



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“Dinámica de localización y expresión
de ARID1A y ARID1B durante el ciclo
celular *in vitro* e *in vivo* en *Mus
musculus*”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A
M. en C. ANGEL FRANCISCO FLORES
ALCANTAR



CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el instituto de Biotecnología, UNAM, UNAM bajo la asesoría de la Dra. Hilda M. Lomelí Buyoli.

Revisores:

Dr. Félix Recillas Targa

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

Dr. Dr. Christopher Wood

Dr. José Luis Montiel Hernández

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

Durante el desarrollo del presente trabajo conté con el apoyo de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Esta tesis esta dedicada a todas las personas y sucesos que se conjugaron en esta pequeña gran ventana de tiempo y que consiente o inconscientemente ayudaron a que este trabajo se llevara a cabo, en especial a:

A mi Madre, la Sra. Yolanda Alcantar Cortes,
A mis hermanos,
A mis sobrinos,
A la vida,
A las decisiones,
A la libertad,
A la música,
Y en la bivalencia del egocentrismo, a Mí

El destino... el futuro... el momento...
es el tributo al pasado y promesas al futuro...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar el posgrado y por ser mi casa, sin Universidades públicas muchas personas que no tenemos recursos no podrían crecer en lo académico.

A mi Jefa la Dra. Hilda Lomelí Buyoli por confiar, asesorar, discutir, pelear, reír y ser mi asesora durante el proyecto, por darme libertad en el desarrollo de experimentos y por todo el apoyo incondicional que me ha brindado.

A la Dra. Diana Escalante Alcalde por asesorarme durante la estancia en su laboratorio, transmitirme su pasión por la ciencia y adoptarme como si fuera su alumno.

A la M. en C. Laura Socorro Ramírez Ángeles por el apoyo técnico brindado durante el desarrollo del proyecto. Gracias Laurita por apoyarme y ser parte activa en esta tesis.

A mi comité Tutoral, la Dra. Hilda Lomelí, Dra. Susana Castro Obregón y Dr. Iván Velasco Velazquez, por todos los comentarios y consejos constructivos cada semestre.

Al comité revisor: Dr. Félix Recillas, Dr. Mario Zurita, Dr. Chris Wood, Dr. José Luis Montiel y Dr. Mario Cruz, por darse el tiempo y espacio para corregir y aportar ideas en el mejoramiento del escrito.

A la Unidad de bioterio del Instituto de Biotecnología, en especial a la I.B.I. Marcela Ramírez Yarza por su valiosa colaboración en la obtención de hembras preñadas.

Al M. en C. Andres Saralegui Amaro por su apoyo técnico en la microscopía confocal.

Al Dr. Leandro David Hernández García y la I.B.Q. Aimée Bastidas Ponce por su apoyo en el cultivo de las células troncales pluripotentes de ratón.

A la L.C.G Adriana V. González Sandoval por su colaboración en los ensayos de sincronización celular, inmunoprecipitación y detección de fosforilaciones.

Al CONACyT por la beca otorgada durante el Proyecto.

A la DGAPA y DGEP, parte de este proyecto auspiciado por estas instituciones.

A mis compañeros de laboratorio, en diez años han desfilado por este laboratorio muchos compañeros por tanto para no olvidar a ninguno, a todos ustedes que fueron parte de este pequeño universo, gracias sinceras.

A mi familia y amigos por compartir conmigo toda la gama de emociones en este viaje maravilloso llamado vida...

Sinceramente,
Angel

La última y nos vamos...

Pues sí! Ahora sí que fue la última tesis que realizamos... Madre para ti, por ti y para nosotros... llegamos al final de este camino. Gracias por ser esa persona tan maravillosa, que siempre esta de pie y nos apoya incondicionalmente. En nombre todos mis hermanos, gracias por escucharnos y darnos tu vida, gracias por compartir risas y llantos. Te aseguro que los seis Te Amamos con toda el Alma.

Mis hermanos son Víctor, Elvira, Mary, Gaby y Adrián... los mejores que me pudieron tocar, gracias por sus consejos y ejemplos implícitos, las risas que siempre acompañan nuestras reuniones, sus palabras calladas son lo mejor que siempre escuchare y sus silencios escandalosos siempre serán apoyados por mí... Los quiero siempre muchachos...

Mis sobrinos... diecisiete de mis hermanos y los hijos de ellos, si ya se! salimos prolíficos, jejeje... todos con características y metas diferentes, pero con la actitud de salir adelante... lo que decidan hacer, háganlo con todas las ganas del mundo...

A mi hijo de vida Moisés Flores Alcantar... Ánimo! Tu puedes eres un gran hombre que tienes todas la actitud y fuerza para ser y hacer lo que tu decidas.

A mis otros hermanos... tomando en cuenta la promiscuidad de la vida tengo muchos consanguíneos con los que he compartido momentos inolvidables en toda la gama de colores, si he de nombrarlos a todos, tengo que acotar son igual de importantes...

Infancia y adolescencia: Edgar (Balan; q.e.d), Neto y Henry García, Fernando, Edgar, Arturo y Daniel Muñoz, Paty, Daisy, Iván y Manuel Sosa; Héctor (Gonzo); Yamil, Mónica y Karina (mis hijas); Israel (gordo), Aldo y Jorge; Karina Imán; **CCHeros:** Mauricio N. Gómora, Erick (Erko), Rogelio, Mauricio Villegas; Jaqueline Reséndiz, Nadia, Marina, Bibiana y Nancy (q.e.d); **Biólogos de Ciencias:** Gabriel Otero (Gabo), Aldo (borracho), Jorge (cejas), Arturo (Cuyo), Edgar (Cake's), Leonardo (Diablo); Sergio (Chucky), Edgardo (Jar-jar), Hiram, Anidia, Whaly, Tony, Kary, Karla Oyuky, Orestes (Gordo), David (Davideño), Ricardo (Rick Cuervo), Janet, Vanessa (q.e.d); **IBtesctos:** Paty (Puebla), Lucia (Luka), Gretel (Roja), Nancy (la gatita), Elida (La gelida), Rosario (Charys), Andrea Mendoza, Brenda (la mamita), Roció (La Dra. Piu), Virgilio (Virk), Raquel (Rachel), Osvaldo (abuelo) Lorena; **Juaritox team:** Oly Caudillo y Annie Espinal; **IFC Team:** Ericka Cruz (Erikilla), Robert, Edmundo, Alex, Ari, Diana (Doctorisima!). **Palapa y anexas!**

Gracias a una persona especial en mi vida: Ana Ibarra, por compartir y soportar gran parte de esta historia, risas, llantos, quejas, festejos, frustraciones, satisfacciones y más...

A mi querida Aimée Bastidas por el tiempo compartido, el entrelineado explicito, experiencias... Gracias por todo y más, deseo que pronto este tu tesis y continúes por el mejor de los caminos.

Mi gran y querida Blanca Ramos Cerrillo, por ser mi confidente y cómplice de risas, hombro de llanto y consejera particular. También a ti pequeño ser de luz, que vienes al final de este proyecto.

Mis hermanos Héctor R. Magadán, Iván Arenas y Javier Aguilar no hay palabras para agradecer todo lo que hemos compartido, el altruismo mutuo y las largas noches de bohemia que tanto disfrutamos, espero sigamos caminando juntos.

Mi alucnis favorita, la mas inteligente e idealista del mundo: Adriana! Te admiro y extraño mucho!

A los que indirectamente han ayudado a encontrar y seguir este camino...

Gracias... Totales!! (Cerati G. 1997)
Angel Flores Alcantar

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología
Molecular

**"Dinámica de localización y expresión de ARID1A
y ARID1B durante el ciclo celular *in vitro* e *in vivo*
en *Mus musculus*"**

PRESENTA

M. en C. Angel Francisco Flores Alcantar

DIRECTOR DE TESIS
DRA. HILDA LOMELÍ BUYOLI

Índice

Índice	7
Abreviaturas	8
Índice de Figuras y Tablas	9
Resumen	10
Introducción	11
Remodelación de la cromatina dependiente de ATP	12
• <i>Una asociación multimérica define a los complejos tipo SWI/SNF</i>	13
• <i>Las familias BAF y PBAF están conservadas a lo largo de la escala evolutiva</i>	15
Subunidades del complejo son esenciales durante el desarrollo embrionario	16
El complejo BAF esta alterado en líneas tumorales y participa en la regulación del ciclo celular	19
Funciones y estructura molecular de ARID1A y ARID1B	22
Antecedentes	25
El gen <i>osa</i> de <i>D. melanogaster</i> interviene tanto en la embriogénesis como en la regulación del ciclo celular y es homólogo a los <i>Arid1</i>.	25
Patrón de expresión de <i>Arid1a</i> y <i>Arid1b</i> durante la embriogénesis de ratón.	26
Justificación	31
Hipótesis	32
Objetivo General	32
Objetivos Particulares	32
Material y Métodos	33
Cultivo y sincronización celular	33
Obtención y disección de embriones pre-implantación	34
Inmunodetección en membrana (western blot)	34
Inmunofluorescencia	35
Microscopía y análisis de datos de fluorescencia	36
<i>Inmunoprecipitación endógena</i>	37
Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	38
Resultados	40
Comparación de la expresión ARID1A y ARID1B durante la embriogénesis	40
<i>ARID1A es modificada post-traduccionalmente <u>in vivo</u></i>	42
Dinámica de localización de ARID1A y ARID1B durante el ciclo celular en cultivo celular.	47
Dinámica de localización de ARID1A y ARID1B en la embriogénesis temprana	54
Discusión	62
Conclusiones	69
Apéndice Soluciones	70
Bibliografía	73

Abreviaturas

ARID1A	AT- Rich Interaction domain-containing protein 1A
ARID1B	AT- Rich Interaction domain-containing protein 1B
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
CTP	Células troncales embrionaria pluripotentes
DNMT	Metil-transferasas de DNA
HATs	Acetil-tranferasas de histonas
DHATs	Des-acetiladas de histonas
HMTasas	Metiltransferasas de histonas
K	Lisina
R	Arginina
ISWI	Chromatin Remodeling by Imitation Switch Complex
CHD	Chromodomain helicase DNA-binding Complex
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non Fermentable Complex
BRM	ATPasa Brahma
Brg1	ATPasa BRM related-gene 1
BAF/BAP	BRM-Brg1 Associated Factors/ BRM Associated Proteins
PBAF/PBAP	Polybromo and Brg1 Associated Factors/ Polybromo Associated BAP
RSC	Remodeling Structure of Chromatin Complex
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
pRB	Proteína Retinoblastoma
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
H3S10P	Fosforilación de la Serina 10 de la Histona H3
rsp18	Proteína ribosomal S18
IP	Inmunoprecipitación
ChiP	Inmunoprecipitación de cromatina
HeLa	Línea celular inmortal derivada de cáncer cervical
dpc	Días post – coitum
HIS	Hibridación <i>in situ</i>
FSB	Suero fetal bovino
TLB	Triton Lisis buffer
NEM	N-etilmaleimida
WB	Ensayos de inmunoblot
qPCR	PCR cuantitativo
kDa	Kilo-Daltones
aa	residuos de aminoácidos

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1	12
Figura 2	19
Figura 3	20
Figura 4	23
Figura 5	27
Figura 6	30
Figura 7	40
Figura 8	42
Figura 9	45
Figura 10	46
Figura 11	48
Figura 12	49
Figura 13	50
Figura 14	51
Figura 15	53
Figura 16	54
Figura 17	55
Figura 18	56
Figura 19	57
Figura 20	59
Figura 21	60
Figura 22	66
Tabla 1	14
Tabla 2	18
Tabla 3	43
Esquema de Montaje de embriones	35
Esquema de Cuantificación de fluorescencia	36
Esquema de citometría de flujo	38

Resumen

ARID1A y ARID1B son proteínas homólogas que alternativamente forman parte del complejo BAF. BAF es un complejo tipo SWI-SNF que remodela cromatina hidrolizando ATP y participa en procesos como proliferación y diferenciación celular. En ratón, ARID1A interviene en la gastrulación y en el mantenimiento de las células troncales embrionarias pluripotentes (CTP; Gao et al. 2008). Por su parte, ARID1B también regula la regeneración del estado indiferenciado de las CTP (Yan et al. 2008). *In vitro*, estas proteínas participan antagónicamente durante la proliferación celular, es decir ARID1A esta involucrado en el cese de la proliferación, mientras que ARID1B promueve la progresión de G1 a S (Nagl et al. 2007).

Hasta el momento no se conoce como se regula la función diferencial de las subunidades ARID1 durante la proliferación, por lo tanto nuestro objetivo fue explorar los factores que determinan la disponibilidad y funcionalidad de estas proteínas en el complejo BAF, durante el ciclo celular *in vitro* y en embriones pre-implantación. Como alternativas, analizamos la dinámica de síntesis y localización subcelular tanto de ARID1A como de ARID1B en las fases del ciclo celular, y observamos que presentan una localización diferencial, es decir, ARID1A se expresa en la interfase y se degrada al llegar a la mitosis. En contraste, ARID1B se expresa de manera estable durante del ciclo celular manteniéndose constante en la división celular tanto en células en cultivo como en embriones preimplantación. Adicionalmente, nuestros resultados sugieren que la expresión de ARID1B aumenta en la transición de G1 a S. Alternativamente realizamos la búsqueda de modificaciones post-traduccionales que sean indicativas de la regulación funcional como fosforilaciones, sumoilaciones o ubiquitinaciones y observamos mediante ensayos de inmunoprecipitación que ARID1A esta ubiquitinada, lo que probablemente regula su degradación durante la mitosis.

En conclusión, el presente estudio muestra que ARID1A se expresa en mayor proporción que ARID1 B durante la embriogénesis sugiriendo que ARID1A tiene funciones globales durante el desarrollo embrionario y ARID1B regula procesos más específicos. También mostramos que ambas subunidades tienen patrones de expresión diferencial durante la proliferación, que es evidente durante la mitosis. Esta dinámica es similar a la reportada para las subunidades catalíticas del complejo BAF (BRM y Brg1). Además sugerimos que ARID1A es ubiquitinada, lo que podría contribuir a la modulación de su actividad y ensamblaje al complejo durante el ciclo celular.

Introducción

El DNA de eucariontes se asocia con proteínas dentro del núcleo formando una estructura llamada *cromatina*. La unidad básica de compactación es el *nucleosoma*, formado por una asociación octamérica de histonas que empaquetan alrededor de 146 pb (revisado en Roberts y Orkin 2004). En células interfásicas se conocen dos tipos de estados cromatínicos: una región referida como *heterocromatina* que se mantiene densamente condensada durante la interfase, es transcripcionalmente inactiva, se replican tardíamente durante la síntesis del DNA y generalmente presentan regiones extendidas de DNA repetitivo (revisado en Rice y Allis 2001). Por su parte, las zonas de DNA laxo donde hay altos niveles de transcripción es definida como *euromatina*. Sin embargo, estos estados de compactación son dinámicos y se remodelan en respuestas transitorias a señales fisiológicas o del desarrollo, pero la decisión en la identidad celular perdura a lo largo de la vida del organismo. Este mecanismo se conoce como *memoria celular* y es importante en procesos como la regulación del ciclo celular y diferenciación tejido específica (van Lohuizen 1999; Cavalli 2002; Simon y Tamkun 2002).

La *memoria celular* o *memoria epigenética* esta definida como los mecanismos que generan modificaciones heredables de la cromatina sin alteración de la secuencia nucleotídica. Dicho proceso depende de la acción coordinada tanto de asociaciones proteicas que modifican covalentemente a las histonas y el DNA, así como de la remodelación cromatínica por complejos multiméricos que hidrolizan ATP (Muchardt y Yaniv 1999; Grewal y Moazed 2003; Mahmoudi y Verrijzer 2001; Narlikar et al. 2002). Dentro de las modificaciones covalentes de la cromatina se incluyen a la metilación del DNA, metilación y/o acetilación de histonas. Cada tipo de modificación covalente esta involucrada en activación o represión génica, es decir, la metilación está involucrada en el silenciamiento génico; por ejemplo, en la represión de elementos transponibles y en la inactivación del cromosoma X en mamífero, las enzimas responsables de generar los patrones de metilación son las metil-transferasas de DNA (DNMT), las cuales modifican el carbono 5 de las citosinas con el grupo metilo en los dinucleótidos CpG, generando patrones de metilación en regiones ricas en el dinucleótido (revisado en Vaissiere et al. 2008). Por su parte, la *metilación de histonas* consiste en la modificación de residuos de lisinas (K) y argininas (R) de los extremos amino-terminal de las histonas por la acción metiltransferasas de histonas (HMTasas). residuos de lisinas (K) y argininas (R) de los extremos amino-terminal de las histonas por la acción metiltransferasas de histonas (HMTasas; Clarke S. 1993).

Remodelación de la cromatina dependiente de ATP

En mamíferos se han descrito alrededor de 26 ATPasas diferentes que funcionan como subunidades catalíticas de complejos multiproteicos que remodelan cromatina hidrolizando ATP. La mayoría de las deleciones de estos genes en el ratón son letales, presentando severos defectos durante el desarrollo embrionario y/o son haploinsuficientes, sugiriendo que presentan funciones específicas, siendo esenciales durante la embriogénesis (revisado en Ho y Crabtree 2010).

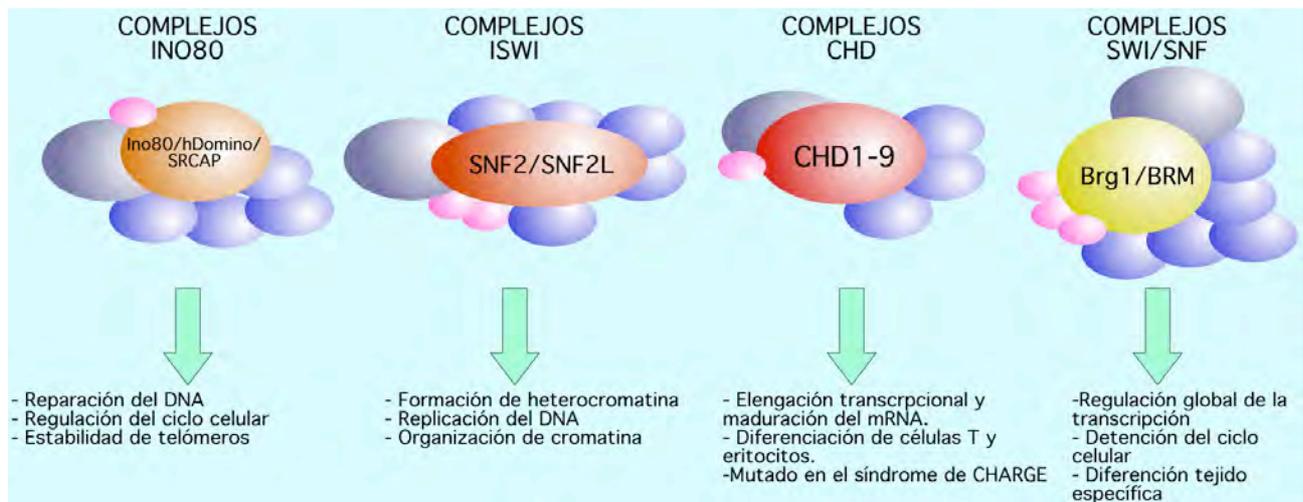


Fig. 1. Las familias de complejos remodeladores de cromatina tienen como subunidad catalítica ATPasas homologas y participan en distintos procesos celulares. En naranja, rosa, rojo y amarillo se representan las distintas ATPasas de los complejos, en azul se representan subunidades accesorias de los complejos. En morado se denota su interacción con otros complejos (como HATS, HMTasas, etc.), en rosa se denota la interacción con otras proteínas como reguladores de la transcripción.

Dichas asociaciones multiméricas se han clasificado en 4 familias principales tomando como referencia la secuencia y estructura de la subunidad catalítica: los complejos tipo INO80, ISWI, CHD y SWI/SNF (Fig.1 revisado en Ho y Crabtree 2010). Adicionalmente, existe un grupo de subunidades que interactúan con la ATPasa pueden aumentar su actividad remodeladora, estabilizando o sirviendo de andamiaje del complejo. Por otra parte se ha descrito que en todos los complejos multiméricos se asocian subunidades exclusivas que son determinantes para la especificidad de los blancos de regulación (revisado en Hargreaves y Crabtree 2011). Cada una de estas familias participan en diferentes procesos celulares, por ejemplo en los complejos tipo INO80 están involucrados en la reparación del DNA, regulación de los puntos de control del ciclo celular y estabilidad de los telómeros (Morrison et al. 2004; Yu et al. 2007). Las asociaciones tipo ISWI están implicadas en la represión transcripcional, formación de la heterocromatina y el mantenimiento de la pluripotencia en células troncales embrionarias

pluripotentes de ratón (Deuring et al. 2000; Stopka et al. 2003). Estudios *in vitro* sugieren que el complejo ISWI está involucrado en el mantenimiento de la estructura de la cromatina estableciendo el espacio entre los nucleosomas (revisado en Hargreaves y Crabtree 2011). En el caso de la familia CHD, se han caracterizado algunas funciones que incluyen el mantenimiento de la actividad transcripcional en células ES por parte de las ATPasas CHD1/2 (Gaspar-Maia et al. 2009). Otras subunidades han sido implicadas en la represión transcripcional interactuando con complejos de desacetilasas de histonas como NURD (revisado en Hargreaves y Crabtree 2011). Los complejos SWI/SNF están involucrados en procesos de activación y represión de la expresión génica en diferentes procesos celulares, los cuales se abordarán en detalle en las siguientes secciones (revisado en Ho y Crabtree 2010).

- Una asociación multimérica define a los complejos tipo SWI/SNF

El complejo SWI/SNF es una asociación proteica que en mamíferos pesa alrededor de 2 MDa y está constituido por aproximadamente 15 subunidades (Tabla 1; revisado en Morhman y Verrijzer 2005). Muchas de estas presentan variantes que son codificadas por genes parálogos o por splicing alternativo, por ejemplo las ATPasas Brg1 (BRM related-gene 1) y BRM, mientras que otras subunidades son únicas como BAF47/INI1 y β -actina (revisado en Hargreaves y Crabtree 2010). Todas estas subunidades pueden interaccionar generando distintas combinaciones, sugiriendo una gran diversidad de complejos tipo SWI/SNF para regular distintos procesos celulares como la proliferación y la diferenciación tejido específico (revisado en Ho y Crabtree 2010). Aunque las ATPasas por si solas pueden modificar la cromatina *in vitro*, la interacción de BAF155/SRG3, BAF170 y BAF47/INI1 aumentan su actividad remodeladora en los ensayos de remodelación de cromatina en nucleosomas individuales, por lo que estas subunidades junto con la ATPasa son conocidas como el “núcleo proteico” de los complejos tipo SWI/SNF (Phelan et al. 1999).

Adicionalmente se han descrito subunidades exclusivas que interaccionan con el complejo SWI/SNF generando así dos subfamilias principales, es decir, la familia *BAF* (Brg1/BRM Associated Factors; Tabla 1), que está definida por la presencia alternativa de las ATPasas Brg1 y BRM, así como de las proteínas homólogas ARID1A o ARID1B en mamífero (cuyos homólogos son SWI1 en *S. cerevisiae* y Osa en *D. melanogaster*); y la familia *PBAF* (Polybromo and Brg1 Associated Factors; Tabla 1) definida por la presencia exclusiva de la ATPasa Brg1 y las subunidades BAF180/Polybromo y BAF200/ARID2

(cuyos homólogos en mosca son BAP180 y BAP170; revisado en Mohrmann y Verrijzer 2005; Wu et al. 2009).

Ensayos de co-inmunoprecipitación y ChiP's en extractos nucleares de células HeLa a distintas concentraciones de sales indicaron que hay asociaciones entre subunidades de las distintas subfamilias de complejos unidas a DNA y libres, sugiriendo que hay un pre-ensamblaje de subcomplejos, indicando mayor diversidad de posibles combinaciones y que su actividad depende de otros factores que incluyen el contexto de la cromatina, presencia de subunidades y posiblemente modificaciones post-traduccionales que modulen la actividad del complejo (Ryme et al. 2009). Por ejemplo se ha reportado que las ATPasas son fosforiladas en momentos específicos del ciclo celular regulando su función (Muchardt et al. 1996), otras subunidades como BAF57 pueden ser ubiquitinadas para su degradación (Keppler y Archer 2010).

Tabla 1. Las subunidades de complejos tipo SWI/SNF están conservadas desde levadura hasta mamífero (Morado - "núcleo del complejo"; azul- subunidades accesorias; amarillo - específicas de PBAF; Rosa-específicas de BAF; modificada Roberts y Orkin 2004; Mohrmann y Verrijzer 2005).

Complejos de la familia Brm/Brg1-Associated Factor (BAF)			Complejos de la familia Polybromo-associated BAF (PBAF)		
SWI/SNF (<i>S. cerevisiae</i>)	BAP (<i>D. melanogaster</i>)	BAF (Mamífero)	RSC (<i>S. cerevisiae</i>)	PBAP (<i>D. melanogaster</i>)	PBAF (mamífero)
Swi2/Snf2	BRM	BRG1 BRM	Sth1	BRM	BRG1
Snf5	SNR1	BAF47/INI1	Sfh1	SNR1	BAF47/INI1
Swi3	BAP155/ Moirá	BAF155/ Srg3	Rsc8	BAP155/ Moirá	BAF155/ Srg3
	<u>BAP170</u>	<u>BAF170</u>		<u>BAP170*</u>	<u>BAF170</u>
Swp73/Snf12	BAP60	BAF60 (a-c)	Rsc6	BAP60	BAF60 (a-c)
		BAF45 (a-d)			BAF45 (a-d)
Arp9	BAP55	BAF53 (a-b)	Arp9	BAP55	BAF53 (a-b)
Arp7	BAP47/ ACT1/2	β -actina	Arp7	BAP47/ ACT1/2	β -actina
	BAP111	BAF57		BAP111	BAF57
	BAP74				
			Rsc1, Rsc2, Rsc4	Polibromo	Polibromo/ BAF180
			Rsc9	BAF170	BAF200
Swi1	OSA	ARID1A ARID1B			

- Las familias BAF y PBAF están conservadas a lo largo de la escala evolutiva

Las dos clases de asociaciones proteicas tipo SWI/SNF en mamífero, están presentes desde *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) hasta cordados y son definidas por subunidades homólogas en los diferentes organismos (Tabla 1), es decir:

•La “familia BAF” incluye al complejo SWI/SNF (SWItch defective/Sucrose Non Fermentable) de levadura, BRAHMA o BAP (Brm- Associated Proteins) de *D. melanogaster* y BAF de mamífero (revisado en Mohrmann y Verrijzer 2005).

•La “familia PBAF” integrada por los complejos RSC (Remodeling Structure of Chromatin) de levadura, PBAP (Polybromo – associated BAP) de *D. melanogaster* y PBAF de mamífero (revisado en Mohrmann y Verrijzer 2005).

En todos los organismos estas dos familias de complejos participan en procesos independientes y no se complementan funcionalmente, por ejemplo en *S. cerevisiae*, el complejo tipo PBAF (RSC) es importante para la viabilidad de la levadura interviniendo en procesos como la regulación de la división celular (Krebs et al. 2000). Por su parte, el complejo SWI/SNF interviene en procesos metabólicos de la sucrosa, en el “mating-type” y la mutación de alguna de sus subunidades no compromete la sobrevivencia del organismo (revisado en Roberts y Orkin 2004).

En organismos multicelulares hay un cambio funcional de los complejos durante la evolución (Moshkin et al. 2008; Carrera et al. 2008), es decir, a diferencia de la levadura, en *D. melanogaster* el complejo BAP es necesario para la viabilidad, regula la división celular (Moshkin et al. 2008; Baig et al. 2010) y la expresión de genes homeóticos durante la embriogénesis (Treisman et al. 1997; Vázquez et al. 1999). En cambio, el complejo PBAP no es importante en la sobrevivencia de la mosca, interviene durante la generación de la cutícula del huevo en células foliculares del ovario, sin embargo las moscas carentes de este complejo sobreviven y son fértiles, además participa en la regulación génica del sistema inmune (Carrera et al. 2008). Ensayos de inmunofluorescencia en cromosomas politénicos sugiere que la localización de ambos complejos es excluyente corroborando que participan diferencialmente en la regulación transcripcional (Moshkin et al. 2008).

En mamíferos se han caracterizado las subunidades exclusivas de los complejos BAF (ARID1A y ARID1B; Gao et al. 2008; Yan et al. 2008) y PBAF (BAF180/Polybromo y BAF200/ARID2; Wang et al. 2004; Yan et al. 2006). En ambos casos la mutación es letal aunque su efecto ocurre a diferentes momentos de la embriogénesis: cuando se elimina ARID1A el ratón muere durante la gastrulación (6.5 días post - coitum - dpc -) al no

formarse la capa mesodermal (Gao et al. 2008). La delección heteróciga de ARID1A o ARID1B presenta fenotipo haploinsuficiente en células embrionarias troncales de ratón (se detalla más adelante; Gao et al. 2008; Yan et al. 2008). En cambio, la pérdida de función de BAF180/Polybromo (complejo PBAF) es letal a los 12.5-13.5 dpc presentando defectos en la formación de corazón; el heterocigoto no genera fenotipo visible (Wang et al. 2004). Estudios en células HeLa mostraron que BAF200/ARID2 regula genes responsivos a interferón (Yan et al. 2005). Estas evidencias demuestran que los complejos BAF y PBAF están conservados a lo largo de la escala evolutiva y regulan diferentes procesos biológicos.

Subunidades del complejo son esenciales durante el desarrollo embrionario

En mamífero los complejos BAF y PBAF comparten las subunidades del "núcleo proteico" (Tabla 1) y se ha tratado de dilucidar cual es la participación de cada proteína en la regulación génica en diferentes procesos como la embriogénesis y la proliferación celular. En ratón se han caracterizado varias de las subunidades del complejo por medio del estudio de ratones mutantes nulos, así como por ensayos de diferenciación de células pluripotentes (CTP; Tabla 2). Para las ATPasas, se ha mostrado que aunque ambos transcritos son heredados maternalmente, la proteína Brg1 está presente desde el desarrollo preimplantación y durante toda la embriogénesis, mostrando una expresión fuerte y generalizada (Randazzo et al. 1994; LeGouy et al. 1998). Por el contrario, BRM se detecta a partir del estadio de blastocisto (al inicio de la diferenciación celular) y presenta menor a que Brg1 a lo largo de la embriogénesis (LeGouy et al. 1998; Reyes et al. 1998; Bultman et al. 2000). La delección de Brg1 en el ratón es letal durante la pre-implantación, ya que no se establece ni el trofoblasto, ni la masa celular interna¹. Mientras que el 15% de los ratones heterocigotos presentan excencefalia, el resto son viables y fértiles; sin embargo son susceptibles a la formación de tumores (Bultman et al. 2000). Por su parte, la pérdida de función de BRM no genera letalidad embrionaria, pero se observa un aumento en el tamaño de los ratones adultos, debido a un aumento en el índice mitótico (Reyes et al. 1998). Estos datos indican que Brg1 tiene funciones esenciales durante el desarrollo embrionario y su expresión elevada podría complementar la función de BRM. Por su parte, BRM está involucrada en la regulación de la proliferación y no es capaz de complementar la función de Brg1 (Bultman et al. 2000). Por otra parte,

¹ El trofoblasto es la capa celular que rodea al blastocisto, estas células son diferenciadas y generan los tejidos extrambrionarios. La masa celular interna (MCI) es el grupo celular dentro del trofoblasto que tiene la capacidad de generar al embrión ya esta compuesta de células pluripotentes.

ensayos de diferenciación de células troncales pluripotentes sugieren que Brg1 interviene en el mantenimiento del estado indiferenciado y BRM participa en el proceso de diferenciación celular (Ho et al. 2009).

En ratón se han caracterizado las funciones de varias subunidades de los complejos tipo SWI/SNF incluyendo las subunidades del núcleo proteico que de manera homocigota son letales durante el desarrollo y heterocigota presentan diferentes defectos incluyendo exencefalia o susceptibilidad a la tumorigénesis (Tabla 2; Klochendler-Yeivin et al. 2000; Roberts et al. 2000; Kim JK et al. 2001). Adicionalmente se han caracterizado subunidades accesorias del complejo revelando fenotipos discretos en procesos como proliferación o diferenciación celular tejido específica (Tabla 2; Lickert et al. 2004; Lessard et al. 2007; Takeuchi et al. 2007; Wu et al. 2007).

Tabla 2. Caracterización de subunidades de los complejos BAF y PBAF durante la embriogénesis (Morado - "núcleo del complejo"; azul- subunidades accesorias; amarillo - específicas de PBAF; Rosa- específicas de BAF).

Subunidad	Papel en el complejo	Fenotipo y función durante la embriogénesis
BRM	ATPasa	Viable y fértil, Solo se observa aumento en la talla y peso del -/- (Reyes et al. 1998). Promueve la diferenciación tejido específica, su expresión aumenta durante el proceso (Flowers et al. 2009)
Brg1	ATPasa	Letal durante la preimplantación (Bultman et al. 2000), Regula la activación cigótica e interviene e la diferenciación tejido específica de neuronas (Seo S et al. 2005), adipocitos (Pedersen et al. 2001), miocitos (De la serna et al. 2001). Ratones +/- presenta excencefalia y susceptibilidad a tumorigénesis (Bultman et al. 2000).
BAF155/Srg3 BAF170	Andamiaje y protección a degradación	BAF155/Srg3 es letal durante la peri-implantación. El 20% de los heterocigotos presenta excencefalia por defectos durante el cierre del tubo neural y el resto es susceptible a tumorigénesis (Kim et al. 2001)
BAF47/INI1	Unión a DNA e interacción con otras proteínas	Letal durante la gastrulación (Klorchender-Yeivin et al. 2000), adipocitos Ratones +/- son susceptibles durante a la formación de tumores de derivados ectodérmicos (Klochender-Yeivin et al. 2000; Roberts et al. 2000).
BAF60 (a-c)	Accesoria	BAF60C interviene en el desarrollo del corazón (Lickert et al. 2004) y en el establecimiento de eje izquierda-derecha (Takeuchi et al. 2007).
BAF45 (a-d)	Accesoria	BAF45A necesaria para la proliferación y mantenimiento de células progenitoras neurales. BAF45B y C se expresan en neuronas diferenciadas (Lessard et al. 2007).
BAF 57	Accesoria	Se ha propuesto su participación en el desarrollo células T (Chi et al. 2002)
BAF53 (a-b)	Accesoria	BAF53A involucrada en el mantenimiento de las células progenitoras neurales (Lessard et al. 2007). BAF53B se expresa en neuronas diferenciadas y es necesaria para el crecimiento dendrítico (Lessard et al. 2007; Wu et al. 2007).
ARID1 (A-B)	Define al complejo BAF	ARID1A es letal durante la gastrulación, células troncales embrionarias es necesario para mantener pluripotencialidad (Gao et al. 2008). ARID1B es necesaria en el mantenimiento de la pluripotencialidad y regulación global de genes (Yan et al. 2007)
BAF180/Polybromo	Define al complejo PBAF	Interviene en el desarrollo del corazón (Wang et al. 2004; Huang et al. 2008)
BAF200	Exclusiva de PBAF	Aun no se reporta caracterización en ratón

El complejo BAF esta alterado en líneas tumorales y participa en la regulación del ciclo celular

El ciclo celular es una secuencia de eventos que incluyen el crecimiento, replicación de componentes y la división de una célula madre en dos células hermanas. Las dos fases principales del ciclo son la replicación del DNA (fase S) y la Mitosis (fase M). Entre estas 2 fases existen puntos de regulación: El primer censo (fase G1), se lleva a cabo después de la mitosis para descartar errores durante la segregación cromosomal, además de permitir el crecimiento de la célula. El otro punto de control o fase G2, tiene como finalidad corregir posibles errores de la fase S (Fig. 2; revisado en Tyson y Novak 2008).

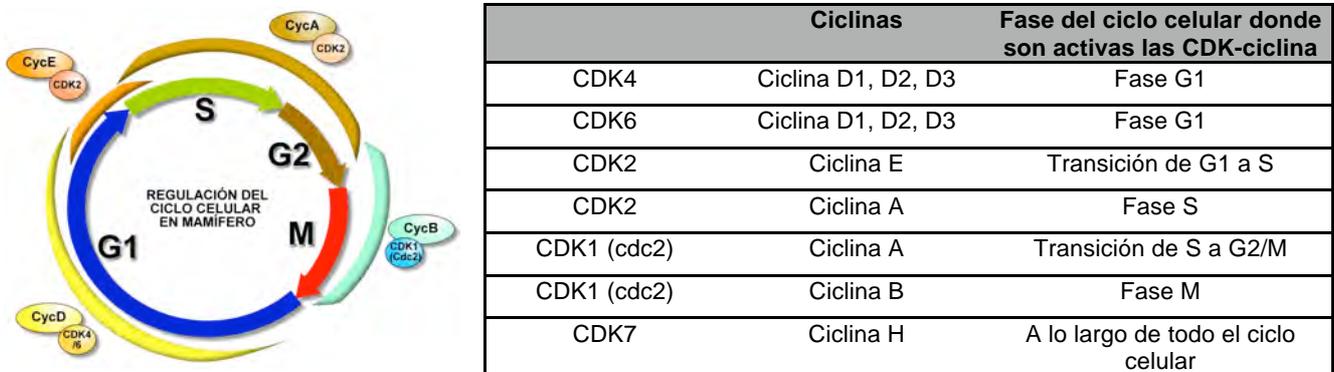


Fig 2. La progresión del ciclo celular esta modulada por la acción de cinasas dependientes de ciclinas (CDKS) en asociación de ciclinas. Izquierda: Representación esquemática de la expresión de ciclina-CDK en cada fase del ciclo celular, es decir CiclinaD-CDK4/6 promueven el inicio de la proliferación en Fase G1, posteriormente CiclinaE-CDK2, la progresión a síntesis (S), Ciclina A-CDK2 regula la transición de S a G2 y finalmente CiclinaB-CDK1 regula la fase de mitosis (M). Derecha: tabla de las diferentes ciclinas reportadas y su asociación con CKDs a lo largo del ciclo celular en mamífero (Vermeulen et al. 2003; Tyson y Novak 2008).

La regulación durante la progresión del ciclo celular es indispensable para evitar que la célula adquiera identidad tumorigénica (revisado en Malumbres y Barbacid 2009). La proliferación está regulada por la asociación coordinada de distintas proteínas, como las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs)² y su asociación con ciclinas. Estos complejos tienen blancos específicos que promueven la transición de una fase a otra (Fig. 2), entre ellos se incluye retinoblastoma³ (pRb), el cual es fosforilado de manera dinámica durante el ciclo celular. En general, la acción de ciclina D – CDK4/6 conlleva la progresión de G1/S fosforilando a pRB y promoviendo la expresión de genes necesarios para la síntesis

² Es una familia de cinasas de treoninas y serinas activadas en puntos específicos del ciclo celular.

³ Proteína supresora de tumores que actúa como represor de genes que promueven la progresión del ciclo celular como E2F1-3, ciclina A, ciclina E, (revisado en Vermeulen et al. 2003)

de DNA y la progresión de la proliferación. Posteriormente, la hiperfosforilación de pRb permite la transición de S a G2/M. El complejo ciclinas-CDK's también modifica otras CDKs y proteínas del citoesqueleto regulando la mitosis (Fig. 3; revisado en Vermeulen et al. 2003; Tyson y Novak 2008; Malumbres y Barbacid 2009).

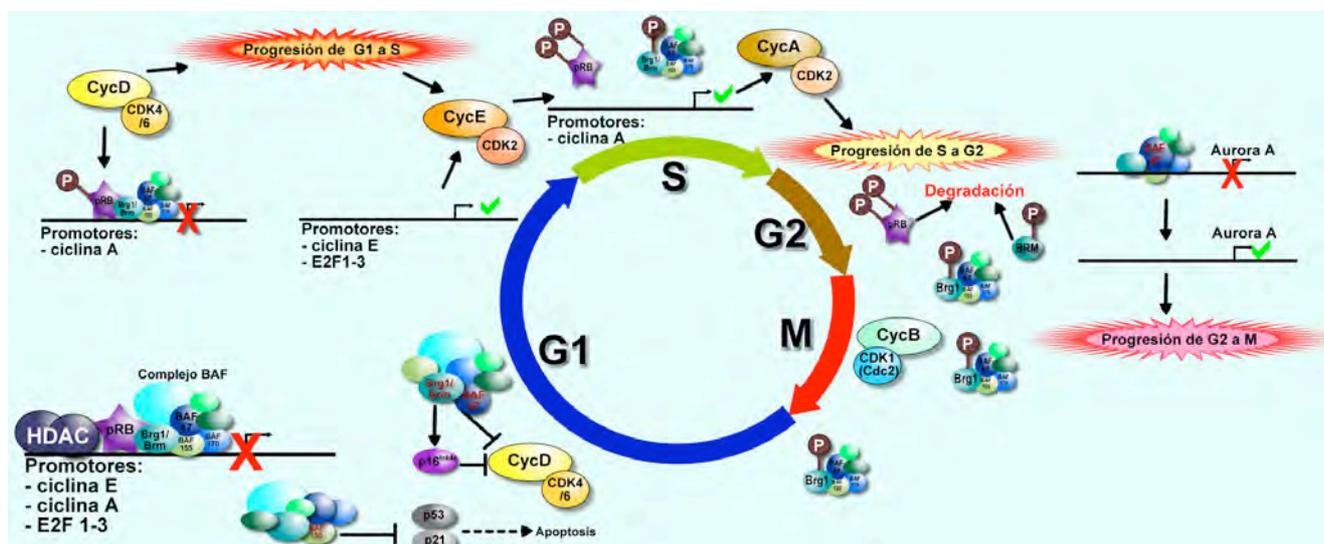


Fig.3 El complejo BAF regula la progresión del ciclo celular a distintos niveles. **Durante G1:** BAF interacciona con pRB y HDAC en la represión de los genes que codifican para ciclina A, E y los E2F1-3, por su parte Brg1 y BAF 47/INI1 participan en la expresión de p16ink4a y en la represión de la expresión de ciclina D deteniendo en todos los casos el ciclo celular en esta fase. Durante la **transición a síntesis:** la ciclina D/CDK4/6 fosforilan a pRB promoviendo la expresión de ciclina E y los E2F1-3 avanzando a la fase S, por su parte el complejo BAF-pRB fosforilado mantienen la represión sobre ciclina A. **En la fase S:** La asociación de ciclina E/CDK2 fosforila a BAF-pRb, liberando de la represión transcripcional de ciclina A, avanzando en fase S y G2. La fosforilación de pRB y BRM las llevan a degradación mientras que Brg1 y el núcleo del complejo se mantiene en el resto del ciclo celular. En **G2/M:** Se sugiere la participación de BAF47/INI1 en la represión expresión de genes que regulan la mitosis, entre ellos Aurora A (Cinasa de treoninas y serinas) que es necesaria para avanzar de G2 a mitosis. Brg1 se mantiene expresada durante la mitosis, sin embargo no se ha reportado si las otras subunidades también están presentes durante esta fase del ciclo celular.

Como se describió anteriormente, el complejo BAF es esencial durante los procesos de proliferación y diferenciación celular (revisado en Ho y Crabtree 2010). En esta parte queremos destacar las evidencias relacionadas con su participación en la regulación del ciclo celular. Así por ejemplo, se han caracterizado diversas líneas tumorales de humano⁴ que presentan alteración de la expresión de proteínas que forman parte del complejos tipo SWI/SNF (Tabla 2; DeCristofaro et al. 2001). También se ha visto que en humano algunos *loci* génicos donde se ubican subunidades del complejo, están ubicados en zonas que presentan rearrreglos génicos en diferentes tipos de cáncer (revisado en Reisman et al. 2009), por ejemplo, BAF47/INI1 en humano se ubica en el cromosoma 22q11, zona modificada en tumores pediátricos agresivos (Versteeg et al. 1998). La delección

⁴ Incluyendo tumores de mama, riñón, ovario, páncreas, retina, medula espinal, linfoma y rabdosarcoma.

heterocigota de subunidades del “núcleo del complejo” genera susceptibilidad a tumorigénesis de diversos orígenes (Bultman et al. 2000; Klochendler-Yeivin et al. 2000; Roberts et al. 2000; Kim JK et al. 2001).

Se ha denominado a BAF47/INI1 como proteína supresora de tumores debido a que la pérdida de su heterocigocidad correlaciona con el desarrollo de tumores rabdoideos malignos⁵ (MTR; Roberts et al. 2002) mientras tanto que, la restitución de su expresión conlleva la detención del ciclo celular en G0/G1: por un lado promueve la expresión de p16^{ink4a-6} involucrada en la detención de la proliferación mediada por pRB, y por otra parte reprime la expresión de ciclina D1, evitando la inactivación de pRB mediada por ciclinaD/CDK4-6 (Fig. 4; Betz et al. 2002; Versteeg et al. 2002; Zhang et al., 2002; Oruetxebarria et al. 2004). Adicionalmente, BAF47/INI1 está involucrada en la regulación de la mitosis, estabilidad cromosomal y en reparación del daño a DNA (Klochendler-Yeivin et al. 2006; Ray et al. 2009; Lee et al. 2011).

Las ATPasas Brg1 y Brm también están disminuidas en líneas tumorales derivadas de páncreas, mama, pulmón y próstata (revisado en Roberts y Orkin 2004). La pérdida heterocigota de Brg1 está asociada con la formación de tumores (Bultman et al. 2000). Durante la proliferación celular, las ATPasas BRM y BRG1 son fosforiladas al final de G2 y quedan excluidas del DNA condensado; esta modificación disminuye los niveles de expresión de BRM, sin embargo BRG1 permanece constante durante la mitosis (Muchardt et al. 1996). Los complejos BAF que contienen una u otra ATPasa regulan la progresión del ciclo celular reprimiendo la expresión de genes. Por un lado, su interacción con pRb genera un complejo represor que evita la expresión de E2F1 (Fig. 3; Trouche et al. 1997; Dunaief et al. 1994). En otro contexto y en paralelo, la interacción del complejo BAF-pRb con HDACs deriva en la represión transcripcional de genes involucrados en la progresión del ciclo celular (ciclina E y ciclina A; Zhang et al. 2000), en ambos casos el ciclo celular se detiene en la fase G1 (Fig. 3). Recientemente se determinó la participación de BAF155/SRG3 como proteína supresora de tumores evitando la apoptosis mediada por p53 y p21⁷ después de daño al DNA, promoviendo la formación de tumores *in vivo* (Fig. 3. Ahn et al. 2010). Además, se ha descrito que el complejo BAF interactúa con otras

⁵ Son procesos tumorales agresivos cuya prognosis no supera los 2 años de vida, fueron definidos como rabdoideos debido a su similitud morfológica con rabiomioblastos, es decir nucleolo prominente, núcleo vacuolado, inclusiones eosinófilas citoplasmáticas (Hass et al. 1981). Estos tumores se pueden desarrollar en cerebro, riñón, medula espinal, cara.

⁶ Ink4A (inhibitor of CDK4A) inhibe la expresión del complejo ciclina D1/CDK4 (este complejo fosforila a pRB promoviendo la expresión de genes necesarios para la progresión del ciclo celular.

⁷ La expresión de p53 y p21 promueve a la detención de la proliferación, reparación del DNA y/o la muerte celular en respuesta diferentes tipos de estrés (revisado en Taylor y Stark 2001)

proteínas supresoras de tumores como BRCA1⁸ por medio de Brg1, o la interacción de C-MYC con BAF47/INI1 durante la regulación de transcripción (revisado en Roberts y Orkin et al. 2004).

Funciones y estructura molecular de ARID1A y ARID1B

Los genes *Arid1a* y *Arid1b* de mamífero son parálogos y presentan dos regiones de homología desde levadura hasta mamífero. Una de ellas cerca al extremo carboxilo terminal, el cual divide en dos dominios llamados C1 y C2 (o OHD1 y OHD2 respectivamente). Dicha región está involucrada en la interacción con las ATPasas y con receptores nucleares de hormonas (Dallas et al. 2000; Nie et al. 2000; Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002; Nie et al. 2003). Por otra parte presentan un dominio de unión a DNA dentro de regiones ricas de adenina-timina llamado ARID (AT-Rich Interaction Domain; Dallas et al. 2000; Nie et al. 2000; Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002; Nie et al. 2003). Su estructura es de ocho hélices α y dos hojas β antiparalelas, aunque puede ser funcional con solo 6 hélices α ; ARID interactúa con el DNA por medio de un motivo hélice – vuelta – hélice en el surco mayor y con las estructuras β antiparalelas en el surco menor del DNA (Iwahara y Clubb 1999; Iwahara et al. 2002; Kim et al. 2004). La presencia del dominio ARID en las proteínas ARID1, sugiere que su papel dentro del complejo BAF es de anclaje entre el complejo y el DNA (Collins et al. 1999; Dallas et al. 2000; Nie et al. 2000; Kozmik et al. 2001; Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002). Adicionalmente, ambas proteínas presentan motivos LXXLL⁹ que están involucrados en la interacción con receptores nucleares de hormonas (Dallas et al. 2000; Nie et al. 2000; Hurlstone et al. 2002; Inoue et al. 2002; Nie et al. 2003). Por su parte, ARID1A presenta un dominio de interacción con la proteína supresora de tumores HIC1 (Fig. 4; Van Rechem et al. 2009).

Arid1a es un gen de 6,855 nucleótidos que en ratón codifica para al menos tres isoformas que resultan del "splicing" alternativo (Kozmik et al. 2001 y <http://www.ensembl.org>). Esta subunidad interacciona con Brg1 y BRM en humano durante la activación transcripcional mediada por los receptores nucleares de glucocorticoides, andrógenos y estrógenos (Inoue et al. 2002) y su expresión esta disminuida en algunas líneas celulares de carcinoma renal y de mama (Wang et al. 2004). Por su parte *Arid1b* presenta un marco abierto de lectura de 5,871 nucleótidos (Hurlstone

⁸ BRCA1 interviene en la reparación y replicación del DNA, apoptosis, regulación de transcripción y relajamiento de la cromatina, la pérdida de su expresión conlleva a inestabilidad genómica y el desarrollo de cáncer (revisado en Murphy y Moynahan 2010)

⁹ Donde la L representa residuos de Leucina y las X cualquier aminoácido.

et al. 2002; Inoue *et al.* 2002; Nie *et al.* 2003; Wang *et al.* 2004). Al comparar estas proteínas presentan una identidad global del 56%, aunque es superior al 80% en los dominios conservados (Fig. 4). Se ha reportado que ARID1B estimula la expresión mediada por receptores nucleares de hormonas (Hurlstone *et al.* 2002; Inoue *et al.* 2002) y participa en la activación transcripcional del gen *HoxA7* (Nie *et al.* 2003). La cuantificación de proteína en líneas celulares tumorigénicas de humano, indicó que ARID1A se expresa 3.5 veces más que ARID1B, aunque presentan una afinidad similar con Brg1 (Wang *et al.* 2004). Recientemente con ayuda de estudios bioquímicos se ha sugerido que ARID1A y ARID1B están presentes en complejos pre-ensamblados tipo BAF, ambos complejos coexisten en el espacio nuclear y pueden estar unidos en promotores génicos (Ryme *et al.* 2009).

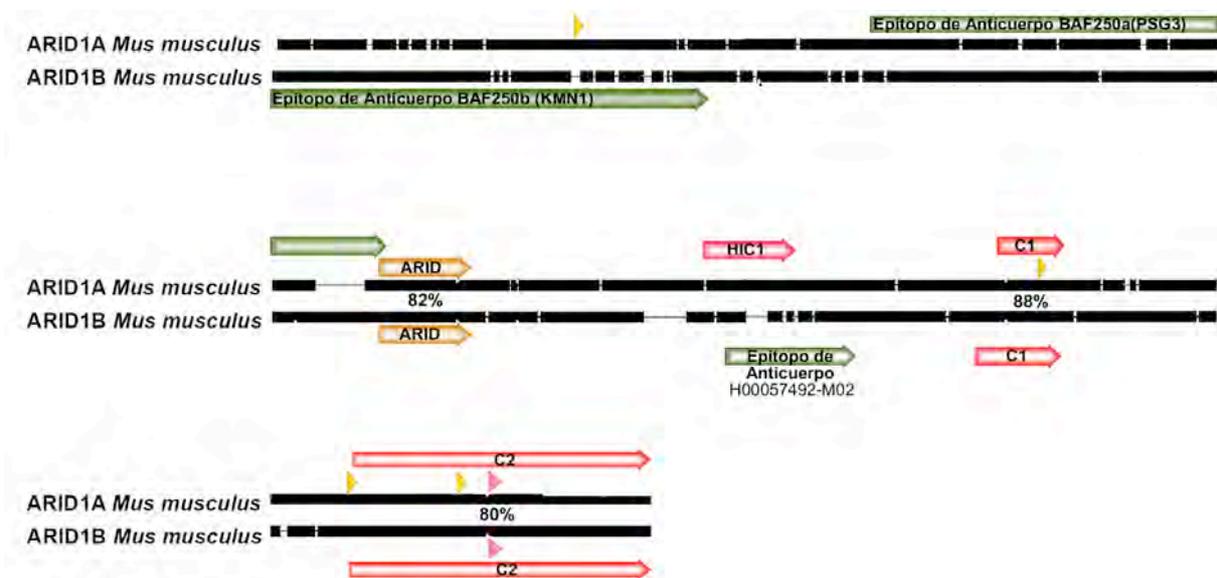


Fig.4 Alineamiento de las proteínas ARID1. Presentan una identidad global del 56%. En el dominio ARID1 alrededor del 82% (Flecha naranja); dominio C1 – 88% y C2 – 80% (Flechas rojas). Se denotan los epítopes de los anticuerpos específicos para cada subunidad (Flechas Verdes). El dominio de interacción con la proteína supresora de tumores HIC1 es específico de ARID1A (Van Rechem *et al.* 2009). Las cabezas de flechas amarillas representan motivos LXXLL de interacción con receptores nucleares de hormonas (Dallas *et al.* 2000; Nie *et al.* 2000; Hurlstone *et al.* 2002; Inoue *et al.* 2002; Nie *et al.* 2003). La cabeza de flecha rosa representa el motivo de interacción con el complejo de E3 ligasa de ubiquitina Elo C (Li *et al.* 2010). El alineamiento se realizó con el software libre clustal W y los motivos y dominios se agregaron en el programa Geneious, las secuencias fueron tomadas del dominio www.ncbi.nlm.nih.gov, para ARID1A – NP_001074288 y para ARID1B - NP_001078824.

En años recientes se han caracterizado algunas funciones de las subunidades ARID1 durante el ciclo celular (Nagl *et al.* 2007). Estos autores encontraron que ARID1A y ARID1B en asociación con el complejo BAF participan de manera antagónica en la progresión del ciclo celular de mamífero, regulando la expresión de genes necesarios

para la transición de las fases G1 a S. Es decir, en cultivo de preosteoblastos de ratón sincronizados (línea MC3T3 E1), donde se indujo la pérdida de función de los genes *Arid1a* y *Arid1b*¹⁰ se observó que la subunidad ARID1A (en el complejo BAF-1A) es requerida para detener el ciclo celular en G1, cooperando con desacetilasas de histonas (HDAC) y E2F4-5¹¹; en cambio ARID1B (BAF-1B) promueve la proliferación celular, interactuando con complejos de acetilasas de histonas (HAT) y E2F1-3¹² (Nagl *et al.* 2007).

Diferentes grupos hemos tratado de caracterizar las funciones de los ARID1 en ratón mediante la generación de mutantes nulos ("Knock out"- KO). Sin embargo no se había tenido éxito debido a que la delección heterocigota en células troncales embrionarias presenta fenotipo, es decir, defectos en proliferación, estabilidad cromosómica y mantenimiento de pluripotencialidad (datos no publicados; Wang *et al.* 2004; Gao J *et al.* 2008; Yan *et al.* 2008). La generación del ratón mutante para ARID1A se logró con una estrategia condicional donde se involucró al sistema Cre-Lox P, así como la delección de los dos alelos en células ES para la generación de quimeras (Gao *et al.* 2008; Bu *et al.* 2010; Zou *et al.* 2010).

La delección de *Arid1a* en ratón presenta defectos en la gastrulación (no se genera la capa mesodermal) y es letal a los 6.5 dpc (*días post coitum*); además una porción de los ratones heterocigotos muestran exencefalia. Adicionalmente se demostró que las células troncales embrionarias que son nulas para *Arid1a* presentan problemas en su regeneración y en el mantenimiento del estado indiferenciado, sugiriendo que puede regular genes como *Sox2*, *Utf1* y *Oct4*. Ensayos de diferenciación sugieren que la ausencia de ARID1A afecta exclusivamente la diferenciación hacia derivados mesodermales (cardiomiocitos y adipocitos; Gao J *et al.* 2008). *Arid1b* también regula la proliferación y el mantenimiento del estado indiferenciado de células ES, sugiriendo que promueve la expresión de genes relacionados con la pluripotencialidad (*Oct3/4*, *FoxD3*, *Klf3*, *Bmp4*, entre otros) y reprime la expresión de genes involucrados en la diferenciación (*Gata2*, marcador de endotelio y *Esx1* marcador de células gigantes del trofoblasto). La ausencia de *Arid1b* en células troncales embrionarias conlleva una desregulación de genes involucrados en procesos celulares tales como la biosíntesis de proteínas, desenrollamiento del DNA y maduración del RNA (Yan *et al.* 2008). Sin embargo hasta el momento no se ha reportado la caracterización de *Arid1B* en un modelo *in vivo*.

¹⁰ Se utilizaron RNA de interferencia (siRNA) específicos para cada gene.

¹¹ Se ha reportado que los complejos DHAT y E2F4 y E2F5 participan en el silenciamiento génico (Gregory *et al.* 2001; Seville *et al.* 2005).

¹² Ambas asociaciones regulan positivamente la expresión de genes (Gregory *et al.* 2001; Seville *et al.* 2005).

Recientemente se describió la interacción de ARID1B con un complejo de E3 ligasa de ubiquitina, sugiriendo su participación en este proceso post-traducciona; adicionalmente se observó que la mutación del motivo de interacción de ARID1B con la E3 ligasa de ubiquitina conlleva su ubiquitinación y degradación; aunque para ARID1A también se conserva el motivo de interacción, los autores no exploraron experimentalmente su interacción con esta E3 ligasa (Li et al. 2010).

Antecedentes

El gen *osa* de *D. melanogaster* interviene tanto en la embriogénesis como en la regulación del ciclo celular y es homólogo a los *Arid1*.

En *D. melanogaster*, se describió como genes tipo *trithorax* a subunidades del complejo BRAHMA (Kennison and Tamkun, 1988; Tamkun et al., 1992). Particularmente el gen homólogo de los *Arid1* se denominó *osa*¹³ y participa en la regulación de la expresión de *Antennapedia*¹⁴ (Vazquez et al. 1999), sin embargo se ha sugerido que también participa en la regulación global de la transcripción. Heitzler y col. reportaron que *osa* regula negativamente la expresión de genes proneurales interaccionando con el mismo complejo,(Heitzler et al. 2003; ver Tabla 1). Por su parte diferentes líneas de moscas mutantes en *osa* son letales en estadios tempranos de desarrollo y las heterocígas presentan defectos en durante la diferenciación de los fotorreceptores, generando fenotipos de ojos pequeños, sugiriendo que *osa* interviene en la proliferación y/o sobrevivencia de dichas células (Treisman et al. 1997).

El complejo BRAHMA es importante durante la progresión del ciclo celular de la fase G2 a mitosis, específicamente se requiere la presencia de OSA para la unión del complejo en promotores de genes como *string/cdc25*, que participan en regulación de la mitosis (Moshkin et al. 2007). Por otra parte, ensayos de sobreexpresión de OSA retrasan la

¹³ Presenta los dominios funcionales ARID, C1 y C2, así como los motivos LXXLL.

¹⁴ Es un gene homeótico cuya pérdida de expresión causa la transformación de antena a pata, su pérdida de expresión parcial presenta fenotipos intermedios entre antena y pata.

progresión del ciclo celular en el disco imagal de ojo, es decir OSA interacciona directamente con ciclina E¹⁵ y se ha sugerido que esta asociación evita la proliferación celular (Baig et al 2010). Sugiriendo que el OSA puede regular el ciclo celular por distintos mecanismos y en distintos momentos, es decir mantener a las células en G1 interaccionando físicamente con proteínas que promueven el ciclo (Baig et al. 2010) o promover la progresión el ciclo celular regulando transcripcionalmente genes durante la fase G2/M (Moshkin et al. 2007).

Patrón de expresión de *Arid1a* y *Arid1b* durante la embriogénesis de ratón.

Como se mencionó anteriormente tanto en *D. melanogaster* como en mamífero diferentes grupos de investigación han estudiado a las subunidades exclusivas del complejo BAF, en diferentes procesos celulares o del desarrollo, en nuestro laboratorio hemos caracterizado el papel de diferentes genes durante la embriogénesis. Por tanto se sugería que los genes ARID1 que podrían tener funciones tanto en el desarrollo embrionario, como en la proliferación y/o diferenciación celular de mamífero, nos interesamos en entender que funciones tienen *Arid1a* y *Arid1b* durante la embriogénesis. Como primer objetivo caracterizamos la dinámica de expresión de ambos genes en etapas embrionarias de ratón que involucren procesos como gastrulación, proliferación y organogénesis. Para ello, durante mi tesis de maestría, clone fragmentos específicos del mRNA de cada gen para utilizarlos como sondas en ensayos de hibridación *in situ* (HIS) en embriones de 7.5 a 10.5 días post coitum.

Esta metodología aporta información cualitativa de la localización del mRNA en las muestras analizadas, sin embargo si distinguen diferencias en la intensidad y tiempo de detección de la señal, se podría especular sobre diferencias en los niveles de expresión de los genes analizados, de tal manera que la sonda de *Arid1a* se observó alrededor de las seis horas de tratamiento con una expresión generalizada, en cambio *Arid1b* se detectó hasta las 40 horas de revelado en todos los estadios analizados y en patrones discretos, sugiriendo que *Arid1a* se expresa más que *Arid1b* en la embriogénesis, para confirmar dicha suposición realizamos ensayos de RNA cuantitativo y western blot (ver sección de Resultados).

El patrón de expresión de *Arid1a* a los 7.5 dpc se presentó una señal fuerte y ubicua

¹⁵ Como se mencionó en la Fig. 2 esta ciclina E interviene en la progresión de G1 a síntesis de DNA.

tanto en regiones embrionarias como extraembrionarias; en cortes sagitales de estos embriones observamos que estaba presente en las tres capas germinales, presenta mayor expresión en el surco primitivo (región donde se está llevando a cabo la ingresión del mesodermo; Fig. 5a y b). A los 8.5 dpc, observamos expresión generalizada en el cerebro, placa neural posterior y somitas, sin embargo su expresión estuvo ausente de los atrios cardíacos, la línea media del cerebro y mesénquima intersomático (Fig. 5c y d). A los 9.5 dpc, *Arid1a* fue detectada en derivados ectodérmicos y mesenquimáticos, en embriones completos no se observó en órganos derivados del endodermo y corazón (Fig. 5e). En cortes sagitales de estos embriones se observó expresión en el mesénquima de la cabeza, tejido neural y somitas (Fig. 5f). A los 10.5 dpc, la localización de *Arid1a* parece quedar restringida al cerebro anterior, cerebro posterior, somitas, extremidades, arcos branquiales y punta de la cola, sugiriendo disminución de su expresión (Fig. 5g).

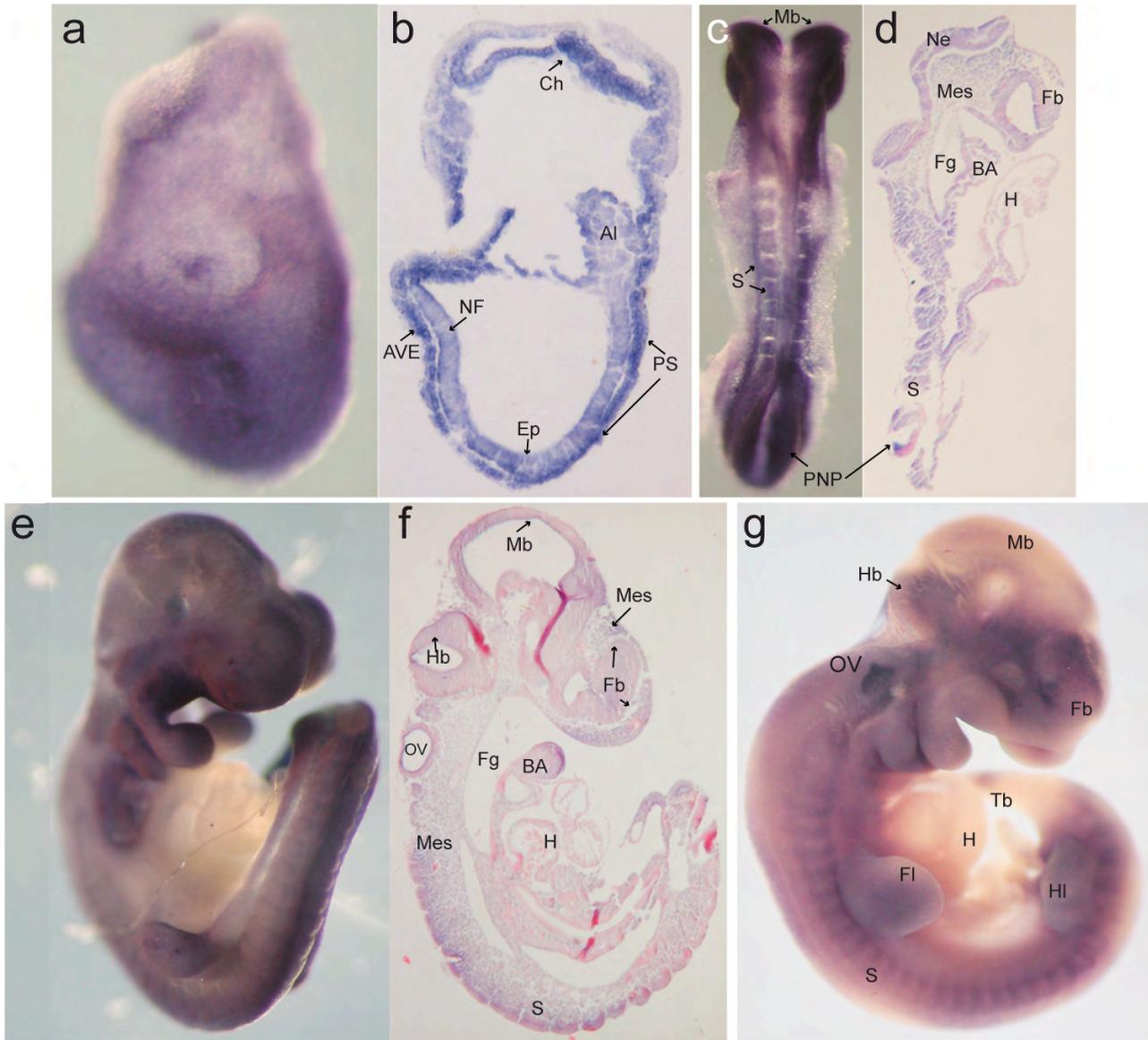


Fig. 5 Patrón de expresión de *Arid1a* durante el desarrollo embrionario. (a y b) Embrion 7.5 dpc; (c y d) Embrión de 8.5 dpc; (e y f) Embrión de 9.5 dpc; (g) Embrión de 10.5 dpc; (a y b) Izquierda - región anterior y derecha - región posterior; (a, e, g) Vista lateral; (b, d, f) Corte sagital; (c) Vista dorsal; AI, alantoides; AVE, endodermo visceral anterior; BA, arcos branquiales; Ch, corión; Ep, epiblasto; Fb, Cerebro anterior; Fg, intestino anterior; FI, extremidad anterior; H, corazón; Hb, cerebro anterior; HI, extremidad anterior; Mb, cerebro medio; Mes, mesenquima; NF, neuroectodermo; PNP, placa neural posterior; OV, vesicula otica; PS, surco primitivo; S, somitas; Tb, punta de cola.

La expresión de *Arid1b* fue más restringida durante toda la embriogénesis, de tal forma que a los 7.5 dpc se observó en el neuroectodermo, mesodermo y corion (Fig. 6a y b); en cortes sagitales, se localizó preferencialmente en mesodermo, en la parte distal del epiblasto y endodermo visceral (Fig. 6b). En embriones de 8.5 dpc la señal fue débil y se limitó a derivados neurales incluyendo la cresta neural, cerebro posterior y placa neural posterior (Fig. 6c y d). A los 9.5, el transcrito fue detectado en la parte ventral del embrión, pero estuvo ausente de la parte dorsal del cerebro (Fig. 6e); cortes sagitales de

estos embriones confirmaron su expresión en arcos branquiales, vesícula óptica, cabeza, mesénquima del tronco e intestino (Fig. 6f). A los 10.5 dpc *Arid1b* se limitó principalmente en las vesículas ópticas y óticas. Estos resultados indican que *Arid1a* tiene una expresión generalizada de sugiriendo que pudiera presentar funciones generales durante el desarrollo, mientras que la expresión discreta de *Arid1b* insinúa una regulación de blancos específicos durante la embriogénesis.

Continuando con el establecimiento de las funciones de los *Arid1* durante la embriogénesis, intentamos generar ratones mutantes nulos con líneas de células troncales embrionarias que tenían la inserción de “gene-trap¹⁶” en los locus de *Arid1a* ó *Arid1b* y dos líneas con expresión estable de siRNA específicos¹⁷ para *Arid1a*, cuya reducción del mRNA es alrededor de 52% y 68% respectivamente (Datos de H. Lomelí y L. Guzmán). La caracterización de estas CTP incluyo el análisis de proliferación, el cual fue similar a líneas sin inserción. El análisis de sus cariotipos¹⁸, mostró que la línea de *Arid1b* era diploide, sin embargo todas las CTP de *Arid1a* presentaban inestabilidad cromosomal. Estos resultados sugirieron que la delección del locus *Arid1a* en forma heterocigota podría ser factor para mantener la integridad cromosomal y descarta a dichas líneas para generar líneas de ratones mutantes nulos. Por otra parte intentamos generar ratones quiméricos con la línea RRM105 (+/- *Arid1b*) sin éxito. Posterior a estos resultados, se reportó que *Arid1a* es haploinsuficiente en CTP y que *Arid1b* interviene en el mantenimiento de la pluripotencialidad de CTP (ver introducción; Gao et al. 2008; Yan et al. 2008) y hasta este momento no se ha reportado un análisis de la ausencia de *Arid1b* en ratón. Por lo anterior, concluimos que el establecimiento de líneas de ratones mutantes nulos para ambos genes involucraba técnicas experimentales que no tenemos estandarizadas, por tanto exploramos otras alternativas que nos permitan abordar el estudio de las funciones subunidades ARID1 tanto *in vitro* como *in vivo*.

¹⁶ Vector que contiene secuencias intrónicas, así como un sitio aceptor de splicing para evitar su eliminación durante la maduración del mRNA. Presenta un marcador de selección positiva (MSP) β -Geo con polyA que interrumpe la traducción a partir del sitio de inserción.

¹⁷ Vector comercial pSilencer3.1+H1 neo (Ambion), contiene neomicina como MSP y el promotor al promotor H1 de la RNA polimerasa III que promueve la expresión de secuencias cortas (Brummelkamp et al 2002; Kunath et al. 2003; Lickert et al. 2004).

¹⁸ Es necesario para demostrar si las CTP tienen la capacidad integrarse cuando se microinyectan y es necesario que al menos el 70% la población sea diploide (40 cromosomas).

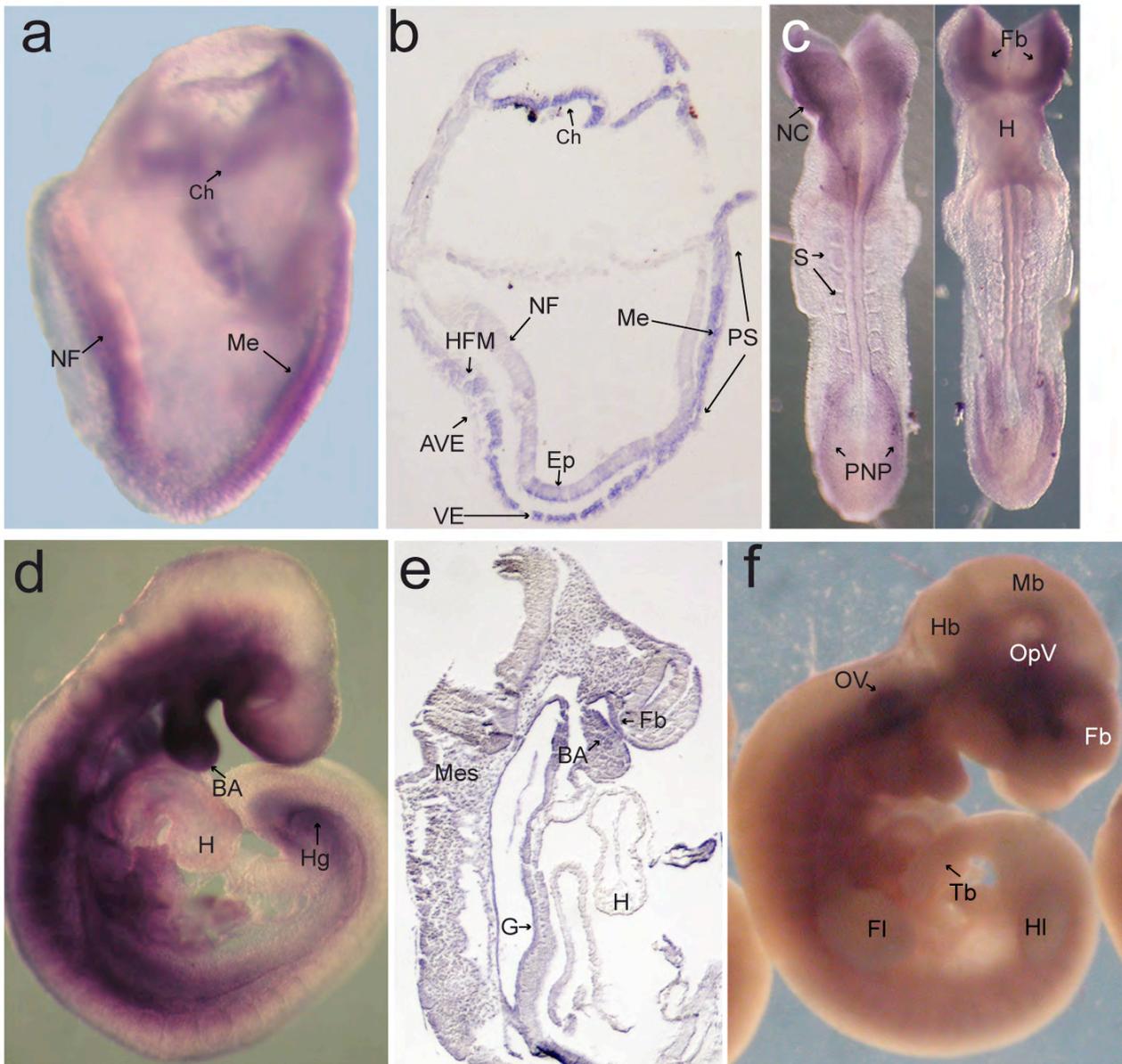


Fig. 6 Patrón de expresión de *Arid1b* durante el desarrollo embrionario. (a y b) Embrion 7.5 dpc; (c) Embrión de 8.5 dpc; (d y e) Embrión de 9.5 dpc; (f) Embrión de 10.5 dpc; (a y b) Izquierda - región anterior y derecha - región posterior; (a, d, f) Vista lateral; (b, e) Corte sagital; (c) Vista dorsal - izquierda y ventral - derecha; AVE, endodermo visceral anterior; BA, arcos branquiales; Ch, corión; Ep, epiblasto; Fb, Cerebro anterior; FI, extremidad anterior; G, Intestino; H, corazón; Hb, cerebro anterior; HFM, Mesenquima de región cefálica; Hg, Intestino posterior; HI, extremidad anterior; Mb, cerebro medio; Me, Mesodermo; Mes, mesenquima; NC, Cresta Neural NF, neuroectodermo; PNP, placa neural posterior; OpV vesícula óptica; Ov, vesícula ótica; PS, surco primitivo; S, somitas; Tb, punta de cola; VE endodermo visceral.

Justificación

Cada subunidad ARID1 se asocia independientemente con el complejo BAF, formando complejos pre-ensamblados en el espacio nuclear y/o en promotores específicos (Ryme et al. 2009). Estas proteínas parálogas en asociación con el complejo, presentan funciones similares y antagónicas en diferentes procesos celulares (Nie et al. 2000; Inoue et al. 2002; Nagl et al. 2007; Gao J et al. 2008; Yan et al. 2008). Particularmente las funciones diferenciales durante la regulación de la proliferación parecen conservarse en *D. melanogaster*, donde se ha sugerido que la proteína OSA regula positiva y negativamente la progresión del ciclo celular, aunque no se ha analizado como se ejecutan estas funciones (Moshkin et al. 2007; Baig et al. 2010). En mamífero, la proteína encargada de generar un complejo anti-proliferativo es ARID1A y ARID1B integra un complejo proliferativo (Nagl et al. 2007). Además se caracterizaron que ratones mutantes nulo de subunidades del complejo BAF desarrollan de tumores, particularmente ARID1A cuya expresión esta alterada en líneas de cáncer de mama y riñón (Wang et al. 2004) y recientemente también se describió para ovario (Jones et al. 2010; Weigand et al. 2010), y se ha propuesto que esta subunidad es una proteína supresora de tumores ginecológicos (Guan et al. 2011; Mamo et al. 2011). Por su parte se involucró a ARID1B en el mantenimiento y proliferación de células troncales embrionarias (Yan et al. 2008).

Sin embargo, no se han explorado los mecanismos involucrados en la función diferencial de ARID1A y ARID1B durante la proliferación. Para entender como estas subunidades pueden interactuar con el complejo BAF y funcionar de manera antagónica a lo largo del ciclo celular, nos propusimos analizar si dinámica de expresión y modificación post- tanto *in vitro* como *in vivo*.

Para el estudio *in vitro*, se emplearon cultivos celulares de preosteoblastos y células troncales embrionarias de ratón; por un lado se expresan ambas proteínas de manera endógena, los preosteoblastos pueden sincronizarse y se pueden analizar tanto células individuales como poblaciones en momentos específicos del ciclo celular, por su parte las CTE están proliferación constante. El estudio *in vivo* se llevó con embriones en estadio pre-implantación (2.5 – 3.5 dpc) debido a que además de estar en proliferación constante se expresaban ambas proteínas y se podían analizar células o blastómeros individuales.

Hipótesis

La presencia de ARID1A y ARID1B en las distintas fases del ciclo celular es necesaria para su función en asociación con el complejo BAF, además presentan funciones antagónicas durante la proliferación. Por tanto proponemos que estas subunidades presentaran una dinámica de síntesis o localización diferencial a lo largo de la proliferación. Adicionalmente se ha reportado que existen complejos pre-ensamblados en promotores que están inactivos, lo que nos hace hipotetizar si la regulación de la función y/o asociación de las proteínas ARID1 al complejo BAF, también podría estar mediada por otros mecanismos, como las modificaciones post-traduccionales. Es importante enfatizar que estas posibilidades no son excluyentes y se podrían complementar como puntos de control en la regulación de la proliferación mediada por los complejos tipo BAF.

Objetivo General

Evaluar mecanismos que permitan deducir la regulación de las funciones antagónicas de ARID1A y ARID1B durante la progresión del ciclo celular.

Objetivos Particulares

1. Análisis de la expresión de ARID1A y ARID1B

1.1 Comparar los niveles de expresión ambas subunidades durante la embriogénesis (8.5 – 10.5 dpc), para establecer cuantitativamente las diferencias sugeridas en los ensayos de hibridación *in situ*.

1.2 Explorar la localización subcelular de los ARID1 en las distintas fases de la proliferación (G1, S y G2/M) en cultivo de preosteoblastos sincronizados y CTE. Y comparar los niveles de las proteínas en las distintas fases de la proliferación.

1.3 Establecer la dinámica de expresión de ambas proteínas en blastómeros de embriones pre-implantación (2.5 a 3.5 dpc), correlacionándolas con marcadores de la fase de síntesis de DNA y Mitosis.

2. Explorar si las proteínas ARID1 sufren modificaciones post-traduccionales, particularmente fosforilaciones, sumoilaciones y ubiquitinaciones en cultivo celular.

Material y Métodos

Cultivo y sincronización celular

Se cultivaron pre-osteoblastos de la línea MC3T3 E1 (ATCC, USA) de pases tempranos (entre 15 y 30), para evitar alteraciones en la proliferación por senescencia de pases tardíos (por arriba del pase 40; Peterson et al. 2004), con medio alpha-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FSB; α 10), 100mM β -mercaptoetanol, 50 unidades/ml penicilina y 50 μ g/ml streptomycin (GIBCO; Sigma) en una incubadora húmeda a una temperatura constante de 37 °C con 5% CO₂.

Los ensayos de sincronización en la fase G0/G1 se hicieron en cultivos de monocapa al 70% de confluencia por ausencia de nutrientes: cultivos lavados tres veces con PBS 1x (ver Apéndice soluciones) y se incubaron por 72 hrs con alpha-MEM suplementado con 0.1% FSB (Nagl et al. 2007). Para obtener células en la fase de síntesis de DNA, se utilizaron cultivos sincronizados por ausencia de suero y se indujo la proliferación con medio α MEM suplementado con 10% SFB por 12, 18 y 24 h, para realizar ensayos de inmunofluorescencia.

Alternativamente se empleó otro protocolo de sincronización que involucra el bloqueo en G0/G1 con alpha-MEM α 0.1% SFB por 72 hrs. Posteriormente, las células se trataron con drogas para obtener poblaciones enriquecidas en fase de síntesis y G2/M (Fig. 12a), Es decir, el protocolo inicio con la detención del ciclo celular por ausencia de nutrientes, a continuación se reactivó con alpha-MEM 10% SFB por 5 h y se agregó hidroxycurea 1mM (Sigma; apéndice soluciones) por 18 h para sincronizarlas en la frontera G1/S; se lavaron con PBS 1x (3 veces) y se estimuló por 3 h adicionales con α 10 fresco para que la población avanzara a la fase S. Para obtener poblaciones en G2/M se realizó la sincronización anterior y se expuso con colchicina 60 μ g/ml por 24 h (apéndice soluciones). Estos ensayos de sincronización fueron evaluados por citometría de flujo para corroborar el enriquecimiento de poblaciones en cada fase del ciclo celular y se extrajo proteína total y RNA (Ver Fig. 13a).

Se cultivaron células troncales embrionarias de la línea W 9.5¹⁹ en presencia de capa de células alimentadoras²⁰ con medio DMEM suplementado con 15% de FSB (D15), Glutamina 200mM, aminoácidos no esenciales 200mM, 100mM β -mercaptoetanol, 50 unidades/ml penicilina y 50 μ g/ml streptomycin (GIBCO; Sigma). Se crecieron a

¹⁹ Derivada de la cruce de las cepas 129S1/SvImJ, que son genicamente estables.

²⁰ Fibroblastos primarios de ratón derivados de la cepa CD1, ver apéndice.

semiconfluencia en cajas de 100mm y se lisaron para extracción de proteínas y se fijaron para inmunofluorescencia (ver adelante).

Obtención y disección de embriones pre-implantación

Se utilizaron ratones de la cepa CD1 con un fotoperíodo de 14 h luz/10 h oscuridad, a una temperatura constante de 25 °C. Hembras de alrededor de 2 meses de edad fueron expuestas con machos entre 12-14 hrs. Posteriormente, se revisó la presencia de tapón vaginal como confirmación de cruce tomando ese día como 0.5 dpc (días post-coitum). Las hembras preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical a los 2.5 y 3.5 dpc para obtener mórulas y blastocistos, respectivamente. Las mórulas se recuperaron con lavados suaves en los oviductos, mientras que para los blastocistos se lavaron los cuernos uterinos; en ambos casos se utilizó el medio M2 durante la recuperación de los embriones (Specialty Media, Phillipsburg, N.J. USA).

Inmunodetección en membrana (western blot)

Se extrajeron proteínas totales de cultivos de CTP y preosteoblastos de ratón y de embriones de 8.5 a 10.5 dpc, con el buffer de lisis TLB (Triton Lisis Buffer) enriquecido con inhibidores de proteasas (ver apéndice soluciones). Se homogeneizaron alrededor de 7×10^6 células en 100 μ l de TLB y se mantuvieron en rotación lenta a 4°C por 2h, a continuación se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C, se reservó el sobrenadante para la cuantificación de proteínas y su almacenamiento (-20°C). La cuantificación de los extractos se realizó por el microensayo Bradford (BioRad) de acuerdo a las indicaciones del distribuidor.

Se diluyeron 100 μ g de los extractos totales con LB 2x (Ver apéndice soluciones), se hirvieron por 5 min. y se separaron en geles desnaturalizantes de poli-acrilamida al 7% (SDS-PAGE) durante 2.5 hrs a 25mA. La electrotransferencia húmeda se realizó en membranas de nitrocelulosa (0.45 μ m; BioRad) a 400mA durante 60 min. Las membranas se lavaron con TBS-T 1x y se verificó la transferencia de las proteínas tiñendo con rojo Ponceau por 5 min en rotación suave y, posteriormente, se eliminó la tinción con un lavado de TBS-T 1x por 10 min.

La inmunodetección inició con el bloqueo las membranas con leche descremada al 5% en TBS-T por 1 h a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, la membrana se incubo con el anticuerpo primario (ARID1A o ARID1B 1:500; β -tubulina 1:2500) en TBS 1x y 5% leche descremada durante toda la noche a 4°C, se realizaron 3 lavados con TBS-T

1x por 10 min a TA para quitar el pegado inespecífico. Posteriormente, la membrana se incubo con el anticuerpo secundario (anti- mouse o rabbit 1:5000) durante 1 h a TA, para terminar con su lavado con TBS-T (3x por 10 min a TA), se reveló con el kit “Super Signal West” (THERMO Scientific), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para este estudio se compararon tres exposiciones a diferentes 5, 10 y 20 minutos y los resultados fueron analizados por densitometría con el programa ImageJ; la cuantificación correspondió al promedio de tres experimentos independientes tomando la expresión de β -tubulina como referencia de proteína. Como referencia de peso molecular se utilizó el cocktail “Page Ruler Plus Pre-stained Protein Ladder” (Fermentas), los anticuerpos utilizados fueron: anti-ARID1A (sc-32761); anti-ARID1B (sc-32752); anti- β -tubulina (sc-9104); goat anti-mouse IgG-HPR (sc-2055) y goat anti-rabbit IgG-HPR (sc-2004) de Santa cruz Biotech; y anti-ubiquitina fue de Sigma U5379.

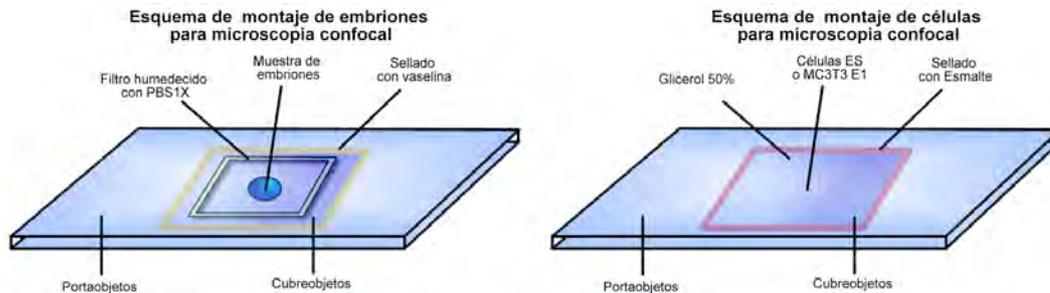
Inmunofluorescencia

Los embriones preimplantación fueron tratados con solución tyrode para remover la zona pelucida y evitar señal inespecífica durante el ensayo. Los cultivos de células ES se crecieron a semiconfluencia y los preosteoblastos fueron sincronizados como se describió previamente. Se realizaron dobles inmunofluorescencias detectando ARID1A o ARID1B (Abnova; H00057492-M02) en paralelo con un marcador de la fase de síntesis de DNA (PCNA - Proliferating Cell Nuclear Antigen; Santa cruz Biotech. sc-7907) o el marcador de mitosis (H3S10P).

Embriones sin zona pelucida, preosteoblastos y células ES fueron fijadas por 30 minutos en metanol:DMSO (4:1) a TA. Después se procedió a realizar un proceso de rehidratación secuencial con etanol al 70%, 50%, 30% y PBS 1x, siendo de 5 minutos cada tratamiento. Todas las muestras se bloquearon con leche descremada al 2% en PBS y Tween20 al 0.05% (PBS – T) durante 1 h. Los anticuerpos primarios se incubaron durante toda la noche a 4 °C (ARID1A ó ARID1B - 1:100 con anti- H3 S10 fosforilada (H3S10P) - 1:1000 o anti-PCNA - 1:1000). Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS-T y se incubaron los anticuerpos secundarios por 1 h. a TA y en la oscuridad (AlexaFluor 647 anti-mouse -1:1000 y Alexa Fluor 488 anti-rabbit - 1:1000). Para finalizar, las muestras se lavaron 3 veces con PBS-T 1x por 10 min cada lavado.

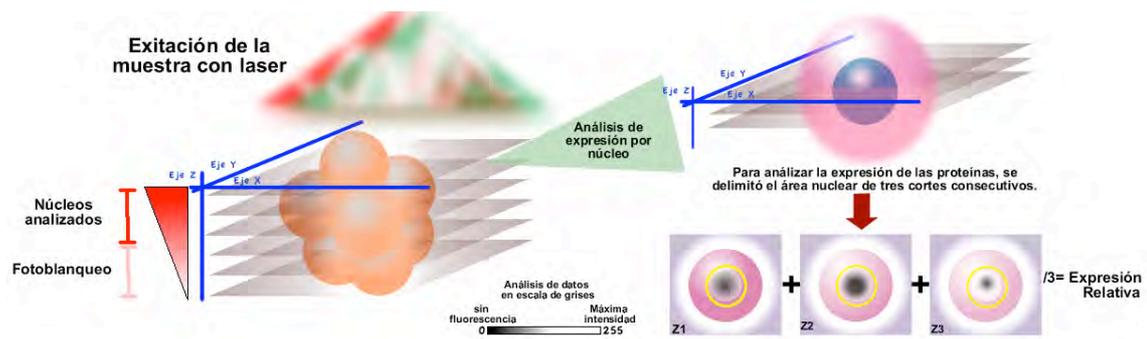
Los embriones se montaron en portaobjetos con filtros perforados en la parte central y humedecidos para mantener hidratada la muestra. En la zona perforada, primero se colocaron las mórulas o blastocistos en una gota de PBS 1x, se colocó el cubreobjetos y

se sellaron todos los lados con vaselina para mantener por mas tiempo la humedad de la muestra (Ver esquema abajo). Las células ES y preosteoblastos se montaron en 50% glicerol con cubreobjetos evitando la formación de burbujas y se sellaron con esmalte transparente. Posteriormente, se procedió a capturar las imágenes por microscopía confocal.



Microscopía y análisis de datos de fluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia fueron analizados en el microscopio confocal LSM 510 con un objetivo 63x-W con apertura numérica de 1.2 (Zeiss). Para detectar el anticuerpo AlexaFluor 488 anti-rabbit se utilizó un láser de Argón (excitación a 488nm) y un filtro "band pass" 500 - 530 IR. Para la detección de AlexaFluor 647 anti-mouse, se utilizó un laser de HeNe que excita a los 693nm con un filtro "band pass" 650-710 IR. Para los embriones y células ES se realizaron cortes ópticos en el eje Z cada 2 μm . En preosteoblastos, la captura de las imágenes se hicieron en un corte óptico de un solo plano y todos los experimentos fueron adquiridos en las mismas condiciones para poder comparar los resultados. En todos los casos, se cuantificaron al menos cuarenta núcleos de tres ensayos independientes, utilizando el programa de acceso libre ImageJ 1.41. La selección de células a cuantificar fue al azar, y utilizando microscopia de contraste de fases y con marcaje de DNA (Sytox Green - GIBCO), se delimitó el área nuclear de células interfásicas individuales. La fluorescencia se cuantificó como el promedio de intensidad por pixel en tonos de grises (256 colores; 0= negro o sin señal y 255 = blanco o máxima intensidad); en el caso de células en mitosis (metafase a telofase) se delimitó el citoplasma para la cuantificación. Para el análisis de las fluorescencias de embriones pre-se examinaron los cortes ópticos de la parte superior de mórulas o blastocistos para descartar variaciones de fluorescencia en su parte inferior debida al foto-blanqueo (Esquema siguiente pag.). La expresión relativa tanto en embriones como células ES se obtuvo al promediar la señal de 3 cortes ópticos por núcleo (Esquema abajo, derecha).



Esquema representativo de captura de imágenes por microscopía confocal (izquierda) en el eje x,y, z de embriones y células ES con dos distintos láseres. Se denota la región tomada para el análisis de expresión. A la derecha se representa un blastómero con 3 cortes ópticos utilizados para cuantificar la señal de fluorescencia en escala de tonos de grises, el promedio de tres cortes ópticos fue utilizado como cuantificación relativa de la expresión proteica.

La determinación de la expresión del marcador de mitosis H3S10P (Intensidad promedio de píxeles en el área nuclear), así como la morfología observada por microscopía de contraste de fases, permitieron agrupar a las células en 3 categorías: interfásicas (en un rango de 0-5 píxeles); profásicas (rango entre 6-30 píxeles) y mitosis avanzada (≥ 31 píxeles). En el caso de las células en la fase de síntesis de DNA se generaron dos grupos: con poco PCNA (0-20 píxeles; células en G1 a síntesis temprana) y expresión elevada de PCNA (≥ 21 píxeles; células en fase de síntesis avanzada). Por su parte, la expresión relativa de ARID1A y ARID1B fue comparada en los grupos antes mencionados, para lo cual se determinaron las diferencias por medio de la prueba de *t de Student*, considerando como diferencia significativa una $p \leq 0.05$ (software utilizado: Excel – Microsoft Inc – y Prism 4.0 – GraphPad Software Inc. –).

Inmunoprecipitación endógena

Se obtuvieron extractos proteicos totales de células ES en TLB con o sin 10 mM de N-etilmaleimida (NEM)²¹ siguiendo el protocolo descrito en la sección de inmunodetección en membrana. Cada inmunoprecipitación (IP) se realizó con 1 mg de proteína total, esta se incubó con 1µg de anticuerpo (anti-ARID1A; anti-ubiquitina o anti-SUMO1) por 1.5 hrs en agitación suave a 4°C. A continuación se agregaron 100µL de sefarosa acoplada con proteína A/G (Sef-prot A/G), previamente hidratada y bloqueada (ver Apéndice soluciones) y se mantuvo en agitación lenta por 1 hrs a 4°C. Posteriormente se hicieron 2

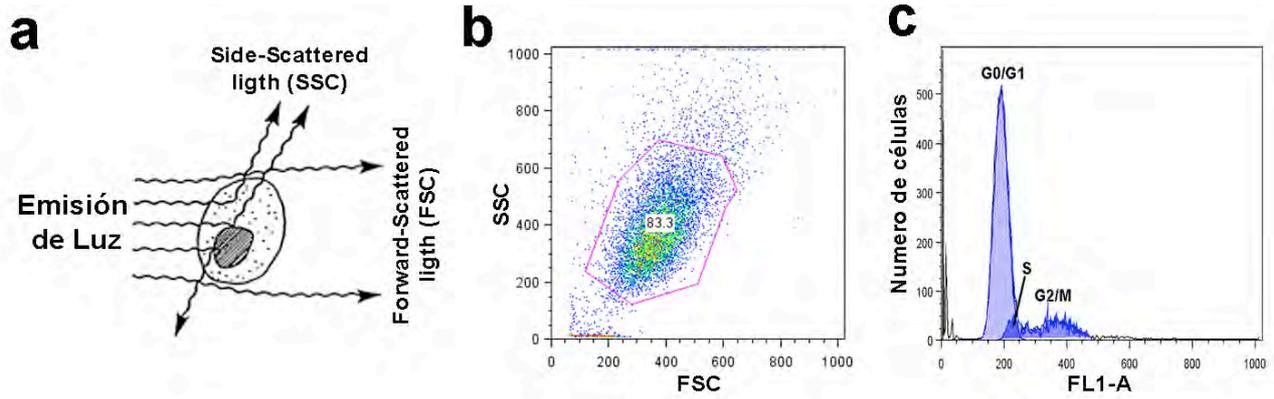
²¹ Se une covalentemente a proteínas evitando la pérdida de modificaciones post-traduccionales, específicamente sumoilaciones y ubiquitinaciones.

lavados de 10 min cada uno a 4°C buffer de lavado (HEMK, ver Apéndice Soluciones). La proteína retenida en la sefarosa, se resuspendió en 100 µl de buffer de cargado (LB2x) y se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida al 7%(SDS-PAGE) para realizar ensayos tipo "western blot". Como control negativo se incubó 1mg de extracto total de proteína con 100µL de Sef-prot A/G sin presencia de anticuerpos. Para monitorear el pegado inespecífico en la inmunodetección de membrana, se añadió un carril con la IgG como referencia de los anticuerpos contenidos en la IP. Los anticuerpos utilizados son: ARID1A (Santa Cruz Biotech - sc-32761); anti ubiquitina (SIGMA - U5379); anti SUMO1.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Con el objetivo de distinguir las fases del ciclo celular (G1/G1, Síntesis y G2/M), se evaluó el contenido de DNA, empleando un intercalante del DNA fluorescente (Sytox Green, Invitrogen) en células disgregadas. Es decir, los preosteoblastos sincronizados se trataron con 0.25% de tripsina por 2 minutos para disgregarlos de la placa y se inactivaron con medio α 10. A continuación se centrifugaron a 1000 rpm por 4 min para formar un "pellet", se limpiaron 2 veces con PBS 1x para quitar α 10, centrifugando las células después de cada lavado. Los preosteoblastos en suspensión se fijaron en etanol al 70% frío por 30 min a 4°C (en este punto las células se pueden mantener en congelación a -70°C hasta por 15 días para su análisis).

Posteriormente, las células fijadas fueron re-hidratadas con PBS1x por 15 min a 4°C y se trataron con RNAasa (50U, ROCHE) por 1 h a 37°C en buffer de tinción (apéndice soluciones), en seguida se agregó Sytox-green a 0.5 µM (Invitrogen) por 30 min a temperatura ambiente. Las muestras fueron evaluadas en un FACSort en el canal referido a 488 nm con el programa CellQuest (BD Biosciences). Esta técnica nos permite contar y analizar partículas individuales por: (1) Área o tamaño celular, debido a la deflexión de la luz del laser (Forward Scattered lighth o FSC); (2) Complejidad o granulosidad celular, por la refracción de la luz dentro de la célula (Side-scattered light o SSC), (3) Intensidad de fluorescencia para determinar el contenido de DNA (FL1; Ver Esquema sig. Pag.). El análisis de resultados se llevó a cabo en el programa FlowJo y se cuantificaron tres distintas lecturas de poblaciones de cada tratamiento para hacer pruebas estadísticas (Fig. 12a).



Análisis de ciclo celular por citometría de flujo. (a) Esquema referido a la detección de los índices de tamaño y complejidad celular, FSC y SSC respectivamente, se destaca la deflexión de la luz para Forward-Scattered y la reflexión de la luz en el Side-Scattered. (b) Gráfico SSC vs FSC de población de preosteoblastos, mientras mas cercano a 0 en ambos ejes se refiere a células más pequeñas y menos complejas, se delimita la población seleccionada para el análisis de ciclo celular. (c) Histograma representativo de células no sincronizadas donde se definen los picos de las distintas

Resultados

Comparación de la expresión ARID1A y ARID1B durante la embriogénesis

Evidencias en *D. melanogaster* sugieren que el homólogo de los ARID1 regula diferencialmente el ciclo celular en algunos tipos celulares durante la embriogénesis (Moshkin et al. 2007; Baig et al. 2010), por su parte en mamífero las subunidades ARID1 también un papel antagónico en la proliferación de células en cultivo (Nagl et al. 2007), sin embargo en ningún modelo se ha relacionado la expresión de ARID1A y ARID1B con su posible actividad antagónica durante la embriogénesis. Por esta razón, nos planteamos evaluar la expresión de ambos ARID1 y tratar de establecer si estas subunidades presentan expresión diferencial en el embrión, así como intentar de establecer relación entre regiones de proliferación y la presencia de ARID1A o ARID1B. Los patrones de expresión que realizamos con hibridaciones *in situ*, indicaron en primera instancia que *Arid1a* se expresa generalizadamente, mientras que *Arid1b* presenta una expresión restringida a ciertos tejidos durante el desarrollo (ver Antecedentes) y no observamos una relación entre las zonas de expresión de estos genes y regiones de proliferación, sugiriendo que las subunidades ARID participan en la regulación de diversos procesos celulares, como la diferenciación. Como se mencionó, los patrones de expresión nos hicieron hipotetizar que *Arid1a* y *Arid1b* tienen niveles de expresión diferentes durante la embriogénesis, sin embargo estos ensayos no son cuantitativos, para comparar la expresión de ARID1A y ARID1B a nivel proteína y su dinámica de síntesis durante el desarrollo embrionario, se realizaron ensayos de inmunoblot en membrana con anticuerpos específicos reportados por Wang y col (2004).

Con ensayos de electroforesis (SDS-PAGE) se separaron extractos proteícos de embriones de 8.5, 9.5, 10.5 dpc y CTP (como referencia células indiferenciadas); se transfirieron en membranas de nitrocelulosa para realizar los inmunoblots correspondientes para ARID1A, ARID1B y β -tubulina (empleado como control de carga y normalización durante la comparación de proteínas). Con este análisis, en primer instancia observamos dos productos proteícos para ARID1A, uno del tamaño predicho (~242 kDa; Kozmik et al. 2001) y otra banda de alto peso molecular (~270 kDa), sugiriendo que es susceptible a modificaciones post-traduccionales (Fig.7a). En todos los estadios analizados se observa que la banda de alto peso molecular se detecta fuertemente, mientras que la banda de ~242 kDa varia dependiendo del estadio observado (Fig. 7a), en el caso de ARID1B también observamos dos isoformas la del tamaño predicho (~240 Hurlstone et al. 2002) y una de mayor peso molecular, siendo la

banda de alto peso molecular la mejor representada a lo largo de la embriogénesis y células troncales pluripotentes. La cuantificación incluyó ambas isoformas y observamos que tanto en células pluripotentes como a lo largo de la embriogénesis la expresión de ARID1A es superior sobre ARID1B, es decir en células troncales pluripotentes, ARID1A se expresa alrededor de 8 veces más que ARID1B, en la embriogénesis la diferencia es de 8 a 10 veces superior la expresión de ARID1A sobre ARID1B (Fig. 7a y b). Por otra parte analizamos la dinámica de cada proteína durante el desarrollo realizando la prueba estadística ANOVA, es decir comparamos la expresión de ARID1A en CTP y cada estadio embrionario y detectamos diferencias de expresión a lo largo de la embriogénesis y se destaca la mayor expresión de ARID1A en células indiferenciadas con respecto a los estadios embrionarios ($p \leq 0.0042$; Fig. 7a y b), concordando con el reporte donde sugieren que la expresión de ARID1A disminuye durante la diferenciación (Kaeser et al. 2008; Yan et al. 2008). Por su parte el ensayo estadístico para la expresión de ARID1B no se reveló diferencias en los niveles de expresión ($p \geq 0.602$; Fig. 7a y b), discrepando con reporte que sugiere un aumento de expresión de esta proteína durante la diferenciación (Kaeser et al. 2008).

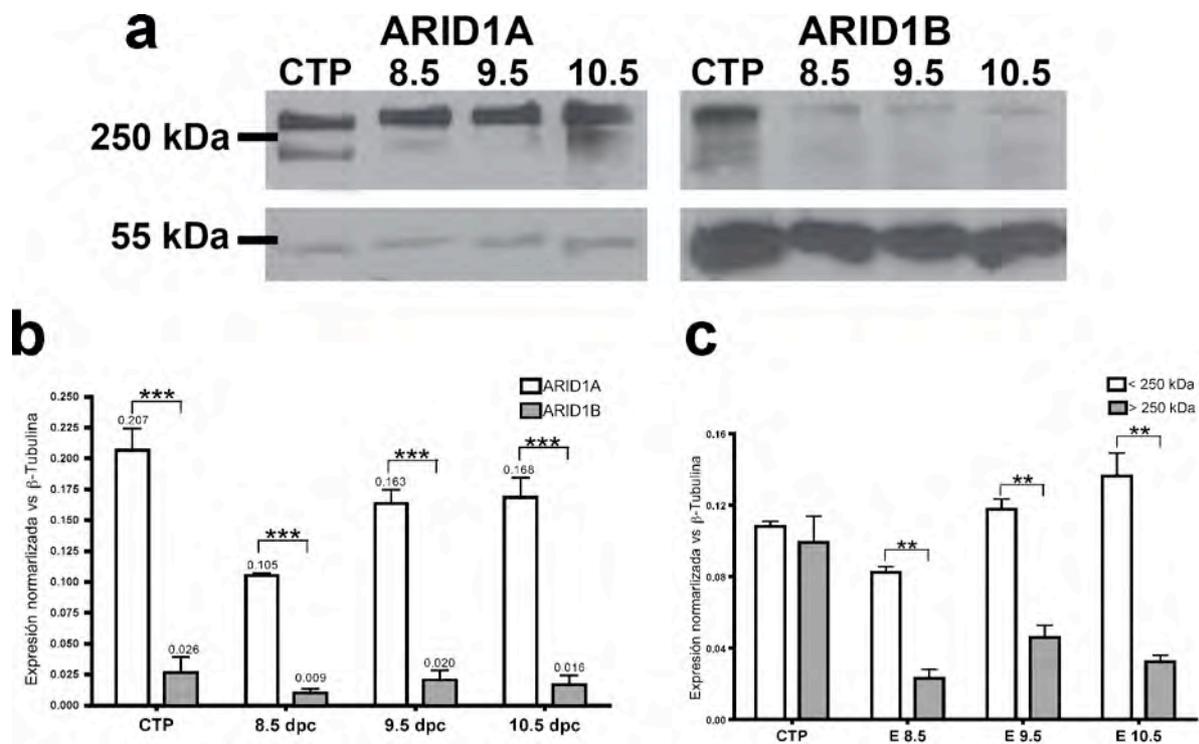


Fig. 7 Expresión de ARID1A y ARID1B. (a) WB de ambas proteínas durante el desarrollo embrionario, como control de carga se utilizó β -tubulina; Se cargaron 100 μ g de proteína en cada carril, sin embargo la detección de ARID1A se observó en tiempos cortos de revelado, en cambio ARID1B necesitó mayor exposición; (b) Análisis densitométrico del total de proteína para ARID1A o ARID1B en los inmunoblots, los datos representan tres experimentos diferentes \pm error estandar; prueba de t de Student ***($p \leq 0.005$) y +($p \leq 0.05$, con respecto a ARID1A en CTP).(c) Comparación de la expresión relativa de las dos bandas de ARID1A durante la embriogénesis. Se graficó el promedio \pm error estandar. ***($p \leq 0.005$) y *($p \leq 0.05$ como referencia la banda de 242 kDa de ES).

Como se mencionó anteriormente, tanto para ARID1A como ARID1B se detectaron dos isoformas, una del tamaño predicho y una de alto peso molecular (Fig. 7a), que podría ser resultado de modificaciones post-traduccionales en ambas proteínas, sin embargo la banda referida al peso molecular predicho varía en los estadios analizados. Por tanto y debido a que ARID1A se detectó mejor en estos ensayos, se comparó la expresión de las isoformas de cada muestra con la prueba de t de Student. Los resultados indican que en células troncales la expresión de ambas isoformas es similar ($p= 0.611$, no significativa), aunque la isoforma de alto peso molecular se expresa en mayor proporción durante la embriogénesis ($p \leq 0.05$, diferencia significativa en todos los casos; Fig. 7c). Sugiriendo que durante el estado indiferenciado, ARID1A presenta dos productos proteicos que podrían tener un papel en la regulación de la pluripotencialidad, por su parte la expresión preferencial de la banda de alto peso molecular durante la embriogénesis podría indicar que en células diferenciadas ARID1A presente regulación post-traducciona, reflejada en la especificidad funcional a lo largo del desarrollo embrionario.

ARID1A es modificada post-traduccionalmente in vivo

La presencia de isoformas de ARID1A sugiere su modificación postraducciona *in vivo*; adicionalmente, propusimos que mecanismos de modificación post-traducciona intervengan en la regulación funcional o disponibilidad de las subunidades ARID1. Una aproximación inicial fue la búsqueda de bases de datos de modificaciones postraduccionales *in silico* de las secuencias disponibles para ARID1A (gi: 124249109) y ARID1B (gi: 145553997). El sitio web NetPhos se utilizó para buscar sitios susceptibles a fosforilación y para identificar sitios consenso de sumoilación empleamos dos software, sumo plot y SUMOsp 2.0²². Aunque en ambos casos se identificaron diversos sitios susceptibles para ambas modificaciones, la selección de sitios se basó en los valores con mayor probabilidad de ser modificados (en ambos análisis probabilidades cercanas a 1, siendo este valor el máximo), en el caso de las fosforilaciones también seleccionamos los sitios específicos para cada proteína, hipotetizando que estos sitios diferenciales pudieran estar involucrados en la regulación de funciones diferenciales de las subunidades.

²² El sitio NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/>) identifica fosforilaciones en residuos de serina (S), tirosina (Y) y threonina (T). El sitio sumo plot (<http://www.abgent.com>) y SUMOsp 2.0 (software libre) identifica lisinas (K) susceptibles a sumoilación.

En la tabla 3 se muestran los sitios obtenidos de nuestro análisis *in silico*, para ambas proteínas, se destaca que algunos de los sitios seleccionados de fosforilación concuerdan con reportes de secuenciación masiva de proteínas fosforiladas (Tabla 3, revisado en www.phosphosite.org), sugiriendo que el criterio de selección es correcto y apoyando la hipótesis de regulación post-traducciona de los ARID1. Aunque no hay evidencias bioquímicas de sumoilaciones para las subunidades ARID1, esta modificación interviene en la regulación funciona de las proteínas, modificando de manera diferencial con fosforilaciones (Li et al. 2007).

Además es interesante que residuos con alta probabilidad de ser modificados por fosforilaciones o sumoilaciones, están cercanos o dentro de los dominios funcionales descritos para las proteínas (Tabla 3 y esquema). Para confirmar estas propuesta se realizaron ensayos de inmunoprecipitación (IP) en distintos extractos proteicos que incluyeron embriones de 8.5, 9.5 y 10.5 dpc, así como preosteoblastos (MC3T3 E1) y células troncales de ratón; debido a que ARID1A se expresa fuertemente en estas muestras nos centramos en el análisis de esta subunidad, por su parte ARID1B fue descartada por el momento por su expresión débil, pero no descartamos que también presente regulación post-traducciona (Fig. 7a). Con esta idea y para tratar de conservar dichas modificaciones se adicionaron inhibidores de fosfatasa (phosphoSTOP; ROCHE) o N-etilmaleimida (10mM; inhibidor de sumoilasa y ubiquinasas) durante la preparación de los extractos proteicos (Ver Material y Métodos).

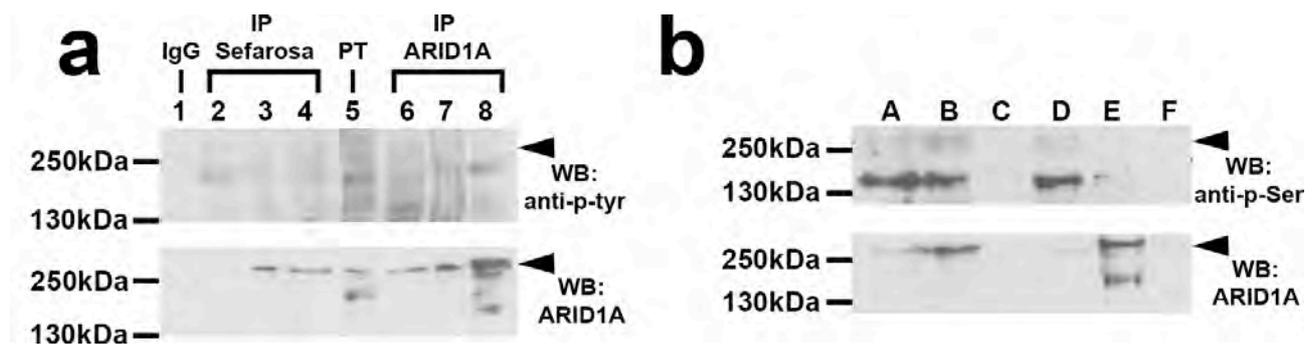
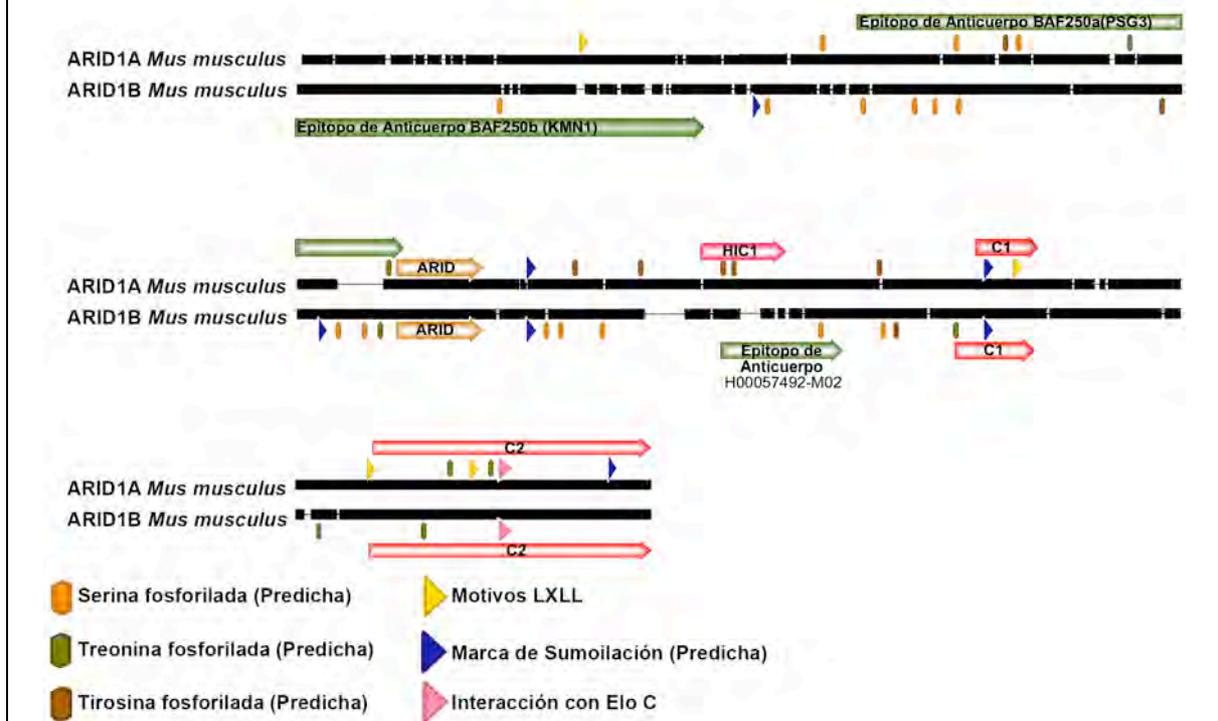


Fig. 8 Inmunoprecipitaciones de ARID1A en extractos proteicos de preosteoblastos de ratón tratados con inhibidores de fosfatasa (a) WB de anti-fosfo tirosina - arriba y anti-ARID1A - abajo. Carril 1 –IgG anti-mouse; carril 2 – IP sin anticuerpo (control de pegado inespecífico); carril 3 – lavado de IP sin anticuerpo; carril 4 – Sobrenadante de IP sin anticuerpo; carril 5 – PT (100 µg de proteína total); carril 6 – Sobrenadante de IP con anti-ARID1A; carril 7 - lavado de IP con anti-ARID1A; carril 8 – Inmunoprecipitación de ARID1A. (b) Inmunoblot de anti-fosfo Serina - arriba y anti-ARID1A - abajo. Carril A – 100 µg de proteína total; Carril B – Sobrenadante de IP sin anticuerpo; Carril C – IP sin anticuerpo (control de pegado inespecífico); carril D - Sobrenadante de IP con anti-ARID1A; carril E – Inmunoprecipitación de ARID1A; carril F – IgG anti-mouse. La cabeza de flecha indica el lugar donde migra ARID1A. Se realizaron 3 repeticiones de cada ensayo.

Tabla 3. Sitios susceptibles a modificaciones post-traduccionales de las proteínas homólogas. Las sumoilaciones se llevan a cabo en las lisinas (K); las fosforilaciones en residuos de serina (S), tirosina (Y) y treonina (T).

ARID1A		ARID1B	
Sumoilaciones	Fosforilaciones	Sumoilaciones	Fosforilaciones
1662 LKPP	659 *S*	971 LKAD	230 *S*
1678 LKSG	710 *S*	1206 LKPP	489 *S*
2241 AKVD	763 *Y*	1639 LKSG	587 *S*
	778 *S*	476 MKRP	643 *S*
	895 *T*	1712 GKGD	667 *S*
	1004 *T*	1857 GKGD	693 *S*
	1212 *Y*	1725 GKED	921 *Y*
	1286 *Y*	975 GKEE	989 *S*
	1378 *Y*		1018 *S*
	1390 *Y*		1036 *T*
	1556 *Y*		1226 *S*
	2058 *T*		1239 *S*
	2103 *T*		1286 *S*
			1450 *S*
			1521 *S*
			1535 *Y*
			1563 *S*
			1602 *T*
			1871 *T*
			1989 *T*

Esquema de modificaciones y su ubicación en las secuencias



Con extractos proteicos de preosteoblastos de ratón tratados con inhibidores de fosfatasa, se realizaron inmuprecipitaciones de ARID1A, se hicieron inmunoblots detectando por una parte la precipitación de la subunidad, así como la detección de residuos fosforilados de tirosina (tyr) y serina (Ser; Fig. 8a y b, respectivamente). Los resultados indicaron que se inmunoprecipitó correctamente ARID1A (Fig. 8 carriles 8 y E membrana inferior), sin embargo no somos capaces de detectar bandas fosforiladas que sobrelapa con el tamaño de ARID1A tanto en residuos de fosforilados de Tyr como Ser (Fig. 8 carriles 8 y E membrana inferior), sugiriendo que ARID1A no es modificada por fosforilación en preosteoblastos de ratón. Por otra parte, el patrón de bandeo observado en los extractos totales de proteínas y sobrenadantes de las inmuprecipitaciones, indican que los anticuerpos que se unen a residuos fosforilados están detectando otras proteínas modificadas (Fig. 8. carriles 2-7, A,B, D membranas superiores), aunque otro control positivo que nos hubiera permitido verificar si los anticuerpos están funcionando correctamente era la inmunoprecipitación de una proteína fosforilada y su correspondiente inmunoblot que revelara dicha modificación.

Se obtuvieron extractos proteicos totales de preosteoblastos de ratón tratados con 10 mM de NEM, para enriquecer proteínas sumoiladas y ubiquitinadas. Corroboramos que el tratamiento con NEM aumenta considerablemente la detección de proteínas sumoiladas en extractos proteicos totales y no altera la detección de ARID1A (Fig. 9a carril 1= Sin NEM y carril 2= 10 mM NEM). Por otra parte el tratamiento con NEM no altera la inmunoprecipitación de ARID1A (Fig. 9a membrana inferior, carril 3= Sin NEM y carril 4= 10mM NEM), ni tampoco aumenta el pegado inespecífico de proteína a la resina (Fig. 9a carril 5 sin NEM y carril 6 con 10mM NEM). El inmunoblot para SUMO1, en inmuprecipitaciones de ARID1A en extractos con 10 mM de NEM, revela una banda tenue (Fig. 9a carril 4 membrana superior) que sobrelapa con la detectada para ARID1A (Fig. 9a membrana inferior, carril 4), sugiriendo que ARID1A es susceptible a esta modificación en este tipo celular; sin embargo se sugiere realizar inmuprecipitaciones de una proteína sumoilada y su correspondiente inmunoblot como control positivo, aunque el enriquecimiento detectado en extractos proteicos totales tratados con NEM indican que la metodología utilizada esta funcionando. La cuantificación en células troncales pluripotentes y embriones de ratón, sugieren una fuerte expresión de ARID1A, además detectamos una banda de alto peso molecular que podría ser resultado de sumoilación y/o ubiquitinación, los resultados de cultivos celulares sugerían que era sumoilada por tanto se obtuvieron extractos proteicos de células troncales de ratón, embriones de 9.5 y

10.5 dpc tratados con 10mM de NEM para realizar ensayos de inmunoprecipitación de ARID1A y detectar sumoilaciones por inmunoblot (Fig. 9b). Los resultados muestran que inmunoprecipitamos la proteína en las muestras utilizadas (Fig. 9b membrana inferior²³, carriles B-D), sin embargo el inmunoblot realizado para SUMO1 no revelan bandas distinguibles que coincidan con ARID1A, indicando que durante la embriogénesis y células troncales no se está sumoilando y la banda de alto peso molecular debe ser consecuencia de otro proceso post-traducciona. Otra posibilidad es que la cantidad de proteína sumoilada está por debajo del límite de detección del ensayo realizado, por tanto un procedimiento para confirmar si esta proteína está sumoilada sería transfectar con fragmentos de ARID1A que contengan sitios consenso de sumoilación, fusionados con banderas de marcaje (por ejemplo "tag" de histidinas), lo que permitiría purificar mayor cantidad de proteína y enriquecer el producto modificado.

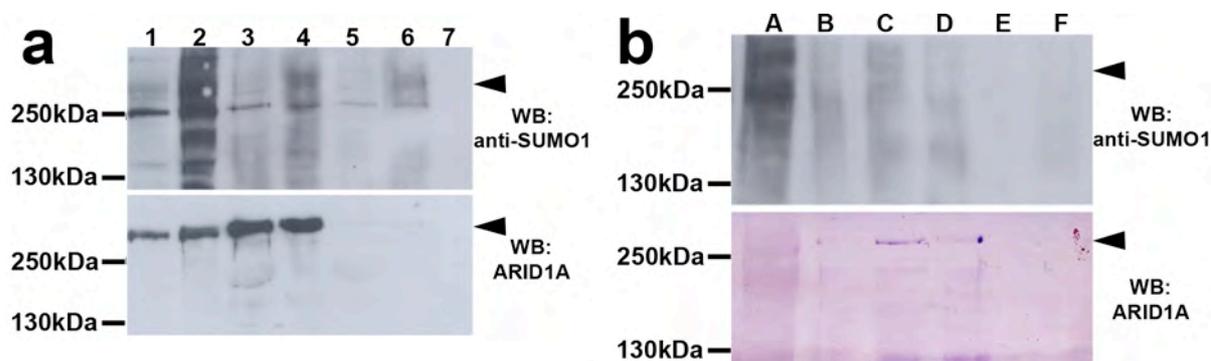


Fig. 9 (a) WB de anti-fosfo SUMO1 - arriba y anti-ARID1A - abajo en extractos proteicos de preosteoblastos de ratón. Carril 1 – 100 µg de proteína total sin NEM; carril 2 – 100 µg de proteína total con NEM; carril 3 – IP de ARID1A en proteína sin NEM; carril 4 – IP de ARID1A con proteína tratada con NEM carril 5 – IP sin anticuerpo en proteína sin NEM; carril 6 – IP sin anticuerpo de proteína con NEM; carril 7 – IgG anti-mouse (b) Inmunoblot de anti-SUMO1 - arriba y anti-ARID1A - abajo en extractos proteicos tratados con NEM. Carril A – 100 µg de proteína total de CTP; Carril B – IP de ARID1A en células troncales pluripotentes; Carril C – IP de ARID1A con extractos de embriones de 9.5 dpc; carril D - IP de ARID1A con extractos de embriones de 10.5 dpc; carril E – IP de CTP sin anticuerpo A; carril F – IgG anti-mouse. La cabeza de flecha indica el lugar donde migra ARID1A. Tanto para (a) como para (b) se hicieron dos repeticiones del ensayo.

Debido a que ARID1A presenta una banda de migración lenta, se hipotetizaba una modificación significativa, quizá de tipo covalente, consideramos como plausible que estuviera ubiquitinada. Anteriormente, se reportó que las proteínas ARID1 interactúan con un complejo de E3 ligasa de ubiquitina; ARID1B puede ser ubiquitinada y degradada cuando el sitio de interacción con el complejo es mutado (Li et al. 2010); sin embargo no

²³ La detección de ARID1A se realizó con un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina y se reveló directamente en la membrana y presenta la tinción color morada. Este tipo de revelado tiene la desventaja de ser menos sensible, reflejado en la menor detección de las bandas de ARID1A con respecto a la observada con la otra metodología.

se han reportado datos de ubiquitinación *in vivo* para estas proteínas. Para confirmar que ARID1A puede ser ubiquitinada, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación tanto de ARID1A, como de residuos ubiquitinados en paralelo con extractos proteicos de células troncales pluripotentes tratados con o sin NEM (10mM). Posteriormente, se analizaron por inmunoblot con anticuerpos para ubiquitina y ARID1A en ambas IPs (Fig. 10). El inmunoblot con anti-ubiquitina mostró que el tratamiento con NEM aumenta la cantidad de proteínas ubiquitinadas y revela una banda mayor a 250 kDa, tanto en fracción inmunoprecipitada para ARID1A como en la de proteínas ubiquitinadas (Fig. 10 carriles 2 y 3). La detección de ARID1A en su correspondiente IP, revela la presencia de las dos isoformas observadas en la Fig. 7a y se destaca que la banda de alto peso molecular coincide con la banda revelada para anti-ubiquitina (Fig. 10 carril 2). Por su parte, en el carril de la IP de anti-ubiquitina también se observa una banda de alto peso molecular positiva para ARID1A, que corresponde al producto de alto peso molecular (Fig. 10 carril 3). Estos datos sugieren que la banda de alto peso molecular de ARID1A en células troncales pluripotentes está ubiquitinada, por lo que su actividad, función o estabilidad podría estar así regulada.

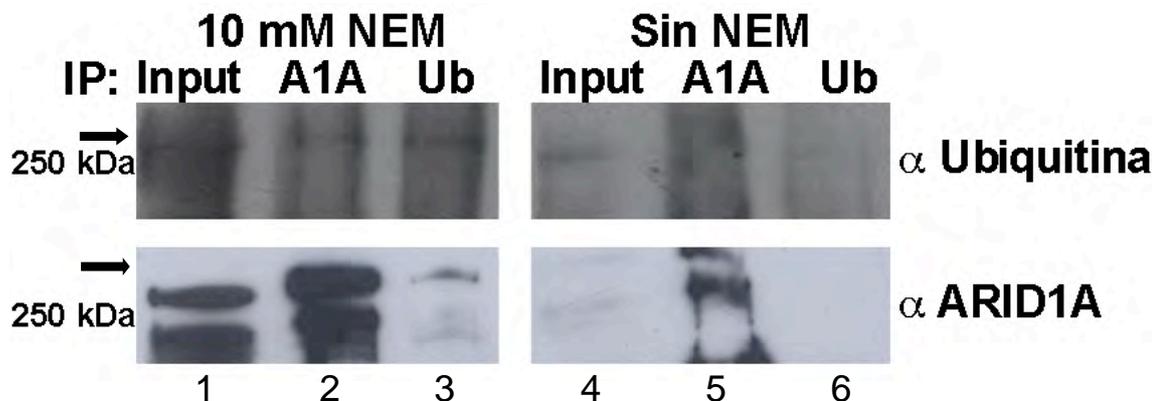


Fig. 10. Inmunoprecipitaciones con anti-Ubiquina y anti-ARID1A en proteínas totales de células troncales pluripotentes con presencia o ausencia de NEM. La fleche denota la banda de alrededor de 270 kDa de ARID1A presente tanto en ambos inmunoblots e inmunoprecipitaciones.

Dinámica de localización de ARID1A y ARID1B durante el ciclo celular en cultivo celular.

Como se describió anteriormente las proteínas ARID1A y ARID1B parecen tener funciones antagónicas durante la proliferación en preosteoblastos de ratón (Nagl. et al. 2007). Se reporto mediante experimentos de inmunoprecipitación de cromatina, que ARID1A se encuentra unido en promotores de genes que regulan la progresión del ciclo

celular (como ciclina A, ciclina E, cdc2 y c-myc) en células sincronizadas en G1 y se va despegando cuando las células empiezan a proliferar, correlacionando con que ARID1A está involucrada en la detención del ciclo celular; por su parte, ARID1B se presenta en dichos promotores durante G1 y S, participando en la progresión del ciclo celular (Nagl. et al. 2007).

Para evaluar la cinética de síntesis y localización subcelular de estas dos subunidades en el ciclo celular, empleamos ensayos de inmunofluorescencias (IF) y WB de ambos ARID1 en células sincronizadas durante las diferentes fases de la proliferación. Por un lado, obtuvimos células sincronizadas en G0/G1 y durante la fase de síntesis de DNA (Ver Material y Métodos), se realizaron ensayos inmunofluorescencias en paralelo con anticuerpos para estas subunidades y con un anticuerpo que identifica a PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), el cual es un marcador de la fase S y cuya expresión inicia paralelamente a la síntesis de DNA (Bravo y Macdonald-Bravo, 1984; Bravo y Macdonald-Bravo, 1987). Por otra parte, para detectar los estadios de la mitosis, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en cultivos de preosteoblastos asincrónicos y se detectó ARID1A o ARID1B, con la fosforilación de la histona H3 en la serina 10 (H3S10P), debido a que dicha modificación es un marcador de la mitosis pues inicia al final de la fase G2 y perdura a lo largo de la división celular (Prigent y Dimitrov 2003).

Las dobles inmunofluorescencias ARID1A/PCNA ó ARID1B/PCNA en células sincronizadas, corroboraron que las células se sincronizan en G0, puesto que PCNA está ausente en el tiempo cero y su expresión incrementa gradualmente al reintroducir el suero fetal bovino en el cultivo a partir de las 12 hrs (Figs. 11 y 12). En primer instancia y con ayuda de microscopía de contraste de fases y tinción de DNA (Sytox Green o Yoduro de propidio), observamos que las proteínas ARID1 se localizan dentro del núcleo durante la interfase (Fig. 11 y 12). La cuantificación de ARID1A sugiere que se expresa establemente entre G0 y S (Fig. 11c), en cambio los niveles de expresión de ARID1B aumentan de manera significativa durante la transición de G0/G1 a síntesis, siendo más evidentes a las 18 y 24 h de estímulo (Fig. 12c). Estos datos sugieren que estas proteínas tienen una dinámica de expresión diferencial durante la interfase, es decir ARID1A se mantiene constante mientras que ARID1B aumenta de G0 a S.

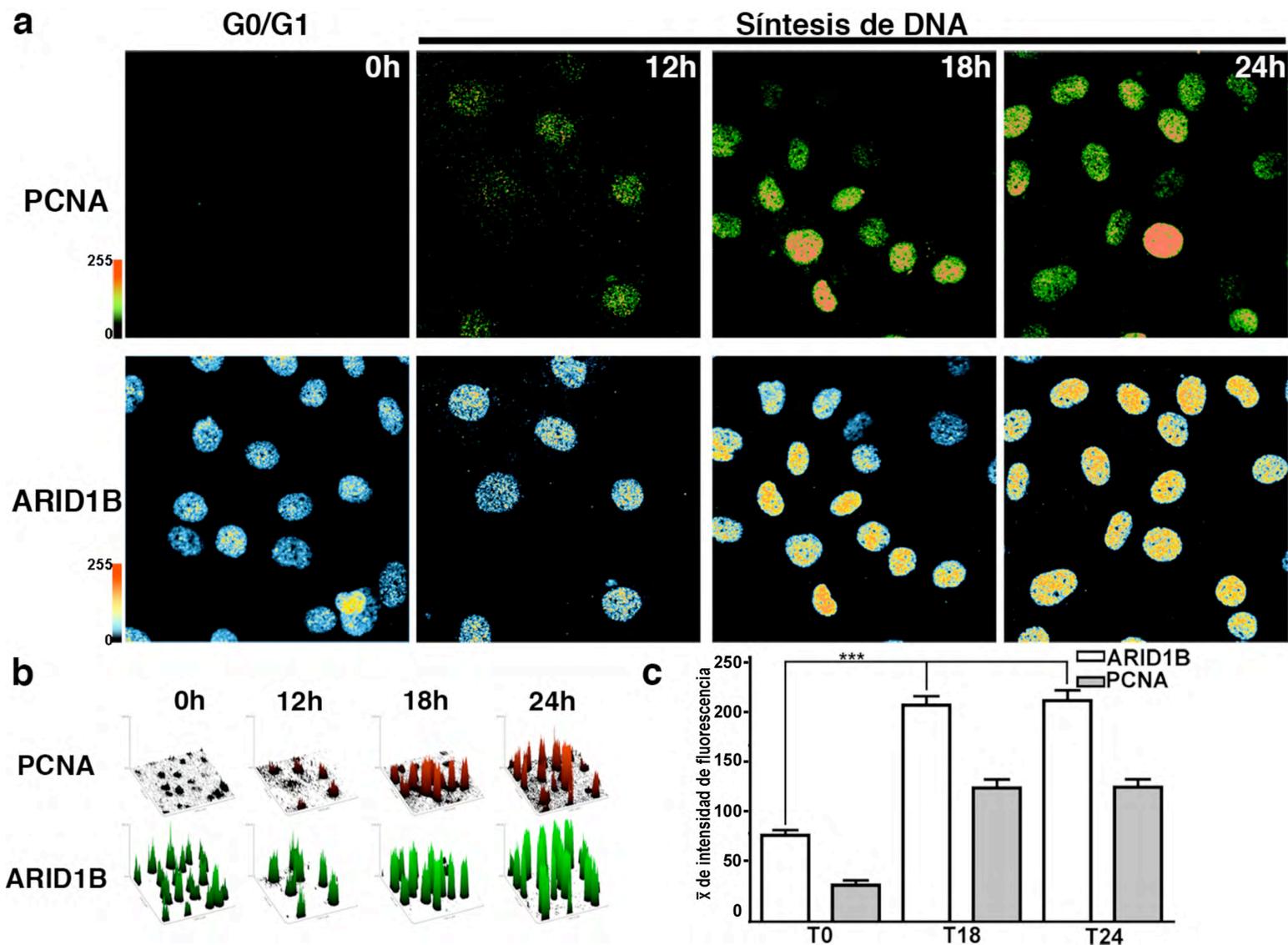


Fig. 12 Expresión de ARID1B en la interfase. **(a, b)** Imágenes en pseudo-color de inmunofluorescencias a diferentes tiempos de sincronización, G0 (0h) y S (12, 18 y 24 h), para PCNA (arriba) y ARID1B (abajo); escala de pseudo-color refleja la intensidad de tonos de grises (255 px), 0 = sin expresión; 255 = máxima expresión. **(b)** Histogramas de superficie de (a), cada pico refleja la expresión de PCNA ó ARID1B por célula. **(c)** Cuantificación de la expresión de ARID1B a lo largo de la sincronización. (n=40 células por tratamiento); se graficó el promedio de tres experimentos independientes. (±) barras de variación = error estandar.

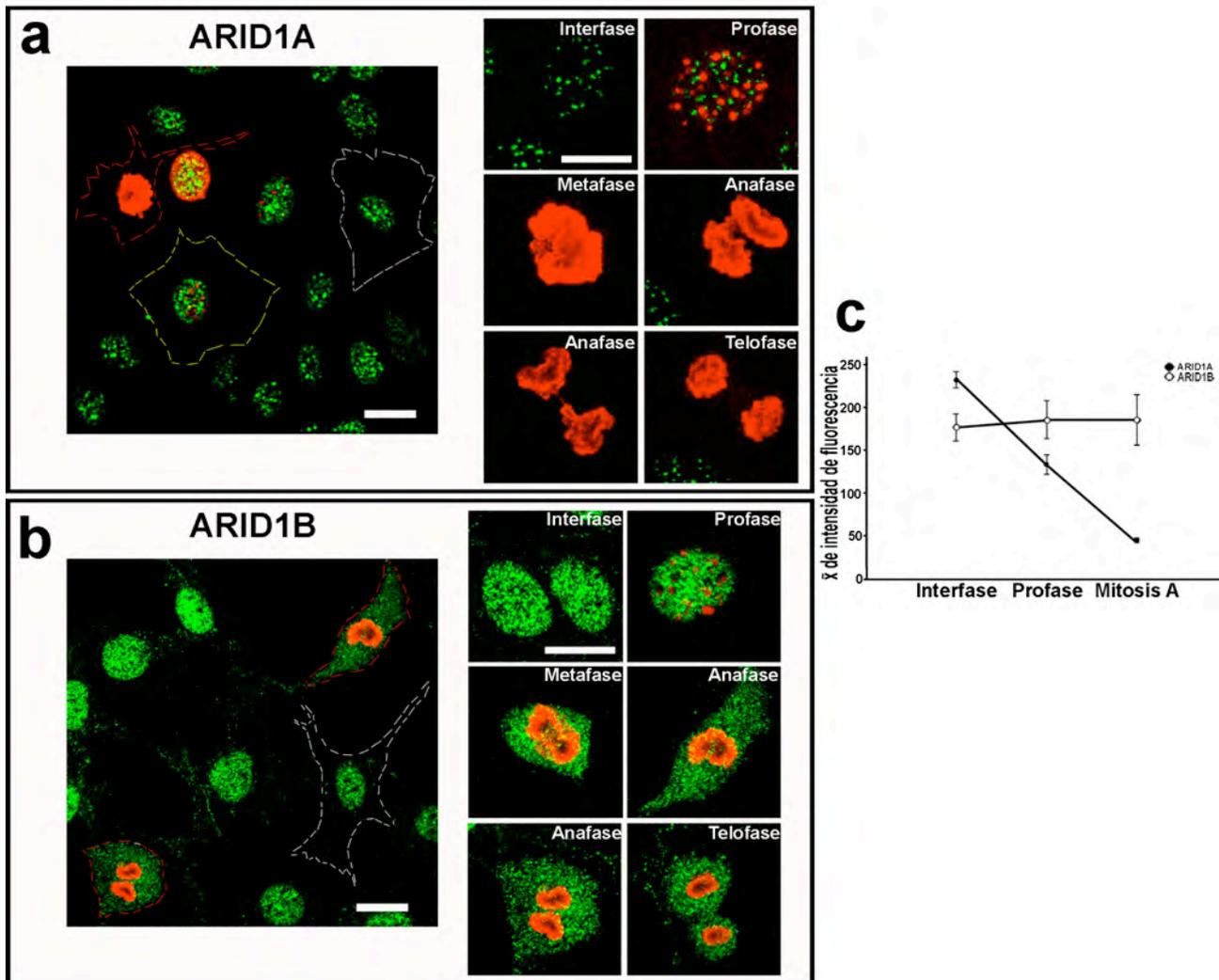


Fig. 13 Expresión de ARID1A y ARID1B durante G2/M. (a, b) Dobles inmunofluorescencias de ARID1A ó B (verde)/ fosforilación de Ser10 de la histona H3 (H3S10P; rojo). Izquierda – imagen a 20x donde se delimitan con líneas punteadas células en distintos momentos del ciclo celular. Derecha – células individuales en diferentes fases de la mitosis. (c) Cuantificación de la expresión de los ARID1 a lo largo de la mitosis. n = 40 células por tratamientos; 3 repeticiones. Escala 20 μ m. Imágenes de microscopía confocal

Las inmunofluorescencias para H3S10P/ARID1A ó 1B (Fig. 12), permitieron detectar todos los estadios de la mitosis, así como el análisis cualitativo y cuantitativo para las subunidades ARID1. En estas condiciones, los resultados indican que ARID1A disminuye durante profase hasta desaparecer a partir de metafase (Fig. 13a y c). En cambio, la expresión de ARID1B permanece constante a lo largo de mitosis (Fig. 13b y c). Los resultados anteriores sugieren que los genes ARID1 puede tener una dinámica diferencial a lo largo del ciclo celular, es decir que ARID1A presenta expresión constante desde G1 hasta S y se degrada durante la mitosis (ver Fig.11 y 13), mientras que ARID1B aumenta

su expresión de G1 a S y se mantiene constante a lo largo de la fase M (Fig. 12 y 13). Adicionalmente también observamos que a lo largo de la interfase, ambas subunidades ARID1 se localizaron en el núcleo, mientras que durante los estadios avanzados de la mitosis (metafase a telofase) sólo observamos la expresión de ARID1B en el espacio citoplasmático.

Los datos de la cinética de expresión de las subunidades ARID sugieren dos posibilidades no excluyentes: por un lado, la síntesis o la estabilidad de las proteínas pudiera ser regulada a lo largo del ciclo celular, o bien, la síntesis del mRNA pudiera determinar la disponibilidad del producto a lo largo de la proliferación. Para evaluar estas interrogantes se realizaron ensayos de inmunoblot (WB) y PCR cuantitativo (qPCR) con extractos totales de células sincronizadas. Para la obtención de poblaciones enriquecidas en las fases del ciclo celular se hicieron ensayos de sincronización por ausencia de nutrientes para obtener la población en G0/G1, con hidroxyurea para enriquecer la fase S y con colchicina para G2/M (Ver Material y Métodos). Previo al análisis de las subunidades ARID1, se comprobó la sincronización del ciclo celular por citometría de flujo (contenido de DNA; Fig. 14a).

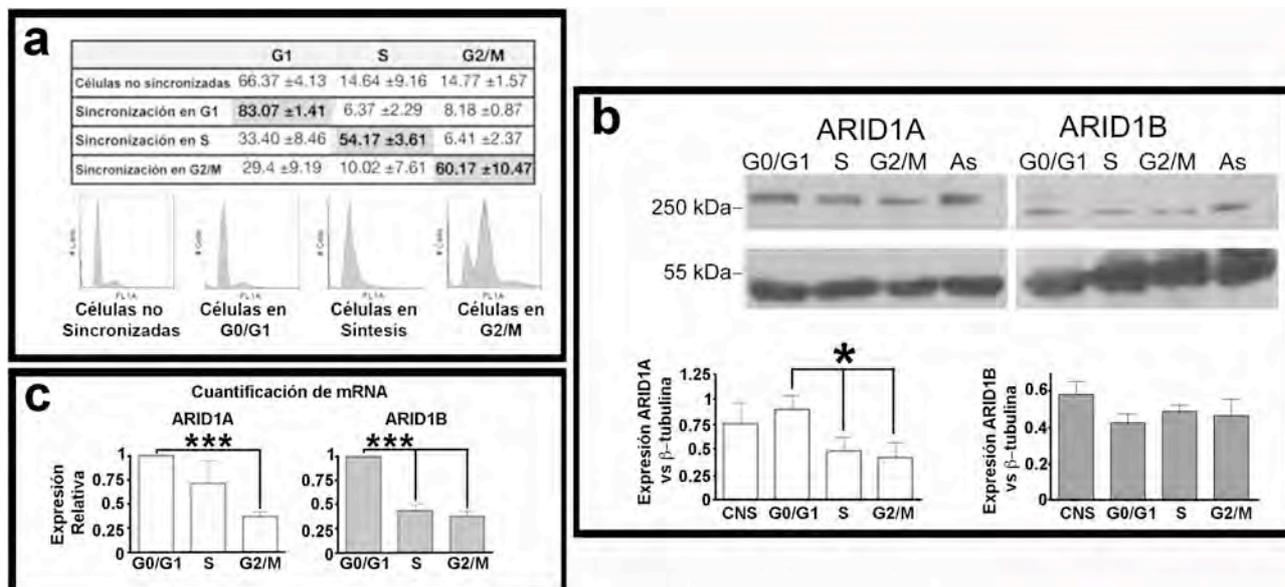


Fig. 14 Dinámica de expresión de ARID1A y ARID1B durante la proliferación. (a) Tabla del análisis de sincronización celular (arriba), histogramas de citometría donde se ilustra la sincronización celular en las distintas fases (abajo), eje X – número celular, eje Y – fluorescencia por contenido de DNA (b) WB de ARID1A y ARID1B en diferentes fases del ciclo celular (arriba); Densitometría del inmunoblot de ARID1A (* p ≤ 0.05; abajo izquierda) y ARID1B (grafica abajo Derecha) (c) Cuantificación del mRNA de *Arid1a* (barras blancas) y *Arid1b* (barras grises). Pruebas de t ***(p ≤ 0.001; 3 repeticiones).

Los ensayos de sincronización enriquecieron las poblaciones celulares de G0 alrededor del 80% y para S y G2/M entre el 50-60% (Fig. 14a). El ensayo de inmunoblot

para ARID1A presentó una banda de alto peso molecular (~270 kDa), la cual disminuyó de manera significativa a partir de G0/G1 hasta G2/M (Fig. 13b y c), en este tipo celular se observó la banda de ~240 kDa sugiriendo que solo se expresa la isoforma de alto peso molecular. Por su parte, ARID1B revela la banda de ~240 kDa cuya expresión no se modifica de manera significativa a lo largo de la división celular (Fig. 14b). Con el objetivo de evaluar la dinámica del nivel transcripcional de los *Arid1*, se examinó la expresión del mRNA de ambos *Arid1* durante el ciclo celular por RT-PCR cuantitativo. Para ello se utilizaron oligonucleótidos específicos que evitan la amplificación cruzada de los mensajeros y que están ubicados en diferentes exones, descartando así la amplificación de DNA genómico. Como control interno se amplificó el mRNA de la proteína ribosomal S18 (*rsp18*). En estas condiciones, ambos ARID1 presentaron su mayor expresión en la fase G0/G1, sin embargo, posteriormente se observó que *Arid1a* baja gradualmente hasta la fase G2/M (Fig. 13e izquierda), *Arid1b* bajó su expresión a un nivel mínimo desde la síntesis de DNA y así mantuvo durante G2/M (Fig. 13e derecha). Estos resultados indican que tanto el mRNA como la proteína de ARID1A disminuye a lo largo del ciclo celular desde la fase G1 hasta mitosis, lo que pudiera significar que su disponibilidad es regulada principalmente a nivel transcripcional y quizá, en menor grado a nivel de proteína, sin embargo estos ensayos pudieran presentar discrepancias resultados obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencias donde se sugiere que no hay diferencias de expresión entre G1 y síntesis de DNA (Fig. 11), que pudieran ser explicados por la diferentes metodologías utilizadas, mientras que en la fluorescencia se cuantifican intensidades relativas en núcleos individuales, en los inmunoblots y qRT-PCR los valores son absolutos con respecto a la normalización de con una proteína o mRNA que se expresa constantemente en poblaciones enriquecidas en una de las fases de ciclo celular pero aun hay influencia de las poblaciones remanentes de los otros estadios de la proliferación. Por el otro lado, el transcrito de *Arid1b* presenta mayor expresión durante la fase G0/G1 y baja significativamente en las otras etapas, sin embargo la proteína parece constante durante la proliferación, concordando con los resultados obtenidos con las inmunofluorescencias, sugiriendo que la proteína ARID1B es mas estable que ARID1A durante la proliferación y que ambos genes *Arid1* son transcritos durante la ausencia de nutrientes y después no continúan su transcripción.

Durante el análisis del inmunoblot de sincronización celular observamos que en ARID1A se presenta una banda ~170 kDa, que es exclusivamente en los extractos sincronizados, sugiriendo que durante la sincronización celular ARID1A se degrada. Por

su parte, para ARID1B se reveló un producto de alrededor de 120 kDa con altos niveles de expresión exclusiva de preosteoblastos, ya que no observamos otros tipos celulares (Fig. 15), que podría corresponder a una isoforma o producto post-traduccionales estable y posiblemente funcional en esta línea celular (www.ensembl.org). Con estos datos se concluye que ARID1A disminuye a lo largo del ciclo celular, con un producto de alto peso molecular, posiblemente modificado post-traduccionales, por su parte, la expresión de ARID1B a lo largo de la proliferación es constante y presenta dos isoformas de diferente peso molecular, una alrededor de 240 kDa y una pequeña sugiriendo que en este tipo celular hay dos isoformas posiblemente funcionales.

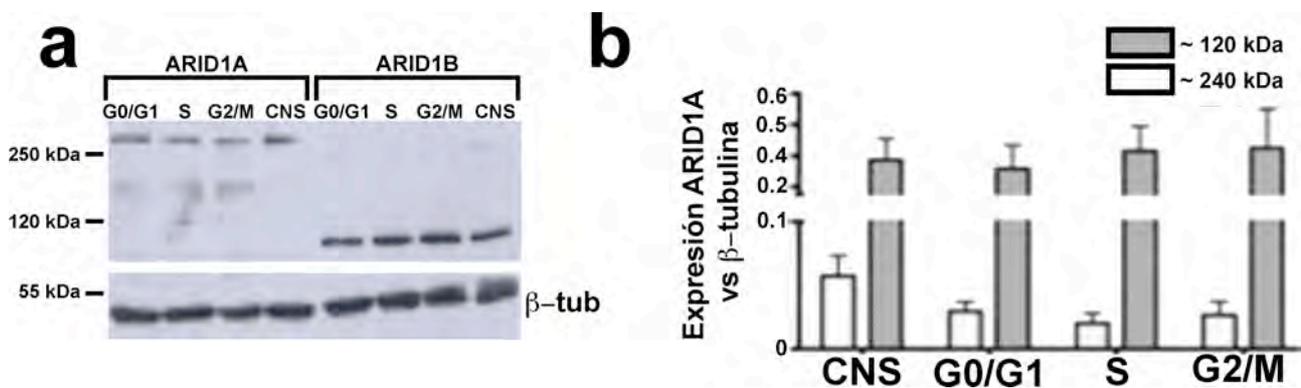


Fig. 15 Inmunoblot de las proteínas ARID1 en células sincronizadas. (a) membrana revelada donde se muestra que ARID1A presenta una banda de ~270 kDa referida como la isoforma de alto peso molecular identificada en CTP y desarrollo embrionario y otro producto de ~170 kDa; para ARID1B se observa la expresión tenue de la banda de la proteína completa (~240 kDa) y la detección elevada de una banda de ~ 120 kDa, exclusiva de este tipo celular (b) Cuantificación de las bandas detectadas para ARID1B durante el ciclo celular. Se observa expresión elevada y constante del producto ~ 120 kDa a diferencia de la proteína completa que se expresa en menor cantidad. Se hicieron 3 repeticiones del ensayo.

Dinámica de localización de ARID1A y ARID1B en la embriogénesis temprana

Para evaluar la dinámica de ambas proteínas ARID1 en otros tipos celulares, se determinó la expresión en células ES y en embriones preimplantación como modelo *in vivo*. Se decidió utilizar las células embrionarias pluripotentes debido a que tienen un ciclo celular acelerado, es decir, con períodos cortos en las fases G1 y G2, y alrededor del 80% del tiempo en fase de síntesis de DNA o mitosis (revisado en White y Dalton 2005). Por otra parte, durante el desarrollo preimplantación la tasa de proliferación es relativamente rápida y se presentan todas las fases del ciclo celular (revisado en Kubiak et al. 2008; Zernicka-Goetz et al. 2009).

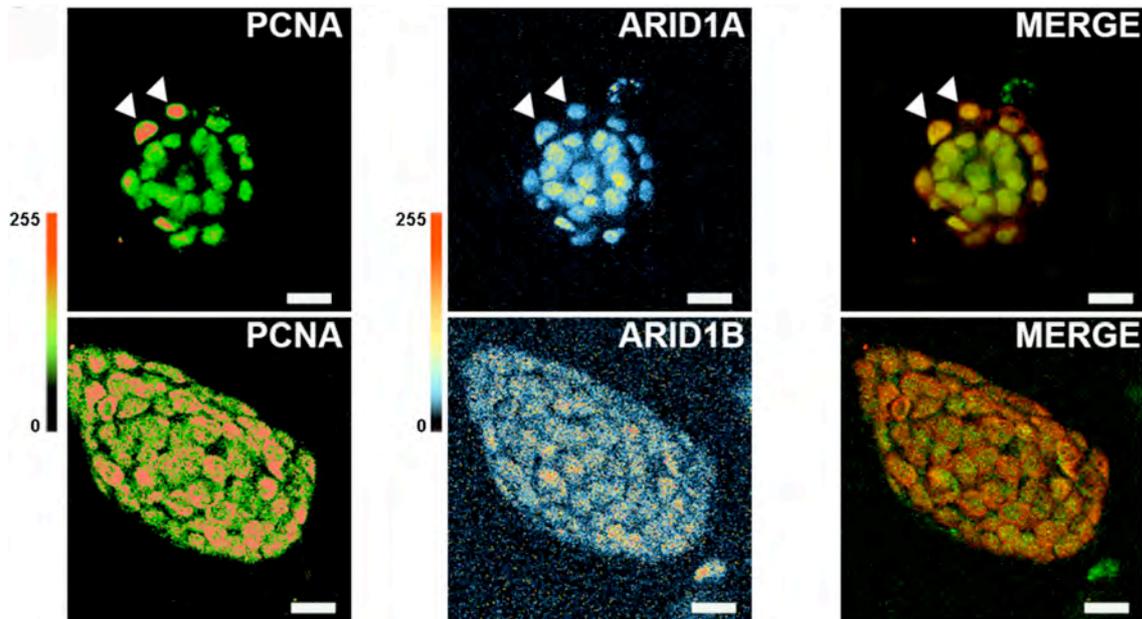


Fig. 16 Dinámica de ARID1A y ARID1B durante la interfase en células troncales de ratón. Imágenes en pseudo-color de IF de ARID1A/PCNA (arriba) y ARID1B/PCNA (abajo); escala de pseudo-color refleja la intensidad de tonos de grises (255 px), 0 = sin expresión; 255 = máxima expresión. Las cabezas de flecha indican células con altos niveles de PCNA y menor expresión de ARID1A. Escala 20 μ m. Imágenes de microscopía confocal, corte óptico de 1.5 μ m. Se realizaron 3 repeticiones del experimento.

En primera instancia se realizaron ensayos de dobles inmunofluorescencias (PCNA/ARID1A o 1B y H3S10P/ARID1A o 1B) en células ES de la línea R1. Se demostró que ARID1A se localizó en células que expresaron PCNA y de manera general se apreció que las células con fuerte tinción de PCNA, tienen menor expresión de ARID1A, sugiriendo que ésta disminuye a medida que avanza la síntesis (Fig. 16 arriba). De manera similar a lo que ocurrió en los preosteoblastos, cualitativamente se sugiere que la expresión de ARID1B fue constante durante la interfase tomando como referencia células con las distintas intensidades de fluorescencia de PCNA (Fig. 16 abajo).

En el caso de la localización durante la división celular, observamos semejanzas en los resultados para ambas proteínas, ya que tanto cualitativa como cuantitativamente se observa que células troncales pluripotentes en mitosis avanzada no expresan ARID1A (Fig. 17a y b), de manera cualitativa observamos la expresión de ARID1B a lo largo de la división celular, sin embargo la cuantificación sugiere que su expresión disminuye durante la fase M (Fig. 17a y b). Estos datos indican que, en células troncales también se observó una dinámica diferencial similar a la que establecimos en preostoblastos, ya que ARID1A presenta su máxima expresión en G0 y disminuye a lo largo de síntesis de DNA hasta desaparecer en mitosis y ARID1B es relativamente constante a lo largo de la proliferación, aunque observamos que disminuye un poco en la mitosis.

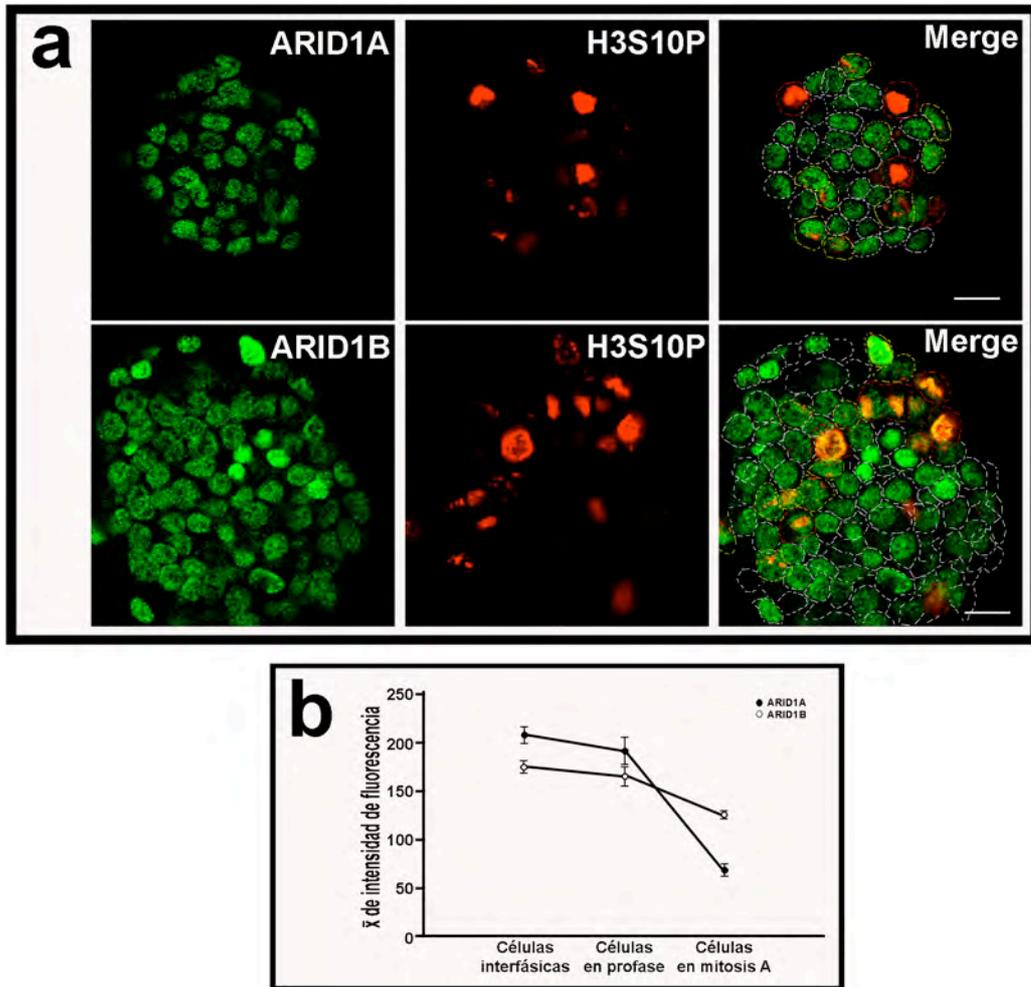


Fig. 17 Expresión de ARID1 durante la división celular. (a) Cortes ópticos de IF de ARID1A/ H3S10P o ARID1B/H3S10P, se delimitan los citoplasmas para diferenciar células individuales. (c) Cuantificación de la expresión de los ARID1 a lo largo de la mitosis. Se realizaron 3 experimentos independientes y se cuantificaron 40 núcleos como se describió en la sección de Material y Métodos. La escala representa 20 μ m. Imágenes de microscopía confocal, corte óptico de 1.5 μ m.

Para determinar la dinámica de los ARID1 durante la proliferación *in vivo*, realizamos ensayos de inmunofluorescencias para cada proteína en mórulas (2.5 dpc) y blastocistos (3.5 dpc), en paralelo con los marcadores de fases del ciclo celular (PCNA o H3S10P). Inicialmente observamos que ambas proteínas también se localizan en los núcleos de los blastómeros en los estadios analizados. ARID1A se expresa en todos los blastómeros que están en interfase tanto en mórula como en blastocisto (Fig. 18 y 19), Por otra parte, observamos que ARID1B inicia su expresión en el estadio de mórula temprana (8 células), probablemente como parte de la segunda ola de activación cigótica y parece que se va expresando en paralelo con la fosforilación de la Ser10 de la histona H3 (Fig. 20 y 21), sugiriendo que en el desarrollo preimplantación podría tener un papel durante la división celular. Adicionalmente en blastocisto observamos que tanto ARID1A como ARID1B se expresan en los distintos tipos celulares, es decir en células

pluripotentes (masa celular interna) y células diferenciadas (células del trofoblasto), para tratar de buscar diferencias de expresión de los ARID1 entre estos dos tipos celulares comparamos cualitativa y cuantitativamente la fluorescencia de ARID1A y ARID1B, sin embargo no observamos diferencias significativas entre la masa celular interna y trofoblasto (Datos no mostrados).

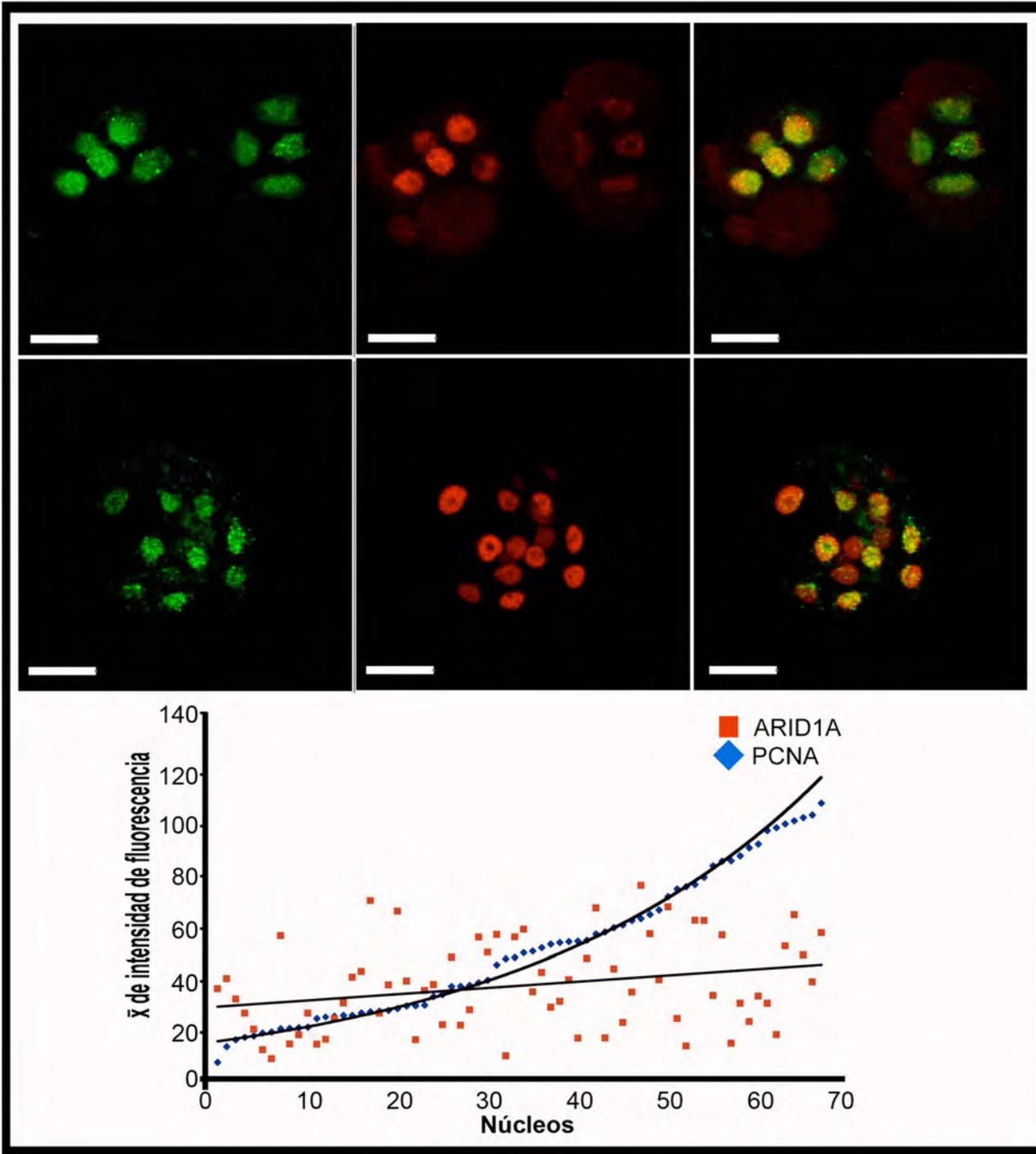


Fig. 18 Expresión de ARID1A durante la interfase *in vivo*. (a) Inmunofluorescencias de mórula (arriba) y blastocisto (abajo). ARID1A (VERDE), PCNA (ROJO) y la sobreposición de ambas señales, se observa que todos los núcleos son positivos para ambas proteínas. En la parte inferior se muestra la gráfica de cuantificación. En ambos estadios embrionarios se cuantificó la expresión de ARID1A durante la interfase. En ambos estadios embrionarios se cuantificó la expresión de PCNA durante la interfase. Se observó que no hay diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia entre los estadios embrionarios y en cada caso al menos 10 blastómeros.

núcleos con diferentes niveles de PCNA (Fig. 18), sugiriendo que en estos estadios embrionarios, ARID1A se expresa constantemente en la fase G1 y síntesis de DNA. Sin embargo las inmunofluorescencias con el marcador de la fase G2/M revelan que ARID1A disminuye en profase y desaparece en metafase (Fig.19)

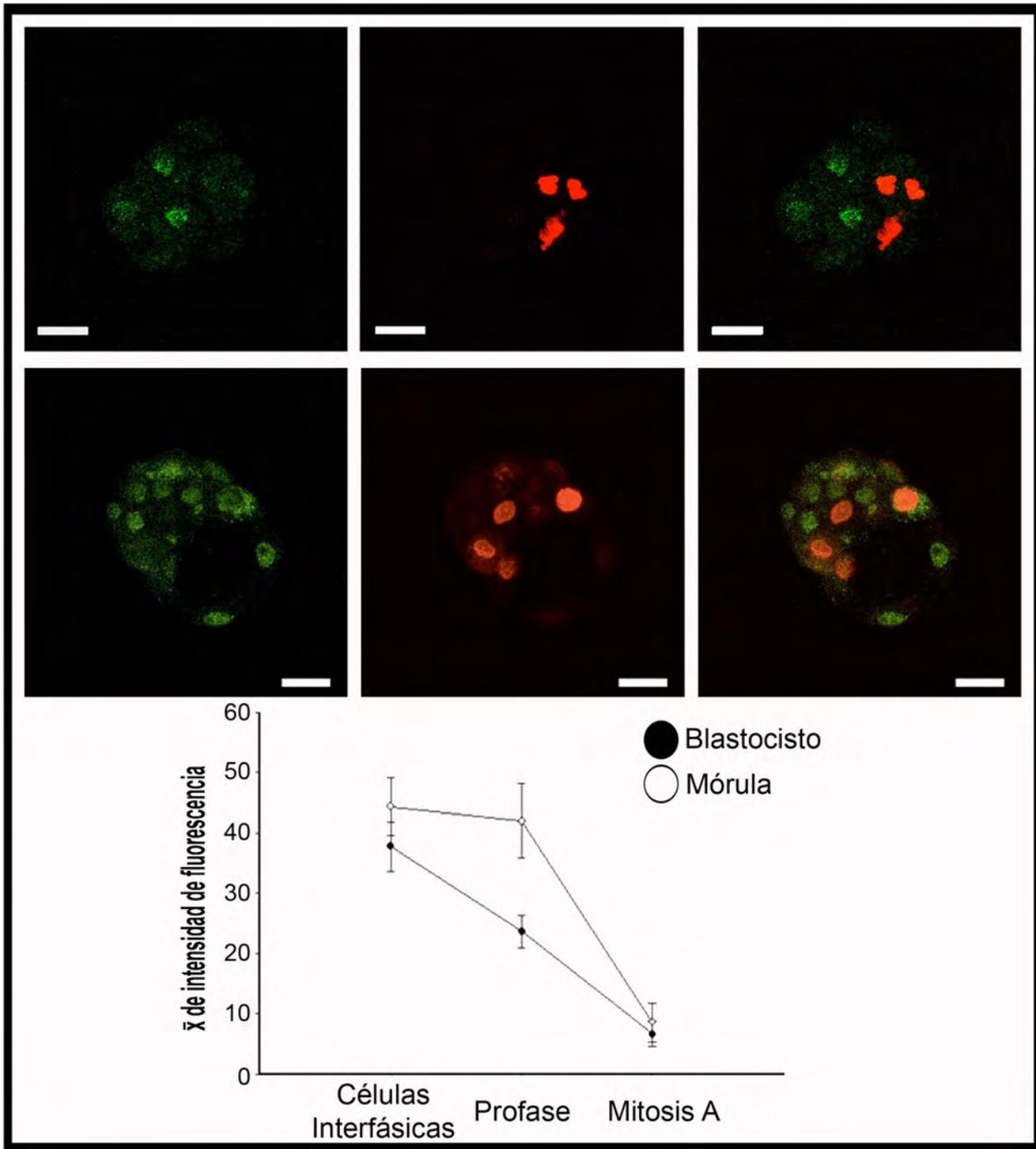


Fig. 19 Expresión de ARID1A durante la mitosis en embriones pre-implantación. Inmunofluorescencias para ARID1A (verde) y H3S10P (rojo) y sobreposición de las dos señales. Arriba – Mórulas; Abajo – Blastocisto. En la parte inferior se presenta la gráfica de la cuantificación de fluorescencia de ARID1A a lo largo de la mitosis. (Mitosis A) mitosis avanzada. Escala = 20 μ m. Cortes ópticos de microscopía confocal (1.5 μ m). Se cuantificaron tres experimentos independientes y en cada caso al menos 40 blastómeros.

Como se mencionó anteriormente, ARID1B inicia su expresión en el estadio de mórula, por tanto estos embriones presentan variaciones en el nivel de fluorescencia, por

tanto los descartamos para cuantificación, sin embargo cualitativamente observamos que todas las células en interfase, (aunque tengan diferente nivel de PCNA) tienen señal de ARID1B (Fig. 20). La cuantificación de núcleos de blastocisto también mostraron que la fluorescencia no varía significativamente (Fig. 20), corroborando que ARID1B se mantiene constante en la interfase en el desarrollo preimplantación. La detección de esta subunidad con el marcador de G2/M sugiere que en mórulas ARID1B inicia su expresión cuando se modifica la H3 por fosforilación; la cuantificación en blastocistos indica que su expresión no varía entre células no mitóticas y células en división celular (Fig. 20). Estos resultados sugieren que ARID1B inicia su expresión en el estadio de mórula y se mantiene constante durante la proliferación en ambos estadios embrionarios.

En blastocisto se observan dos tipos celulares: la masa celular interna (pluripotentes) y células de trofoblasto (diferenciadas). Comparamos los niveles de expresión de los ARID1 con la finalidad de detectar diferencias significativas en estos dos tipos celulares, sin embargo no logramos observar diferencias significativas, posiblemente por la resolución de estos ensayos (Fig. 15 y 16 arriba). Hasta el momento no se había reportado el inicio de expresión de ARID1B durante el desarrollo embrionario. Como parte de este proyecto determinamos que esta subunidad se localiza en núcleos de embriones de 8 células en la segunda ola de activación cigótica (Fig. 16 mórula abajo), a diferencia de ARID1A, que es heredada maternalmente (Gao et al. 2008). Este dato indica que podría haber diferencias funcionales durante el desarrollo pre-implantación. En conjunto resultados demuestran que *in vivo* también se presenta expresión diferencial de ARID1A y ARID1B durante la proliferación.

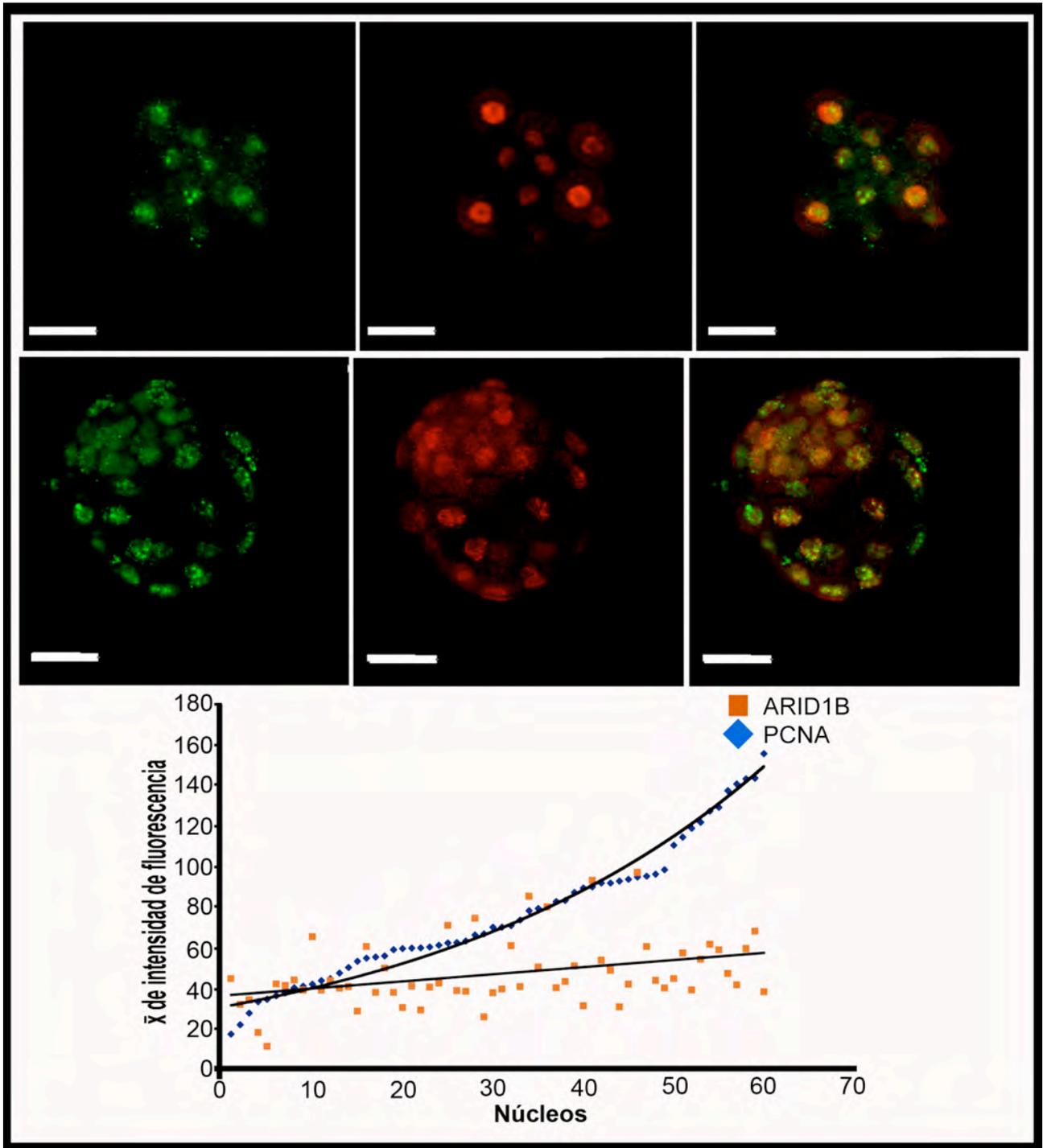


Fig. 20 Expresión de ARID1B durante la interfase *in vivo*. (a) Inmunofluorescencias de mórula (arriba) y blastocisto (abajo). ARID1B (VERDE), PCNA (ROJO) y la sobreposición de ambas señales, se observa que todos los núcleos son positivos para ambas proteínas. En la parte inferior se muestra la gráfica de cuantificación de núcleos individuales organizados por su nivel de expresión de PCNA (menor a mayor).. Escala = 20 μ m. Cortes ópticos de microscopía confocal (1.5 μ m). Se evaluaron tres experimentos independientes y en cada caso al menos 40 blastómeros.

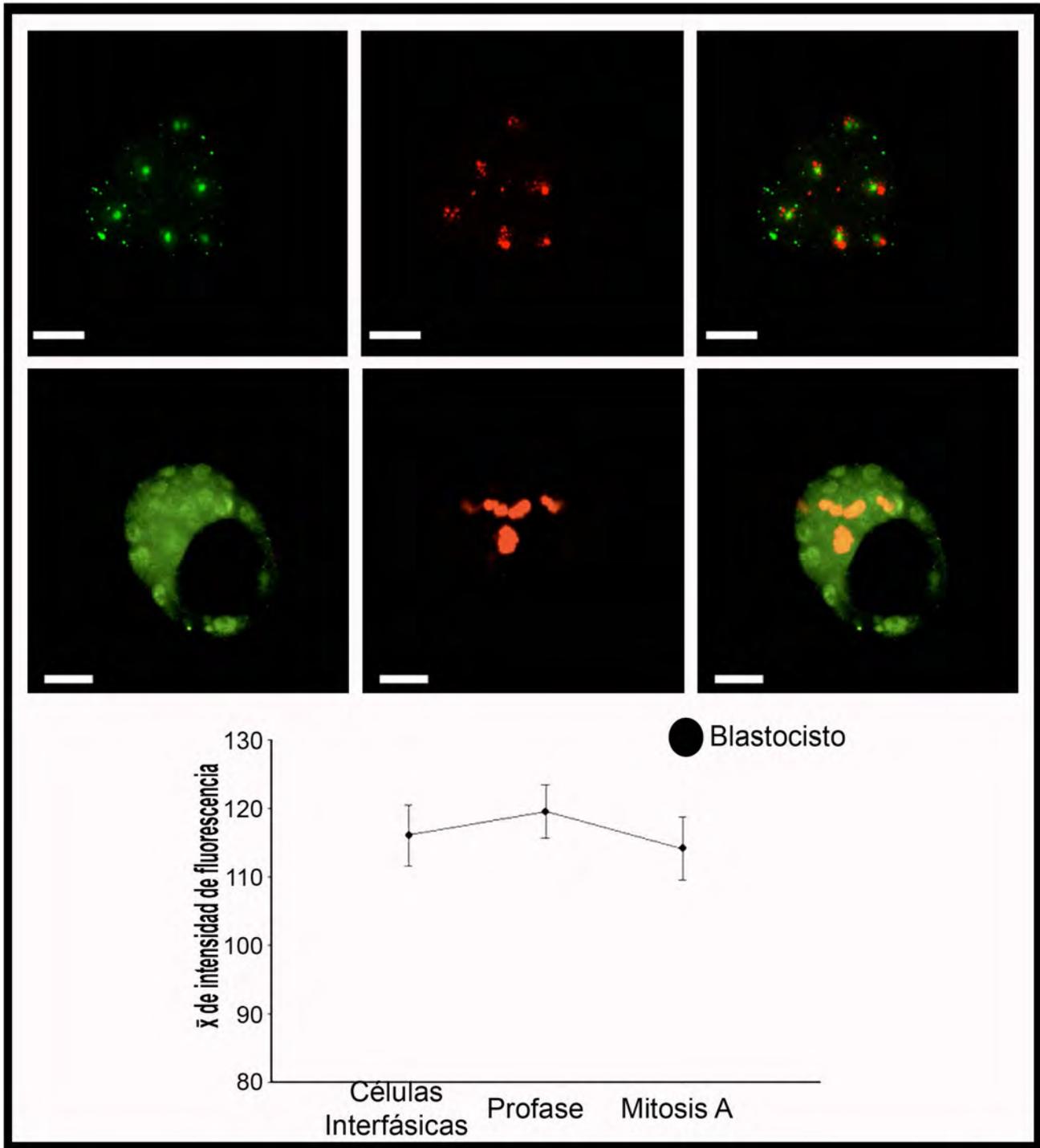


Fig. 21 Expresión de ARID1B durante la mitosis en embriones pre-implantación. Inmunofluorescencias para ARID1B (verde) y H3S10P (rojo) y sobreposición de las dos señales. Arriba – Mórulas; Abajo – Blastocisto. En la parte inferior se presenta la gráfica de la cuantificación de fluorescencia de ARID1B a lo largo de la mitosis en blastocisto. (Mitosis A) mitosis avanzada. Escala = 20 μ m. Cortes ópticos de microscopía confocal (1.5 μ m). Se cuantificaron tres experimentos independientes y en cada caso al menos 40 blastómeros.

Discusión

ARID1A y ARID1B son subunidades alternativas del complejo BAF y se ha sugerido que tienen funciones homólogas y antagónicas en diferentes procesos celulares (Hurlstone *et al.* 2002; Inoue *et al.* 2002; Nagl *et al.* 2007). Previamente comparamos el patrón de expresión de los RNAs mensajeros de estas subunidades durante el desarrollo embrionario, encontrando una expresión fuerte y generalizada de ARID1A, mientras que ARID1B presenta expresión más regionalizada y discreta. Esta localización diferencial durante la embriogénesis y el antagonismo funcional, nos permitió especular sobre su regulación funcional y su ensamble al complejo BAF a lo largo de la proliferación.

El análisis de ambas proteínas y el patrón de expresión previamente establecido, muestra que ARID1A tiene mayor expresión y localización generalizada con respecto a ARID1B, anteriormente se reportó que ambas subunidades tienen afinidad similar con la ATPasa (Wang *et al.* 2004), por tanto la presencia elevada de ARID1A sugiere que durante la embriogénesis, esta subunidad participa preferencialmente con el complejo BAF durante el desarrollo embrionario, mientras que la expresión menor y restringida de ARID1B indica que esta podría participar en regular procesos específicos durante el desarrollo embrionario. El análisis SDS-PAGE/WB evidenció una banda de peso molecular mayor de ambos productos proteicos, lo cual podría ser consecuencia de modificaciones post-traduccionales. Por lo anterior se evaluó el nivel de fosforilación en serinas y tirosinas, la sumoilación y la ubiquitinación para ARID1A, obteniendo resultados positivos para la ubiquitinación en células troncales pluripotentes, indicando que la banda de alto peso molecular podría ser consecuencia de esta modificación. Es interesante que la isoforma de migración lenta se expresa preferencialmente durante la embriogénesis, sugiriendo que ARID1A está modificada por ubiquitina a lo largo de la embriogénesis de ratón. Aunque el patrón de migración de ARID1B también es indicativo de modificaciones post-traduccionales en células troncales y embriones, no se corroboró experimentalmente debido a débil expresión de su proteína. Por lo anterior, una perspectiva que surge de este proyecto, es estudiar las modificaciones post-traduccionales de las subunidades ARID1 durante la embriogénesis, como alternativa para analizar la regulación de su actividad y ensamblaje al complejo BAF en el establecimiento de sus diferencias funcionales.

Aunque el análisis de fosforilaciones y sumoilaciones no fue concluyente, no se descarta que estas proteínas sean susceptibles a estas modificaciones, debido a que el análisis *in silico* sugiere la presencia de varios sitios consenso; una explicación de estos

resultados es las metodologías utilizadas no tengan la sensibilidad para detectarlas. Además se puede especular si estas modificaciones regulan la funcionalidad de los ARID1 en otros procesos celulares, como diferenciación tejido-específica y en la expresión transcripcional mediada por receptores nucleares de hormonas. Por lo tanto para abordar estas posibles modificaciones post-traduccionales, proponemos realizar ensayos de expresión transitoria de fragmentos de las proteínas, que incluyan sitios susceptibles a estas modificaciones fusionadas con banderas de marcaje como tag de histidinas o myc, de esta manera se podría aumentar la cantidad de producto purificado y por ende la sensibilidad del ensayo. Otra alternativa viable en la determinación de las fosforilaciones incluye el marcaje con isótopos radiactivos (^{32}P), es decir, realizar tratamientos con ATP marcado, realizar IPs contra los ARID1 y verificar si presenta señal del isótopo. Alternativamente se podría realizar secuenciación de péptidos marcados con el isótopo para determinar si los ARID1 presenta fosforilaciones (revisado en Steen et al. 2005), y otras metodologías que incluyen al mapeo peptídico, digestión y análisis por HPLC y espectrometría de masas, o la generación de construcciones con mutaciones puntuales en los posibles sitios de modificación pos-traduccionales y verificar su se altera patrón de migración con ensayos tipo western blot.

Por otra parte dado que ARID1A y ARID1B pudiera tener un papel antagónico durante la proliferación, establecimos la dinámica de expresión y localización de ambas proteínas durante distintas fases del ciclo celular en preosteoblastos de ratón, células embrionarias pluripotentes y embriones preimplantación. Los ensayos de inmunofluorescencia en preosteoblastos mostraron diferencias de expresión de ambas proteínas durante la proliferación, es decir, ARID1A se expresó de manera constante tanto en G0/G1 como en S y empieza a decrecer durante profase hasta desaparecer en mitosis, en cambio ARID1B se mantiene constante durante la proliferación. Es interesante destacar que tanto en células troncales como en embriones preimplantación donde el ciclo celular presenta principalmente síntesis de DNA y mitosis, la dinámica de localización diferencial de ambos ARID1 fue similar a las observaciones *in vitro*, lo que implica que dicha expresión diferencial podría tener relevancia durante la proliferación *in vivo*.

Los ensayos de western blot y qRT-PCR en células sincronizadas confirman que ARID1A disminuye su mRNA y presencia de proteína (se degrada) de interfase a mitosis. Por su parte, el transcrito de ARID1B disminuye de la fase G1 a síntesis de DNA y se mantiene estable en las otras fases; en cambio, el producto proteico no presentó variación

significativa a lo largo del ciclo celular. Estos datos indican que la disponibilidad de ARID1A durante la proliferación está limitada por la presencia del mRNA ya que su proteína presenta la misma cinética de desaparición. En el caso de ARID1B su transcrito se expresa fuertemente durante G1 y disminuye drásticamente durante la fase de síntesis y de mitosis, sin embargo la proteína se mantuvo estable durante la proliferación; esto sugiere que la presencia de las proteínas ARID1 durante el ciclo celular es consecuencia de distintos mecanismos, mientras que ARID1A es inestable y se degrada de la fase G1 hasta mitosis, potencialmente por ubiquitinación; en cambio la subunidad ARID1B es más estable a lo largo de la proliferación, sugiriendo que esta subunidad no es ubiquitinada y por tanto no se degrada tan fácilmente como su homólogo, adicionalmente, el *western blot* presenta ciertas diferencias con respecto a los resultados observados en la inmunofluorescencia: el inmunoblot sugiere que ARID1A decrece de G0/G1 a S y continúa degradándose en mitosis. En el caso de ARID1B no se observa un aumento significativo durante la síntesis de DNA como lo sugerían las inmunofluorescencias. Estas discrepancias podrían ser explicadas por los protocolos usados para la sincronización debido a que para las inmunofluorescencias se sincronizó por ausencia de suero y la fase de S fue estimulada reintroduciendo nutrientes, por tanto observamos la fase de síntesis en distintos momentos; en cambio las poblaciones ocupadas en el ensayo de inmunoblot, se sincronizaron con fármacos que detienen el ciclo celular en puntos específicos (hidroxyurea – fase S; colchicina – mitosis), por tanto las células están detenidas en un momento específico de cada fase y no se refleja la cinética de la proliferación que se observa con el protocolo sincronización y estimulación por ausencia/presencia de nutrientes, además que probablemente durante la fase S estamos detectando momentos distintos de la fase de Síntesis de DNA. Además las inmunofluorescencias en paralelo permiten distinguir células individuales en cada fase del ciclo celular, mientras que el inmunoblot es una cuantificación de poblaciones celulares enriquecidas en alguna fase de la proliferación, sin embargo no son totalmente puras, lo que puede generar variaciones en los resultados

Anteriormente se reportó que las subunidades catalíticas del complejo BAF, Brg1 y BRM se expresan diferencialmente durante la mitosis y son modificadas por fosforilación antes de entrar a la división celular (Muchardt *et al.* 1996). Haciendo la comparación con nuestros resultados, observamos que ARID1A presenta una cinética similar a la observada para BRM que es fosforilada y degradada durante la fase M; por otro lado, Brg1 también es fosforilada, sin embargo se mantiene constante durante toda la proliferación, como lo observamos para ARID1B. Adicionalmente se ha propuesto que la

asociación de ARID1A con BRM interviene en la represión de genes importantes para la progresión del ciclo celular, mientras que la asociación de ARID1B con Brg1, está involucrada en el mantenimiento de la expresión génica durante la proliferación (Kaesler et al. 2008).

Nuestros resultados de cinéticas diferenciales entre las proteínas ARID1, presentan correspondencia con la dinámica reportada para las ATPasas (Fig. 21), por lo que sugerimos un modelo de formación de complejos tipo BAF durante la proliferación; por una parte un complejo que reprime la transcripción para genes involucrados en la progresión del ciclo celular con la interacción de ARID1A y BRM que se ensambla y funciona durante G1, reprimiendo genes involucrados en distintas fases de la proliferación (como c-myc, ciclina A, ciclina E, etc.), sin embargo la disponibilidad de ARID1A se va limitando por que no se sigue transcribiendo su mRNA y posiblemente la proteína se va degradando vía ubiquitina, a lo largo de la fase de síntesis de DNA hasta desaparece al entrar en mitosis, donde BRM es fosforilado y degradado propiciando la disgregación del complejo represor. Por su parte ARID1B se transcribe solo durante G1, y su presencia durante todo el ciclo celular es similar a la de Brg1, sugiriendo que forma un complejo promotor de la proliferación, resistente a degradación ya que al parecer ambas proteínas son estables, por tanto mantener este complejo sería útil durante la activación de la transcripción de genes que promuevan la proliferación cuando el complejo represor se disocie de los genes reprimidos para promover en rápidamente su expresión y activación del ciclo celular.

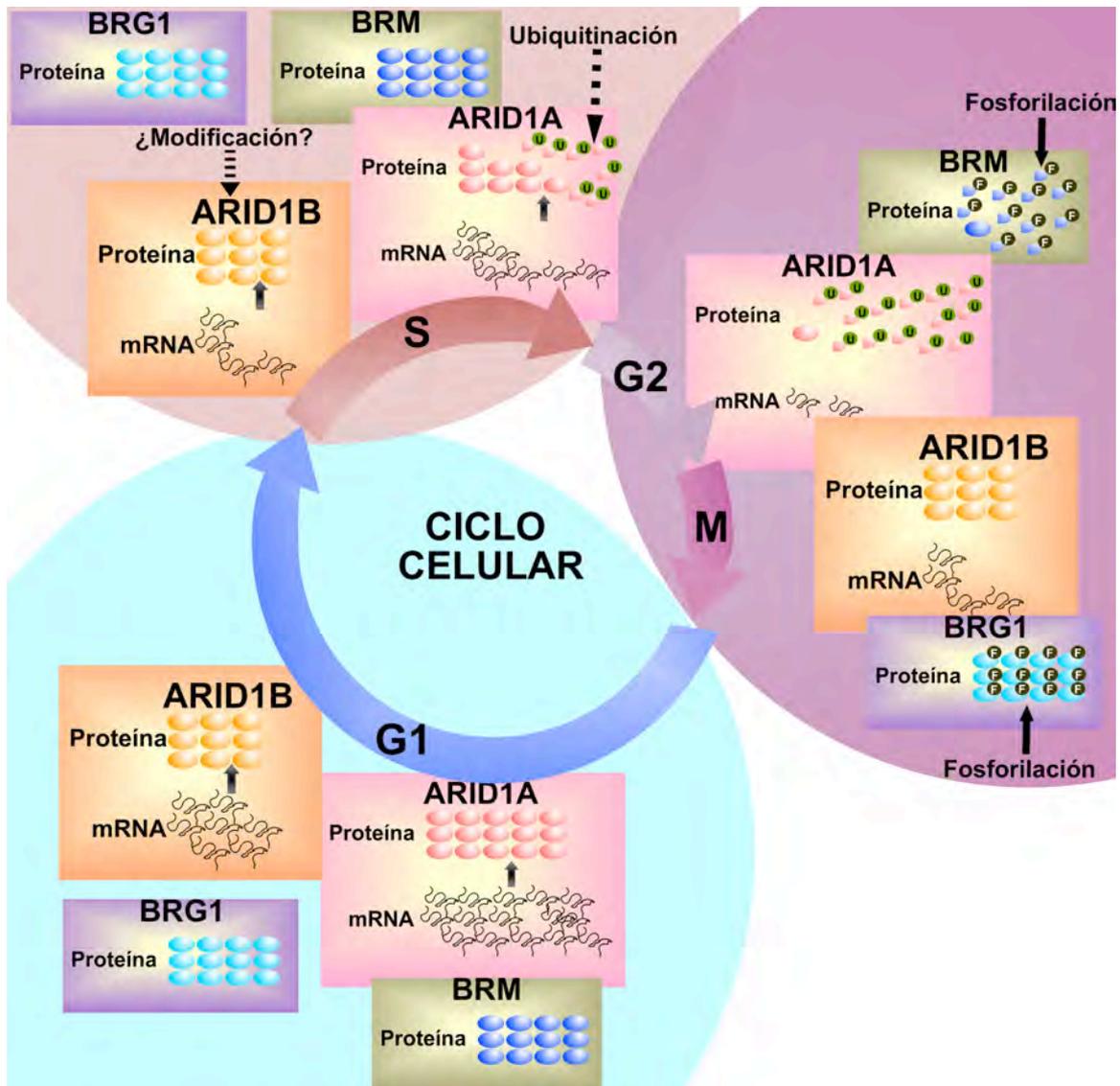


Fig. 22 Modelo de la expresión de los ARID1 durante el ciclo celular. Durante **G0/G1**: Ambas ARID1 presentan su mayor expresión tanto a nivel proteína como mRNA, aunque ARID1A (recuadro rosa) siempre en mayor proporción que ARID1B (recuadro naranja). Durante **la síntesis de DNA** ARID1A disminuye tanto en proteína como mRNA, por su parte ARID1B es constante a nivel de proteína aunque su mRNA disminuye. Durante **G2/M** ARID1A continua disminuyendo hasta desaparecer en metafase (proteína y mRNA). Por su parte aunque disminuye el mRNA de ARID1B, la cantidad de proteína permanece constante. Se sugiere que la ubiquitinación de ARID1A inicia a partir del inicio de la fase síntesis de DNA (Flecha discontinua). La cinética de los ARID1 es similar a las reportadas para las ATPasas por Muchard y col (1996), es decir, BRM (recuadro verde) es parecido a la dinámica de ARID1A a nivel de proteína y Brg1 (recuadro morado) empata lo observado para ARID1B, manteniéndose constantes durante el ciclo celular.

Para corroborar nuestro modelo proponemos realizar ensayos de co-inmunoprecipitación durante las fases del ciclo celular detectando ARID1A con BRM y

ARID1B con BRG1, para analizar si estas subunidades interactúan específicamente a lo largo del ciclo celular, que apoyaría la formación del complejo represor y del complejo activador. Alternativamente se podrían realizar ensayos de doble híbrido para identificar interacciones preferenciales entre alguna de las ATPasas y las subunidades ARID1.

Por otra parte para dilucidar si ARID1A se degrada a lo largo de la proliferación debido a ubiquitinación proponemos realizar ensayos de inhibición de la ubiquitinación con Bortezomib, que es un compuesto que inhibe dicha modificación (Xu et al. 2004), en células sincronizadas en los distintos momentos del ciclo celular y comparar los niveles proteicos en sincronizaciones con o sin los inhibidores. Otra estrategia involucra la generación de construcciones de ARID1A con el o los sitios de ubiquitinación modificados para evitar su modificación y cuantificar su expresión a lo largo del ciclo celular. Aunque probablemente la sobreexpresión e inhibición de la degradación de ARID1A, evite que las células transfectadas proliferen, debido a su papel en la detención del ciclo celular, lo que sugeriría que la degradación de la proteína es importante para que se inicie la proliferación.

También sería interesante analizar si ARID1B y Brg1 interactúan durante la división celular, puesto que ambos se encuentran presentes en el citoplasma pero no hay evidencia que durante este proceso haya interacción entre subunidades del complejo, por tanto sugerimos realizar ensayos de co-inmunoprecipitación ARID1B/Brg1

Otras líneas de investigación que quedaron por explorar, se refieren al establecimiento de modificaciones post-traduccionales de ARID1B tanto *in vitro* como durante la embriogénesis, debido a la débil expresión de la proteína, sin embargo se podría transfectar una construcción del mRNA fusionado con una bandera de marcaje (Tag histidinas o myc) en líneas celulares para aumentar la cantidad de proteína en el ensayo y poder inmunoprecipitar ARID1B con mayor eficiencia aumentándola sensibilidad del ensayo para detectar fosforilaciones o sumoilaciones. Por su parte esta misma estrategia de sobreexpresión *in vitro* se sugiere para ARID1A en la búsqueda de fosforilaciones y sumoilaciones, ya que no pudimos concluir de manera contundente si esta subunidad es susceptible a estas modificaciones.

Por su parte durante la embriogénesis se detectó en mayor proporción la banda de alto peso molecular de ARID1A, sugiriendo que esta presente el producto modificado, probablemente por ubiquitina como en células troncales, para analizar esta hipótesis, sugerimos realizar ensayos de inmunoprecipitación para proteínas ubiquitinadas y ARID1A en los estadios embrionarios 8.5 a 10.5 dpc y detectar por inmunoblot tanto

ARID1A como anti-ubiquitina, para ver si hay correspondencia como lo observamos en células troncales.

Aunque anteriormente se ha reportado que la presencia de las subunidades ARID1 está relacionado con su interacción con el complejo (Ryme et al 2009), no se ha reportado un estudio formal donde se haya establecido la relación de su presencia con su funcionalidad, nosotros sugerimos que su presencia es importante para que interaccionen y funcionen con el complejo BAF a lo largo del ciclo celular, por tanto para analizar dicha propuesta, sugerimos realizar ensayos de Transfección con construcciones que tengan los dominios funcionales alterados (ARID, C1 y C2), de tal manera que la proteína este disponible para ensamblarse al complejo pero funcionalmente inactiva, para explorar si estando presente pero inactiva sea suficiente para promover la progresión o detención del ciclo celular.

Conclusiones

1. Durante la embriogénesis de ratón ARID1A presentó mayor expresión que ARID1B.
2. Se sugiere la presencia de dos isoformas de peso molecular (240 kDa y 270 kDa) para ambas subunidades ARID1, tanto en células troncales de ratón como durante la embriogénesis.
3. ARID1A se expresa en mayor proporción en células troncales que durante la embriogénesis, por su parte ARID1B no varía significativamente entre células indiferenciadas y estadios embrionarios.
4. En nuestras condiciones no se observó la fosforilación (ni en residuos de Ser tyr) para ARID1A, por su parte esta subunidad parece ser ubiquitinada en células troncales de ratón, sugiriendo que su funcionalidad o disponibilidad es regulada por esta modificación postraducciona.
5. Las subunidades ARID1 presentaron una dinámica de expresión diferencial durante el ciclo celular tanto *in vitro* como *in vivo*. Es decir ARID1A se expresa fuertemente durante G1 y se degrada progresivamente hasta desaparecer en mitosis, en cambio ARID1B se mantiene estable durante las etapas de la proliferación.
6. Tanto el mRNA como la proteína de ARID1A fueron inestables durante la proliferación ya que presentaron cinéticas similares, sugiriendo que la disponibilidad de esta subunidad depende de su transcripción y el producto proteico es susceptible a degradación.
7. En el caso de ARID1B las dinámicas de expresión entre el mRNA y la proteína son distintas, es decir el transcrito se degrada, sin embargo la proteína se mantiene expresada, indicando que la presencia de ARID1B a lo largo de la proliferación depende la estabilidad de la proteína.
8. Esta dinámica diferencial entre ambas proteínas ARID1 sugiere que su disponibilidad durante las distintas fases de ciclo celular puede ser significativo para el ensamblaje y regulación de la función del complejo durante la progresión o arresto de ciclo celular.

Apéndice Soluciones

Cultivo

- PBS (Phosphate buffered saline)

Se hace una solución concentrada (10x) con los siguientes ingredientes

NaCl	20 g
KCl	0.5 g
Na ₂ HPO ₄	3.6 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g

Diluir en 15 ml de agua desionizada y ajustar el pH a 7.4 con HCl. Aforar a 200 ml.

Para realizar PBS 1x se diluye la solución 10x en agua.

- Tripsina

Se utilizó tripsina-EDTA al 0.25% por 1-2 minutos para disgregar cultivos de preosteoblastos, para las células troncales de ratón se trataron con tripsina por 7 minutos.

- Preparación de células alimentadoras para las células troncales de ratón (feeders)

Se cultivaron fibroblastos primarios de ratón en medio DMEM suplementado con 10% de FSB (D15), Glutamina 200mM, aminoácidos no esenciales 200mM, 100mM β - mercaptoetanol, 50 unidades/ml penicilina y 50 µg/ml streptomina (GIBCO; Sigma), hasta semiconfluencia, se trataron con mitomicina (10 µg/ml) por 3 horas para inhibir su proliferación y se lavaron 4 veces con PBS 1x, se disgregaron con tripsina 0.25% y se subcultivaron a una confluencia de 3.5×10^5 células por ml.

- Hidroxyurea

La solución stock es a 1 M se diluye en Agua milliQ y se esteriliza por filtración en campana. La concentración de trabajo es 1 µM/ml.

- Colchicina

Se hace una solución "stock" a una concentración de 60µg/ml en agua milliQ, esterilizar por filtración en campana. La concentración de trabajo es 0.06 µg/ml.

Purificación de proteínas

- TLB (Triton Lysis Buffer)

Se hace la solución con los componentes del Búfer y se almacena a 4°C. Los inhibidores de proteasas se agregan antes de extraer proteínas.

Componentes del Búfer	Inhibidores de proteasas
20mM Tris pH 7.4	1 mM PMSF
137mM NaCl	5 µg/ml Leupeptina
25mM β-glicerolphosphate pH 7.4	5 µg/ml Antipaina
2mM Pirofosfato de Sodio	5 µg/ml Aprotinina
EDTA pH 7.4	5 µg/ml Pestatina A
1% Triton X100	0.5 mM DTT
10% Glicerol	200 mM NaVO ₄
	100 mM NaCl

- N – etilmaleimida (NEM)

Se hace una solución stock a 0.5 M, es decir se disuelve 62.55 mg de NEM en 1 ml de etanol. Y se almacena a 4°C. La concentración de trabajo es 10 mM

Immunodetección en membrana

- LB 2x

Mezclar los componentes y hacer alícuotas. Se almacena a -20°C

Stock	Concentración final	Volumen a 10 ml
Tris 0.5M pH 6.8	62mM	2.48 ml
SDS 10%	4 %	4 ml
Glicerol	3 %	3 ml
β - mercaptoetanol	5 %	0.5 ml
Azul de bromofenol	0.1 %	0.01 g
Agua		4.95 ml

- SDS-PAGE

Archilamida/metilen Bis archilamida (10x)

Archilamida 30g
 Metilen bis archilamida 0.8g
 Agua desionizada 100ml
 Filtrar y guardar en oscuridad a 4°C.

Persulfato de amonio 10% (PSA)

Disolver 0.2 g en 2 ml de agua desionizada, guardar a 4°C.

<i>Buffer del gel inferior</i>		<i>Buffer del gel superior</i>	
Tris	18.17 g (1.5M)	Tris	6.06 g (0.5M)
SDS 10% (v/v)	4 ml (0.4%)	SDS 10% (v/v)	4 ml (0.4%)
Ajustar pH a 8.8 con HCl y aforar a 100 ml con agua desionizada		Ajustar pH a 6.8 con HCl y aforar a 100 ml con agua desionizada	

Buffer de corrida (10x)

Tris 15.15g
 Glicina 74.55g
 SDS 5g
 Agua desionizada 500ml
 Conductividad 1x1.1mS/cm; 10x7.5 mS/cm a temperatura ambiente. El pH debe ser 8.3 \pm 0.01. NOTA: No ajustar el pH

Buffer de transferencia húmeda

Tris 1.51g (25mM)
 Glicina 7.2g (192mM)
 Metanol 100ml (20%)
 Agua desionizada 500ml
 El pH debe ser 8.3. NOTA: No ajustar el pH

TBS

Solución stock a 10x

Tris 12.11 g (200mM)
 NaCl 43.83 g (1.5 M)
 Ajustar el pH a 7.5 y aforar a 100 ml. Con agua desionizada
 Diluir 10 veces para tener la solución 1x

TBS – T

A 500 ml de TBS 1x se agrega 250 μ l de Tween 20.

Gel de archilamida 7%

Gel Inferior		Gel Superior	
Buffer	3.37 ml	Buffer	1.5 ml
Sol. Archilamida	3.12 ml	Sol. Archilamida	0.6 ml
Agua	6.49 ml	Agua	3.9 ml
PSA 10%	50.5 µl	PSA 10%	22.5 µl
TEMED	17.8 µl	TEMED	7.5 µl

Inmunoprecipitación

- HEMK

Es el búfer HEMG20 con 0.1M KCL. Para 50 ml:

Concentración	Reactivo	Stock	Vol. Trabajo
25 mM	HEPES, pH 7.6	1 M	1.25 ml
0.1 M	KCl	1 M	5 ml
12.5 mM	MgCl ₂	0.5 M	1.25 ml
0.1 mM	EDTA	500 mM	10 µl
20% (v/v)	Glicerol	100%	10 ml

Agregar 32.49 ml de H₂O. Almacenar a 4°C. Al momento de trabajar, añadir inhibidores de proteasas (1 pastilla de Complete Mix por cada 50ml).

- Hidratación de la sefarosa

Hidratar dos veces con 500µL de PBS1x a 125 mg de Sef-ProtA/G (GE Healthcare Inc.) por 10 minutos en rotación a 4°C cada tratamiento, para quitar el liquido se centrifuga a 1000 rpm por 3 min después de cada hidratación. Posteriormente se hacen tres lavados con 500 ml de HEMK por 10 min a 4°C. En cada lavado se centrifuga a 1000 rpm por 3 min a 4°C para quitar el buffer. En seguida se bloquea con BSA 0.05% (en agua) a 4°C durante 2 hrs y se centrifuga a 1000rpm por 3 min a 4°C. Para quitar el BSA se realizan dos lavados con HEMK por 10 min cada uno, a partir de este momento la sefarosa esta lista para ensayos de IP.

Nota: Esta sefarosa hidratada se puede utilizar hasta por 1 mes.

Citometría de Flujo

- Buffer tinción

	Concentración trabajo	Volumen a 50 ml
Tris – HCl pH 7.4 (1M)	100mM	5 ml
NaCl (5M)	150mM	1.5 ml
CaCl ₂ (1M)	1mM	50 µl
MgCl ₂ (500mM)	0.5mM	50 µl
NP-40 (Igepal)	0.1% (v/v)	50 µl
Agua	-	48.35 ml

Bibliografía

1. Ahn J, Ko M, Lee C, Kim J, Yoon H and Seong RH (2010) Srg3, a mouse homolog of BAF155, is a novel p53 target and acts as a tumor suppressor by modulating p21(WAF1/CIP1) expression. *Oncogene* 30:445-456
2. Baig J, Chanut F, Kornberg TB and Klebes A (2010) The chromatin-remodeling protein Osa interacts with CyclinE in *Drosophila* eye imaginal discs. *Genetics* 184:731-744
3. Bravo R and Macdonald-Bravo H (1984) Induction of the nuclear protein 'cyclin' in quiescent mouse 3T3 cells stimulated by serum and growth factors. Correlation with DNA synthesis. *EMBO J* 3:3177-3181
4. Bravo R and Macdonald-Bravo H (1985) Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *EMBO J* 4:655-661
5. Bu L, Gao X, Jiang X, Chien KR, Wang Z. (2010) Targeted conditional gene knockout in human embryonic stem cells. *Cell Res* 20:379-382.
6. Bultman S, Gebuhr T, Yee D, La Mantia C, Nicholson J, Gilliam A, Randazzo F, Metzger D, Chambon P, Crabtree G and Magnuson T (2000) A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell* 6:1287-1295
7. Carrera I, Zavadil J and Treisman JE (2008) Two subunits specific to the PBAP chromatin remodeling complex have distinct and redundant functions during *drosophila* development. *Mol Cell Biol* 28:5238-5250
8. Cavalli, G. (2002). Chromatin as a eukaryotic template of genetic information. *Curr Opin Cell Biol* 14, 269-78
9. Chi TH, Wan M, Zhao K, Taniuchi I, Chen L, Littman DR and Crabtree GR (2002) Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes. *Nature* 418:195-199
10. Clarke S (1993) Protein methylation. *Curr Opin Cell Biol* 5:977-983
11. Collins RT, Furukawa T, Tanese N and Treisman JE (1999) Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. *EMBO J* 18:7029-7040
12. Dallas PB, Pacchione S, Wilsker D, Bowrin V, Kobayashi R and Moran E (2000) The human SWI-SNF complex protein p270 is an ARID family member with non-sequence-specific DNA binding activity. *Mol Cell Biol* 20:3137-3146
13. Dallas PB, Pacchione S, Wilsker D, Bowrin V, Kobayashi R and Moran E (2000) The human SWI-SNF complex protein p270 is an ARID family member with non-sequence-specific DNA binding activity. *Mol Cell Biol* 20:3137-3146
14. de la Serna IL, Carlson KA and Imbalzano AN (2001) Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat Genet* 27:187-190
15. Deuring R, Fanti L, Armstrong JA, Sarte M, Papoulas O, Prestel M, Daubresse G, Verardo M, Moseley SL, Berloco M, Tsukiyama T, Wu C, Pimpinelli S and Tamkun JW (2000) The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure *in vivo*. *Mol Cell* 5:355-365
16. Dunaief JL, Strober BE, Guha S, Khavari PA, Alin K, Luban J, Begemann M, Crabtree GR and Goff SP (1994) The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* 79:119-130
17. Flowers S, Nagl NG, Jr., Beck GR, Jr. and Moran E (2009) Antagonistic roles for BRM and BRG1 SWI/SNF complexes in differentiation. *J Biol Chem* 284:10067-10075
18. Gao X, Tate P, Hu P, Tjian R, Skarnes WC and Wang Z (2008) ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF chromatin remodeling component BAF250a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6656-6661
19. Gaspar-Maia A, Alajem A, Polesso F, Sridharan R, Mason MJ, Heidersbach A, Ramalho-Santos J, McManus MT, Plath K, Meshorer E and Ramalho-Santos M (2009) Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 460:863-868
20. Gregory CW, He B, Johnson RT, Ford OH, Mohler JL, French FS and Wilson EM (2001) A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res* 61:4315-4319
21. Grewal SI and Moazed D (2003) Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301:798-802
22. Guan B, Wang TL and Shih le M (2011) ARID1A, a Factor That Promotes Formation of

- SWI/SNF-Mediated Chromatin Remodeling, Is a Tumor Suppressor in Gynecologic Cancers. *Cancer Res* 71:6718-6727
23. Haas J, Palmer N, Weinberg A, Beckwith J (1981) Ultrastructure of malignant rhabdoid tumor of the kidney: A distinctive renal tumor of children. *Hum Pathol* 12:646 – 657.
 24. Hargreaves DC and Crabtree GR (2010) ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res* 21:396-420
 25. Ho L and Crabtree GR (2010) Chromatin remodelling during development. *Nature* 463:474-484
 26. Ho L, Jothi R, Ronan JL, Cui K, Zhao K and Crabtree GR (2009) An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is an essential component of the core pluripotency transcriptional network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:5187-5191
 27. Hochstrasser M (2009) Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* 458:422-429
 28. Huang X, Gao X, Diaz-Trelles R, Ruiz-Lozano P and Wang Z (2008) Coronary development is regulated by ATP-dependent SWI/SNF chromatin remodeling component BAF180. *Dev Biol* 319:258-266
 29. Hurlstone AF, Olave IA, Barker N, van Noort M and Clevers H (2002) Cloning and characterization of hELD/OXA1, a novel BRG1 interacting protein. *Biochem J* 364:255-264
 30. Inoue H, Furukawa T, Giannakopoulos S, Zhou S, King DS and Tanese N (2002) Largest subunits of the human SWI/SNF chromatin-remodeling complex promote transcriptional activation by steroid hormone receptors. *J Biol Chem* 277:41674-41685
 31. Iwahara J and Clubb RT (1999) Solution structure of the DNA binding domain from Dead ringer, a sequence-specific AT-rich interaction domain (ARID). *EMBO J* 18:6084-6094
 32. Iwahara J, Iwahara M, Daughdrill GW, Ford J and Clubb RT (2002) The structure of the Dead ringer-DNA complex reveals how AT-rich interaction domains (ARIDs) recognize DNA. *EMBO J* 21:1197-1209
 33. Jones S, Wang TL, Shih Ie M, Mao TL, Nakayama K, Roden R, Glas R, Slamon D, Diaz LA, Jr., Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE and Papadopoulos N (2010) Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* 330:228-231
 34. Kaeser MD, Aslanian A, Dong MQ, Yates JR, 3rd and Emerson BM (2008) BRD7, a novel PBAF-specific SWI/SNF subunit, is required for target gene activation and repression in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 283:32254-32263
 35. Kennison JA and Tamkun JW (1988) Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8136-8140
 36. Keppler BR and Archer TK (2010) Ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent control of subunit stoichiometry in the SWI/SNF complex. *J Biol Chem* 285:35665-35674
 37. Kim JK, Huh SO, Choi H, Lee KS, Shin D, Lee C, Nam JS, Kim H, Chung H, Lee HW, Park SD and Seong RH (2001) Srg3, a mouse homolog of yeast SWI3, is essential for early embryogenesis and involved in brain development. *Mol Cell Biol* 21:7787-7795
 38. Kim S, Zhang Z, Upchurch S, Isern N and Chen Y (2004) Structure and DNA-binding sites of the SWI1 AT-rich interaction domain (ARID) suggest determinants for sequence-specific DNA recognition. *J Biol Chem* 279:16670-16676
 39. Klochendler-Yeivin A, Picarsky E and Yaniv M (2006) Increased DNA damage sensitivity and apoptosis in cells lacking the Snf5/Ini1 subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Mol Cell Biol* 26:2661-2674
 40. Klochendler-Yeivin, A., Fiette, L., Barra, J., Muchardt, C., Babinet, C. and Yaniv, M. (2000). The murine SNF5/INI1 chromatin remodeling factor is essential for embryonic development and tumor suppression. *EMBO Rep* 1, 500-6.
 41. Kozmik Z, Machon O, Kralova J, Kreslova J, Paces J and Vlcek C (2001) Characterization of mammalian orthologues of the *Drosophila* *osa* gene: cDNA cloning, expression, chromosomal localization, and direct physical interaction with Brahma chromatin-remodeling complex. *Genomics* 73:140-148
 42. Krebs JE, Fry CJ, Samuels ML and Peterson CL (2000) Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell* 102:587-598
 43. Kubiak JZ, Chesnel F, Richard-Parpaillon L, Bazile F, Pascal A, Polanski Z, Sikora-Polaczek M, Maciejewska Z and Ciemerych MA (2008) Temporal regulation of the first mitosis in *Xenopus* and mouse embryos. *Mol Cell Endocrinol* 282:63-69
 44. Lee S, Cimica V, Ramachandra N, Zagzag D and Kalpana GV (2011) Aurora A is a repressed effector target of the chromatin remodeling protein INI1/hSNF5 required for rhabdoid tumor cell survival. *Cancer Res* 71:3225-3235
 45. LeGouy E, Thompson EM, Muchardt C and Renard JP (1998) Differential preimplantation regulation of two mouse homologues of the yeast SWI2 protein. *Dev Dyn* 212:38-48

46. Lessard J, Wu JI, Ranish JA, Wan M, Winslow MM, Staahl BT, Wu H, Aebersold R, Graef IA and Crabtree GR (2007) An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron* 55:201-215
47. Li X, Lee YK, Jeng JC, Yen Y, Schultz DC, Shih HM and Ann DK (2007) Role for KAP1 serine 824 phosphorylation and sumoylation/desumoylation switch in regulating KAP1-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem* 282:36177-36189
48. Li XS, Trojer P, Matsumura T, Treisman JE and Tanese N (2010) Mammalian SWI/SNF--a subunit BAF250/ARID1 is an E3 ubiquitin ligase that targets histone H2B. *Mol Cell Biol* 30:1673-1688
49. Lickert H, Takeuchi JK, Von Both I, Walls JR, McAuliffe F, Adamson SL, Henkelman RM, Wrana JL, Rossant J and Bruneau BG (2004) Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature* 432:107-112
50. Mahmoudi T and Verrijzer CP (2001) Chromatin silencing and activation by Polycomb and trithorax group proteins. *Oncogene* 20:3055-3066
51. Malumbres M and Barbacid M (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9:153-166
52. Mamo A, Cavallone L, Tuzmen S, Chabot C, Ferrario C, Hassan S, Edgren H, Kallioniemi O, Aleynikova O, Przybytkowski E, Malcolm K, Mousses S, Tonin PN and Basik M (2011) An integrated genomic approach identifies ARID1A as a candidate tumor-suppressor gene in breast cancer. *Oncogene*
53. Mohrmann L and Verrijzer CP (2005) Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta* 1681:59-73
54. Morrison AJ, Highland J, Krogan NJ, Arbel-Eden A, Greenblatt JF, Haber JE and Shen X (2004) INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* 119:767-775
55. Moshkin YM, Mohrmann L, van Ijcken WF and Verrijzer CP (2007) Functional differentiation of SWI/SNF remodelers in transcription and cell cycle control. *Mol Cell Biol* 27:651-661
56. Muchardt C and Yaniv M (1999) The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth. *Semin Cell Dev Biol* 10:189-195
57. Muchardt C, Reyes JC, Bourachot B, Leguoy E and Yaniv M (1996) The hbrm and BRG-1 proteins, components of the human SNF/SWI complex, are phosphorylated and excluded from the condensed chromosomes during mitosis. *EMBO J* 15:3394-3402
58. Murphy CG and Moynahan ME (2010) BRCA gene structure and function in tumor suppression: a repair-centric perspective. *Cancer J* 16:39-47
59. Nagl NG, Jr., Wang X, Patsialou A, Van Scoy M and Moran E (2007) Distinct mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes with opposing roles in cell-cycle control. *EMBO J* 26:752-763
60. Narlikar GJ, Fan HY and Kingston RE (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108:475-487
61. Nie Z, Xue Y, Yang D, Zhou S, Deroo BJ, Archer TK and Wang W (2000) A specificity and targeting subunit of a human SWI/SNF family-related chromatin-remodeling complex. *Mol Cell Biol* 20:8879-8888
62. Nie Z, Yan Z, Chen EH, Sechi S, Ling C, Zhou S, Xue Y, Yang D, Murray D, Kanakubo E, Cleary ML and Wang W (2003) Novel SWI/SNF chromatin-remodeling complexes contain a mixed-lineage leukemia chromosomal translocation partner. *Mol Cell Biol* 23:2942-2952
63. Oruetxebarria I, Venturini F, Kekarainen T, Houweling A, Zuijderduijn LM, Mohd-Sarip A, Vries RG, Hoeben RC and Verrijzer CP (2004) P16INK4a is required for hSNF5 chromatin remodeler-induced cellular senescence in malignant rhabdoid tumor cells. *J Biol Chem* 279:3807-3816
64. Pedersen TA, Kowenz-Leutz E, Leutz A and Nerlov C (2001) Cooperation between C/EBPalpha TBP/TFIIB and SWI/SNF recruiting domains is required for adipocyte differentiation. *Genes Dev* 15:3208-3216
65. Phelan ML, Sif S, Narlikar GJ and Kingston RE (1999) Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell* 3:247-253
66. Prigent C and Dimitrov S (2003) Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci* 116:3677-3685
67. Randazzo FM, Khavari P, Crabtree G, Tamkun J and Rossant J (1994) brg1: a putative murine homologue of the *Drosophila* brahma gene, a homeotic gene regulator. *Dev Biol* 161:229-242
68. Ray A, Mir SN, Wani G, Zhao Q, Battu A, Zhu Q, Wang QE and Wani AA (2009) Human SNF5/INI1, a component of the human SWI/SNF chromatin remodeling complex, promotes nucleotide excision repair by influencing ATM recruitment and downstream H2AX

- phosphorylation. *Mol Cell Biol* 29:6206-6219
69. Reyes JC, Barra J, Muchardt C, Camus A, Babinet C and Yaniv M (1998) Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2 α). *EMBO J* 17:6979-6991
 70. Rice JC and Allis CD (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* 13:263-273.
 71. Roberts CW and Orkin SH (2004) The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer* 4:133-142
 72. Roberts, C. W., Galusha, S. A., McMenamin, M. E., Fletcher, C. D. and Orkin, S. H. (2000). Haploinsufficiency of Snf5 (integrase interactor 1) predisposes to malignant rhabdoid tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13796-800.
 73. Ryme J, Asp P, Bohm S, Cavellan E and Farrants AK (2009) Variations in the composition of mammalian SWI/SNF chromatin remodelling complexes. *J Cell Biochem* 108:565-576
 74. Seo S, Richardson GA and Kroll KL (2005) The SWI/SNF chromatin remodeling protein Brg1 is required for vertebrate neurogenesis and mediates transactivation of Ngn and NeuroD. *Development* 132:105-115
 75. Seville LL, Shah N, Westwell AD and Chan WC (2005) Modulation of pRB/E2F functions in the regulation of cell cycle and in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 5:159-170
 76. Simon JA and Tamkun JW (2002) Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr Opin Genet Dev* 12:210-218
 77. Stopka T and Skoultchi AI (2003) The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14097-14102
 78. Takeuchi JK, Lickert H, Bisgrove BW, Sun X, Yamamoto M, Chawengsaksophak K, Hamada H, Yost HJ, Rossant J and Bruneau BG (2007) Baf60c is a nuclear Notch signaling component required for the establishment of left-right asymmetry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:846-851
 79. Tamkun JW, Deuring R, Scott MP, Kissinger M, Pattatucci AM, Kaufman TC and Kennison JA (1992) brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68:561-572
 80. Taylor WR and Stark GR (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20:1803-1815
 81. Treisman JE, Luk A, Rubin GM and Heberlein U (1997) eyelid antagonizes wingless signaling during Drosophila development and has homology to the Bright family of DNA-binding proteins. *Genes Dev* 11:1949-1962
 82. Trouche D, Le Chalony C, Muchardt C, Yaniv M and Kouzarides T (1997) RB and hbrm cooperate to repress the activation functions of E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11268-11273
 83. Tyson JJ and Novak B (2008) Temporal organization of the cell cycle. *Curr Biol* 18:R759-R768
 84. Vaissiere T, Sawan C and Herceg Z (2008) Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res* 659:40-48
 85. van Lohuizen M (1999) The trithorax-group and polycomb-group chromatin modifiers: implications for disease. *Curr Opin Genet Dev* 9:355-361
 86. Van Rechem C, Boulay G and Leprince D (2009) HIC1 interacts with a specific subunit of SWI/SNF complexes, ARID1A/BAF250A. *Biochem Biophys Res Commun* 385:586-590
 87. Vazquez M, Moore L and Kennison JA (1999) The trithorax group gene osa encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development* 126:733-742
 88. Wang X, Nagl NG, Wilsker D, Van Scoy M, Pacchione S, Yaciuk P, Dallas PB and Moran E (2004) Two related ARID family proteins are alternative subunits of human SWI/SNF complexes. *Biochem J* 383:319-325
 89. Wang Z, Zhai W, Richardson JA, Olson EN, Meneses JJ, Firpo MT, Kang C, Skarnes WC and Tjian R (2004) Polybromo protein BAF180 functions in mammalian cardiac chamber maturation. *Genes Dev* 18:3106-3116
 90. White J and Dalton S (2005) Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem Cell Rev* 1:131-138
 91. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, Senz J, McConechy MK, Anglesio MS, Kalloger SE, Yang W, Heravi-Moussavi A, Giuliany R, Chow C, Fee J, Zayed A, Prentice L, Melnyk N, Turashvili G, Delaney AD, Madore J, Yip S, McPherson AW, Ha G, Bell L, Fereday S, Tam A, Galletta L, Tonin PN, Provencher D, Miller D, Jones SJ, Moore RA, Morin GB, Oloumi A, Boyd N, Aparicio SA, Shih le M, Mes-Masson AM, Bowtell DD, Hirst M, Gilks B, Marra MA and Huntsman DG (2010) ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med* 363:1532-1543

92. Wu JI, Lessard J, Olave IA, Qiu Z, Ghosh A, Graef IA and Crabtree GR (2007) Regulation of dendritic development by neuron-specific chromatin remodeling complexes. *Neuron* 56:94-108
93. Xu Q, Farah M, Webster JM and Wojcikiewicz RJ (2004) Bortezomib rapidly suppresses ubiquitin thiolesterification to ubiquitin-conjugating enzymes and inhibits ubiquitination of histones and type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Mol Cancer Ther* 3:1263-1269
94. Yan Z, Cui K, Murray DM, Ling C, Xue Y, Gerstein A, Parsons R, Zhao K and Wang W (2005) PBAF chromatin-remodeling complex requires a novel specificity subunit, BAF200, to regulate expression of selective interferon-responsive genes. *Genes Dev* 19:1662-1667
95. Yan Z, Wang Z, Sharova L, Sharov AA, Ling C, Piao Y, Aiba K, Matoba R, Wang W and Ko MS (2008) BAF250B-associated SWI/SNF chromatin-remodeling complex is required to maintain undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 26:1155-1165
96. Yu EY, Steinberg-Neifach O, Dandjinou AT, Kang F, Morrison AJ, Shen X and Lue NF (2007) Regulation of telomere structure and functions by subunits of the INO80 chromatin remodeling complex. *Mol Cell Biol* 27:5639-5649
97. Zernicka-Goetz M, Morris SA and Bruce AW (2009) Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nat Rev Genet* 10:467-477
98. Zou J, Cochran R and Cheng L (2010) Double knockouts in human embryonic stem cells. *Cell Res* 20:250-252