentos realizados en Huh7 tratadas con CDCA a concentraciones elevadas mostraron la citotoxicidad producida por el exceso de ácidos biliares. Este resultado coincidía con lo observado en estudios previos (Bernstein H et al, 1999; Dvorak K et al, 2007; Rosignoli P et al 2008). Los ensayos de MTT corroboraron cuantitativamente que la viabilidad celular medida en muestras tratadas con un exceso de CDCA y GW4064 era superior a las células tratadas con CDCA (Fig. 58 y 59). Esto indicaba que el GW4064 protegía a las células frente al exceso del ácido biliar CDCA. Debido a la especificidad del GW4064 por FXR, dicho comportamiento celular revelaba que este receptor nuclear podría activar mecanismos para la protección frente a la genotoxicidad ocasionada por el exceso de ácidos biliares en un contexto hepático. Aún así, no queda demostrado que esta protección frente a los efectos citotóxicos de los ácidos biliares se deba a la inducción de *TCEA2* ya que la inducción por GW4064 de transportadores de ácidos biliares que los mueven hacia el exterior de la célula podría bastar para disminuir la citotoxicidad. Cuando se silenció la expresión de *TCEA2* mediante un siRNA específico las

células moría, lo que impidió comprobar el grado de participación de TCEA2 en la protección por GW4064.

La utilización de un modelo *in vivo* permitió analizar el comportamiento de ratones tratados con GW4064 en un contexto hepático. Los ratones control mostraron una inducción de los niveles de *Tcea2* por la administración del GW4064. Sin embargo, los ratones deficientes en FXR no mostraban ninguna variación en los niveles de este gen derivada del tratamiento con el ligando sintético de FXR (Fig. 60). A diferencia de los modelos humano, la respuesta de *Tcea2* era mucho menor, lo que cuestiona la posible utilización del modelo murino para profundizar en los estudios funcionales del eje ácidos biliares-FXR-TCEA2.

El conjunto de experimentos realizados caracterizan la regulación de TCEA2 por FXR. Debido a que un exceso de ácidos biliares produce la inducción de ROS y daños en el DNA, una disminución en los niveles de estas moléculas mitigaría sus efectos dañinos en las células (Yang F et al, 2007). FXR colabora en este proceso, ya que mediante la regulación de algunos de sus genes diana transporta ácidos biliares al exterior del hepatocito, impide su entrada y regula su biosíntesis a partir de colesterol. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos, TCEA2 es un nuevo gen diana de FXR que podría mediar en la reparación de los daños genotóxicos causados por un exceso de ácidos biliares en las células. Así, se propone una nueva función de FXR en la reparación celular a través de la inducción de los niveles de TCEA2.

## **NDRG2: supresor tumoral**

Se ha observado que *NDRG2* es un gen reprimido en muchos tipos de tejidos cancerígenos (Deng et al, 2003; Hu et al, 2004; Lorentzen et al, 2007; Liu et al, 2007), y recientemente se ha demostrado que su expresión es capaz de inhibir la metástasis en los carcinomas celulares hepáticos (Lee DC et al, 2008; Zheng J et al, 2011). Por otro lado, se ha demostrado que la activación de FXR con GW4064 inhibe el crecimiento celular en varios tipos de tumores (Yao L et al, 2008), como por ejemplo en el hepatocarcinoma humano (Ohno T et al, 2012). A causa de la inducción de la expresión de *NDRG2* a nivel de mRNA (Fig. 1 y 61) y proteína (Fig. 62), debida a los tratamientos en células de hepatoma humano Huh7 y HepG2 con ligandos de FXR, se planteó la hipótesis de que *NDGR2* podría estar inducido por FXR impidiendo la progresión tumoral en hígado. El resultado obtenido en los hepatocitos primarios humanos confirmaba la importancia fisiológica de esta inducción (Fig. 63). Tras comprobar que esta regulación era dependiente de la expresión de FXR (Fig. 64), se localizó un elemento de respuesta a este receptor nuclear cuya secuencia estaba conservada en otras especies (Fig. 65). Esta regulación fue demostrada mediante los ensayos de transfección transitoria de construcciones que contenían un elemento de respuesta a FXR localizado en el primer intrón del gen *NdrG2* (Fig. 66 y 67).

Los ratones deficientes en FXR muestran elevados niveles de ácidos biliares en suero y en hígado (Sinal CJ et al, 2000), y una alta incidencia de tumores hepáticos (Kim I et al 2007; Yang F et al, 2007). Debido a que el exceso de ácidos biliares produce efectos perjudiciales, como la inducción de especies reactivas de oxígeno, la señales inflamatorias o el daño a DNA, han sido propuestos como agentes carcinogénicos (Berstein H et al, 2009). Por tanto, se considera que la exposición crónica a una elevada cantidad de ácidos biliares es la causa para el desarrollo de HCC en ratones deficientes en FXR.

Además, se ha demostrado que la disminución de ácidos biliares, mediante la administración a estos ratones de una resina secuestrante de los mismos (2% colestiramina), reducía significativamente la malignidad de las lesiones tumorales (Yang F et al, 2007). Por otro lado, estudios posteriores abogan por la participación FXR como supresor de tumores, indicando que los ratones deficientes en este receptor nuclear desarrollan tumores no solo por el exceso de ácidos biliares, sino también por la falta en sí de FXR (Wang YD et al, 2008). De acuerdo con esta última hipótesis, se ha demostrado que la activación de FXR suprime la tumorigénesis intestinal, mientras que la pérdida de FXR incrementa la susceptibilidad a tumorigénesis (Modica S et al, 2008).

NDRG2 también está implicado en procesos de diferenciación y regeneración hepática (Hu XL et al, 2006; Yang J et al, 2010). Puede que en ambos procesos NDRG2 proteja al hígado de entrar en un ciclo de daño-reparación que promovería un crecimiento descontrolado de las células, estimulando la producción de factores de inflamación que podrían derivar en tumores. Sin embargo, ningún estudio hasta ahora ha descrito esta función de NDRG2 ni ha relacionada a FXR con ella.

El conjunto de resultados mostrados en este apartado constituyen el primer estudio realizado en el que se demuestra que la activación de FXR induce la expresión del supresor de tumores NDRG2. Estos datos pueden esclarecer los mecanismos que utiliza este receptor nuclear en la protección contra la hepatocarcinogénesis y la regeneración hepática.

### **TM4SF4: regeneración hepática y litiasis**

TM4SF4 es una proteína de membrana glicosilada expresada principalmente en células del epitelio intestinal y del hígado (Wice BM y Gordon JI, 1995). Su función no está bien definida, aunque se cree que tiene un papel importante en la inhibición de la proliferación celular, en el crecimiento pancreático (Anderson KR et al, 2011) y en la finalización de la regeneración hepática (Liu Z et al, 2001). Anteriormente a este estudio se había descrito la implicación de FXR en procesos cancerígenos, inflamatorios y regenerativos en distintos tejidos (Gadaleta RM et al, 2010). Por otro lado, se ha desarrollado un estudio genético en humanos que identificó a los transportadores hepáticos de colesterol *ABCG5/8* y a *TM4SF4* como locus en el desarrollo de la enfermedad de cálculos en la vesícula biliar (litiasis), con una contribución estimada de un 7.5% (Schafmayer C et al, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con activadores de FXR previene la litiasis en ratones (Moschetta A et al, 2004) y que mutaciones en el gen de FXR predisponen para el desarrollo de litiasis en humanos y ratones (Kovacs P et al, 2008). Todos estos estudios respaldan a TM4SF4 como un candidato que media en regulación por FXR de todos estos procesos.

En los resultados presentados se puede observar cómo la expresión de *TM4SF4* se inducía por los ligandos de FXR, GW4064 y CDCA, en un contexto hepático humano (Fig. 1, 69, 70 y 71). Debido a que es una proteína expresada también en intestino, se analizaron sus niveles de mRNA y proteína en modelos intestinales observando una inducción por los tratamientos (Fig. 73 y 74). Los experimentos de pérdida de función de FXR demostraron que dicho receptor nuclear era indispensable para la inducción de *TM4SF4* (Fig. 75). Un estudio *in silico* del promotor de *TM4SF4* identificó un IR1 en el promotor proximal de dicho gen corroborándose su actividad por ensayos reportero (Fig. 76 y 77). Mediante la realización de un ensayo EMSA se pudo observar que el heterodímero FXR-RXR se unía al



IR1 de una forma específica (Fig. 78). La inmunoprecipitación de la cromatina de células Huh7 permitió observar la unión en un contexto más fisiológico (Fig. 79). Por otro lado también se comprobó la inducción de los niveles de *Tm4sf4* por FXR activado en un modelo celular murino (Fig. 80) y en un contexto *in vivo* (Fig. 81 y 82). Para este último se utilizaron ratones control y deficientes en FXR inyectados con GW4064. Los niveles del mRNA de *Tm4sf4* en hígado se inducían por el tratamiento en ratones control pero no en ratones deficientes de FXR; sin embargo, en un contexto intestinal, no se observó ninguna inducción, lo que contrasta con los resultados obtenidos en los modelos intestinales humanos.

El conjunto de resultados resumidos en este apartado ponen de manifiesto la caracterización de *TM4SF4* como nuevo gen diana de FXR. La funcionalidad de esta regulación podría estar ligada con la regulación del crecimiento celular en un contexto hepático e intestinal, o con la enfermedad de litiasis, donde los mecanismos que están involucrados en su desarrollo y curación se desconocen todavía.

### **CICLO DE LA UREA: catabolismo de los aminoácidos**

El ciclo de la urea es la vía metabólica usada para la descomposición de compuestos nitrogenados, principalmente aminoácidos. Tiene lugar en el hígado y el producto final de desecho, la urea, se excreta por los riñones. Cuando hay un fallo hepático, la homeostasis del amoniaco se altera profundamente dando lugar a hiperamonemia (White LP et al, 1955), encefalopatía hepática (Ong JP et al, 2003) e incluso cirrosis hepática (Rudman D et al, 1973; Kaiser S et al, 1988).

El experimento de *microarray* realizado en Huh7 ponía de manifiesto cómo todos genes que codifican enzimas del ciclo de la urea (CPS1, OTC, ASS1, ASL, ARG1) estaban reprimidos por el tratamiento con GW4064 (Fig. 1). Incluso, uno de los reguladores de la actividad de CPS1, SIRT5, también aparecía reprimido en el *microarray* aunque esto no fue confirmado PCR a tiempo real (Fig. 83). A pesar de que no se ha descrito la regulación de SIRT5 por FXR, existe una acetilación de FXR por otro miembro de la familia de las sirtuinas, SIRT1 (Kemper JK et al, 2009). Un estudio posterior demostró que FXR inducía los niveles de SIRT1 hepáticos a través de SHP mediante la inhibición de un miRNA (Lee J et al, 2010). Debido a este complejo mecanismo es posible que, si FXR es capaz de regular SIRT5, se deban llevar a cabo otras aproximaciones técnicas que puedan demostrarlo.

CPS1 es la enzima limitante del ciclo de la urea (Martínez AI et al, 2010). El mecanismo de represión génica más utilizado por FXR es la inducción del receptor nuclear atípico SHP. La transfección de un siRNA específico de SHP en células Huh7 mostró la pérdida de significancia en la represión de *CPS1* por el ligando sintético de FXR usado (Fig. 84). Debido a que los niveles de *CPS1* continuaban estando reprimidos, solo se pudo atribuir una implicación parcial de SHP a la desrepresión incompleta de *CPS1*. Por el momento se desconoce la razón fisiológica por la cual FXR reduce los niveles de muchos de los genes del ciclo de la urea.

## **HP/HPR: implicación en el proceso inflamatorio**

La haptoglobina es una proteína producida principalmente en el hígado que circula en el plasma sanguíneo unida a la hemoglobina libre procedente de una hemólisis fisiológica o patológica (Levy AP et al, 2010). La HP se une con gran afinidad a la Hb libre evitando así su actividad oxidativa y previniendo la pérdida de hierro a través de los riñones (Hwang PK and Gree J, 1980). La HPR es una proteína sérica con más de un 90% de homología con la haptoglobina. Ambas son proteínas de fase aguda de inflamación (Raynes JG et al, 1991; Nielsen MJ et al, 2009). FXR también está relacionado con el proceso inflamatorio. Se ha descrito que en ratones en los cuales se induce inflamación, mediante el tratamiento con lipopolisacáridos, se observa una disminución en los niveles hepáticos del mRNA de FXR (Kim MS et al, 2003). Por otro lado, TNF $\alpha$  y la interleuquina 1 disminuyen los niveles de FXR en células de hepatoma humano Hep3B (Kim MS et al, 2003). Por tanto, FXR modula negativamente la inflamación hepática promovida por el factor NF- $\kappa$ B, pero éste a su vez es capaz de suprimir la expresión génica mediada por FXR, existiendo entre estos dos factores un *crosstalk* negativo (Wang YD et al, 2008). Este mecanismo se ha caracterizado recientemente en el tejido intestinal demostrando una interacción *in vitro* entre las subunidades de NF- $\kappa$ B, p50 y p65, con FXR (Gadaleta RM et al, 2011).

Tras observar los resultados obtenidos en el *microarray* de Huh7 se descubrió que los genes *HP* y *HPR* se encontraban entre los más reprimidos por GW4064 (Fig. 1). Los niveles génicos de la citoquina TNFSF10, que al unirse a su receptor activa genes implicados en la inflamación y activación de NF- $\kappa$ B, también estaban reprimidos en este experimento. Además, en el *microarray* de las células HK-2 las interleuquinas 6 y 8, así como el receptor de la IL6, aparecen entre los genes más reprimidos (Fig. 3). El mismo resultado se obtuvo para el gen de la *IL6* en los *microarray* de las células HUVEC y VSMC (Fig. 4). Esto respalda la implicación de FXR en la regulación del proceso inflamatorio.

Se comprobó la represión de *HP* y *HPR* por PCR cuantitativa de células Huh7 tratadas con los diferentes ligandos de FXR, CDCA y GW4064 (Fig. 85). El estudio en hepatocitos primarios reveló que los niveles del mRNA de *HP* eran reprimidos por el tratamiento con GW4064, pero no significativamente por CDCA (Fig. 86). Con el objetivo de profundizar en el mecanismo de regulación que ejercía FXR sobre *HP*, se analizaron sus niveles en ausencia de FXR en células Huh7, donde la represión observada en células transfectadas con siRNA control es igual a la observada en las transfectadas con siFXR (Fig. 87). Esto puede deberse a que, aunque la transfección con siRNA disminuía en un 90% los niveles del mRNA de FXR, la cantidad existente del receptor nuclear era suficiente para ejercer la represión, un efecto que ya se ha reportado para otros genes reprimidos por FXR como PCSK9 (Langhi C et al, 2008). La infección de Huh7 con el adenovirus que sobreexpresaba FXR reprimía los niveles génicos de *HP* y, junto con los ensayos de silenciamiento, confirmaban la especificidad de FXR en la represión de este gen (Fig. 88).

Por otra parte, se realizó un experimento tratando células HepG2 con el reactivo cicloheximida, inhibidor de la síntesis proteica. El resultado indicaba la necesidad de la síntesis de una proteína intermedia en la represión que ejercía FXR sobre el gen *HP* (Fig. 89). En células Huh7 transfectadas con siRNA control o siSHP, la represión de este gen por el tratamiento con GW4064 pierde la significancia pero no la tendencia en la represión (Fig. 90). Esto puede deberse a que la disminución de los niveles de SHP con el siRNA específico no era suficiente para eliminar la represión que ejercía FXR o que SHP no mediaba en dicha represión.

El conjunto de resultados obtenidos demuestran que la represión de la haptoglobina por FXR requiere la síntesis de una proteína intermedia. Además, se ha demostrado que SHP no interviene en dicho proceso de síntesis.

## **Ubiquitinas**

La principal vía de degradación de proteínas es la ubiquitinación (Glickman MH and Ciechanover A, 2002). Este proceso también es una modificación post-traducciona que aumenta la especificidad de la unión entre proteínas (Welchman RL et al, 2005), la activación de quinasas o procesos de reparación del DNA (Chen ZJ and Sun LJ, 2009). La relación entre los ácidos biliares y el proceso de ubiquitinación ha sido recientemente estudiada. Se ha descubierto que ciertos transportadores relacionados con el metabolismo de los ácidos biliares, como NTCP o BSEP, son ubiquitinizados (Kuhlkamp T et al, 2005; Hayashi H and Sugiyama Y, 2009). También se ha descubierto cómo la ubiquitinación puede influir en la estabilidad y en la actividad de genes como SHP (Miao J et al, 2009). De esta forma, FXR podría controlar la actividad de proteínas induciendo la expresión de genes que las ubiquitinicen.

En los resultados derivados del *microarray* en Huh7 se observaba cómo diversos tipos de ubiquitinas aparecían inducidas por el tratamiento con GW4064 (Fig. 1). Algunos ejemplos eran los genes que codificaban para la proteína UBD (tipo ubiquitina) y las enzimas UBE2L6 (conjugasa E2), NEDD4L y FBXO2 (ambas ligasas E3). Al analizar estos genes por PCR cuantitativa se observaron inducciones significativas en los mRNAs de todas estas enzimas para los tratamientos de las células Huh7 con los activadores de FXR, destacando las marcadas inducciones de *UBE2L6* y *NEDD4L* (Fig. 91).

Existen numerosos trabajos en la bibliografía que relacionan la ubiquitinación con el sistema inmunitario. La ISG15 es una proteína similar a la ubiquitina que responde al estímulo de IFN- $\alpha$  y  $\beta$ , factores que juegan un papel esencial en la inmunidad innata a patógenos como virus o bacterias, así como a células cancerosas. Se ha descrito que ISG15 se une específicamente a UBE2L6 (Zhao C et al, 2004). La regulación de UBE2L6 por FXR podría relacionar a este receptor nuclear con los procesos de respuesta inmune. Para caracterizar esta regulación se trataron células de hepatoma humano, Huh7 y HepG2, con los ligandos de FXR, GW4064 y CDCA, observándose una marcada inducción de los niveles de *UBE2L6* (Fig. 99). Sin embargo, en hepatocitos primarios humanos, la inducción solo se mantenía con el tratamiento con GW4064 (Fig. 100). Se llevaron a cabo experimentos de ganancia y pérdida de función de FXR, mostrando *UBE2L6* en ambos casos un comportamiento similar a cualquier gen diana de FXR (Fig. 101 y 102). El tratamiento de las Huh7 con un inhibidor de la transcripción mostraba que la regulación se producía de forma transcripcional (Fig. 103). La identificación bioinformática de dos elementos de respuesta a FXR y la demostración de su interacción con el heterodímero FXR-RXR mediante EMSA, confirmaron la regulación de *UBE2L6* por este receptor (Fig. 104).

La enzima NEDD4L fue identificada como una ubiquitin ligasa que controla la expresión de canales de sodio en la superficie celular, mediando en su endocitosis y degradación en lisosomas (Russo CJ et al, 2005). Por otro lado, los ácidos biliares tienen una relación muy estrecha con el gradiente de sodio, ya que la fuerza impulsora para la formación de bilis en hepatocitos proviene del gradiente del catión creado por la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, al cual está acoplado el transporte de sales biliares. En el *microarray* realizado en células renales (HK-2) esta ubiquitin ligasa aparecía inducida por la sobre expresión con

FXR combinada con el tratamiento con GW4064 (Fig. 3). Esto indicaba que FXR podría regular a NEDD4L en un contexto renal. Se ha demostrado que mutaciones de NEDD4L se asocian con la hipertensión (Dahlberg J et al, 2007). En el *microarray* realizado en VSMC se observó cómo los niveles de *NEDD4L* eran inducidos por la sobre expresión con FXR conjuntamente con el tratamiento con GW4064 (Fig. 4). Los resultados obtenidos en los distintos *microarrays* fueron confirmados por PCRs cuantitativas con los distintos modelos celulares (Fig. 92 y 93). El experimento en hepatocitos primarios humanos confirmó la inducción de *NEDD4L* por ligandos de FXR (Fig. 94). La caracterización del mecanismo por el que FXR era capaz de regular *NEDD4L* se llevó a cabo mediante experimentos de pérdida y ganancia de función de FXR en los cuales quedó patente la importancia de FXR en la inducción observada de los niveles de *NEDD4L* (Fig. 95 y 96). El estudio con actinomicina D demostró que esta regulación era de tipo transcripcional (Fig. 97) y los estudios con ratones mostraron la conservación de dicha regulación (Fig. 98). Estos resultados indicaban un nuevo mecanismo a través del cual FXR podría regular la homeostasis del Na<sup>+</sup> e influir en procesos fisiológicos tan importantes como la excreción de la bilis desde los hepatocitos o la hipertensión.

Se había descrito la regulación que ejercía Nedd4l sobre los miembros de la familia Smad, Smad2 y 3, ya que provoca su degradación cuando éstos están activados por el factor de crecimiento TGFβ, produciendo así la inhibición en la señalización de este factor (Gao S et al, 2009). Un estudio reciente muestra una unión de la proteína Smad7 con Nedd4L con el objetivo de reclutarlo para la degradación del receptor de TGFβ, como otro mecanismo de inhibición de la señalización de este factor (Aragón E et al, 2012). Dado este papel de NEDD4L como inhibidor de la señalización de TGFβ, la inducción de esta ubiquitín ligasa por agonistas de FXR podría adquirir una relevancia especial en el mecanismo que explique los efectos antifibróticos descritos para FXR (Fiorucci S et al, 2005; Li J et al, 2011).

### **ADH1: metabolismo del etanol**

En humanos la enzima ADH1 es la encargada de catalizar la oxidación de etanol a acetaldehído en el hígado. Dicha enzima se codifica por tres genes (*ADH1A*, *B* y *C*) cuya combinación como homo- o heterodímeros permite formar la enzima funcional que metaboliza alcoholes. Se ha demostrado que las diferentes genes de ADH1 participan en el metabolismo de los ácidos biliares, oxidando alcoholes biliares (Okuda A and Okuda K, 1983) o transformándolos para favorecer su excreción desde el hepatocito a la bilis (McEvily AJ et al, 1988). Analizando los resultados obtenidos en el *microarray* de las células Huh7 (Fig. 1), se descubrió que los tres genes que codifican para la enzima ADH1 eran inducidos por GW4064. Estos datos se corroboraron por PCR cuantitativas que mostraron inducciones de los tres genes en células HepG2 y Huh7 tratadas con los ligandos de FXR, CDCA y GW4064 (Fig. 105). Debido a esto, FXR controlaría los genes que codifican para la enzima ADH1, induciendo su expresión para regular la metabolización de intermediarios de la biosíntesis de ácidos biliares, como los alcoholes biliares.

El análisis de la expresión hepática demostró la inducción de los niveles proteicos de ADH1 en Huh7 (Fig. 106). Al tratar hepatocitos primarios humanos con los ligandos de FXR mencionados solo los genes *ADH1A* y *ADH1B* eran inducidos por los tratamientos (Fig. 107). La inducción observada por el tratamiento con CDCA y GW4064 en los niveles de ambos genes, se bloqueaba en ausencia de FXR (Fig.

108). Esto indicaba la importancia de la expresión de FXR en estas regulaciones. Los genes *ADH1A*, *ADH1B* y *ADH1C* están organizados en un *cluster* de genes dispuestos en el cromosoma humano. Un estudio *in silico* de los promotores de estos genes identificó sendos elementos de respuesta a FXR (Fig. 109). Los ensayos reportero de construcciones que los contenían en presencia de FXR activado denotaron un aumento en la actividad luciferasa de los promotores de *ADH1A* y *ADH1B*, pero no de *ADH1C* (Fig. 110 y 111). Debido a que la secuencia del IR1 del gen *ADH1C* está menos conservada respecto al consenso, se realizaron mutaciones en este elemento de respuesta que lo convertían en su homólogo del gen *ADH1A*, induciendo así la actividad luciferasa del promotor de *ADH1C* (Fig. 112). Como se preveía, la unión de FXR-RXR a los elementos de respuesta localizados fue confirmada por ensayos EMSA para los IR1 de *ADH1A* y *ADH1B*, pero no para *ADH1C* (Fig. 113).

El gen *Adh1* se encuentra en ratones en una sola copia. Al examinar los niveles de este gen en el hígado de los mismos tratados con GW4064 no se observó ninguna inducción por el efecto del ligando de FXR (Fig. 114). Este comportamiento especie-específico no es anómalo en los genes diana de FXR, ya que algunos de los genes descritos solo son regulados por FXR en humanos. Algunos ejemplos son la lipasa hepática (Sirvent A et al, 2004), fibrinógeno (Anisfeld AM et al, 2005),  $\alpha$ -cristalina (Lee FY et al, 2005), o sindecan-1 (Anisfeld AM et al, 2003).

Otra enzima importante en la metabolización del alcohol es CYP2E1 (cytochrome P450 2E1). Esta enzima se expresa principalmente en los microsomas de las células hepáticas (Neve EP and Ingelman-Sundberg M, 2000). Un estudio reciente ha mostrado que dicha enzima se correlaciona con un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y de peroxidación de lípidos (Bell NL et al, 2010). Debido a esto, es posible que frente a un exceso hepático de etanol, la inducción en la expresión de *ADH1* por FXR evitaría que CYP2E1 se activara en exceso y por tanto la producción de ROS.

Por otro lado, se ha demostrado que *ADH1* es capaz de metabolizar el retinol (Boleda MD et al, 1993; Martras S et al, 2004). De esta forma, cuando las concentraciones hepáticas de retinol sean excesivas y puedan causar toxicidad, FXR induciría la expresión de *ADH1* para convertir el retinol en retinaldehído. Este a su vez podría seguir oxidándose, por la acción de otras enzimas, a ácido retinoico, que actúa como ligando de receptores nucleares como RAR o RXR (en el caso de ácido 9-cis-retinoico).

## **Discusión general**

El conjunto de genes estudiados en esta tesis ha dado como resultado la identificación de nuevos genes diana de FXR. Muchos de estos genes relacionan a este receptor con funciones no descritas previamente, como el transporte de retinol (RBP4), la liberación de proteínas ancladas por GPI (GLPD1) o la oxidación del etanol (ADH1), evidenciando la utilidad de los *microarrays* como técnica para la revelación de nuevas funciones.

En concordancia con la relación descrita de FXR con la protección frente a procesos cancerígenos (Yao L et al, 2008; Ohno T et al, 2012) o toxicidad (Nomoto M et al, 2009), nuestros resultados soportan la idea de un papel activo de FXR en estos procesos. Así, induciendo la expresión de supresores de tumores como FABP3 o NDRG2, FXR puede proteger al hígado o al tejido mamario frente al cáncer. Por otra parte, la toxicidad causada por un exceso de ácidos biliares puede dañar al DNA (Rosignoli P et al 2008). FXR induce la expresión de un factor de reparación de estos daños (TCEA2). Por otro lado, un exceso de etanol o retinol puede derivar en una mayor producción de especies oxidativas de oxígeno. La inducción por FXR de los genes que constituyen la enzima que metaboliza ambos alcoholes en humanos (ADH1) podría evitar la producción de ROS que sin duda causa daños citotóxicos (Edenberg HJ, 2000; Martras S et al, 2004). Por tanto, la regulación de estos genes sugiere una función de FXR común: la protección de las células frente a diversos estímulos nocivos.

El descubrimiento de nuevos genes diana ha relacionado a FXR con procesos no solo hepáticos, como la litiasis (TM4SF4) o la regeneración hepática (TM4SF4 y NDRG2), sino también multiorgánicos como la respuesta inmune (UBE2L6), la inhibición de la fibrosis (NEDD4L) o la inflamación (HP/HPR). Además, la investigación llevada a cabo también subraya la intervención de FXR en procesos como el metabolismo de los ácidos grasos, el ciclo de la urea o el transporte vesicular (GPLD1).

## **CONCLUSIONES**





De los resultados de la presente tesis doctoral se han extraído las siguientes conclusiones:

1. - El tratamiento de células de hepatoma humano con un ácido biliar primario (CDCA) o con un agonista sintético de FXR (GW4064) reprime la expresión de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos, incluyendo la activación, translocación,  $\beta$ -oxidación y conversión a cuerpos cetónicos, así como genes pertenecientes al ciclo de la urea.
2. - La represión que ejerce FXR sobre el gen de la haptoglobina, que codifica para una proteína de fase aguda de inflamación, se realiza mediante un mecanismo indirecto que requiere la síntesis de un intermediario distinto a SHP.
3. - La activación de FXR en células hepáticas humanas induce la expresión de la fosfolipasa GPLD1 que hidroliza el anclaje de proteínas unidas por glicosilfosfatidilinositol a membranas. La regulación se produce a través de un elemento de respuesta en el promotor del gen de esta fosfolipasa. El tratamiento con GW4064 induce *in vivo* la expresión de *Gpld1* en el hígado de ratones control pero no en el de ratones deficientes en FXR.
4. - La expresión génica de *RBP4*, el transportador sanguíneo de retinol, se induce por FXR activado en células hepáticas y vasculares humanas mediante mecanismos post-transcripcionales. La inducción de la expresión de *Rbp4* por FXR activado también se observa en ratones.
5. - ADH1A y ADH1B son enzimas responsables de la metabolización del etanol en hepatocitos humanos. Los ligandos de FXR inducen la expresión génica de de ambas y la regulación es especie-específica.
6. - La activación de FXR induce la expresión de *NDRG2* y *TM4SF4*, proteínas implicadas en la supresión de la proliferación celular y en la etapa de finalización de la regeneración hepática. Tanto en humanos como en ratones, FXR regula directamente a los respectivos genes mediante elementos intrónicos (*NDRG2*) o localizados en la región proximal del promotor (*TM4SF4*).
7. - El gen *FABP3/MDGI* es una diana directa de FXR. La activación de FXR induce fuertemente y de manera específica la expresión de este gen en células hepáticas, vasculares, renales y en líneas de cáncer mamario, en las que se ha descrito como supresor de la invasión y la migración celular.
8. - FXR regula transcripcionalmente los genes que codifican para la ubiquitina conjugasa UBE2L6 y la ubiquitina ligasa NEDD4L. La inducción de esta ligasa por ligandos de FXR podría tener especial relevancia en la actividad antifibrótica de este receptor nuclear debido a la función inhibidora de NEDD4L sobre la señalización de TGF $\beta$ .
9. - El gen *TCEA2* está altamente inducido por FXR activado en células hepáticas, vasculares, renales y mamarias. La regulación se produce a través de un elemento intrónico idéntico al consensus de FXRE. La inducción de *TCEA2* por FXR podría ser un mecanismo de protección frente a la citotoxicidad causada por el daño oxidativo de DNA inducido por ácidos biliares.



# **BIBLIOGRAFÍA**



**A**

- Adeva MM, Souto G, Blanco N, Donapetry C (2012) Ammonium metabolism in humans. *Metabolism*.
- Anderson KR, Singer RA, Balderes DA *et al.* (2011) The L6 domain tetraspanin Tm4sf4 regulates endocrine pancreas differentiation and directed cell migration. *Development* **138**(15), 3213-3224.
- Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Meyer ME *et al.* (2003) Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-X receptor. *J Biol Chem* **278**(22), 20420-20428.
- Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Lee H, Zhang Y, Lee FY, Edwards PA (2005) Activation of the nuclear receptor FXR induces fibrinogen expression: a new role for bile acid signaling. *J Lipid Res* **46**(3), 458-468.
- Ansell BJ, Navab M, Hama S *et al.* (2003) Inflammatory/Anti-inflammatory Properties of High-Density Lipoprotein Distinguish Patients From Control Subjects Better Than High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels and Are Favorably Affected by Simvastatin Treatment. *Circulation* **108**(22), 2751-2756.
- Aragon E, Goerner N, Zaromytidou AI *et al.* (2011) A Smad action turnover switch operated by WW domain readers of a phosphoserine code. *Genes Dev* **25**(12), 1275-1288.
- Aragón E, Goerner N, Xi Q *et al.* (2012) Structural Basis for the Versatile Interactions of Smad7 with Regulator WW Domains in TGF-<sup>2</sup> Pathways. *Structure (London, England : 1993)*.
- Assamaki R, Sarlomo-Rikala M, Lopez-Guerrero JA *et al.* (2007) Array comparative genomic hybridization analysis of chromosomal imbalances and their target genes in gastrointestinal stromal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **46**(6), 564-576.

**B**

- Barrasa JI, Olmo N, Pérez-Ramos P *et al.* (2011) Deoxycholic and chenodeoxycholic bile acids induce apoptosis via oxidative stress in human colon adenocarcinoma cells. *Apoptosis*.
- Beigneux A, Hofmann AF, Young SG (2002) Human CYP7A1 deficiency: progress and enigmas. *J Clin Invest* **110**(1), 29-31.
- Bell LN, Temm CJ, Saxena R *et al.* (2010) Bariatric surgery-induced weight loss reduces hepatic lipid peroxidation levels and affects hepatic cytochrome P-450 protein content. *Ann Surg* **251**(6), 1041-1048.
- Bergman AS, Carlsson SR (1994) Saponin-induced release of cell-surface-anchored Thy-1 by serum glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D. *Biochem J* **298 Pt 3**, 661-668.
- Bernstein H, Bernstein C, Payne CM, Dvorak K (2009) Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* **15**(27), 3329-3340.
- Bernstein H, Payne CM, Bernstein C, Schneider J, Beard SE, Crowley CL (1999) Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein misfolding by the bile salt, deoxycholate. *Toxicol Lett* **108**(1), 37-46.
- Berridge MJ (1984) Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* **220**(2), 345-360.
- Berry DC, Noy N (2009) All-trans-retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor beta/delta and retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol* **29**(12), 3286-3296.
- Biesalski HK, Frank J, Beck SC *et al.* (1999) Biochemical but not clinical vitamin A deficiency results from mutations in the gene for retinol binding protein. *Am J Clin Nutr* **69**(5), 931-936.

- Bilz S, Samuel V, Morino K, Savage D, Choi CS, Shulman GI (2006) Activation of the farnesoid X receptor improves lipid metabolism in combined hyperlipidemic hamsters. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**(4), E716-722.
- Binas B, Danneberg H, McWhir J, Mullins L, Clark AJ (1999) Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *The FASEB Journal* **13**(8), 805-812.
- Bishop-Bailey D (2004) FXR as a novel therapeutic target for vascular disease. *Drug News Perspect* **17**(8), 499-504.
- Bishop-Bailey D, Walsh DT, Warner TD (2004) Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10), 3668-3673.
- Blomhoff R, Blomhoff HK (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* **66**(7), 606-630.
- Boleda MD, Saubi N, Farres J, Pares X (1993) Physiological Substrates for Rat Alcohol Dehydrogenase Classes: Aldehydes of Lipid Peroxidation,  $\omega$ -Hydroxyfatty Acids, and Retinoids. *Arch Biochem Biophys* **307**(1), 85-90.
- Boulkroun S, Fay M, Zennaro MC *et al.* (2002) Characterization of rat NDRG2 (N-Myc downstream regulated gene 2), a novel early mineralocorticoid-specific induced gene. *J Biol Chem* **277**(35), 31506-31515.
- Bowen RF, Raikwar NS, Olson LK, Deeg MA (2001) Glucose and insulin regulate glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D expression in islet beta cells. *Metabolism* **50**(12), 1489-1492.
- Brooks SA (2010) Functional interactions between mRNA turnover and surveillance and the ubiquitin proteasome system. *Wiley Interdisciplinary Reviews - RNA* **1**(2), 240-252.

## C

- Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB (1986) Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* **256**(20), 2835-2838.
- Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D *et al.* (2005) Transient impairment of the adaptive response to fasting in FXR-deficient mice. *FEBS Lett* **579**(19), 4076-4080.
- Charlet-Berguerand N, Feuerhahn S, Kong SE *et al.* (2006) RNA polymerase II bypass of oxidative DNA damage is regulated by transcription elongation factors. *EMBO J* **25**(23), 5481-5491.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* **294**(5548), 1866-1870.
- Chen JD, Evans RM (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**(6548), 454-457.
- Chen ZJ, Sun LJ (2009) Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell* **33**(3), 275-286.
- Choi SC, Yoon SR, Park YP *et al.* (2007) Expression of NDRG2 is related to tumor progression and survival of gastric cancer patients through Fas-mediated cell death. *Exp Mol Med* **39**(6), 705-714.
- Chytil F, Ong DE (1983) Cellular retinol- and retinoic acid-binding proteins. *Adv Nutr Res* **5**, 13-29.
- Claudel T, Sturm E, Duez H *et al.* (2002) Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest* **109**(7), 961-971.
- Conti E, Izaurralde E (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol* **17**(3), 316-325.

Cooper DA, Berry DA, Jones MB, Kiorpes AL, Peters JC (1997) Olestra's effect on the status of vitamins A, D and E in the pig can be offset by increasing dietary levels of these vitamins. *J Nutr* **127**(8 Suppl), 1589S-1608S.

Corr PB, Gross RW, Sobel BE (1984) Amphipathic metabolites and membrane dysfunction in ischemic myocardium. *Circ Res* **55**(2), 135-154.

Cunningham P, McDermott L (2009) Long chain PUFA transport in human term placenta. *J Nutr* **139**(4), 636-639.

Cyphert HA, Ge X, Kohan AB, Salati LM, Zhang Y, Hillgartner FB (2012) Activation of the farnesoid x receptor induces hepatic expression and secretion of fibroblast growth factor 21. *J Biol Chem* **287**(30), 25123-25138.

## D

Dahlberg J, Nilsson LO, von Wowern F, Melander O (2007) Polymorphism in NEDD4L is associated with increased salt sensitivity, reduced levels of P-renin and increased levels of Nt-proANP. *PLoS One* **2**(5), e432.

Dang CV (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* **19**(1), 1-11.

De Matteis MA, Santini G, Kahn RA, Di Tullio G, Luini A (1993) Receptor and protein kinase C-mediated regulation of ARF binding to the Golgi complex. *Nature* **364**(6440), 818-821.

Deeg MA, Bierman EL, Cheung MC (2001) GPI-specific phospholipase D associates with an apoA-I- and apoA-IV-containing complex. *J Lipid Res* **42**(3), 442-451.

Deeg MA, Bowen RF, Williams MD, Olson LK, Kirk EA, LeBoeuf RC (2001) Increased expression of GPI-specific phospholipase D in mouse models of type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**(1), E147-154.

Deng JT, Hoylaerts MF, Van Hoof VO, De Broe ME (1992) Differential release of human intestinal alkaline phosphatase in duodenal fluid and serum. *Clin Chem* **38**(12), 2532-2538.

Deng JT, Hoylaerts MF, De Broe ME, van Hoof VO (1996) Hydrolysis of membrane-bound liver alkaline phosphatase by GPI-PLD requires bile salts. *Am J Physiol* **271**(4 Pt 1), G655-663.

Deng Y, Yao L, Chau L *et al.* (2003) N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. *Int J Cancer* **106**(3), 342-347.

De Gottardi A, Touri F, Maurer CA *et al.* (2004) The Bile Acid Nuclear Receptor FXR and the Bile Acid Binding Protein IBABP Are Differently Expressed in Colon Cancer. *Digestive Diseases and Sciences* **49**(6), 982-989.

Doetsch PW (2002) Translesion synthesis by RNA polymerases: occurrence and biological implications for transcriptional mutagenesis. *Mutat Res* **510**(1-2), 131-140.

Domschke S, Domschke W, Lieber CS (1974) Hepatic redox state: attenuation of the acute effects of ethanol induced by chronic ethanol consumption. *Life Sci* **15**(7), 1327-1334.

Düfer M, Hörth K, Wagner R *et al.* (2012) Bile Acids Acutely Stimulate Insulin Secretion of Mouse  $\beta$ -Cells via Farnesoid X Receptor Activation and KATP Channel Inhibition. *Diabetes* **61**(6), 1479-1489.

Duran-Sandoval D, Cariou B, Percevault F *et al.* (2005) The farnesoid X receptor modulates hepatic carbohydrate metabolism during the fasting-refeeding transition. *J Biol Chem* **280**(33), 29971-29979.

Dvorak K, Payne CM, Chavarria M *et al.* (2007) Bile acids in combination with low pH induce oxidative stress and oxidative DNA damage: relevance to the pathogenesis of Barrett's oesophagus. *Gut* **56**(6), 763-771.

### E

- Edenberg HJ (2000) Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **64**, 295-341.
- Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA (2005) Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Arch Biochem Biophys* **433**(2), 397-412.
- Etzerodt A, Maniecki MB, Moller K, Moller HJ, Moestrup SK (2010) Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* **88**(6), 1201-1205.
- Etzerodt A, Moestrup SK (2012) CD163 and inflammation: Biological, diagnostic and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal*.
- Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**(4854), 889-895.

### F

- Fabrikant JI (1968) The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J Cell Biol* **36**(3), 551-565.
- Fiorucci S, Mencarelli A, Palladino G, Cipriani S (2009) Bile-acid-activated receptors: targeting TGR5 and farnesoid-X-receptor in lipid and glucose disorders. *Trends Pharmacol Sci* **30**(11), 570-580.
- Fiorucci S, Rizzo G, Antonelli E *et al.* (2005) Cross-talk between farnesoid-X-receptor (FXR) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to the antifibrotic activity of FXR ligands in rodent models of liver cirrhosis. *J Pharmacol Exp Ther* **315**(1), 58-68.
- Fiorucci S, Rizzo G, Donini A, Distrutti E, Santucci L (2007) Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends Mol Med* **13**(7), 298-309.
- Forman BM, Goode E, Chen J *et al.* (1995) Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* **81**(5), 687-693.
- Furuhashi M, Hotamisligil GS (2008) Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **7**(6), 489-503.

### G

- Gadaleta RM, Oldenburg B, Willemsen ECL *et al.* (2011) Activation of bile salt nuclear receptor FXR is repressed by pro-inflammatory cytokines activating NF- $\kappa$ B signaling in the intestine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1812**(8), 851-858.
- Gadaleta RM, van Erpecum KJ, Oldenburg B *et al.* (2011) Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut* **60**(4), 463-472.
- Gao S, Alarcón C, Sapkota G *et al.* (2009) Ubiquitin Ligase Nedd4L Targets Activated Smad2/3 to Limit TGF- $\beta$  Signaling. *Molecular Cell* **36**(3), 457-468.
- Ghyselinck NB, Bavik C, Sapin V *et al.* (1999) Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J* **18**(18), 4903-4914.
- Ginsberg HN, Le NA, Goldberg IJ *et al.* (1986) Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI. Evidence that apolipoprotein CIII inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo. *J Clin Invest* **78**(5), 1287-1295.



- Giordano C, Catalano S, Panza S *et al.* (2011) Farnesoid X receptor inhibits tamoxifen-resistant MCF-7 breast cancer cell growth through downregulation of HER2 expression. *Oncogene* **30**(39), 4129-4140.
- Glass CK (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* **15**(3), 391-407.
- Glickman MH, Ciechanover A (2002) The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews* **82**(2), 373-428.
- Gong P, Cnaan A, Wang B *et al.* (2010) The ubiquitin-like protein FAT10 mediates NF-kappaB activation. *J Am Soc Nephrol* **21**(2), 316-326.
- González-Chávez A, Elizondo-Argueta S, Gutiérrez-Reyes G, León-Pedroza JI (2011) Pathophysiological implications between chronic inflammation and the development of diabetes and obesity. *Implicaciones fisiopatológicas entre inflamación crónica y el desarrollo de diabetes y obesidad* **79**(2), 209-216.
- Goodman DS (1984) Overview of current knowledge of metabolism of vitamin A and carotenoids. *J Natl Cancer Inst* **73**(6), 1375-1379.
- Goodman DS, Huang HS (1965) BIOSYNTHESIS OF VITAMIN A WITH RAT INTESTINAL ENZYMES. *Science* **149**(3686), 879-880.
- Goodwin B, Jones SA, Price RR *et al.* (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* **6**(3), 517-526.
- Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR (1977) High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: The Framingham study. *The American Journal of Medicine* **62**(5), 707-714.
- Gosmain Y, Dif N, Berbe V *et al.* (2005) Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *J Lipid Res* **46**(4), 697-705.
- Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN (2000) The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 653-699.
- Granner D, Andreone T, Sasaki K, Beale E (1983) Inhibition of transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by insulin. *Nature* **305**(5934), 549-551.
- Grober J, Zaghini I, Fujii H *et al.* (1999) Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J Biol Chem* **274**(42), 29749-29754.

## H

- Hanawalt PC, Spivak G (2008) Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(12), 958-970.
- Hanniman EA, Lambert G, McCarthy TC, Sinal CJ (2005) Loss of functional farnesoid X receptor increases atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* **46**(12), 2595-2604.
- Hanson RW, Reshef L (1997) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem* **66**, 581-611.
- Hartman HB, Gardell SJ, Petucci CJ, Wang S, Krueger JA, Evans MJ (2009) Activation of farnesoid X receptor prevents atherosclerotic lesion formation in LDLR<sup>-/-</sup> and apoE<sup>-/-</sup> mice. *J Lipid Res* **50**(6), 1090-1100.

- Hayashi H, Sugiyama Y (2009) Short-chain ubiquitination is associated with the degradation rate of a cell-surface-resident bile salt export pump (BSEP/ABCB11). *Mol Pharmacol* **75**(1), 143-150.
- He F, Li J, Mu Y *et al.* (2006) Downregulation of endothelin-1 by farnesoid X receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res* **98**(2), 192-199.
- He S, Deng J, Li G, Wang B, Cao Y, Tu Y (2012) Down-regulation of Nedd4L is associated with the aggressive progression and worse prognosis of malignant glioma. *Jpn J Clin Oncol* **42**(3), 196-201.
- Hegele RA (2009) Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet* **10**(2), 109-121.
- Hemler ME, Mannion BA, Berditchevski F (1996) Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochim Biophys Acta* **1287**(2-3), 67-71.
- Hershko A (1983) Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell* **34**(1), 11-12.
- Hertzel AV, Bernlohr DA (2000) The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab* **11**(5), 175-180.
- Hicke L (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3), 195-201.
- Ho KJ (1976) Circadian distribution of bile acid in the enterohepatic circulatory system in hamsters. *J Lipid Res* **17**(6), 600-604.
- Ho KJ (1976) Circadian distribution of bile acids in the enterohepatic circulatory system in rats. *Am J Physiol* **230**(5), 1331-1335.
- Holt JA, Luo G, Billin AN *et al.* (2003) Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev* **17**(13), 1581-1591.
- Houten SM, Watanabe M, Auwerx J (2006) Endocrine functions of bile acids. *EMBO J* **25**(7), 1419-1425.
- Hsu MH, Savas U, Griffin KJ, Johnson EF (2001) Identification of peroxisome proliferator-responsive human genes by elevated expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in HepG2 cells. *J Biol Chem* **276**(30), 27950-27958.
- Hu T, Chouinard M, Cox AL *et al.* (2006) Farnesoid X receptor agonist reduces serum asymmetric dimethylarginine levels through hepatic dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 gene regulation. *J Biol Chem* **281**(52), 39831-39838.
- Hu XL, Liu XP, Deng YC *et al.* (2006) Expression analysis of the NDRG2 gene in mouse embryonic and adult tissues. *Cell Tissue Res* **325**(1), 67-76.
- Hu XL, Liu XP, Lin SX *et al.* (2004) NDRG2 expression and mutation in human liver and pancreatic cancers. *World J Gastroenterol* **10**(23), 3518-3521.
- Huang L, Zhao A, Lew JL *et al.* (2003) Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J Biol Chem* **278**(51), 51085-51090.
- Huang W, Ma K, Zhang J *et al.* (2006) Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* **312**(5771), 233-236.
- Hubbert ML, Zhang Y, Lee FY, Edwards PA (2007) Regulation of hepatic Insig-2 by the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol* **21**(6), 1359-1369.
- Hummerich L, Muller R, Hess J *et al.* (2006) Identification of novel tumour-associated genes differentially expressed in the process of squamous cell cancer development. *Oncogene* **25**(1), 111-121.

Hunt JF, Erwin E, Palmer L *et al.* (2002) Expression and activity of pH-regulatory glutaminase in the human airway epithelium. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **165**(1), 101-107.

Huynh H, Alpert L, Pollak M (1996) Silencing of the mammary-derived growth inhibitor (MDGI) gene in breast neoplasms is associated with epigenetic changes. *Cancer Res* **56**(21), 4865-4870.

Huynh H, Pollak M (1997) Stabilization of mammary-derived growth inhibitor messenger RNA by antiestrogens. *Clin Cancer Res* **3**(11), 2151-2156.

Hwang PK, Greer J (1980) Interaction between hemoglobin subunits in the hemoglobin . haptoglobin complex. *J Biol Chem* **255**(7), 3038-3041.

Hwang ST, Urizar NL, Moore DD, Henning SJ (2002) Bile acids regulate the ontogenic expression of ileal bile acid binding protein in the rat via the farnesoid X receptor. *Gastroenterology* **122**(5), 1483-1492.

### I

Ikeda S, Miyazaki H, Nakatani T *et al.* (2002) Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. *Biochem Biophys Res Commun* **296**(2), 395-400.

Inagaki T, Choi M, Moschetta A *et al.* (2005) Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* **2**(4), 217-225.

Ishibashi S, Schwarz M, Frykman PK, Herz J, Russell DW (1996) Disruption of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. *J Biol Chem* **271**(30), 18017-18023.

### J

Jansen-Durr P, Osiewacz HD (2002) Healthy ageing: a question of stress, damage and repair. Meeting on mechanisms of biological ageing. *EMBO Rep* **3**(12), 1127-1132.

Jenster G, Trapman J, Brinkmann AO (1993) Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem J* **293** ( Pt 3), 761-768.

Jeon C, Yoon H, Agarwal K (1994) The transcription factor TFIIIS zinc ribbon dipeptide Asp-Glu is critical for stimulation of elongation and RNA cleavage by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19), 9106-9110.

Jiang XC, Bruce C, Mar J *et al.* (1999) Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J Clin Invest* **103**(6), 907-914.

Jung D, Mangelsdorf DJ, Meyer UA (2006) Pregnane X receptor is a target of farnesoid X receptor. *J Biol Chem* **281**(28), 19081-19091.

### K

Kaikaus RM, Bass NM, Ockner RK (1990) Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia* **46**(6), 617-630.

Kaiser S, Gerok W, HÄUssinger D (1988) Ammonia and glutamine metabolism in human liver slices: new aspects on the pathogenesis of hyperammonaemia in chronic liver disease. *European Journal of Clinical Investigation* **18**(5), 535-542.

Kanzawa N, Maeda Y, Ogiso H, Murakami Y, Taguchi R, Kinoshita T (2009) Peroxisome dependency of alkyl-

- containing GPI-anchor biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(42), 17711-17716.
- Kars M, Yang L, Gregor MF *et al.* (2010) Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes* **59**(8), 1899-1905.
- Kastner P, Mark M, Chambon P (1995) Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* **83**(6), 859-869.
- Katsika D, Magnusson P, Krawczyk M *et al.* (2010) Gallstone disease in Swedish twins: risk is associated with ABCG8 D19H genotype. *J Intern Med* **268**(3), 279-285.
- Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G (2005) Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun* **329**(1), 386-390.
- Kawaguchi R, Yu J, Honda J *et al.* (2007) A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* **315**(5813), 820-825.
- Keitel V, Donner M, Winandy S, Kubitz R, Haussinger D (2008) Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **372**(1), 78-84.
- Keitel V, Reinehr R, Gatsios P *et al.* (2007) The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* **45**(3), 695-704.
- Kemper JK, Xiao Z, Ponugoti B *et al.* (2009) FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab* **10**(5), 392-404.
- Kilcullen N, Viswanathan K, Das R *et al.* (2007) Heart-type fatty acid-binding protein predicts long-term mortality after acute coronary syndrome and identifies high-risk patients across the range of troponin values. *J Am Coll Cardiol* **50**(21), 2061-2067.
- Kim A, Kim MJ, Yang Y, Kim JW, Yeom YI, Lim JS (2009) Suppression of NF-kappaB activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells. *Carcinogenesis* **30**(6), 927-936.
- Kim I, Morimura K, Shah Y, Yang Q, Ward JM, Gonzalez FJ (2007) Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* **28**(5), 940-946.
- Kim MS, Shigenaga J, Moser A, Feingold K, Grunfeld C (2003) Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response. *J Biol Chem* **278**(11), 8988-8995.
- Kinnunen PK, Ehnolm C (1976) Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. *FEBS Lett* **65**(3), 354-357.
- Kleine AH, Glatz JF, Van Nieuwenhoven FA, Van der Vusse GJ (1992) Release of heart fatty acid-binding protein into plasma after acute myocardial infarction in man. *Mol Cell Biochem* **116**(1-2), 155-162.
- Klinge CM (2000) Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* **65**(5), 227-251.
- Kovacs P, Kress R, Rocha J *et al.* (2008) Variation of the gene encoding the nuclear bile salt receptor FXR and gallstone susceptibility in mice and humans. *J Hepatol* **48**(1), 116-124.
- Krahenbuhl S, Talos C, Reichen J (1994) Mechanisms of impaired hepatic fatty acid metabolism in rats with long-term bile duct ligation. *Hepatology* **19**(5), 1272-1281.
- Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C *et al.* (2001) Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* **409**(6817), 198-201.
- Kuhlkamp T, Keitel V, Helmer A, Haussinger D, Kubitz R (2005) Degradation of the sodium taurocholate

- cotransporting polypeptide (NTCP) by the ubiquitin-proteasome system. *Biol Chem* **386**(10), 1065-1074.
- Kuraoka I, Endou M, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H, Tanaka K (2003) Effects of endogenous DNA base lesions on transcription elongation by mammalian RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair and transcriptional mutagenesis. *J Biol Chem* **278**(9), 7294-7299.
- Kuraoka I, Suzuki K, Ito S *et al.* (2007) RNA polymerase II bypasses 8-oxoguanine in the presence of transcription elongation factor TFIIS. *DNA Repair (Amst)* **6**(6), 841-851.
- Kurokawa R, Soderstrom M, Horlein A *et al.* (1995) Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* **377**(6548), 451-454.
- Kurtz A, Vogel F, Funa K, Heldin CH, Grosse R (1990) Developmental regulation of mammary-derived growth inhibitor expression in bovine mammary tissue. *J Cell Biol* **110**(5), 1779-1789.
- Kurtz TA, Fineberg NS, Considine RV, Deeg MA (2004) Insulin resistance is associated with increased serum levels of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D. *Metabolism* **53**(2), 138-139.

## L

- Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD, Edwards PA (2000) Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem* **275**(14), 10638-10647.
- Lambert G, Amar MJA, Guo G, Brewer HB, Gonzalez FJ, Sinal CJ (2003) The Farnesoid X-receptor Is an Essential Regulator of Cholesterol Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* **278**(4), 2563-2570.
- Lang F, Bohmer C, Palmada M, Seebohm G, Strutz-Seebohm N, Vallon V (2006) (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev* **86**(4), 1151-1178.
- Langhi C, Le May C, Kourimate S *et al.* (2008) Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett* **582**(6), 949-955.
- Leblanc BP, Stunnenberg HG (1995) 9-cis retinoic acid signaling: changing partners causes some excitement. *Genes Dev* **9**(15), 1811-1816.
- Lee DC, Kang YK, Kim WH *et al.* (2008) Functional and clinical evidence for NDRG2 as a candidate suppressor of liver cancer metastasis. *Cancer Res* **68**(11), 4210-4220.
- Lee FY, Kast-Woelbern HR, Chang J *et al.* (2005) Alpha-crystallin is a target gene of the farnesoid X-activated receptor in human livers. *J Biol Chem* **280**(36), 31792-31800.
- Lee FY, Lee H, Hubbert ML, Edwards PA, Zhang Y (2006) FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends in Biochemical Sciences* **31**(10), 572-580.
- Lee H, Zhang Y, Lee FY, Nelson SF, Gonzalez FJ, Edwards PA (2006) FXR regulates organic solute transporters  $\alpha$  and  $\beta$  in the adrenal gland, kidney, and intestine. *J Lipid Res* **47**(1), 201-214.
- Lee J, Padhye A, Sharma A *et al.* (2010) A pathway involving farnesoid X receptor and small heterodimer partner positively regulates hepatic sirtuin 1 levels via microRNA-34a inhibition. *J Biol Chem* **285**(17), 12604-12611.
- Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B (2009) Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* **89**(1), 147-191.
- Lejeune F, Maquat LE (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* **17**(3), 309-315.

- Levy AP, Asleh R, Blum S *et al.* (2010) Haptoglobin: basic and clinical aspects. *Antioxid Redox Signal* **12**(2), 293-304.
- Li F, Patterson AD, Krausz KW, Tanaka N, Gonzalez FJ (2012) Metabolomics reveals an essential role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in bile acid homeostasis. *J Lipid Res* **53**(8), 1625-1635.
- Li J, Wilson A, Kuruba R *et al.* (2008) FXR-mediated regulation of eNOS expression in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* **77**(1), 169-177.
- Li J, Zhang Y, Kuruba R *et al.* (2011) Roles of microRNA-29a in the antifibrotic effect of farnesoid X receptor in hepatic stellate cells. *Mol Pharmacol* **80**(1), 191-200.
- Li Y, Wang L, Qiu J *et al.* (2012) Human tetraspanin transmembrane 4 superfamily member 4 or intestinal and liver tetraspan membrane protein is overexpressed in hepatocellular carcinoma and accelerates tumor cell growth. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **44**(3), 224-232.
- Li YT, Swales KE, Thomas GJ, Warner TD, Bishop-Bailey D (2007) Farnesoid x receptor ligands inhibit vascular smooth muscle cell inflammation and migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(12), 2606-2611.
- Lieber CS, Jones DP, Losowsky MS, Davidson CS (1962) Interrelation of uric acid and ethanol metabolism in man. *J Clin Invest* **41**, 1863-1870.
- Lieber CS (1992) [Clinical biochemistry of alcohol and its metabolic and hepatic effects]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*, 183-210.
- Lieber CS (1997) Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* **257**(1), 59-84.
- Lin W-W, Karin M (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* **117**(5), 1175-1183.
- Lisanti MP, Darnell JC, Chan BL, Rodriguez-Boulan E, Saltiel AR (1989) The distribution of glycosyl-phosphatidylinositol anchored proteins is differentially regulated by serum and insulin. *Biochem Biophys Res Commun* **164**(2), 824-832.
- Liu N, Wang L, Liu X *et al.* (2007) Promoter methylation, mutation, and genomic deletion are involved in the decreased NDRG2 expression levels in several cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **358**(1), 164-169.
- Liu RZ, Graham K, Glubrecht DD, Germain DR, Mackey JR, Godbout R (2011) Association of FABP5 expression with poor survival in triple-negative breast cancer: implication for retinoic acid therapy. *Am J Pathol* **178**(3), 997-1008.
- Liu S, Yang P, Kang H *et al.* (2010) NDRG2 induced by oxidized LDL in macrophages antagonizes growth factor productions via selectively inhibiting ERK activation. *Biochim Biophys Acta* **1801**(2), 106-113.
- Liu Z, Zhao M, Yokoyama KK, Li T (2001) Molecular cloning of a cDNA for rat TM4SF4, a homolog of human il-TMP (TM4SF4), and enhanced expression of the corresponding gene in regenerating rat liver(1). *Biochim Biophys Acta* **1518**(1-2), 183-189.
- Lorentzen A, Vogel LK, Lewinsky RH *et al.* (2007) Expression of NDRG2 is down-regulated in high-risk adenomas and colorectal carcinoma. *BMC Cancer* **7**, 192.
- Low MG, Huang KS (1991) Factors affecting the ability of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D to degrade the membrane anchors of cell surface proteins. *Biochem J* **279** ( Pt 2), 483-493.
- Lu TT, Makishima M, Repa JJ *et al.* (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* **6**(3), 507-515.

Lusis EA, Watson MA, Chicoine MR *et al.* (2005) Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res* **65**(16), 7121-7126.

## M

Ma JJ, Kong LM, Liao CG, Jiang X, Wang Y, Bao TY (2012) Suppression of MMP-9 activity by NDRG2 expression inhibits clear cell renal cell carcinoma invasion. *Med Oncol*.

Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD (2006) Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* **116**(4), 1102-1109.

Mackness MI, Durrington PN, Mackness B (2004) The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. *Am J Cardiovasc Drugs* **4**(4), 211-217.

Maecker HT, Todd SC, Levy S (1997) The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* **11**(6), 428-442.

Malerod L, Sporstol M, Juvet LK *et al.* (2005) Bile acids reduce SR-BI expression in hepatocytes by a pathway involving FXR/RXR, SHP, and LRH-1. *Biochem Biophys Res Commun* **336**(4), 1096-1105.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M *et al.* (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**(6), 835-839.

Marschall HU, Wagner M, Bodin K *et al.* (2006) Fxr(-/-) mice adapt to biliary obstruction by enhanced phase I detoxification and renal elimination of bile acids. *J Lipid Res* **47**(3), 582-592.

Martras S, Alvarez R, Gallego O *et al.* (2004) Kinetics of human alcohol dehydrogenase with ring-oxidized retinoids: effect of Tween 80. *Arch Biochem Biophys* **430**(2), 210-217.

McEvily AJ, Holmquist B, Auld DS, Vallee BL (1988) 3 beta-Hydroxy-5 beta-steroid dehydrogenase activity of human liver alcohol dehydrogenase is specific to gamma-subunits. *Biochemistry* **27**(12), 4284-4288.

Mehta PK, Griendling KK (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(1), C82-97.

Mencarelli A, Fiorucci S (2010) FXR an emerging therapeutic target for the treatment of atherosclerosis. *J Cell Mol Med* **14**(1-2), 79-92.

Merida I, Pratt JC, Gaulton GN (1990) Regulation of interleukin 2-dependent growth responses by glycosylphosphatidylinositol molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(23), 9421-9425.

Miao J, Xiao Z, Kanamaluru D *et al.* (2009) Bile acid signaling pathways increase stability of Small Heterodimer Partner (SHP) by inhibiting ubiquitin-proteasomal degradation. *Genes Dev* **23**(8), 986-996.

Modica S, Murzilli S, Salvatore L, Schmidt DR, Moschetta A (2008) Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* **68**(23), 9589-9594.

Modica S, Bellafante E, Moschetta A (2009) Master regulation of bile acid and xenobiotic metabolism via the FXR, PXR and CAR trio. *Front Biosci* **14**, 4719-4745.

Modica S, Gadaleta RM, Moschetta A (2010) Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl Recept Signal* **8**, e005.

Moller DE (2001) New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* **414**(6865), 821-827.

Monaco HL, Rizzi M, Coda A (1995) Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-

binding protein. *Science* **268**(5213), 1039-1041.

Moschetta A, Bookout AL, Mangelsdorf DJ (2004) Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model. *Nat Med* **10**(12), 1352-1358.

Muranjan M, Nussenzweig V, Tomlinson S (1998) Characterization of the human serum trypanosome toxin, haptoglobin-related protein. *J Biol Chem* **273**(7), 3884-3887.

## N

Nakagawa T, Guarente L (2009) Urea cycle regulation by mitochondrial sirtuin, SIRT5. *Aging (Albany NY)* **1**(6), 578-581.

Napal L, Marrero PF, Haro D (2005) An intronic peroxisome proliferator-activated receptor-binding sequence mediates fatty acid induction of the human carnitine palmitoyltransferase 1A. *J Mol Biol* **354**(4), 751-759.

Napoli JL (1996) Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J* **10**(9), 993-1001.

Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST *et al.* (2005) The double jeopardy of HDL. *Ann Med* **37**(3), 173-178.

Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G *et al.* (2001) HDL and the Inflammatory Response Induced by LDL-Derived Oxidized Phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(4), 481-488.

Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM *et al.* (2000) Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* **41**(9), 1495-1508.

Neely JR, Morgan HE (1974) Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu Rev Physiol* **36**, 413-459.

Neve EP, Ingelman-Sundberg M (2000) Molecular basis for the transport of cytochrome P450 2E1 to the plasma membrane. *J Biol Chem* **275**(22), 17130-17135.

Nevo J, Mai A, Tuomi S *et al.* (2010) Mammary-derived growth inhibitor (MDGI) interacts with integrin alpha-subunits and suppresses integrin activity and invasion. *Oncogene* **29**(49), 6452-6463.

Nielsen MJ, Petersen SV, Jacobsen C *et al.* (2006) Haptoglobin-related protein is a high-affinity hemoglobin-binding plasma protein. *Blood* **108**(8), 2846-2849.

Nomoto M, Miyata M, Yin S *et al.* (2009) Bile acid-induced elevated oxidative stress in the absence of farnesoid X receptor. *Biol Pharm Bull* **32**(2), 172-178.

Nose K, Mizuno T, Yamane N *et al.* (2005) Identification of Ammonia in Gas Emanated from Human Skin and Its Correlation with That in Blood. *Analytical Sciences* **21**(12), 1471-1474.

## O

Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RB, Ho WK (1972) A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science* **177**(4043), 56-58.

Oh SK, Kim SH, Abbruzzi G, Adler WH, Tauber AI (1992) Quantitative differentiation of the haptoglobin-related gene product from haptoglobin in human plasma: a possible test for tumor-associated antigen. *Hybridoma* **11**(1), 1-12.

Ohno T, Shirakami Y, Shimizu M *et al.* (2012) Synergistic growth inhibition of human hepatocellular carcinoma



cells by acyclic retinoid and GW4064, a farnesoid X receptor ligand. *Cancer Lett* **323**(2), 215-222.

Okuda A, Okuda K (1983) Physiological function and kinetic mechanism of human liver alcohol dehydrogenase as 5 beta-cholestane-3 alpha,7 alpha,12 alpha,26-tetrol dehydrogenase. *J Biol Chem* **258**(5), 2899-2905.

Ong JP, Aggarwal A, Krieger D *et al.* (2003) Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *The American Journal of Medicine* **114**(3), 188-193.

Oota H, Dunn CW, Speed WC *et al.* (2007) Conservative evolution in duplicated genes of the primate Class I ADH cluster. *Gene* **392**(1-2), 64-76.

Ou HY, Wu HT, Yang YC, Wu JS, Cheng JT, Chang CJ (2011) Elevated retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Horm Metab Res* **43**(5), 312-318.

Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L *et al.* (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* **313**(5790), 1137-1140.

## P

Pelsers MM, Hermens WT, Glatz JF (2005) Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin Chim Acta* **352**(1-2), 15-35.

Pelsers MM (2008) Fatty acid-binding protein as marker for renal injury. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **241**, 73-77.

Perez MJ, Gonzalez-Sanchez E, Gonzalez-Loyola A, Gonzalez-Buitrago JM, Marin JJ (2011) Mitochondrial genome depletion dysregulates bile acid- and paracetamol-induced expression of the transporters Mdr1, Mrp1 and Mrp4 in liver cells. *Br J Pharmacol* **162**(8), 1686-1699.

Pfahl M, Chytil F (1996) Regulation of metabolism by retinoic acid and its nuclear receptors. *Annu Rev Nutr* **16**, 257-283.

Pickart CM, Fushman D (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* **8**(6), 610-616.

Pineda Torra I, Claudel T, Duval C, Kosykh V, Fruchart JC, Staels B (2003) Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol* **17**(2), 259-272.

Popescu IR, Helleboid-Chapman A, Lucas A *et al.* (2010) The nuclear receptor FXR is expressed in pancreatic  $\beta$ -cells and protects human islets from lipotoxicity. *FEBS Lett* **584**(13), 2845-2851.

Pullinger CR, Eng C, Salen G *et al.* (2002) Human cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest* **110**(1), 109-117.

Puppo A, Halliwell B (1988) Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton reagent? *Biochem J* **249**(1), 185-190.

## Q

Qiu J, Liu Z, Da L *et al.* (2007) Overexpression of the gene for transmembrane 4 superfamily member 4 accelerates liver damage in rats treated with CCl<sub>4</sub>. *J Hepatol* **46**(2), 266-275.

Qu X, Zhai Y, Wei H *et al.* (2002) Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family. *Mol Cell Biochem* **229**(1-2), 35-44.

Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ *et al.* (1999) Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking

retinol-binding protein. *EMBO J* **18**(17), 4633-4644.

### R

- Raasi S, Schmidtke G, de Giulì R, Groettrup M (1999) A ubiquitin-like protein which is synergistically inducible by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* **29**(12), 4030-4036.
- Raikwar NS, Bowen-Deeg RF, Du XS, Low MG, Deeg MA (2010) Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D improves glucose tolerance. *Metabolism* **59**(10), 1413-1420.
- Ren J, Wang Y, Gao Y, Mehta SB, Lee CG (2011) FAT10 mediates the effect of TNF-alpha in inducing chromosomal instability. *J Cell Sci* **124**(Pt 21), 3665-3675.
- Renga B, Mencarelli A, Vavassori P, Brancaleone V, Fiorucci S (2010) The bile acid sensor FXR regulates insulin transcription and secretion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1802**(3), 363-372.
- Renga B, Mencarelli A, D'Amore C *et al.* (2012) Glucocorticoid receptor mediates the gluconeogenic activity of the farnesoid X receptor in the fasting condition. *FASEB J* **26**(7), 3021-3031.
- Represa J, Avila MA, Miner C *et al.* (1991) Glycosyl-phosphatidylinositol/inositol phosphoglycan: a signaling system for the low-affinity nerve growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(18), 8016-8019.
- Rodriguez JC, Gil-Gomez G, Hegardt FG, Haro D (1994) Peroxisome proliferator-activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem* **269**(29), 18767-18772.
- Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Pelli MA, Morozzi G (2008) Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate. *Eur J Nutr* **47**(6), 301-309.
- Rudman D, DiFulco TJ, Galambos JT, Smith RB, 3rd, Salam AA, Warren WD (1973) Maximal rates of excretion and synthesis of urea in normal and cirrhotic subjects. *J Clin Invest* **52**(9), 2241-2249.
- Ruiz A, Winston A, Lim YH, Gilbert BA, Rando RR, Bok D (1999) Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase. *J Biol Chem* **274**(6), 3834-3841.
- Russo CJ, Melista E, Cui J *et al.* (2005) Association of NEDD4L ubiquitin ligase with essential hypertension. *Hypertension* **46**(3), 488-491.

### S

- Salama NR, Chuang JS, Schekman RW (1997) Sec31 encodes an essential component of the COPII coat required for transport vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **8**(2), 205-217.
- Sakai K, Fujii H, Yamamoto T *et al.* (1995) Tissue-specific suppression of aortic fatty-acid-binding protein in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Biochem* **229**(1), 201-206.
- Savolainen VT, Liesto K, Mannikko A, Penttila A, Karhunen PJ (1993) Alcohol consumption and alcoholic liver disease: evidence of a threshold level of effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* **17**(5), 1112-1117.
- Schafmayer C, Teumer A, Buch S *et al.* (2010) 50 A Genome-Wide Scan Identifies TM4SF4 (Intestine and Liver Tetraspan Membrane Protein 4) as a Susceptibility Locus for Gallstone Disease. *Gastroenterology* **138**(5, Supplement 1), S-10.

- Schwarz M, Lund EG, Setchell KD *et al.* (1996) Disruption of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. *J Biol Chem* **271**(30), 18024-18031.
- Seol W, Choi HS, Moore DD (1995) Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol* **9**(1), 72-85.
- Sheff D, Lowe M, Kreis TE, Mellman I (1996) Biochemical heterogeneity and phosphorylation of coatomer subunits. *J Biol Chem* **271**(12), 7230-7236.
- Shen LL, Liu H, Peng J *et al.* (2011) Effects of farnesoid X receptor on the expression of the fatty acid synthetase and hepatic lipase. *Mol Biol Rep* **38**(1), 553-559.
- Shoda J, Kano M, Asano T *et al.* (1999) Secretory low-molecular-weight phospholipases A2 and their specific receptor in bile ducts of patients with intrahepatic calculi: factors of chronic proliferative cholangitis. *Hepatology* **29**(4), 1026-1036.
- Sinal CJ, Yoon M, Gonzalez FJ (2001) Antagonism of the Actions of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\alpha$  by Bile Acids. *Journal of Biological Chemistry* **276**(50), 47154-47162.
- Sirvent A, Claudel T, Martin G *et al.* (2004) The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS Lett* **566**(1-3), 173-177.
- Sirvent A, Verhoeven AJ, Jansen H *et al.* (2004) Farnesoid X receptor represses hepatic lipase gene expression. *J Lipid Res* **45**(11), 2110-2115.
- Smith M, Hopkinson DA, Harris H (1972) Alcohol dehydrogenase isozymes in adult human stomach and liver: evidence for activity of the ADH 3 locus. *Ann Hum Genet* **35**(3), 243-253.
- Sokol RJ, Winklhofer-Roob BM, Devereaux MW, McKim Jr JM (1995) Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* **109**(4), 1249-1256.
- Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS *et al.* (2005) Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology* **146**(3), 984-991.
- Storch J, Thumser AEA (2000) The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1486**(1), 28-44.
- Swales KE, Korbonits M, Carpenter R, Walsh DT, Warner TD, Bishop-Bailey D (2006) The farnesoid X receptor is expressed in breast cancer and regulates apoptosis and aromatase expression. *Cancer Res* **66**(20), 10120-10126.

## T

- Takeuchi T, Adachi Y, Nagayama T, Furihata M (2011) Nedd4L modulates the transcription of metalloproteinase-1 and -13 genes to increase the invasive activity of gallbladder cancer. *Int J Exp Pathol* **92**(2), 79-86.
- Thomas AM, Hart SN, Kong B, Fang J, Zhong XB, Guo GL (2010) Genome-wide tissue-specific farnesoid X receptor binding in mouse liver and intestine. *Hepatology* **51**(4), 1410-1419.
- Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K (2008) Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* **7**(8), 678-693.
- Tiwari A, Maiti P (2009) TGR5: an emerging bile acid G-protein-coupled receptor target for the potential treatment of metabolic disorders. *Drug Discovery Today* **14**(9-10), 523-530.

- Tornaletti S (2005) Transcription arrest at DNA damage sites. *Mutat Res* **577**(1-2), 131-145.
- Trauner M, Meier PJ, Boyer JL (1998) Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* **339**(17), 1217-1227.
- Tsujioka H, Misumi Y, Takami N, Ikehara Y (1998) Posttranslational modification of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-specific phospholipase D and its activity in cleavage of GPI anchors. *Biochem Biophys Res Commun* **251**(3), 737-743.
- Tsujioka H, Takami N, Misumi Y, Ikehara Y (1999) Intracellular cleavage of glycosylphosphatidylinositol by phospholipase D induces activation of protein kinase Calpha. *Biochem J* **342** ( Pt 2), 449-455.
- Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L *et al.* (1992) Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem* **267**(3), 1805-1810.

### U

- Urizar NL, Dowhan DH, Moore DD (2000) The Farnesoid X-activated Receptor Mediates Bile Acid Activation of Phospholipid Transfer Protein Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* **275**(50), 39313-39317.

### V

- Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC *et al.* (1995) Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* **96**(6), 2758-2767.
- Vassileva G, Golovko A, Markowitz L *et al.* (2006) Targeted deletion of Gpbar1 protects mice from cholesterol gallstone formation. *Biochem J* **398**(3), 423-430.
- Veerkamp JH, Maatman RG (1995) Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. *Prog Lipid Res* **34**(1), 17-52.
- Viswanathan K, Kilcullen N, Morrell C *et al.* (2010) Heart-type fatty acid-binding protein predicts long-term mortality and re-infarction in consecutive patients with suspected acute coronary syndrome who are troponin-negative. *J Am Coll Cardiol* **55**(23), 2590-2598.
- Vogel S, Gamble MV, Blaner WS (1999) Biosynthesis, absorption, metabolism and transport of retinoids. *Handbook of experimental pharmacology* vol. 139 (647 p.) ((11 p.1/4)), pp. 31-95.

### W

- Waite M, Roddick V, Thornburg T, King L, Cochran F (1987) Conversion of phosphatidylglycerol to lyso(bis)phosphatidic acid by alveolar macrophages. *FASEB J* **1**(4), 318-325.
- Wald G (1968) Molecular basis of visual excitation. *Science* **162**(3850), 230-239.
- Walker V (2012) Severe hyperammonaemia in adults not explained by liver disease. *Ann Clin Biochem* **49**(Pt 3), 214-228.
- Wang CS, McConathy WJ, Kloer HU, Alaupovic P (1985) Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J Clin Invest* **75**(2), 384-390.
- Wang HL, Kurtz A (2000) Breast cancer growth inhibition by delivery of the MDGI-derived peptide P108. *Oncogene* **19**(20), 2455-2460.

- Wang L, Liu N, Yao L *et al.* (2008) NDRG2 is a new HIF-1 target gene necessary for hypoxia-induced apoptosis in A549 cells. *Cell Physiol Biochem* **21**(1-3), 239-250.
- Wang YD, Chen WD, Moore DD, Huang W (2008) FXR: a metabolic regulator and cell protector. *Cell Res* **18**(11), 1087-1095.
- Wang YD, Chen WD, Wang M, Yu D, Forman BM, Huang W (2008) Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. *Hepatology* **48**(5), 1632-1643.
- Watanabe J, Chou KJ, Liao JC *et al.* (2007) Differential Association of Hemoglobin with Proinflammatory High Density Lipoproteins in Atherogenic/Hyperlipidemic Mice. *Journal of Biological Chemistry* **282**(32), 23698-23707.
- Watanabe J, Grijalva V, Hama S *et al.* (2009) Hemoglobin and its scavenger protein haptoglobin associate with apoA-1-containing particles and influence the inflammatory properties and function of high density lipoprotein. *J Biol Chem* **284**(27), 18292-18301.
- Watanabe M, Houten SM, Matak C *et al.* (2006) Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* **439**(7075), 484-489.
- Watanabe M, Houten SM, Wang L *et al.* (2004) Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* **113**(10), 1408-1418.
- Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(8), 599-609.
- Wen H, Kim N, Fuentes EJ, Mallinger A, Gonzalez-Alegre P, Glenn K (2010) FBG1 is a promiscuous ubiquitin ligase that sequesters APC2 and causes S-phase arrest. *Cell Cycle* **9**(22), 4506-4517.
- White LP, Phear EA, Summerskill WH, Sherlock S (1955) Ammonium tolerance in liver disease: observations based on catheterization of the hepatic veins. *J Clin Invest* **34**(2), 158-168.
- Wice BM, Gordon JI (1995) A tetraspan membrane glycoprotein produced in the human intestinal epithelium and liver that can regulate cell density-dependent proliferation. *J Biol Chem* **270**(37), 21907-21918.
- Wittenburg H, Lyons MA, Li R, Churchill GA, Carey MC, Paigen B (2003) FXR and ABCG5/ABCG8 as determinants of cholesterol gallstone formation from quantitative trait locus mapping in mice. *Gastroenterology* **125**(3), 868-881.
- Wright MD, Tomlinson MG (1994) The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today* **15**(12), 588-594.

## X

- Xu Z, Huang G, Gong W *et al.* (2012) FXR ligands protect against hepatocellular inflammation via SOCS3 induction. *Cellular Signalling* **24**(8), 1658-1664.

## Y

- Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y *et al.* (2004) Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J Biol Chem* **279**(22), 23158-23165.
- Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD, Huang W (2007) Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res* **67**(3), 863-867.

- Yang J, Li Y, Wu L *et al.* (2010) NDRG2 in rat liver regeneration: role in proliferation and apoptosis. *Wound Repair Regen* **18**(5), 524-531.
- Yang JI, Yoon JH, Myung SJ *et al.* (2007) Bile acid-induced TGR5-dependent c-Jun-N terminal kinase activation leads to enhanced caspase 8 activation in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **361**(1), 156-161.
- Yang Q, Graham TE, Mody N *et al.* (2005) Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* **436**(7049), 356-362.
- Yasuda H, Hirata S, Inoue K, Mashima H, Ohnishi H, Yoshida M (2007) Involvement of membrane-type bile acid receptor M-BAR/TGR5 in bile acid-induced activation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinases in gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **354**(1), 154-159.

## Z

- Zhang DW, Jeang KT, Lee CGL (2006) p53 negatively regulates the expression of FAT10, a gene upregulated in various cancers. *Oncogene* **25**(16), 2318-2327.
- Zhang J, Li F, Liu X *et al.* (2006) The repression of human differentiation-related gene NDRG2 expression by Myc via Miz-1-dependent interaction with the NDRG2 core promoter. *J Biol Chem* **281**(51), 39159-39168.
- Zhang Y, Edwards PA (2008) FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett* **582**(1), 10-18.
- Zhang Y, Lee FY, Barrera G *et al.* (2006) Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(4), 1006-1011.
- Zhang Y, Ren J (2011) ALDH2 in alcoholic heart diseases: molecular mechanism and clinical implications. *Pharmacol Ther* **132**(1), 86-95.
- Zhang Y, Wang X, Vales C *et al.* (2006) FXR deficiency causes reduced atherosclerosis in Ldlr<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(10), 2316-2321.
- Zhao A, Lew JL, Huang L *et al.* (2003) Human kininogen gene is transactivated by the farnesoid X receptor. *J Biol Chem* **278**(31), 28765-28770.
- Zhao C, Beaudenon SL, Kelley ML *et al.* (2004) The Ubch8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN- $\alpha/\beta$ -induced ubiquitin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20), 7578-7582.
- Zheng J, Li Y, Yang J *et al.* (2011) NDRG2 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion, migration and invasion by regulating CD24 expression. *BMC Cancer* **11**, 251:251-259.
- Zhou X, He W, Huang Z, Gotto AM, Jr., Hajjar DP, Han J (2008) Genetic deletion of low density lipoprotein receptor impairs sterol-induced mouse macrophage ABCA1 expression. A new SREBP1-dependent mechanism. *J Biol Chem* **283**(4), 2129-2138.
- Zolfaghari R, Ross AC (2000) Lecithin:retinol acyltransferase from mouse and rat liver. CDNA cloning and liver-specific regulation by dietary vitamin a and retinoic acid. *J Lipid Res* **41**(12), 2024-2034.
- Zollner G, Trauner M (2006) Molecular mechanisms of cholestasis. *Wien Med Wochenschr* **156**(13-14), 380-385.
- Zollner G, Wagner M, Moustafa T *et al.* (2006) Coordinated induction of bile acid detoxification and alternative elimination in mice: role of FXR-regulated organic solute transporter-alpha/beta in the adaptive response to bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**(5), G923-932.

## **ANEXOS**





**ABREVIACIONES**

<b>8OHdG</b>	8-hidroxi-2-deoxiguanosina (derivado de la 8-oxoG)
<b>8-oxoG</b>	8-oxo-2-deoxiguanosina
<b>AC</b>	<i>Adenylate cyclase</i>
<b>ACC-1</b>	<i>Acetyl-CoA carboxylase-1</i>
<b>ADH</b>	<i>Alcohol dehydrogenase, EC 1.1.1.1</i>
<b>ADH1</b>	<i>Alcohol dehydrogenase class I</i>
<b>ANGPTL3</b>	<i>Angiopoietin-like protein 3</i>
<b>ARG1</b>	<i>Arginase 1</i>
<b>ASBT</b>	<i>Apical sodium-dependent bile acid transporter</i>
<b>ASL</b>	<i>Argininosuccinate lyase</i>
<b>ASS1</b>	<i>Argininosuccinate synthase 1</i>
<b>ATP</b>	<i>Adenosine-5'-triphosphate</i>
<b>BA</b>	<i>Bile Acid</i>
<b>bp</b>	<i>Base pairs</i>
<b>BSEP</b>	<i>Bile salt extract pump</i>
<b>CA</b>	<i>Cholic Acid</i>
<b>cAMP</b>	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
<b>CAR</b>	<i>Constitutive androstane receptor (NR1H3)</i>
<b>CDCA</b>	<i>Chenodeoxycholic acid</i>
<b>CHD</b>	Enfermedad coronaria del corazón( <i>coronary heart disease</i> )
<b>COX2</b>	<i>Cytochrome C oxidase subunit II</i>
<b>CP</b>	<i>Ceruloplasmin</i>
<b>CPS1</b>	<i>Carbamoyl-P sintetasa</i>
<b>CPT1A</b>	<i>Carnitine palmitoyltransferase I A, liver</i>
<b>CRBP-I</b>	<i>Celular retinol binding protein I</i>
<b>CREB</b>	<i>cAMP-response element-binding proteins</i>
<b>CYP2E1</b>	<i>Cytochrome P4502E1</i>
<b>CYP7A1</b>	<i>Cholesterol 7<math>\alpha</math>-hydroxylase</i>
<b>DAG</b>	<i>Diacylglyceroids</i>
<b>DCA</b>	<i>Deoxycholic acid</i>
<b>DDAH1</b>	<i>Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1</i>
<b>DKO</b>	<i>Double Knockout</i>
<b>DUB</b>	Enzimas de desubiquitinación
<b>E-box</b>	<i>Enhancer Box</i>

---

<b>EGFR</b>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
<b>eNOS</b>	<i>Endothelia NO synthase</i>
<b>FABP</b>	<i>Fatty acid binding protein</i>
<b>FAS</b>	<i>Fatty acid synthase</i>
<b>FFA</b>	<i>Free fatty acids</i>
<b>FGF19</b>	<i>Fibroblast growth factor 19, denominado FGF15 en ratones</i>
<b>FGFR4</b>	<i>Fibroblast growth factor receptor 4</i>
<b>FXR</b>	<i>Farnesoid X Receptor (NR1H4)</i>
<b>G6P</b>	<i>Glucose-6-phosphatase</i>
<b>GLP-1</b>	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
<b>GLUT4</b>	<i>Glucose transporter type 4, insulin-responsive</i>
<b>GPI</b>	<i>Glicosil fospatidilinositol</i>
<b>GPLD1</b>	<i>GPI-specific phospholipase D, GPI-PLD</i>
<b>GS</b>	<i>Glutathione Synthetase</i>
<b>HATs</b>	<i>Histone acetyltransferase</i>
<b>Hb</b>	<i>Hemoglobin</i>
<b>HCC</b>	<i>Hepatocellular carcinoma</i>
<b>HDL</b>	<i>High Density Lipoprotein</i>
<b>HDL-c</b>	<i>High density lipoprotein- cholesterol</i>
<b>H-FABP</b>	<i>Heart- Fatty acid binding protein</i>
<b>HL</b>	<i>Hepatic lipase</i>
<b>HMGCS2</b>	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase mitochondrial</i>
<b>holo-RBP</b>	<i>complejo de retinol unido a RBP</i>
<b>HP</b>	<i>Haptoglobin</i>
<b>HPR</b>	<i>Haptoglobin-related protein</i>
<b>HPX</b>	<i>Hemopexin</i>
<b>IBABP</b>	<i>Ileal bile acid binding protein</i>
<b>IDL</b>	<i>Intermediate Density Lipoptrotein</i>
<b>IL-6</b>	<i>Interleukin 6</i>
<b>il-TMP</b>	<i>Intestinal and liver tetraspan membrane protein (TM4SF4)</i>
<b>iNOS</b>	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
<b>Insig2</b>	<i>Insulin induced gene 2</i>
<b>IPG</b>	<i>Inositol phosphoglycans</i>
<b>IR-1</b>	<i>Inverted repeted element separate one nucleotide</i>
<b>IRES</b>	<i>Internal ribosome entry site</i>
<b>IRES</b>	<i>Internal ribosome entry site</i>

---

<b>IRS-1</b>	<i>Insulin receptor 1</i>
<b>ISG15</b>	<i>IFN-stimulated gene, 15 kDa</i>
<b>JAK/STAT</b>	<i>Janus tyrosine kinases/signal transducer and activators of transcription</i>
<b>JNK</b>	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
<b>LCA</b>	<i>Lithocholic acid</i>
<b>LCAT</b>	<i>Lecithin-cholesterol acyltransferase</i>
<b>LDL</b>	<i>Low density lipoprotein</i>
<b>LDLr</b>	<i>Low density lipoprotein receptor</i>
<b>LPL</b>	<i>Lipoprotein lipase</i>
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharid</i>
<b>LRH-1</b>	<i>Liver receptor homolog-1</i>
<b>MDGI</b>	<i>Mammary-derived growth inhibitor</i>
<b>MDR3</b>	<i>Multidrug resistance gene 3</i>
<b>NAD</b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Forma oxidada del NAD
<b>NADH</b>	Forma reducida del NAD
<b>NDRG2</b>	<i>N-myc downregulated gene 2</i>
<b>NEDD4L</b>	<i>Human neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4 like</i>
<b>NTCP</b>	<i>Na<sup>+</sup>-dependent cholate transporting protein</i>
<b>OST<math>\alpha</math></b>	<i>Organic solute transporter alpha</i>
<b>OST<math>\beta</math></b>	<i>Organic solute transporter beta</i>
<b>OTC</b>	<i>Ornithine transcarbamylase</i>
<b>oxLDL</b>	<i>Oxidized LDL</i>
<b>PA</b>	<i>Phosphatidic acids</i>
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-derived growth factor</i>
<b>PEPCK</b>	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator activated-receptor gamma coactivator-1alpha</i>
<b>PKA</b>	<i>Protein kinase A</i>
<b>PKC<math>\alpha</math></b>	<i>Protein kinase C</i>
<b>PL</b>	<i>Phospholipids</i>
<b>PLTP</b>	<i>Phospholipid transfer protein</i>
<b>PON-1</b>	<i>Paraoxonase 1</i>
<b>PPAR<math>\alpha</math></b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (NR1C1)</i>

---

<b>PPi</b>	<i>Phosphate inorganic</i>
<b>PXR</b>	<i>Pregnane X receptor (NR1H2)</i>
<b>RAR</b>	<i>Retinoic acid receptor (NR1B1)</i>
<b>RBP</b>	<i>Retinol-binding protein</i>
<b>RNAPII</b>	<i>RNA polimerase II</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>RXR</b>	<i>Retinoic X Receptor (NR2B1)</i>
<b>SAA</b>	<i>Serum amyloid A</i>
<b>SHP</b>	<i>Short heterodimer partner (NROB2).</i>
<b>SIRT5</b>	<i>deacetilasa dependiente de NAD</i>
<b>SR-B1</b>	<i>Scavenger receptor class B type I</i>
<b>SREBP-1c</b>	<i>Sterol-regulatory-element-binding protein-1c</i>
<b>STRA6</b>	<i>Stimulated by retinoic acid 6</i>
<b>TCR</b>	<i>Transcription-coupled repair</i>
<b>TG</b>	<i>Triglycerides</i>
<b>TGR5</b>	<i>G protein-coupled bile acid receptor 1</i>
<b>TLF1</b>	<i>Trypanosome lytic factor 1</i>
<b>TLF2</b>	<i>Trypanosome lytic factor 2</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
<b>TNT</b>	<i>Transcription and traduction in vitro</i>
<b>TTR</b>	<i>Transthyretin</i>
<b>UB</b>	<i>Ubiquitin</i>
<b>Ubl</b>	<i>Ubiquitin like protein</i>
<b>VDR</b>	<i>Vitamin D receptor (NR1H1)</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
<b>VLDL</b>	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
<b>VSMC</b>	<i>Vascular smooth muscle cells</i>

## ÓLIGOS

**ÓLIGOS DE CLONAJE EN pGL3-bv**

JCR287 -1986hGPLD1 F	AGTCACGCGTAGCCTCCTGAGTAGCTTGG
JCR288 +94hGPLD1 R	AGTCCTCGAGCTTCTCTGGTGACGTGG
JCR237 mNDRG2 -596 F	TATCATAAGCGGCGGGACTCGGCTGAGGAG
JCR238 mNDRG2 +1829 R	AGTCGCTAGCCTCCTGAAGTTCTGCAATGGTG
JCR253-1975hTM4SF4F	5'-AGTCGGTACCTCAGCACAGTGATGACAGC-3'
JCR254+208hTM4SF4R	5'-AGTCGCTAGCAATCAAAGCTCCTCACTGC-3'

**ÓLIGOS DE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA**

JCR295 dirmutIR1hGPLD1 F	GGCTTGTTTTCTCAATCAgTGATTTGCTTAGAGAGAAGCGGTGGG
JCR296 dirmutIR1hGPLD1 R	CCCACCGCTTCTCTAAGCAAATCAcTGATTGAGGAAACCAAGCC
JCR247 dirmutIR1mNDRG2 F	GGGGAGATTAGAAAGAATTAGTGATTCTGGAATCCTGGGTCTTGGC
JCR248 dirmutIR1mNDRG2 R	GCCAAGACCCAGGATTCCAGAATCACTAATTCTTTCTAATCTCCCC

**ÓLIGOS DE CLONACIÓN EN pGL3-TK**

JCR430 wtIR1+4275hFABP3 F	GATCCGTGATAGGGCAcTCACTTGTTCATGA
JCR431 wtIR1+4275hFABP3 R	GATCTCATGACAAGGTGAATGCCCTATCACG
JCR432 mutIR1+4275hFABP3 F	GATCCGTGATAAAGCATTCAATTTGTTCATGA
JCR433 mutIR1+4275hFABP3 R	GATCTCATGACAAAATGAATGCTTTATCACG
JCR422 +9079hTCEA2 F	GATCCTGGTTTTGGGTCAgTGACCTGAGGTGGTTA
JCR423 +9079hTCEA2 R	GATCTAACACCTCAGGTCAcTGACCCAAACCAG
JCR424 mut +9079hTCEA2 F	GATCCTGGTTTTGAATCAgTGATTTGAGGTGGTTA
JCR425 mut +9079hTCEA2 R	GATCTAACACCTCAAATCAcTGATTCAAACCAG
JCR249 wtIR1+756mNDRG2 F	GATCCTTAGAAAGGGTTAGTGACCCTGGAA
JCR250 wtIR1+756mNDRG2 R	GATCTTCCAGGGTCACTAACCCTTTCTAAG
JCR251 mutIR1+756mNDRG2 F	GATCCTTAGAAAGAATTAGTGATTCTGGAA
JCR252 mutIR1+756mNDRG2 R	GATCTTCCAGAATCACTAATTCTTTCTAAG
JCR273 wtIR1-81hTM4SF4 F	GATCCTAACAGAGGTTATTGGTCTCCATGGCA
JCR274 wtIR1-81hTM4SF4 R	GATCTGCCATGGAGACCAATAACCTCTGTTAG
JCR275 mutIR1-81hTM4SF4 F	GATCCTAACAGAAATTATTGGTTTCCATGGCA
JCR276 mutIR1-81hTM4SF4 R	GATCTGCCATGGAAACCAATAATTTCTGTTAG

**ÓLIGOS EMSA**

JCR404 -6hGPLD1 F	GATCCGTTTTCTCGGTCAGTGACCTGCTTAGA
JCR405 -6hGPLD1 R	GATCTCTAAGCAGGTCAGTACCGAGGAAACG
JCR406 mut-6hGPLD1 F	GATCCGTTTTCTCAATCAGTGATTTGCTTAGA
JCR407 mut-6hGPLD1 R	GATCTCTAAGCAAATCACTGATTGAGGAAACG

JCR408 +9079hTCEA2 F	GATCCTGGTTTGGGTCAAGTACCTGAGGTGGTTA
JCR409 +9079hTCEA2 R	GATCTAACACCTCAGGTCACTGACCCAAACCAG
JCR410 mut+9079hTCEA2 F	GATCCTGGTTTGA <u>A</u> TCAGTGA <u>TT</u> GAGGTGGTTA
JCR411 mut+9079hTCEA2 R	GATCTAACACCTCA <u>A</u> ACTCACTGA <u>TT</u> CAAACCAG
JCR400-81hTM4SF4 F	GATCCTAACAGAGGTTATTGGTCTCCATGGCA
JCR401-81hTM4SF4 R	GATCTGCCATGGAGACCAATAACCTCTGTTAG
JCR402 mut-81hTM4SF4	GATCCTAACAGAA <u>A</u> TTATTGG <u>TT</u> CCATGGCA
JCR403 mut-81hTM4SF4 R	GATCTGCCATGG <u>A</u> ACCAATAA <u>TT</u> TCTGTTAG
JCR412 -5644hUBE2L6 F	GATCCAGCACGGGGGTCAATGCCCTAACCCCA
JCR413 -5644hUBE2L6 R	GATCTGGGGTTAGGGGCATTGACCCCGTGTG
JCR414 mut-5644hUBE2L6 F	GATCCAGCACGGGA <u>A</u> TCAATGCT <u>TT</u> CTAACCCCA
JCR415 mut-5644hUBE2L6 R	GATCTGGGGTTAGA <u>A</u> GCATTGA <u>TT</u> CCCGTGCTG
JCR416 +1938hUBE2L6 F	GATCCAAATGAAGGGCCATTGACCCTGGGTGGA
JCR417 +1938hUBE2L6 R	GATCTCCACCCAGGGTCAATGGCCCTTCATTTG
JCR418 mut+1938hUBE2L6 F	GATCCAAATGAAGA <u>A</u> CCATTGA <u>TT</u> CTGGGTGGA
JCR419 mut+1938hUBE2L6 R	GATCTCCACCCAGA <u>A</u> TCAATGG <u>TT</u> CTTCATTTG
JCR376 hi-BABP FXRE F	GATCCCAGGGTGAATAACCTCGGGGA
JCR377 hi-BABP FXRE R	GATCTCCCCGAGGTTATTCACCTGG

**ÓLIGOS CHIP**

JCR434 hTCEA2 IR CHIP F	CTCTGAAGCCTCATGATTG
JCR435 hTCEA2 IR CHIP R	CAAGCATTCCAAGTTGTAAC
JCR283 hTM4SF4 IR1 -81F	CCTGTCTTCGATTGCAAC
JCR284 hTM4SF4 IR1 -81R	ATTCTCCCTGACCTGAAGTG
JCR261 hSHP IR1 F	AGCTAGTGATAAGGCACTTCC
JCR262 hSHP IR1 R	GTGGCACTGATATCACCTCAG

**SONDAS TAQMAN HUMANAS**

Eukaryotic 18S rRNA Vic MGBprobe 1000Rxn GU

HOMO SAPIENS NR0B2	HS00222677_M1
HOMO SAPIENS NR1H4	HS00231968_M1
HOMO SAPIENS CYP7A1	HS00167982_M1
HOMO SAPIENS GPLD1	HS00155284_M1
HOMO SAPIENS PLA2G1B	HS00386701_M1
HOMO SAPIENS SLC27A2	HS00186324_M1
HOMO SAPIENS ACSM3	HS00194528_M1
HOMO SAPIENS ACSL5	HS00212106_M1
HOMO SAPIENS CRAT	HS00912963_M1
HOMO SAPIENS CROT	HS00221733_M1
HOMO SAPIENS CPT1A	HS00157079_M1
HOMO SAPIENS SLC25A20	HS00386383_M1
HOMO SAPIENS CPT2	HS00988962_M1
HOMO SAPIENS EHHADH	HS00157347_M1
HOMO SAPIENS HMGCS2	HS00194145_M1
HOMO SAPIENS PPAR $\alpha$	HS00947539_M1
HOMO SAPIENS FABP1	HS00155026_M1
HOMO SAPIENS FABP2	HS01573164_G1
HOMO SAPIENS FABP3	HS00269758_M1
HOMO SAPIENS FABP5	HS02339437_G1
HOMO SAPIENS FABP6	HS01031183_M1
HOMO SAPIENS RBP4	HS00924047_M1
HOMO SAPIENS TCEA2	HS00371401_M1
HOMO SAPIENS NDRG2	HS00212263_M1

HOMO SAPIENS TM4SF4	HS00270335_M1
HOMO SAPIENS CPS1	HS00157048_M1
HOMO SAPIENS ASS1	HS00540723_M1
HOMO SAPIENS SIRT5	HS00202043_M1
HOMO SAPIENS HP	HS00605928_G1
HOMO SAPIENS HPR	HS00750565_S1
HOMO SAPIENS UBE2L6	HS01125548_M1
HOMO SAPIENS UBD	HS00197374_M1
HOMO SAPIENS FBXO2	HS00201792_M1
HOMO SAPIENS NEDD4L	HS00969321_M1
HOMO SAPIENS ADH1A	HS00605167_G1
HOMO SAPIENS ADH1B	HS00605175_M1
HOMO SAPIENS ADH1C	HS00817827_M1

**SONDAS TAQMAN DE RATÓN**

MUS MUSCULUS NR0B2	MM00442278_M1
MUS MUSCULUS NR1H4	MM00436419_M1
MUS MUSCULUS GPLD1	MM00433733_M1
MUS MUSCULUS FABP3	MM02342495_M1
MUS MUSCULUS RBP4	MM00803266_M1
MUS MUSCULUS TCEA2	MM00447447_M1
MUS MUSCULUS NDRG2	MM00443483_M1
MUS MUSCULUS TM4SF4	MM00523755_M1
MUS MUSCULUS NEDD4L	MM00459584_M1
MUS MUSCULUS ADH1	MM00507711_M1





**ARTÍCULOS EN PREPARACIÓN**



The Tumor Suppressor N-Myc Downstream Regulated Gene 2 is Regulated by the Farnesoid X Receptor\*

Cédric Langhi<sup>1</sup>, Elena Pedraz-Cuesta<sup>2</sup>, Yolanda Donate, Pedro F. Marrero, Diego Haro, and Joan C. Rodríguez<sup>3</sup>

From the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy and the Institute of Biomedicine of the University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

\*Running Title: *Regulation of NDRG2 by FXR*

To whom correspondence should be addressed: Joan C. Rodríguez, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: 34-934020488; Fax: 34-934024520; E-mail: jcrodriguez@ub.edu

**Keywords:** hepatocarcinoma; tumor suppressor; nuclear receptor; gene expression; bile acids

**Background:** *NDRG2* is a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma (HCC).

**Results:** Farnesoid X receptor (FXR) agonists induce *NDRG2* expression via a transcriptional mechanism.

**Conclusion:** *NDRG2* is a direct FXR target gene and its expression can be induced pharmacologically in HCC cells.

**Significance:** These findings contribute to the understanding of the mechanisms underlying anticancer properties of the metabolic regulator FXR.

#### SUMMARY

Functional and clinical studies have established the role of N-myc downstream-regulated gene 2 (*NDRG2*) as a tumor suppressor in a variety of human cancers, such as hepatocellular carcinoma (HCC). Mice lacking expression of the bile acid-activated farnesoid X receptor (FXR, NR1H4) develop HCC, and low expression of FXR is associated with human HCC progression. Here we report that chenodeoxycholic acid (CDCA) or the synthetic FXR agonist GW4064 robustly induced *NDRG2* expression in human hepatoma cells and primary hepatocytes. Knockdown of FXR abolished the induction by both agonists, whereas overexpression of a constitutively active form of FXR increased *NDRG2* expression. The response to activated FXR appeared to be a primary transcriptional response, as it was not blocked by cycloheximide and a conserved inverted repeat

separated by one nucleotide (IR1) was identified within intronic regions of human and murine *NDRG2* genes as a putative FXR-response element. This site was shown to bind FXR/RXR $\alpha$  heterodimers and to confer FXR responsiveness to the natural and a heterologous promoter. Moreover, mice given a single dose of GW4064 exhibit an increase of *NdrG2* expression in liver and kidney, where both *NDRG2* and FXR are enriched. The identification of *NDRG2* as a direct FXR target gene provides a new potential mechanism whereby FXR may exert its anticancer properties, and suggest that modulation of this nuclear receptor may be used for therapeutic intervention in liver cancer. Given the role of FXR as a key metabolic regulator, our findings shed new light on the link between metabolism and cancer.

Liver cancer, predominantly consisting of hepatocellular carcinoma (HCC), is the fifth most common cancer worldwide and the third leading cause of cancer death (1). Tumor metastasis and recurrence represent the most critical factors linked with poor prognosis and death in HCC. These processes are mediated by the genes regulating diverse molecular pathways such as tumor-cell survival, proliferation, adhesion, motility, invasiveness, and others (2). Both inhibiting the promoters of tumor growth and displacement and inducing the expression of the tumor metastasis suppressors are considered as valid means of reducing tumor growth and preventing metastasis (3). Recently, N-myc

downstream-regulated gene 2 (*NDRG2*) was identified as a novel tumor metastasis suppressor in HCC (4, 5). *NDRG2* belongs to the *NDRG* family, comprised of four members, *NDRG1-4*, which are reportedly involved in cell proliferation and differentiation (6, 7). *NDRG* proteins are characterized by having an  $\alpha/\beta$  hydrolase-fold region. However, none of them has the expected catalytic signature residues required to function as hydrolase (8). Accordingly, a recent crystallographic analysis suggests that *NDRG2* is a non-enzymatic member of the  $\alpha/\beta$  hydrolase superfamily, while supporting its role as tumor suppressor (9). Although the precise molecular function of *NDRG2* is not yet known, accumulated data indicate that it plays a major role in the suppression of tumorigenesis. *NDRG2* is highly expressed in many normal tissues, especially in the brain, heart, skeletal muscle, liver, and kidney, whereas low expressed or undetectable in a variety of human cancer cell lines and carcinomas (6, 7, 10-14). In HCC, *NDRG2* expression is down-regulated compared to normal adjacent tissues. Furthermore, low expression of *NDRG2* may serve as a prognostic biomarker for malignant transformation in hepatocytes. In addition, it has been demonstrated that *NDRG2* overexpression diminishes the proliferative, invasive and migratory abilities of HCC cells (4, 5). In line with its role in hepatocyte proliferation and differentiation, *NDRG2* was recently identified as a cell cycle and apoptosis regulator in liver regeneration (15).

Several studies have shown that the expression of human *NDRG2* is strongly regulated at transcriptional level by cell growth, proliferation, stress and hormonal responses in different tissues and cell lines. *NDRG2* is repressed by Myc in HeLa, intestinal Caco-2, HT-29, and leukemia cells (16), while it is induced by Wilms' tumor gene 1 protein in hematopoietic cells (17), and by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and p53 in lung adenocarcinoma A549 cells (18, 19). Recently, Yao and colleagues have shown that estrogen up-regulates *NDRG2* in HeLa and human salivary gland epithelial cells (20). Given the recognized role of *NDRG2* in the suppression of HCC metastasis, the identification of factors capable of inducing hepatic *NDRG2* expression may provide new opportunities for therapeutic intervention in liver cancer.

The farnesoid X receptor  $\alpha$  (*FXR $\alpha$* , NR1H4, hereafter referred to as *FXR*), a member of the nuclear hormone receptor superfamily, is the chief sensor of intracellular levels of bile acids (21). *FXR* is highly expressed in the liver, kidney, intestine and the adrenal gland. In response to bile acid binding, *FXR* transcriptionally regulates a variety of genes involved in bile acid, lipid and glucose metabolism (22, 23). Beyond its established function as a key regulator of metabolism, recent studies indicate that *FXR* also plays roles in preventing intestinal bacterial infection (24) and in modulating normal liver regeneration (25). Importantly, since two independent groups reported that the loss of *FXR* in *Fxr*-null mice resulted in spontaneous hepatocarcinogenesis (26, 27), considerable research efforts have been focused on the identification of the underlying mechanisms of liver cancer inhibition by *FXR* and its relevance in the pathogenesis of human HCC (28). Subsequently, various studies have shown that *FXR* expression in human HCC samples was decreased compared to normal liver tissues (29-31). Moreover, Huang and co-workers (31) demonstrated that proinflammatory cytokines, which were up-regulated in human HCC, decreased *FXR* expression. Consistent with this observation, the down-regulation of *FXR* by miR-421 promoted the proliferation, migration, and invasion of HCC cells (32). Conversely, the activation of *FXR* with GW4064, a synthetic ligand for *FXR*, inhibited the growth of HCC cells (33). Not with standing, the specific nature of the *FXR* target genes involved in the inhibition of liver cancer is still unknown. In the present study, we demonstrate that *NDRG2* is a direct gene of *FXR* in liver and HCC cells. This is, to our knowledge, the first report describing a direct regulation of a tumor suppressor gene by *FXR*. Thus, our results provide evidence for a novel potential mechanism whereby *FXR* may protect against hepatocarcinogenesis.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Plasmids**—A 2.4-kb fragment containing the 5' flanking region, first exon, first intron, and part of the second exon of the murine *NdrG2* gene was amplified by PCR from genomic DNA using a forward primer upstream of a natural *KpnI* restriction site (5'-TAT CAT AAG CGG CGG

GAC TCG GCT GAG GAG-3') and a reverse primer tailed with an *NheI* site (5'-AGT CGC TAG CCT CCT GAA GTT CTG CAA TGG TG-3'). The PCR product was digested with *KpnI* and *NheI* and subcloned into the promoterless firefly (*Photinus pyralis*) luciferase reporter pGL3-basic plasmid vector (Promega) to obtain construct p-437/+1966NDRG2. Mutagenesis of this plasmid was performed using the QuickChange™ site-directed mutagenesis kit (Stratagene) with the following primers: 5'-GGG GAG ATT AGA AAG AAT TAG TGA TTC TGG AAT CCT GGG TCT TGG C-3' and 5'-GCC AAG ACC CAG GAT TCC AGA ATC ACT AAT TCT TTC TAA TCT CCC C-3' (the altered nt are in bold and underlined type). The vector pGL3-TK contains a fragment corresponding to nt -109 to +20 of the thymidine kinase (TK) gene promoter of herpes simplex virus subcloned into the *Bg/II/HindIII* sites of pGL3-basic vector. The reporter plasmids p(NDRG2IR1)*n*-TK (*n* = 1, 2, 4) were generated by insertion of 1, 2, or 4 copies of a double-stranded oligonucleotide (obtained by annealing 5'-GAT CCT TAG AAA GGG TTA GTG ACC CTG GAA-3' and 5'-GAT CTT CCA GGG TCA CTA ACC CTT TCT AAG-3') into the *Bg/II* site of pGL3-TK. Similarly, the four-copy mutant IR1 construct p(mutNDRG2IR1)<sub>4</sub>-TK was generated by annealing 5'-GAT CCT TAG AAA GAA TTA GTG ATT CTG GAA-3' and 5'-GAT CTT CCA GAA TCA CTA ATT CTT TCT AAG-3' before ligation into *Bg/II*-digested pGL3-TK. The integrities of all plasmids were verified by DNA sequencing. Plasmids expressing cDNA for human retinoid X receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ , NR2B1) and FXR into pSG5 have been previously described (34).

*Animal Experiments* —All experimental protocols with mice were performed with the approval of the animal ethics committee of the University of Barcelona (Barcelona, Spain). C57BL/6J mice and *Fxr*-null mice (35) on a C57BL/6J background (*FXR*<sup>-/-</sup>, #007214) were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Animals were housed under controlled conditions (temperature-controlled facility with a 12 h/12 h dark/light cycle) with food and water *ad libitum*. 10-week-old male C57BL/6 and *FXR*<sup>-/-</sup> were injected i.p. with either vehicle (corn oil 5% DMSO) or GW4064 (provided by GlaxoSmithKline, Research Triangle

Park, NC) dissolved in vehicle (10 mg/ml) at a dose of 50 mg/kg and then fasted for 8 h before sacrificed for tissue collection. Livers and kidney were excised, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further processing.

*Cell Culture and Treatment Conditions*—Human hepatoma HepG2 and Huh7 cells and mouse hepatoma Hepa 1-6 cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin G, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and heat-inactivated 10% (v/v) FBS. Mouse immortalized hepatocytes AML12 were grown in DMEM/Ham's F-12 medium supplemented with 10% FBS, 100 mM dexamethasone, and ITS (insulin, transferrin, and sodium selenite, Roche Applied Science). Human primary hepatocytes were obtained commercially (Ready Heps™ Fresh Hepatocytes, Lonza, Basel, Switzerland) and maintained in Hepatocyte Complete Medium (HCM™ bulletkit, Lonza). Cells were treated with GW4064, chenodeoxycholic acid (CDCA), or the vehicle (DMSO) in the same medium supplemented with 10% charcoal stripped FBS (Biological Industries). Unless specified, the cells were treated for 24 h. Cycloheximide was purchased from Sigma Aldrich.

*siRNA Transfection*—For siRNA-mediated FXR knockdown experiments, the human FXR siGENOME SMARTpool (M-003414-01) or siGENOME Non-Targeting siRNA #1 (D-001210-01) purchased from Dharmacon (Lafayette, CO) were used to transfect Huh7 cells with the DharmaFECT 4 Transfection Reagent (Dharmacon) at a final concentration of 25 nM each for 48 h, followed by 24 h of treatments as described above.

*Adenoviral Infection*—Adenoviruses expressing VP16 (AdVP16) or VP16FXR chimeras (AdVP16FXR) were gifts from Dr. A. Moschetta (Consorzio Mario Negri Sud, Chieti, Italy) and were previously described (36). Huh7 and Hepa 1-6 cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 25 or 50 for 48 h.

*Cell Transfection and Reporter Assays*—HepG2 cells were transiently transfected using FuGENE 6 (Roche Applied Science) transfection reagent according to the manufacturer's instructions. Typically, each well of a 12-well plate received 100 ng of firefly luciferase reporter plasmid and, when indicated, 200 ng of plasmid

expressing human FXR. Effector plasmid dosage was kept constant by the addition of appropriate amounts of the empty expression vector pSG5. 10 ng/well of *Renilla* luciferase plasmid pRL-CMV (Promega) was included in all transfections as an internal control for transfection efficiency. After 6h, cells were treated for 24 h with the vehicle (DMSO), 100  $\mu$ M CDCA, or 1  $\mu$ M GW4064 as described above. Luciferase activities were assayed as previously described (37). Firefly luciferase activities were normalized to *Renilla* luciferase activity. All transfections were performed in triplicate, and similar results were obtained in at least three independent experiments.

**Western Blot Analysis**—Whole protein cell extracts were obtained from cultured cells or liver and kidney of mice. Briefly, cells were homogenized in Nonidet P-40 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% Nonidet P-40) supplemented with a mixture of protease inhibitors (Sigma Aldrich) and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma Aldrich). Equal amounts of protein (30-50  $\mu$ g) were run in 10% polyacrylamide gels and then transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA) and probed with different antibodies: anti-NDRG2 (1:200, Abnova, cat# H00057447-M03); anti-FXR (1:1000, Invitrogen, cat# A9033A); and anti-actin (1:1000, Sigma Aldrich, cat# A2066). Signal was detected using a EZ-ECL Chemiluminescence Detection Kit for HRP (Biological Industries).

**RNA Isolation and Real-time Quantitative PCR Analysis**—Total RNA was isolated from cells or mouse biopsies by using Tri-Reagent (Ambion) and was further treated with DNase I (Ambion). cDNA was synthesized from total RNA (1  $\mu$ g) by murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) and p(dN)6 random primers (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. cDNA was subjected to real-time quantitative PCR (qPCR) using Platinum<sup>®</sup> Quantitative PCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen) and the specific TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay probes (Applied Biosystems): *NDRG2*, Hs00212263\_m1; *PLTP*, Hs01067287\_m1; *NR0B2*, Hs00222677\_m1; *NR1H4*, Hs00231968\_m1; *Ndr2*, Mm00443483\_m1; *Nr0b2*, Mm00442278\_m1. Relative mRNA abundance was obtained by normalizing to 18S levels (Applied Biosystems).

**In Silico Analysis of FXR Response Elements (FXREs)**—The analysis of genomic sequences for the identification of putative FXREs in human and mouse NDRG2 genes was performed using the NUBIScan computer algorithm ([www.nubiscan.unibas.ch/](http://www.nubiscan.unibas.ch/)), which relies on the combination of nucleotide distribution weight matrices of published functional hexamer half-sites. The alignment of sequences of different mammals was carried out using VISTA tools ([genome.lbl.gov/vista/index.shtml](http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml)).

**In Vitro Transcription/Translation and Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**—Human RXR $\alpha$  and FXR proteins were synthesized in vitro from the corresponding expression plasmids as previously described (34). In order to obtain an unprogrammed lysate as a negative control for EMSA, a reaction was performed with the empty vector pSG5. The lysate volumes were kept constant by the addition of unprogrammed lysate. Double-stranded oligonucleotides corresponding to the sequence spanning nt +887 to +911 of *Ndr2* (NDRG2IR1) was radiolabeled and used as probe as previously described (34). For competition experiment, increasing fold molar excess of unlabeled probe NDRG2IR1, or a modified version harboring mutations in the IR1 hexamers described under "Plasmids" (mutNDRG2IR1), were included during a 15 min preincubation on ice. A cold probe containing the FXRE of the human ileal-bile acid-binding protein (*I-BABP*) gene promoter (38) was used as a control.

**Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay**—HepG2 cells were treated with 1% formaldehyde for 10 min at 37 °C, and then disrupted in lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8) with protease inhibitors (1 mM PMSF and Protease Inhibitor Cocktail from Sigma Aldrich) for 10 min at room temperature. Chromatin was sonicated to shear DNA to an average length between 200 and 1000 bp and then precleared using Protein A/G PLUS Agarose (sc-2003, Santa Cruz Biotechnology). The precleared sheared chromatin was immunoprecipitated overnight with 5  $\mu$ g of anti-FXR (sc-1204 X, Santa Cruz Biotechnology) or goat IgG (I9140, Sigma Aldrich) as negative control. Precipitated DNA was extracted with phenol/chloroform and resuspended in 50  $\mu$ l of water. Input and immunoprecipitated DNA were subjected to PCR

amplification using primers encompassing the FXRE in the proximal promoter of human *NROB2* (5'-AGC TAG TGA TAA GGC ACT TCC-3' and 5'-GTG GCA CTG ATA TCA CCT CAG-3'), the putative FXRE in the second intron of human *NDRG2* (5'-CCT CTT ACC TCC ACA TCA GC-3' and 5'-ACA CAG CAA CGA GGT GAA TG-3'), or an unrelated genomic region from the human alcohol dehydrogenase gene cluster lacking any functional FXRE (C. Langhi and J. C. Rodríguez, unpublished results) (5'-AGG AGA CAT CGG ATC TTC TGG-3' and 5'-CTG TCA TGC TAG CAT CTC TCC-3'). The PCR products were electrophoresed in a 2% (w/v) agarose gel, visualized by staining with ethidium bromide, quantified by ImageJ and normalized by input amplification.

*Statistical Analysis*—Data are expressed as mean  $\pm$  SEM as determined by analysis of multiple independent samples, as indicated in figure legends. Significant differences were assessed using a two-tailed Student's *t* test. Values of  $p < 0.05$  were considered to be significant.

## RESULTS

*Human Hepatic NDRG2 mRNA and Protein Levels Are Increased by FXR Ligands*—Microarray analysis revealed that expression of *NDRG2* is up-regulated by FXR agonists.<sup>5</sup> To confirm this observation, human hepatocarcinoma Huh7 were treated with increasing concentrations of CDCA, the most potent bile acid agonist of FXR, or GW4064, a synthetic specific FXR agonist, for 24 h and the endogenous expression of *NDRG2* was determined by real time qPCR. As shown in Fig. 1*A*, treatment with both FXR ligands resulted in a dose-dependent increase in the levels of *NDRG2* mRNAs. To ensure that the induction of *NDRG2* by FXR ligands is not limited to a single hepatoma cell line, we also analyzed RNA from human hepatoma HepG2 cells after 24 h of treatment with the FXR ligands, obtaining similar results (Fig. 1*B*).

In order to extend our results to a more physiologically relevant system, we treated human primary cultured hepatocytes with CDCA or GW4064 for 24 h. As shown by real time qPCR, both FXR agonists induced mRNA levels of *NDRG2* and phospholipid transfer protein (*PLTP*), an established FXR target gene (39, 40), to a similar extent (Fig. 1, *C*).

Next, Western blot analyses performed on whole cell lysates from Huh7 incubated for 24 h with CDCA, GW4064, or vehicle revealed that the quantity of *NDRG2* protein was robustly increased (15-fold) by both FXR ligands (Fig. 1, *D*).

*Induction of NDRG2 Expression by CDCA and GW4064 Requires FXR Expression*—Since bile acids may exert their actions through FXR-independent pathways, we silenced FXR by siRNA to determine whether the induction of *NDRG2* expression observed upon treatment with CDCA was really dependent on FXR expression. Huh7 cells were therefore transfected with non-targeting siRNA or siRNA complexes directed against FXR (siFXR) before ligand treatments. siFXR-mediated knock-down of endogenous FXR levels (Fig. 2, *A* and *B*) completely blocked the induction of *NDRG2* expression by CDCA (Fig. 2*C*). Similarly, as shown in Fig. 2*D*, we also confirmed by siFXR the dependence on FXR in the response to GW4064 to rule out any effect of this synthetic ligand that could relate to weak agonistic effects on other receptors (41). As a control, GW4064- and CDCA-dependent increase of the mRNA levels of *NROB2* (hereafter referred to as *SHP*), a previously characterized FXR target gene (42, 43), was similarly attenuated in siFXR-transfected cells (Fig. 2, *C* and *D*). These data not only confirms the mediation of FXR in the pharmacological response to GW4064 but also establish the essential role of FXR in the physiological regulation of *NDRG2* by bile acids.

*Gain-of-function on FXR Induces NDRG2 Expression*—To further confirm the ability of FXR to induce *NDRG2* expression in hepatic cells, we performed gain-of-function studies by ectopically expressing a chimera of FXR and transcriptional activator VP16 (VP16FXR) that is constitutively active. As demonstrated in Fig. 2*E*, infection of Huh7 cells with increasing MOIs of adenoviruses expressing VP16FXR resulted in a dose-dependent response induction of *NDRG2* expression compared to adenovirus expressing VP16 alone.

*Mouse Hepatic NdrG2 Expression is Induced by Activated FXR*—To examine whether activation of FXR also induces the murine *NdrG2* gene expression, we analyzed RNA from treated AML12 cells, a non tumorigenic established cell line from mouse normal liver that retains the capacity to express 33% of the *Fxr* mRNA levels

expressed in liver (44). CDCA and GW4064 treatments strongly increased expression of *Ndr2* mRNA (Fig. 3A). On the other hand, no induction of *Ndr2* expression was observed in mouse hepatoma Hepa 1-6 cells (Fig. 3B), a cell line that express over 600-fold less *Fxr* mRNA than mouse liver (45). Indeed, in contrast to Huh7, we were unable to detect FXR protein content in Hepa 1-6 (Fig. 3C). However, a significant induction of *Ndr2* expression was observed in Hepa 1-6 when FXR was ectopically overexpressed (Fig. 3, C and D). We next treated mice with either vehicle or 50 mg/kg of GW4064 for 8 h and determined liver NDRG2 protein levels by Western blot analysis. The data in Fig. 3E, demonstrate that NDRG2 levels were significantly increased by GW4064 *in vivo*. Taken together, these expression data indicate that hepatic regulation of the *NDRG2/Ndr2* gene by FXR shares a conserved mechanism between human and mouse.

*Ndr2* Expression is Induced by Activated FXR in Kidney—*Ndr2* was initially characterized as an early aldosterone-induced gene in rat kidneys (46). Thereafter, it was proposed that NDRG2 may affect the function of the epithelial sodium channel (ENaC) (47), which is localized in the apical membranes of sodium absorbing epithelia like the distal nephron and hence plays a key role in the maintenance of blood pressure. Furthermore, NDRG2 appears to be involved in the suppression of renal cell carcinoma tumorigenesis and malignant transformation (14). Given these roles of NDRG2 in renal function and since both FXR and NDRG2 are enriched in kidney, we investigated whether *Ndr2* expression was regulated by FXR activation in this organ. Real time qPCR data shown in Fig. 3F demonstrate that the i.p. administration of the FXR ligand GW4064 induced *Ndr2* expression in kidneys of wild-type mice. In contrast, *Ndr2* mRNA were unaffected by administration of GW4064 in FXR<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3F). Activation of FXR *in vivo* also increased *Shp* mRNA levels in the kidneys of wild-type, but not FXR<sup>-/-</sup> mice. In addition, we determined by Western blot that GW4064 treatment markedly increased renal NDRG2 protein levels of wild-type, but not FXR<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3G).

*Induction of NDRG2 mRNA Levels by Activated FXR Is a Primary Response*—In order to determine whether protein synthesis is required for the induction of *NDRG2* mRNA by FXR ligands,

HepG2 cells were treated with vehicle or FXR ligands for 8 h in the presence or absence of cycloheximide. As shown in Fig. 4, induction of *NDRG2* mRNA by CDCA or GW4064 is independent of protein synthesis. A similar pattern was observed for *SHP*, a primary target gene of FXR. It is worth noting that the cycloheximide-dependent superinduction of *SHP* mRNA (Fig. 4) is a phenomenon previously observed (Fig. 3A in Ref. 48), which is consistent with a protein synthesis mediated auto-repression of *SHP* (42, 43). Consequently, we conclude that the induction of *NDRG2* mRNA by both FXR ligands is expected to be a primary response, as it occurs in the absence of protein synthesis.

*Identification of a Putative FXRE within Intronic Regions of NDRG2/Ndr2 Genes*—Most known FXREs consist of an inverted repeat of the hexanucleotide motif RGGTCA with minor variants spaced by one nucleotide (IR1) (40). Therefore, we scanned the 5' flanking regions of human and mouse *NDRG2/Ndr2* genes for putative FXREs using the NUBIScan computer algorithm. However, no putative IR1 was identified in the region 10 kb upstream of the transcription start site (TSS) of any of these genes. Further *in silico* analysis of the intronic regions led to the identification, as the best hit, of a putative IR1 present within the second intron of human *NDRG2* gene (at +1560 from TSS) and the first intron of murine *Ndr2* gene (at +894 from TSS) that matched the consensus for FXREs (Fig. 5A). Sequence alignment using VISTA tools (see "Experimental Procedures") revealed that this IR1 is conserved in several mammalian species (Fig. 5B).

*Functional Characterization of a Putative FXRE of the Ndr2 Gene*—To assess the functionality of this putative FXRE, we performed transient transfection assays in HepG2 cells with a luciferase reporter construct under the control of a 2.4-kb fragment containing the proximal promoter region plus exon 1, intron 1, and part of exon 2 of the *Ndr2* gene (p-437/+1966NDRG2) in the presence or absence of a plasmid encoding FXR and the cells were then incubated for 24 h with the natural (CDCA) and the synthetic (GW4064) FXR agonists. As shown in Fig. 5C, CDCA and GW4064 alone significantly increased luciferase activity. Cotransfection of the FXR expression plasmid robustly enhanced gene activation in



response to both FXR agonists. These effects were dependent on *NdrG2* sequences, because the promoterless pGL3-basic vector was not affected (Fig. 5C). Importantly, mutation of this IR1 element completely abolished the response to activated FXR (Fig. 5D). These results demonstrate that the single FXRE in the first intron of *NdrG2* is critical for transcriptional activation in response to FXR agonists.

Next, this IR1 motif was tested in the context of heterologous promoter to evaluate whether it is sufficient to confer FXR-mediated regulation. HepG2 cells were transfected with constructs that carried one, two or four copies of the *NdrG2* IR1 site upstream of the TK promoter and the luciferase reporter gene (p(NDRG2IR1)<sub>n</sub>-TK) along with a plasmid encoding FXR in the presence or the absence of GW4064. As demonstrated in Fig. 5E, activated FXR enhanced the activity of *NdrG2* IR1-driven promoter constructs in a copy-dependent manner, whereas a reporter construct with the TK promoter alone or with four copies of a mutated version of *NdrG2* IR1 (p(mutNDRG2IR1)<sub>4</sub>-TK) was not stimulated at all, thereby confirming that this IR1 functions as a genuine FXRE.

**Binding Analysis of FXR to the *NdrG2*/*NDRG2* IR1 Element**—With a few reported exceptions, FXR binds to an FXRE as a heterodimer with RXR $\alpha$ . Direct binding of FXR/RXR $\alpha$  heterodimers to the *NdrG2* IR1 element was examined. For this purpose, EMSAs were performed using *in vitro* translated FXR and RXR $\alpha$  and a radiolabeled double-stranded oligonucleotide containing the *NdrG2* IR1 element. As shown in Fig. 6A, neither FXR nor RXR $\alpha$  alone bound to the probe (*lanes 2 and 3*). However, when both FXR and RXR $\alpha$  proteins were present, a complex with the radiolabeled probe was formed, indicating that the IR1 element is bound by FXR/RXR $\alpha$  heterodimers (*lane 4*). The specificity of this retarded complex was demonstrated by competition analysis showing that it was competed away by increasing concentrations of either the unlabeled NDRG2IR1 probe (Fig. 6A, *lanes 5-7*) or a cold probe containing a well characterized IR1/FXRE from the *I-BABP* proximal promoter (Fig. 6A, *lanes 11-13*), whereas it was relatively unaffected by the presence of the unlabeled DNA containing the mutated IR1 sequence (mutNDRG2IR1) (Fig. 6A,

*lanes 8-10*). To investigate whether *NDRG2* IR1 binds FXR *in vivo*, we performed ChIP using HepG2 cells. The data in Fig. 6B demonstrate that FXR was bound to the intronic region in the *NDRG2* gene containing the identified IR1. As a positive control we also analyzed the proximal promoter of *SHP* (Fig. 6B), which contains a previously identified functional FXRE (42, 43).

## DISCUSSION

Clinical observations showing inverse correlation between the level of expression of *NDRG2* and the degree of tumor aggressiveness in HCC, along with experimental data showing that ectopically expression of *NDRG2* suppressed malignancy of human hepatoma models (4, 5, 49, 50), and accumulating data from many kinds of human cancers in other tissues (6, 10-12), have established *NDRG2* as a tumor suppressor. Reduction of *NDRG2* expression in hepatoma cell lines and primary tumors has been intimately associated with promoter hypermethylation (4, 51). In the present study we report for the first time a treatment with small molecules that can overcome transcriptional repression of *NDRG2* in hepatoma cells. Our data show that *NDRG2* mRNA and protein levels were strongly increased in response to FXR ligands in human hepatoma cell lines. We have ascertained that these responses depend on FXR and do not require the synthesis of intermediate proteins. This regulation by FXR is conserved in mice. As demonstrated by mutation analysis in transient transfection and binding experiments, induction by FXR may be attributed to an IR1 located in the first intron of *NdrG2* gene. This element, which we identified by NUBIScan computer analysis as the best hit, was also found to be enriched in genome-wide FXR binding analysis in mouse liver (52, 53). We have also identified this element in the second intron of human *NDRG2* gene, where we have demonstrated the binding of FXR. Taken together, our results demonstrate that *NDRG2* is a direct target of FXR.

Mice lacking expression of *Fxr* have elevated levels of serum and hepatic bile acids, an increased bile acid pool size (35), and a high incidence of liver tumors (26, 27). Since endogenous bile acids have been previously proposed as carcinogens due to reported deleterious effects related to tumor promotion,

including induction of reactive oxygen species, inflammatory signals and DNA damage (54), the cause for the development of HCC in *Fxr*-null mice was attributed to the chronic exposure to elevated bile acids. Indeed, lowering bile acid pool in *Fxr*<sup>-/-</sup> mice by a 2% cholestyramine feeding significantly reduced malignant lesions (27). However, as proposed by the authors of the latter study, other factors, in addition to higher levels of bile acids, are not excluded (27), and it is possible that FXR may work as a tumor suppressor (28). Consistent with this hypothesis, Moschetta and colleagues (36) demonstrated that activation of FXR suppresses intestinal tumorigenesis, whereas loss of FXR and not merely elevated bile acid concentrations *per se* increases susceptibility to tumorigenesis. In this context, genes involved in cell cycle, including cyclin D1 and cyclin E, were up-regulated in aging *Fxr*<sup>-/-</sup> mice but not in wild-type controls (27, 29). Similarly, there was increased activation of  $\beta$ -catenin pathway in HCC of *Fxr*-null mice (29). Moreover, given the role of FXR in antagonizing the NF- $\kappa$ B signaling (55) and the strong hepatic inflammation displayed by *Fxr*-null mice, the possibility exists that the protection by FXR is the indirect result of suppression of inflammation (23, 27). However, if considering the intervention of tumor suppressors, the particular FXR target genes involved in protection against liver cancer have remained unknown. Therefore, *NDRG2* may mediate a novel mechanism for FXR actions. Notably, up-regulation of *NDRG2* protein reduces cyclin D1 and cyclin E, but not other cyclins, in renal carcinoma cells (56), attenuates  $\beta$ -catenin signaling in colon carcinoma cells (57), and suppresses NF- $\kappa$ B activity in fibrosarcoma cells (58). However, despite exhaustive efforts we have not been able to demonstrate a clear FXR/*NDRG2*/ $\beta$ -catenin and/or NF- $\kappa$ B axis in hepatoma cells. This paradox suggest that other factors, in addition to *NDRG2*, should be involved in the anticancer properties of FXR. Remarkably, both FXR and *NDRG2* have been described as regulators of liver regeneration (15, 25). Thus, it is tempting to speculate that during liver regeneration, after the initial stages of cytokine production and hepatocyte proliferation, *NDRG2* may protect the liver to enter endless cycles of injury/repair that would keep producing inflammatory factors that are tumor promoters.

Therefore, it remains as an interesting question for future research to determine whether *NDRG2* is required for a proper modulation of normal liver regeneration by FXR.

Activation of FXR induced *NDRG2* expression in human primary cultured hepatocytes. In as much as the exact molecular mechanisms for the biological functions displayed by *NDRG2* are not yet known, it is difficult to deduce the physiological role for FXR mediated up-regulation of *NDRG2*. In addition to tumor suppression, cell differentiation and stress responses (6), *NDRG2* has also been related to the regulation of sodium gradient in several reports. First, *NDRG2* was identified as a mineralocorticoid-induced gene in renal cortical collecting duct, the site of aldosterone-regulated sodium absorption (46). Later, it was detected as a substrate of serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1), a regulator of ENaC activity (59). Thereafter, studies in heterologous expression systems showed that co-expression of *NDRG2* and ENaC resulted in a stimulation of ENaC-mediated Na<sup>+</sup> currents (47). More recently, Yao and co-workers have shown that *NDRG2* directly binds and stabilizes the  $\beta$ 1-subunit of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, the motor of sodium reabsorption. By increasing the abundance of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\beta$ 1 protein, *NDRG2* promotes the formation of an electrochemical gradient of Na<sup>+</sup> across the basolateral plasma membrane, leading to low cytosolic concentrations of Na<sup>+</sup>, which ultimately activates ENaC in the apical membrane of epithelial cells, facilitating the reabsorption of Na<sup>+</sup> (20). Based on the current data showing regulation of *NdrG2* expression by FXR in kidney, we anticipate that characterization of a potential role of FXR in regulating sodium reabsorption and fluid volume homeostasis is an interesting area of future investigation. Additionally, it is noteworthy that the driving force for bile formation in hepatocytes comes from the sodium gradient created by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, to which bile salt transport is coupled (60). Further studies will be required to define a potential connection of *NDRG2* to bile acid transport.

In conclusion, our results have demonstrated that activation of FXR specifically induces the expression of a tumor suppressor gene, *NDRG2*. These data underscores the role of FXR in the protection against hepatocarcinogenesis, and

suggest that modulation of this nuclear receptor may potentially provide a basis for future therapeutic intervention in liver cancer. Moreover, given the established role of FXR in metabolism, the elucidation of the rationale for physiological regulation of *NDRG2* by FXR will likely have general implications for the link between metabolic regulation and cancer.

## REFERENCES

1. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer. J. Clin.* **61**, 69-90
2. Gupta, G. P., and Massagué, J. (2006) Cancer metastasis: Building a framework. *Cell* **127**, 679-695
3. Nguyen, D. X., Bos, P. D., and Massagué, J. (2009) Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 274-284
4. Lee, D. C., Kang, Y. K., Kim, W. H., Jang, Y. J., Kim, D. J., Park, I. Y., Sohn, B. H., Sohn, H. A., Lee, H. G., Lim, J. S., Kim, J. W., Song, E. Y., Kim, D. M., Lee, M. N., Oh, G. T., Kim, S. J., Park, K. C., Yoo, H. S., Choi, J. Y., and Yeom, Y. I. (2008) Functional and clinical evidence for NDRG2 as a candidate suppressor of liver cancer metastasis. *Cancer Res.* **68**, 4210-4220
5. Zheng, J., Li, Y., Yang, J., Liu, Q., Shi, M., Zhang, R., Shi, H., Ren, Q., Ma, J., Guo, H., Tao, Y., Xue, Y., Jiang, N., Yao, L., and Liu, W. (2011) NDRG2 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion, migration and invasion by regulating CD24 expression. *BMC Cancer* **11**, 251:1-9
6. Yao, L., Zhang, J., and Liu, X. (2008) NDRG2: A myc-repressed gene involved in cancer and cell stress. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **40**, 625-635
7. Melotte, V., Qu, X., Ongenaert, M., van Crielinge, W., de Bruine, A. P., Baldwin, H. S., and van Engeland, M. (2010) The N-myc downstream regulated gene (NDRG) family: Diverse functions, multiple applications. *FASEB J.* **24**, 4153-4166
8. Shaw, E., McCue, L. A., Lawrence, C. E., and Dordick, J. S. (2002) Identification of a novel class in the alpha/beta hydrolase fold superfamily: The N-myc differentiation-related proteins. *Proteins* **47**, 163-168
9. Hwang, J., Kim, Y., Kang, H. B., Jaroszewski, L., Deacon, A. M., Lee, H., Choi, W. C., Kim, K. J., Kim, C. H., Kang, B. S., Lee, J. O., Oh, T. K., Kim, J. W., Wilson, I. A., and Kim, M. H. (2011) Crystal structure of the human N-myc downstream-regulated gene 2 protein provides insight into its role as a tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* **286**, 12450-12460
10. Zhao, H., Zhang, J., Lu, J., He, X., Chen, C., Li, X., Gong, L., Bao, G., Fu, Q., Chen, S., Lin, W., Shi, H., Ma, J., Liu, X., Ma, Q., and Yao, L. (2008) Reduced expression of N-myc downstream-regulated gene 2 in human thyroid cancer. *BMC Cancer* **8**, 303
11. Furuta, H., Kondo, Y., Nakahata, S., Hamasaki, M., Sakoda, S., and Morishita, K. (2010) NDRG2 is a candidate tumor-suppressor for oral squamous-cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1785-1791
12. Lorentzen, A., Lewinsky, R. H., Bornholdt, J., Vogel, L. K., and Mitchelmore, C. (2011) Expression profile of the N-myc downstream regulated gene 2 (NDRG2) in human cancers with focus on breast cancer. *BMC Cancer* **11**, 14
13. Li, W., Chu, D., Chu, X., Meng, F., Wei, D., Li, H., and Sun, B. (2011) Decreased expression of NDRG2 is related to poor overall survival in patients with glioma. *J. Clin. Neurosci.* **18**, 1534-1537
14. Liang, Z. L., Kang, K., Yoon, S., Huang, S. M., Lim, J. S., Kim, J. M., Lim, J. S., and Lee, H. J. (2012) NDRG2 is involved in the oncogenic properties of renal cell carcinoma and its loss is a novel independent poor prognostic factor after nephrectomy. *Ann. Surg. Oncol.* 10.1245/s10434-011-2204-3
15. Yang, J., Li, Y., Wu, L., Zhang, Z., Han, T., Guo, H., Jiang, N., Tao, K., Ti, Z., Liu, X., Yao, L., and Dou, K. (2010) NDRG2 in rat liver regeneration: Role in proliferation and apoptosis. *Wound Repair Regen.* **18**, 524-531
16. Zhang, J., Li, F., Liu, X., Shen, L., Liu, J., Su, J., Zhang, W., Deng, Y., Wang, L., Liu, N., Han, W., Zhang, J., Ji, S., Yang, A., Han, H., and Yao, L. (2006) The repression of human differentiation-related gene NDRG2 expression by myc via miz-1-dependent interaction with the NDRG2 core promoter. *J. Biol. Chem.* **281**, 39159-39168

17. Svensson, E., Vidovic, K., Olofsson, T., Vallon-Christersson, J., Borg, A., and Gullberg, U. (2007) The wilms' tumor gene 1 (WT1) induces expression of the N-myc downstream regulated gene 2 (NDRG2). *DNA Cell Biol.* **26**, 589-597
18. Wang, L., Liu, N., Yao, L., Li, F., Zhang, J., Deng, Y., Liu, J., Ji, S., Yang, A., Han, H., Zhang, Y., Zhang, J., Han, W., and Liu, X. (2008) NDRG2 is a new HIF-1 target gene necessary for hypoxia-induced apoptosis in A549 cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **21**, 239-250
19. Liu, N., Wang, L., Li, X., Yang, Q., Liu, X., Zhang, J., Zhang, J., Wu, Y., Ji, S., Zhang, Y., Yang, A., Han, H., and Yao, L. (2008) N-myc downstream-regulated gene 2 is involved in p53-mediated apoptosis. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5335-5349
20. Li, Y., Yang, J., Li, S., Zhang, J., Zheng, J., Hou, W., Zhao, H., Guo, Y., Liu, X., Dou, K., Situ, Z., and Yao, L. (2011) N-myc downstream-regulated gene 2, a novel estrogen-targeted gene, is involved in the regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **286**, 32289-32299
21. Kalaany, N. Y., and Mangelsdorf, D. J. (2006) LXRS and FXR: The yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 159-191
22. Zhang, Y., and Edwards, P. A. (2008) FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett.* **582**, 10-18
23. Matsubara, T., Li, F., and Gonzalez, F. J. (2012) FXR signaling in the enterohepatic system. *Mol. Cell. Endocrinol.* 10.1016/j.mce.2012.05.004
24. Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y. K., Peng, L., Zhao, G., Downes, M., Yu, R. T., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Repa, J. J., Mangelsdorf, D. J., and Kliewer, S. A. (2006) Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3920-3925
25. Huang, W., Ma, K., Zhang, J., Qatanani, M., Cuvillier, J., Liu, J., Dong, B., Huang, X., and Moore, D. D. (2006) Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* **312**, 233-236
26. Kim, I., Morimura, K., Shah, Y., Yang, Q., Ward, J. M., and Gonzalez, F. J. (2007) Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* **28**, 940-946
27. Yang, F., Huang, X., Yi, T., Yen, Y., Moore, D. D., and Huang, W. (2007) Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res.* **67**, 863-867
28. Wang, Y. D., Chen, W. D., Moore, D. D., and Huang, W. (2008) FXR: A metabolic regulator and cell protector. *Cell Res.* **18**, 1087-1095
29. Wolfe, A., Thomas, A., Edwards, G., Jaseja, R., Guo, G. L., and Apte, U. (2011) Increased activation of the wnt/beta-catenin pathway in spontaneous hepatocellular carcinoma observed in farnesoid X receptor knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **338**, 12-21
30. Martinez-Becerra, P., Vaquero, J., Romero, M. R., Lozano, E., Anadon, C., Macias, R. I., Serrano, M. A., Grane-Boladeras, N., Munoz-Bellvis, L., Alvarez, L., Sangro, B., Pastor-Anglada, M., and Marin, J. J. (2012) No correlation between the expression of FXR and genes involved in multidrug resistance phenotype of primary liver tumors. *Mol. Pharm.* **9**, 1693-1704
31. Liu, N., Meng, Z., Lou, G., Zhou, W., Wang, X., Zhang, Y., Zhang, L., Liu, X., Yen, Y., Lai, L., Forman, B. M., Xu, Z., Xu, R., and Huang, W. (2012) Hepatocarcinogenesis in FXR<sup>-/-</sup> mice mimics human HCC progression that operates through HNF1alpha regulation of FXR expression. *Mol. Endocrinol.* **26**, 775-785
32. Zhang, Y., Gong, W., Dai, S., Huang, G., Shen, X., Gao, M., Xu, Z., Zeng, Y., and He, F. (2012) Downregulation of human farnesoid X receptor by miR-421 promotes proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Cancer Res.* **10**, 516-522
33. Ohno, T., Shirakami, Y., Shimizu, M., Kubota, M., Sakai, H., Yasuda, Y., Kochi, T., Tsurumi, H., and Moriwaki, H. (2012) Synergistic growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells by acyclic retinoid and GW4064, a farnesoid X receptor ligand. *Cancer Lett.* **323**, 215-222
34. Prieur, X., Coste, H., and Rodriguez, J. C. (2003) The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J. Biol. Chem.* **278**, 25468-25480

35. Sinal, C. J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J. M., Lambert, G., and Gonzalez, F. J. (2000) Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* **102**, 731-744
36. Modica, S., Murzilli, S., Salvatore, L., Schmidt, D. R., and Moschetta, A. (2008) Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* **68**, 9589-9594
37. Prieur, X., Huby, T., Coste, H., Schaap, F. G., Chapman, M. J., and Rodriguez, J. C. (2005) Thyroid hormone regulates the hypotriglyceridemic gene APOA5. *J. Biol. Chem.* **280**, 27533-27543
38. Grober, J., Zaghini, I., Fujii, H., Jones, S. A., Kliewer, S. A., Willson, T. M., Ono, T., and Besnard, P. (1999) Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *J. Biol. Chem.* **274**, 29749-29754
39. Urizar, N. L., Dowhan, D. H., and Moore, D. D. (2000) The farnesoid X-activated receptor mediates bile acid activation of phospholipid transfer protein gene expression. *J. Biol. Chem.* **275**, 39313-39317
40. Laffitte, B. A., Kast, H. R., Nguyen, C. M., Zavacki, A. M., Moore, D. D., and Edwards, P. A. (2000) Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 10638-10647
41. Dwivedi, S. K., Singh, N., Kumari, R., Mishra, J. S., Tripathi, S., Banerjee, P., Shah, P., Kukshal, V., Tyagi, A. M., Gaikwad, A. N., Chaturvedi, R. K., Mishra, D. P., Trivedi, A. K., Sanyal, S., Chattopadhyay, N., Ramachandran, R., Siddiqi, M. I., Bandyopadhyay, A., Arora, A., Lundasen, T., Anakk, S. P., Moore, D. D., and Sanyal, S. (2011) Bile acid receptor agonist GW4064 regulates PPARgamma coactivator-1alpha expression through estrogen receptor-related receptor alpha. *Mol. Endocrinol.* **25**, 922-932
42. Goodwin, B., Jones, S. A., Price, R. R., Watson, M. A., McKee, D. D., Moore, L. B., Galardi, C., Wilson, J. G., Lewis, M. C., Roth, M. E., Maloney, P. R., Willson, T. M., and Kliewer, S. A. (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* **6**, 517-526
43. Lu, T. T., Makishima, M., Repa, J. J., Schoonjans, K., Kerr, T. A., Auwerx, J., and Mangelsdorf, D. J. (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell* **6**, 507-515
44. Hubbert, M. L., Zhang, Y., Lee, F. Y., and Edwards, P. A. (2007) Regulation of hepatic insig-2 by the farnesoid X receptor. *Mol. Endocrinol.* **21**, 1359-1369
45. Perez, M. J., Gonzalez-Sanchez, E., Gonzalez-Loyola, A., Gonzalez-Buitrago, J. M., and Marin, J. J. (2011) Mitochondrial genome depletion dysregulates bile acid- and paracetamol-induced expression of the transporters Mdr1, Mrp1 and Mrp4 in liver cells. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 1686-1699
46. Boulkroun, S., Fay, M., Zennaro, M. C., Escoubet, B., Jaisser, F., Blot-Chaubaud, M., Farman, N., and Courtois-Couty, N. (2002) Characterization of rat NDRG2 (N-myc downstream regulated gene 2), a novel early mineralocorticoid-specific induced gene. *J. Biol. Chem.* **277**, 31506-31515
47. Wielputz, M. O., Lee, I. H., Dinudom, A., Boulkroun, S., Farman, N., Cook, D. I., Korbmacher, C., and Rauh, R. (2007) (NDRG2) stimulates amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> currents in xenopus laevis oocytes and fisher rat thyroid cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 28264-28273
48. Anisfeld, A. M., Kast-Woelbern, H. R., Meyer, M. E., Jones, S. A., Zhang, Y., Williams, K. J., Willson, T., and Edwards, P. A. (2003) Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-X receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 20420-20428
49. Hu, X. L., Liu, X. P., Lin, S. X., Deng, Y. C., Liu, N., Li, X., and Yao, L. B. (2004) NDRG2 expression and mutation in human liver and pancreatic cancers. *World J. Gastroenterol.* **10**, 3518-3521
50. Park, M. Y., Choi, S. C., Lee, H. S., Kim, D., Baek, K. E., Kim, J. T., Lim, J. S., Yeom, Y. I., Chung, J. W., Kim, J. W., Myung, P. K., Lee, H. G., Kim, J. W., and Song, E. Y. (2008) A quantitative

- analysis of N-myc downstream regulated gene 2 (NDRG 2) in human tissues and cell lysates by reverse-phase protein microarray. *Clin. Chim. Acta* **387**, 84-89
51. Liu, N., Wang, L., Liu, X., Yang, Q., Zhang, J., Zhang, W., Wu, Y., Shen, L., Zhang, Y., Yang, A., Han, H., Zhang, J., and Yao, L. (2007) Promoter methylation, mutation, and genomic deletion are involved in the decreased NDRG2 expression levels in several cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 164-169
  52. Thomas, A. M., Hart, S. N., Kong, B., Fang, J., Zhong, X. B., and Guo, G. L. (2010) Genome-wide tissue-specific farnesoid X receptor binding in mouse liver and intestine. *Hepatology* **51**, 1410-1419
  53. Chong, H. K., Infante, A. M., Seo, Y. K., Jeon, T. I., Zhang, Y., Edwards, P. A., Xie, X., and Osborne, T. F. (2010) Genome-wide interrogation of hepatic FXR reveals an asymmetric IR-1 motif and synergy with LRH-1. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6007-6017
  54. Bernstein, H., Bernstein, C., Payne, C. M., and Dvorak, K. (2009) Bile acids as endogenous etiologic agents in gastrointestinal cancer. *World J. Gastroenterol.* **15**, 3329-3340
  55. Wang, Y. D., Chen, W. D., Wang, M., Yu, D., Forman, B. M., and Huang, W. (2008) Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. *Hepatology* **48**, 1632-1643
  56. Ma, J. J., Liao, C. G., Jiang, X., Zhao, H. D., Yao, L. B., and Bao, T. Y. (2010) NDRG2 suppresses the proliferation of clear cell renal cell carcinoma cell A-498. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **29**, 103
  57. Kim, Y. J., Yoon, S. Y., Kim, J. T., Song, E. Y., Lee, H. G., Son, H. J., Kim, S. Y., Cho, D., Choi, I., Kim, J. H., and Kim, J. W. (2009) NDRG2 expression decreases with tumor stages and regulates TCF/beta-catenin signaling in human colon carcinoma. *Carcinogenesis* **30**, 598-605
  58. Kim, A., Kim, M. J., Yang, Y., Kim, J. W., Yeom, Y. I., and Lim, J. S. (2009) Suppression of NF-kappaB activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells. *Carcinogenesis* **30**, 927-936
  59. Murray, J. T., Campbell, D. G., Morrice, N., Auld, G. C., Shpiro, N., Marquez, R., Pegg, M., Bain, J., Bloomberg, G. B., Grahammer, F., Lang, F., Wulff, P., Kuhl, D., and Cohen, P. (2004) Exploitation of KESTREL to identify NDRG family members as physiological substrates for SGK1 and GSK3. *Biochem. J.* **384**, 477-488
  60. Burwen, S. J., Schmucker, D. L., and Jones, A. L. (1992) Subcellular and molecular mechanisms of bile secretion. *Int. Rev. Cytol.* **135**, 269-313

**Acknowledgments**-We thank GlaxoSmithKline for providing expression plasmids and GW4064, and Dr. Antonio Moschetta (Consorzio Mario Negri Sud, Chieti, Italy) for the generous gift of adenoviruses.

## FOOTNOTES

\* This work was supported by the Plan Nacional I+D Grant SAF2008-04606 from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia, and also by funding from the Catalan government (Ajut de Suport als Grups de Recerca de Catalunya, 2009SGR163).

<sup>1</sup> Present address: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Edward A. Doisy Research Center, Saint Louis University School of Medicine, 1100 South Grand Ave. St. Louis, MO 63140

<sup>2</sup> Supported by the Ajuts de Personal Investigador en Formació Scholarship from the University of Barcelona.

<sup>3</sup> Supported by the Ramón y Cajal Program from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia. To whom correspondence should be addressed: Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: 34-934020488; Fax: 34-934024520; E-mail: jcrodriguez@ub.edu

<sup>4</sup> The abbreviations used are: HCC, hepatocellular carcinoma; *NDRG2*, N-myc downstream-regulated gene 2; *FXR*, farnesoid X receptor; nt, nucleotide(s); TK, thymidine kinase; IR1, inverted repeat separated by a single nt; *RXR*, retinoid X receptor; CDCA, chenodeoxycholic acid; siRNA, small interfering RNA; MOI, multiplicity of infection; qPCR, quantitative PCR; PLTP, phospholipid transfer protein; SHP, small heterodimer partner; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; FXRE, *FXR* response element; I-BABP, ileal-bile acid-binding protein; TSS, transcription start site; ENaC, epithelial sodium channel.

<sup>5</sup> E. Pedraz-Cuesta and J. C. Rodríguez, unpublished data.

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1. Increase of *NDRG2* mRNA and protein levels by both natural and synthetic *FXR* ligands.** Human hepatoma Huh7 (A) and HepG2 (B) cells were treated for 24 h with vehicle (*Control*), or increasing concentrations of CDCA or GW4064. C, primary hepatocytes isolated from human liver were incubated with vehicle (*Control*), 50  $\mu$ M CDCA, or 5  $\mu$ M GW4064 for 24 h. Total RNA was extracted and reverse transcribed for analysis by real time qPCR. Specific *NDRG2* and *PLTP* mRNA levels normalized to 18S content are expressed relative to control set as 1 (mean  $\pm$  SEM). D, Western blot analysis of total protein lysates from Huh7 cells treated with vehicle (*Control*), 50  $\mu$ M CDCA, or 5  $\mu$ M GW4064 for 24 h. Protein signals were quantified and *NDRG2* levels were normalized to actin content. Significant differences compared with the corresponding controls are as follows: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . The results are representative of two or three independent experiments from triplicate dishes.

**FIGURE 2. Studies with *FXR* silencing and gain-of-function.** Huh7 cells were transfected with either control siRNA (*siControl*) or siRNA targeting *FXR* (*siFXR*). At 48 h post-transfection, cells were treated with vehicle (*Control*) (A-D), 50  $\mu$ M CDCA (C), or 5  $\mu$ M GW4064 (D) for 24 h. Specificity of the knockdown was checked by determination of relative *FXR* mRNA expression using real-time qPCR (A), and *FXR* protein levels by Western blot (B). Silencing of *FXR* abolishes the induction of *NDRG2* expression by CDCA (C) and GW4064 (D). Relative mRNA levels of the *FXR* target gene *SHP* were also measured as a control. E, Huh7 cells were infected with increasing MOI of adenovirus expressing either VP16 (*AdVP16*) or a constitutively active chimera of VP16 and *FXR* (*AdVP16FXR*) for 48 h. Specific mRNA levels of *FXR* and *NDRG2* were determined by real-time qPCR, normalized to 18S content and expressed relative to control set as 1 (mean  $\pm$  SEM). Significant differences compared with the corresponding controls are as follows: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . The results are representative of two or three independent experiments from triplicate dishes.

**FIGURE 3. Induction of mouse *NdrG2* expression by activated *FXR*.** Murine immortalized hepatocyte AML12 (A) and hepatoma Hepa 1-6 (B) cells were treated in triplicate dishes with vehicle (*Control*), 50  $\mu$ M CDCA, or 5  $\mu$ M GW4064 for 24 h. Total RNA was extracted and reverse transcribed for analysis by real time qPCR. Specific *NdrG2* mRNA levels normalized to 18S content are expressed relative to control set as 1 (mean  $\pm$  SEM). C, Western blot analysis using an antibody against *FXR* and cell lysates from Huh7 and Hepa1-6 that were infected or not (*No Ad*) with 50 MOI of adenovirus expressing either VP16 (*AdVP16*) or a chimera of VP16 and *FXR* (*AdVP16FXR*) for 48 h. D, Relative mRNA levels of *NdrG2* in 50 MOI adenovirus-infected Hepa 1-6 determined as in B. E, Western blot analysis of cell lysates from livers of mice that were treated for 8 h with either vehicle (*Control*) (n=4) or 50 mg/kg GW4064 (n=5). Protein signals were quantified and *NDRG2* levels were normalized to actin content. F, Relative mRNA levels of *NdrG2* and *Shp* in kidneys of wild-type (*WT*) and *FXR*<sup>-/-</sup> mice that were treated as in E (n=5/group). G, Renal protein levels of *NDRG2* were determined by Western blot, and signals were



quantified and normalized to actin. Significant differences compared with the corresponding controls are as follows: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

**FIGURE 4. The induction of *NDRG2* mRNA by FXR ligands does not require protein synthesis.** HepG2 cells were treated with vehicle (*Control*), 100  $\mu$ M CDCA, or 5  $\mu$ M GW4064, in the absence or the presence (*CHX*) of 10  $\mu$ g/ml cycloheximide. After 8 h total RNA was extracted and reverse transcribed for analysis by real time qPCR. Specific *NDRG2* and *SHP* mRNA levels normalized to 18S content are expressed relative to control in the absence of cycloheximide set as 1 (mean  $\pm$  SEM). Significant differences compared with the control in the absence of cycloheximide are as follows: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . Within the group in the presence of cycloheximide, significant differences compared to control are: §,  $p < 0.05$ ; §§,  $p < 0.01$ .

**FIGURE 5. Description of an intronic IR1 in *NDRG2/Ndr2* genes that mediates response to FXR.** *A*, Schematic representation of part of the exon-intron structure of human and mouse *NDRG2/Ndr2* genes and localization of the IR1 elements (in grey) identified by NUBIScan program as FXREs. Empty boxes and black solid boxes indicate untranslated and translated regions of exons, respectively. *B*, Comparison of sequences of different mammals, in which the conserved IR1 is boxed. Consensus sequence for IR1 FXREs is shown at the bottom. The RGGTCA half-sites are indicated by arrows. *C*, HepG2 cells were transfected with a plasmid containing a luciferase reporter gene driven by a 2.4-kb fragment corresponding to the proximal promoter region plus exon 1, intron 1, and part of exon 2 of the *Ndr2* gene (*NDRG2*) or the empty pGL3-basic vector (*pGL3bv*) along with a plasmid expressing FXR or the empty expression vector pSG5 as control. Cells were treated with vehicle (*Control*), 100  $\mu$ M CDCA, or 1  $\mu$ M GW4064 for 24 h, and luciferase activities were measured. *D*, Mutation of the intronic IR1 eliminates the response to activated FXR. Experiments were performed as in *C* with the reporter construct containing wild-type or IR1 site-directed mutated sequence (depicted with a cross), or the empty pGL3-basic vector as negative control, together with a plasmid expressing FXR or the empty vector pSG5, in the presence of vehicle or 1  $\mu$ M GW4064. *E*, The intronic IR1 element present in *Ndr2* gene confers FXR responsiveness to heterologous promoters. Experiments were performed as in *D* with the reporter constructs containing one, two, or four copies of the wild-type (*NDRG2IR1*), or four copies of mutant (*mutNDRG2IR1*) *Ndr2* IR1 site cloned in front of a heterologous TK promoter-driven luciferase gene. The empty pGL3-TK reporter vector was used as negative control. Results are expressed as -fold induction over control. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . The results are representative of three independent experiments.

**FIGURE 6. Binding analysis of FXR to the *NDRG2* intronic IR1 site.** *A*, EMSAs were performed using in vitro transcribed/translated FXR, RXR $\alpha$ , or unprogrammed reticulocyte lysate (-), when indicated, and a labeled double-stranded oligonucleotide containing the *Ndr2* IR1 element (*NDRG2IR1*) as described under "Experimental Procedures". The specific FXR-RXR $\alpha$ -FXRE complex is indicated by an arrow. The competition experiments for binding of FXR-RXR $\alpha$  heterodimers were performed by adding a 50-, 200-, and 500-fold molar excess of the indicated unlabeled probes. Mutations present in the modified version of *wtNDRG2IR2* (*mutNDRG2IR1*) are shown in Fig. 5D. *I-BABP*, FXRE of *I-BABP* gene (38). *B*, ChIP assays were performed with chromatin from HepG2 cells and either goat IgG or FXR-specific antibody and primers encompassing FXREs in human *NDRG2* and *SHP*, as positive control, or an unrelated genomic region with no FXRE (*Control*), as negative control, as described under "Experimental Procedures". The results were normalized by inputs.

Figure 1

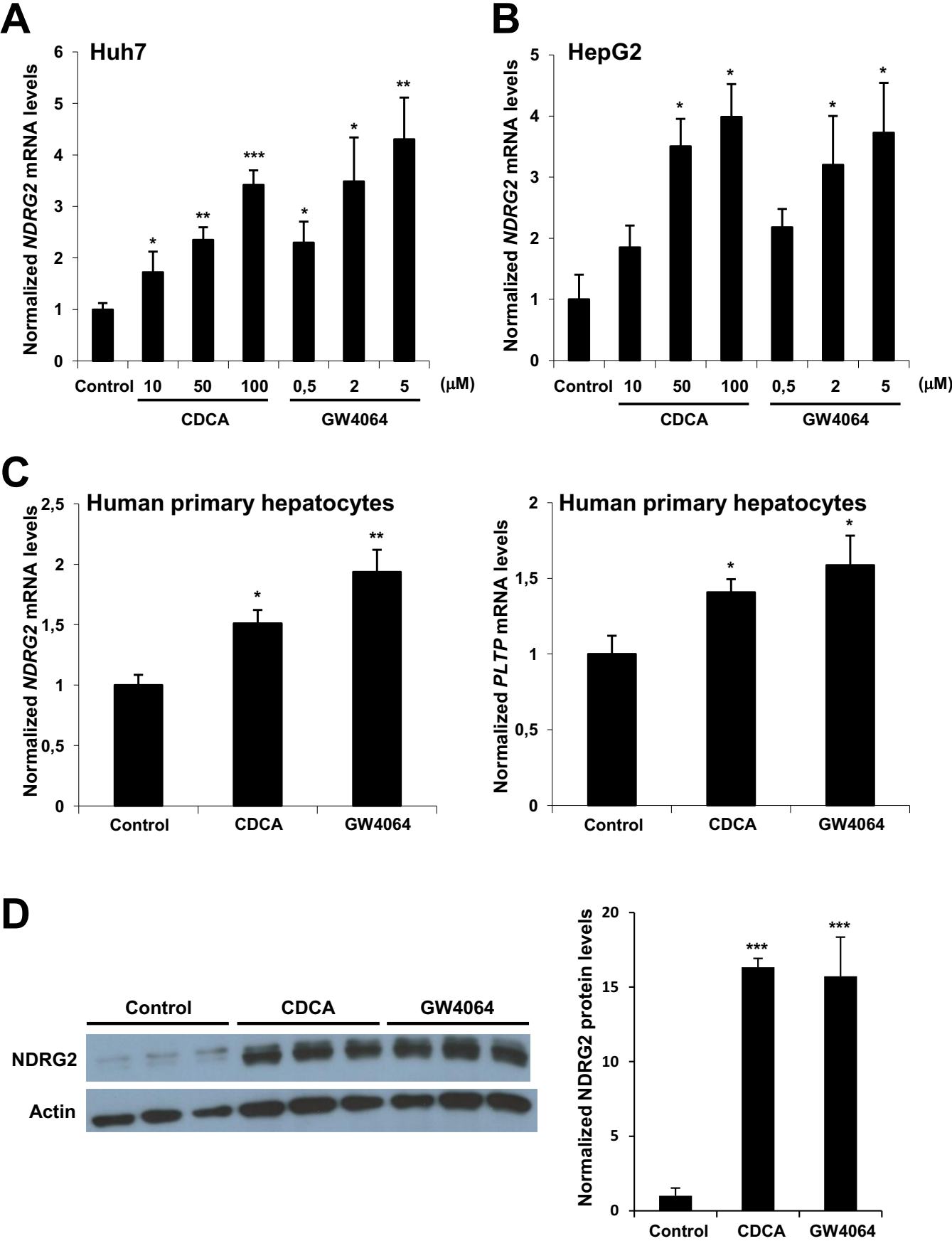


Figure 2

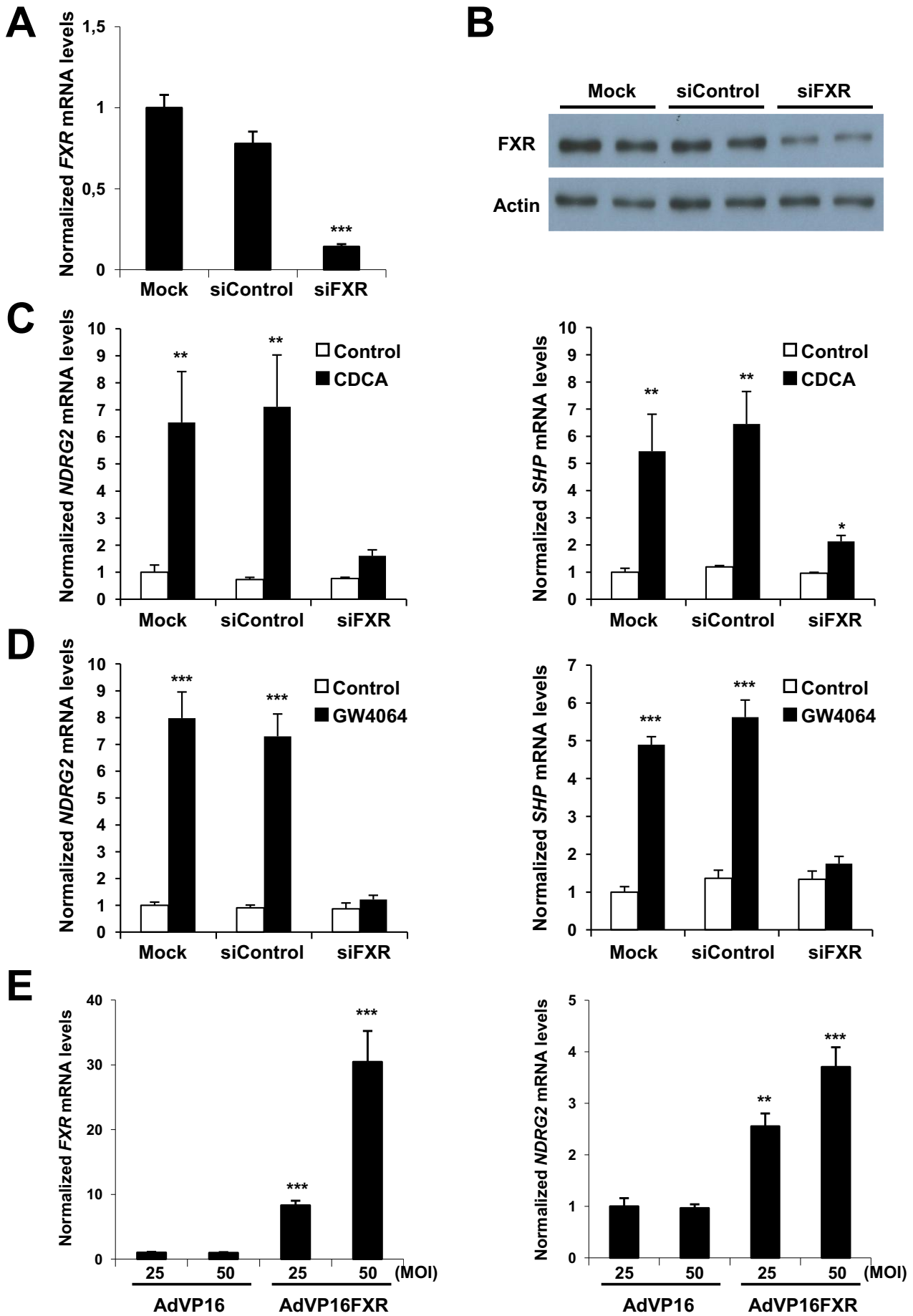


Figure 3

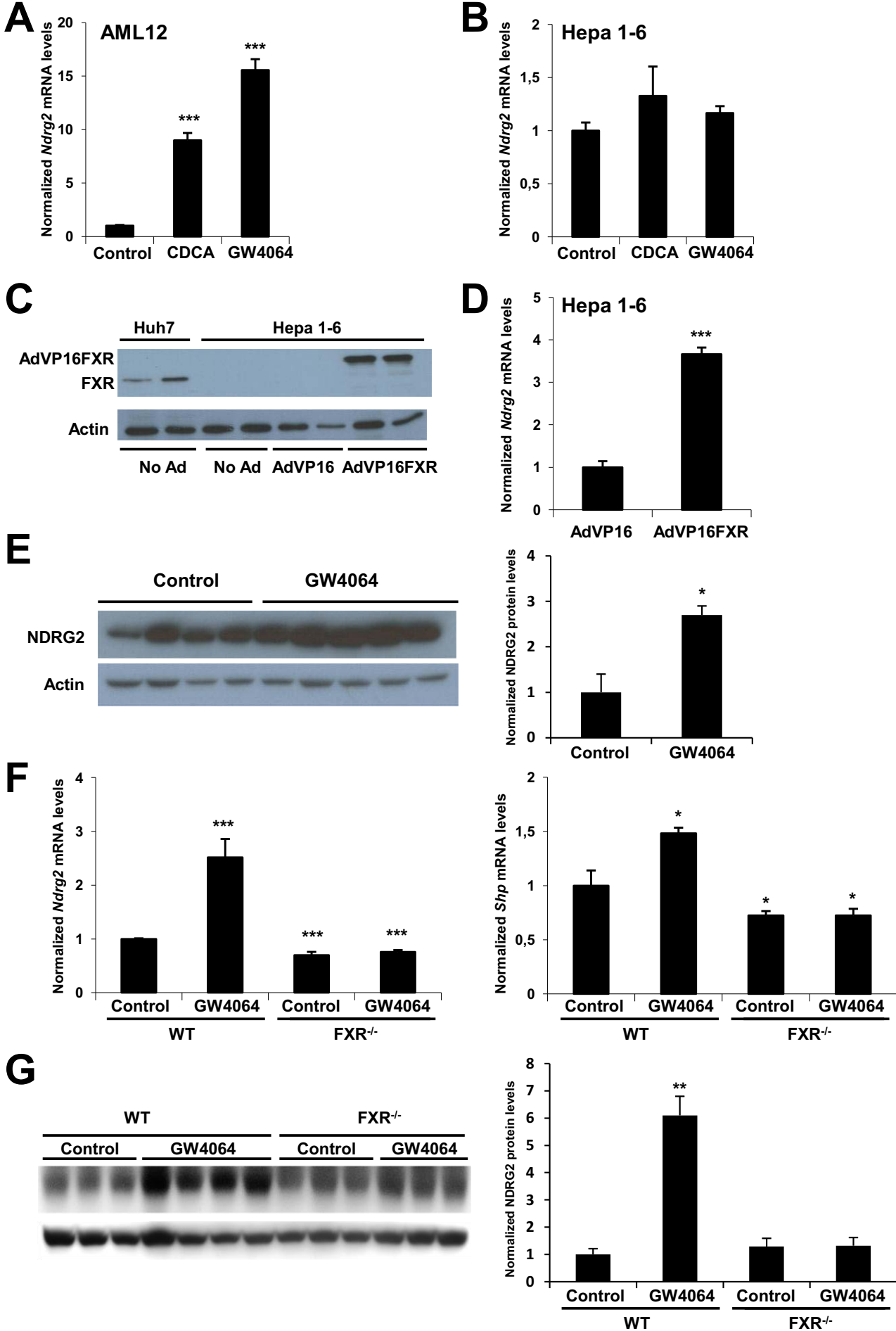


Figure 4

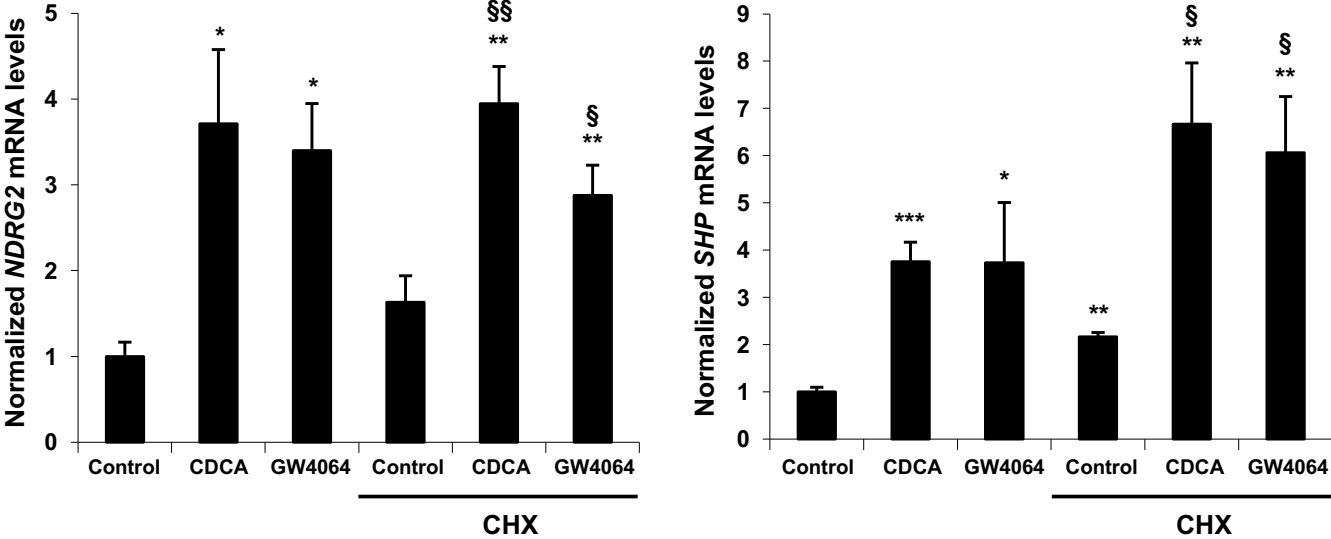


Figure 5

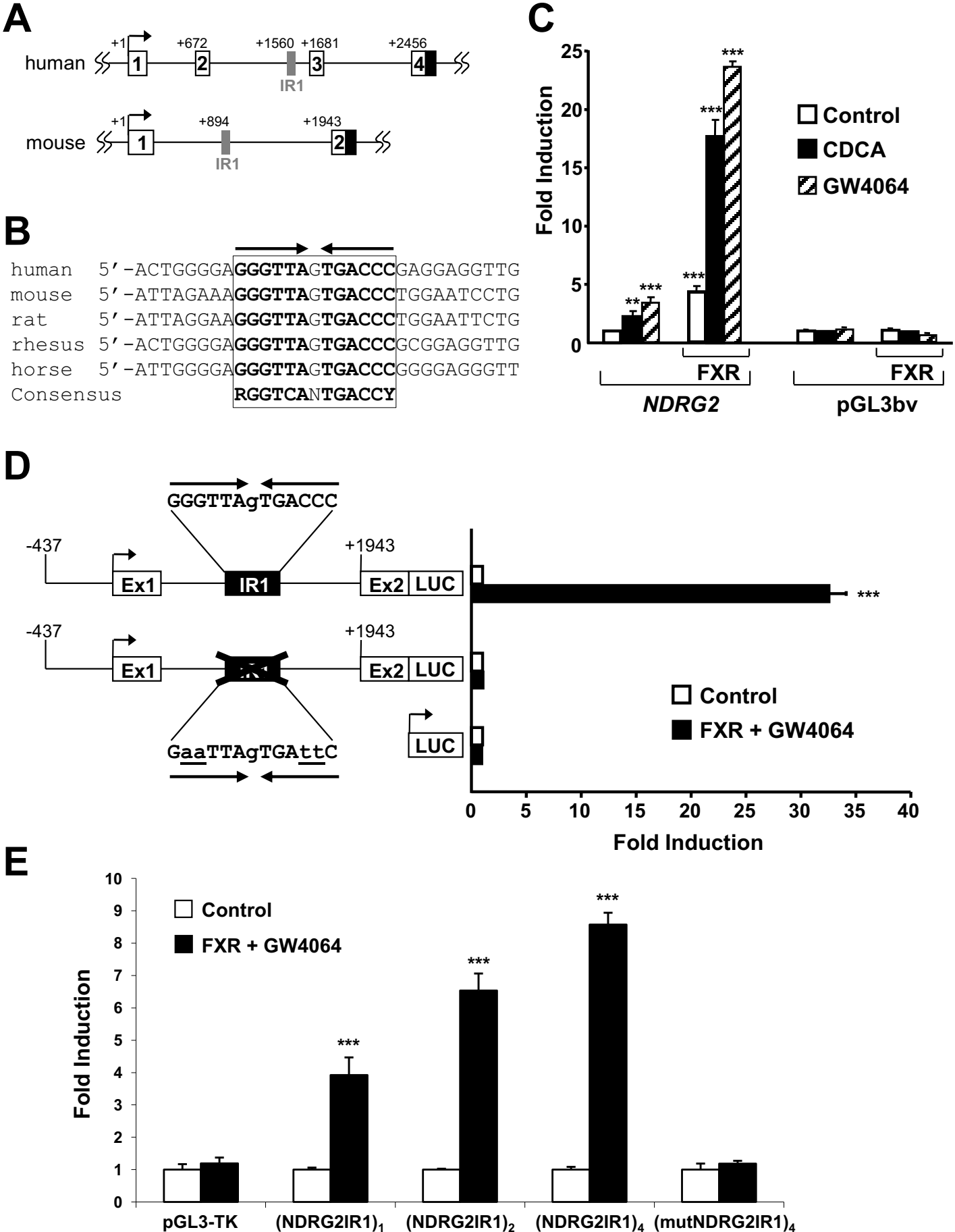
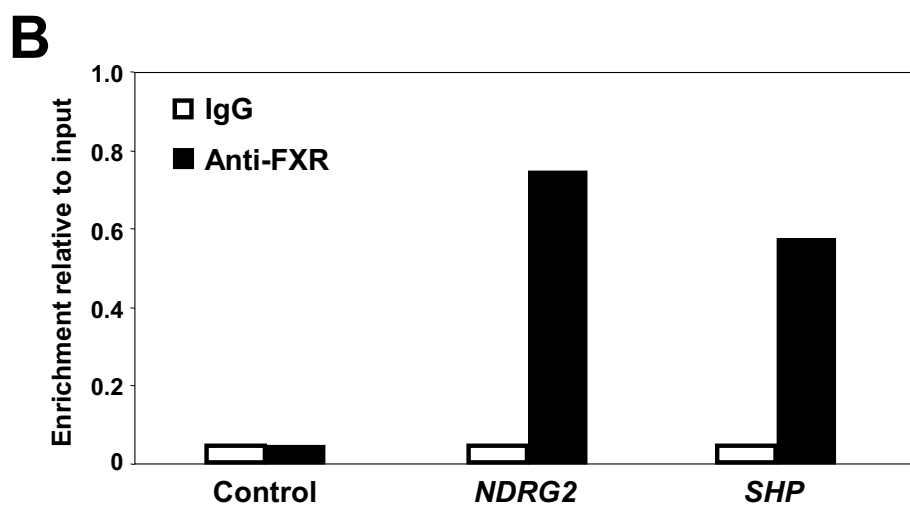
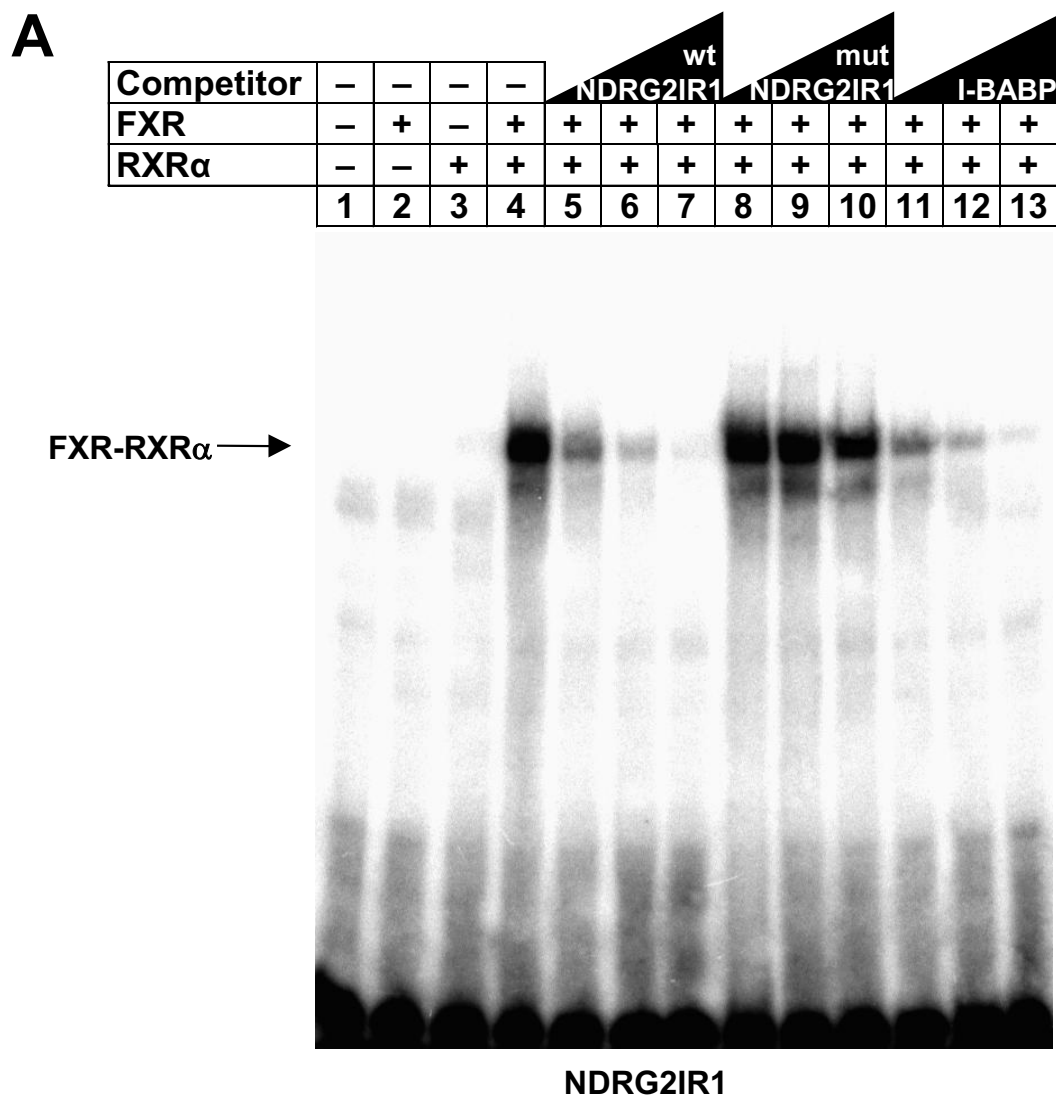


Figure 6







## The Farnesoid X Receptor Regulates the Human Class I Alcohol Dehydrogenase Genes

Cedric Langhi<sup>1,2</sup>, [clanghi@slu.edu](mailto:clanghi@slu.edu)

Elena Pedraz-Cuesta<sup>1</sup>, [elenapedraz@ub.edu](mailto:elenapedraz@ub.edu)

Pedro Marrero<sup>1</sup>, [pedromarrero@ub.edu](mailto:pedromarrero@ub.edu)

Diego Haro<sup>1</sup>, [dharo@ub.edu](mailto:dharo@ub.edu)

Joan Carles Rodríguez<sup>1</sup>, [jcrodriguez@ub.edu](mailto:jcrodriguez@ub.edu)

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy and the Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB), Av. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> current address: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Edward A. Doisy Research Center, Saint Louis University School of Medicine, 1100 South Grand Ave. St. Louis, MO 63140

**Keywords:** bile acids, ethanol, liver metabolism, gene regulation, bile alcohol

**Corresponding author :**

Joan Carles Rodríguez, Ph.D.

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy and the Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB), Av. Joan XXIII s/n, E-08028 Barcelona, Spain.

Tel : 934020488

Fax : 934024520

Email : [jcrodriguez@ub.edu](mailto:jcrodriguez@ub.edu)

**List of abbreviation:**

FXR Farnesoid X Receptor

ADH1 Class I Alcohol Dehydrogenase

BA Bile acid

RXR Retinoic X Receptor

CDCA Chenodeoxycholic acid

**Abstract:**

Class I Alcohol Dehydrogenase (ADH1) is the rate-limiting enzyme for hepatic ethanol oxidation. Contrary to rodents, 3 isozymes exist in human (*ADH1a*, *ADH1b* and *ADH1c*) organized as a gene cluster. These 3 genes are differentially expressed during fetal liver development. Intriguingly, specific polymorphisms in this enzyme are associated with reduced risk of alcoholism. Here we describe the regulation of the human *ADH1* cluster by the bile acid-activated nuclear receptor Farnesoid X Receptor (FXR). Experiments in both human primary hepatocytes and hepatoma cell lines show that *ADH1* mRNA, protein and activity are increased upon exposure to the FXR natural agonist chenodeoxycholic acid or to the synthetic FXR-specific agonist GW4064. We demonstrate that this effect is mediated by FXR, by using both overexpression and silencing approaches. In agreement with these observations, we identify and characterize FXR response elements in the promoter regions of *ADH1a* and *ADH1b*, but not *ADH1c*. **Conclusion:** These data support a new role of the bile acid receptor FXR in the regulation of the *ADH1* gene cluster. These data also suggest that FXR activation may participate in ethanol and retinol metabolism in the human liver.

## Introduction

Alcohol dehydrogenases (ADHs; EC 1.1.1.1) are zinc-containing dimeric enzymes implicated in the oxidation of alcohol to aldehyde. In mammals, ethanol is metabolized mainly in the liver by the Class I ADH (ADH1) to acetaldehyde, which is further oxidized to acetate by mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) (1, 2). In mouse and rat, a single ADH1 gene is present in the genome. In contrast, 3 ADH1 genes are expressed in primates: ADH1a, ADH1b and ADH1c. The human ADH1 genes are organized in tandem within a cluster on chromosome 4 and have very high nucleotide similarity to each other, suggesting they are the result of duplication events (2). Proteins encoded by the ADH1 genes form both homo- and heterodimeric alcohol dehydrogenase isozymes, and they represent the predominant class of ADHs in the liver (2). From a clinical perspective, it is important that subjects that carry the ADH1b\*2 polymorphism have increased activity of the enzyme and are markedly protected against alcoholism (3). Authors showed that ADH1 is abundantly expressed in the adult liver, where it catalyzes not only ethanol oxidation, but also the oxidation of a wide variety of xenobiotic and endogenous alcohols (4). Hence, ADH1 catalyzes steps in several metabolic pathways important in postnatal liver development including bile acid synthesis (5), norepinephrine and dopamine metabolism (6, 7), and retinol (vitamin A) metabolism (8). In humans, a temporal expression of the 3 class I ADH genes was observed during fetal liver development (9, 10). The control of the ADH1 gene cluster during liver development, however, remains unclear.

The bile acid receptor farnesoid X receptor (FXR; NR1H4), a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors, was initially characterized in

the liver for its ability to regulate the expression of genes involved in bile acid synthesis and secretion, and in xenobiotic detoxification (11, 12). In addition, FXR plays an important role in lipids, lipoprotein and glucose metabolism (13, 14). Upon its activation by bile acids, FXR heterodimerizes with the retinoid X receptor and modulates the transcription of target genes, through binding to an FXR response element (FXRE) composed by an inverted repeat of the canonical sequence AGGTCA separated by one nucleotide (IR1)(15). Interestingly, the different human ADH1 isotypes also participate in bile acid metabolism (5). Thus, ADH1b is specifically implicated in the oxidation of the bile alcohol 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetrol, a key intermediate in the formation of cholic acid (5), while ADH1c exerts a 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases/3-oxo-reductases activity to promote the epimerization of the 3 $\beta$  iso bile acids, generated by intestinal bacteria, to the 3 $\alpha$  bile acids, which are subsequently secreted by the hepatocyte into the bile (16).

In this study, we investigated the effect of FXR activation by both the natural agonist chenodeoxycholic acid (CDCA) and the synthetic ligand GW4064 on ADH1 expression in human hepatocytes. We demonstrate that FXR differentially regulates the 3 ADH1 genes, thereby linking bile acid signaling to the control of the expression of the ADH1 gene cluster in human liver. We hypothesize that the FXR-ADH1 axis could play an important role in hepatic metabolism and in the maintenance of liver integrity by promoting oxidation and detoxification of ADH1 substrates like ethanol or bile alcohols.

## **Materials and Methods**

### **Animal experiments**

All experimental protocols with mice were performed with approval of the Animal Ethics Committee of Universitat de Barcelona. C57BL/6 mice were maintained under a 12 h/12 h light/dark cycle with free access to food and water. Male animals (10 weeks old, n=5 per group) were injected once i.p with 50 mg/kg of body weight GW4064 or vehicle (corn oil 5% DMSO) and fasted for 8 h before sacrificed for liver collection.

### **Cell culture**

The human hepatoma cell lines HepG2 and Huh7 and Rat hepatoma FAO cells were maintained as previously described (17). Primary mouse hepatocytes were isolated by the collagenase method, as described (18) and cultured for 6 h before the different treatments begun. Human primary hepatocytes were obtained commercially (Ready Heps Fresh Hepatocytes, Lonza, Walkersville, MD, USA) and maintained in Hepatocyte Complete Medium (HCM bullet Kit, Lonza, Walkersville, MD, USA). Cells were treated with GW4064, the bile acid CDCA (Sigma, Saint Louis, MO, USA) or vehicle (DMSO) for 24 h in media supplemented with 10% charcoal stripped FBS. For siRNA-mediated FXR knock-down experiments, Huh7 cells were transfected with 25 nmol/L of either FXR siGENOME SMART pool (M-003414-01) and siGENOME Non-Targeting siRNA #1 (D-001210-01) (Dharmacon, Lafayette, CO, USA), using DharmaFECT 4 transfection Reagent (Dharmacon, Lafayette, CO, USA). For overexpression experiments in Huh7, cells were transduced with hFXR-VP16 or VP16 adenoviral vectors (a kind gift of Dr Antonio Moschetta, University of Bari, Italy).

## **Reporter assays**

Huh7 cells were transiently transfected with FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) according to the manufacturer's instructions. Typically, each well of a 12-well plate received 100 ng of firefly luciferase reporter plasmid and, where indicated, 200 ng of plasmids expressing human FXR. A Renilla luciferase reporter was included in all transfections as an internal control for transfection efficiency. After 6 h, cells were treated as previously described with 1  $\mu$ mol/L GW4064 or vehicle (DMSO) for 24 h. Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA).

## **Western blot analysis**

Whole protein cell extracts were obtained from Huh7 cells in NP-40 Lysis buffer (NaCl 150 mM, TrisHCl 50 mM, NP40 1%) supplemented with protease inhibitors (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Fifty  $\mu$ g of protein were resolved in a 10% acrylamide gel and then transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). Antibodies against panADH1 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, cat# sc-22750) and FXR (1:1,000, Invitrogen, Grand Island, NY, USA, cat# A9033A) were used for western blot analysis.  $\beta$ -actin antibody was used as loading control (1:1,000, Sigma, Saint Louis, MO, USA, cat#: A2066).

## **RNA extraction and real time PCR analysis**

Total RNA was extracted from cells or livers using Tri-Reagent (Ambion, Grand Island, NY, USA). Total RNA (1  $\mu$ g) was reverse transcribed using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) according to the manufacturer's instructions. qRT-PCR

was performed using Platinum qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) with taqman primers (Taqman Gene Expression Assay, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA): hADH1a Hs00605167\_g1 ; hADH1b Hs00605175\_m1 ; hADH1c Hs00817827\_m1 ; hCYP2E1 Hs00559368\_m1 ; hALDH1a Hs00946916\_m1 ; hALDH2 Hs00355914\_m1 ; hPLTP Hs01067287\_m1 ; hSHP Hs00222677\_m1 ; hFXR Hs00231968\_m1 ; mADH1a Mm00507711\_m1 ; mSHP Mm00442278\_m1; rADH1a Rn00570670\_m1 ; rSHP Rn 00589173\_m1 ; 18S 4319413E. Assays were conducted with the ABI 7700 amplification system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

### **Alcohol dehydrogenase activity assay**

Alcohol dehydrogenase activity was measured with a commercial Alcohol Dehydrogenase Assay Kit (K787, BioVision, Milpitas, CA, USA) following manufacturer's instructions, and normalized to protein content in each sample.

### **Electromobility Shift Assay and plasmids**

Complete methods concerning EMSA experiments and plasmids construction can be found in supplemental information. [NOT SURE ABOUT PUTTING THIS IN SUPPL DATA...](#)

### **Statistical Analysis**

Each experiment is representative of at least two independent experiments with a minimum of 3 replicates per condition. All values are shown as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was analyzed using a Student's unpaired *t* test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.



## Results

### **FXR activation induces *ADH1a* and *ADH1b* genes in human primary hepatocytes and human hepatoma cell lines**

FXR is well characterized to protect liver against toxicity of molecules like bile acids, tetrachloride carbon (19) or acetaminophen (20), and several genes of phase 1 detoxification pathway are directly modulated by FXR (21-23). ADH1 enzyme acts by mediating oxidation of its substrates, most likely ethanol, and has been describe to metabolize bile alcohols (5), which are intermediate in the bile acid synthesis pathway. Thus, we investigate whether human ADH1 genes are regulated by the bile acid receptor FXR.

First, human primary hepatocytes were exposed for 24h to the FXR natural ligand CDCA or to the FXR specific agonist GW4064. As shown in Fig. 1A, the mRNA levels of *ADH1a* and *ADH1b* were increased upon FXR activation. The previously reported FXR target *PLTP* was also induced under the same conditions. In contrast, FXR activation did not change the abundance of *ADH1c* mRNA. To confirm these results, HepG2 hepatoma cells were also incubated in the presence or absence of FXR activators. Again, only the expression of *ADH1a* and *ADH1b*, but not *ADH1c*, was induced by FXR (Fig. 1B). In agreement with these results, cells incubated with FXR agonists showed a ~10-fold increase in ADH1 protein, compared to cells receiving vehicle (Fig. 1C). Collectively, data in Fig. 1 suggest that FXR induces the expression of the specific ADH1 isozymes ADH1a and ADH1b.

### **FXR overexpression increases human *ADH1* mRNA level while FXR knock-down abolishes FXR mediated regulation on human *ADH1* genes expression**

To further demonstrate the involvement of FXR in the regulation of the *ADH1* gene cluster, we performed adenovirus-mediated overexpression of a constitutively active form of FXR

(FXR-VP16) in Huh7 cells. Two different doses of adenovirus were used to transduce the cells. As shown in Fig. 2A, *FXR* mRNA content was increased 10- and 30-fold with 25 and 50 MOI, respectively, compared to cells receiving VP16 virus. Under these conditions, the expression of *ADH1a* and *ADH1b*, but not *ADH1c*, was induced by FXR overexpression (Fig. 2b).

Next, we examined the effects of silencing FXR in Huh7 cells, by using siRNA. FXR knock-down was confirmed by western blot analysis (Fig. 3A). Data in Fig. 3B show that FXR activation by GW4064 in cells transfected with a mock siRNA results in increased expression of the classical FXR target gene *SHP*, as well as *ADH1a* and *ADH1b*. In contrast, this effect is completely abolished in cells transfected with siRNA against FXR (Fig. 3B). Taken together, data in Figs. 1–3 establish a role for FXR in the regulation of human *ADH1a* and *ADH1b*.

### **FXR regulation of ADH1 is human-specific and does not occur in rodents**

To determine whether the FXR regulation of ADH1 also occurs in rodents, C57BL/6 mice were treated with vehicle or GW4064 and the hepatic expression of the single *Adh1* gene present in rodents. Unexpectedly, no change in *Adh1* mRNA levels was detected following activation of FXR, despite the strong induction of previously reported FXR targets such as *Shp* (Fig. 4A). To exclude that the dissimilar findings in human hepatocytes and in mice liver were due to methodological differences, mouse primary hepatocytes were incubated in the presence or absence of GW4064 for 24 h. Again, *Shp* was markedly induced following FXR activation while no change was observed for in *Adh1* transcript (Fig. 4B). Finally, rat FAO hepatoma cells were also treated with CDCA or GW4064 for 24h. As described for mouse liver and hepatocytes, FXR activation induced the expression of *Shp* but failed to modulate

the rat *Adh1* transcript. Taken altogether, these data show that FXR affects hepatic *ADH1* levels in a species-dependant manner.

### **Identification of FXR response elements in the promoter of human *ADH1* genes**

In order to understand the molecular mechanism explaining the differential regulation of the human *ADH1* gene cluster by FXR, the promoters of *ADH1a*, *ADH1b* and *ADH1c* were analyzed *in silico* to screen for putative FXR response element using the NUBIScan algorithm. A total of 3 potential functional IR1, one for each promoter, were identified in homologous region between the 3 promoters (Fig. 5A). While the IR1 sequences in the *ADH1a* and *ADH1b* promoters are well conserved compared to the consensus FXRE, the element in the promoter of *ADH1c* shows the critical adenine at position +6 (15) substituted to guanine (Fig. 5A). Furthermore, in agreement with the lack of murine *Adh1* regulation by FXR shown above, no FXRE was identified in the mouse *Adh1* promoter.

To test whether these regions were able to confer response to FXR, a 2,5 Kb fragment of each human promoter were cloned into a luciferase reporter vector, so as to generate pADH1a-WT, pADH1b-WT and pADH1c-WT, respectively. Luciferase activity tests were then performed following transient transfection into Huh7 cells, in presence or absence of exogenous FXR and GW4064 treatment. The results in Fig. 5B show that FXR is able to stimulate promoter activity for both *ADH1a* and *ADH1b* constructs. In contrast, no effect of FXR and/or agonist was noted when using the *ADH1c* construct. These latter result is in agreement with our observation that the potential IR1 sequence in this promoter deviates from a conserved, functional FXRE. To further confirm this observation, the IR1 sequence for each promoter was cloned in front of a thymidine kinase-driven luciferase reporter construct. Again, in transient transfection experiments overexpression of FXR resulted in enhanced luciferase activity for

contracts containing either the *ADH1a* or the *ADH1b* IR1 sequences, but not for the construct containing the *ADH1c* IR1 element (Fig. 5C).

To further demonstrate the critical role of the identified IR1 sequences in the FXR response of human *ADH1*, site-directed mutagenesis was performed. Hence, the IR1 from *ADH1a* and *ADH1b* promoter were completely disrupted by introducing point mutations, so as to generate the reporter constructs pADH1a-mut and pADH1b-mut, respectively. Data in Fig. 5D show that these point mutations abrogated the response to FXR. In another experiment, we mutated the non-responsive element of the *ADH1c* promoter into the well responsive IR1 present in *ADH1a* promoter (pADH1cmut1a). Our results show that, we were able to convert the IR1 element in the *ADH1c* promoter into a functional FXRE (Fig. 5E). Collectively, data in Fig. 5 clearly demonstrate that the IR1 sequences identified in both the *ADH1a* and *ADH1b* promoters, but not in the *ADH1c* promoter, are required and sufficient to mediate FXR responsiveness, and likely explain the changes in *ADH1* expression noted in human hepatocytes (Fig. 1).

### **The FXR/RXR heterodimer binds to the IR1 in the *ADH1a* and *ADH1b* promoter**

To assess whether FXR is able to bind these newly identified IR1, electromobility shift assays were performed, using *in vitro* translated FXR and RXR proteins and <sup>32</sup>P-labeled double-stranded oligonucleotides containing the IR1 from the *ADH1a*, *ADH1b*, *ADH1c* and I-BABP (positive control) promoters. As expected, results in Fig. 6A show DNA-protein complex for both *ADH1a* and *ADH1b* (lanes 4 and 6, respectively), but not for *ADH1c* (lane 8). The specificity of these complexes was demonstrated by successful competition with increasing amounts of unlabeled oligonucleotide dimers (Fig. 6B; lanes 5–7 and 11–13, compared to lane 4). In contrast, no disappearance of the DNA-protein complexes was observed when a

mutated IR1 was used as a competitor (Fig. 6B; lanes 8–10, compared to lane 4). Taken together, results in Fig. 6 strongly suggest that the FXR/RXR heterodimer binds specifically to the IR1 of *ADH1a* and *ADH1b* promoters, but not to the *ADH1c* promoter.

### **FXR activation increases ADH1 enzymatic activity in human hepatocytes**

Having shown that activation of FXR increases human *ADH1* mRNA and protein level, we next examined whether the activity of the enzyme was also increased using a commercial kit, as described in materials and methods. Hence, ADH1 activity was assayed after exposure of Huh7 cells treated with or without CDCA or GW4064 for 48 h. As shown in Fig. 7A, FXR activation with either CDCA or GW4064 resulted in a significant increase in cellular ADH1 activity. To verify that such increase was dependent on FXR, we transfected Huh7 cells with control or anti-FXR siRNA oligonucleotides prior to the 24 h treatment with GW4064. Data in Fig. 7B show that, when FXR expression is silenced, the stimulatory effect of GW4064 on ADH1 activity is completely abolished. We conclude that FXR controls not only the expression of *ADH1*, but also the overall cellular ADH1 activity.

### **Discussion**

In humans, the class I alcohol dehydrogenase, the enzyme that catalyze the oxidation of ethanol to acetaldehyde in liver, is encoded by 3 separate genes (*ADH1a*, *ADH1b* and *ADH1c*) clustered head-to-tail within an 80 Kb region on chromosome 4. It is speculated that the increased combinations of ADH1 homo- and hetero-dimers may allow the liver to metabolize various alcohols. Interestingly, the ADH1b\*2 polymorphism, producing an enzyme with higher catalytic activity, has been strongly associated with a reduced risk for alcoholism (3). In this study, we characterized the regulation of the ADH1a and ADH1b

genes by the bile-acid nuclear receptor FXR in human hepatocyte. We show that human *ADH1a* and *ADH1b*, but not *ADH1c*, are functional FXR targets. However, this pathway is not conserved in rodents, as we failed to observe changes in *Adh1* levels in mouse liver or in rat hepatoma cells following FXR activation. Such a species-dependent regulation is not uncommon and has already been described for FXR target genes like PCSK9 (24), PPAR $\alpha$  (25), hepatic lipase (26), apo (a) (27), fetuin b (28), ALAS1 (29),  $\alpha$ -crytallin (30), kininogen (31) fibrinogen (32) or the syndecan-1 (33). The reasons behind such expansion in the repertoire of FXR targets in primates, compared to rodents, are unclear. It is intriguing to speculate that bile acids have acquired additional roles as signaling molecules in human. The three human *ADHI* genes were originated for sequential duplication of the ancestral *ADHI* gene. Several lines of evidence indicate that the first split was between *ADH1c* and the gene that gave rise to *ADH1a* and *ADH1b* common ancestor (2). This latter evolutionary mechanism would be consistent with our results, and we hypothesize that the FXR responsive elements in the promoters of both *ADH1a* and *ADH1b* appeared after the duplication of *ADH1c* by de novo mutation of the non-functional ancestor IR1 sequence.

Another singularity described in the regulation of human *ADHI* genes is their sequential expression during liver development. Hence, *ADH1a* is expressed in early fetal hepatic development (second trimester), while *ADH1b* expression is turned on at a later stage (third trimester); finally, *ADH1c* begins being expressed during postnatal liver development at about 5 months after birth (9, 10). The total amount of *ADH1a*, *-1b* and *-1c* activity in the human liver increases by more than an order of magnitude postnatally between birth and 5 years of age, when adult levels of all three ADH isozymes are achieved (34). We speculate that FXR might play a critical role in the control of the *ADHI* gene cluster during liver development by mediating the upregulation of both *ADH1a* and *ADH1b* genes.

Interestingly, the human fetus is capable of synthesizing bile acids from the end of the first trimester (35). The main bile acids found in the fetal liver are tauro- and glyco-conjugates of cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA). However, atypical bile acids with functional groups at different positions or in greater number than found in conventional bile are also detected, reflecting a special fetal bile acid metabolism (36). CDCA is the predominant bile acid synthesized by the fetal liver and secreted into bile during early gestation (37). During the first week of life CA becomes the predominant bile acid, and the CA/CDCA ratio is even higher than in adults. Finally, within the first month this ratio falls and reaches normal value (36, 37).

The molecular mechanisms regulating fetal and perinatal bile acid metabolism are yet to be fully elucidated. Intriguingly, authors reported that ADH1 is implicated in bile acid metabolism (16). Specifically, human *ADH1b* was shown to catalyze the oxidation of the bile alcohol 5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ ,26-tetrol to the 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -cholestan-26-oic acid, a key intermediate in the formation of cholic acid (5). Interestingly, this bile alcohol is a more potent FXR activator than CDCA (38). It is intriguing to speculate whether: i) the sequential expression pattern of ADH1 genes during liver development; ii) the isozyme-specific regulation by the bile acid-activated FXR; and iii) the potential role of ADH1 on bile alcohol to bile acid conversion, are physiologically relevant for bile acid homeostasis not only during development but also in adulthood. Further experiments using humanized mice containing a BAC clone that expresses the human *ADH1* locus will be necessary to confirm this hypothesis.

FXR is highly expressed in entero-hepatic tissues where it acts as a bile acid sensor to regulate bile acid metabolism (11, 12). FXR is also a master regulator of lipid and glucose

metabolism in liver (13, 14), and is implicated in several aspects of hepatic homeostasis like detoxification (20) and liver regeneration (19, 39, 40). Here we characterized a new role for FXR in the control of the human *ADH1* gene cluster in liver that links bile acid signaling and alcohol metabolism. In this context, the FXR-ADH1 axis fits nicely into the Phase I detoxification pathways for which several FXR targets have been described (21-23). Additionally, we speculate that human *ADH1* is a critical FXR target that controls key aspects of bile acid metabolism during liver development. The fact that mouse and human ADH1 loci are so divergent complicates the study of ADH1 regulation by FXR. Further experiments using humanized mice for ADH1 genes will be needed to explore the physiological relevance of this regulation.



1. Edenberg HJ. Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2000;64:295-341.
2. Oota H, Dunn CW, Speed WC, Pakstis AJ, Palmatier MA, Kidd JR, Kidd KK. Conservative evolution in duplicated genes of the primate Class I ADH cluster. *Gene* 2007;392:64-76.
3. Rivera-Meza M, Quintanilla ME, Tampier L, Mura CV, Sapag A, Israel Y. Mechanism of protection against alcoholism by an alcohol dehydrogenase polymorphism: development of an animal model. *FASEB J* 2010;24:266-274.
4. Eklund H, Muller-Wille P, Horjales E, Futer O, Holmquist B, Vallee BL, Hoog JO, et al. Comparison of three classes of human liver alcohol dehydrogenase. Emphasis on different substrate binding pockets. *Eur J Biochem* 1990;193:303-310.
5. Okuda A, Okuda K. Physiological function and kinetic mechanism of human liver alcohol dehydrogenase as 5 beta-cholestane-3 alpha,7 alpha,12 alpha,26-tetrol dehydrogenase. *J Biol Chem* 1983;258:2899-2905.
6. Mardh G, Vallee BL. Human class I alcohol dehydrogenases catalyze the interconversion of alcohols and aldehydes in the metabolism of dopamine. *Biochemistry* 1986;25:7279-7282.
7. Mardh G, Luehr CA, Vallee BL. Human class I alcohol dehydrogenases catalyze the oxidation of glycols in the metabolism of norepinephrine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:4979-4982.
8. Posch KC, Enright WJ, Napoli JL. Retinoic acid synthesis by cytosol from the alcohol dehydrogenase negative deer mouse. *Arch Biochem Biophys* 1989;274:171-178.
9. Smith M, Hopkinson DA, Harris H. Developmental changes and polymorphism in human alcohol dehydrogenase. *Ann Hum Genet* 1971;34:251-271.
10. Smith M, Hopkinson DA, Harris H. Alcohol dehydrogenase isozymes in adult human stomach and liver: evidence for activity of the ADH 3 locus. *Ann Hum Genet* 1972;35:243-253.
11. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000;102:731-744.
12. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 2009;89:147-191.
13. Zhang Y, Edwards PA. FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett* 2008;582:10-18.
14. Cariou B, Staels B. FXR: a promising target for the metabolic syndrome? *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:236-243.
15. Thomas AM, Hart SN, Kong B, Fang J, Zhong XB, Guo GL. Genome-wide tissue-specific farnesoid X receptor binding in mouse liver and intestine. *Hepatology* 2010;51:1410-1419.
16. McEvily AJ, Holmquist B, Auld DS, Vallee BL. 3 beta-Hydroxy-5 beta-steroid dehydrogenase activity of human liver alcohol dehydrogenase is specific to gamma-subunits. *Biochemistry* 1988;27:4284-4288.
17. Vila-Brau A, De Sousa-Coelho AL, Mayordomo C, Haro D, Marrero PF. Human HMGCS2 regulates mitochondrial fatty acid oxidation and FGF21 expression in HepG2 cell line. *J Biol Chem* 2011;286:20423-20430.
18. Orellana-Gavalda JM, Herrero L, Malandrino MI, Paneda A, Sol Rodriguez-Pena M, Petry H, Asins G, et al. Molecular therapy for obesity and diabetes based on a long-term increase in hepatic fatty-acid oxidation. *Hepatology* 2011;53:821-832.
19. Meng Z, Wang Y, Wang L, Jin W, Liu N, Pan H, Liu L, et al. FXR regulates liver repair after CCl4-induced toxic injury. *Mol Endocrinol* 2010;24:886-897.
20. Lee FY, de Aguiar Vallim TQ, Chong HK, Zhang Y, Liu Y, Jones SA, Osborne TF, et al. Activation of the farnesoid X receptor provides protection against acetaminophen-induced hepatic toxicity. *Mol Endocrinol* 2010;24:1626-1636.
21. Marschall HU, Wagner M, Bodin K, Zollner G, Fickert P, Gumhold J, Silbert D, et al. Fxr(-/-) mice adapt to biliary obstruction by enhanced phase I detoxification and renal elimination of bile acids. *J Lipid Res* 2006;47:582-592.
22. Zollner G, Wagner M, Moustafa T, Fickert P, Silbert D, Gumhold J, Fuchsbichler A, et al. Coordinated induction of bile acid detoxification and alternative elimination in mice: role of FXR-

regulated organic solute transporter-alpha/beta in the adaptive response to bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G923-932.

23. Noh K, Kim YM, Kim YW, Kim SG. Farnesoid X receptor activation by chenodeoxycholic acid induces detoxifying enzymes through AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of CCAAT/enhancer binding protein beta. *Drug Metab Dispos* 2011;39:1451-1459.

24. Langhi C, Le May C, Kourimate S, Caron S, Staels B, Krempf M, Costet P, et al. Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett* 2008;582:949-955.

25. Pineda Torra I, Claudel T, Duval C, Kosykh V, Fruchart JC, Staels B. Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol* 2003;17:259-272.

26. Sirvent A, Verhoeven AJ, Jansen H, Kosykh V, Darteil RJ, Hum DW, Fruchart JC, et al. Farnesoid X receptor represses hepatic lipase gene expression. *J Lipid Res* 2004;45:2110-2115.

27. Chennamsetty I, Claudel T, Kostner KM, Baghdasaryan A, Kratky D, Levak-Frank S, Frank S, et al. Farnesoid X receptor represses hepatic human APOA gene expression. *J Clin Invest* 2011;121:3724-3734.

28. Murakami T, Walczak R, Caron S, Duhem C, Vidal V, Darteil R, Staels B. The farnesoid X receptor induces fetuin-B gene expression in human hepatocytes. *Biochem J* 2007;407:461-469.

29. Peyer AK, Jung D, Beer M, Gnerre C, Keogh A, Stroka D, Zavolan M, et al. Regulation of human liver delta-aminolevulinic acid synthase by bile acids. *Hepatology* 2007;46:1960-1970.

30. Lee FY, Kast-Woelbern HR, Chang J, Luo G, Jones SA, Fishbein MC, Edwards PA. Alpha-crystallin is a target gene of the farnesoid X-activated receptor in human livers. *J Biol Chem* 2005;280:31792-31800.

31. Zhao A, Lew JL, Huang L, Yu J, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, et al. Human kininogen gene is transactivated by the farnesoid X receptor. *J Biol Chem* 2003;278:28765-28770.

32. Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Lee H, Zhang Y, Lee FY, Edwards PA. Activation of the nuclear receptor FXR induces fibrinogen expression: a new role for bile acid signaling. *J Lipid Res* 2005;46:458-468.

33. Anisfeld AM, Kast-Woelbern HR, Meyer ME, Jones SA, Zhang Y, Williams KJ, Willson T, et al. Syndecan-1 expression is regulated in an isoform-specific manner by the farnesoid-X receptor. *J Biol Chem* 2003;278:20420-20428.

34. Pikkarainen PH, Raiha NC. Development of alcohol dehydrogenase activity in the human liver. *Pediatr Res* 1967;1:165-168.

35. Williamson C, Miragoli M, Sheikh Abdul Kadir S, Abu-Hayyeh S, Papacleovoulou G, Geenes V, Gorelik J. Bile acid signaling in fetal tissues: implications for intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Dig Dis* 2011;29:58-61.

36. Murphy GM, Signer E. Bile acid metabolism in infants and children. *Gut* 1974;15:151-163.

37. Setchell KD, Dumaswala R, Colombo C, Ronchi M. Hepatic bile acid metabolism during early development revealed from the analysis of human fetal gallbladder bile. *J Biol Chem* 1988;263:16637-16644.

38. Nishimaki-Mogami T, Une M, Fujino T, Sato Y, Tamehiro N, Kawahara Y, Shudo K, et al. Identification of intermediates in the bile acid synthetic pathway as ligands for the farnesoid X receptor. *J Lipid Res* 2004;45:1538-1545.

39. Borude P, Edwards G, Walesky C, Li F, Ma X, Kong B, Guo GL, et al. Hepatocyte specific deletion of farnesoid X receptor delays, but does not inhibit liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2012.

40. Zhang L, Wang YD, Chen WD, Wang X, Lou G, Liu N, Lin M, et al. Promotion of liver regeneration/repair by farnesoid X receptor in both liver and intestine. *Hepatology* 2012.

**Acknowledgment :**

The authors thank Josep Maria Orellana for the preparation of mouse hepatocyte and Antonio Moschetta for providing FXR-VP16 adenovirus

# Regulation of Human Class I Alcohol Dehydrogenases by Farnesoid X Receptor Agonists

Journal: Gastroenterology

## **Fig1 : Activation of FXR induces ADH class I gene expression in human hepatic cells**

Effects of FXR activation in the regulation of the expression of genes involved in ethanol metabolism in human hepatoma cell line HepG2 **(A)** and HuH7 **(B)**

**(C)** CDCA and GW4064 treatment induces the level of the ADH1 proteins in HuH7 detected with a non isoform specific panADH1 antibody.

**(D)** Treatment of human primary hepatocytes by CDCA and GW4064 confirms upregulation of ADH1 gene expression by FXR agonist.

## **Fig2 : FXR is required to modulate ADH1 gene cluster expression in human hepatic cells**

**(A)** FXR overexpression by adenoviral infection of HuH7 by a constitutive active form of FXR is sufficient to increase ADH1 gene mRNA content

siRNA-mediated FXR down regulation in HuH7 abolishes ADH1 gene upregulation by both GW4064 **(B)** and CDCA **(C)**.

## **Fig3 : ADH1 gene regulation by FXR is species-specific**

**(A)** Treatment of the mouse immortalized hepatocytes AML12 by CDCA and GW4064 shows no effect of FXR ligands on ADH1 gene expression while the FXR target SHP is well induced

**(B)** Treatment of the rat hepatoma FAO cells by CDCA and GW4064 shows no effect of FXR ligands on ADH1 gene expression while the FXR target SHP is induced

**(C)** Treatment of mice by IP injection of a unique dose of GW4064 does not modulate hepatic ADH1 expression while SHP induction is detected

## **Fig4 : FXR regulates human ADH1 gene cluster at the transcriptional level**

**(A)** Inhibition of translation by cycloheximide treatment does not interfere with ADH1b mRNA induction by CDCA and GW4064 in HuH7, as well as SHP induction while repression by CDCA and GW4064 is logically counteracted by CHX

**(B)** Half life of ADH1b mRNA is not modified by CDCA nor GW4064 when adding transcription inhibitor Actinomycin D in HU7 like for SHP mRNA, demonstrating a regulation at the level of gene transcription to induce ADH1b gene by FXR activation.

**(C)** Cloning of the promoter for each of the 3 human ADH1 genes demonstrates an activation of transcriptional activity by FXR activation

### **Fig5 : FXR regulates transcriptional activity of ADH1 gene cluster via different FXRE**

**(A)** Activation of promoter activity of the different FXRE identified in human ADH1 gene cluster and subcloned in front of TK promoter. Each insert is a duplex of 4 repetition of the original FXRE.

**(B)** Mutation of the IR1 #7 as in figure A completely abolished response to FXR of promoter ADH1A and ADH1B activity ; and **(C)**, mutation of IR1 #7 in promoter ADH1C to the same as promoter ADH1A allows response to FXR to induce promoter activity.

**(D)** Comparison of the IR1 #7 of promoter ADH1A, ADH1B and ADH1C to induce transcriptional activity

### **Fig6 : Binding of FXR to IR1 elements in the human ADH1 gene cluster**

ChIP experiment performed in Huh7 demonstrates that FXR binds to the IR1 FXRE, as well as control binding to SHP IR1

### **Fig7 : Bile acids and synthetic FXR activator GW4064 induce ADH1 activity**

FXR activation increases ADH1 activity in vitro in HuH7 cells after 24h of treatment by CDCA and GW4064 **(A)** and 48h of treatment **(B)**.

**(C)** FXR-mediated induction of ADH1 activity in human cell in vitro is confirmed in HepG2 cells after 48h of treatment

**(D)** No modulation of ADH1 activity is detected in mouse AML12 treated 48h with GW4064, confirming species-specificity of the regulation

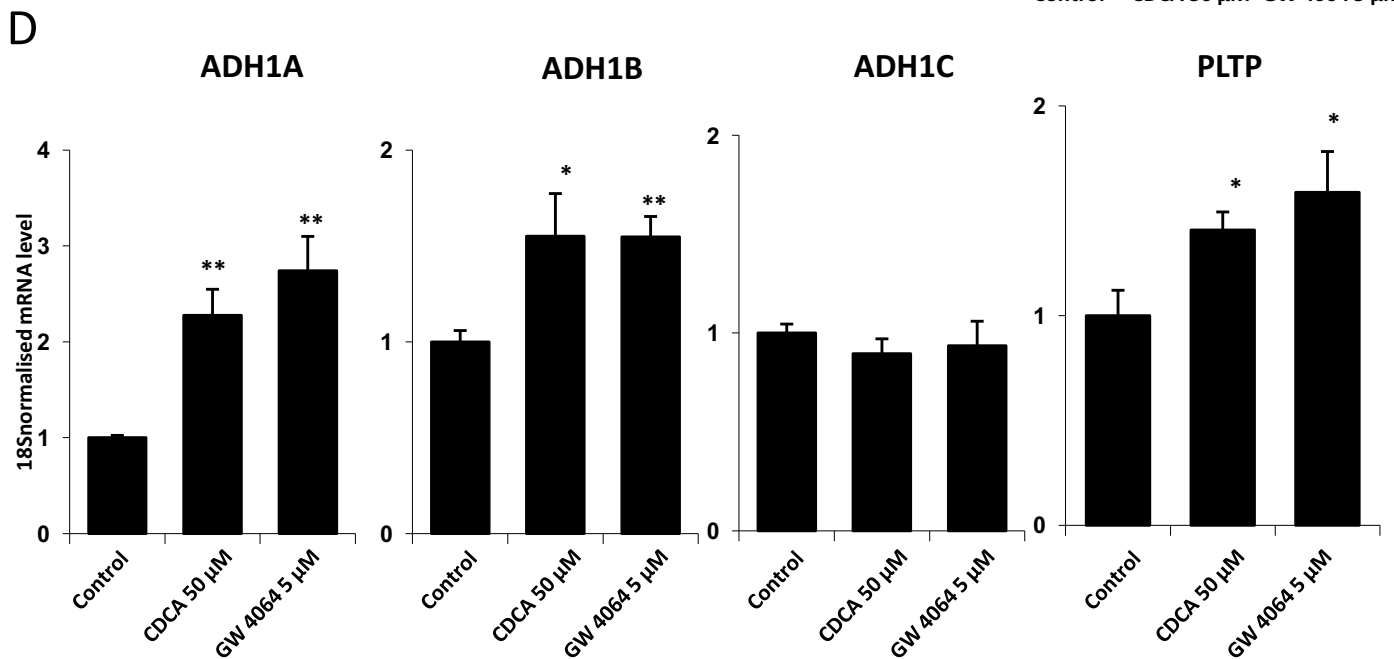
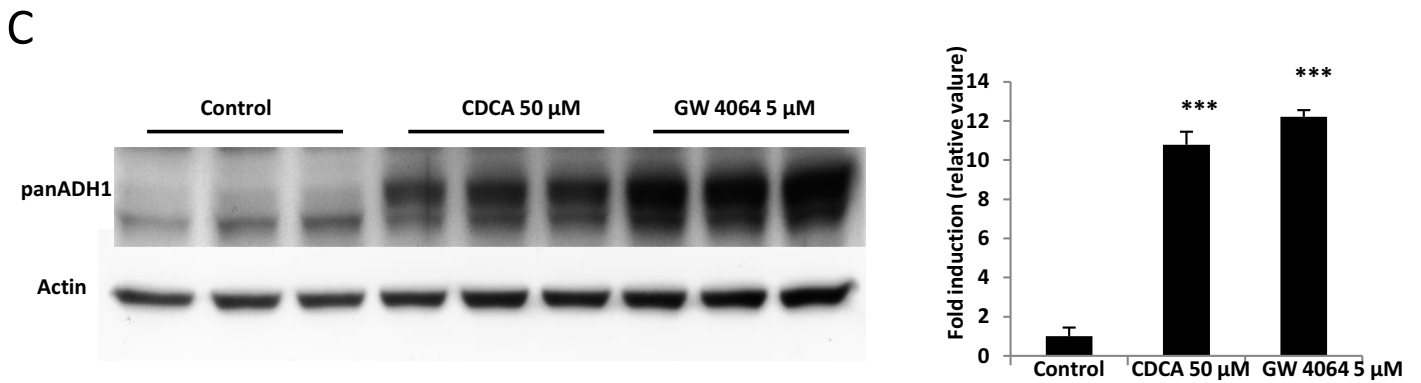
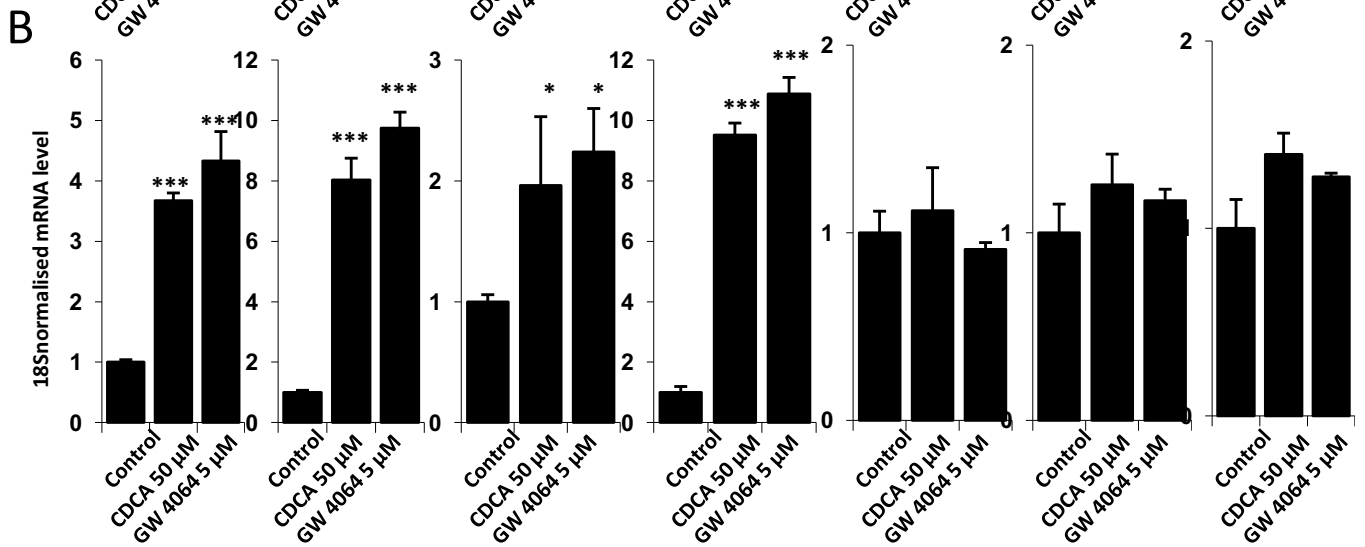
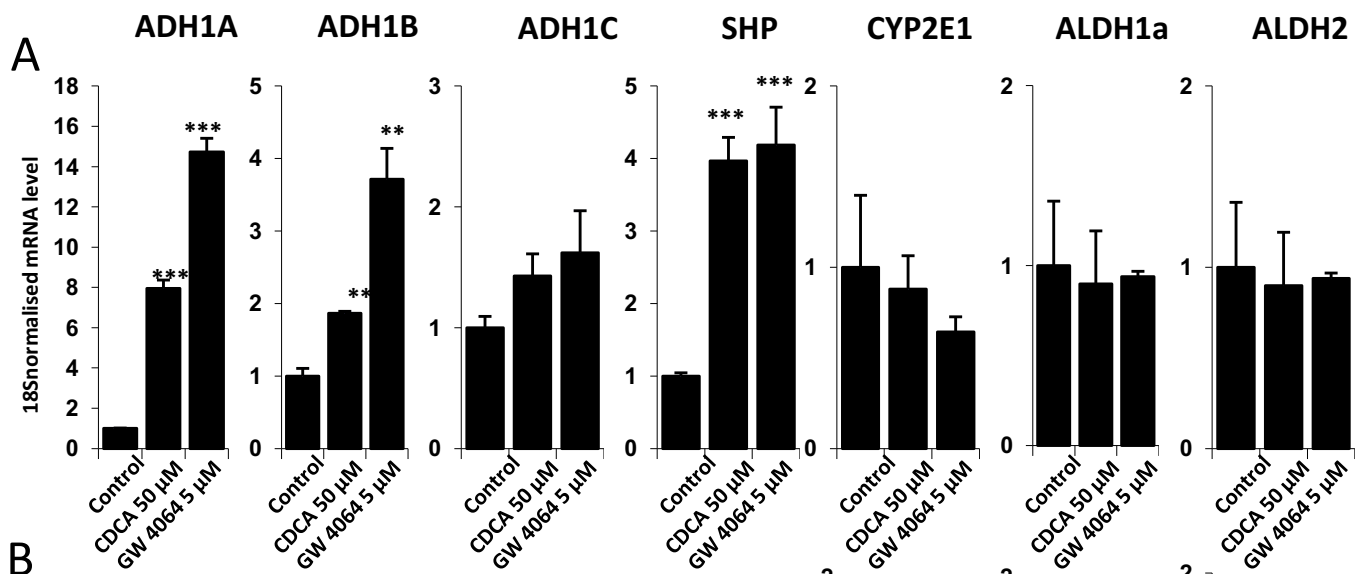
**(E)** Activation of ADH1 activity in HuH7 by FXR activation is abolished when FXR is downregulated using siRNA

### **Supplemental data**

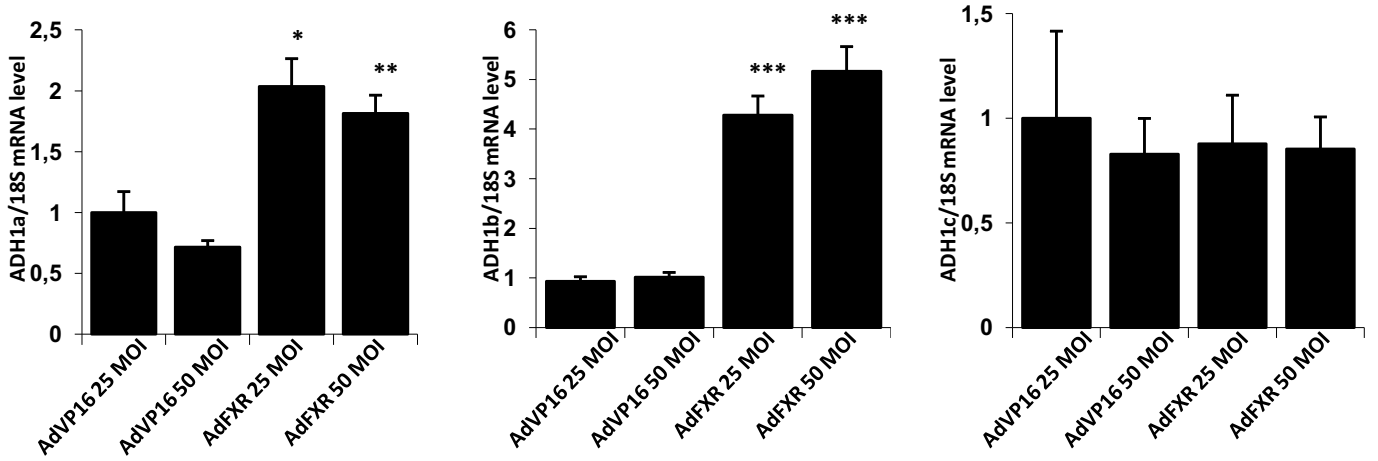
**(A)** FXR and **(B)** SHP mRNA expression with adenovirus overexpression of hFXR-VP16 in Huh7

siRNA-mediated silencing of FXR counteracted the FXR target gene SHP induction by GW4064 **(C)** and CDCA **(D)** treatment

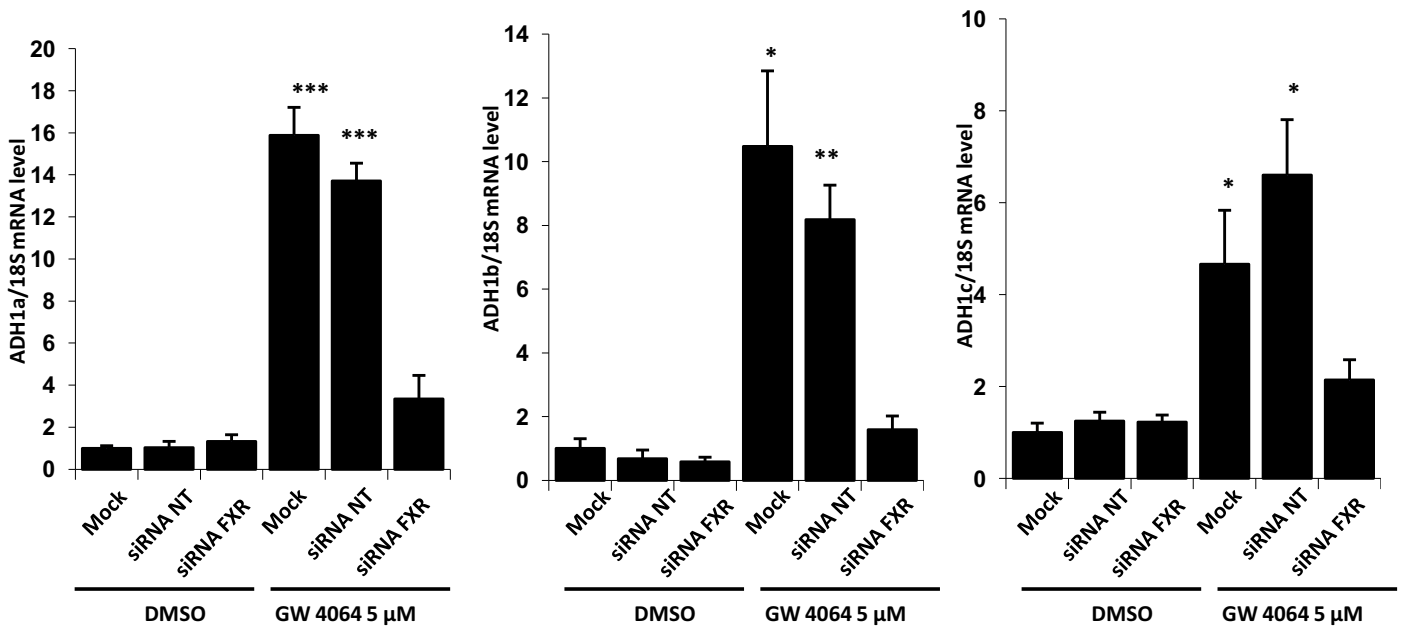
**(E)** Western blot analysis of FXR expression when using siRNA to downregulate FXR



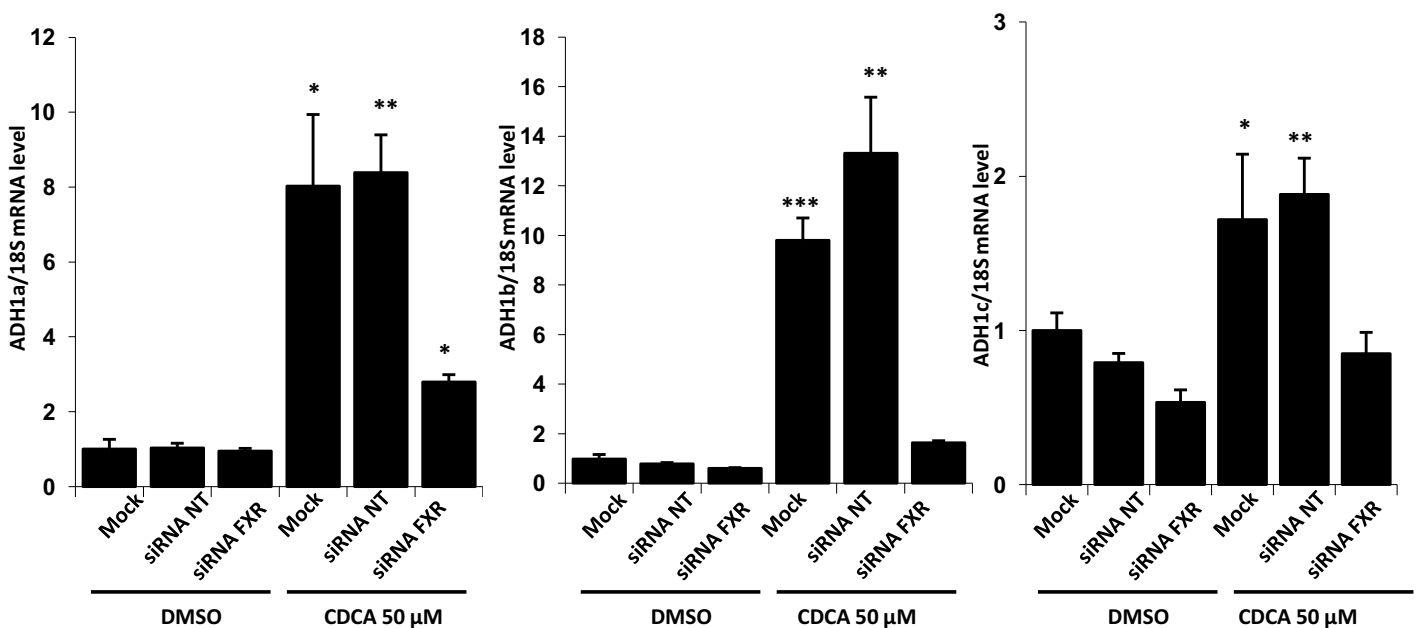
**A**

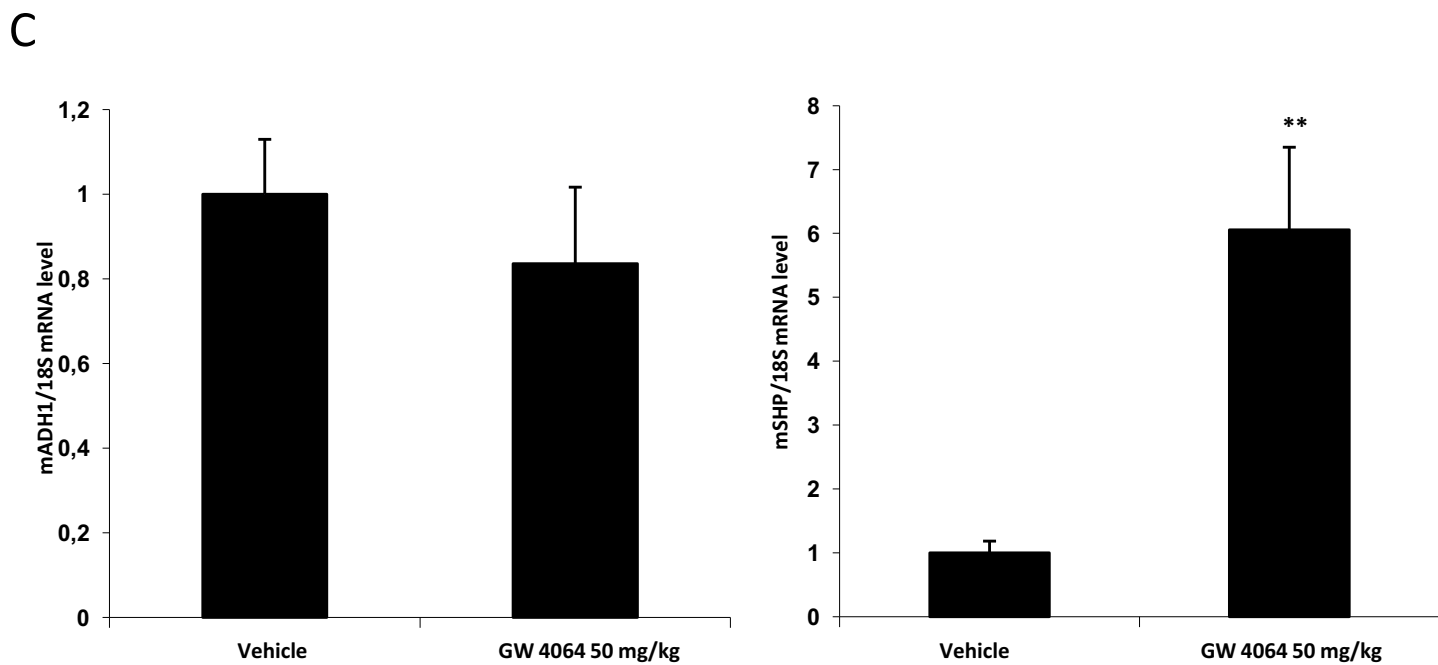
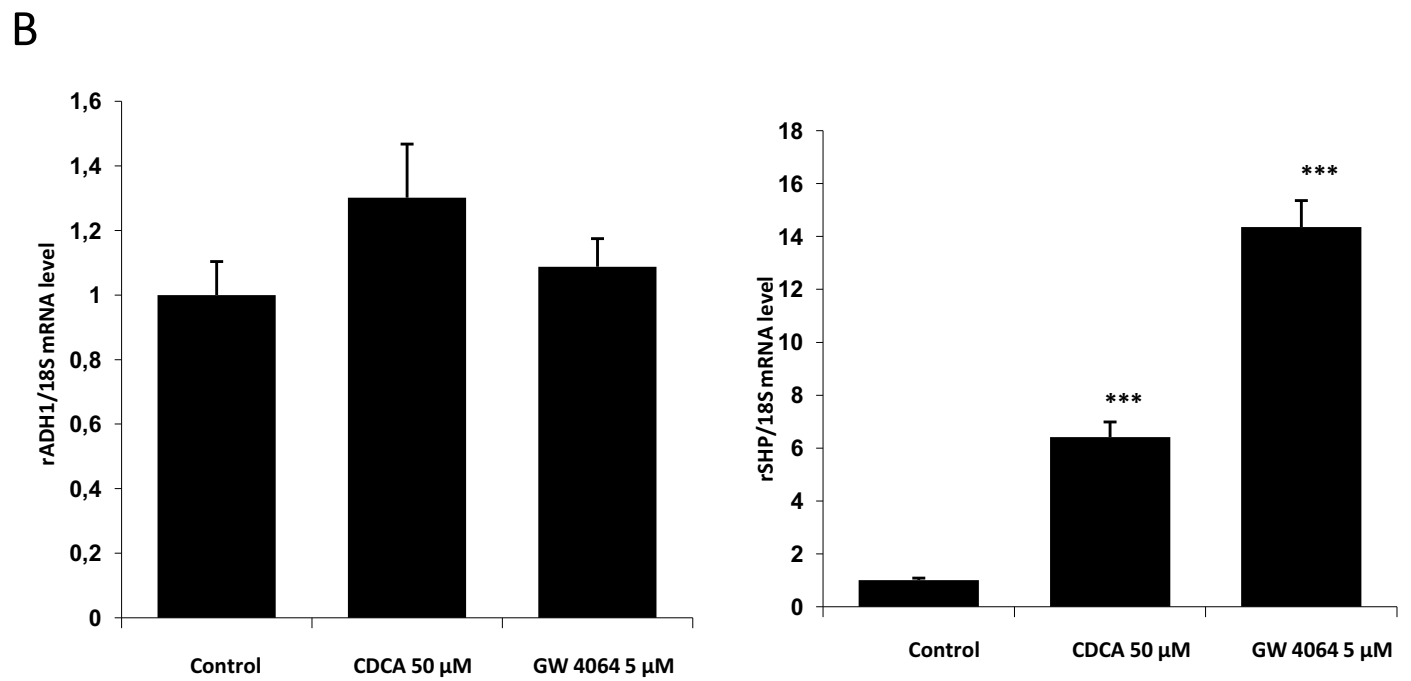
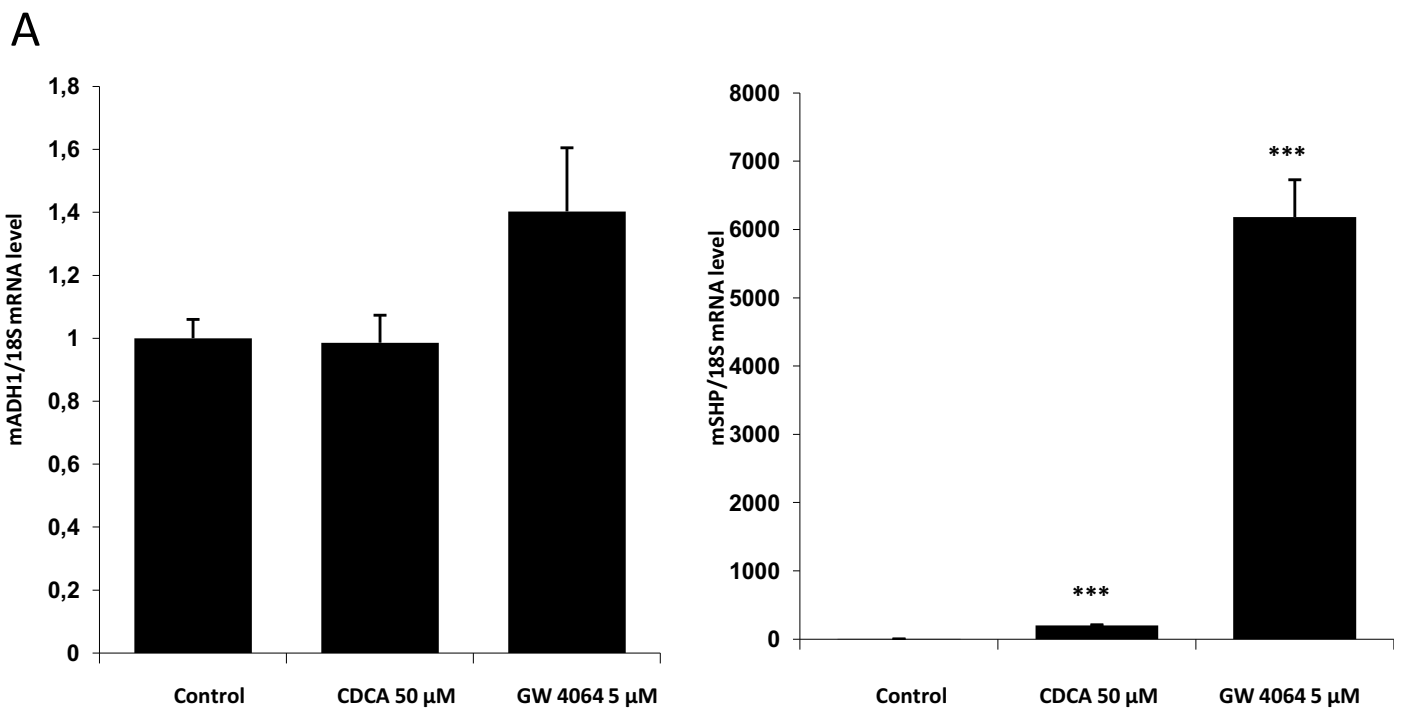


**B**



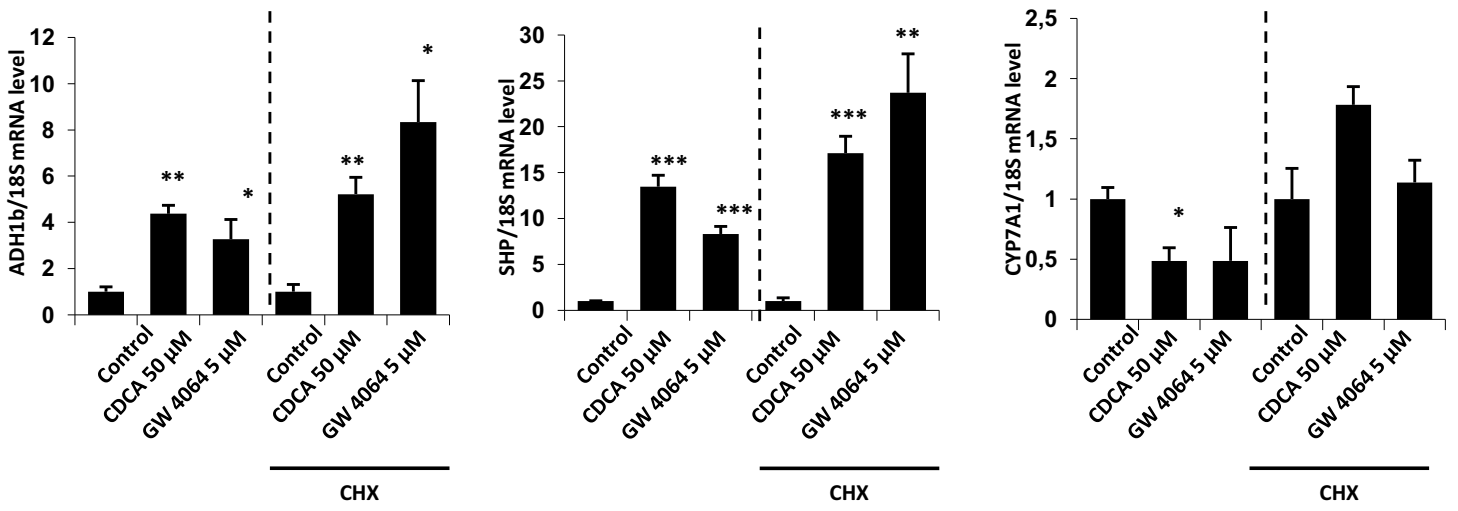
**C**



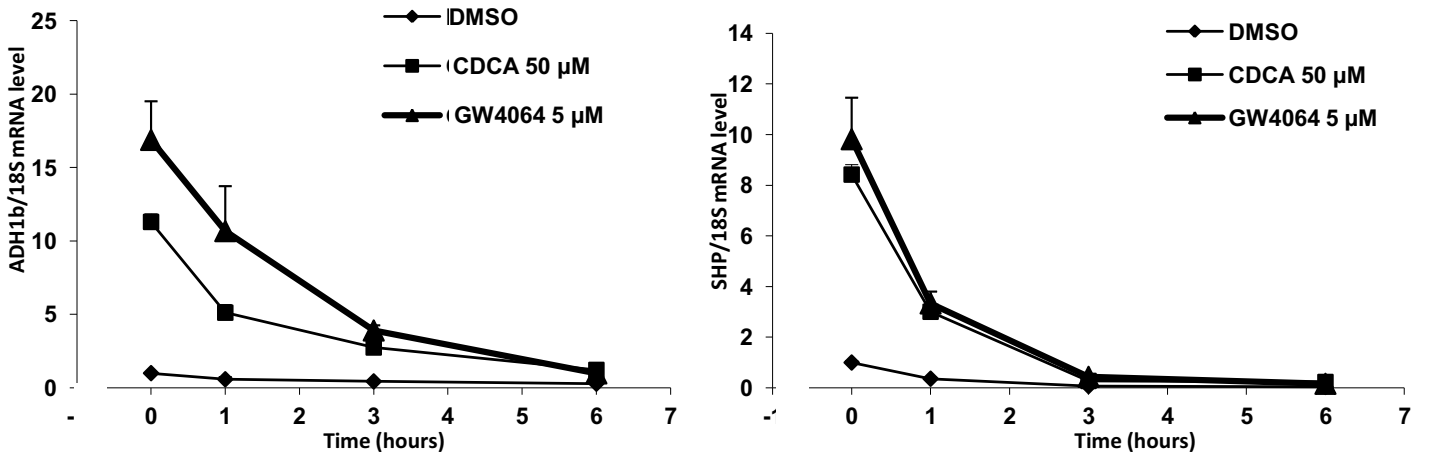




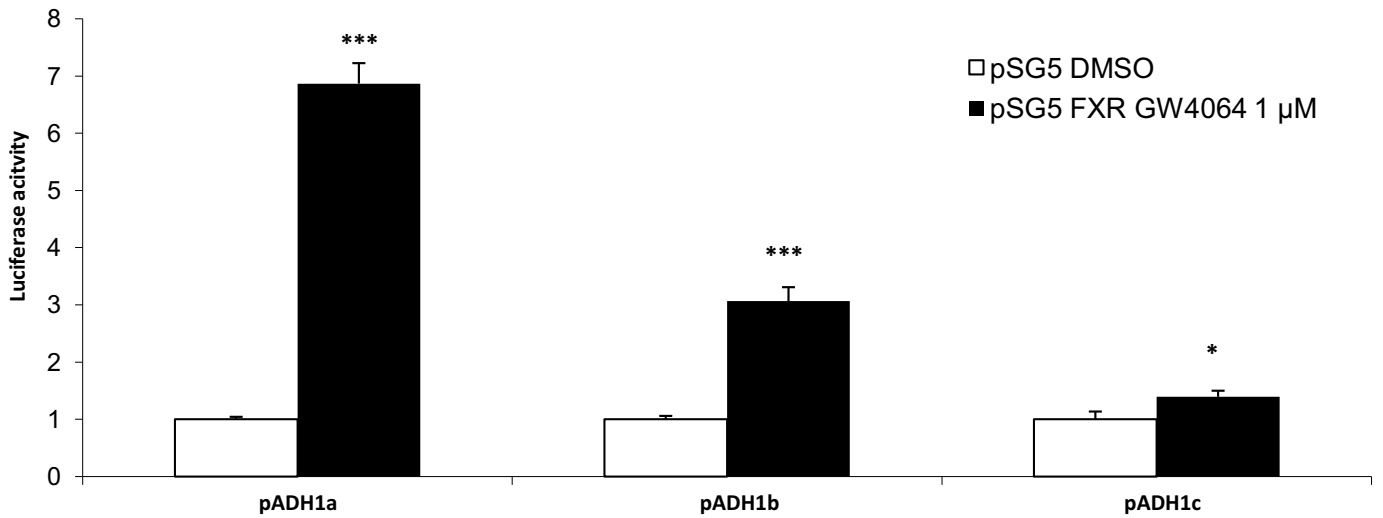
**A**

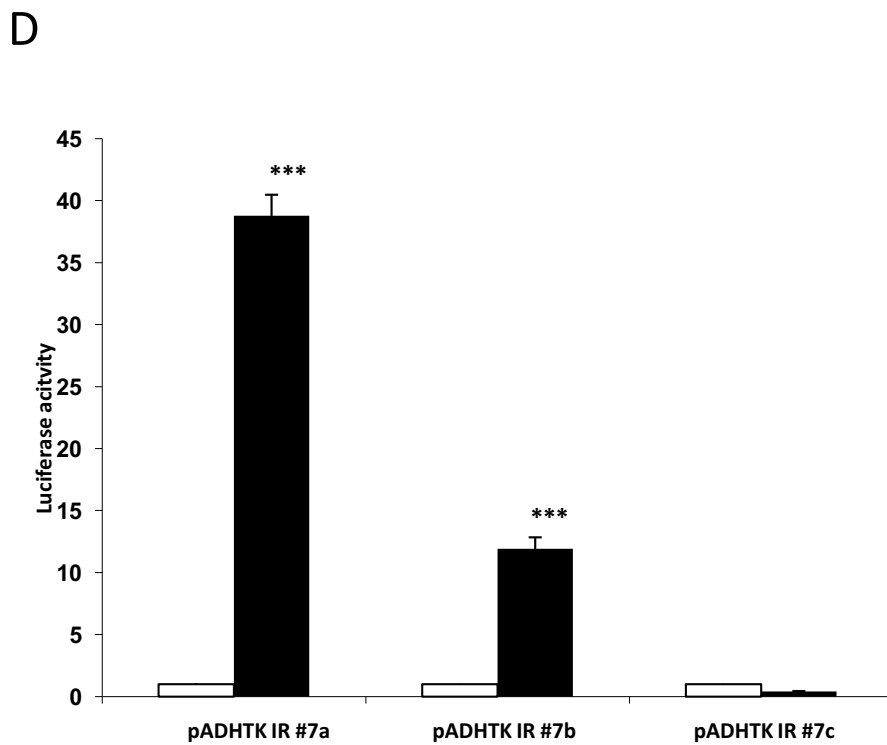
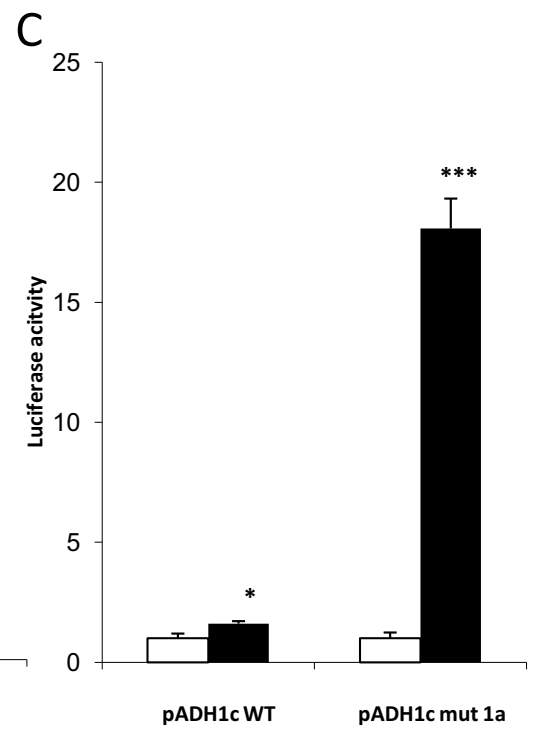
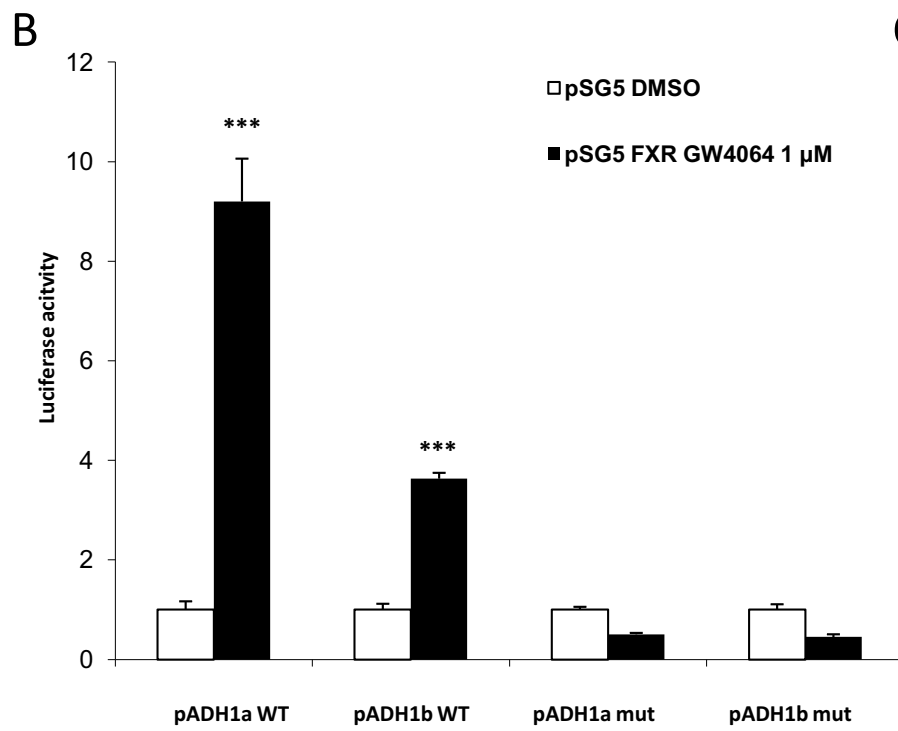
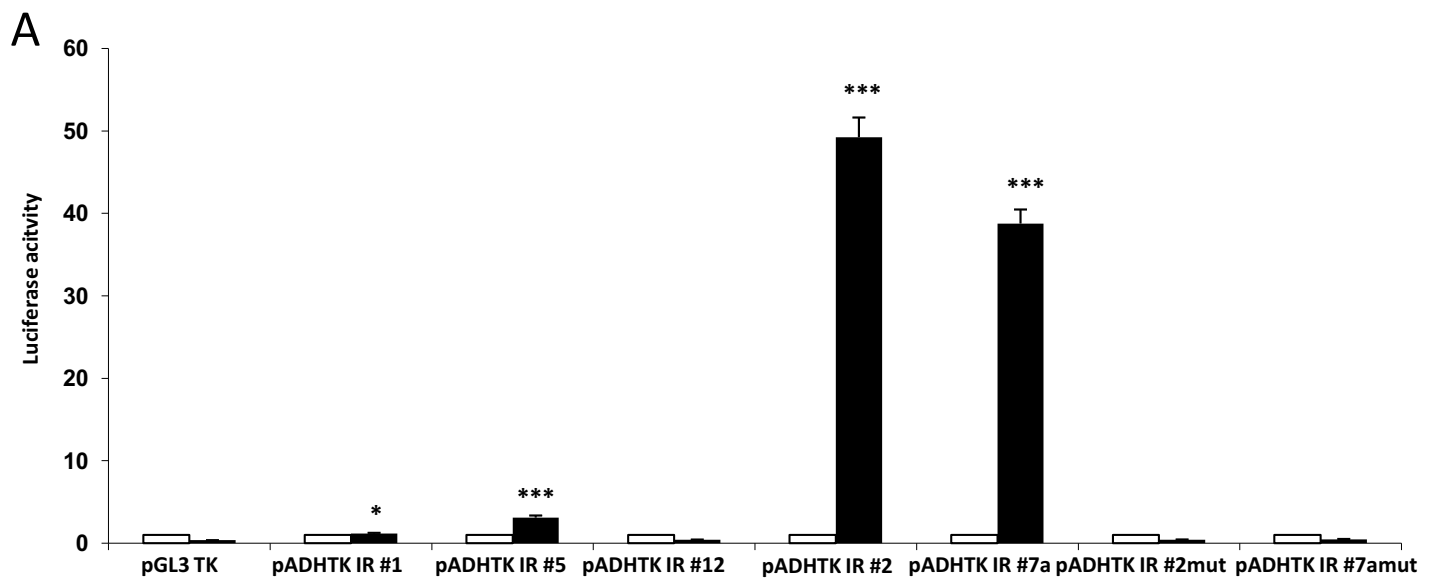


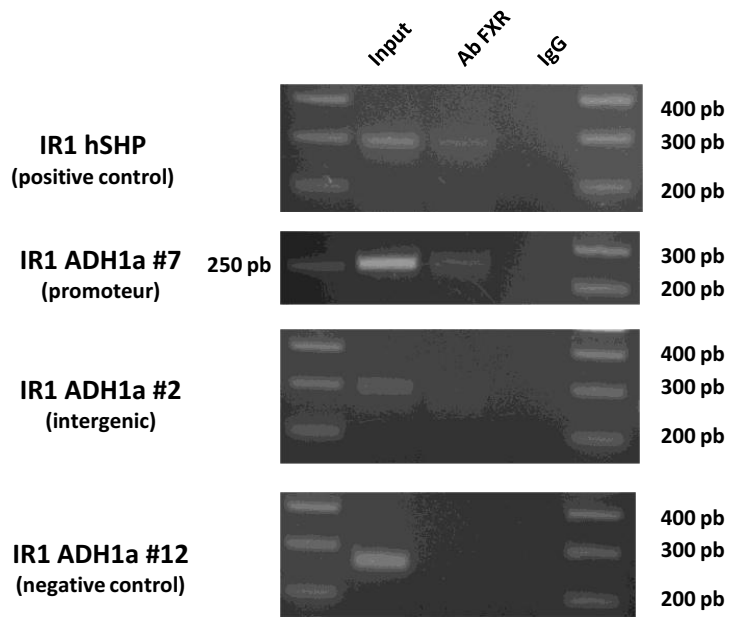
**B**

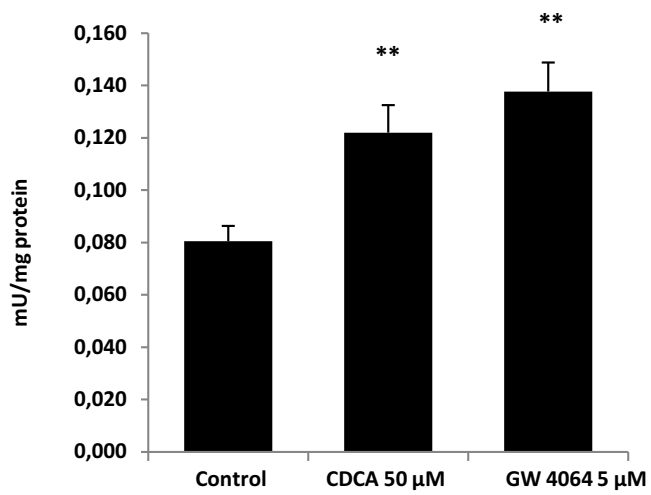
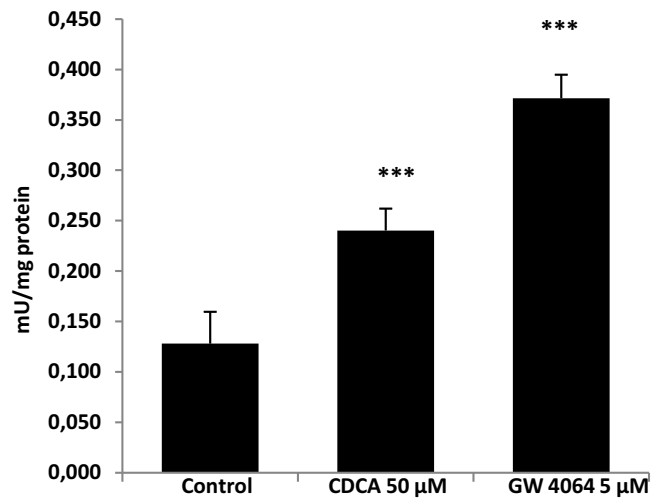
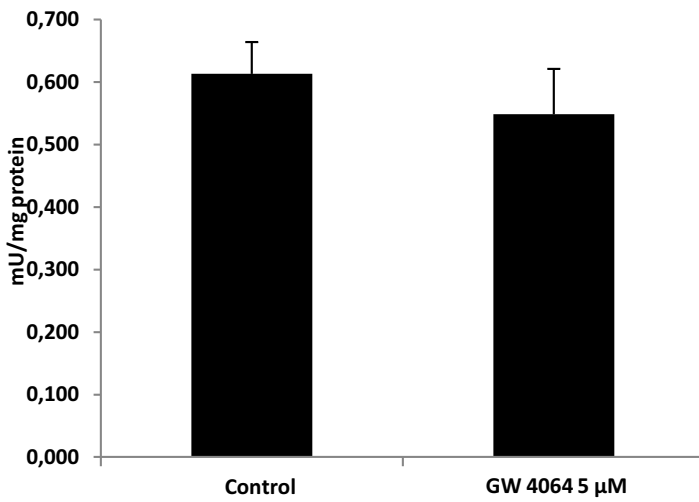
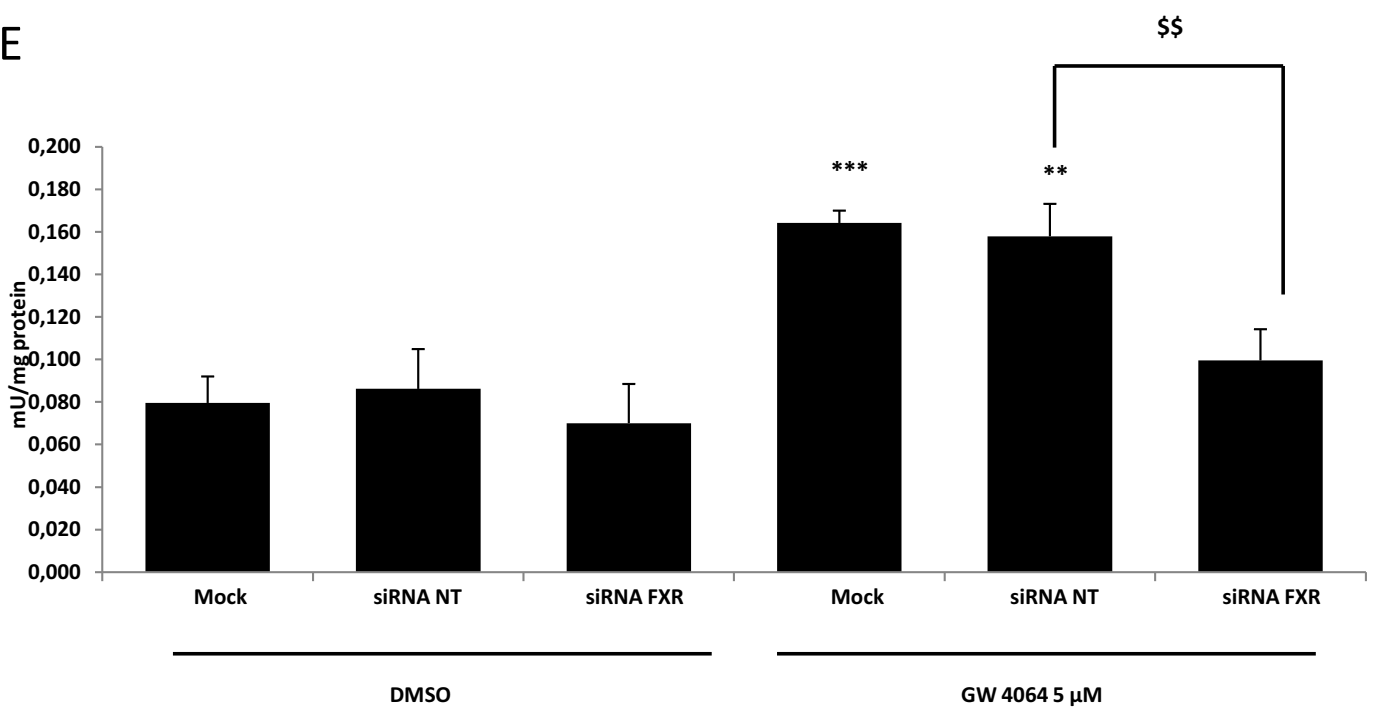


**C**

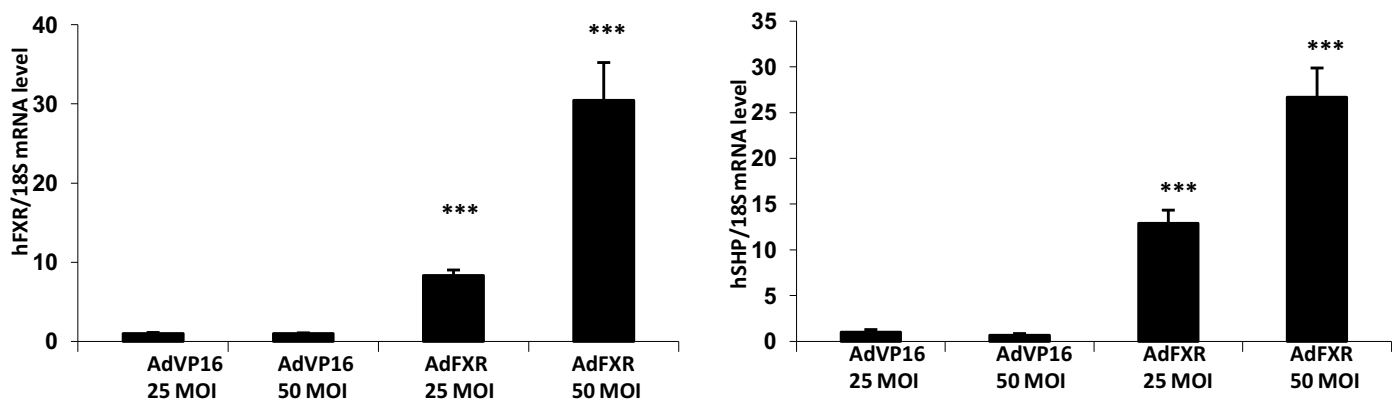




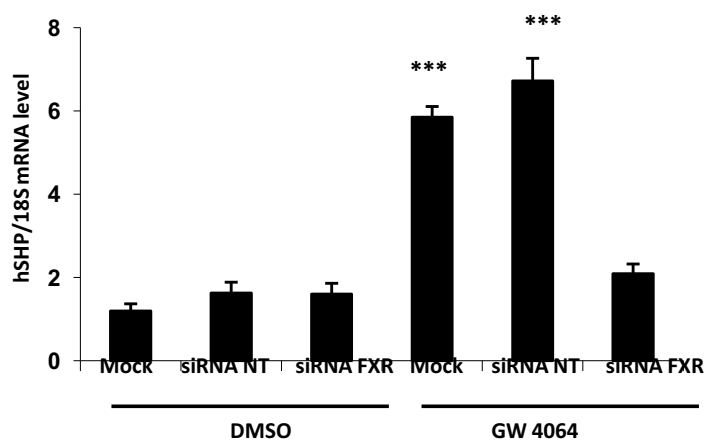


**A****B****C****E**

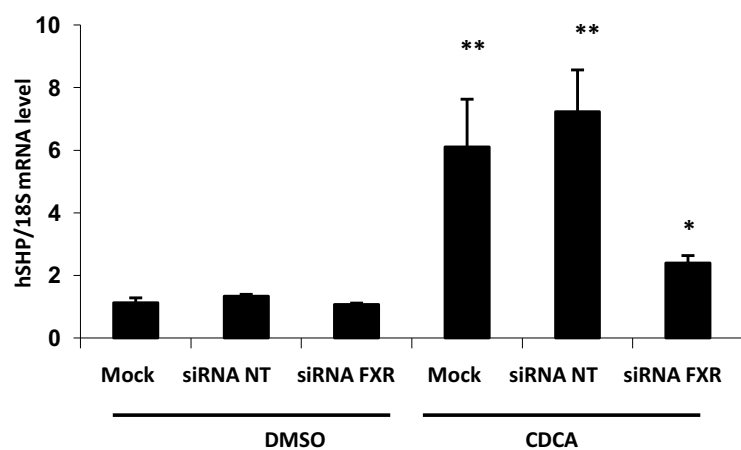
**A**



**C**



**D**



**E**

