

**Departamento de Genética
Facultad de Biología
Universidad de Sevilla**



**Departamento de Biología Molecular
Centro Andaluz de Biología Molecular y
Medicina Regenerativa**

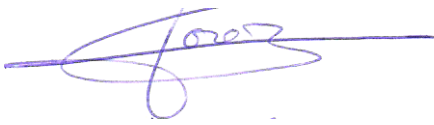


FUNCIÓN CITOPLÁSMICA DE LA PROTEÍNA SUPRESORA DE TUMORES hSNF5

**Trabajo presentado por la licenciada Tatiana Alfonso Pérez para optar
al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla**

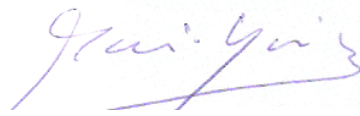
Sevilla, ENERO de 2014

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección de los doctores José Carlos Reyes Rosa y Mario García Domínguez y la tutela del doctor Andrés Aguilera López en el Departamento de Biología Molecular en el Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER)



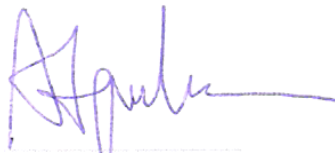
El Director de la Tesis

Dr. José Carlos Reyes Rosa



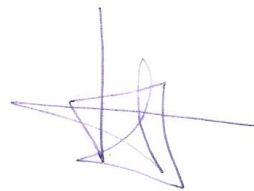
El Codirector de la Tesis:

Dr. Mario García Domínguez



El tutor de la Tesis:

Dr. Andrés Aguilera López



La Doctoranda:

Tatiana Alfonso Pérez

ABREVIATURAS.....	9
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	10
INTRODUCCIÓN.....	13
1. Cromatina y hSNF5	15
1.1 Estructura de la cromatina	15
1.2 Remodelado de la cromatina: el complejo SWI/SNF	16
1.3 Cáncer asociado al complejo SWI/SNF	19
1.4 hSNF5: origen y estructura	20
1.5 Tumores rabdoideas	22
1.6 Mecanismos de supresión tumoral mediados por hSNF5	25
2. Dinamina	29
2.1 Historia de la dinamina	29
2.2 Isoformas de dinamina en mamíferos	30
2.3 Estructura y ensamblaje de la dinamina	32
2.4 Actividad GTPasa y fisión de membrana	36
2.5 Dinamina, una proteína esencial para la endocitosis	38
2.5.1 Sistema de membranas intracelulares	38
2.5.2 Tipos de endocitosis	39
2.6 Dinamina y su relación con el citoesqueleto	42
2.7 Enfermedades asociadas a la ausencia de dinamina	43
OBJETIVOS.....	45
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
1. Organismos	51
2. Anticuerpos	52
3. Oligonucleótidos	53
4. Condiciones de cultivo	54
4.1 Condiciones de cultivo bacterianas	54
4.2 Condiciones de cultivo de levaduras	55
4.3 Condiciones de cultivo de líneas celulares animales	55

5. Manipulación y análisis de DNA	55
5.1 Aislamiento de DNA plasmídico bacteriano	55
5.2 Aislamiento de DNA plasmídico de levaduras	56
5.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	57
5.4 Purificación, cuantificación y secuenciación de DNA	57
5.5 Manipulación enzimática, digestión y ligación de fragmentos de DNA	57
5.6 Amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa	57
5.7 Transformación de bacterias	58
5.8 Transformación de levaduras	59
5.9 Transfección transitoria de líneas celulares animales	59
5.9.1 Fosfato Cálcico	59
5.9.2 Lipídico	60
6. Manipulación del RNA	60
6.1 Aislamiento y cuantificación del RNA de líneas celulares animales	60
6.2 Reacción de retrotranscripción a partir de RNA seguido de amplificación de cDNA mediante PCR	61
6.3 Transfección de RNA de interferencia	61
7. Síntesis, purificación y análisis de proteínas	62
7.1 Síntesis de proteínas recombinantes en <i>E.coli</i>	62
7.2 Obtención de extractos celulares de <i>E.coli</i>	63
7.3 Obtención de extractos proteicos de líneas celulares animales	63
7.4 Purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad	64
7.5 Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida y tinción de geles	65
7.6 Cuantificación de proteínas	67
7.7 Cromatografía de afinidad a pequeña escala “pull down”	67
7.8 Sistema de doble híbrido en levaduras	68
8. Métodos inmunológicos	69
8.1 Detección de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida mediante Western Blot	69
8.2 Inmunoprecipitación de proteínas	70
8.3 Inmunofluorescencia indirecta	71
8.4 Ensayo de ligación proximal	72

9. Técnicas de microscopía	74
9.1 Microscopía de fluorescencia y confocal	74
9.2 Ensayo de pérdida de fluorescencia en el fotoblanqueo	74
10. Otros Ensayos	77
10.1 Ensayo de endocitosis	77
10.2 Ensayo de actividad GTPasa	77
10.3 Ensayo de sedimentación	78
RESULTADOS.....	81
1. Estudio de la localización celular de hSNF5	83
1.1 Estudio de la localización celular de hSNF5	83
1.2 Estudio de la dinámica núcleo-citoplasma de hSNF5	88
1.3 Estudio de secuencias de exporte y de localización nuclear en hSNF5	93
2. Búsqueda de proteínas que interaccionen con hSNF5 en el citoplasma	97
2.1 Búsqueda de proteínas que interaccionen con hSNF5 mediante espectrometría de masas	97
2.2 Análisis de la interacción entre hSNF5/CAD y hSNF5/Calnexina	99
2.3 Búsqueda de proteínas que interaccionen con hSNF5 mediante escrutinio de doble híbrido	104
2.4 Análisis de los positivos obtenidos en el escrutinio de doble híbrido	104
3. Estudio molecular de la interacción entre hSNF5 y Dinamina2 (DNM2)	107
3.1 Análisis de los dominios esenciales en la interacción entre hSNF5 y DNM2	107
3.2 Estudio de la implicación de DNM2 en el exporte de hSNF5 al citoplasma	109
3.3 Estudio de la interacción entre hSNF5 y DNM2 mediante “pull down”	110
3.4 Estudio de la interacción entre hSNF5 y DNM2 mediante coinmunoprecipitación	111
3.5 Estudio de la interacción entre hSNF5 y DNM2 mediante ensayo de ligación proximal	112
3.6 Análisis de la colocalización entre hSNF5 y DNM2 en vesículas endocíticas	114
3.7 Estudio de la interacción entre hSNF5 y otras isoformas de DNM mediante coinmunoprecipitación	117

4. Análisis funcional de la interacción entre hSNF5 y DNM2	119
4.1 Estudio del silenciamiento de <i>hSNF5</i> sobre la endocitosis dependiente de DNM2	119
4.1.1 Efecto de la ausencia de hSNF5 sobre la endocitosis mediada por clatrina	119
4.1.2 Efecto de la ausencia de hSNF5 sobre la endocitosis basal de fluido	122
4.2 Análisis de la actividad GTPasa y ensamblaje de DNM2 en presencia de hSNF5	126
4.3 Análisis de los niveles proteicos de DNM2 en ausencia de hSNF5	129
5. Análisis de expresión génica en células HeLa silenciadas para hSNF5 y DNM2	132
DISCUSIÓN.....	135
1. hSNF5 es una proteína nuclear y citoplásmica	137
2. hSNF5 interacciona con proteínas en el citoplasma	140
2.1 hSNF5 interacciona con CAD	141
2.2 hSNF5 interacciona con MMS19, SLC25A5 y RPS3	143
2.3 hSNF5 interacciona con DNM	145
3. El silenciamiento de hSNF5 afecta negativamente a la endocitosis dependiente de DNM2	147
4. Posible implicación en cáncer de la desregulación–inestabilidad de DNM2 en ausencia de hSNF5	151
CONCLUSIONES.....	155
ANEXOS.....	159
BIBLIOGRAFÍA.....	161

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
bp	Pares de nucleótidos (bases)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis[β -aminoetil éter] N,N,N',N'tetraacético
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GST	Glutation S-transferasa
h	horas
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
mA	Miliamperio
min	Minuto
mM	Milimolar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Reacción de la retrotranscriptasa seguida de amplificación de cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa
TBE	Tampón Tris-borato/EDTA
TE	Tampón Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-metiletildiamina
Tritón X-100	t-Octilfenoxipolietoxietanol
Tween 20	Monolaurato de polioxietilensorbitano
V	Voltios
vol.	Volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. El complejo SWI/SNF

Tabla 2. Características genotípicas más importantes de las estirpes de *E. coli* utilizadas

Tabla 3. Características genotípicas más importantes de la estirpe de *S.cerevisiae* utilizada

Tabla 4. Características más importantes de las líneas celulares utilizadas

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados

Tabla 6. Anticuerpos secundarios utilizados

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados

Tabla 8. Cepas control utilizadas en el escrutinio de doble híbrido

Tabla 9. Análisis de los positivos obtenidos en el análisis de doble híbrido

Tabla 10. Genes comunes sobreexpresados tras silenciar *hSNF5* o *DNM2* en células HeLa

Tabla 11. Genes comunes cuya expresión disminuye tras silenciar *hSNF5* o *DNM2* en células HeLa

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Análisis de los dominios de hSNF5

Figura 2. Cinética de la distribución núcleo citoplasma de GFP-hSNF5 en células HeLa infectadas con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (HIV-1)

Figura 3. Mecanismos de supresión tumoral mediados por hSNF5

Figura 4. Vías implicadas en la actividad supresora tumoral del complejo SWI/SNF

Figura 5. Isoformas y variantes de splicing de dinamina en mamíferos

Figura 6. Estructura de la dinamina

Figura 7. Modelo del ciclo de la dinamina

Figura 8. Rutas endocíticas

Figura 9. Formación de vesículas recubiertas por clatrina

Figura 10. Representación del ensayo de ligación proximal (PLA)

Figura 11. Representación esquemática de la técnica de FLIP realizada en este estudio

Figura 12. Una fracción de hSNF5 está presente en el citoplasma

Figura 13. Inhibición de la expresión de *hSNF5*

Figura 14. Una fracción de GFP-hSNF5 localiza en el citoplasma de células HeLa

Figura 15. GFP-hSNF5 muestra una distribución núcleo/citoplasma (N/C) similar e independiente a la cantidad o expresión del vector pEGFP-C2-hSNF5 transfectado

Figura 16. GFP-hSNF5 es sintetizada en cantidades similares a la proteína endógena

Figura 17. Una fracción de la proteína endógena hSNF5 localiza en el citoplasma

Figura 18. GFP-hSNF5 migra del núcleo al citoplasma

Figura 19. Análisis de secuencias de exporte nuclear (NES) teóricas en hSNF5

Figura 20. Identificación de putativas secuencias de localización nuclear (NLS) en la región aminoterminal de hSNF5

Figura 21. Identificación de proteínas que interactúan con hSNF5 en el citoplasma mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Figura 22. hSNF5 y CAD interactúan *in vivo* a través del dominio CPSII de CAD en ensayos de coimmunoprecipitación

Figura 23. hSNF5 interactúa con CNX, pero no con CAD, *in situ* mediante ensayo de ligación proximal (PLA).

Figura 24. Interacción entre hSNF5 y los positivos encontrados en el escrutinio mediante ensayo de doble híbrido

Figura 25. Mapeo de la interacción entre hSNF5 y Dnm2 mediante ensayo de doble híbrido

Figura 26. DNM2 etiquetada con un epítipo Flag (F) y una Secuencia de Localización Nuclear (NLS) provoca redistribución de Ha-hSNF5 y colocaliza con ella en estructuras nucleares punteadas

Figura 27. GTS-hSNF5 interactúa directamente con His-DNM2 en presencia de GDP o GTP γ S mediante ensayo de “pull down”.

Figura 28. Flag-hSNF5 (F-hSNF5) y Ha-Dinamina2 (Ha-DNM2) interactúan *in vivo* en ensayos de coimmunoprecipitación

Figura 29. El ensayo de ligación proximal (PLA) *in situ* revela interacción entre las proteínas hSNF5 y DNM2 en células HeLa

Figura 30. GFP-hSNF5 y Ha-DNM2 colocalizan en vesículas endocíticas en células COS7

Figura 31. Expresión de *GFP-hSNF5* y *Ha-DNM2* en células COS7

Figura 32. DSRed-5 interactúa con GFP-DNM1, GFP-DNM2 y GFP-DNM3 *in vivo* mediante ensayos de coimmunoprecipitación

Figura 33. Inhibir la expresión de *hSNF5*, pero no de *hBRM* y/o *BRG1*, mediante RNA de interferencia (siRNA) provoca una disminución de la EMC en células HeLa

Figura 34. Inhibir la expresión de *hSNF5* mediante RNA de interferencia (siRNA) provoca una disminución de la CME en células RPE1

Figura 35. Inhibir la expresión de *hSNF5* mediante otro RNA de interferencia (siRNA) y un short hairping RNA (shRNA), provoca una disminución de la CME en células HeLa

Figura 36. Inhibir la expresión de *hSNF5* provoca una disminución de la endocitosis basal de fluidos en células HeLa

Figura 37. hSNF5 inhibe la actividad GTPasa de DNM2 ensamblada

Figura 38. GST-hSNF5 no afecta el ensamblaje de His-DNM2 aunque el ensamblaje de His-DNM2 puede favorecer la precipitación de GST-hSNF5

Figura 39. El silenciamiento de *hSNF5* o *DNM2* mediante RNA de interferencia (siRNA) no afecta a los niveles de RNA mensajero (% RNAm) de *DNM2* o *hSNF5*, respectivamente

Figura 40. La inhibición de la expresión de *hSNF5*, pero no la de *hBRM* y/o *BRG1*, mediante RNA de interferencia (siRNA) provoca un descenso de los niveles de DNM2

Figura 41. La inhibición de la expresión de *DNM2* provoca un descenso de los niveles citoplásmicos de hSNF5

Figura 42. Número de genes desregulados en células HeLa silenciadas para *DNM2* o *hSNF5*

Figura 43. Nivel de expresión de los 17 genes más desregulados tras silenciar *hSNF5* en células HeLa durante 72 h

Figura 44. Clasificación de los genes comunes desregulados tras silenciar *hSNF5* o *DNM2* en categorías funcionales

Figura 45. Representación esquemática de las interacciones entre hSNF5 y otras proteínas

Figura 46. Modelo de actuación de la dinamina durante la endocitosis en dos pasos

INTRODUCCIÓN

1. CROMATINA Y hSNF5

1.1 Estructura de la cromatina

Dentro del núcleo celular eucariótico el DNA se encuentra empaquetado en una estructura altamente organizada y dinámica denominada cromatina. La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma (Kornberg, 1974), formado por un octámero de histonas, constituido por dos subunidades de cada una de las cuatro histonas nucleosómicas H2A, H2B, H3 y H4, y alrededor del cual se enrollan 147 pb de DNA en forma de superhélice levógira (Luger et al., 1997; Richmond et al., 1984). Las histonas son pequeñas proteínas básicas que se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución. Cada una de ellas presenta una región amino terminal desestructurada denominada cola amino terminal y un dominio central que presenta un plegamiento globular característico. En el caso de las histonas H2A y H2B, tras el dominio globular aparece otra cola corta desestructurada que se denomina cola carboxilo terminal. Ambas colas se proyectan hacia el exterior de los nucleosomas, proporcionando estabilidad y mediando la interacción con otras proteínas o con los nucleosomas adyacentes (Luger et al., 1997; Arents y Moudrianakis, 1995). Los nucleosomas se encuentran separados entre sí por un fragmento de DNA denominado DNA espaciador al que se une un quinto tipo de histona, denominada histona H1, en el punto de entrada y salida del DNA.

El primer nivel de compactación post-nucleosomal lo constituye la fibra de 11 nm de diámetro o “collar de cuentas” (Olins y Olins, 1974; Finch y Klug, 1976). A partir de este nivel de condensación se producen órdenes de compactación superiores desde la fibra de 30 nm de diámetro (Tremethick, 2007; Grigoryev y Woodcock, 2012), hasta alcanzar el estado de cromosoma metafásico (Nishino et al., 2012). Sin embargo, tras 30 años de investigación, aún no se conoce con exactitud la configuración exacta de estas estructuras de mayor orden (Pepenella et al., 2013; Adkins et al., 2004; Smith y Peterson, 2005). Dentro del núcleo eucariótico la cromatina puede presentarse en dos estados fundamentales, eucromatina y heterocromatina, según el grado de compactación, funcionalidad y bioquímica (Adkins et al., 2004).

1.2 Remodelado de la cromatina: el complejo SWI/SNF

El elevado grado de condensación presentado por la cromatina representa un obstáculo para la transcripción, la replicación, la recombinación y la reparación. Sin embargo, la cromatina es una estructura altamente dinámica pues mediante su remodelado múltiples procesos bioquímicos modifican su estructura provocando un cambio en la accesibilidad de las maquinarias enzimáticas implicadas en el metabolismo del DNA (Aalfs y Kingson, 2000; Loidl, 2001).

Se han propuesto tres mecanismos que cooperan en la célula regulando la estructura de la cromatina. El primero, conlleva el intercambio de las histonas canónicas por otras variantes histónicas que llevarían a cabo funciones especializadas (Vardabasso et al., 2013; Chen et al., 2013). El segundo, implica modificaciones covalentes de los residuos de las colas de las histonas que actuarían a modo de código permitiendo el reclutamiento de ciertas proteínas a la cromatina, (Jenuwein y Allis, 2001; Kouzarides, 2007; Arnaudo y Garcia, 2013). El tercero, modifica la disposición y estructura de los nucleosomas mediante complejos que remodelan la cromatina utilizando para ello la energía obtenida a partir de la hidrólisis del ATP (Wilson y Roberts, 2011; Hargreaves y Crabtree, 2011).

Los complejos remodeladores de cromatina son complejos multiproteicos que utilizan la energía procedente de la hidrólisis del ATP para desestabilizar las interacciones entre el DNA y el octámero de histonas (Fan et al., 2003; Saha et al., 2006; Wilson y Roberts, 2011; Hargreaves y Crabtree, 2011). Pese a su diversidad estructural y funcional, todos albergan como subunidad catalítica una ATPasa dependiente de DNA de la familia SNF2, perteneciente a la superfamilia II de helicasas (Eisen et al., 1995; Singleton y Wigley, 2002). El resto de subunidades de las que se componen median su interacción con la cromatina, regulan la actividad catalítica de las subunidades ATPasas, o bien están implicadas en otras funciones más especializadas, como la interacción con otras proteínas remodeladoras o factores de transcripción. En algunos casos participan en la interacción con la matriz nuclear, así como en el ensamblaje y estabilización de los complejos (Hogan y Varga-Weisz, 2007).

El complejo SWI/SNF fue descubierto por dos grupos de manera independiente, a raíz de un conjunto de mutaciones que afectaban a la expresión de los genes *SUC2* y *HO* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*). El gen *SUC2* codifica una invertasa necesaria para que la levadura utilice la sacarosa como fuente de carbono (Neigeborn y Carlson, 1984; Abrams et al. 1986) mientras que el gen *HO* codifica una endonucleasa necesaria para el cambio de sexo (“switching”) de este organismo (Egel et al., 1984). Por este motivo, a estos genes se les denominó *SWI* (“switch deficient”) y *SNF* (“sucrose non-fermenting”), respectivamente. Análisis posteriores revelaron que varios de los genes hallados en cada uno de los anteriores estudios codificaban proteínas que formaban parte de un mismo complejo multiprotéico (Abrams et al., 1986). Estudios bioquímicos y genéticos demostraron que este complejo afectaba a la transcripción de numerosos genes provocando cambios en la estructura nucleosomal de la cromatina (Hirschhorn et al., 1992; Cairns et al., 1994; Cote et al., 1994; Peterson et al., 1994). El descubrimiento de este complejo llevó a la identificación posterior de otros, involucrados también en la remodelación de la cromatina.

Actualmente estos complejos remodeladores dependientes de ATP pueden agruparse en cinco familias en base a la composición de subunidades y su actividad bioquímica: SWI/SNF, ISWI, INO80, SWR1 y NURD/Mi2/CHD. La familia SWI/SNF se encuentra conservada evolutivamente desde levaduras hasta humanos (Tabla 1) (Hargreaves y Crabtree, 2011). Todos estos complejos multiprotéicos presentan una estructura similar compuesta por una subunidad ATPasa catalítica, un núcleo formado por proteínas altamente conservadas, y un número variable de subunidades accesorias que podrían mediar el ensamblaje de dicho complejo, su interacción con otras proteínas y su especificidad funcional.

En levaduras, dos complejos remodeladores conforman la familia SWI/SNF, el complejo SWI/SNF (denominado ySWI/SNF) y el complejo RSC (“Remodel the Structure of Chromatin”). Además de la subunidad ATPasa (Swi2/Snf2), el núcleo funcional del complejo ySWI/SNF está formado por dos subunidades conservadas, Swi3 y Snf5 (Phelan et al., 1999; Smith et al., 2003). El complejo RSC contiene una subunidad ATPasa paróloga a Swi2/Snf2 denominada Sth1, dos subunidades idénticas al complejo ySWI/SNF, Arp7 y Arp9 (“Actin related proteins”), y varias subunidades homólogas (Cairns et al., 1996). Estudios genéticos indican que ambos complejos

implicados en regulación génica, desempeñan funciones especializadas no redundantes (Hargreaves y Crabtree, 2011).

En mamíferos, BRG1 (“Brahma Related Gene 1”) o hBRM (“human Brahma”) constituyen la subunidad ATPasa del complejo BAF (“BRG1/hBRM Associated Factor”), que junto con las proteínas SNF5, BAF155 y BAF170 forman el núcleo de complejo y las proteínas BAF53, BAF57, BAF180, entre otras, constituyen las subunidades accesorias. Recientemente se han identificado nuevas subunidades de este complejo (Bcl7a, b, c, Bcl11a, b, Brd9 y SS18 (Kadoch et al., 2013). Los complejos remodeladores de la familia SWI/SNF de mamíferos y moscas han perdido y ganado subunidades en respuesta a cambios en la regulación epigenética que acompañan a la multicelularidad. Aunque quizás lo más significativo resida en la expansión de las familias génicas que codifican subunidades homólogas en BAF, frente al monomórfico complejo ySWI/SNF (Tabla 1).

Tabla 1. El complejo SWI/SNF

LEVADURA		MOSCA	HUMANO
ySWI/SNF	RSC	BAP	BAF
Swi2/Snf2*	Sth1*	BRM*	BRG1/SMARCA4* o hBRM/SMARCA2*
---	---	OSA/eyelid o BAF170	BAF250a/ARID1A o BAF250b/ARID1B o BAF200/ARID2**
---	Rsc1,2,4	Polibromo	BAF180**
Swi3	Rsc8	MOR/BAP155	BAF155/SMARCC1 y/o BAF170/SMARCC2
Swp73	Rsc6	BAP60	BAP60a/SMARCD1 o BAP60b/SMARCD2 o BAP60c/SMARCD3
	Arp7,9	BAF55 o BAP47	BAF53a o b
Snf5	Sfh1	SNR1/BAP45	BAF47/hSNF5/SMARCB1/INI1
---	---	SYAP	BAF45a,b,c o d
---	---	BAP111/dalao	BAF57/SMARCE1
---	---	β-Actina	
Swi1/Ard6, Swp82, Taf14, Snf6, Snf1	Rsc3,5,7,9,10,30, Htl1, Lbd7, Rtt102	---	Brd7**,9

Se muestran los complejos de la familia SWI/SNF en levadura, mosca y humano. Las subunidades homólogas se agrupan horizontalmente. Las diferentes nomenclaturas se encuentran separadas por barras oblicuas (/). BAF es utilizado para factores asociados a BRG1/BRM en mamíferos. SMARC (“SWI/SNF Related, Actin containing, Regulators of Chromatin”). *subunidad ATPasa. **ARID2, BAF180, y Brd7 son subunidades propuestas del complejo PBAF. Modificado de Hargreaves y Crabtree, 2011.

Mientras el complejo SWI/SNF en levaduras se une casi exclusivamente a promotores desplazando nucleosomas con su consecuente activación, los complejos BAF se encuentran generalmente en promotores y “enhancers” activando o reprimiendo genes. Además estos complejos son polimórficos, gracias al ensamblaje combinatorio de las isoformas de cada subunidad del complejo, por lo que poseen mayor diversidad funcional. Hasta la fecha, este mecanismo ha sido encontrado únicamente en vertebrados, posiblemente reflejando el incremento del número de genes efectivos o patrones de regulación génica durante el desarrollo.

1.3 Cáncer asociado al complejo SWI/SNF

En mamíferos, el complejo SWI/SNF representa una conexión entre el remodelado de la cromatina y la supresión tumoral. Estudios recientes han revelado que sorprendentemente, el 19,6 % de los tumores encontrados en humanos presentan mutaciones en subunidades de este complejo (Kadoch et al., 2013). La primera subunidad de un complejo remodelador de la cromatina, implicada en el inicio y el desarrollo de tumores fue hSNF5 (Versteeg et al., 1998). Inactivaciones bialélicas en este gen dan lugar a tumores extremadamente agresivos denominados tumores rabdoides, además de originar otro tipo de tumores. Sin embargo, hSNF5 no es la única subunidad del complejo involucrada en cáncer (Romero y Sánchez-Céspedes, 2013; Kadoch et al., 2013). BRG1 se encuentra mutado sobre todo en melanomas, meduloblastomas, cáncer de pulmón, ovárico, colorectal y pancreático (Medina et al., 2004; Blanco et al., 2009; Rodriguez-Nieto et al., 2011; Kadoch et al., 2013). hBRM, sobre todo en cáncer colorectal y de pulmón. Mutaciones en el gen *ARID1A* se han identificado en un gran número de carcinomas de ovario, gástricos, hepatocelulares, de vesícula biliar o melanomas. También se han descrito mutaciones en el gen que codifica la subunidad BAF180 en numerosos carcinomas renales.

1.4 hSNF5: origen y estructura

Los primeros indicios de la existencia de SNF5 datan de 1984. Su identificación a raíz de un conjunto de mutaciones en la levadura *S.cerevisiae* incapaces de fermentar la sacarosa llevó a darle el nombre de *SNF5* (“Sucrose Non-Fermenting gene number 5”) (Neugeborn y Carlson, 1984). Análisis genéticos posteriores revelaron que *SNF5* y otros cuatro genes requeridos para la fermentación de la sacarosa (genes *SNF*) o involucrados en el cambio de sexo (genes *SWI*) mostraron un comportamiento similar cuando fueron mutados o delecionados (Winston y Carlson, 1992; Carlson y Lauren, 1994). Este hecho permitió formular una hipótesis en la que los productos de estos genes formaban un complejo multiprotéico, el complejo SWI/SNF (apartado 1.2) (Cairns et al., 1994; Peterson et al., 1994) involucrado en reestructurar la cromatina (Kruger y Herskowitz, 1991; Hirschhorn et al., 1992; Kruger et al., 1995). Su ortólogo humano, INI1 (“Integrase Interactor 1”), fue originalmente identificado por dos grupos. Uno, lo clonó como homólogo a la proteína SNF5 descubierta en levaduras (Muchardt et al., 1995) mientras que el otro grupo la identificó gracias a su interacción con la INtegrasa (IN) del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (HIV-1) en un ensayo de doble híbrido (Kalpana et al., 1994). Tras su identificación como componente del complejo BAF, se le atribuyó el nombre de BAF47 debido a su peso molecular (Wang et al., 1996). Posteriormente, el comité de nomenclatura genética le confirió el nombre de SMARCB1 (“SWI/SNF related, Matrix associated, Actin dependent Regulator of Chromatin, subfamily B, member 1”). En esta tesis se utilizará el nombre de hSNF5.

hSNF5 presenta un elevado grado de conservación en todas las variantes de la familia SWI/SNF (Tabla 1, página 18). Se cree que la función de hSNF5 en el complejo reside en mediar el reclutamiento del mismo a sitios específicos gracias a su capacidad para interactuar con otras proteínas. El gen *hSNF5*, compuesto por 9 exones, codifica una proteína de 385 aminoácidos, aunque se han identificado varias isoformas. El análisis de la estructura de la proteína (Figura 1) muestra la existencia de un posible dominio de cremallera de leucinas en el extremo amino terminal (Nt) de la proteína, seguido de dos repeticiones altamente conservadas (Rpt1 y Rpt2) (Morozov et al., 1998) y una región carboxilo terminal moderadamente conservada en todos los homólogos con un dominio “coiled-coil” (HR3: “Homology región 3”). Rpt1 (R1), está involucrada en

la interacción con otras proteínas mientras que aún se desconoce la función específica de Rpt2 (R2). A través de R1 hSNF5 interacciona con IN estimulando la integración del HIV en el genoma. Las proteínas de la familia ALL1/hTRX/MLL, implicadas en activación génica, también interaccionan con hSNF5 (Rozenblatt-Rosen et al., 1998), al igual que la proteína nuclear del virus Epstein-Barr (EBNA2) fosforilada (Wang et al., 1996). C-MYC, que requiere al complejo SWI/SNF para su función transactivadora (Cheng et al., 1999), y GADD34, implicada en parada del crecimiento celular y apoptosis en respuesta a daño en el DNA, también interaccionan con hSNF5 (Adler et al., 1999; Wu et al., 2002).

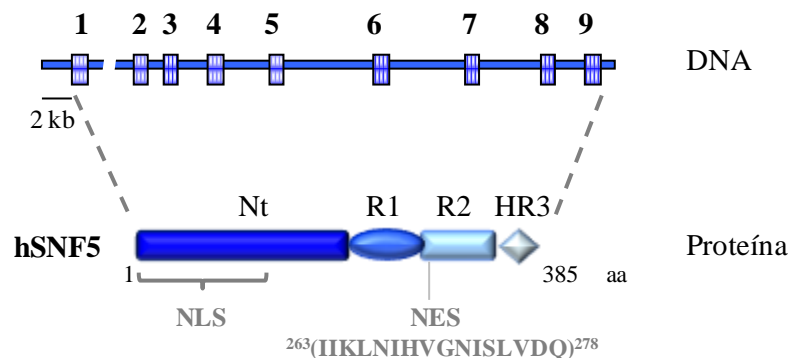


Figura 1. Análisis de los dominios de hSNF5. hSNF5 está codificada por nueve exones. La proteína presenta una región amino terminal (Nt), dos repeticiones altamente conservadas, Rpt1 (R1) y Rpt2 (R2), y una región conservada en todos los homólogos (HR3). Se muestra la localización de la posible Secuencia de Localización Nuclear (NLS) y de la Secuencia de Exporte Nuclear (NES) descrita (Craig et al., 2002). aa: aminoácidos.

En 2002, Craig y colaboradores (Craig et al., 2002) sugirieron la existencia de una Secuencia de Localización Nuclear (NLS) en sus primeros 130 aminoácidos, que conferiría localización nuclear a hSNF5. Además, estos investigadores identificaron en el dominio Rpt2 una Secuencia de Exporte Nuclear (NES) ($^{263}\text{IIKLNIHVGNISLVDQ}^{278}$) capaz de interactuar con la hCRM1/exportina1, una proteína de la familia de las carioferinas- β (King et al., 2006) que media el exporte del núcleo al citoplasma. A pesar de presentar ambas secuencias, hSNF5 localiza intensamente en el núcleo celular en condiciones normales de cultivo. Basándose en la existencia de estas secuencias y en la localización celular revelada mediante técnicas inmunohistoquímicas, Craig y colaboradores postularon un modelo en el que la proteína contenía una NES inactiva, bloqueada u oculta. La proteína presentaría localización exclusivamente nuclear salvo en ocasiones en la que la NES quedara expuesta tras un

estímulo desconocido que provocaría un cambio de conformación o en la interacción con cierta/s proteína/s.

La presencia de una NES concuerda con la primera evidencia de la existencia de hSNF5 en el citoplasma, obtenida en 2001 (Turelli et al., 2001). Los experimentos realizados muestran que hSNF5 es exportada transitoriamente al citoplasma tras infección por HIV-1 (Figura 2). Tras 30 min de la inoculación de células HeLa con HIV-1, la proteína GFP-hSNF5 localiza mayoritariamente en núcleo y mínimamente en el citoplasma. Presumiblemente, transcurrido este tiempo ninguna proteína viral ha alcanzado el núcleo. Tras 2 h, GFP-hSNF5 localiza mayoritariamente en el citoplasma en forma de áreas punteadas, mientras que a las 4-6 h vuelve a relocalizar de nuevo en el núcleo. Estos investigadores sugieren que el exporte es inducido por la entrada de las partículas virales, sin necesidad de la presencia de IN.

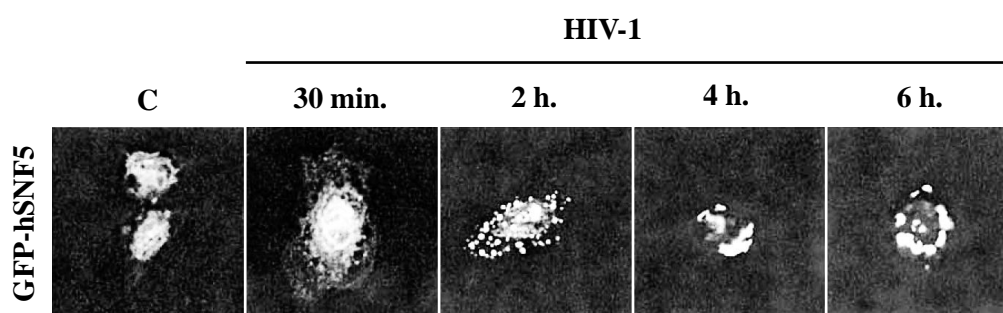


Figura 2. Cinética de la distribución núcleo citoplasma de GFP-hSNF5 en células HeLa infectadas con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (HIV-1). C: células no tratadas. Tiempos tras la inoculación: 30 minutos (min), 2, 4 y 6 horas (h). Adaptado de Turelli et al., 2001.

1.5 Tumores rabdoïdes

Los tumores rabdoïdes se definen como neoplasias extremadamente agresivas y letales originadas antes de los 4 años de edad. Se desarrollan principalmente en el cerebro y la médula espinal (referidos como tumores Rabdoïdes Teratoïdes Atípicos (AT/RTs)) (Rorke et al., 1995; Burger et al., 1998), riñón y tejidos blandos (denominados Tumores Rabdoïdes Malignos (MRTs) o tumores rabdoïdes extrarrenales) (Biegel et al., 2006). Descubiertos y definidos en primera instancia como una variante rabdomiosarcomatoïde del tumor de Wilms (Beckwith y Palmer, 1978), los MRTs y posteriormente los AT/RTs (Biggs et al., 1987) fueron clasificados como

entidades distintas y el término rhabdomyosarcomatoide se redujo a rabdoide (Rorke et al., 1995; Kleihues et al., 2002; Tomlinson et al., 2005). De histogénesis desconocida, se cree que podrían producirse a partir de una célula madre de la cresta neural (Gadd et al., 2010). El índice de supervivencia ronda los 2 años para el 15% de los infantes que lo padecen.

Los tumores rabdoide presentan una apariencia histológica bastante variable. La mayoría contienen al menos algunas zonas compuestas por células con fenotipo rabdoide (indiferenciadas, con inclusiones citoplásmicas eosinófilas, cromatina descondensada y un gran nucléolo) y áreas formadas por células indiferenciadas pleomórficas o en forma de huso sin fenotipo rabdoide. Los AT/RTs muestran una variedad de células mesenquimales o epiteliales neuroectodérmicas primitivas, característica que hace difícil diferenciarlos de otros tumores neuroectodérmicos primitivos o carcinomas de plexo coroideo (Rorke et al., 1995,1996; Burger et al., 1998). Sin embargo, la existencia de fenotipo rabdoide no es criterio suficiente para realizar un diagnóstico diferencial, pues estas células pueden formar parte de una gran variedad de tumores. Para un mejor diagnóstico se utilizan técnicas inmunohistoquímicas basadas en la expresión de actina del músculo liso, antígenos de membrana epitelial y vimentina, y la carencia de la proteína hSNF5 (Judkins et al., 2004).

Inicialmente, el desarrollo de este tipo de tumores fue asociado con monosomía del cromosoma 22, y posteriormente, deleciones y translocaciones involucraron a la región 11.2, localizada en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11.2) (Biegel et al., 1990; Douglass et al., 1990). Estudios posteriores identificaron al gen *hSNF5* como origen molecular común a los tumores rabdoide (Biegel et al., 1999; Sévenet et al., 1999), describiéndosele como un gen supresor tumoral. Las mutaciones o deleciones en la línea germinal (~25% de los casos) aparecen *de novo* en la mayoría de los pacientes, sin ser sus padres portadores, predisponiendo al desarrollo de uno o más tumores (Taylor et al., 2000; Janson et al., 2006; Swensen et al., 2009). Las alteraciones genéticas en células somáticas directamente provocan su desarrollo (~75% de los casos) (Versteeg et al., 1998; Biegel et al., 1999, 2002, 2006; Sévenet et al., 1999; Jackson et al., 2007, 2009; Kordes et al., 2010; Eaton et al., 2011; Dufour et al., 2012).

Las alteraciones genéticas analizadas en los tumores rabdoideas llevan a la inactivación de ambas copias por pérdida de heterocigosidad (inactivación bialélica) de *hSNF5*. La mayoría son mutaciones puntuales o cambios en la pauta de lectura en la secuencia codificadora que provocan un nuevo codón de “STOP” que dará lugar a una proteína truncada. Hay algunas zonas propensas a mutación o “puntos calientes” en *hSNF5*. En relación a esto, dos mutaciones parecen ser específicas y estar presentes en la gran mayoría de AT/RT de origen somático: (1) la deleción de una citosina o guanidina en el codón 382 del exón 9 que daría lugar a un cambio en la pauta de lectura traduciéndose en la adición de 96 aminoácidos más al extremo carboxilo terminal de la proteína, y (2) una mutación en el exón 5 (c.601C>T) (Biegel et al., 1990, 2002, Versteeg et al., 1998; Judkins et al., 2004; Jackson et al., 2009; Eaton et al., 2011). En la gran mayoría de tumores primarios estas alteraciones genéticas causan ausencia de la proteína, pues probablemente ésta o el mensajero de RNA sean inestables. Sin embargo, en algunos tumores rabdoideas no existe mutación de secuencia ni metilación de la región promotora de *hSNF5* (Zhang et al., 2002; Frühwald et al., 2006; Bourdeaut et al., 2007). Quizás ciertas reordenaciones genéticas, modificaciones epigenéticas o un incluso una alteración genética en otro gen induzcan la formación del tumor.

Diferentes estudios genéticos han demostrado que no existen alteraciones genéticas más allá de la de *hSNF5* en los MRTs, indicando la importancia de su carencia y revelando su papel como supresor tumoral (Jackson et al., 2009; Lee et al., 2012; Hasselblatt et al., 2013). Sin embargo, las alteraciones en *hSNF5* no son exclusivas de los MRTs (Bourdeaut et al., 2007; Wilson y Roberts, 2011). Casos de sarcoma epitelioides (Modena et al., 2005; Hornick et al., 2009), hepatoblastomas (Trobaugh-Lotario et al., 2009), schannomatosis familiar (Hulsebos et al., 2007; Boyd et al., 2008) y sarcomas indiferenciados (Kreiger et al., 2009) presentan inactivación homocigota de *hSNF5* en un 55, 35, 36 y 29 % de los casos, respectivamente. Un pequeño porcentaje (<8%) de los casos de condrosarcoma mixoide extraesquelético (Kohashi et al., 2008), meningiomas (Rieske et al., 2003; Christiaans et al., 2011) y cordomas poco diferenciados (Mobley et al., 2010) también presentan esta inactivación.

1.6 Mecanismos de supresión tumoral mediados por hSNF5

Tras el descubrimiento del origen molecular de los tumores rabdoideos, varios grupos desarrollaron modelos de ratón modificados genéticamente que permitieron evidenciar la capacidad supresora tumoral de SNF5 en ratón (“mouse” SNF5 o mSNF5) (Klochender-Yeivin et al., 2000; Roberts et al., 2000; Guidi et al., 2001). En estos estudios, ratones homocigotos nulos para *SNF5* mostraron letalidad embrionaria en estado preimplantatorio, mientras que los heterocigotos presentaron predisposición a desarrollar sarcomas agresivos (20% los desarrollaron tras 12 meses de vida), estrechamente relacionados con los MRTs en humanos (Roberts et al., 2000; Klochender-Yeivin et al., 2000; Guidi et al., 2001). La inactivación bialélica condicional de *mSNF5* provocó la aparición de linfomas y MRTs tras 11 semanas de vida. Una extraordinaria velocidad de desarrollo para la inactivación de un solo gen (Roberts et al., 2002) en comparación con el tiempo de desarrollo de tumores originados en ausencia de otros supresores de tumores. Por ejemplo, la deficiencia de *p53* combinada con *Rb* en heterocigosidad produce cáncer en 16 semanas, la pérdida de *p53* lo provoca en 20 semanas, y la ausencia de *p16^{Ink4a}*, en 60 semanas (Harvey et al., 1993; Williams et al., 1994; Serrano et al., 1996). El desarrollo agresivo de los tumores mostrado por los ratones heterocigotos para *SNF5* en tan sólo 11 semanas demuestra el potente papel de esta proteína como supresora de tumores.

Aunque no se conozcan con exactitud las vías por las que hSNF5 ejerce su supresión tumoral, se ha descrito su implicación en regulación del ciclo celular. Varios estudios han sugerido que hSNF5 regular la vía *p16^{Ink4a}-CDK4/ciclina D-Rb-E2F*, exhibiendo una actividad antiproliferativa (Figura 3) (Betz et al., 2002; Imbalzano y Jones, 2005; Tsikitis et al., 2005). La ausencia de hSNF5 provoca niveles reducidos de *p16^{Ink4a}*, incrementando la fosforilación de Rb (proteína necesaria para el tránsito G1-S y para la progresión de la fase S) por CDKs (CDK: quinasas dependientes de ciclina) y promoviendo la entrada en fase S por liberación del factor de transcripción E2F (Figura 3). Finalmente, el incremento en los niveles de E2F se correlaciona con un aumento de la expresión de genes dianas de E2F involucrados en proliferación, acompañado por aumento de niveles de *p53* (Chai et al., 2005). Esto sugiere que la inactivación de hSNF5 conduce a una progresión aberrante del ciclo celular que

finalmente activaría puntos de control celular o “checkpoints” que conducirían a parada de ciclo y apoptosis, mediada en parte por p53. A pesar de existir una mayor proliferación asociada a estas vías, la pérdida de *hSNF5* es letal en la mayoría de las células primarias (Isakoff et al., 2005; Klochendler-Yeivin et al., 2006). De hecho, la disrupción de checkpoints vía inactivación de los supresores de tumores *p53* y *mSNF5* resulta en un dramático sinergismo oncogénico causando tumores a las 3-4 semanas de vida en ratones condicionales respecto a las 11 semanas de desarrollo tumoral tras la deficiencia de *mSNF5*. Además, el hecho de que los tumores formados sean exclusivamente del tipo de los desarrollados en ratones deficientes en *mSNF5* y no de los desarrollados por ausencia de *p53*, sugiere que el fenotipo *mSNF5* es dominante y que la pérdida de *p53* ayuda a acelerar el desarrollo del tumor en ausencia de *hSNF5* (Isakoff et al., 2005).

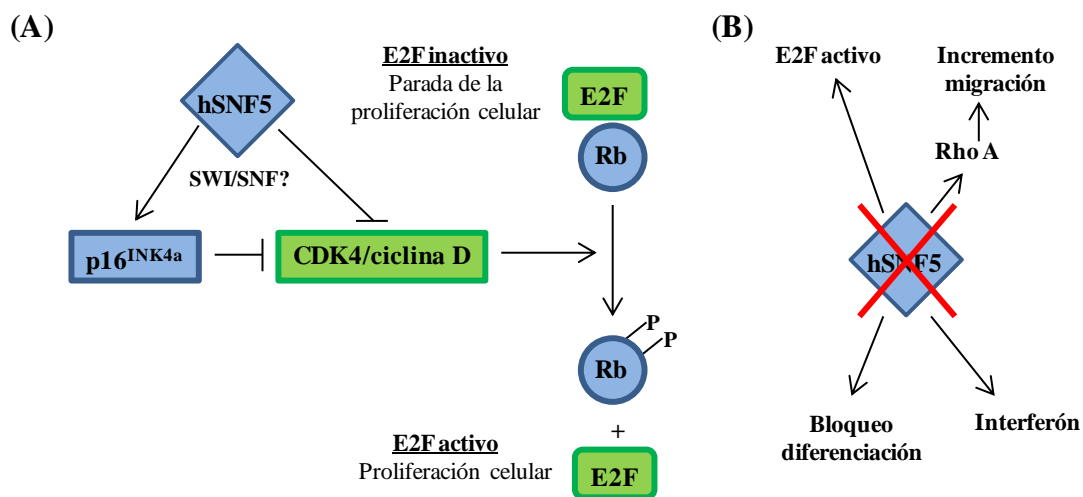


Figura 3. Mecanismos de supresión tumoral mediados por hSNF5. (A) Regulación de la vía p16-CDK4/ciclina D-Rb-E2F por hSNF5. Mediante el aumento en la expresión de p16^{INK4a} e inhibición de la expresión de la ciclina D1, hSNF5 promueve la inactivación del factor de transcripción E2F por la proteína retinoblastoma (Rb). Las proteínas supresoras de tumores se muestran en azul. Adaptado de Imbalzano y Jones, 2005. (B) Algunas de las rutas afectadas por la pérdida de hSNF5. Adaptado de Roberts y Biegel, 2009.

La reintroducción de *hSNF5* en células humanas derivadas de MRT induce morfología plana, cambios en el citoesqueleto de actina, acumulación de las células en G0/G1 y en algunos casos, senescencia celular y apoptosis (Ae et al., 2002; Versteeg et al., 2002; Medjkane et al., 2004). Efectos que parecen estar mediados por la inhibición de la expresión de la ciclina D1 (Zhang et al., 2002; Tsikitis et al., 2005) o por la

activación de la expresión de p16^{INK4a} (Oruetebarria et al., 2004), manteniéndose formado el complejo Rb-E2F (Betz et al., 2002), dando lugar a la disminución en la expresión de genes diana de E2F y finalmente a la parada de ciclo celular.

Varios estudios cuyo objetivo residía en descubrir las bases moleculares de la gran capacidad invasiva y la naturaleza metastática de los tumores rabdoideos, han identificado a hSNF5 como regulador del citoesqueleto de actina. hSNF5 regula factores de cambio de nucleótido de guanina (GEFs) y proteínas aceleradoras de la actividad GTPasa (GAPs) que controlan la actividad de la pequeña GTPasa RhoA y por tanto la arquitectura del citoesqueleto y la migración celular, de manera dependiente del complejo SWI/SNF. Por tanto, la pérdida de hSNF5 confiere un mayor potencial migratorio (Figura 3B) (Medjkane et al., 2004; Caramel et al., 2008).

hSNF5 también es necesario para la diferenciación, incluyendo diferenciación de hepatocitos *in vivo* (Gresh et al., 2005) y de adipocitos *in vitro* ((b)Caramel et al., 2008). Además, la pérdida de hSNF5 interfiere con la actividad de genes diana de interferón (Morozov et al., 2007).

La inestabilidad genética causada por defectos en la reparación del DNA y en la respuesta a este daño es una característica común presentada por muchas células tumorales, aunque cambios epigenéticos también pueden contribuir a la transformación oncogénica. Por ello, si la ausencia de hSNF5 provoca inestabilidad cromosómica debida a defectos en la reparación del DNA o si defectos epigenéticos conducen a esta inestabilidad, ha sido objeto de estudio por parte de varios grupos. En relación a su implicación en la regulación del ciclo celular, Vries y colaboradores (Vries et al., 2005) sugirieron que hSNF5 podía estar involucrada en regulación del “checkpoint” mitótico y que su inactivación llevaría a poliploidía e inestabilidad cromosómica. Sin embargo, aunque la falta de diploidía es característica común de muchos tumores agresivos, las células de los tumores rabdoideos son diploides y genéticamente estables. Detractores de la teoría de Vries y colaboradores exponen que hSNF5 no ejerce un papel en la reparación del DNA ni el mantenimiento de la integridad genética (McKenna et al., 2008), a pesar de que varios estudios han sugerido que el complejo SWI/SNF está involucrado en reparación del DNA (Chai et al., 2005; Hara et al., 2002; Park et al., 2006; Klochendler-Yeivin, 2006). La carencia de hSNF5 afectaría al control epigenético

de la expresión génica a través del complejo SWI/SNF (McKenna et al., 2008,2009). Sin embargo, la aparición y el desarrollo del cáncer asociado a la pérdida de hSNF5 quizás no pueda explicarse simplemente por la inactivación del complejo SWI/SNF (Doan et al., 2004), ya que aunque la alteración génica de ciertas de sus subunidades dan lugar a cáncer, ninguna de ellas produce el tipo de tumor tan agresivo en ausencia de hSNF5. Así, los tumores desarrollados por ratones deficientes en *BRG1* son distintos a los desarrollados debido a la pérdida de *SNF5*, y en comparación con ambos, la inactivación de *BRM* provoca desregulación de ciclo celular pero no tumores (Reyes et al., 1998; Wilson y Roberts, 2011).

Se ha descrito que los tumores rabdoides presentan una elevada expresión del protooncogen *c-MYC* y una baja expresión de BIN1/anfifisina-2. C-MYC controla el crecimiento celular y el desarrollo y regula la transformación celular, la diferenciación y la apoptosis (Facchini y Penn, 1998), mientras que BIN1/anfifisina-2 es un supresor tumoral que ejerce su acción en parte interaccionando con C-MYC. El complejo SWI/SNF se une al promotor de *c-MYC* regulándolo (Nagl et al., 2006), mientras que hSNF5 interacciona directamente con C-MYC siendo requerida para su actividad transactivadora (Cheng et al., 1999). Quizás los elevados niveles de C-MYC en tumores rabdoides contribuyan a la oncogénesis en ausencia de hSNF5. El descenso en la expresión de BIN1/anfifisina-2 en tumores rabdoides en ausencia de alteración génica parece ser debido a la falta de reclutamiento del complejo SWI/SNF mediado por hSNF5 (McKenna et al., 2012).

La contribución de este elevado número de interacciones a la transformación oncogénica *in vivo* aun no está clara. En conclusión, todos estos datos sugieren que hSNF5 regula vías necesarias para la correcta regulación del ciclo celular, la diferenciación y el citoesqueleto de actina, por lo que su pérdida puede conducir a un ciclo celular de actividad aberrante y a la formación de tumores. Aunque existen evidencias de que la supresión tumoral puede estar mediada por el complejo SWI/SNF (Figura 4) quizás existan vías mediadas exclusivamente por hSNF5 (Doan et al., 2004).

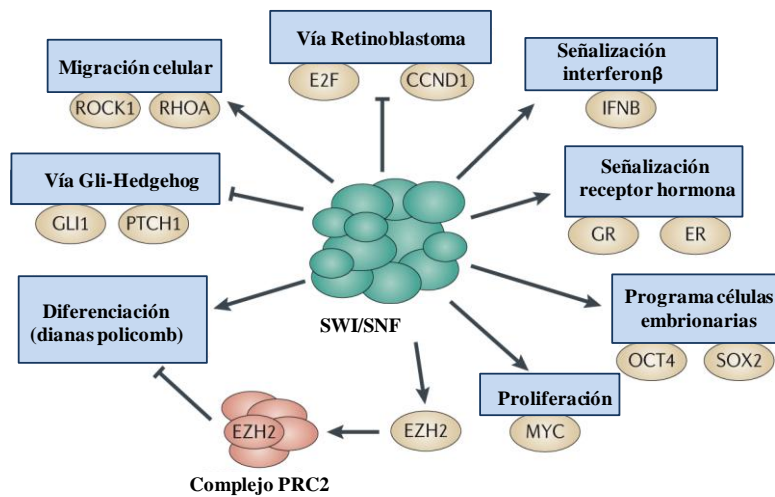


Figura 4. Vías implicadas en la actividad supresora tumoral del complejo SWI/SNF. Se muestran las vías tumorales en forma de cajas azules y las proteínas afectadas, en expresión o actividad, en forma oval marrón. CCND1: ciclina D1; ER: receptor de estrógeno; GR: receptor de glucocorticoide; IFNB: interferón β ; ROCK1: proteína quinasa asociada a RHO. Adaptado de Wilson y Roberts, 2011.

2 DINAMINA

2.1 Historia de la dinamina

La dinamina (DNM) fue descubierta hace más de 25 años como proteína de unión a microtúbulos (Paschal et al., 1987; Shpetner y Valle, 1989). La presencia en su secuencia de aminoácidos de tres elementos consenso característicos de proteínas de unión a GTP permitieron clasificarla dentro de la familia de las GTPasas (Obar et al., 1990).

Mucho antes de su descubrimiento en mamíferos, científicos de la Universidad British Columbia en Canadá observaron que a temperaturas no permisivas una mutación en el gen *shibire* (*shi^{ts}*) de *Drosophila melanogaster* (*D.melanogaster*) provocaba una rápida e irreversible parálisis (Suzuki et al., 1971; Grigliatti et al., 1973). Estudios posteriores revelaron que la causa de esta parálisis se debía a la acumulación de vesículas endocíticas recubiertas por clatrina en la membrana plasmática presináptica de neuronas (Kosaka e Ikeda, 1983a; Koeing e Ikeda, 1989) y de células no neuronales (Kosaka e Ikeda, 1983b), en estado previo a su escisión. Este hecho puso de manifiesto el papel desempeñado por *shibire* en endocitosis. La elevada homología existente entre *shibire* y DNM (66% de identidad, 78% de similitud) (Obar et al., 1990; Van der Bliet y Meyerowitz, 1991; Chen et al., 1991) y el bloqueo de la endocitosis observado en células de mamífero que sintetizaban una versión mutante de la DNM (deficiente en su

capacidad de unión a GTP) revelaron que ambas proteínas ejercían la misma función endocítica (Van der Blik et al., 1993; Herskovits et al., 1993; Damke et al., 1994).

Análisis estructurales posteriores mostraron que la DNM podía existir en solución tanto en estado tetamérico (Muhlberg et al., 1997) como ensamblada, formando anillos y hélices (Hinshaw y Schmid, 1995; Carr y Hinshaw, 1997) en presencia o ausencia de membrana lipídica. Estas estructuras ensambladas sobre una bicapa lipídica en solución presentaron una mayor actividad GTPasa y capacidad constrictora, apoyando la imagen de DNM como molécula responsable de generar la fuerza necesaria para la escisión de membrana (Sweitz y Hinshaw, 1998; Takei et al., 1998). Actualmente la DNM es considerada una GTPasa con capacidad para formar estructuras helicoidales cuyo cambio conformacional, dependiente de hidrólisis de GTP, promovería la fisión de membrana.

2.2 Isoformas de dinamina en mamíferos

Las DNMs son proteínas conservadas a lo largo de la evolución en eucariotas superiores. Aunque solamente ha sido identificada una isoforma (con múltiples variantes de “splicing”) en invertebrados como *Caenorhabditis elegans* y *D.melnogaster* (Chen et al., 1991; Clark et al., 1997), en mamíferos, la DNM se encuentra codificada por tres genes diferentes (*DNM1*, *DNM2* y *DNM3*) que presentan múltiples variantes de “splicing” (Figura 5) (Cao et al., 1998). A pesar de que la elevada identidad (~80%) mostrada por estas tres isoformas apoya la idea de un mecanismo molecular común, la existencia de esta triplicación génica (con múltiples variantes de splicing) a lo largo de la evolución podría reflejar especialización funcional a nivel de tejido e isoforma, y a nivel de orgánulo según variante/s de “splicing” presente/s (Ferguson y De Camilli, 2012).

DNM1, *DNM2* y *DNM3* muestran diferencias en su patrón de expresión. *DNM1* presenta elevados niveles de expresión en tejido nervioso, convirtiéndose el producto de este gen en la isoforma mayoritaria en este tipo de tejido (Nakata et al., 1991; Ferguson et al. 2007), aunque su síntesis es capaz de detectarse en líneas celulares no neuronales

(Liu et al., 2008; Ferguson et al., 2009). DNM2 es ubicua (Cao et al., 1998, Ferguson et al., 2007) mientras que *DNM3* se expresa mayoritariamente en cerebro y en testículo, y en menor cuantía, en pulmón y corazón. La función llevada a cabo por DNM1 reside en el rápido reciclaje de vesículas sinápticas, hecho que lleva implícito la localización de esta isoforma en el compartimento presináptico neural. Como se ha mencionado anteriormente, DNM1 es la isoforma mayoritaria en tejido neural, aunque la expresión de DNM2 y sobre todo de DNM3, es detectable en menor cuantía.

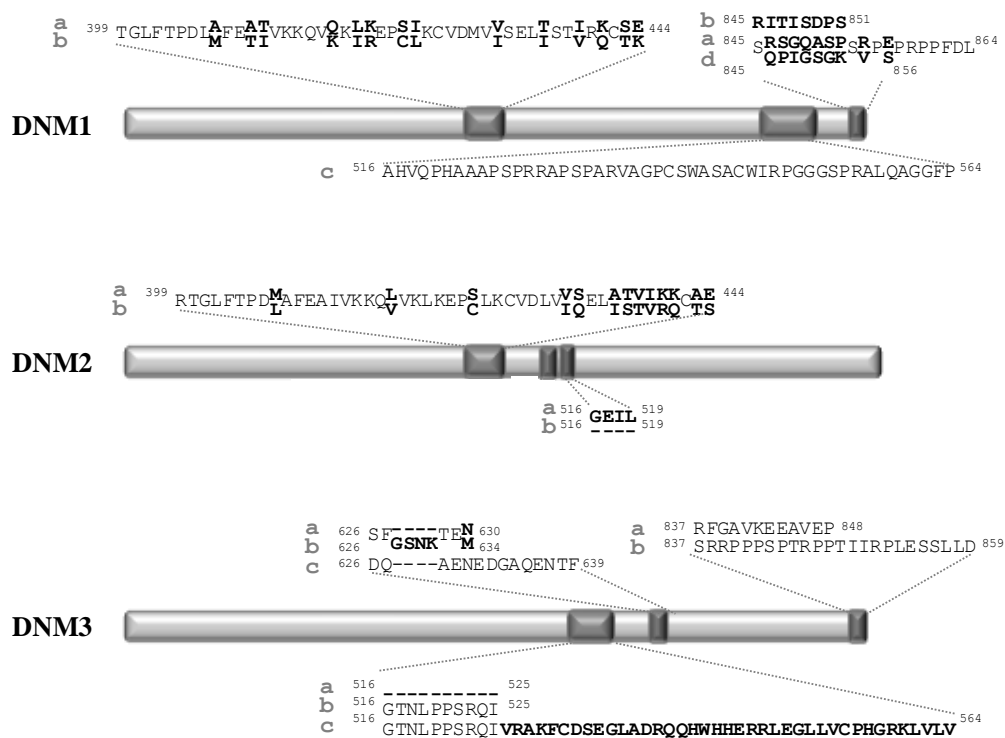


Figura 5. Isoformas y variantes de splicing de dinamina en mamíferos. Representación esquemática de las tres isoformas de dinamina (DNM1, DNM2 y DNM3) presentes en mamíferos, indicando los correspondientes sitios alternativos de splicing (gris oscuro). Se ha descrito la existencia de al menos ocho variantes de splicing para DNM 1 (aa, ba, ab, bb, ac, bc, ad, y bd), cuatro para DNM2 (aa, ab, ba, bb) y trece para DNM3 (aaa, aba, bba, baa, bbb, bab, aab, abb, aca, acb, bca, bcb y c). Adaptado de Cao et al., 1998 y McNiven et al., 2000.

Partiendo de esta premisa, estudios recientes han puesto de manifiesto que DNM1 y DNM3 presentan redundancia funcional respecto a la endocitosis de vesículas sinápticas, aunque también se le han atribuido a DNM3 funciones postsinápticas de remodelaje y morfogénesis (Gray et al., 2003; Lu et al., 2007; Raimondi et al., 2011) así como un papel en la liberación de células espermáticas (Vaid et al., 2007). A pesar de lo anteriormente expuesto, la carencia de estas dos isoformas no afecta gravemente al desarrollo del sistema nervioso, aunque la ausencia de DNM3 empeora el fenotipo

producido por la carencia de DNM1. Este hecho pone de manifiesto que, a pesar de su contribución mutua, ninguna de ellas es esencial en la regeneración de vesículas sinápticas. En este escenario, las funciones sinápticas básicas podrían ser llevadas a cabo por la única isoforma existente, DNM2, y/u otro mecanismo independiente de ésta (Raimondi et al., 2011).

DNM2 es la isoforma mejor estudiada debido a su papel desempeñado en la fisión de vesículas producidas en la endocitosis dependiente e independiente de clatrina (Henley et al., 1998; Oh et al., 1998; Lamaze et al., 2001; Pelkmans et al., 2002). DNM2 también es esencial en una amplia variedad de eventos celulares en los que tiene lugar el remodelado de membranas, como la fagocitosis (Gold et al., 1999; Yu et al., 2006), citoquinesis o el tráfico desde la red Trans del aparato de Golgi (Jones et al., 1998; Kreitzer et al., 2000; Bonazzi et al., 2005). Se ha descrito su implicación en el ensamblaje y reorganización de la actina (Orth and McNiven, 2003; Schafer, 2004; Itoh et al., 2005; Kruchten and McNiven, 2006), además de su importancia como GTPasa mediadora de apoptosis dependiente de p53 (Fish et al., 2000; Soulet et al., 2006).

En conjunto, todo lo anteriormente expuesto sugiere especificidad de función a nivel de isoforma. DNM1 y DNM3 han adaptado su función a endocitosis rápida en sinapsis, mientras que DNM2 lleva a cabo procesos constitutivos en células no neuronales.

2.3 Estructura y ensamblaje de la dinamina

La DNM es el primer miembro de una gran familia llamada “proteínas relacionadas con la dinamina” (DLP) (Praefcke et al., 2004). Estructuralmente, la DNM consta de cinco dominios conservados (Figura 6A) (Hinshaw, 2000; Ferguson y De Camilli, 2012): un dominio GTPasa (GTPasa), un domino intermedio (MD), un domino homólogo a la pleckstrina (PH), un dominio efector GTPasa (GED) y un domino rico en prolinas/argininas (PRD). Los implicados en la actividad y el ensamblaje (GTPasa, MD y GED) están presentes en la gran mayoría de las DLP (Praefcke et al., 2004).

El dominio GTPasa une e hidroliza GTP. Similar a los dominios GTPasa presentes en proteínas de unión a GTP, aunque de tamaño mayor, es la región con mayor grado de conservación dentro de las DLPs. El dominio PH es esencial en la localización de la DNM en membrana gracias a su interacción con fosfolípidos acídicos como el fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PIP2) (Salim et al., 1996; Barylko et al., 1998). El GED, conocido como “domino coiled-coil” o “dominio de ensamblaje”, interacciona con el dominio GTPasa, promoviendo su ensamblaje y estimulando su actividad actuando como una GAP (proteína activadora GTPasa) (Sever et al., 1999).

Más de treinta proteínas interaccionan directamente con la DNM, involucrándola en diferentes procesos celulares. Debido a que la mayor parte de estas interacciones se producen entre motivos aminoacídicos presentes en el dominio PRD de la DNM y dominios homólogos a Src (SH) 3 presentes en otras proteínas (Ringstad et al., 1997), el PRD es considerado el principal dominio implicado en la interacción proteína-proteína (Ferguson y De Camilli, 2012). De este modo, la interacción con proteínas que presentan dominios SH3, como la cortactina o Abp1, dirige a la DNM a filamentos de actina (McNiven et al., 2000b, Kessels et al., 2001), mientras que su interacción con BIN/anfifisina, endofilina, intersectina y sorting nexina 9, la dirigen a estructuras recubiertas por clatrina durante la endocitosis (David et al., 1996; Yoshida et al., 2004; Ringstad et al., 1997; Zamanian y Kelly, 2003; Ramachandran y Schmid, 2008). Además, se ha descrito que la fosforilación de la DNM debida a su interacción con Grb2 podría implicarla en transducción de señales tirosina quinasa (Kranenbrug et al., 1999).

La capacidad intrínseca de la DNM para formar polímeros helicoidales es esencial en su función (Ferguson y De Camilli, 2012; Morlot y Roux, 2013), sin embargo esta misma capacidad ha impedido durante años su cristalización. Teniendo en cuenta este hecho, dos grupos de investigación han conseguido obtener recientemente el cristal de DNM1, utilizando mutantes deficientes en polimerización (carentes del PRD) (Faelber et al., 2011; Ford et al., 2011). Los datos obtenidos en estos estudios de difracción revelan que la DNM es un dímero en el cristal. Su peculiar estructura (Figura 6A) muestra los dominios MD y GED plegados formando un “tronco” rígido. En la formación del dímero los troncos de ambas moléculas interaccionan dando lugar a una cruceta en la cual los dominios GTPasa, conectados cada uno a su tronco mediante un dominio estructural denominado elemento empaquetado de señalización (BSE),

localizan en posiciones opuestas en el exterior de la cruz, mientras que los dominios PH se muestran más cercanos a ella. La interacción entre dímeros vecinos se produce a través de las estructuras superiores e inferiores del tronco, dando lugar a una hélice dextrógira formada por 14,3 homodímeros por vuelta, cuyo diámetro es controlado por el ángulo formado entre los dos troncos (Figura 6A). En este escenario, el dominio PH oligomerizado potencia significativamente la unión a lípidos (Klein et al., 1998) mientras que los dominios GTPasa interaccionando fuertemente promueven el ensamblaje y aumentan la actividad GTPasa (Muhlberg et al., 1997). Aunque la unidad básica de la DNM sea el dímero, en solución a baja concentración salina (baja fuerza iónica) y sin requerimiento nucleotídico adicional, los dímeros de DNM se asocian formando tetrámeros. Estos tetrámeros oligomerizan a su vez dando lugar a polímeros helicoidales (Carr y Hinshaw, 1997) de dimensiones similares en ausencia (Hinshaw and Schmid, 1995) o en presencia de moldes de membrana (Figura 6B y C) (Shpetner y Valle, 1989; Takei et al., 1998; Gu et al., 2010). *In vitro*, las hélices formadas presentan dimensiones similares a las estructuras con aspecto de collar visualizadas en el cuello de las vesículas recubiertas por clatrina en los mutantes *shibire* (*shi^{ts}*) y en sinaptosomas tratados con GTP γ S (un análogo de GTP no hidrolizable) (Takei et al., 1995).

In vivo, el bloqueo funcional de esta GTPasa da lugar a estructuras de diámetro idéntico a las formadas *in vitro* a partir de proteína purificada (Figura 6C) (Carr y Hinshaw, 1997; Hinshaw and Schmid, 1995). *In vivo*, la DNM se ensambla en estructuras poliméricas en el cuello de invaginaciones de membrana recubiertas por clatrina de manera dependiente de GTP (Takei et al., 1995). Pero ¿cómo se produce dicho ensamblaje? y ¿es la polimerización la causante de la deformación y constricción de membrana? La respuesta a estas preguntas es controvertida pues existe cierta discrepancia entre los datos obtenidos *in vitro*, que muestran que la DNM es suficiente para deformar membrana, respecto a los obtenidos *in vivo*, que sugieren reclutamiento dependiente de curvatura de membrana (Roux et al., 2010).

Existe una competición entre la energía necesaria para constreñir la membrana (dependiente del radio de curvatura) y la energía de polimerización de la DNM (dependiente de concentración). Además, hay que tener en cuenta que el reclutamiento de la DNM a la membrana es un evento tardío en la formación de la vesícula, sugiriendo que éste podría ocurrir una vez generada la curvatura (Doyon et al., 2011, Taylor et al.,

2011). El reclutamiento a membrana curvada podría deberse a su asociación con proteínas “sensoras” de curvatura que presentan además de dominios SH3 (de unión a dominios PRD), dominios BAR (Bin-Anfifisina-Rvs) a través de los cuales se unen a membrana (Farsad et al, 2001; Sorre et al., 2012).

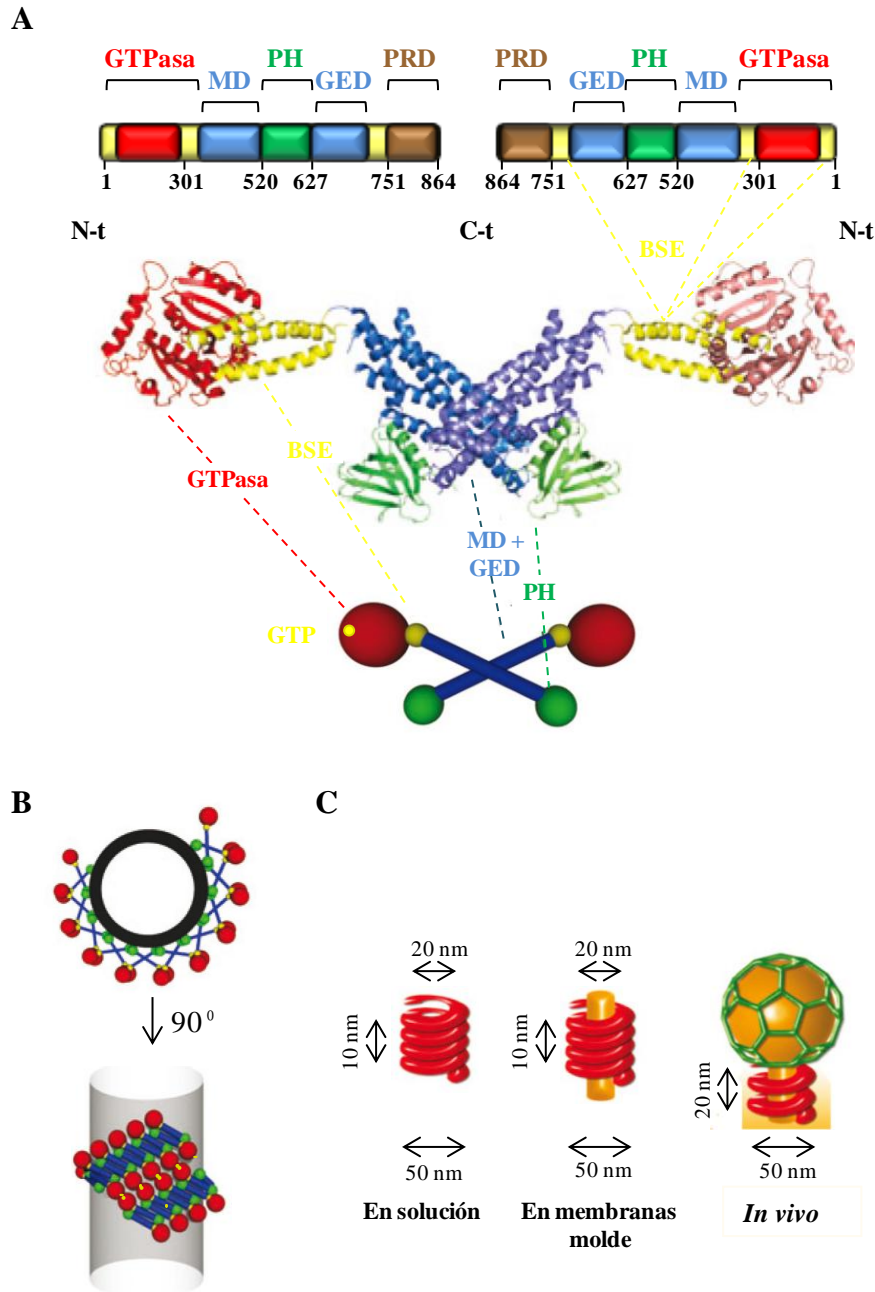


Figura 6. Estructura de la dinamina. (A) Organización en dominios GTPasa; intermedio (MD); homólogo a la pleckstrina (PH); efector GTPasa (GED); rico en prolinas/argininas (PRD). Los números indican la posición de aminoácidos en la secuencia. Estructura 3D revelada por estudios cristalográficos. Los monómeros interaccionan a través del tronco (MD y GED; en azul). El BSE o elemento de señalización empaquetado (en amarillo) está formado por tres hélices que derivan de las secuencia N y C terminal (N-t; C-t) a ambos lados del dominio GTPasa y de la región C-t del GED. (B) Representación esquemática de polímeros helicoidales sobre un molde tubular de membrana, en dos orientaciones diferentes. (C) Representación esquemática de la hélice de dinamina: en solución, sobre molde tubular e *in vivo*. Modificado de Ferguson et al., 2012; Morlot y Roux, 2013.

Como conclusión, DNM es una GTPasa de gran tamaño con habilidad para polimerizar dando lugar a una estructura helicoidal formada a partir de homodímeros antiparalelos con capacidad para deformar membrana. Su ensamblaje en membrana puede depender de varios factores, entre los que se encuentran la carga negativa de la membrana, su curvatura, la unión a PIP2, el pH y la concentración salina. Aunque su polimerización pueda llevarse a cabo en ausencia de nucleótidos, la DNM unida a GTP presenta gran propensión a polimerizar.

2.4 Actividad GTPasa y fisión de membrana

¿Cómo la actividad GTPasa de la DNM ensamblada en hélices poliméricas puede provocar la fisión de membranas? Para responder esta cuestión primero debemos ahondar un poco en la bioquímica básica y el funcionamiento de su dominio GTPasa (Morlot y Roux, 2013). El dominio GTPasa de la DNM une e hidroliza GTP. A pesar de presentar una estructura similar al dominio GTPasa canónico de las proteínas Ras, su estado libre (de nucleótido) no corresponde al clásico estado inactivo (libre de nucleótido o unido a GDP) de las pequeñas GTPasas reguladoras (Reubold et al., 2005). En contraposición, a nivel estructural, muestra características similares a dominios ATPasa presentes en proteínas motoras y su actividad enzimática se asemeja más a la presentada por ATPasas implicadas en generar fuerza (como kinesinas o miosinas), que a las GTPasas reguladoras (Obar et al., 1990). Otra peculiaridad que la diferencia de estas pequeñas GTPasas es que la DNM cambia su nucleótido unido rápidamente (elevada K_m) y lo hidroliza aún más rápido (elevada actividad GTPasa ensamblada) (Warnock et al., 1996). Y es que, aunque la DNM desensamblada presenta baja afinidad por el GTP, la interacción entre dominios GTPasa estimula su actividad GTPasa (Warnock et al., 1996).

A nivel molecular, el análisis de la estructura del cristal de DNM unida a un análogo no hidrolizable de GTP o a un análogo de GDP y Pi, sugiere que el cambio conformacional ocurre cuando el GTP es hidrolizado a GDP y Pi (Figura 7A y B) (Ford et al., 2011). Este cambio conformacional podría explicar la constricción y sucesiva fisión de membrana dependiente de GTP. Sin embargo, hay que tener en cuenta que al

ser la constricción una fuerza opuesta a la viscosidad y elasticidad de la membrana, entra en juego la velocidad a la que tiene lugar dicha constricción, que en el caso de la DNM es de unos cuantos cientos de milisegundos (Lenz et al., 2008; Morlot et al., 2010). Narayanan y colaboradores (Narayanan et al., 2005) propusieron un modelo de actuación de la DNM durante la endocitosis en dos pasos. El primero, que ocurriría en los eventos tempranos de la endocitosis, involucraría la transición de la DNM desensamblada unida a GDP a DNM en estado pre-ensamblado unida a GTP. En este estado, la DNM actuaría como andamiaje para factores accesorios involucrados en el ensamblaje y la maduración de la cubierta de la vesícula. El segundo paso, ocurriría en eventos más tardíos y requeriría el ensamblaje en el cuello de la vesícula donde la hidrólisis del GTP estimulada por el ensamblaje dispara la fisión de membrana.

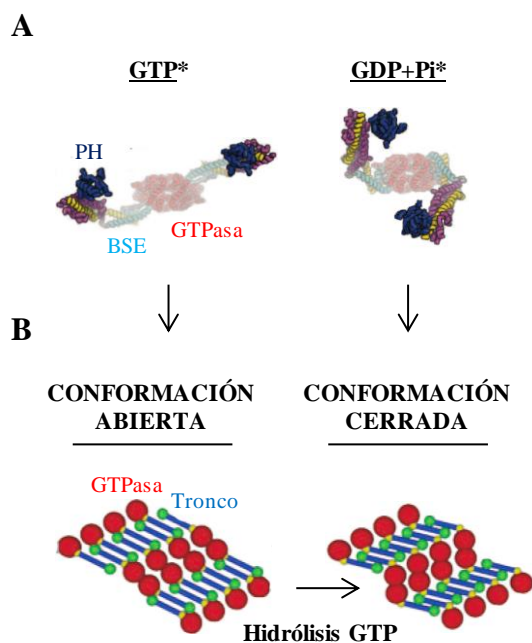


Figura 7. Modelo del ciclo de la dinamina. (A) Conformación de la dinamina dependiente de nucleótido. Se muestra la molécula en su estado abierto, unida a un análogo del GTP no hidrolizable (GTP*), y en su estado cerrado, unido a un análogo de GDP + Pi (GDP + Pi*), donde cambia dramáticamente el ángulo entre el dominio GTPasa y el tronco, gracias al BSE. (B) Modelo de actuación de dinamina donde la hidrólisis de GTP produce un cambio conformacional (de conformación abierta a cerrada). Adaptado de Ford *et al.*, 2011 y Morlot y Roux, 2013.

A lo largo de los años se han propuesto múltiples modelos de fisión de membrana que podría llevar a cabo la DNM (Morlot y Roux, 2013): “spring” (Kozlov, 1999), de fisión por corte (Lenz et al., 2009), de despolimerización (Warnock et al., 1996; Bashkirov et al., 2008), de constricción (Morlot et al., 2012) o combinatorio (Campelo y Malhotra, 2012). De todos ellos, los dos últimos parecen ser los más probables.

Los primeros modelos apuestan por que la constricción pueda alcanzar un estado de hemifisión que se resolvería espontáneamente mediante fisión. Esta posible teoría predice que la fisión ocurriría entre la zona lipídica cubierta por DNM y el túbulo lipídico no cubierto (Morlot et al., 2012), lugar en el cual la membrana, altamente estresada y tensionada, incrementa su elasticidad favoreciendo la fisión. Aunque este modelo ha cobrado fuerza recientemente existe otro que coloca al citoesqueleto de actina como pieza central, capaz de generar la fuerza necesaria para la fisión, el modelo combinatorio (Campelo y Malhotra, 2012). En él, la DNM controlaría la cantidad de PIP2 que es generado y concentrado en un área específica de membrana. Proteínas con dominios SH3-BAR, se unirían posteriormente, actuando como un sensor y/o estabilizador de curvatura de membrana. Todo esto llevaría al reclutamiento de proteínas de unión a actina y del citoesqueleto de actina provocando la fisión.

Tras casi veinte años de investigación se ha logrado demostrar mediante microscopía electrónica y aproximaciones bioquímicas, biofísicas y estructurales, que la hélice de DNM es capaz de constreñir. Sin embargo, puede que esta constricción no sea suficiente para fisionar la membrana, entrando en juego la elasticidad de la membrana, efectores reclutados por la DNM y el citoesqueleto de actina.

2.5 Dinamina, una proteína esencial para la endocitosis

2.5.1 Sistema de membranas intracelulares

A lo largo de la evolución la célula eucariota ha desarrollado un elaborado sistema de membranas que actúa como una barrera dinámica, preservando el contenido celular y manteniendo la comunicación con el entorno que la rodea, así como entre los compartimentos que la conforman. Esta comunicación fluida se lleva a cabo principalmente mediante dos vías de transporte, la ruta secretora (exocitosis) y la endocítica (endocitosis). En la ruta secretora, las proteínas recién sintetizadas son transportadas desde el retículo endoplásmico hasta su destino final (espacio extracelular, membrana plasmática u otros compartimentos). Mediante la endocitosis, las células

internalizan solutos, ligandos y porciones de membrana plasmática que alcanzan los endosomas tempranos, donde serán clasificados. Desde estos, la carga será dirigida a endosomas de reciclaje, que llevan el cargo de vuelta a la membrana plasmática, a endosomas tardíos, a lisosomas para su degradación o a la red trans del Golgi (Grant y Donaldson, 2009). Los orgánulos que forman parte de ambas rutas (retículo endoplásmico, aparato de Golgi, membrana plasmática, endosomas y lisosomas) permanecen conectados mediante un tráfico bidireccional, mediado principalmente por vesículas de transporte que se desplazan a través de elementos del citoesqueleto.

2.5.2 Tipos de endocitosis

La endocitosis, llevada a cabo por todas las células eucariotas, es un proceso que engloba múltiples vías de internalización. Su elevada complejidad, la existencia de redundancia funcional y la multiplicidad de funciones proteicas han dificultado su entendimiento dando lugar a múltiples sistemas de clasificación, incompletos hoy en día (Sandvig et al., 2008; Doherty y McMahon, 2009). La primera clasificación divide las múltiples rutas en dos grupos: la ruta clásica dependiente de clatrina (CME) y las “no clásicas” independientes de clatrina (CIE). Todas ellas incluyen invaginación de membrana seguida de escisión, y finalmente, fusión con la membrana de destino (Figura 8).

La CME, la ruta mejor caracterizada de todas, es dependiente de DNM (McMahon y Boucrot, 2011). Mediante esta vía, nutrientes, antígenos, patógenos (virus SARS, Ebola), una amplia variedad de receptores (receptor de transferrina, de EGF, de tirosín quinasas, acoplados a proteínas G) y sus ligandos son internalizados en vesículas recubiertas por clatrina.

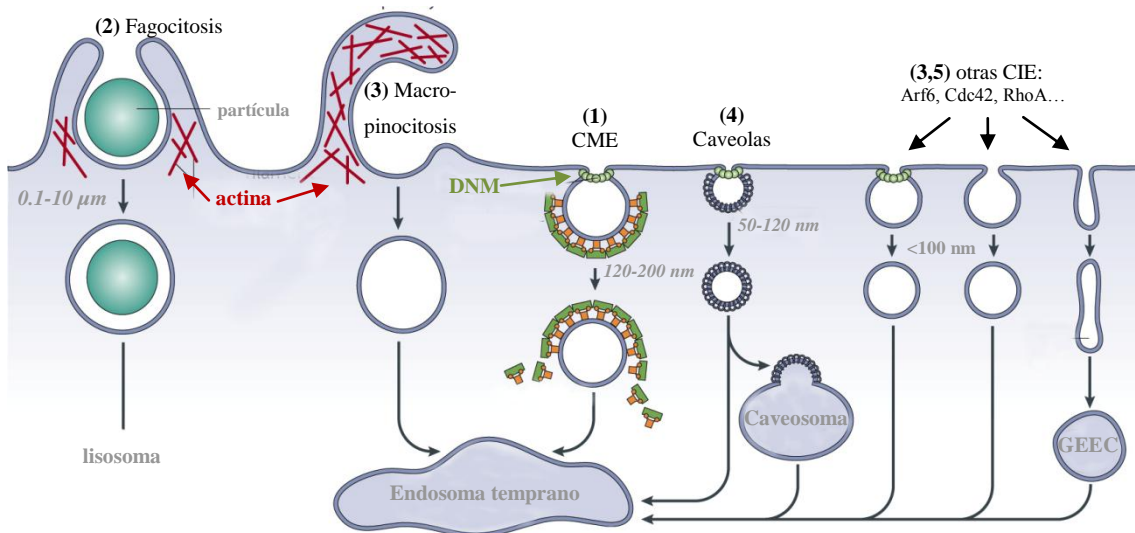


Figura 8. Rutas endocíticas. (1) dependiente de clatrina (CME). Independientes de clatrina (CIE): (2) la fagocitosis, que internaliza grandes partículas; (3) la macropinocitosis; (4) la llevada a cabo a través de caveolas y (5) otras: dependiente de Arf6, RhoA, Cdc42, GEEC, entre otras. Se muestra la dependencia o independencia de DNM (esferas en verde). Modificado de Mayor y Pagano, 2007.

La formación de estas vesículas cubiertas requiere cinco estados (Figura 9): nucleación, selección del cargo, ensamblaje de la cubierta de clatrina, escisión mediada por DNM mediante cambio conformacional bajo hidrólisis de GTP y desensamblaje. Aunque la endocitosis de estos receptores puede estimularse por la unión a ligando, como es el caso del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), otros receptores, por ejemplo el receptor de transferrina, son internalizados constitutivamente (Hopkins et al., 1985).



Figura 9. Formación de vesículas recubiertas por clatrina. 1-el módulo de **nucleación** (formado por proteínas con dominios FHC (FCHO) que reclutan a EPS15, e intersectinas) se ensambla en la membrana gracias a su avidéz por PIP2; 2- **selección del cargo**: el módulo recluta a la proteína adaptadora AP2, que une PIP2, clatrina, interacciona con dominios citoplásmicos de receptores de membrana (selección directa del cargo) o con otras proteínas adaptadoras (selección indirecta del cargo); 3- **ensamblaje de la cubierta de clatrina**, reclutada por AP2 y proteínas accesorias que provocan curvatura de membrana y polimerización de actina; 4- **escisión**, dependiente dinamina, reclutada al cuello de la vesícula por proteínas con dominios BAR (amfifisina, endofilina, SNX9...), que forma un polímero helicoidal alrededor del cuello de la vesícula, pudiendo mediar su escisión mediante cambio conformacional bajo hidrólisis de GTP; 5- **desensamblaje** de la cubierta de clatrina. Modificado de McMahon y Boucrot, 2011.

Las vías de internalización que componen la CIE están peor caracterizadas. Entre ellas se encuentran la endocitosis mediada por caveolas, la fagocitosis, la macropinocitosis, las dependientes de Arf6, flotilina, Cdc42 (también denominada GEEC) o RhoA (también denominada IL-2R β), y la llevada a cabo mediante pliegues dorsales de membrana. Estas vías son las principales responsables de la internalización de membrana y fluido extracelular, pues más del 60 % de dicha internalización se produce a través de ellas (Howes et al., 2010; Sandvig et al., 1987). Algunas son consideradas dependientes o independientes de DNM, aunque realizar dicha clasificación continúa siendo controvertido hoy día (Mayor y Pagano, 2007; Sandvig et al., 2008; Doherty y McMahon, 2009; Kumari et al., 2010; Sandvig et al., 2011, Park et al., 2013). Entre las dependientes de DNM se encuentran la internalización por caveolas (Henley et al., 1998), las dependientes de la GTPasa RhoA y Cdc42, la fagocitosis y la llevada a cabo mediante pliegues dorsales de membrana. Entre las independientes de DNM se encuentran las dependientes de Arf6 o Cdc42, denominada también GEEC (Compartimentos Endosomales tempranos enriquecidos en proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI)), y la macropinocitosis (Mayor y Pagano, 2007; Sandvig et al., 2008; Doherty y McMahon, 2009; Kumari et al., 2010; Sandvig et al., 2011).

Las CIE se consideran independientes de clatrina pero dependiente de “rafts” lipídicos, microdominios de membrana plasmática cuya fluidez es menor a la de su entorno, enriquecidos en colesterol, fosfolípidos saturados y proteínas de membrana, (Hanzal-Bayer y Hancock, 2007). Además de por la necesidad lipídica, las CIE se diferencian de la CME por la dependencia a proteínas de cubierta diferente a clatrina, como la caveolina en endocitosis mediada por caveolas, y por la dependencia de pequeñas GTPasa regulatorias (Arf6, Rho, Rab5, Rac1, Cdc42) que actúan en más de una vía. A través de estas vías ubicuas las células pueden internalizar receptores específicos de membrana (IL-2R β , receptor de citoquinas γ c), toxinas bacterianas (cólera, tétanos), proteínas ancladas a GPI y fluido extracelular. Esta fase fluida, capaz de incorporar marcadores de fase fluida, como el dextrano o la preoxidasa de rábano, puede ser introducida en la célula a través de vías dependientes e independientes de DNM (Cao et al., 2007; Kumari et al., 2010; Sandvig et al., 2011). Una de las rutas de internalización independiente de DNM2 es la macropinocitosis, descrita como una forma de endocitosis, no coordinada directamente por la presencia de cargo, capaz de introducir en la célula grandes volúmenes de fluido a partir de protrusiones de

membrana plasmática dependientes de actina y Rac1 (Kerr y Teasdale, 2009). Esta vía puede operar de manera constitutiva (por ejemplo en células del sistema inmune presentadoras de antígenos) o inducida mediante la activación de receptores tirosín-quinasa (como el receptor EGF) tras la adición de factores de crecimiento. En esta situación las células estimuladas aumentan su polimerización de actina incrementando la internalización de fluidos (Hewlett et al., 1994).

2.6 Dinamina y su relación con el citoesqueleto

El citoesqueleto es una estructura dinámica compuesta en eucariotas por filamentos de actina (o actina F), filamentos intermedios y microtúbulos, que provee de soporte interno e interviene en fenómenos de transporte, tráfico, movilidad y división celular.

En células de mamífero, la DNM y los filamentos de actina intervienen en múltiples formas de endocitosis (CME y CIE), en procesos de migración celular, invasión a través de la matriz extracelular e invasión bacteriana (Menon y Schafer et al., 2013). Los filamentos de actina se encuentran implicados en invaginación de membrana, formación y estabilización de vesículas recubiertas por clatrina, escisión (evento en el que interviene también la DNM) y movimiento de las vesículas formadas. Se ha descrito que la DNM interactúa directa (Gu et al., 2010) e indirectamente (a través de la cortactina o Abp1) (Kaksonen et al., 2000) con los filamentos de actina. El hecho de que la DNM ensamblada (unida a GTP) se una a filamentos de actina *in vitro* podría implicar regulación en el ensamblaje/des-ensamblaje y/o en la forma de dichos filamentos (Gu et al., 2010), mediante unión directa o a través de proteínas con las cuales interactúa, como la cortactina (implicada en nucleación a través del complejo Arp2/3) (Weaver et al., 2001). Por tanto, ambas proteínas muestran interdependencia durante la endocitosis. Además de estar implicada en eventos endocíticos, la DNM (especialmente la DNM2) se asocia a estructuras ricas en filamentos de actina como podosomas e invadopodia (degradándolos), cometas y pedestales (favoreciendo la entrada de ciertos patógenos), lamellipodia, pliegues de membrana y fagocitosis (regulando su formación) (Buccione et al., 2004; Orth et al., 2002; McNiven et al., 2000; Gold et al., 1999).

Desde su descubrimiento como proteína de unión a microtúbulos la DNM se ha visto implicada en procesos dependientes de éstos (Menon y Schafer, 2013), incluyendo inestabilidad dinámica de los mismos, mitosis o mantenimiento de la estructura centrosomal (Tanabe y Takei, 2009; Thompson et al., 2002, 2004). La DNM no colocaliza con los microtúbulos en células en interfase, aunque sí colocaliza con la γ -tubulina en centrosomas durante la interfase y la mitosis Thompson et al., 2004. También se asocia a los microtúbulos durante la mitosis (“mid zone spindle”) y la citocinesis (“midbody”) desempeñando un papel esencial en la separación de las células hijas, por lo que su carencia afecta negativamente al proceso, enlenteciéndolo (Thompson et al., 2002). Además, se ha descrito que la disfunción de la dinámica de los microtúbulos observada en células carentes de DNM afecta al transporte de organelas, a la formación del aparato de Golgi y a la degradación lisosomal y que este efecto es independiente de su actividad GTPasa (Kaverina et al., 1999; Tanabe y Take, 2009, 2012). Estas células contienen altos niveles de tubulina acetilada y de-tirosinada (marcadores de estabilidad), siendo requerida la DNM en el inicio y el mantenimiento de la dinámica de crecimiento/acortamiento (Tanabe y Takei, 2012).

2.7 Enfermedades asociadas a la ausencia de dinamina

Mutaciones en el gen que codifica la DNM2 han sido ligadas a dos enfermedades: “Charcot Marie Tooth” (CMT) (Zuchner et al., 2005; Tanabe y Takei, 2012), una neuropatía sensorial y motora que afecta al sistema nervioso periférico, y la miopatía centronuclear (CNM) (Böhm et al, 2012; Durieux et al., 2010), un desorden resultante en degeneración muscular.

La CMT se caracteriza por falta de mielina o des-mielinización, que afecta a la velocidad de la señal nerviosa, y estructura del axón (que provoca una menor amplitud de la misma) (Sidiropoulos et al., 2012). La DNM2, uno de los más de 60 genes implicados en esta enfermedad, se asocia a un subtipo denominado CMT-B, que presenta una disminución moderada de la velocidad de conducción, pérdida de axones con mielina y exceso de mielina localizado, entre otras características (Zuchner et al., 2005). La gran mayoría de las mutaciones asociadas este desorden localizan en la región amino terminal del dominio PH (responsable de unión a fosfolípidos) (Zheng et

al., 1996), afectando a su localización en membrana, a la activación de proteínas y por tanto, a su función (Vallis et al., 1999; Tanabe y Takei, 2009). Sin embargo, los mecanismos celulares por los cuales mutaciones en este gen producen esta enfermedad parecen ser diferentes según la mutación, pues mientras el mutante K558E afectó negativamente la función endocítica, el 551Δ3 perturbó la dinámica de microtúbulos (Tanabe y Takei, 2012). Además, todos los mutantes de DNM encontrados en CMT afectaron solamente a la isoforma 2 y no a la 1, sugiriendo la inexistencia de redundancia funcional entre estas isoformas.

La CNM se caracteriza por la localización nuclear céntrica en células musculares esqueléticas, la disposición radial de las fibras sarcoplásmicas y la aparición de una debilidad muscular progresiva. Esta enfermedad se asocia a mutaciones localizadas en dominio MD y en la zona límite entre los dominos PH-GED de la DNM2 (Kenniston et al., 2010, Sidiropoulos et al., 2012). In vitro, se ha descrito que mientras algunos mutantes de DNM 2 asociados a CNM disminuyen su unión a membrana (Zuchner et al. 2005), otros (mutación localizada en región C-terminal del dominio PH) elevan su actividad GTPasa sin afectan a su unión a PIP2 (Kenniston et al., 2010). A nivel celular, ciertos mutantes se han asociado con interferencias con el centrosoma (R369W and R465W), alteración de la dinámica de microtúbulos y defectos en la formación del complejo de Golgi (D555_E557) (Zuchner et al., 2005; Tanabe y Takei, 2009) o inhibición de la internalización de tfn a través de la CME (R465W, V625_, E650) (Bitoun et al., 2009; Tanabe y Takei, 2009). Además, fibroblastos de pacientes con CNM (R465W) mostraron deficiencia en esta vía (Bitoun et al., 2009) al igual que fibroblastos embrionarios de ratones homocigotos para esta mutación (Durieux et al., 2010).

OBJETIVOS

1-Investigar la presencia de hSNF5 en el citoplasma y caracterizar su tráfico núcleo citoplásmico.

2-Determinar la función desempeñada por la proteína hSNF5 en el citoplasma:

2.1 Identificar proteínas que interaccionen con hSNF5 en el citoplasma

2.2 Analizar las consecuencias funcionales de las interacciones identificadas

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ORGANISMOS

En esta tesis se han utilizado bacterias, levaduras y líneas celulares de origen animal. La bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*) se utilizó como herramienta para la biología molecular del DNA y la obtención de proteínas recombinantes (Tabla 2). La levadura *S.cerevisiae* se utilizó para llevar a cabo el escrutinio de doble híbrido y la caracterización de dominios esenciales en la interacción entre proteínas (Tabla 3). El uso de líneas celulares animales (Tabla 4) permitió conocer la localización celular de las proteínas en estudio y llevar a cabo ensayos proteómicos y funcionales.

Tabla 2. Características genotípicas más importantes de las estirpes de *E. coli* utilizadas

ESTIRPE	GENOTIPO
DH5α	<i>F-endA1 gyrA96 hsdR17 ΔlacU16 9(f80lacZΔM15) recA1 relA1 supE44 thi-1</i> (Hanahan, 1983)
BL21 (DE)	<i>hsdS gal (λcls857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene1)</i> (Studier y Moffatt, 1986)

Tabla 3. Características genotípicas más importantes de la estirpe de *S.cerevisiae* utilizada

ESTIRPE	GENOTIPO
MaV203	<i>MATa leu2-3 112 trp1-901 his3Δ200 ade2-101 gal4Δ gal80Δ SPAL10::URA3</i> <i>GAL1::lacZ HIS3_{UAS} GAL1::HIS3@LYS2 can1^R cyh2^R</i> (ProQuest Two-Hybrid System ,GibcoBRL)

Tabla 4. Características más importantes de las líneas celulares utilizadas

LÍNEA CELULAR	ESPECIE	ORIGEN	MEDIO DE CULTIVO	PROCEDENCIA
HeLa	Homo sapiens	Epitelio procedente de un carcinoma cervical	DMEM	Dra. R.M. Ríos Cabimer, Sevilla (España)
293T	Homo sapiens	Epitelio derivado de riñón		Dr. A. López Cabimer, Sevilla (España)
COS7	Cercopithecus aethiops	Epitelio derivado de riñón		Dr. Fdez-Chacón US, Sevilla (España)
RPE1	Homo sapiens	Epitelio de retina	DMEM/F12	Clontech

2. ANTICUERPOS

A continuación se detallan los anticuerpos primarios (Tabla 5) y secundarios (Tabla 6) utilizados indicando el antígeno que reconocen, su origen, procedencia y las diluciones usadas para Inmunofluorescencia (IF) y Western-Blot (WB).

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados

ANTICUERPO ANTI	ANTÍGENO	ORIGEN	PROCEDENCIA	IF	WB
Flag M2	DYKDDDDK	Ratón Monoclonal	Sigma Ref. F1804	1:200	1:1000
Flag	DYKDDDDK	Conejo Policlonal	Sigma Ref. F7425	1:100	1:500
Ha (HA-7)	YPYDVPDYA	Ratón Monoclonal	Sigma Ref. H9658	-	1:1000
HA High Affinity	YPYDVPDYA	Rata Monoclonal	Roche Ref. 11867423001	1:200	1:1000
HIS	HHHHHH	Ratón Monoclonal	Amersham Ref.27471010	-	1:3000
GST	GST	Conejo Policlonal	Dr. J.C.Reyes, Cabimer, Sevilla (España)	-	1:2000
GFP	GFP	Cabra Policlonal	Abcam Ref. ab6673	1:5000	1:200
α -Tubulina	α -Tubulina	Ratón Monoclonal	Sigma Ref. T9026	1:1000	1:3000
BRG1	aa 209-296 (humana)	Conejo Policlonal	Santa Cruz Ref. sc-10768	1:100	1:500
BRM	aa 48-214 (humana)	Conejo Policlonal	Abcam Ref. ab15597	1:500	1:1000
BAF180	aa 1-50 (humana)	Conejo Policlonal	Bethyl Ref. A301590A	-	1:200
R-hSNF5	hSNF5 (humana)	Ratón Monoclonal	Abcam Ref. ab88589	1:50	1:300
C-hSNF5	C-terminal (humana)	Cabra Policlonal	Santa Cruz Ref. sc-16189	1:25	1:300
DNM2	C-terminal (humana)	Cabra Policlonal	Santa Cruz Ref. sc-6400	1:100	1:400
SP70	HSP70 (humana)	Ratón Monoclonal	Santa Cruz Ref. sc-24	-	1:5000
GAPDH	GAPDH (humana)	Ratón Monoclonal	Santa Cruz Ref. sc-47724	-	1:10000
CAD	N-terminal (humana)	Conejo Monoclonal	Abcam Ref. ab40800	1:100	1:800
Calnexina	C-terminal (perro)	Conejo Policlonal	Abcam Ref. ab75801	1:200	1:2000

Tabla 6. Anticuerpos secundarios utilizados

ANTICUERPO ANTI	ORIGEN	CONJUGADO	PROCEDENCIA	IF	WB
Ratón IgG (H+L)	Cabra	Alexa Fluor 488	Invitrogen Ref. A-11029	1:400	-
Cabra IgG (H+L)	Burro	Alexa Fluor 488	Invitrogen Ref. A-11055	1:400	-
Conejo IgG (H+L)	Mono	FITC	Jackson ImmunoResearch Ref. 111095144	1:150	-
Cabra IgG (H+L)	Burro	Cy3	Jackson ImmunoResearch Ref. 705165003	1:400	-
Mouse IgG (H+L)	Burro	Cy5	Jackson ImmunoResearch Ref. 715175151	1:400	-
Rata IgG (H+L)	Burro	Cy3	Jackson ImmunoResearch Ref. 712165153	1:400	-
Conejo IgG	Cabra	Peroxidasa de Rábano	Sigma Ref. A-0545	-	1:10000
Cabra IgG	Conejo	Peroxidasa de Rábano	Sigma Ref. A-5420	-	1:50000
Ratón IgG	Cabra	Peroxidasa de Rábano	Sigma Ref. A-4416	-	1:5000
Rata IgG	Conejo	Peroxidasa de Rábano	Sigma Ref. A-5795	-	1:50000

3. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados como herramientas en la biología molecular del DNA se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')
DNM2 F1	AGAGTCACTGCCGACCCTTC
DNM2F2	CAGAGCAGAGGAATGTCTAC
hSNF5 Nt F	AAGCTAGCATGAGCAAGACCTTCGGGCAG
hSNF5 Nt R	TGCGCATCTAAGGCAGAGGCCTTAGCATG
hSNF5 Rpt1 F	TGGCTAGCTCCACAACCATCAACAGGAAC
hSNF5 Rpt1 R	CCAGGCCTTAGGACTCGATCTGCTGTCTG
hSNF5 Rpt2 F	TCGCTAGCTACCCACGGACAGCATCC
hSNF5 Rpt2 R	TGAGGCCTTAGGTCTTCTGATGCCAGCTC
hSNF5 HR3 F	AGGCTAGCTGGCATCAGAAGACCTACGC
hSNF5 HR3 R	GGAGGCCTTGTGCTGATGGGCTGGTTAC
hSNF5 Rpt1cola F	CGAGGTGCTGGAGTCCTACCCACGGACAG

hSNF5 Rpt1cola R	GGTAGGACTCCAGCACCTCGGGCTGAGATG
hSNF5 Rpt2 cola F	AGACCAGCGCAGCTGGCATCAGAAGACCTAC
hSNF5 Rpt2cola R	GATGCCAGCTGCGCTGGTCTGACTGGTCCTC
hSNF5 ΔNES F	CCAGCGCGTTCGTGGACCAGTTTGAGTGGG
hSNF5 ΔNES R	ACTGGTCCACGACGCGCTGGTCTGACTGG
DNM2 Δ GTPasa F	AGGTCGACGCAGAGCCAACCTGCTGTCCCTG
DNM2 Δ MD R	GATTGGGTATGGTCTTGCGCGTGGGGTCATC
DNM2 Δ MD F	GCGCAAGACCATAACCAATCAGGGGGAGATC
DNM2Δ PH R	TCCAGCTGTCGATATTGTTGATGGTCAACC
DNM2 Δ PH F	CAACAATATCGACAGCTGGAAGGCTTCGTT
DNM2 Δ GED R	TGGACACGGTCTCTGCCTGGTCCCTTCTCTG
DNM2 Δ GED F	CCAGGCAGAGACCGTGTCCACACCCGTG
DNM2 Δ PRD R	GGGCGGCCGCTTAGGTGTTTTGGAGCCACGTG
Q*-GAPDH F	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
Q-GAPDH R	AATGAAGGGGTCATTGATGG
Q-DNM2 F	GCTGGCCAAGGAAGTCGAT
Q-DNM2 R	CACGCCAATGTAGCCTCTTCT
Q-hSNF5 F	CAGACGCTGAGATGGAGAAGAA
Q-hSNF5 R	CCTCATCCGCCTCGTGTT
si**hSNF5	GUUGAUGACGCCUGAGAUG
sihSNF5.2	GAGAUACCCUCACUCUGG
siBRG1	GCGACUCACUGACGGAGAA
sihBRM	GAAAGGAGGUGCUAAGACA
siDNM2	GCACGCAGCUGAACAAAGAA
siControl	siC001 (Dharmacon)

*: oligonucleótidos utilizados en reacciones de PCR cuantitativas relativas; **:RNA interferencia.

4. CONDICIONES DE CULTIVO

4.1 Condiciones de cultivo bacterianas

Las estirpes bacterianas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook, 1989) autoclavado y suplementado, cuando era necesario, con ampicilina 100 µg/ml o kanamicina 25 µg/ml. El cultivo sólido de estas cepas se llevó a cabo en estufas a 37 °C. El cultivo líquido requirió además agitación orbital continua.

LB: NaCl 10 g/l, bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l. Añadir 15 g/l de bactoagar para la obtención de medio sólido.

4.2 Condiciones de cultivo de levaduras

La estirpe MaV203 se cultivó habitualmente en medio rico YPAD, con el objetivo de obtener biomasa para llevar a cabo los ensayos experimentales, o en medio mínimo SC, necesario para testar fenotipos específicos en ensayos de transformación. En este caso, el medio mínimo SC sin Leucina (Leu), Triptófano (Trp) ni Histidina (His), se complementó con los aminoácidos necesarios para cada condición experimental. El cultivo sólido se llevó a cabo en estufas a 30 °C. El cultivo líquido requirió además agitación orbital continua.

YPAD: extracto de levadura, triptona 20 g/l, glucosa 20 g/l, adenina sulfato 0,1 g/l. Añadir bactoagar 20 g/l para obtener medio sólido. Esterilizar a 121 °C 15 min.

SC: Añadir al contenido de cada sobre (Q·BIOgene) 1 l de agua destilada. Añadir bactoagar 20 g/l para obtener medio sólido. Esterilizar a 121 °C 15 min. Tras su enfriamiento parcial añadir los requerimientos aminoacídicos necesarios (0,8 mM Leu, 0,32 mM Trp y/o 0,8 mM His) procedentes de soluciones previamente filtradas.

4.3 Condiciones de cultivo de líneas celulares animales

Las células HeLa, 293T y COS7 se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) y suplementado con suero fetal bovino al 10%, estreptomycinina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml. Las células RPE1 se cultivaron en medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino al 10%, estreptomycinina 100 µg/ml y penicilina 100 U/ml. Todos los cultivos se mantuvieron en una atmósfera húmeda, a 37°C, y con CO₂ al 5%.

5. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DEL DNA

5.1 Aislamiento de DNA plasmídico bacteriano

El aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se llevó a cabo mediante el método de lisis alcalina (Sambrook and Gething, 1989). Las células contenidas en 2 ml de cultivo se recogieron por centrifugación a 9000 g 5 min. El precipitado se resuspendió en 100 µl de la Solución I y tras 5 min a temperatura ambiente (RT) se

añadieron 200 µl de la Solución II, invirtiendo la mezcla varias veces e incubando posteriormente 5 min en hielo. Tras la adición de 150 µl de la Solución III, la mezcla resultante se invirtió varias veces y posteriormente se incubó 5 min en hielo. Las proteínas, el DNA cromosómico y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 13000 g 5 min. La precipitación del DNA plasmídico se llevó a cabo utilizando dos volúmenes de etanol al 96%, incubando 10 min a -20 °C y centrifugando posteriormente 13000 g 5 min. Al precipitado obtenido se añadió etanol al 70°C con el objetivo de eliminar las sales, se volvió a centrifugar y finalmente el precipitado resultante se resuspendió en TE. Para la obtención de DNA plasmídico más puro o a ,mediana y gran escala se utilizaron los sistemas comerciales Favorgene o JET Star (Genomed), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Solución I: 50 mM Glucosa, 25 mM tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0.

Solución II: 0,2 M NaOH, 1% SDS.

Solución III: 3 M KAc, 11,5% ácido acético glacial.

TE: 10 mM tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0.

5.2 Aislamiento de DNA plasmídico de levaduras

Las células cultivadas en 2 ml de medio selectivo a 30°C durante 12-14 h se recogieron por centrifugación a 3000 g 5 min y se resuspendieron en 100 µl de STET. Se añadió 0,2 g de perlas de vidrio de 0,45 mm y la mezcla se agitó vigorosamente durante 5 min. Tras añadir otros 100 µl de STET, se hirvió a 100°C durante 3 min y posteriormente se centrifugó a 13000 g durante 10 min a 4°C. A 150 µl del sobrenadante obtenido se le añadió 75 µl de acetato de amonio 7,5 M y tras incubar 1 h a -20°C, se centrifugó a 13000 g durante 10 min a 4°C. La precipitación del DNA plasmídico presente en la fase acuosa se llevó a cabo utilizando dos vol. (volúmenes) de etanol al 96%, incubando 10 min a -20°C y centrifugando posteriormente. Al precipitado obtenido se añadió etanol al 70°C y se resuspendió en agua. Debido a que los vectores aislados eran de bajo número de copias, el DNA extraído necesitó ser posteriormente amplificado en *E.coli*.

STET: 8% sacarosa, 50 mM tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 5%, Triton X-100.

5.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se llevó según el método de Sambrook (Sambrook, 1989). Los geles de agarosa se prepararon en tampón TBE 0,5X a una concentración 0,8-2% dependiendo del tamaño de los fragmentos a analizar. A los geles se les añadió BrEt (5 µg/ml) que permitió visualizar el DNA exponiéndolo a luz ultravioleta. A las muestras se les añadió 1/10 vol. de tampón de carga. Para determinar el tamaño de los fragmentos se empleó un patrón comercial. La electroforesis se realizó en sistemas horizontales Wide Mini- Sub Cell GT (Biorad).

TBE 1X: tris 18,78 g/l, ácido bórico 5,5 g/l, EDTA disodium·2H₂O 0,74 g/l.

Tampón de carga de DNA: 0,25% azul de bromofenol, 0,25 % xileno-cianol, 30% glicerol.

5.4 Purificación, cuantificación y secuenciación de DNA

Para la extracción de DNA de la agarosa y la purificación del DNA plasmídico bacteriano obtenido a pequeña escala se usó el sistema comercial Favorgene siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración de DNA en solución se estimó por espectrofotometría (ND-1000; nanodrop). La secuenciación de fragmentos de DNA la realizó la empresa Secugen (Madrid, España)

5.5 Manipulación enzimática

Las diferentes enzimas empleadas en la manipulación del DNA tales como endonucleasas de restricción (Takara; GE Healthcare; New England Biolabs), polimerasa de DNA, Klenow, fosfatasa alcalina (Roche) y la ligasa T4 (Invitrogen) se utilizaron según las instrucciones del fabricante.

5.6 Amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación de fragmentos de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el termociclador T-personal (Biometra). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la reacción (Tabla M6) fueron

sintetizados por Sigma. Para cada reacción se utilizaron las siguientes condiciones estándar: 1 μ M de cada oligonucleótido, 5 μ l de tampón de PCR comercial 10X, 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido, 20-50 ng de DNA molde, 2,5 U de polimerasa de DNA (Ecotaq; C-viral) y H₂O Milli-Q estéril hasta un vol. total de 50 μ l. Para alcanzar una elevada fiabilidad en la síntesis se utilizó la polimerasa del sistema comercial Expand High Fidelity PCR System (Roche). La reacción tipo constó de 1 ciclo de 5 min a 95°C; 20-30 ciclos de 1 min a 94°C seguido de 1 min a la temperatura de apareamiento de los oligonucleótidos al DNA molde y posteriormente 1 min/Kb DNA a amplificar a 72°C; para finalizar, 1 ciclo de 10 min a 72°C.

5.7 Transformación de bacterias

La transformación de *E.coli* se llevó a cabo mediante transformación por choque térmico o por electroporación. En la transformación por choque térmico 100 μ l de células competentes se mezclaron con 50 ng de DNA. Dicha mezcla se incubó en hielo 30 min y a continuación se sometió a un choque térmico de 42°C durante 45 s. En la transformación por electroporación, 50 μ l de células competentes se mezclaron con 100 ng de DNA. Dicha mezcla se incubó 1 min en hielo, se colocó en el interior de una cubeta de electroporación previamente enfriada en hielo y se le suministró un choque eléctrico de 2500 V y 15 μ F. Tras el choque térmico o eléctrico se añadió 0,9 ml de LB a la mezcla que se incubó posteriormente durante 60-90 min a 37°C. Transcurrido este tiempo se recogieron las células por centrifugación y se sembraron en medio LB sólido o bien se añadieron a cultivo líquido cuando fue necesario realizar ensayos de síntesis y purificación de proteínas. En ambos casos, el medio se suplementó con el antibiótico adecuado para seleccionar aquellas bacterias portadoras del plásmido que contenga el gen de resistencia.

Las transformaciones rutinarias se llevaron a cabo en la estirpe DH5 α mediante choque térmico o electroporación. Si el objetivo residía en la síntesis y posterior purificación de proteínas recombinantes, la estirpe BL21 (DE) fue la escogida.

5.8 Transformación de levaduras

La transformación de levaduras se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Ito (Ito, 1983) y posteriormente modificado por Gietz (Gietz, 1992). Dicho método se utilizó para obtener el escrutinio en el ensayo de de doble híbrido y para la posterior verificación y análisis de las interacciones. Para transformaciones rutinarias se resuspendió en medio YPAD líquido biomasa de la estirpe Mav203 cultivada en medio YPAD sólido a 30°C 16 h. Tras medir su densidad óptica a 600 nm (DO_{600}), se inoculó un cultivo del mismo medio a una DO_{600} de 0,1 y se incubó unas 5 h a 30°C hasta obtener una DO_{600} de 0,4. Una vez alcanzada la DO_{600} deseada el cultivo se centrifugó 5 min a 3000 g y el precipitado se resuspendió en H₂O Milli-Q (1/5 del vol. del cultivo inicial). Tras centrifugar durante 5 min a 3000 g el precipitado obtenido se resuspendió en 1/100 vol. de TE/LiAc obteniendo así células competentes. Por transformación se mezclaron 100 µl de células competentes con 0,5 µg de DNA, 50 µg de DNA de esperma de salmón y 600 µl de PEG/TE/LiAc. Tras incubarla 30°C 30 min la mezcla se sometió a choque térmico durante 15 min a 42°C, se centrifugó 30 s a 15000 g y finalmente el precipitado resultante se resuspendió en 100 µl de H₂O Milli-Q estéril procediendo a su siembra en placas de medio selectivo. Las placas se incubaron 48-72 h a 30°C.

TE/LiAc: 10 mM tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA pH 7,5, 0,1 M LiAc.

PEG/TE/LiAc: 10 mM tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA pH 7,5, 0,1 M LiAc, 40 % PEG-3350 al 50%.

5.9 Transfección transitoria de líneas celulares animales

5.9.1 Fosfato cálcico

Se utilizó el método clásico descrito, con algunas modificaciones (Graham, 1973). Aproximadamente 4 horas antes de la transfección el medio de células 293T cultivadas al 50-70% de confluencia se reemplazó por medio nuevo (1/2 vol. inicial). Para transfectar células cultivadas en placas de 56,7 cm², se diluyó 20 µg de DNA (18 µg de DNA específico y 2 µg de DNA que exprese GFP) en un vol. final de 250 µl de H₂O Milli-Q y se mezcló con 250 µl de HBS 2X. Mientras esta solución se agitaba, se

añadió gota a gota 50 μ l de 1,25 M CaCl_2 . La solución de transfección resultante se incubó durante 20 min a RT antes de añadirla al cultivo gota a gota. Aproximadamente 12 h después el medio de cultivo se sustituyó por medio de cultivo completo y 12-24 h más tarde se procedió a su análisis.

PBS 1X: 136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 1,4 mM KH_2PO_4 . Autoclavar.

HBS 2X: 280 mM NaCl, 0,8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,05 mM Hepes. Ajustar el pH a 7,05, filtrar y congelar a -20°C .

CaCl₂: 1,25 M CaCl_2 . Filtrar y congelar a -20°C .

5.9.2 Lipídico

Las células HeLa, COS7 o RPE1 se transfectaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). El día previo a la transfección, se cultivó la cantidad de células necesaria para que al día siguiente éstas estuvieran al 70-80% de confluencia. 1 h antes de la transfección el medio de cultivo se sustituyó por medio sin antibiótico. Para transfectar células cultivadas en placas de 9,4 cm^2 se mezcló por un lado 4 μ g de DNA en 250 de Opti-MEM (Gibco) y por el otro, 10 μ l de Lipofectamina con 240 μ l de Opti-MEM (la cantidad de Lipofectamina varió según toxicidad celular). Tras incubar 5 min ambas soluciones por separado se mezclaron e incubaron 20 min más. Pasado este tiempo la mezcla de transfección se añadió gota a gota sobre las células cultivadas en 1,5 ml de medio sin antibiótico. Aproximadamente 6 h más tarde se sustituyó el medio por medio de cultivo completo y 12-24 h más tarde se procesaron las células para su análisis.

6. MANIPULACIÓN DEL RNA

6.1 Aislamiento y cuantificación del RNA de líneas celulares animales

El aislamiento de RNA se llevó a cabo con el sistema RNeasy mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación se estimó por espectrofotometría a $\text{DO}_{260\text{nm}}$. La visualización de RNA se llevó a cabo en geles de agarosa al 0,8% en tampón TBE 0,5X teñidos con BrET (5 μ g/ml).

6.2 Reacción de retrotranscripción a partir de RNA seguido de amplificación de cDNA mediante PCR

Este protocolo se llevó a cabo en dos etapas. La primera consistió en obtener cDNA total a partir de RNA (1 µg/reacción) mediante la acción de la enzima retrotranscriptasa utilizando el sistema Super-Script™ First strand Síntesis for RT-PCR (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Como control, una de las reacciones careció de enzima retrotranscriptasa. La segunda etapa consistió en una reacción de PCR utilizando 0,5-2 µl de la reacción de retrotranscripción obtenida en el paso previo. Las reacciones de PCR cuantitativas se realizaron con un termociclador de PCR a tiempo real (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems, 7500 System Software V1.4.0). Los oligonucleótidos empleados (diseñados por el programa Primer 3 Plus) presentan eficiencias de amplificación prácticamente idénticas (Tabla M6). Para testarlos, se realizó una recta patrón a partir de diluciones seriadas de una muestra de cDNA por par de oligonucleótidos y se comprobó si las pendientes de las rectas eran paralelas y si tenían un valor cercano a -3.3 y 3.4. Para cada reacción de PCR cuantitativa relativa se utilizaron las siguientes condiciones estándar: 7,5 µl de agua, 5 µM de cada oligonucleotido, 2,5 µl de cDNA de la dilución escogida tras realizar la recta patrón, 12,5 µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) que contiene el fluorocromo SYBR® Green, la ampliTaQ Gold DNA polimerasa, la DNA polimerasa LD, dNTPs con mezcla de dUTP/dTTP, el fluorocromo ROX como referencia pasiva y un tampón optimizado para la reacción. La reacción tipo constó de 1 ciclo de 10 min a 95 °C; 40 ciclos de 15 s a 95°C seguido de 1 min a 65°C; 1 ciclo de disociación que consiste en 15 s a 95°C, 1 min a 65°C, 15 s a 95°C y 15 s a 60°C. Los valores fueron normalizados respecto a la expresión del gen *GAPDH*.

6.3 Transfección de RNA de interferencia

Para inhibir la síntesis de distintas proteínas se utilizaron RNA de interferencia (Tabla M6) suministrados por Dharmacon Research (Lafayette, CO). La transfección transitoria de siRNA en líneas celulares se llevó a cabo usando Oligofectamina (Invitrogen; Ref. 12252-011). El día previo a la transfección, se sembró la cantidad de células necesaria para que al día siguiente éstas estuvieran al 20-30 % de confluencia.

12 h antes de la transfección el medio de cultivo se sustituyó por medio de cultivo sin antibióticos. Para transfectar células cultivadas en placas de 9,6 cm² (NUNC; Ref. 140675), se mezcló por un lado 2 µl de siRNA a 50 µM en 175 µl de Opti-MEM, y por el otro, 4 µl de Oligofectamina en 15 µl de Opti-MEM. Tras incubar 7 min ambas soluciones por separado, se mezclaron e incubaron 20 min más. Durante este periodo el medio de las células se sustituyó por Opti-MEM (0,8 ml/pocillo). Finalmente, la mezcla de transfección se añadió gota a gota sobre las células en cultivo. Aproximadamente 6 h después se sustituyó el medio por medio de cultivo completo y 72 h más tarde se procesaron las células para su análisis.

7. SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

7.1 Síntesis de proteínas recombinantes en *E.coli*

Durante la realización de este trabajo se han utilizado dos sistemas de expresión heteróloga en *E.coli*. Un sistema basado en el promotor tac, para el que fue necesario la utilización del plásmido pGex (Amersham Biosciences), que permitió la expresión de proteínas fusionadas a la proteína Glutación-S-transferasa (GST). Estos plásmidos se basan en la síntesis constitutiva del represor LacI, a partir del gen *lacI^q*, que se une a la región operadora del promotor tac impidiendo su expresión. La presencia del análogo de la lactosa isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) libera al represor permitiendo la expresión génica.

El sistema basado en el promotor del fago T7 supuso la utilización de plásmidos de la serie pET (Novagen), que permitió la síntesis de proteínas con una secuencia de seis residuos de histidina en su extremo amino o carboxilo terminal. Para la expresión del gen de interés se requirió la utilización de la estirpe BL21 (DE), que porta en el cromosoma el gen codificante para la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. Dicha construcción también es inducible por IPTG.

Para la inducción se inocularon 0,25-1,5 l de LB suplementado con el antibiótico requerido con células BL21 (DE) electroporadas con el plásmido deseado. El cultivo se

mantuvo a 37°C en agitación orbital hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,5, momento en el que se le añadió IPTG 0,5-1 mM. Tras la adición de IPTG, el cultivo se incubó 3 h a 26-30°C en agitación orbital. Las células se recogieron por centrifugación 10 min a 9000 g y el precipitado se congeló a -80°C durante 1 h.

7.2 Obtención de extractos celulares de *E.coli*

Para la obtención de extractos celulares de *E.coli* se utilizó el método de rotura por ultrasonidos. En primer lugar se recogieron las células por centrifugación y el precipitado celular obtenido se resuspendió en 6-40 ml de tampón adecuado suplementado con fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) 1 mM. La suspensión celular, mantenida en hielo se sometió a un tratamiento con ultrasonidos que consistió en 4-7 pulsos de 15 s y 40% amplitud, alternados con ciclos de 1 min en los que se cesaba el tratamiento para evitar el excesivo calentamiento de la muestra. Tras la rotura por ultrasonido se añadió Tritón X-100 a una concentración final del 1% y se agitó suavemente la suspensión 30 min a RT. Finalmente se sometió a centrifugación a 18000 g 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se consideró el extracto crudo libre de células.

PMSF: 17,42 g/l disuelto en isopropanol.

7.3 Obtención de extractos proteicos de líneas celulares animales

La preparación de extractos proteicos procedentes de líneas celulares animales se llevó a cabo mediante dos métodos, según se deseara obtener extractos enriquecidos en proteínas nucleares y/o citoplásmicas. Todos los pasos se llevaron a cabo a 4° C.

Para la obtención de un extracto proteico, formado por proteínas nucleares y citoplásmicas, las células en cultivo se recogieron mecánicamente en PBS 1X y se centrifugaron 5 min a 3000g. Los precipitados obtenidos se resuspendieron en tampón IP (10⁶ células/ 50 µl tampón de lisis) y se incubaron 10 min en agitación suave. El sobrenadante obtenido tras centrifugar el lisado 10 min 16000 g correspondió al extracto de proteínas solubles.

La obtención de extractos enriquecidos en proteínas nucleares o citoplásmicas se llevó a cabo mediante el método descrito por Cereghini y colaboradores (Cereghini et

al., 1988), con algunas modificaciones. En primer lugar, a $6-8 \cdot 10^6$ de células recogidas por centrifugación a 2500 g 5 min se les añadió 200 μ l de tampón HNB hasta su total resuspensión. A continuación, se añadió gota a gota y en agitación leve 100 μ l de tampón HNB suplementado con NP-40 al 1% y la mezcla resultante se incubó en hielo 5 min. El lisado se centrifugó a 2500 g 3 min obteniendo en el sobrenadante resultante el extracto citoplásmico deseado. El precipitado contuvo los núcleos celulares que fueron resuspendidos en 25 μ l de NEB y a los que se les añadió otros 25 μ l de NEB suplementado con NaCl 0,7 M. El lisado se incubó 15 min a 4°C en agitación y posteriormente se centrifugó a 12500 g 15 min. El sobrenadante constituyó el extracto nuclear.

Tampón IP: 50 mM tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1,5 mM de EDTA, 1% Tritón X-100, 1 mM PMSF, una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche).

HNB: 0,5 M sacarosa, 15 mM tris-HCl pH7,5, 60 mM KCl, 0,25 mM EDTA pH 8,0, 0,125 mM EGTA pH 8,0, 0,5 mM espermidina, 0,15 mM espermina, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche).

NEB: 20 mM Hepes pH 7,9, 25% glicerol, 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM EDTA pH 8,0, 0,5 mM DTT, 0,14 M NaCl, 0,5mM PMSF, una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche).

7.4 Purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad

Para la purificación de proteínas fusionadas a la GST en *E.coli* se utilizaron columnas con matriz de Glutation Sefarosa 4B (Amershan Bioscience). Al extracto crudo de proteínas se le añadió 0,2 ml de matriz, previamente equilibrada en PBS 1X, por l de cultivo inducido. La mezcla se mantuvo en agitación suave 1h a 4°C para permitir la unión de la proteína a la matriz. Tras empaquetar la matriz en una columna, dicha columna se lavó con 10 ml de PBS 1X dejando decantar por gravedad. Se llevaron a cabo un par de eluciones añadiendo en cada una 1 vol (referido a la cantidad de matriz utilizada) de tampón de elución G a la matriz e incubando 10 min a RT. Las fracciones se analizaron posteriormente por electroforesis de proteínas.

Para la purificación de proteínas con cola de histidinas se utilizó la matriz Hisbind ResinTM (Novagen). Al extracto crudo de proteínas realizado en tampón de unión se le añadió 0,5 ml de matriz cargada con 100 mM de NiSO₄ y equilibrada en tampón de unión por l de cultivo inducido. La mezcla se mantuvo en agitación suave 1 h a 4°C para

permitir la unión de la proteína a la matriz. Tras empaquetar la matriz en una columna, se procedió a su lavado con 10 vol. (referido a la cantidad de matriz utilizada) de tampón de unión seguido de 6 vol. de tampón de lavado, cuya concentración de imidazol permitió la eliminación de proteínas contaminantes. Finalmente, se llevaron a cabo tres eluciones añadiendo en cada una 4 vol. de tampón de elución 1 (E1), 2 (E2) y 3 (E3) de forma secuencial e incubando 10 min en hielo en cada caso. Las fracciones recogidas se analizaron posteriormente por electroforesis de proteínas.

La purificación de las proteínas GST, GST-hSNF5 y His-DNM2 utilizadas en los ensayos de actividad GTPasa y sedimentación se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC) utilizando tampón de unión, lavado y elución FPLC. Una pequeña fracción de las eluciones obtenidas se analizó por electroforesis de proteínas. Las fracciones proteicas purificadas fueron posteriormente concentradas y dializadas en tampón C con dispositivos Centricón siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tampón de elución G: 50 mM tris-HCl pH 8,0, 10 mM glutatión.

Tampón de unión: 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, 0,5M NaCl, 5 mM imidazol pH 7,4, 1mM PMSF

Tampón de lavado: 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, 0,5M NaCl, 20 mM imidazol pH 7,4.

Tampón de elución: 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, 0,5M NaCl, más 50 mM imidazol (E1), 200 mM de imidazol (E2) o 500 mM imidazol (E3).

Tampón de unión y de lavado FPLC: 200 mM Hepes pH 7,5, 0,4 M KCl, 20 mM imidazol pH 7,4, 1mM PMSF, una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche).

Tampón de elución FPLC: 200 mM Hepes pH 7,5, 0,4 M KCl mas un gradiente de imidazol desde 20 mM hasta 450 mM, una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche).

Tampón C: 20 mM Hepes pH 7,5, 1 mM EGTA, 1 mM DTT.

7.5 Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida y tinción de geles

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes se llevó a cabo según el protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970) para geles discontinuos de poli(acrilamida) utilizando el sistema Mini-Protean IITM (BioRad). Los geles constaban de dos partes: la de empaquetamiento, que favorecía la correcta migración de las muestras y formaba los pocillos donde se colocaban las muestras, y la de separación,

donde las proteínas migraban según su peso molecular. En este trabajo se usaron geles en los que su zona de separación contenía poliacrilamida al 7-12% según el peso molecular de las proteínas a estudiar. Una vez cargados se migraron a RT a 200V en tampón de electrodo durante 50-90 min.

Las muestras se prepararon en tampón de carga desnaturizante 1X, se hirvieron durante 5 min y se cargaron en el gel. Como patrones de masas moleculares se utilizó una mezcla de proteínas comerciales (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, BioRad) bien de bajo peso molecular (Low Range) o alto peso molecular (High Range).

Tras finalizar la electroforesis las proteínas presentes en los geles de poliacrilamida fueron transferidas a filtros de nitrocelulosa o visualizadas sumergiendo el gel en una solución de azul de Coomassie durante 15 min en agitación suave. Posteriormente los geles se lavaron varias veces con una solución desteñidora. Para su conservación se sumergieron en ácido acético glacial 10% o se secaron sobre papel Whatman utilizando un secador de geles.

Gel de empaquetamiento: 0,125 M tris-HCl pH 6,8, 4% acrilamida [acrilamida:bis-acrilamida 29:1 (BioRad)], 0,1% SDS.

Gel de separación: 0,375 M tris-HCl pH 8,8, 7-12% acrilamida, 0,1% SDS.

Tampón de electrodo: 25 mM tris HCl pH 8,3, 192 mM glicina, 0,1% SDS. Para su polimerización se añadió 0,1% APS y 0,05% TEMED.

Tampón de carga desnaturizante 4X: 0,2 M tris-HCl pH 6,8, 32% glicerol, 6,4 % SDS, 16% 2-mercaptoetanol, 0,005 % azul de bromofenol.

Solución de azul de Coomassie: 0,1% Coomassie R-250, 10% ácido acético glacial, 40% metanol.

Solución desteñidora: 10% ácido acético glacial, 40% metanol.

Low range: fosforilasa b (97,4 kDa), seroalbúmina (66,2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsógeno (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa).

High range: miosina (250 kDa), β -galactosidasa (121 kDa), seroalbumina (66,2 kDa) y ovoalbúmina (45 kDa).

7.6 Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas en extractos libres de membrana se llevó a cabo en dos pasos secuenciales. El primero consistió en cuantificar las muestras mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), usando el reactivo Bradford (Bio-Rad) y utilizando como recta patrón cantidades crecientes conocidas de seroalbúmina bovina (BSA). El segundo y posterior, consistió en visualizar las muestras cuantificadas con el método anterior, cargándolas en geles de SDS-poliacrilamida en paralelo a cantidades crecientes conocidas de BSA, que finalmente se tiñeron con Coomassie.

7.7 Cromatografía de afinidad a pequeña escala “pull down”

El objetivo de este ensayo consistió en demostrar la existencia de interacción directa entre las proteínas GST-hSNF5 e His-DNM2 *in vitro* y determinar en qué estado conformacional de His-DNM2, unida a guanidín difosfato (GDP) o guanidín trifosfato no hidrolizable (GTP γ S), tenía lugar dicha interacción.

Para llevar a cabo el ensayo de pull down fue necesario en primer lugar inducir la síntesis de las proteínas GST, GST-hSNF5 e His-DNM2 en la cepa BL21 (DE). En segundo lugar, se procedió a la purificación de las mismas obteniendo por un lado las proteínas GST y GST-hSNF5 unidas a matriz Glutation Sefarosa 4B y equilibradas en tampón PD, y por el otro, la proteína His-DNM2 concentrada en tampón PD. Para este ensayo, un volumen de 50 μ l de tampón PD que contenía 1,5 μ g de la proteína His-DNM2 purificada, se suplementó con 0,5 mM de GDP o GTP- γ S, cuando fue necesario, y la mezcla se incubó durante 30 min a 4°C en leve agitación rotatoria. Transcurrido este tiempo se añadió a cada muestra 1,5 μ g de las proteínas GST o GST-hSNF5 unidas a matriz y disueltas en 300 μ l de tampón PD suplementado con 0,5 mM de GDP o GTP- γ S, cuando fue necesario. A continuación las muestras se incubaron 14 h a 4°C en agitación rotatoria leve para permitir la interacción entre ambas proteínas. Posteriormente, se centrifugaron 5 min 3000 g a 4°C y la matriz se lavó con 1 ml de tampón PD, seguido de una centrifugación de 1 min 3000 g a 4°C. Este proceso de lavado y centrifugación se repitió dos veces más. Por último, se añadió 20 μ l de tampón de carga desnaturizante a la matriz precipitada y tras hervir 5 min las muestras se

sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 9%. La detección de las proteínas separadas en gel se llevó a cabo mediante el método de WB.

Tampón de PD: 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl.

7.8 Sistema de doble híbrido en levaduras

El sistema de doble híbrido en levaduras se llevó a cabo con el objetivo de identificar proteínas que interaccionen con hSNF5 que ayuden a esclarecer su posible función citoplásmica.

Para ello se utilizó el sistema ProQuest Two-Hybrid System (Invitrogen) basado en la reconstrucción del factor transcripcional dimérico GAL4 al interaccionar la proteína de estudio fusionada al dominio de unión al DNA (GBD) de GAL4 (cebo) con la proteína desconocida fusionada al dominio de transactivación (GAD) de GAL4 (presa). Esta reconstrucción activa la transcripción de los genes reporteros *HIS3* y *LacZ* integrados en copia única en el genoma de la estirpe MaV203 de *S.cerevisiae*. El primero codifica una enzima implicada en la síntesis de His, cuya inhibición dependiente de la dosis por el 3-Amino-1,2,4-Triazol (3AT) impide la biosíntesis de dicho aminoácido, mientras que el segundo codifica la enzima β-galactosidasa capaz de metabolizar el 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-β-galactopiranosido (X-Gal) formando un precipitado azul. Antes de comenzar el escrutinio se determinó la concentración mínima de 3AT requerida para anular en nivel de activación basal del gen *HIS3* en la estirpe MaV203, previamente transformada con pDBLeu-*hSNF5*/pPC86, que resultó ser de 50 mM.

Para llevar a cabo este ensayo se clonó el cDNA de *hSNF5* en el plásmido pDBLeu de forma que quedara en fase con la secuencia que codifica para el dominio de unión al DNA de GAL4 presente en este vector. El plásmido pDBLeu contiene también en gen *LEU2*, cuya expresión permite el crecimiento de la levadura en medio sin Leu. El escrutinio se llevó a cabo por transformación de la construcción pDBLeu-*hSNF5* (GBD-*hSNF5*) y la genoteca de cDNA de embrión de ratón de 8,5 días de desarrollo clonada en el vector pPC86 (GAD-Y), en la estirpe MaV203. El plásmido pPC86 contiene también en gen *TRP1* cuya expresión permite el crecimiento de la levadura en

medio sin Trp. La reconstrucción del factor de activación GAL4, gracias a la interacción GBD-hSNF5/GAD-Y, permitió la selección de los clones positivos mediante crecimiento en medio selectivo (SC-Leu-Trp-His+3AT). El DNA plasmídico de los clones positivos crecidos en medio selectivo fue aislado, amplificado en *E.coli* DH5 α y analizado mediante secuenciación. Posteriormente se verificó la interacción entre los candidatos mediante ensayos de retransformación en la estirpe MaV203 y crecimiento posterior en medio selectivo. A los clones positivos se les determinó cualitativamente el nivel de expresión del gen *LacZ* según actividad β -galactosidasa incubándolos en solución de revelado 12 h a 30°C. Tanto en el escrutinio como en los ensayos posteriores, fue necesario utilizar cepas control que contienen parejas de plásmidos que expresan proteínas de fusión con un espectro de interacción variable (Tabla M7).

Solución de revelado: 0,5 % agar, 0,5 M K-PO₄ pH 7,0 , 0,01% SDS, 6,5% dimetilformamida, 0,25% X-Gal.

3-Amino-1,2,4-Triazole (3-AT): 2,5 M de 3-AT en agua. Filtrar.

Tabla 8. Cepas control utilizadas en el escrutinio de doble híbrido

CEPAS	PLÁSMIDO RESIDENTE	cDNA INSERTO	INTERACCIÓN
A	pPC97	Ninguno	Nula
	pPC86	Ninguno	
B	pPC97-RB	Retinoblastoma humano (aa 302-928)	Débil
	pPC86-E2F1	Factor de transcripción E2F (aa 342-437)	
C	pPC97-CYH2 ³ -dDP	DP Drosophila (aa 1-377)	Moderada
	pPC86-d E2F	E2F Drosophila (aa 225-433)	

8. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

8.1 Detección de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida mediante Western Blot

Las proteínas separadas en geles de SDS-poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium (BioRad) mediante el sistema de transferencia semiseca Mini Trans-Blot (BioRad). La electrotransferencia se realizó en tampón de transferencia durante 1-2 h con una intensidad de 1,3 mA/cm². Tras

finalizar el proceso la membrana se tiñó con Rojo Ponceau para visualizar las proteínas transferidas y posteriormente se sumergió en solución de bloqueo durante 1 h a RT y agitación constante suave. La incubación con el anticuerpo primario (Tabla M4) se realizó durante 1'5 h a RT en la misma solución. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces durante 15 min en solución de lavado con agitación constante moderada. Tras los lavados, la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Tabla M5) se realizó en solución de bloqueo durante 1 h a RT. A continuación, se procedió a lavar la membrana 3 veces durante 15 min en solución de lavado con agitación constante moderada. Finalmente, el revelado de la actividad peroxidasa se llevó a cabo con un sistema de inmunodetección quimioluminiscente de gran sensibilidad (ECL Plus Western Blotting Detection System; GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de la señal luminosa se utilizaron películas autorradiográficas HyperFilm™ MP (GE Healthcare).

Tampón de transferencia: 48 mM tris-HCl, 0,037% SDS, 39 mM glicina, 20% metanol.

Solución de rojo Ponceau: Ponceau 1 g/l, 5% ácido acético glacial.

Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo 50 g/l en solución de lavado.

Solución de lavado: 0,1% Tween-20 en PBS 1X.

8.2 Inmunoprecipitación de proteínas

Los experimentos de inmunoprecipitación (IP) en condiciones nativas se realizaron a partir de fracciones proteicas solubles en tampón IP, utilizando matrices de proteína A o proteína G sefarosa (GE Healthcare), dependiendo de la especie e isotipo del anticuerpo primario usado para inmunoprecipitar. En primer lugar, tras haber obtenido y cuantificado el extracto proteico, se repartió por condición experimental 2 fracciones de 1 mg del mismo y se llevaron hasta 1 ml con tampón IP. A continuación, se procedió a equilibrar la matriz al 50 % en el mismo tampón para posteriormente añadir 30 µl de dicha matriz a cada fracción. La incubación posterior se llevó a cabo durante 1 h a 4°C en agitación constante, seguida de una centrifugación de 5 min a 4000 g a 4°C, con el objetivo de eliminar del extracto aquellas proteínas que presentan afinidad por la matriz. De cada sobrenadante obtenido se retiraron 20 µl (20 µg de proteínas) que fueron utilizados posteriormente como control para determinar la cantidad de proteína inmuno y coimmunoprecipitada. A los 980 µl restantes de uno de

los sobrenadantes se les añadió 2 µg de anticuerpo primario específico de la proteína de interés a inmunoprecipitar. A los otros 980 µl, se les añadió 2 µg de anticuerpo primario no específico (rabbit o mouse IgGs; SIGMA) como control. Tras una incubación de 14-18 h a 4°C en agitación constante para permitir el reconocimiento de la proteína de interés por el anticuerpo específico, se añadió a cada fracción 30 µl de matriz al 50% en tampón IP. Posteriormente las muestras se incubaron 3 h en las mismas condiciones para permitir la unión de la matriz a la fracción constante de los anticuerpos y se centrifugaron 5 min a 4000 g a 4°C. Finalmente, a la matriz precipitada se le dio 3 lavados con tampón de IP y se resuspendió en 30 µl de tampón de carga desnaturante 2x para su posterior análisis mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida y WB.

Respecto al ensayo proteómico, cuyo objetivo residía en encontrar proteínas de interacción con hSNF5 en el citoplasma, se realizó un fraccionamiento bioquímico obteniendo extractos citoplasmicos de células 293T previamente transfectadas con los vectores pCMV-7.1-3xFlag, como control, o pCMV-7.1-3xFlag-hSNF5. Dichos extractos fueron sometidos a IP con anticuerpos que reconocen el epítipo Flag unidos a matriz de agarosa. Fracciones de los extractos citoplasmicos utilizados en la IP y las fracciones inmunoprecipitadas se sometieron a análisis en geles de SDS-poliacrilamida, tinción con azul de Coomassie e identificación de las bandas resultantes en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). La huella peptídica de cada muestra se obtuvo mediante espectroscopia de masa láser de desorción/ionización asistida por matriz (MALDI), asociada a un analizador de tiempo de vuelo (TOF).

Tampón IP: 50 mM tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1,5 mM de EDTA, 1% Tritón X-100, 1 mM PMSF, una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche).

Tampón de carga desnaturante 2x: 0,1 M tris-HCl pH 6,8, 16% glicerol, 3,2 % SDS, 8% 2-mercaptoetanol, 0,0025 % azul de bromofenol.

8.3. Inmunofluorescencia indirecta

Las células crecidas en monocapa y adheridas a cubreobjetos se fijaron en PBS-PFA 4% durante 10 min y después se permeabilizaron con PBS-T 0,5 % durante 15 min. Tras la fijación se realizaron 2 lavados de 5 min cada uno con PBS-T 0,1% y

posteriormente se sumergieron los cubreobjetos en solución de bloqueo durante 1 h. A continuación, las células se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 5) disueltos en solución de bloqueo durante 1,5 h. Transcurrido este tiempo se lavaron 3 veces con PBS-T 0,1% y se incubaron posteriormente con los anticuerpos secundarios (Tabla 6) disueltos también en solución de bloqueo durante 1 h a RT. Posteriormente las células se lavaron 3 veces más con PBS-T 0,1%, añadiendo en el último lavado de 10 min. 4'-6-Diamino-2-fenilinol (DAPI) a 0,1 µg/ml como fluorocromo marcador de DNA, seguido de 2 lavados con agua. Finalmente las muestras se deshidrataron durante 2 min en etanol 100% y se montaron en portaobjetos sobre medio de montaje. Todo el proceso se realizó a RT.

PBS-PFA 4 %: Paraformaldehído al 4% en PBS1X.

PBS-T 0,5 %: 0,5 % Tritón X-100 en PBS1X.

PBS-T 0,1%: 0,1 % Tritón X-100 en PBS1X.

Solución de bloqueo: suero fetal bovino o de cabra al 10% en PBS-T 0,1%.

8.4 Ensayo de ligación proximal

Para investigar si las proteínas endógenas en estudio son capaces de interactuar entre sí, se llevó a cabo un ensayo de ligación proximal o PLA (Figura 10) utilizando el sistema comercial Duolink (Olink Bioscience). Este ensayo, llevado a cabo según las instrucciones del fabricante, permitió detectar, visualizar y cuantificar la interacción proteína-proteína en muestras celulares preparadas para microscopía.

Células HeLa crecidas en monocapa y adheridas a cubreobjetos al 70% de confluencia se fijaron, permeabilizaron y bloquearon. A continuación, se incubaron con dos anticuerpos primarios generados en diferentes especies (Tabla 5), cada uno con capacidad de reconocer una de las dos proteínas de interés, durante 1,5 h a RT en solución de bloqueo. En este trabajo se han utilizado anticuerpos primarios solos, como control negativo, o en combinación. Como anticuerpos primarios solos se utilizaron anti: R-hSNF5, DNM2, Calnexina, BAF155 y CAD. En combinación se utilizaron anti: R-hSNF5/BAF155 como control positivo, R-hSNF5/CAD como control negativo, y R-hSNF5/DNM2 y R-hSNF5/Calnexina como estudio de interacción. Tras la incubación se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno en PBS-T 0,1%. Posteriormente las células se

incubaron con anticuerpos secundarios, que reconocen específicamente los anticuerpos primarios previamente utilizados, conjugados cada uno a un único DNA monocatenario o sonda (anti: ratón menos, cabra plus y conejo plus) en solución de bloqueo durante 1h a 37°C. Si las sondas se encuentran muy próximas (<40 nm) interaccionarán a través de un círculo de DNA formado por otros dos oligonucleótidos de DNA. Tras 3 lavados de 10 min en solución A, esta estructura fue ligada 30 min a 37°C. Después de otros 2 lavados de 5 min en solución A, fue amplificada por una polimerasa vía círculo rodante capaz de llevar a cabo varios cientos de ciclos de amplificación y la estructura resultante fue detectada mediante sondas fluorescentes de oligonucleótidos de DNA complementarias (Duolink detection KIT, Orange). Este último pasó requirió una incubación de 100 min a 37°C y 3 lavados posteriores de 10 min en solución B seguidos por un último lavado de 5 min en solución B 0,01X. Finalmente las muestras se deshidrataron durante 2 min en etanol 100% y se montaron en portaobjetos sobre medio de montaje con DAPI.

El resultado se detectó mediante microscopía de fluorescencia y confocal como estructuras punteadas rojas brillantes allí donde existe interacción entre las proteínas endógenas en estudio.

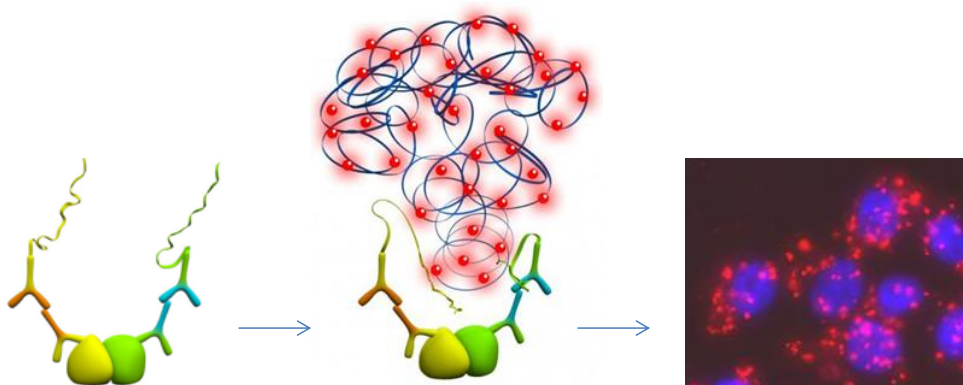


Figura 10. Representación del ensayo de ligación proximal (PLA). Para llevar a cabo este ensayo se requiere el uso de dos anticuerpos primarios generados en diferentes especies, que reconozcan a las proteínas de interés y dos anticuerpos secundarios, que reconozcan específicamente a los primarios, conjugados cada uno a un único DNA monocatenario o sonda. Al encontrarse las dos sondas muy próximas interaccionan a través de un círculo de DNA formado por otros dos oligonucleótidos de DNA. Esta estructura será ligada, amplificada y finalmente detectada mediante microscopía, gracias a sondas fluorescentes de oligonucleótidos de ADN complementarias, visualizándose en la célula como estructuras punteadas brillantes.

El análisis y la cuantificación de la señal obtenida en este ensayo PLA se realizó gracias a la aplicación Granularity de programa MetaMorph Offline 7.1.7.0 (Molecular

Devices) cuantificando más de 130 células por condición procedentes de 2 experimentos independientes.

Solución A: 0,01 M tris-HCl pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20. Filtrar.

Solución B: 0,2 M tris-HCl pH 7,4, 0,1M NaCl. Filtrar.

9. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

9.1 Microscopía de fluorescencia y Confocal

Las preparaciones se observaron usando un microscopio vertical Leica DM6000B. Este microscopio se encuentra conectado a una cámara Leica DFC 350 FX para la adquisición de imágenes monocromáticas. Las imágenes de microscopía confocal fueron adquiridas en un microscopio confocal Leica TCS SP5. Las imágenes adquiridas se procesaron con los programas LAS AF (Leica), Adobe photoshop, Image J y/o Metamorph.

9.2 Ensayo de pérdida de fluorescencia en el fotoblanqueo

El ensayo de pérdida de fluorescencia en el fotoblanqueo o FLIP se llevó a cabo con el objetivo de demostrar, *in vivo*, la existencia de un constante intercambio dinámico entre las poblaciones GFP-hSNF5 existentes en el núcleo y el citoplasma.

La técnica de FLIP se basa en la pérdida permanente de fluorescencia de un fluoróforo, debido a su irreversible destrucción por modificaciones covalentes o daño químico inducido por exposición prolongada a excitación lumínica. Debido a sus propiedades bioquímicas y fotofísicas el fluoróforo más adecuado para este tipo de ensayo es la proteína fluorescente verde o GFP y variantes de ésta, como la proteína fluorescente verde potenciada o EGFP. Las propiedades físicas que hacen de estos fluoróforos naturales las moléculas más aptas son su fotoestabilidad, dada en parte por sus estructura, y su elevada intensidad lumínica, por lo que requieren una dosis menor de excitación lumínica provocando menor efecto fototóxico (Prendergast, 1999; Lippincott-Scharzt y Patterson 2003; Chudakov et al., 2010)..

En los ensayos de FLIP (Figura 11) llevados a cabo en este trabajo, una región de interés (R) es repetidamente fotoblanqueada con laser de elevada intensidad, recogiendo la pérdida de fluorescencia en otras regiones mediante imágenes tomadas con laser de baja intensidad entre eventos de fotoblanqueado. De este modo, si las moléculas fluorescentes en estudio presentan elevada movilidad, tras sucesivas rondas de fotoblanqueado, todas pasarán a través de la región fotoblanqueada, produciéndose un descenso de la fluorescencia en el/los compartimento/s en estudio. Si por el contrario, las moléculas en estudio son inmóviles, jamás pasarán a través de la región fotoblanqueada, por lo que la fluorescencia en las regiones colindantes a ésta permanecerá constante a lo largo del tiempo.

Para llevar a cabo este experimento, se transfectaron células HeLa con construcciones cuya expresión permitió la síntesis de las proteínas EGFP (en adelante GFP), GFP-H2A, GFP-hSNF5 o GFP-hSNF5 Δ NES. Tras 15 h de expresión y antes de comenzar el fotoblanqueo, el medio de cultivo DMEM suplementado con FBS y antibióticos fue reemplazado por DMEM sin rojo fenol suplementado con FBS y antibióticos. A continuación, las células fueron trasladadas a una cámara termostatazada a 37°C y con suministro de CO₂ al 5% acoplada al microscopio confocal Leica TCS5, para su análisis mediante FLIP. Tras escoger un plano que contuviera dos células transfectadas (Figura 11), se fotoblanqueó una de ellas con un láser de argón de máxima intensidad (488 nm, 100% intensidad) en una región de interés de 37,8 μm^2 (zoom factor 3) localizada en el citoplasma (R) durante 24 periodos de 33 s cada uno. La pérdida de fluorescencia tras cada periodo de fotodegradado fue recogida mediante la captura de imágenes (0,27 ms) con un láser de argón de baja intensidad (488 nm, 4% intensidad). Para asegurar la inexistencia de un fotodegradado generalizado se analizó la fluorescencia en una región de la célula vecina no fotoblanqueada y la existente en el medio de cultivo. También se adquirieron imágenes a campo claro tanto al inicio como al final de experimento para asegurar la inexistencia de movimiento celular.

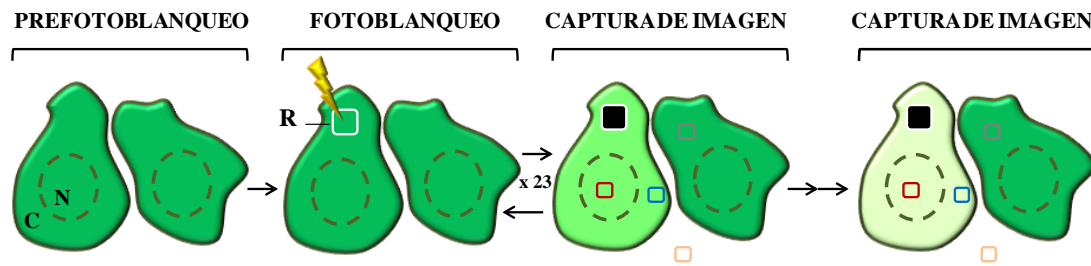


Figura 11. Representación esquemática de la técnica de FLIP realizada en este estudio. Se muestra un plano, al microscopio confocal, que contiene dos células que sintetizan GFP o proteínas de fusión a la misma. Una de ellas es repetidamente fotoblanqueada en una región de interés de localización citoplásmica (R, cuadrado blanco). Entre eventos de fotoblanqueo, se capturan imágenes que permitirán analizar la fluorescencia nuclear (N, cuadrado rojo) y citoplásmica (C, cuadrado azul) de la célula fotoblanqueada, a lo largo del experimento. Como control, se analiza tanto la fluorescencia de la célula vecina (cuadrado gris) como la existente en el medio de cultivo (cuadrado rosa).

Finalmente, se calculó la Intensidad Media de Fluorescencia Nuclear o Citoplásmica (IMFN o IMFC) existente en tres regiones nucleares y tres citoplásmicas de la célula fotoblanqueada a lo largo de experimento mediante el uso del programa MetaMorph y la siguiente fórmula, adaptada de Dundr y Misteli (Dundr y Misteli, 2003):

$$\frac{[(I_t - B_t) \times (I_{n0} - B_0)]}{[(I_{nt} - B_t) \times (I_0 - B_0)]}$$

Donde:

$-I_t$ es la Intensidad Media de Fluorescencia de la región citoplásmica o nuclear de la célula fotoblanqueada en función del tiempo.

$-I_{nt}$ es la Intensidad Media de Fluorescencia de la región citoplásmica o nuclear de la célula vecina no fotoblanqueada en función del tiempo.

$-B_t$ es la Intensidad Media de Fluorescencia del medio de cultivo en función del tiempo.

$-I_0$ es la Intensidad Media de Fluorescencia de la región citoplásmica o nuclear de la célula fotoblanqueada previa al fotoblanqueo (prefotoblanqueo)

$-I_{n0}$ es la Intensidad Media de Fluorescencia de la región citoplásmica o nuclear de la célula vecina previa al fotoblanqueo (prefotoblanqueo)

$-B_0$ es la Intensidad Media de Fluorescencia del medio de cultivo previa al fotoblanqueo (prefotoblanqueo)

10. OTROS ENSAYOS

10.1 Ensayo de endocitosis

Células HeLa cultivadas sobre cubreobjetos al 20-30% de confluencia fueron transfectadas con diferentes siRNAs (Tabla 7) o vectores pTER (Tabla 7) durante 72 h. Células RPE1 cultivadas sobre cubreobjetos al 20-30% de confluencia también fueron transfectadas con diferentes siRNAs durante 72 h. Tras transcurrir 60 h de la transfección el medio de cultivo completo se sustituyó por medio con antibióticos y “sin” suero (0,2%). A las 72 h de la transfección, las células fueron incubadas en medio sin suero con transferrina conjugada al fluorocromo Alexa Fluor 647 (Sigma Aldrich) o dextrano conjugado con tetrametilrodamina 3000 MW (Life technologies) a 10 µg/ml 5 min o a 1 mg/ml 1 h, respectivamente (Cao et al., 2007; Liu et al., 2008). Tras la adición de dxt, en ciertos casos se añadió al medio de cultivo EGF a 30 ng/ml 1h. Después de las incubaciones se lavaron las células con PBS 1X seguido de un lavado en solución G y finalmente se procesaron para IF.

El análisis de la internalización de tfn se realizó gracias a la aplicación Granularity, mientras que la introducción de dxt se calculó según intensidad integrada por unidad de área, ambas aplicaciones del programa MetaMorph Offline 7.1.7.0 (Molecular Devices). Se cuantificó la internalización de dxt o tfn en más de 120 células transfectadas con siRNAs por condición, procedentes de 3 experimentos independientes.

Solución G: 0,1 M glicina pH 3,5, 0,15 M NaCl.

10.2 Ensayo de actividad GTPasa

El objetivo de este ensayo *in vitro* consistió en determinar si la interacción directa entre las proteínas GST-hSNF5 e His-DNM2 afectaba a la actividad GTPasa de His-DNM2 en estado ensamblado (baja fuerza iónica) o desensamblado (elevada fuerza iónica). La actividad GTPasa fue medida en función del tiempo, utilizando un método colorimétrico que detecta el fosfato (Pi) liberado en la reacción de hidrólisis del GTP (Leonard et al., 2005).

En primer lugar, fue necesario inducir la síntesis de las proteínas GST, GST-hSNF5 e His-DNM2 en la cepa BL21 (DE). En segundo lugar, se procedió a la purificación, concentración y diálisis de las mismas en tampón C. Finalmente, se ensayó la actividad de 1 μM de His-DNM2 en función del tiempo, incubada en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes (0,1, 1 ó 10 μM) de GST o GST-hSNF5 en un vol. de 10 μl en tampón de actividad con baja o elevada fuerza iónica, en presencia de 0,5 mM de GTP y a 37°C. Transcurrido el tiempo deseado se añadió a la mezcla 2,5 μl de EDTA, que quela el Mg^{2+} requerido para la hidrólisis del GTP inhibiendo la reacción, a una concentración final de 100 mM. Seguidamente, se añadió 75 μl de solución verde de malaquita, que reacciona con el Pi liberado, a cada reacción inhibida de 12,5 μl . La concentración de Pi liberado por experimento se estimó por espectrofotometría a una DO de 650 nm. Para cada ensayo se generó una curva estándar de Pi (0-100 μM) y muestras control que contuvieron únicamente tampón de actividad y GTP o tampón de actividad y His-DNM2.

Tampón de actividad (baja fuerza iónica): 20 mM Hepes pH 7,5, 2 mM MgCl_2 , 20 mM de KCl, 1 mM DTT, solución verde de Malaquita. El de **elevada fuerza iónica** contiene 130 mM de KCl.

Solución verde de malaquita: 1 mM de verde de Malaquita carbinol base, 10 mM de $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 1 N de HCl. Filtrar y conservar a 4°C.

Solución GTP: 100 mM GTP (lithium salt, Sigma Aldrich) en 20 mM Hepes pH 7,5. Conservar a -80°C.

10.3 Ensayo de sedimentación

El objetivo de este ensayo *in vitro* consistió en determinar si la interacción directa entre las proteínas GST-hSNF5 e His-DNM2 afectaba al ensamblaje de His-DNM2.

Para llevarlo a cabo se utilizaron las proteínas GST, GST-hSNF5 e His-DNM2 obtenidas en el apartado anterior. Para este ensayo, 2 μM de la proteína His-DNM2 fue incubada en presencia o en ausencia de dos concentraciones (0,5 o 2 μM) de GST o GST-hSNF5 en tampón de BFI de baja fuerza iónica a 37°C durante 15 min para permitir el ensamblaje. Transcurrido este tiempo las muestras fueron centrifugadas a

21000 g 30 min a 4°C obteniendo una fracción precipitada, que contuvo la His-DNM2 ensamblada, y una soluble (Warnock et al., 1996). La fracción precipitada fue resuspendida en el mismo vol. de tampón BFI que contenía la fracción soluble. A todas las muestras se les añadió tampón de carga desnaturizante y tras hervirlas 5 min se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. La detección de las proteínas separadas en gel se llevó a cabo mediante tinción en solución azul de Coomassie.

Solución BFI: 20 mM de Pipes pH 7,5, 20 mM de Hepes pH 7,5, 2 mM de MgCl₂, 20 mM de KCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE hSNF5

La localización exclusivamente nuclear de hSNF5 comenzó a ser objeto de debate en 2001. Siete años antes, Kalpana y sus colaboradores (Kalpana et al., 1994) obtuvieron la primera evidencia de la existencia de esta proteína en humanos, consiguiendo su aislamiento, mediante escrutinio de doble híbrido, gracias a su interacción con la integrasa (IN) del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Pero no fue hasta 2001 cuando se demostró que hSNF5, componente nuclear esencial del complejo SWI/SNF (Wang et al., 1996), podía ser exportado transitoriamente al citoplasma en respuesta a la infección por HIV-1 (Turelli et al., 2001). Este último descubrimiento, ligado a la identificación de una secuencia de exporte nuclear (NES) en hSNF5 y a su interacción con la hCRM1/exportina1 (Craig et al., 2002), nos llevó a investigar la existencia de una posible fracción citoplásmica de hSNF5, en condiciones normales de crecimiento.

1.1 Estudio de la localización celular de hSNF5

El análisis de la distribución intracelular de hSNF5 en diferentes líneas celulares se llevó a cabo mediante tres abordajes complementarios: fraccionamiento bioquímico, localización de la proteína de fusión GFP-hSNF5 y localización de la proteína endógena hSNF5 mediante IF.

En primer lugar, se realizó un fraccionamiento bioquímico con el objetivo de obtener extractos enriquecidos en proteínas solubles, nucleares (N) o citoplásmicas (C), a partir de cultivos de diferentes líneas celulares transformadas de origen humano (HeLa y 293T) o simio (COS7). Dichos extractos fueron analizados mediante WB, utilizando un anticuerpo policlonal, generado en cabra, frente a un péptido cercano al extremo C-terminal de hSNF5 (C-hSNF5), con propósito de esclarecer su localización celular. En paralelo, se utilizaron anticuerpos que reconocen otras subunidades del complejo SWI/SNF o alfa-Tubulina (α -Tubulina), como control del fraccionamiento nuclear o citoplásmico, respectivamente. Como se observa en la Figura 12, la proteína hSNF5 fue detectada en ambos tipos de extractos, presentando localización tanto nuclear como citoplásmica. Por el contrario, el resto de subunidades del complejo SWI/SNF

analizadas (BRG1, hBRM y BAF180) fueron detectadas exclusivamente en fracciones nucleares. Según lo esperado, α -Tubulina localizó casi exclusivamente en el citoplasma.

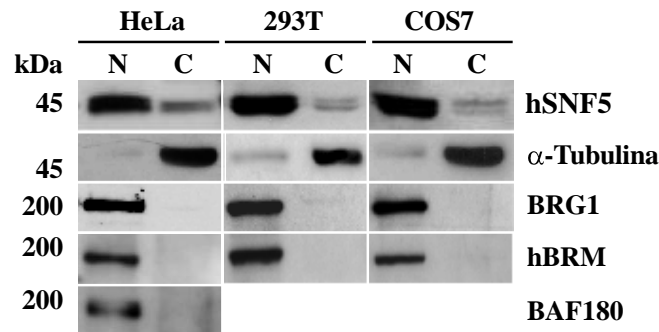


Figura 12. Una fracción de hSNF5 está presente en el citoplasma. Extractos nucleares (N) y citoplásmicos (C) obtenidos a partir de cultivos de células HeLa, 293T y COS7 se analizaron mediante Western Blot, utilizando anticuerpos que reconocen hSNF5 (C-hSNF5), otras subunidades del complejo SWI/SNF (BRG1, hBRM y BAF180) como control nuclear del fraccionamiento y α -Tubulina, como control citoplásmico del mismo. Se analizaron 30 μ g de proteínas.

Para demostrar que el marcaje observado con el anticuerpo C-hSNF5 corresponde a la proteína hSNF5, inhibimos la expresión del gen endógeno mediante pequeños RNAs de interferencia o siRNAs (sihSNF5). La secuencia diana (Tabla 7), localizada en el dominio Rpt1 de su región codificante, fue seleccionada tras analizar su funcionalidad teórica mediante el programa de diseño siRNA target finder de Ambion (www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) y su uso previo en células humanas (Kato et al, 2007). Como control, se utilizó un oligonucleótido de secuencia aleatoria (siControl). El descenso de los niveles de proteína se analizó mediante WB, a partir de extractos nucleares y citoplásmicos de células HeLa y 293T transfectadas con los siControl o sihSNF5 (Figura 13). Los resultados mostraron que el sihSNF5 consiguió inhibir eficientemente la expresión del gen endógeno en ambas líneas celulares y su efecto pudo observarse en fracciones nucleares y citoplásmicas, demostrando la especificidad del anticuerpo utilizado.

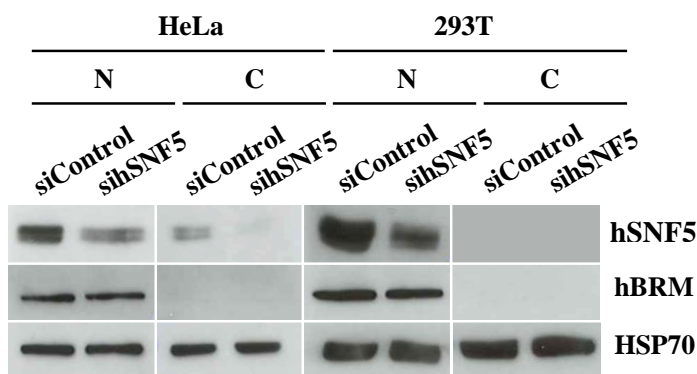


Figura 13. Inhibición de la expresión de hSNF5. Extractos nucleares (N) y citoplásmicos (C) obtenidos a partir de cultivos de células HeLa y 293T transfectadas con siRNA Control (siControl) o siRNA hSNF5 (sihSNF5), se analizaron mediante Western Blot, utilizando anticuerpos que reconocen hSNF5, hBRM, como control nuclear del fraccionamiento, y HSP70, como control de carga. Se analizaron 30 μ g de proteínas.

El segundo abordaje consistió en analizar mediante IF la distribución presentada por hSNF5, hBRM y BRG1, etiquetadas con proteínas fluorescentes como la EGFP, en adelante GFP, o la YFP, en células humanas. Para ello se transfectaron células HeLa con los vectores pEGFP-C2-hSNF5, pEGFP-N1-hBRM o pEYFP-C1-BRG1 y tras 24 h se fijaron y procesaron para IF. Como puede observarse (Figura 14) las subunidades ATPasas del complejo SWI/SNF, hBRM y BRG1, etiquetadas con GFP o YFP respectivamente, mostraron una localización exclusivamente nuclear, mientras que la proteína GFP-hSNF5 localizó tanto en el núcleo (excluida de los nucleolos) como en el citoplasma de células HeLa.

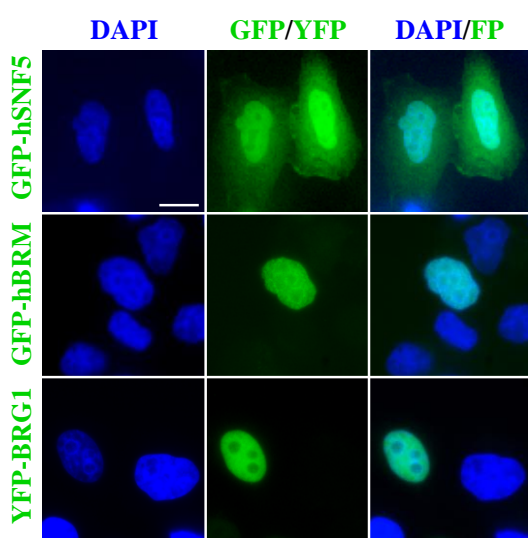


Figura 14. Una fracción de GFP-hSNF5 localiza en el citoplasma de células HeLa. Células HeLa transfectadas con los plásmidos pEGFP-C2-hSNF5, pEGFP-N1-hBRM o pEYFP-C1-BRG1 se procesaron tras 24 h para Inmunofluorescencia. Las proteínas GFP-hSNF5, GFP-hBRM e YFP-BRG1 se muestran en verde. El ADN se tiñó con DAPI (en azul). FP: proteína fluorescente. Barra de escala, 10 μ m.

Con el objetivo de evaluar si la distribución núcleo-citoplasma presentada por la proteína GFP-hSNF5 variaba según la cantidad del DNA incorporado, se transfectaron células HeLa, cultivadas sobre cubreobjetos en placas de 9,5 cm^2 de área, con cantidades crecientes (0,5, 2 o 4 μ g) del vector pEGFP-C2-hSNF5. Tras 24 horas, las células se fijaron y se procesaron para IF. Para cada condición, se calculó la intensidad media de fluorescencia (IMF), tanto en el núcleo como en el citoplasma, mediante el uso del programa MetaMorph, obteniendo posteriormente la relación IMF nuclear (N) respecto a la citoplásmica (C). Tal como se muestra en la Figura 15A, el análisis de los resultados reveló la existencia de una relación IMF N/C prácticamente constante ($\sim 2,5$ veces) e independiente a la cantidad de DNA transfectado. Para evaluar si la distribución núcleo-citoplásmica de hSNF5 se veía afectada por el nivel de expresión, se transfectaron células HeLa con cantidades crecientes (0,5, 2 o 4 μ g) del vector pEGFP-C2-hSNF5, y clasificaron acorde a su IMF nuclear en tres rangos (300-600, 600-900 y

>900). Los rangos definidos fueron encontrados en proporciones similares, independientemente de la cantidad de DNA transfectado (no mostrado).

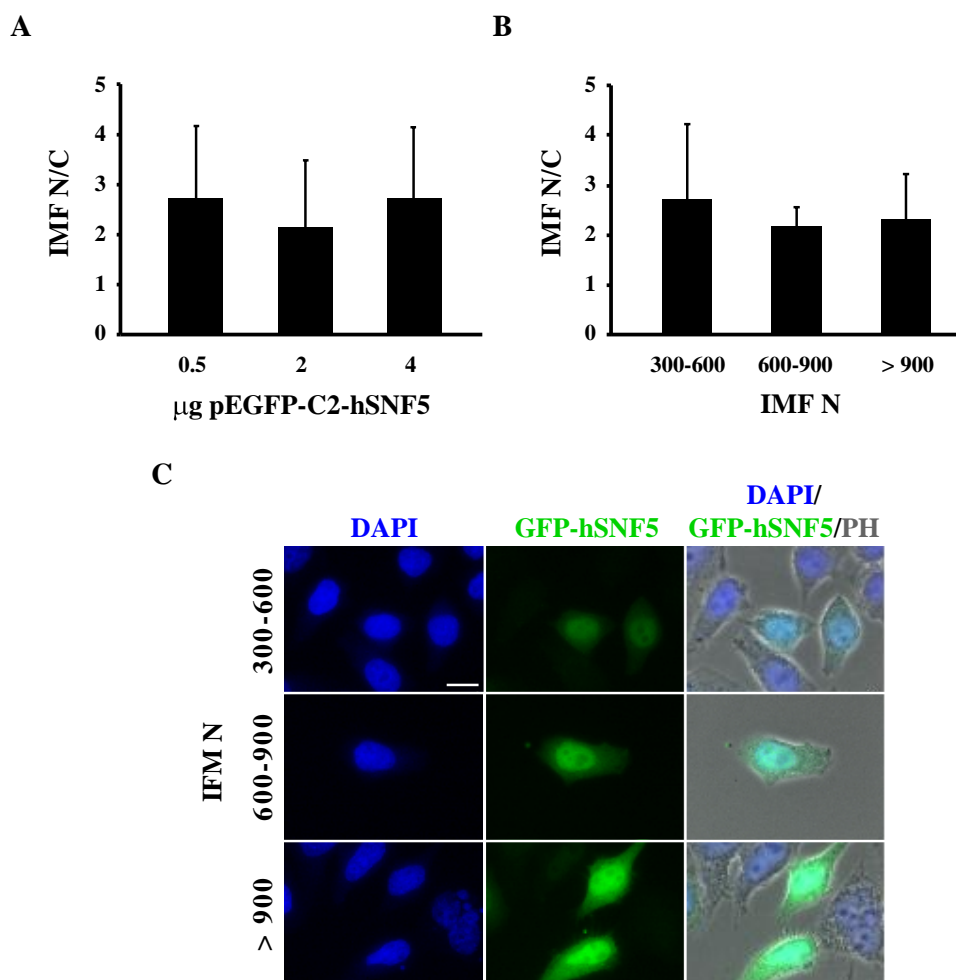


Figura 15. GFP-hSNF5 muestra una distribución núcleo/citoplasma (N/C) similar e independiente a la cantidad o expresión del vector pEGFP-C2-hSNF5 transfectado. Células HeLa transfectadas con cantidades crecientes (0,5, 2 o 4 µg) de pEGFP-C2-hSNF5 y procesadas tras 24 h para Inmunofluorescencia. **(A)** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de GFP-hSNF5 nuclear respecto a la citoplásmica (N/C) en células transfectadas con las cantidades de DNA indicadas. **(B)** Cuantificación de la IMF de GFP-hSNF5 N/C en relación a los rangos de IMF nuclear indicados. Los datos representados en **(A)** y **(B)** corresponden al promedio \pm la desviación estándar obtenidos a partir de 80 células por condición en dos experimentos independientes. **(C)** Células HeLa transfectadas con pEGFP-C2-hSNF5 (en verde) y clasificadas acorde a su IMF nuclear. El ADN se tiñó con DAPI (en azul). CF: contraste de fase. Barra de escala, 10 µm.

Para descartar que la localización parcialmente citoplásmica de GFP-hSNF5 (Figura 14 y 15) se deba a la elevada expresión del vector pEGFP-C2-hSNF5, se analizó su nivel de expresión respecto a la del gen endógeno. Para ello, se transfectaron células HeLa con dicho vector o con el vector pEGFP-C2, como control. Tras 30 horas, las células se recogieron y se procesaron, obteniendo extractos totales que fueron

analizados mediante WB utilizando anticuerpos frente a hSNF5 (C-hSNF5), GFP y GAPDH, como control de carga (Figura 16). Los resultados analizados mostraron que en células HeLa la cantidad de proteína exógena duplicaba (2,25 veces) la de la endógena, asemejándose por tanto el nivel de expresión de *GFP-hSNF5* al del gen endógeno. Si bien debe mencionarse la reducción (20%) de proteína hSNF5 observada en las células que expresaron *GFP-hSNF5*.

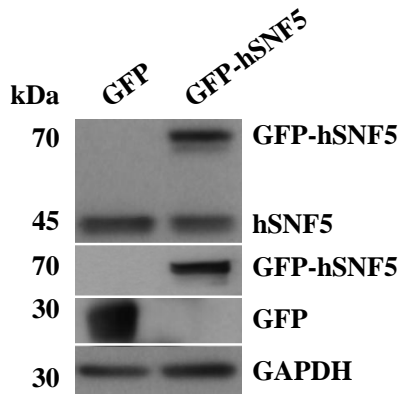


Figura 16. GFP-hSNF5 es sintetizada en cantidades similares a la proteína endógena. Extractos totales obtenidos a partir de células HeLa transfectadas al 45% con los vectores pEGFP-C2, primer carril, o pEGFP-C2-hSNF5, segundo carril, se analizaron mediante Western Blot. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos utilizados, que reconocen hSNF5, GFP y GAPDH, se muestran a la derecha de cada panel. Se analizaron 30 µg de proteínas.

El tercer y último abordaje, consistió en realizar una serie de IFs en células HeLa utilizando dos anticuerpos policlonales comerciales que reconocen la proteína hSNF5 endógena (Figura 17).

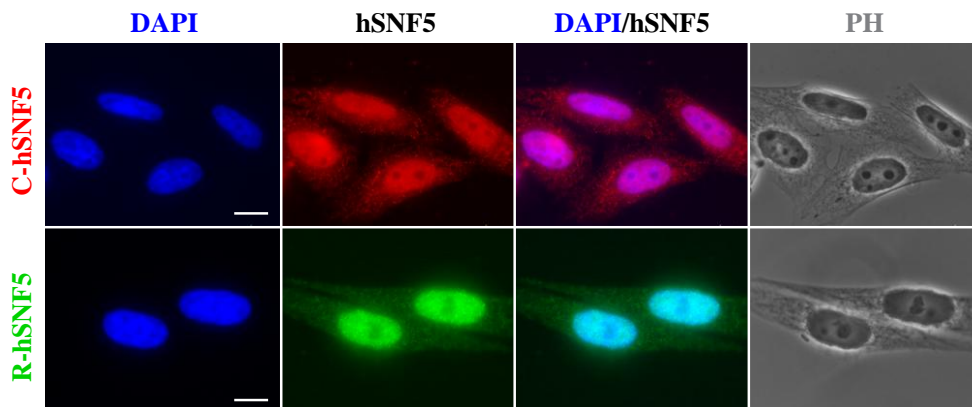


Figura 17. Una fracción de la proteína endógena hSNF5 localiza en el citoplasma. Células HeLa fijadas y marcadas con dos anticuerpos policlonales que reconocen hSNF5. Uno generado en cabra, denominado C-hSNF5 (en rojo) y otro, R-hSNF5, generado en ratón (en verde). El ADN se tiñó con DAPI (en azul). PH: contraste de fase. Barra de escala, 10 µm.

Uno de ellos, el C-hSNF5, fue generado en cabra frente a un péptido cercano al extremo C-terminal de la proteína. El otro, denominado R-hSNF5, fue generado en ratón frente a la proteína completa. Como puede apreciarse en la Figura 17, ambos

anticuerpos mostraron una cierta tinción citoplásmica, adicional al conocido y mayoritario marcaje nuclear.

Estas aproximaciones sientan las bases y constituyen el inicio este proyecto, sugiriendo la existencia de una fracción citoplásmica de hSNF5 en condiciones normales de crecimiento.

1.2 Estudio de la dinámica núcleo-citoplasma de hSNF5

En células eucariotas, citoplasma y núcleo se intercomunican a través del Complejo de Poro Nuclear (NPC) localizado en la membrana nuclear. Compuesto por más de treinta proteínas diferentes denominadas nucleoporinas (Rout y Aitchison, 2000) forman un canal encargado de regular el transporte núcleo-citoplasma de RNAs, proteínas de membrana (receptores) y proteínas solubles. El transporte a través del NPC (Sorokin et al., 2007) puede ser dependiente o independiente de nucleoporinas, mediante difusión (pequeñas proteínas neutras). El importe, desde el citoplasma al núcleo, o el exporte, desde el núcleo al citoplasma, de la mayor parte de las proteínas es realizado por una gran familia de proteínas llamada carioferinas- β (King et al., 2006). Esta familia se compone de importinas, proteínas de unión a Secuencias de Localización Nuclear (NLS) que median el transporte al núcleo, y de exportinas, que se unen a Secuencias de Exporte Nuclear (NES) mediando su transporte al citoplasma. *In vitro*, el proceso de importe requiere la existencia de NLS, carioferina (que reconoce la NLS) e importina- β 1 (de unión a carioferina e interacción con componentes del NPC) (Adam y Adam, 1994; Görlich et al., 1995). Respecto al exporte, es necesario la existencia de una NES y la presencia de carioferina β , siendo la Crm1 la exportina por excelencia. Las proteínas Ran-GTPasas juegan un papel esencial en ambos procesos de transporte, aunque se han descrito vías alternativas (Sorokin et al., 2007).

La presencia de una fracción citoplásmica de hSNF5 en células en crecimiento exponencial podría indicar una retención de la proteína sintetizada previa a su importación al núcleo y/o la existencia de un exporte constante de la misma desde el núcleo al citoplasma. La primera hipótesis podría implicar enmascaramiento de una NLS por cambios de carga, conformación o unión a otras moléculas de localización

citoplásmica. La segunda hipótesis requeriría, además de la presencia de una NLS, la existencia en hSNF5 de una NES, así como su interacción con la proteína que mediaría su exporte. Las investigaciones realizadas por Craig y colaboradores (Craig et al., 2002) sugirieron la presencia de una NLS en los primeros 130 aminoácidos, y demostraron la existencia de una NES. Estos hallazgos les llevaron a postular un modelo basado en una proteína nuclear, gracias a la presencia de una NLS visible y una NES inactiva, bloqueada u oculta. La proteína presentaría localización exclusivamente nuclear, salvo en ocasiones en las que la secuencia de exporte quedara expuesta tras un estímulo desconocido que provocara una alteración en la interacción con cierta/s proteína/s celulares o un cambio en su conformación. Una de las evidencias que apoyaban esta hipótesis se basa en un ensayo realizado por estos mismos investigadores, en los que la creación de un heterocariote demostró que la proteína de fusión GFP-hSNF5 no era transportada al citoplasma. Sin embargo, los resultados mostrados en el apartado 1.1 sugieren que tal vez, esta proteína nuclear implicada en remodelación y transcripción, pueda presentar una dinámica molecular entre el núcleo y el citoplasma.

Para solventar esta cuestión se llevaron a cabo experimentos *in vivo* de fotodegradación por láser mediante pérdida de fluorescencia en el fotoblanqueo o FLIP (Figura 11, página 78) (Dundr y Misteli, 2003; Snapp et al., 2003; Köster et al., 2005) que permitieran determinar la existencia o inexistencia de continuidad entre las poblaciones nucleares y citoplásmicas de hSNF5. La base de esta técnica reside en la pérdida permanente de fluorescencia de un fluoróforo por exposición prolongada a excitación lumínica, siendo la GFP (o derivados como EGFP) el fluoróforo más adecuado debido a sus propiedades bioquímicas y fotofísicas (Prendergast, 1999; Lippincott-Scharzt y Patterson, 2003; Chudakov et al., 2010). En este tipo de ensayo una región de interés es repetidamente fotoblanqueada con laser de elevada intensidad, recogiendo la pérdida de fluorescencia en otra región cercana, mediante imágenes tomadas entre eventos de fotoblanqueo, con laser de baja intensidad. De este modo, si las moléculas fluorescentes en estudio presentan elevada movilidad, pasarán a través de la región de interés y tras sucesivas rondas de fotoblanqueo, se producirá un descenso de la fluorescencia en el/los compartimento/s en estudio.

Para llevar a cabo este experimento, células HeLa sintetizando EGFP (en adelante GFP) o proteínas de fusión a ésta, fueron visualizadas al microscopio confocal,

escogiendo un plano que contuviera dos células transfectadas (Materiales y métodos, Figura 11, página 78). Una de ellas fue fotoblanqueada en una región de interés localizada en el citoplasma (R). La pérdida de fluorescencia tras cada periodo de fotodegradado fue recogida mediante la captura de imágenes al microscopio confocal, analizándose posteriormente la fluorescencia existente en regiones nucleares y citoplásmicas de la célula fotoblanqueada mediante el uso del programa MetaMorph.

Siguiendo este procedimiento se investigó la dinámica presentada por las proteínas hSNF5 (GFP-hSNF5) y una versión mutante de ésta (GFP- Δ NES), carente de su secuencia de exporte nuclear o NES (deleción de aminoácidos I263-L275) (Craig et al., 2002), ambas fusionadas a la GFP. En paralelo y a modo de control, monitorizamos la fluorescencia de la GFP y de la histona H2A fusionada a ésta (GFP-H2A). Se ha descrito que el NPC es capaz de mediar una difusión pasiva bi-direccional de proteínas menores a 60-70 kDa (Paine et al., 1975). Puesto que la GFP presenta un peso molecular de 27 kDa, carece de secuencias de interacción específicas (Ormo et al., 1996) y no interacciona con ningún sustrato, decidimos escogerla como modelo molecular de difusión pasiva (Cardarelli et al., 2007). La GFP-H2A fue escogida como control por ser una proteína de distribución exclusivamente nuclear, a la que el fotodegradado citoplásmico no debe alterar en absoluto.

Los resultados del ensayo fueron representados tanto de manera cualitativa, mediante imágenes captadas al microscopio confocal, al inicio del experimento y tras periodos de fotoblanqueo (Figura 18A), como de manera cuantitativa, mostrando la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la célula fotoblanqueada, respecto al tiempo (Figura 18B y C).

La proteína GFP mostró una distribución uniforme (Figura 18A) de intensidad similar en el núcleo y el citoplasma, sin localización sub-celular específica (Wei et al., 2003), como cabía esperar para una proteína que se mueve por difusión pasiva. Debido en parte a esto último, su coeficiente de difusión (D), definido como el desplazamiento aleatorio o Browniano experimentado por una proteína en el tiempo, es mucho más elevado que el descrito para otras moléculas de localización específica (Snapp et al., 2003). Como se muestra en la Figura 18B y C, la intensidad media de fluorescencia (IMF) en la célula fotoblanqueada decayó rápidamente, alcanzado la mitad de su valor

inicial en el citoplasma y en el núcleo, tras 3 (133 s) y 4 (166 s) periodos de fotoblanqueo, respectivamente. Esta pequeña diferencia de un periodo puede ser debida a que la GFP nuclear presenta un D menor al citoplásmico, y a que, a pesar de presentar un movimiento de difusión libre hacia el citoplasma, todas las moléculas del núcleo deben pasar a través del NPC. La fluorescencia celular desapareció prácticamente en su totalidad tras 12 periodos (400 s), la mitad de los que conformaron el experimento (Figura 18A, B y C).

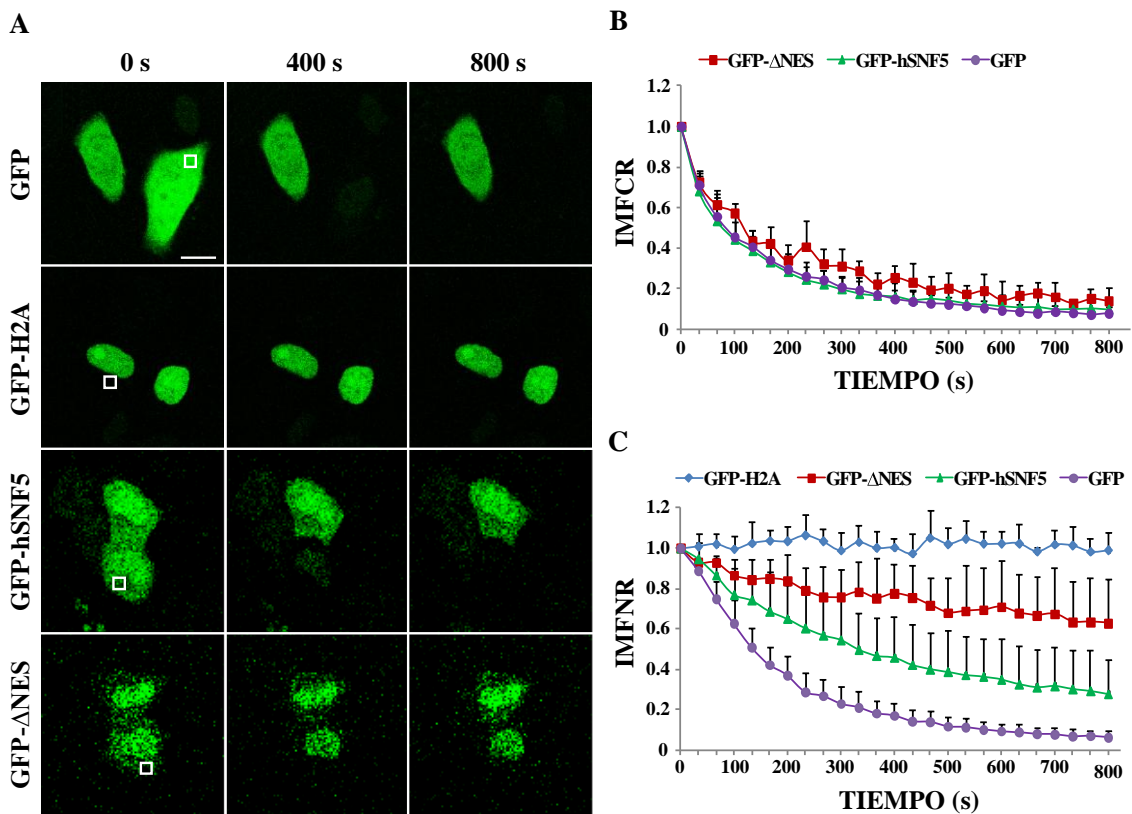


Figura 18. GFP-hSNF5 migra del núcleo al citoplasma. (A) Análisis mediante FLIP (pérdida de fluorescencia en el fotoblanqueo) de la dinámica presentada por las proteínas GFP, GFP-Histona H2A (GFP-H2A), GFP-hSNF5 y GFP-hSNF5 DELTA NES (GFP-ΔNES) entre el núcleo y el citoplasma de células HeLa. Una de las dos células mostradas en cada condición, fue repetidamente fotoblanqueada en una región citoplásmica (cuadrado blanco), tomando imágenes al microscopio confocal entre eventos de fotoblanqueo. Se muestran imágenes previas al fotoblanqueo (0 s), tras 12 (400 s) y tras 24 (800 s) periodos de fotoblanqueo. (B) Intensidad media de fluorescencia citoplásmica relativa (IMFCR) respecto al tiempo de fotoblanqueo, presentada por GFP, GFP-hSNF5 y GFP-ΔNES en (A). (C) Intensidad media de fluorescencia nuclear relativa (IMFNR) respecto al tiempo de fotoblanqueo, presentada por las proteínas ensayadas en (A). Los datos obtenidos en (B) y (C) proceden del análisis de 10 células por condición, de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis estadístico de one-way ANOVA comparando la dinámica de todas las proteínas en estudio, tras cada evento de fotoblanqueo ($p < 0,005$ desde los 33 s hasta los 800 s en (C)).

Por el contrario, la GFP-H2A, pieza fundamental del octámero de histonas o nucleosoma, localizó exclusivamente en el núcleo de células HeLa, permaneciendo su IMF nuclear constante e inalterable durante el ensayo, sin verse afectada por el fotoblanqueo citoplásmico (Figura 18A y C).

GFP-hSNF5 presentó una localización mayoritariamente nuclear, acompañada por un significativo marcaje citoplásmico. La IMF del citoplasma desapareció rápidamente, descendiendo a la mitad de su valor inicial tras 3 periodos de fotoblanqueo (133 s.) y casi totalmente tras 12 periodos (400 s) (Figura 18A y B). La IMF nuclear descendió de manera mucho más pausada que la observada en la GFP, pues tras 4 periodos de fotoblanqueo aun conservó aproximadamente el 75 % de su fluorescencia inicial. Tras 12 periodos y un descenso del 50%, su valor alcanzó el 25% de su intensidad inicial al finalizar el experimento (800 s) (Figura 18A y C). Este hecho demuestra la continuidad existente entre las poblaciones nucleares y citoplásmicas de hSNF5, sugiriendo la existencia de un exporte desde el núcleo hacia el citoplasma y la presencia de una fracción “inmóvil” nuclear que no es transportada al citoplasma.

La localización de la proteína truncada GFP- Δ NES fue similar a la presentada por la silvestre, salvo por un menor pero existente marcaje citoplásmico. Como puede observarse en la Figura 18A y C, la delección de la NES en la célula fotoblanqueada, redujo la pérdida de fluorescencia nuclear al ser comparada con el descenso de la IMF nuclear de GFP-hSNF5. Si bien, debe mencionarse que esta delección no impidió completamente el exporte hacia el citoplasma, posiblemente debido a la existencia de una segunda NES.

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la existencia de un continuo intercambio dinámico de la proteína hSNF5 entre el núcleo y el citoplasma, que sería exportada activamente al citoplasma gracias al reconocimiento de su/s NES por la hCRM1/exportina1.

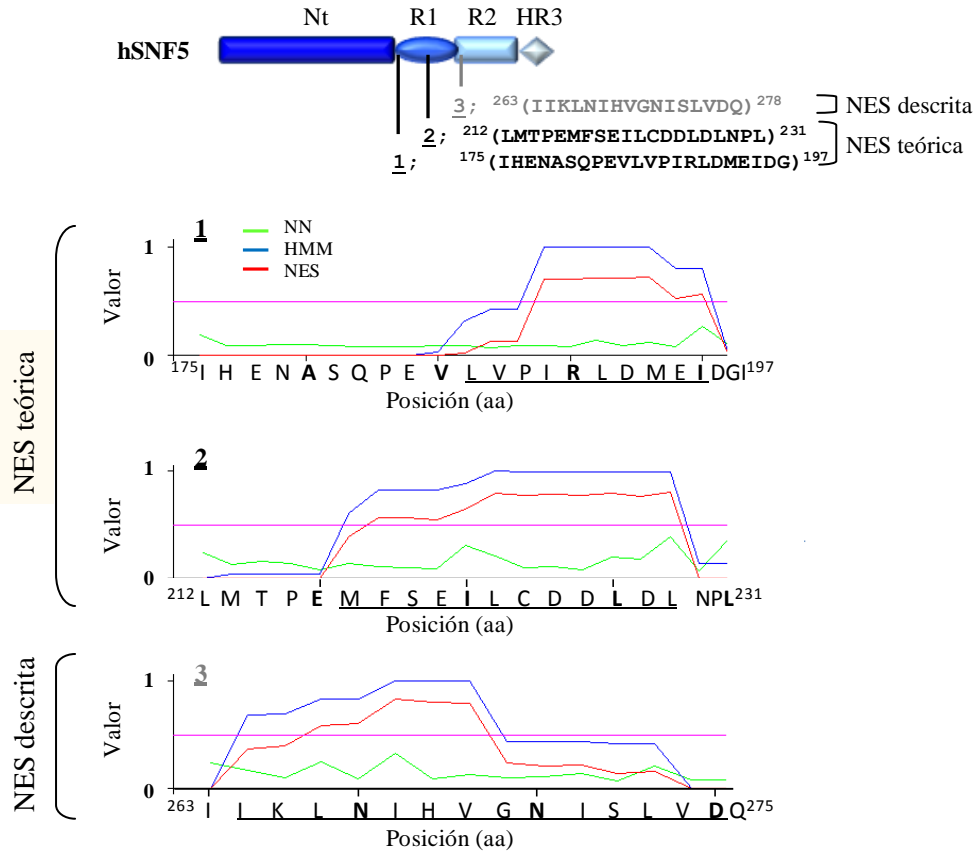
1.3 Estudio de secuencias de exporte y de localización nuclear en hSNF5

En base a los resultados obtenidos en los experimentos de FLIP para la proteína de fusión GFP-hSNF5 delecionada en su única NES descrita (Craig et al., 2002), decidimos realizar un análisis en búsqueda de otras posibles secuencias NES. Para llevarlo a cabo se utilizó la primera aplicación capaz de identificar secuencias de exporte nuclear, llamada NetNES (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>) creada por La Cour y colaboradores (La Cour et al., 2004). Este sistema permite identificar secuencias de exporte nuclear ricas en leucinas en proteínas de eucariotas, combinando la neural network (NN) y los modelos Markov hidden (HMM).

Se ha descrito (Xu et al., 2012) que muchas de las NES identificadas pueden no contener específicamente leucinas, aunque todas siguen un patrón hidrofóbico. La secuencia consenso descrita, para estos péptidos, que suelen estar compuestos por 8 -15 aminoácidos, es $\psi_1 X_{2,3} \psi_2 X_{2,3} \psi_3 X \psi_4$, donde ψ representa Leucina (L) , Valina (V) , Isoleucina (I), Metionina (M) o Fenilalanina (F) y X puede ser cualquier aminoácido, aunque existe predisposición por los cargados negativamente, como el Aspartato (D) o el Glutamato (E). Sin embargo, también se ha descrito que este tradicional consenso sólo ha sido capaz de identificar al ~60% de las NES identificadas experimentalmente (La Cour et al., 2004). Estudios actuales alineando 234 NES experimentalmente identificadas, han permitido generar el siguiente patrón, $\psi X_3 \psi X_2 \psi X \psi$, donde en la tercera y cuarta ψ predominan fuertemente Leucinas. La NES descrita para hSNF5 sigue un patrón prácticamente idéntico al anteriormente expuesto: $\psi X_3 \psi X_2 \psi X \psi X$.

El análisis obtenido para hSNF5 (Figura 19) muestra dos posibles y teóricas NES, además de la NES experimentalmente identificada, $^{266}\text{LNIHVGNISLV}^{276}$ (región 3). Una de las secuencias, valoradas por el sistema que probablemente podría contener una NES, $^{185}\text{LVPIRLDMEI}^{194}$ ($\psi\psi X \psi X \psi X \psi X \psi$) localiza en la región número 1, y la otra, $^{217}\text{MFSEILLCDDL}^{229}$ ($\psi X X X \psi \psi \psi X_3 \psi X \psi$), localizada en la región 2. Algunas de las combinaciones posibles se muestran en la Figura 19B.

A



B

	1	2
<u>hSNF5</u>	EV <u>LVPIRL</u> ..DMEIDGQ .[...].	MFSEILCDDIDL NP..
<u>SNR1</u>	ECLVPIRL ..DMELEGQ .[...].	FAEVL CDDLDLNP..
<u>CeSNF5</u>	EDLVPIRL ..DMELDGI .[...].	IAEIMCEDLDL PL..
<u>SpSNF5</u>	.. LVPIRLE IDADRYK. .[...].	FAEQICIDYDI PL..
<u>ySNF5</u>	EQLVPIRLE FDQDRDRF .[...].	FVDDMLR DYRFED..
<u>SFH1</u> PITL ..DIEHMGH .[...].	FAS IYCKDLDMT... .
CONSENSO	e.lvPIrL ..D.e.g. .[...].	faei.c.Dldl ...
NEses	$\Psi_1(X)_4 \Psi_2X \Psi_3X\Psi_4$ $\Psi_1(X)_2\Psi_2(X)_3 \Psi_3X\Psi_4$	$\Psi_1(X)_4\Psi_2(X)_3\Psi_3X\Psi_4$

Figura 19. Análisis de Secuencias de Exporte Nuclear (NES) teóricas en hSNF5. (A) Localización de regiones que contienen dos teóricas NES (1 y 2) y la NES descrita (3), en hSNF5. Las graficas muestran los valores individuales de los aminoácidos (aa) analizados en las regiones 1, 2 y 3, según puntuación NES (línea roja), calculados a partir del Modelo *Markov Hidden* o HMM (línea azul) y la Artificial Neural Network y NN (línea verde), utilizando el programa NetNES. Los residuos puntuados >0 y <1] se encuentran subrayados. Si la puntuación NES para un residuo supera el umbral (línea morada), podría formar parte de una secuencia de exporte nuclear. (B) Alineamiento de las secuencias detectadas como posibles NES en (A), de hSNF5, *Drosophila* SNR1, *C.elegans* CehSNF5, *S.pombe* SphSNF5 y *S.cerevisiae*, ySNF5 y SFH1. Se indica la secuencia consenso, encuadrada, y alguna de las combinaciones posibles para las NES teóricas. ψ : Leucina, Isoleucina, Valina, Metionina o Fenilalanina. X: cualquier aminoácido. Nt: N-terminal; R: repetición; HR: región homóloga

Además de identificar en hSNF5 la única NES conocida, Craig y colaboradores (Craig et al., 2002) descubrieron la existencia de una secuencia de localización nuclear o NLS en los primeros 130 aminoácidos de la proteína, aunque no identificaron su secuencia.

Existen dos tipos de NLS: la clásica o cNLS y la PY-NLS. La cNLS es la secuencia de localización nuclear mejor caracterizada, pudiendo ser monopartita o bipartita, según esté compuestas por una o dos pequeñas regiones ricas en aminoácidos básicos [Argininas (R) y Lisinas (K)], respectivamente (Dingwall et al., 1991). Ejemplos de secuencias consenso óptimas, incluyen: K(R/K)X(R/K), KR(R/X)K, KR(K/R)R o K(K/R)RK para las monopartitas, y (K/R)(K/R)X₁₀₋₁₂(K/R)_{3/5}, KRX₁₀₋₁₂KRRK, KRX₁₀₋₁₂K(K/R)(K/R) o KRX₁₀₋₁₂K(K/R)X(K/R) para las bipartitas (Marfori et al., 2011). Aunque la distancia existente entre las dos regiones que conforman la cNLS bipartita suele ser de 10-12 aminoácidos, se han descrito casos en los que más de 40 aminoácidos separaban las dos regiones (Lange et al., 2010). La segunda clase de NLS identificada, denominada Prolina- Tirosina (PY)-NLS, sigue la siguiente secuencia consenso: R/H/KX₂₋₅PY, donde H simboliza Histidina (Lee et al., 2006).

Basándonos en lo anteriormente expuesto decidimos analizar los 130 primeros aminoácidos de hSNF5 en búsqueda de su NLS. Su hallazgo podría resultar muy útil en el estudio de su función citoplásmica permitiendo analizar la pérdida de función en este compartimento (construyendo una versión de la proteína carente de su NLS, que desempeñe un papel como dominante negativo) o la ganancia de función en el mismo (construyendo versiones de la proteína carentes de su NES). Hallarla podría ser útil también a la hora de identificar proteínas que interaccionen con ella en el citoplasma (construyendo versiones carentes de su NLS y etiquetadas que nos permitan llevar a cabo experimentos de doble híbrido o análisis proteómico mediante espectrometría de masas.

El análisis de la secuencia aminoterminal de hSNF5 reveló dos posibles NLS compuestas por secuencias que cumplen alguno de los patrones citados (Figura 20). Así, la secuencia ⁴⁵**KRYPSLWRRLATVEERK**⁶² (**KRX₁₃RKK**) cumple casi perfectamente el consenso (K/R)(K/R)X₁₀₋₁₂(K/R)_{3/5}, pudiendo ser una posible

secuencia bipartita, aunque también existe una posible monopartita, la secuencia ⁷⁰**KKTK**⁷³ (**KKXK**), que se ajusta al consenso K(R/K)X(R/K).

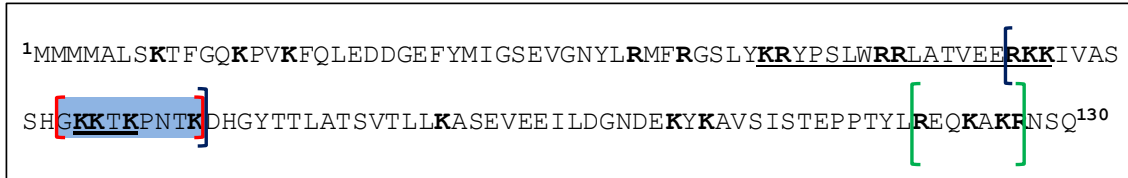


Figura 20. Identificación de secuencias de localización nuclear (NLS) en la región aminoterminal de hSNF5. Las secuencias identificadas como NLS en base a patrones consenso (Marfori et al., 2011) se encuentran subrayadas. Las Lisinas (L) y Argininas (R) se presentan en negrita. Entre corchetes se muestran las secuencias deletionadas en el estudio de la NLS de hSNF5. Los corchetes rojos abarcan una secuencia que está ausente en una isoforma alternativa de hSNF5.

Para llevar a cabo este estudio se construyeron versiones de la proteína que carecían de las regiones entre corchetes, mostradas en la Figura 20, mediante mutagénesis por PCR y posterior clonación en el vector pEGFP-C2. Una de ellas, entre corchetes azules, contiene tanto la segunda región de la secuencia bipartita identificada como 9 aminoácidos ausentes en una isoforma alternativa de hSNF5. La región entre corchetes rojos, abarca sólo los aminoácidos ausentes en la isoforma alternativa. La presencia de esta isoforma en células eucariotas puede apreciarse en análisis por WB de extractos proteicos (Figura 12), visualizándose como una segunda banda debajo de la banda correspondiente a la isoforma más larga, que es la utilizada a lo largo de esta tesis. Además, decidimos deletionar una región rica en aminoácidos básicos (entre corchetes verdes) que en principio no sigue ningún patrón descrito. Las construcciones fueron transfectadas en células COS7 y visualizadas al microscopio de fluorescencia con resultados negativos. Ninguna de las posibles NLS identificadas resultó ser una verdadera NLS, pues ninguna de las proteínas truncadas localizó mayoritariamente en el citoplasma.

2. BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONEN CON hSNF5 EN EL CITOPLASMA

El siguiente abordaje, tras demostrar la existencia de una fracción de hSNF5 en el citoplasma y la continuidad existente entre las moléculas presentes en este compartimento y el nuclear, consistió en buscar proteínas que interaccionen con hSNF5 en el citoplasma. La identificación de proteínas citoplásmicas podría ayudar a esclarecer el papel que quizás ejerza esta proteína supresora de tumores en este compartimento.

Este objetivo se abordó mediante dos aproximaciones experimentales. La primera consistió en un análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) de proteínas capaces de coimmunoprecipitar en el citoplasma de células humanas con una versión etiquetada de hSNF5. La segunda se llevó a cabo mediante un escrutinio de doble híbrido en levaduras.

2.1. Búsqueda de proteínas que interaccionen con hSNF5 mediante espectrometría de masas

Para llevar a cabo este ensayo, en primer lugar, se realizó un fraccionamiento bioquímico con el objetivo de obtener extractos citoplásmicos de células 293T previamente transfectadas con los vectores pCMV-7.1-3xFlag (cuya expresión dará lugar a la síntesis de un péptido que contiene triplicada la secuencia Flag), como control, o pCMV-7.1-3xFlag-hSNF5 (cuya expresión dará lugar a la síntesis de una proteína hSNF5 etiquetada con un triple epítipo Flag: 3xF-hSNF5). Dichos extractos fueron sometidos a inmunoprecipitación con anticuerpos que reconocen el epítipo Flag, unidos a matriz de agarosa. Fracciones de los extractos citoplásmicos (INPUT o INP), posteriormente utilizados en la inmunoprecipitación, y las fracciones inmunoprecipitadas (IP), se sometieron a SDS-PAGE (utilizando geles al 7 y 12% de acrilamida) y posterior tinción con azul de Coomassie (Figura 21A). Las doce proteínas que coimmunoprecipitaron con la proteína 3xF-hSNF5 en el citoplasma se observaron como bandas azules en ambos geles. Porciones individuales de gel conteniendo cada una de las bandas visibles junto a porciones que ocuparon la misma localización en el carril control (3xF) fueron recortadas y procesadas para su identificación por

espectrometría de masa mediante MALDI-TOF. Las proteínas coimmunoprecipitadas identificadas se muestran en la Figura 21A.

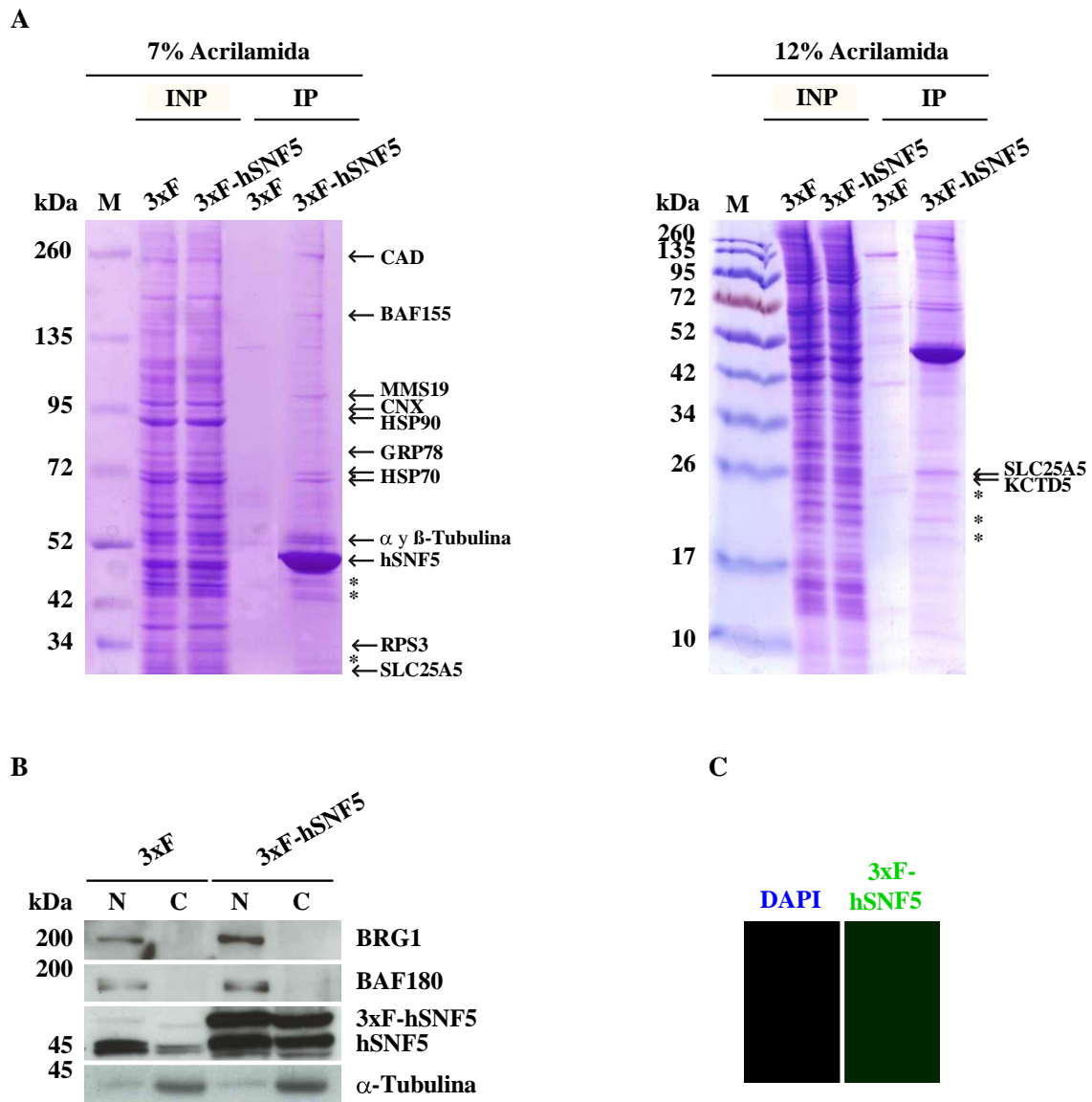


Figura 21. Identificación de proteínas que interactúan con hSNF5 en el citoplasma mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). (A) Extractos citoplásmicos obtenidos a partir de células 293T transfectadas con los vectores pCMV-7.1-3xFlag (carril 3xF), como control, o pCMV-7.1-3xFlag-hSNF5 (carril 3xF-hSNF5) se inmunoprecipitaron (IP) con anticuerpos que reconocían el epitopo Flag (F), unidos a matriz de agarosa. Una fracción del extracto citoplásmico denominada INPUT (0,15% de la cantidad usada en la IP) y las proteínas coimmunoprecipitadas, se sometieron a geles de SDS-poliacrilamida y tinción con azul de Coomassie. Se analizaron todas las bandas visibles del gel al 7% de acrilamida. Del gel al 12% sólo se analizaron las visibles de peso molecular menor a 26 kDa. Se indican las proteínas identificadas por MALDI-TOF. *: productos procedentes de la degradación de hSNF5. (B) Una fracción del extracto citoplásmico (C) obtenido en (A), junto a su correspondiente extracto nuclear (N), se analizó mediante Western Blot. A la derecha de cada panel se muestran las proteínas reconocidas por los anticuerpos utilizados contra BRG1, BAF180, C-hSNF5 y α-Tubulina (C) Localización de la proteína 3xF-hSNF5 (en verde) en células HeLa mediante IF. El DNA se tiñó con DAPI.

Los resultados analizados muestran la interacción, en el citoplasma, de hSNF5 con proteínas tan diversas como CAD (implicada en la biosíntesis de pirimidinas), MMS19 (miembro de la maquinaria que ensambla proteínas con hierro y azufre) o proteínas de choque térmico que actúan como chaperonas entre las que encontramos HSP70, HSP90, GRP78 y Calnexina o CNX (estas dos últimas implicadas en la vía secretora). También se identificaron las proteínas RSP3 (componente de la subunidad 40 S ribosomal), SLC25A5 (transportador mitocondrial y miembro del complejo MMXD), KCTD5 (adaptador en complejos E3 ligasa) y las subunidades α y β Tubulina (subunidades esenciales de los microtúbulos). Curiosamente, también se identificó la interacción de hSNF5 con un miembro del complejo SWI/SNF, BAF155.

Como control de un correcto fraccionamiento bioquímico fracciones del extracto citoplásmico empleado en el experimento, junto a su correspondiente extracto nuclear, fueron analizadas mediante WB (Figura 21B) con anticuerpos que reconocen hSNF5, proteínas exclusivamente nucleares (BRG1 y BAF180) o citoplásmicas (α -Tubulina). La Figura 21C muestra la localización presentada por la proteína 3xF-hSNF5 en células HeLa.

2.2 Análisis de la interacción entre hSNF5/CAD y hSNF5/CNX

La proteína carbamoil fosfato sintetasa/aspartato transcarbamoilasa/dihidroorotasa (CAD) es una proteína multienzimática que lleva a cabo los tres primeros pasos de la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas (Figura 22A), siendo esencial para la proliferación celular (Jones et al., 1980a, 1980b). Cada uno de sus tres dominios estructurales (CPSII, DHO y CAD) cataliza una reacción en la ruta, siendo la actividad CPSasa del dominio CPSII la responsable del paso limitante en la síntesis de nucleótidos de pirimidinas. Se ha descrito que esta actividad se incrementa en células tumorales (Reardon y Weber, 1985; Sigoillot et al., 2004), regulada por la proteína quinasa A y por vías de señalización llevadas a cabo por quinasas activadas por mitógenos, de manera dependiente de proliferación y de ciclo celular (Graves et al., 2000; Huang y Graves, 2003). Por esta razón decidimos estudiar un poco más a fondo la interacción entre esta proteína y hSNF5, encontrada mediante espectometría de masas, ya que tal vez esta interacción afecte a la actividad multienzimática de CAD.

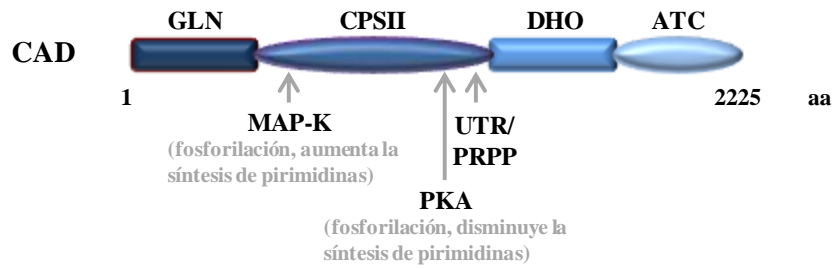
Con el fin de analizar si la interacción entre hSNF5 y CAD tenía lugar en células humanas en cultivo, se llevaron a cabo experimentos de coimmunoprecipitación. En estos ensayos extractos totales de células 293T transfectadas con la construcción pCMV-7.1-3xFlag-hSNF5, se sometieron a inmunoprecipitación con anticuerpos que reconocen al epítipo Flag o específicos frente a CAD. Como control negativo, los lisados fueron inmunoprecipitados en paralelo con inmunoglobulinas G no relacionadas (IgG). Un porcentaje del lisado (INP) y las fracciones inmunoprecipitadas (IP) se utilizaron en ensayos de WB para visualizar las proteínas coimmunoprecipitadas. Como se muestra en la Figura 22B, la proteína 3xFlag-hSNF5 coimmunoprecipitó con la proteína endógena CAD y viceversa, confirmando el resultado obtenido mediante espectrometría de masas.

El siguiente paso consistió en determinar con qué dominio/s de CAD interaccionaba hSNF5. Para averiguarlo, extractos totales de células 293T transfectadas con la construcciones pCDNA-3.1-His-Flag-CAD, pCDNA-3.1-His-Flag-CPSII, pOPIN-M-His-MBP-DHO o pOPIN-M-His-MBP-ATC, cuya expresión daba lugar a la síntesis de la proteína completa o de cada uno de sus dominios, y pRSV-HA-hSNF5 fueron inmunoprecipitados con anticuerpos frente a Ha (Figura 22C). Como control negativo, los lisados fueron inmunoprecipitados en paralelo con inmunoglobulinas G no relacionadas (IgG). Un porcentaje del lisado (INP) y las fracciones inmunoprecipitadas (IP) se utilizaron en ensayos de WB para visualizar las proteínas coimmunoprecipitadas.

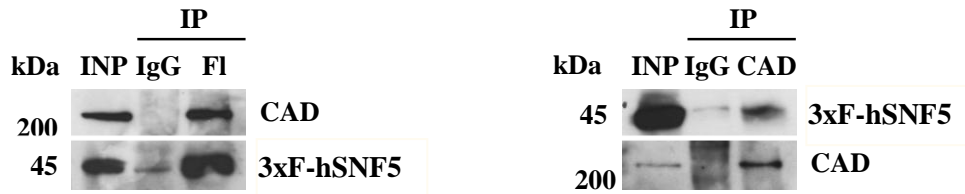
Como se muestra en la Figura 22C, la proteína CAD completa, así como su dominio CPSII coimmunoprecipitaron con hSNF5. Este resultado sienta la base para estudiar en profundidad si la interacción existente entre hSNF5 y el dominio CPSII afecta a la actividad del mismo y con ello a la actividad de CAD.

Para investigar si las proteínas endógenas en estudio (hSNF5 y CAD) son capaces de interactuar entre sí, se llevó a cabo un ensayo PLA (“Proximity Ligation Assay”). Este ensayo permite detectar, visualizar y cuantificar la asociación proteína-proteína en muestras celulares preparadas para microscopía.

A



B



C

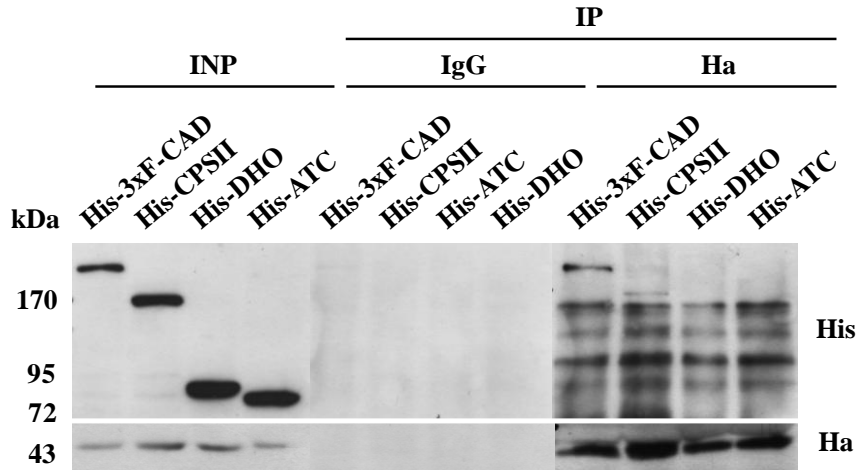


Figura 22. hSNF5 y CAD interactúan *in vivo* a través del dominio CPSII de CAD en ensayos de coimmunoprecipitación. (A) Organización estructural y regulación de CAD. Dominios funcionales: glutaminasa (GLNasa), CPSII (Carbamoil Fosfato Sintetasa), Aspartato TransCarbamoilasa (ATCasa) y DiHidroOrotasa (DHOasa). Los ligandos alostéricos UTP (inhibidor) y PRPP (activador) se unen al dominio CPSII. La actividad CPS (CPSasa) es controlada por MAP quininas (MAP-K) y fosforilación (PKA). Adaptado de Sigoillot et al., 2004. (B) Extractos totales de células 293T transfectadas con el vector pCMV-7.1-3xFlag-hSNF5 fueron inmunoprecipitados (IP) con anticuerpos generados frente al epítipo Flag (Fl) o frente a la proteína CAD. Las proteínas coimmunoprecipitadas se muestran en los paneles superiores de cada experimento. (C) Extractos totales de células 293T transfectadas con los plásmidos pCDNA-3.1-His-Flag-CAD (His-3xF-CAD), pCDNA-3.1-His-Flag-CPSII (His-CPSII), pOPIN-M-His-MBP-DHO (His-DHO) o pOPIN-M-His-MBP-ATC (His-ATC) y pRSV-Ha-hSNF5, fueron inmunoprecipitados (IP) con anticuerpos generados frente al epítipo Ha. Las proteínas coimmunoprecipitadas se muestran en el panel superior. En (A) y (B), como control negativo, los lisados fueron inmunoprecipitados con inmunoglobulinas (IgG). Como control de expresión se utilizó una fracción del extracto total, INP (2% de la cantidad usada en la IP).

Como se describe detalladamente en el apartado 9.4 de Materiales y métodos, se requiere el uso de dos anticuerpos primarios generados en diferentes especies, que reconocerán las proteínas de interés, y dos anticuerpos secundarios conjugados cada uno a un único DNA monocatenario (sonda) que reconocerán específicamente los anticuerpos primarios. Si las dos sondas se encuentran muy próximas, interaccionarán a través de un círculo de DNA formado por otros dos oligonucleótidos de DNA. Esta estructura será ligada, amplificada por una polimerasa y finalmente detectada mediante microscopía, gracias a sondas fluorescentes de oligonucleótidos de DNA complementarias. En paralelo al ensayo de interacción con CAD y haciendo uso de esta técnica, se investigó la posible interacción existente entre hSNF5 y una chaperona del retículo endoplasmático identificada por MALDI-TOF, CNX.

Inesperadamente, el uso conjunto de anticuerpos primarios frente a hSNF5 y CAD no dio lugar a señal alguna (Figura 23A y B) en células HeLa. Este resultado no descarta la existencia de interacción indirecta a través de otras proteínas citoplásmicas, puesto que la interacción ha sido verificada previamente por IP (Figura 21A, 22B y C), o de interacción directa, no visible debido al gran tamaño de CAD o conformación de los anticuerpos en el ensayo. El uso conjunto de anticuerpos primarios frente a hSNF5 y CNX reveló la existencia de asociación entre los miembros que conforman la pareja, observándose estructuras punteadas localizadas en el lugar de interacción (Figura 23A). El análisis y la cuantificación de la señal obtenida en este ensayo PLA se realizó gracias a la aplicación Granularity del programa MetaMorph, que permite determinar el número de elementos punteados por célula analizada.

La localización de las proteínas mencionadas anteriormente se visualizó por IF en células HeLa, utilizando los mismos anticuerpos usados en el ensayo PLA. Como se muestra en la Figura 23B, CAD presentó localización mayoritariamente citoplásmica (Sigoillot et al., 2005) de marcaje más intenso alrededor de la envoltura nuclear. CNX mostró marcaje citoplásmico, más intenso en la zona del retículo endoplásmico, aunque en células HeLa esta proteína también estaba presente en la membrana celular (Figura 23D), hecho previamente descrito (Okazaki et al., 2000).

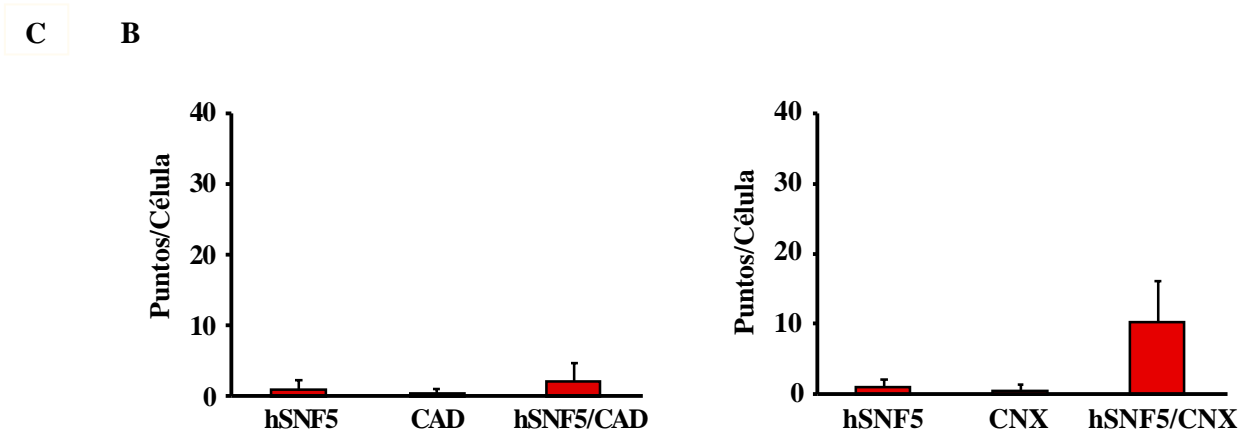
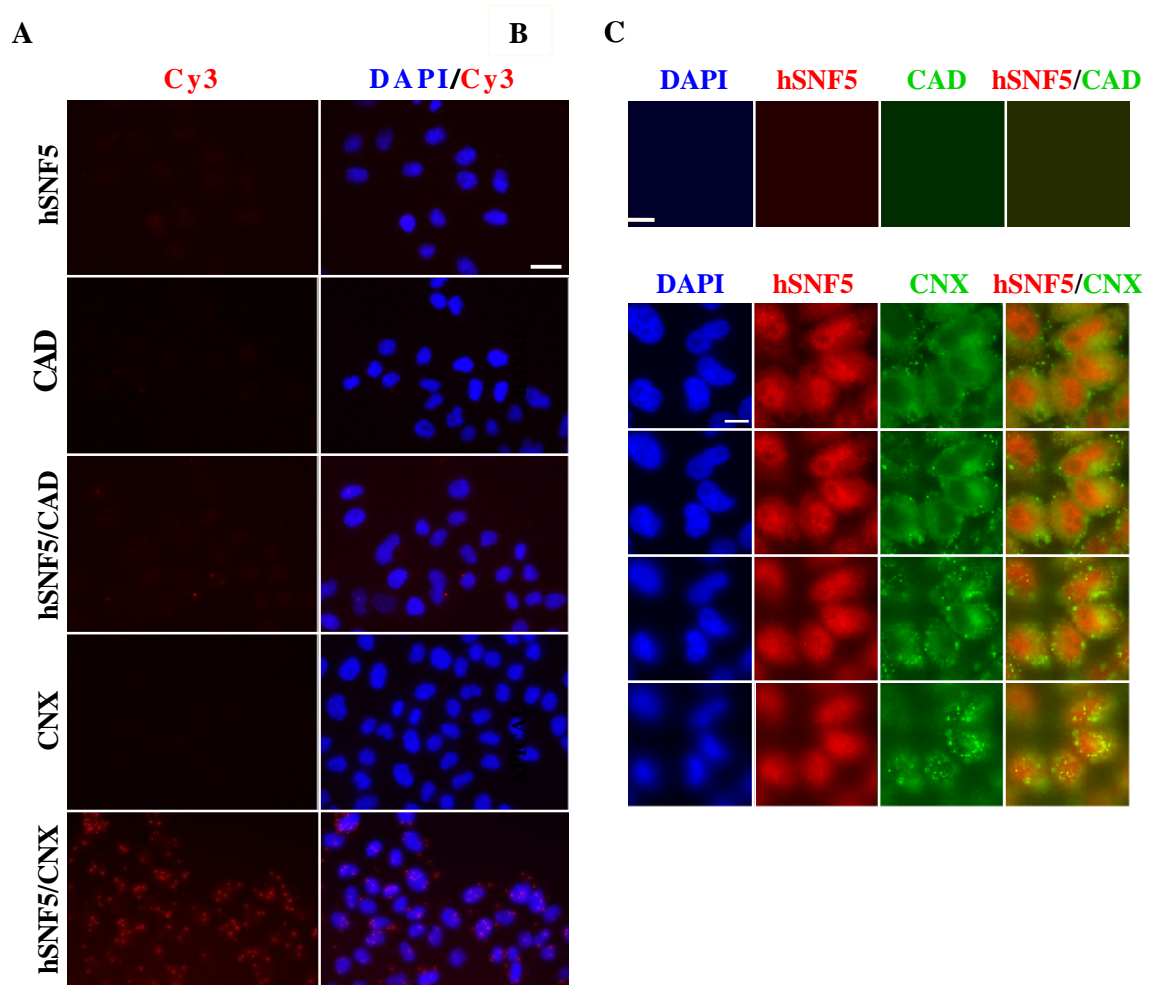


Figura 23. hSNF5 interacciona con CNX, pero no con CAD, *in situ* mediante ensayo de ligación proximal (PLA). Células HeLa, fijadas y permeabilizadas, se incubaron con los anticuerpos hSNF5 (R-hSNF5), GRP78, CAD y CNX solos, como control negativo, o por parejas. Las regiones punteadas (en rojo) representan regiones de estrecha proximidad proteína-proteína. **(B)** Localización de las proteínas endógenas hSNF5 (en rojo), CAD y CNX (en verde) en células HeLa mediante Inmunofluorescencia, utilizando los anticuerpos primarios usados en el PLA. En el ensayo con CNX se muestran distintos planos desde la parte más basal a la más apical. Barra de escala 25 μ m (A) y 10 μ m (B). El ADN se tiñó con DAPI (en azul) en (A) y (B). **(C)** Cuantificación de la señal obtenida en (A) mediante la aplicación Granularidad del programa Metamorph. Los datos obtenidos proceden de dos experimentos independientes con n > 80 células por condición.

En conjunto, estos datos indican que hSNF5 etiquetada es capaz de interactuar con CAD en ensayos de coimmunoprecipitación mediante su dominio CPSII. Sin embargo, los resultados negativos obtenidos en el ensayo PLA sugieren que una interacción indirecta. La interacción hSNF5 y CNX, identificada mediante espectrometría de masas, fue verificada mediante PLA.

2.3 Búsqueda de proteínas que interactúen con hSNF5 mediante escrutinio de doble híbrido

Como segunda aproximación experimental para identificar proteínas que interactúen con hSNF5 se llevó a cabo el escrutinio de una genoteca de cDNA de embrión de ratón de 8,5 días de desarrollo mediante ensayo de doble híbrido en *S.cerevisiae* (apartado 8.8, Materiales y Métodos). Como “cebo” se utilizó la proteína GBD-hSNF5, resultante de la clonación del cDNA que codificaba hSNF5 en el vector pDBLeu, en fase con la secuencia del dominio de unión al DNA del factor transcripcional GAL4 (GBD). Como proteínas “presas” se utilizaron las expresadas a partir de la genoteca de cDNA de ratón, clonadas en el vector pPC86, fusionadas al dominio de activación de GAL4 (GAD). Para confirmar la interacción entre proteínas, se analizó la expresión de dos genes chivatos, *HIS3* y *LACZ*. La existencia de interacción activa los genes *HIS3* y *LACZ*, permitiendo a la levadura crecer en medio selectivo o producir color azul en medio con X-Gal, respectivamente.

2.4 Análisis de los positivos obtenidos en el escrutinio de doble híbrido

De los 3×10^6 transformantes analizados en el escrutinio se aislaron 17 clones capaces de crecer en medio selectivo suplementado con 50 mM de 3AT. La secuenciación de los fragmentos de cDNA que portaban los clones obtenidos en el escrutinio de doble híbrido reveló que 6 de los 17 clones eran “falsos” positivos. El análisis de sus secuencias permitió identificar 8 proteínas diferentes, estando 2 de ellas codificadas por más de un cDNA (Tabla 9). Una de las proteínas obtenidas en el escrutinio, representada por triplicado en los cDNAs secuenciados, fue Smarcc2, una de

las subunidades del complejo SWI/SNF de ratón, homóloga a la subunidad BAF170 en humanos. Este hallazgo valida el escrutinio, pues ambas proteínas, hSNF5 y Smarcc2, pertenecen al complejo SWI/SNF. Además, la interacción entre hSNF5 y homólogos de Smarcc2 en *Mus musculus* (SRG3) y *Arabidopsis thaliana* (ATSWI3) ha sido descrita previamente (Sarnowski et al. 2005; Sohn et al., 2007).

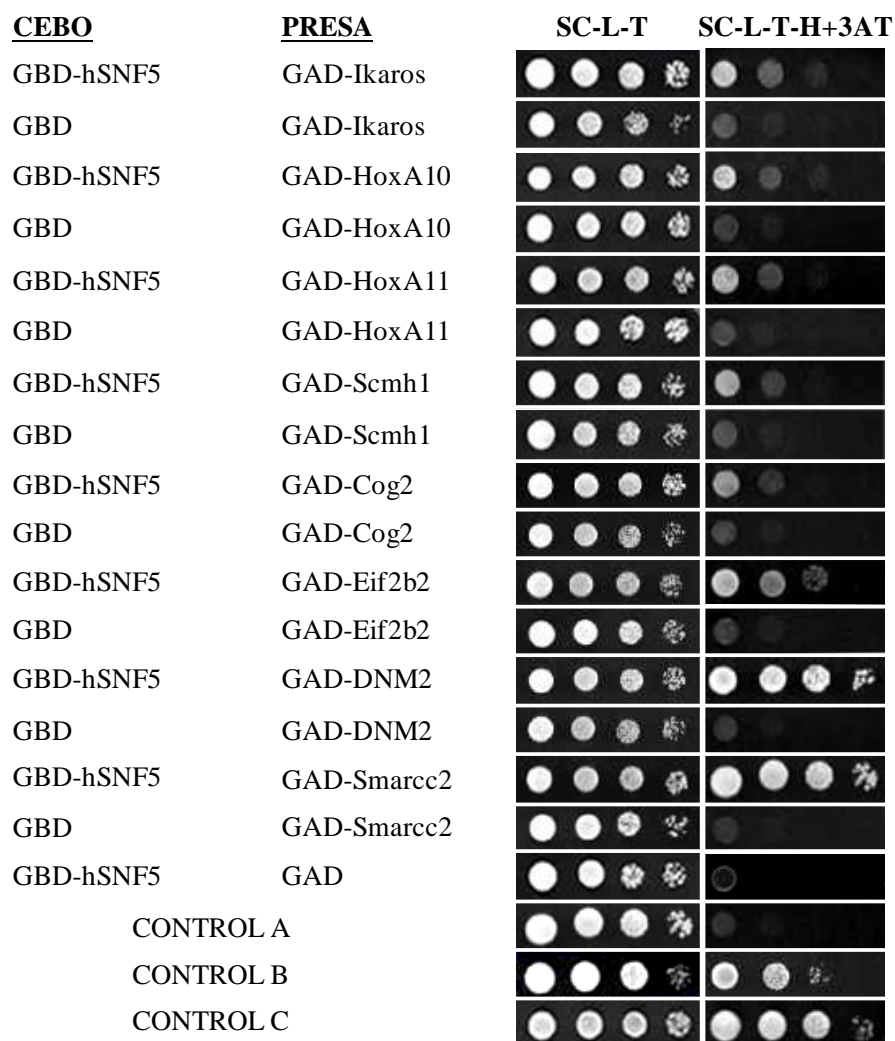
Tabla 9. Análisis de los positivos obtenidos en el análisis de doble híbrido

PROTEÍNA	Nº CLONES	FRAGMENTO DEL CLON*	TAMAÑO COMPLETO*	DOMINIOS
Ikzf1/Ikaros	1	134-535	535	Dedos de zinc C2H2
Hoxa10	1	21-343	416	Homeodominio
Hoxa11	1	86-313	313	Homeodominio
Scmh1	1	502-664	664	SAM, HDACid
Smarcc2	3	5-617 229-617 320-617	1213	Cromodominio, SWIRM
Cog2	1	577-731	731	HDACid
Dnm2 isoforma aa	1	1-870	870	GTPasa, MD, GED, PH, PRD
Eif2b2	2	1-351	351	HDACid

Para verificar y determinar la intensidad de la interacción existente entre los positivos identificados y hSNF5 se llevó a cabo un ensayo de doble híbrido en *S.cerevisiae*. En este ensayo se determinó cualitativamente tanto el crecimiento de los clones positivos en medio selectivo (Figura 24A) como la actividad β -galactosidasa (Figura 24B) presentada por dos de ellos. Como controles del ensayo se utilizaron cepas derivadas de la estirpe de levadura MAV103 (Tabla 8, página 71): control A: control negativo que expresa proteínas que no interactúan; control B y C: controles positivos que expresan proteínas de interacción débil y moderadamente fuerte, respectivamente.

El crecimiento de los clones positivos en medio selectivo reveló interacciones débiles entre GBD-hSNF5 y las proteínas Ikaros, HoxA10, HoxA11, Scmh1 y Cog2 fusionadas a GAD, pues el crecimiento de los transformantes dobles en medio selectivo fue ligeramente superior al presentado por la levadura Control A, o al que mostraron las células que sintetizaron GBD solo y las proteínas Ikaros, HoxA10, HoxA11, Scmh1 o Cog2 fusionadas a GAD. La interacción entre hSNF5 y Eif2b2 se clasificó como moderada, ya que el crecimiento mostrado en medio selectivo resultó ser similar al de la estirpe Control B.

A



B

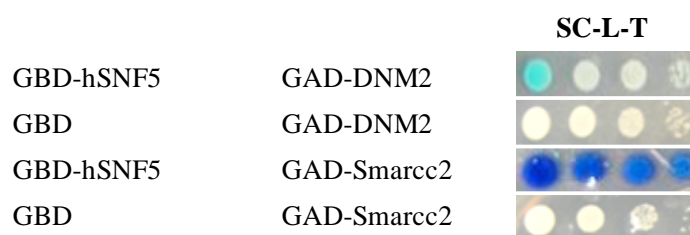


Figura 24. Interacción entre hSNF5 y los positivos encontrados en el escrutinio mediante ensayo de doble híbrido. El cDNA que codifica la proteína hSNF5 se clonó en fase con el dominio de unión al DNA del factor transcripcional GAL4 (GBD), utilizándose la construcción resultante como “cebo”. Los cDNAs de los positivos obtenidos en el ensayo presentes en la genoteca, fusionados al dominio de activación del DNA del factor transcripcional GAL4 se utilizaron como “presas”. Las levaduras cotransformadas se diluyeron en agua estéril hasta alcanzar una DO_{600} 0,4 y se sembraron diluciones seriadas con factor de dilución 10. **(A)** La activación del gen *HIS3* se detectó mediante el ensayo de crecimiento en medio no selectivo (SC-Leu (L)-Trp (T)) o selectivo (SC-L-T-His (H)+50 mM 3AT) de la estirpe MAV203 coexpresando las construcciones indicadas en la figura. Las estirpes control del sistema expresan proteínas que no interaccionan entre sí (Control A), que interaccionan débilmente (Control B) o moderadamente fuerte (Control C). **(B)** La activación del gen *LACZ* se detectó determinando cualitativamente la actividad β -galactosidasa (tinción azul) en los clones mostrados en la figura.

Las interacciones más fuertes las presentaron las levaduras que sintetizaron GBD-hSNF5 y GAD-Smarcc2 y las proteínas GBD-hSNF5 y GAD-Dnm2 (en adelante, DNM2). Estos clones fueron los únicos que mostraron una notable actividad β -galactosidasa (Figura 24B).

El hallazgo de la interacción entre hSNF5 y DNM2 resultó sorprendente no sólo por la fuerte interacción existente entre estas proteínas, sino también por el hecho de haber identificado una proteína de localización citoplásmica que interacciona con hSNF5. Como este hallazgo podría revelar un papel desempeñado por este supresor de tumores en el citoplasma, decidimos estudiar esta interacción más a fondo.

3 ESTUDIO MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN ENTRE hSNF5 y DINAMINA2 (DNM2)

3.1 Análisis de los dominios esenciales en la interacción hSNF5/DNM2

Para determinar qué dominio/s estaban implicados en la interacción entre hSNF5 y DNM2, se generaron versiones truncadas de estas proteínas fusionadas al dominio de unión o activación al DNA de GAL4. Estas construcciones se utilizaron como “cebo” y “presa” respectivamente en ensayos de interacción de doble híbrido. Para determinar los posibles dominios de hSNF5 involucrados en su interacción con DNM2 construimos versiones truncadas de la proteína, fusionadas a GBD. Una de ellas incluía la región N-terminal (Nt), mientras que otra contuvo las repeticiones 1-2 (R1 y R2) y la región homóloga (RH) 3. Como se observa en la Figura 25, la expresión de ninguna de estas construcciones consiguió restablecer la expresión del gen *HIS3* de manera similar a la silvestre. Este hecho refleja que existen dominio/s esenciales para la interacción en ambos fragmentos. Por ello, se generaron otras dos construcciones, una formada por los dominios Nt, R1 y R2, que tampoco logró restablecer el crecimiento en medio selectivo, y otra constituida por los dominios Nt y HR3.

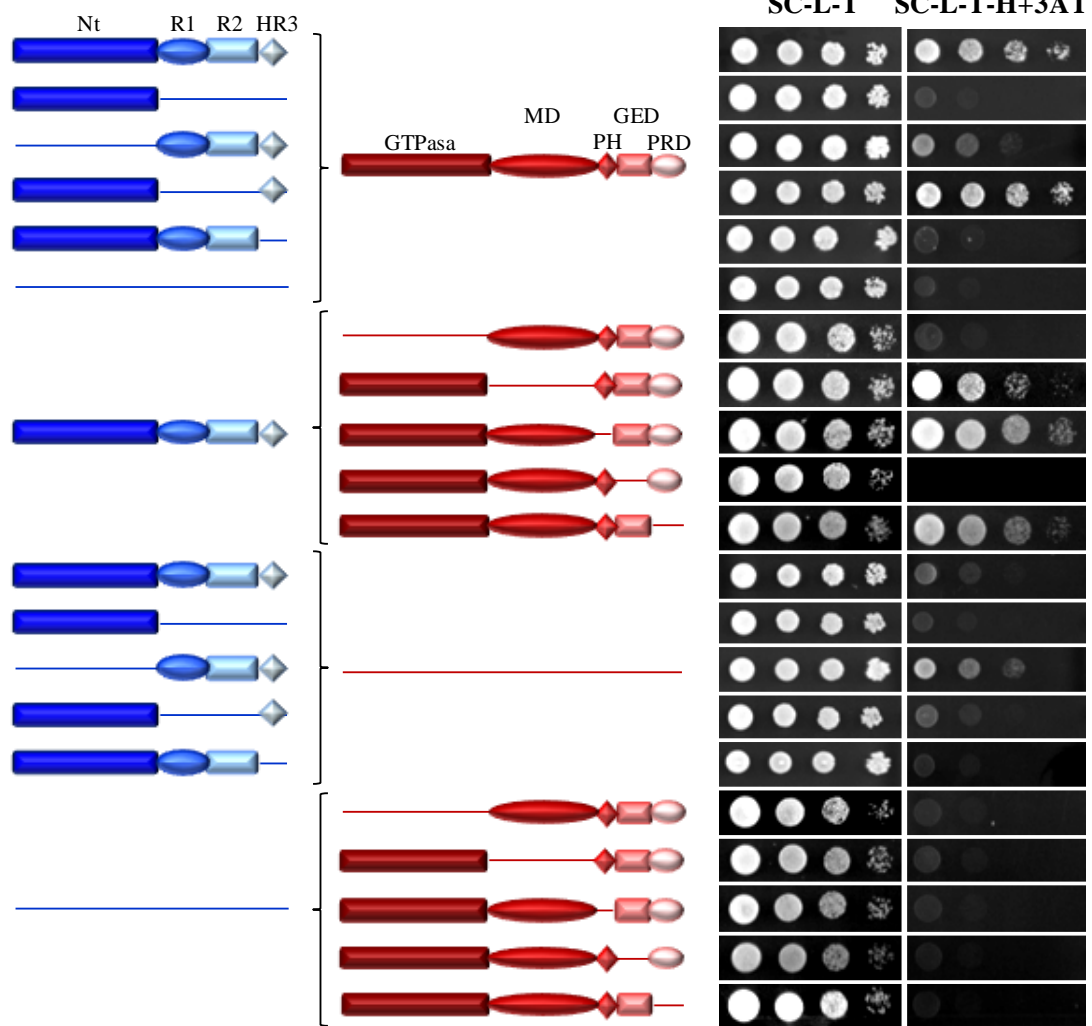
GBD-hSNF5**GAD-DNM2**

Figura 25. Mapeo de la interacción entre hSNF5 y DNM2 mediante ensayo de doble híbrido. Los cDNAs que codificaban hSNF5 o deleciones de la misma se clonaron en fase con el dominio de unión al DNA del factor transcripcional GAL4 (GBD), utilizándose las construcciones resultantes como “cebo”. Los cDNAs que codificaban DNM2 o deleciones de la misma, se clonaron en fase con el dominio de activación del DNA de GAL4 (GAD), utilizándose las construcciones resultantes como “presas”. Diluciones seriadas de la estirpe de levadura transformada con las construcciones que se muestran en la figura, se cultivaron en medio no selectivo (SC-Leu (L)-Trp (T)) y en medio selectivo suplementado con 50 mM de 3AT (SC-L-T-His (H) +3AT), para detectar la activación del gen *HIS3* gracias a la interacción. Las proteínas GBD y GAD se muestran como barras de color azul y rojo, respectivamente. Los dominios de las proteínas en estudio se muestran en forma de esquema: Nt: región N-terminal; R: repeticiones, HR: región homóloga; MD: dominio intermedio; PH: dominio homólogo Pleckstrin; GED: dominio efector GTPasa; PRD: dominio rico en prolina.

Los resultados obtenidos utilizando esta última construcción identificaron los dominios Nt y HR3 como regiones esenciales y suficientes para la interacción con DNM2. Sólo la levadura capaz de sintetizar las proteínas de fusión GBD-Nt-HR3 y GAD-DNM2 fue capaz de crecer en medio selectivo de manera similar a la estirpe que sintetizaba las proteínas completas (GBD-hSNF5 Y GAD-DNM2).

Con el fin de identificar los dominio/s de DNM2 implicados en su interacción con hSNF5, se construyeron 5 versiones truncadas de la proteína fusionadas a GAD. Cada una de ellas carente de uno de los 5 dominios que conforman la proteína: GTPasa, MD, PH, GED y PRD. El resultado de las interacciones entre hSNF5 y las distintas delecciones de DNM2 indicó que los dominios GTPasa y GED fueron esenciales para la interacción, pues la carencia de alguno de ellos impidió por completo el crecimiento de la levadura en medio selectivo. Estudios recientes han demostrado que parte de los dominios GTPasa y GED se pliegan juntos formando un elemento estructural a través del cual podrían interactuar con hSNF5 (Faelber et al., 2011; Ford et al., 2011).

3.2 Estudio de la implicación de DNM2 en el transporte de hSNF5 al citoplasma

El modelo de transporte nuclear propuesto por Craig y colaboradores (Craig et al., 2002) contempla la posibilidad de que hSNF5 presente una NES oculta por su dominio HR3 y que un cambio conformacional pueda desenmascarar la NES. Teniendo en cuenta que el dominio HR3 es esencial en la interacción con DNM2, y a pesar de ser una proteína citoplásmica, tal vez una fracción de ésta esté presente en el núcleo o su entrada en este compartimento se produzca tras un estímulo desconocido. Este hecho la involucraría en el transporte nucleo-citoplasma de hSNF5.

Para determinar si la localización nuclear de esta GTPasa dispara el transporte de hSNF5 se generaron un vector cuya expresión daba lugar a la proteína DNM2 fusionada a un epítipo Flag y a una NLS del virus SV40 (F-NLS-DNM2). También se generó otro vector cuya expresión daba lugar a una proteína hSNF5 etiquetada con un epítipo Ha (Ha-hSNF5). Ambas construcciones se expresaron en células HeLa que tras 24 h se procesaron para IF (Figura 26).

Los resultados demuestran que la presencia nuclear de DNM2 provoca cambios en la distribución de hSNF5 que colocaliza con DNM2 en numerosas estructuras puntuadas. Sin embargo, la proteína F-NLS-DNM2 no provocó el transporte de Ha-hSNF5 al citoplasma. Es posible que la NLS fusionada a DNM2 sea dominante e impida el transporte.

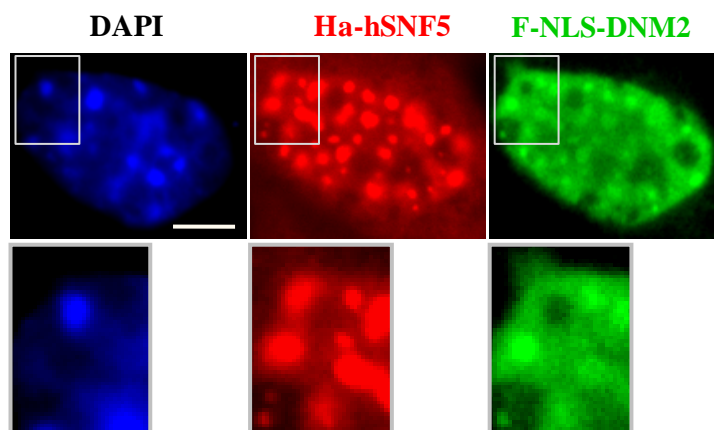


Figura 26. DNM2 etiquetada con un epítipo Flag (F) y una Secuencia de Localización Nuclear (NLS) provoca redistribución de Ha-hSNF5 y colocaliza con ella en estructuras nucleares punteadas. Células HeLA fueron transfectadas con las construcciones pARSV-Sp-Ha-hSNF5 (en rojo) y pARSV-Sp-Flag-NLS-DNM2 (en verde) y tras 30 h fueron procesadas para Inmunofluorescencia. Barra de escala 5 μ m. El DNA se tiñó con DAPI.

3.3 Estudio de la interacción hSNF5/DNM2 mediante “pull down”

Los resultados anteriormente mostrados indican que la interacción entre hSNF5 y DNM2 es posible en la levadura *in vivo*. Con el propósito de comprobar si tal interacción se confirmaba *in vitro*, llevamos a cabo un ensayo de “pull down” tal y como se describe en el apartado 8.7 de Materiales y Métodos. Además, como las dinaminas cambian de conformación en presencia de GDP o GTP, decidimos investigar si la interacción se veía afectada en alguna de estas condiciones. Para ello se incubaron las proteínas purificadas GST o GST-hSNF5 unidas a matriz “Gluthatione Sepharose® 4B” con His-DNM2, en presencia de GDP o GTP γ S (análogo no hidrolizable del GTP). Las proteínas precipitadas se detectaron mediante WB, utilizando anticuerpos que reconocen el epítipo His y la GST. Como se muestra en la Figura 27, la proteína His-DNM2 fue eficazmente retenida por la proteína GST-hSNF5 y en igual medida, en presencia de GDP o GTP γ S, pero no por la GST sola. Este hecho reveló que las proteínas hSNF5 y DNM2 son capaces de interactuar directamente *in vitro*, en presencia de GDP o GTP γ S.

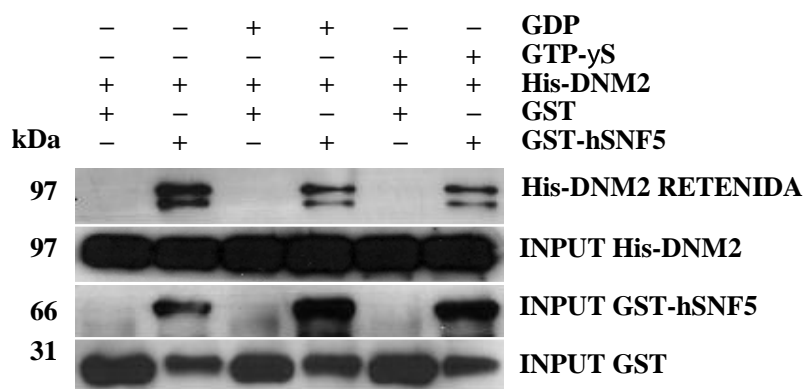


Figura 27. GST-hSNF5 interacciona directamente con His-DNM2 en presencia de GDP o GTP γ S mediante ensayo de “pull down”. Las proteínas GST o GST-hSNF5 unidas a matriz se incubaron con la proteína recombinante His-DNM2 en presencia de GDP o GTP γ S. Las proteínas precipitadas se detectaron mediante Western Blot, utilizando anticuerpos que reconocen los epítomos His y GST. Se muestran las proteínas empleadas en el ensayo (INPUT) y las retenidas.

3.3 Estudio de la interacción entre hSNF5 y DNM2 mediante coimmunoprecipitación

Con el fin de analizar si la interacción entre hSNF5 y DNM2 tiene lugar en células humanas en cultivo se llevaron a cabo experimentos de coimmunoprecipitación. En estos ensayos, células 239T se transfectaron con las construcciones pAdRSV-Sp-Ha-DNM2 y pAdRSV-Sp-Flag-hSNF5, cuya expresión daba lugar a la síntesis de las proteínas Ha-DNM2 y Flag-hSNF5 (F-hSNF5) respectivamente. Tras 24 horas, se obtuvieron extractos totales que fueron sometidos a inmunoprecipitación con anticuerpos generados en ratón frente al epítipo Ha, o en conejo frente al epítipo Flag (Figura 28A). Como control negativo, los lisados fueron sometidos a inmunoprecipitación en paralelo con inmunoglobulinas G no relacionadas (IgG) generadas en ratón o en conejo. Un porcentaje del lisado y las fracciones inmunoprecipitadas se utilizaron en ensayos de WB para visualizar las proteínas coimmunoprecipitadas. Como se muestra en la Figura 28A, hSNF5 coimmunoprecipitó con DNM2 y viceversa, confirmando el resultado obtenido en el escrutinio de doble híbrido y en el ensayo de “pull down”.

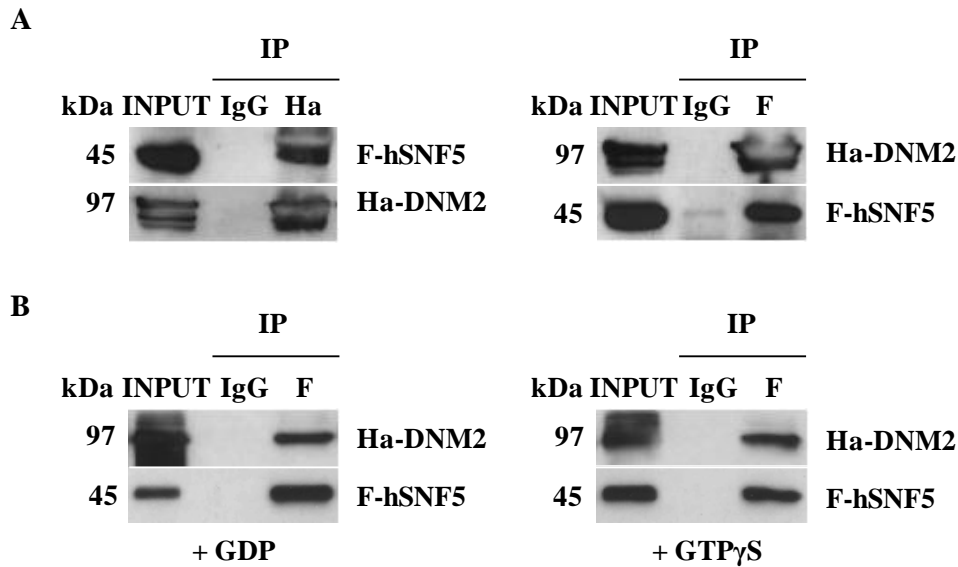


Figura 28. Flag-hSNF5 (F-hSNF5) y Ha-Dinamina2 (Ha-DNM2) interactúan *in vivo* en ensayos de coimmunoprecipitación. Extractos totales de células 293T transfectadas con construcciones de expresión de las proteínas Flag-hSNF5 y Ha-DNM2 fueron sometidos a inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos generados en ratón frente al epítipo Ha (Ha) o en conejo frente al epítipo Flag (F). (A) en presencia de GDP o GTP γ S. (B) Las proteínas coimmunoprecipitadas e inmunoprecipitadas se muestran en los paneles superiores e inferiores de cada experimento, respectivamente. Como control negativo los lisados fueron inmunoprecipitados con inmunoglobulinas (IgG) generadas en ratón o en conejo. Como control de expresión se utilizó una fracción del extracto total denominada INPUT (2% de la cantidad usada en la IP).

Para verificar que la interacción no se veía alterada por el cambio conformacional que experimenta DNМ unida a GDP o GTP, se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación similares a los anteriormente descritos, en presencia de GDP o GTP γ S (un análogo no hidrolizable del GTP). Los resultados mostraron que DNМ2 co-inmunoprecipitó con hSNF5 en igual medida en ambas condiciones (Figura 18B), confirmando el resultado obtenido en el ensayo de “pull down”.

3.5 Estudio de la interacción entre hSNF5 y DNМ2 mediante ensayo de ligación proximal

Para investigar la localización y la proximidad las proteínas endógenas hSNF5 y DNМ2 en estudio se llevó a cabo un ensayo de ligación proximal (PLA)

Como se observa en la Figura 29, el uso conjunto de anticuerpos primarios frente a hSNF5 y DNМ2 dio lugar a una señal punteada fuerte de localización mayoritariamente citoplásmica (Figura 29A y C) en células HeLa, debido a la asociación de ambas proteínas endógenas. Sin embargo, esta señal fue prácticamente

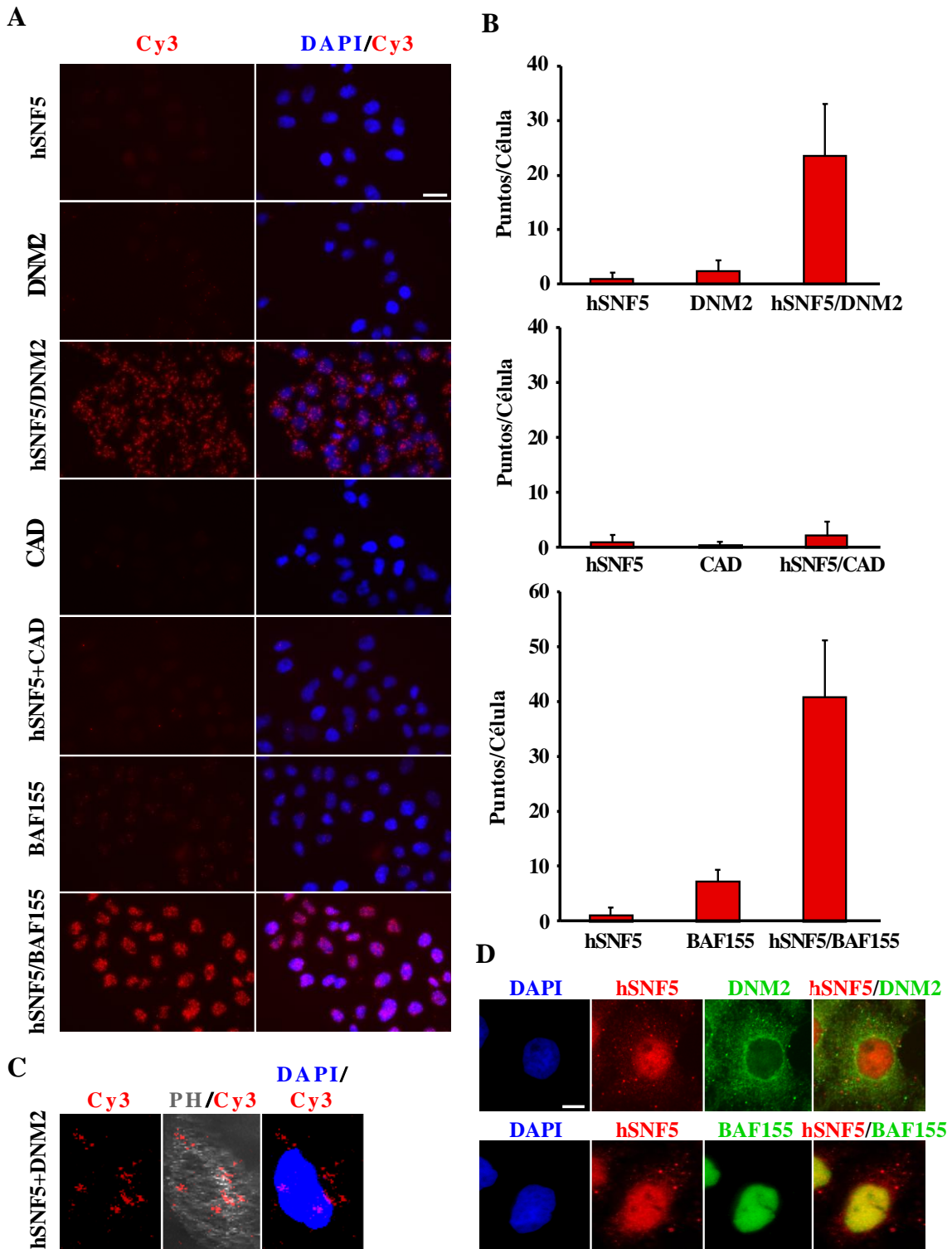


Figura 29. El ensayo de ligación proximal (PLA) *in situ* revela interacción entre las proteínas hSNF5 y DNM2 en células HeLa. (A) Células fijadas y permeabilizadas se incubaron con los anticuerpos primarios indicados solos o por parejas para llevar a cabo el ensayo de PLA. Como control negativo se utilizó la pareja de anticuerpos hSNF5/CAD y como control positivo, hSNF5/BAF155. Las regiones punteadas (en rojo) representan regiones de estrecha proximidad proteína-proteína. **(B)** Cuantificación de la señal obtenida en (A). Los datos obtenidos proceden de dos experimentos independientes con $n > 80$ ó 130 células por condición. **(C)** Ensayo de PLA realizado en una célula HeLa utilizando los anticuerpos hSNF5/DNM2, donde se aprecia una señal mayoritariamente citoplásmica (en rojo). PH: contraste de fase. **(D)** Localización de las proteínas endógenas hSNF5 (en rojo), DNM2, y BAF155 (en verde) en células HeLa mediante Inmunofluorescencia, utilizando los anticuerpos primarios usados en el PLA. Barra de escala: 25 μm (A), 10 μm (C,D). El DNA se marcó con DAPI (en azul) en (A), (B) y (C).

inapreciable en ensayos realizados con cada anticuerpo primario, de manera independiente, hecho que verifica la especificidad de dicho ensayo. Como control negativo, se utilizaron conjunta o independientemente anticuerpos primarios frente a hSNF5 y CAD. Como control positivo se utilizaron anticuerpos primarios frente a hSNF5 y BAF155, una subunidad del complejo SWI/SNF cuya interacción con hSNF5 ha sido previamente demostrada (Figura 21, página 100). La localización de todas las proteínas mencionadas anteriormente (excepto la de CAD, mostrada previamente en la Figura 23C, página 105) se visualizó por IF en células HeLa utilizando los mismos anticuerpos usados en el ensayo PLA (Figura 29D).

El análisis y la cuantificación de la señal obtenida en este ensayo PLA se realizó gracias a la aplicación Granularity del programa MetaMorph, que permite determinar el número de elementos puntuados por célula analizada. Como se muestra en la Figura 29B, se obtuvieron 43, 23 y 2 puntos de interacción por célula, cuando se usaron conjuntamente anticuerpos frente a hSNF5/BAF155 (control positivo), hSNF5/DNM2 o hSNF5/CAD (control negativo), respectivamente.

3.6 Análisis de la colocalización entre hSNF5 y DNM2 en vesículas endocíticas

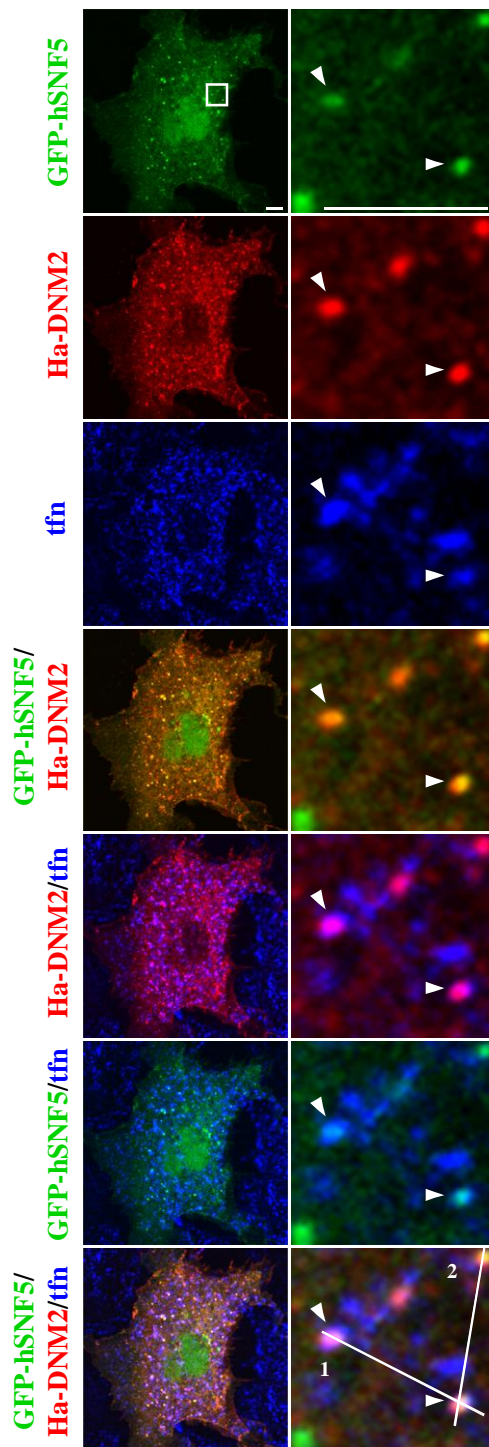
DNM2 desempeña un papel esencial en la endocitosis mediada por clatrina, mediando la escisión y liberación de las vesículas desde la membrana plasmática. Teniendo en cuenta su función en endocitosis y los resultados mostrados que demuestran interacción entre esta GTPasa citoplásmica y hSNF5 por diversas técnicas (doble híbrido, pull down, IP y PLA), decidimos averiguar si hSNF5 y DNM2 co-localizan en vesículas endocíticas. Para ello se transfectaron células COS7 con las construcciones pEGFP-C2-hSNF5 y pAdRSV-Sp-Ha-DNM2. Tras 30 h, se añadió al medio de cultivo transferrina conjugada al fluorocromo Alexa fluor 647 (tfn) y tras 5 min las células fueron procesadas para IF. La transferrina es una proteína de unión a hierro. Se une a su receptor en la superficie celular, siendo internalizada en vesículas endocíticas recubiertas por clatrina y llevada hasta los endosomas tempranos, donde libera el hierro. Finalmente es dirigida a los endosomas de reciclaje para ser degradada o llevada devuelta a la superficie celular (Mayle et al., 2012)

En la Figura 30A se muestra una célula COS7 con único, doble o triple marcaje. La localización mayoritariamente nuclear mostrada por la proteína GFP-hSNF5 vino acompañada de una menor señal citoplásmica, con cierto patrón punteado. La proteína Ha-DNM2 localizó únicamente en el citoplasma mostrando un marcaje citoplásmico de patrón punteado mucho más abundante que el observado para GFP-hSNF5. La tfn localizó en el citoplasma, marcando vesículas endocíticas. Con el objetivo de analizar la posible co-localización de GFP-hSNF5, Ha-DNM2 y tfn, se adquirieron imágenes a mayor aumento (Figura 30A) y se utilizó la aplicación Linescan del programa MetaMorph, que permite analizar la intensidad de fluorescencia presentada por los fluorocromos utilizados a lo largo de una línea dibujada. En la Figura 30B se muestra el perfil de intensidad de fluorescencia emitido por los tres fluorocromos empleados a través de dos líneas dibujadas en el citoplasma de la célula transfectada expuesta a tfn (último panel, Figura 30A). Como puede observarse, los picos de mayor intensidad correspondieron a estructuras punteadas que contenían GFP-hSNF5, Ha-DNM2 y tfn, indicando estos resultados que GFP-hSNF5 colocaliza en el citoplasma con Ha-DNM2 en vesículas endocíticas.

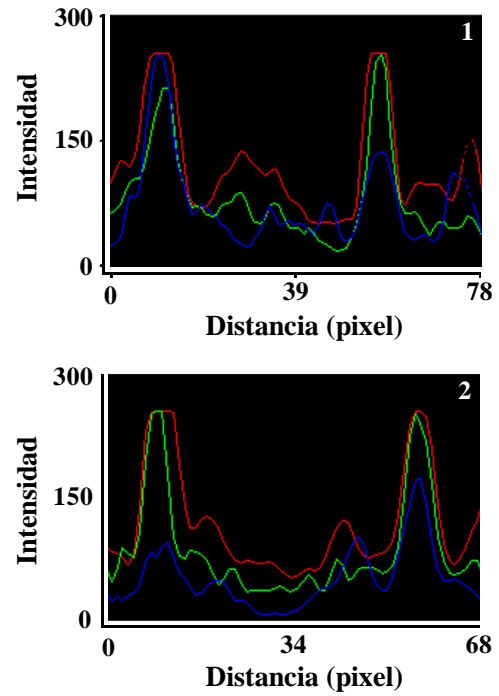
Un análisis cuantitativo de los resultados demostró que el 66,5% de las estructuras punteadas que presentaron marcaje para Ha-DNM2, también presentaron marcaje para GFP-hSNF5. Respecto al evento inverso, el 81,3% de las que presentaron marcaje para GFP-hSNF5 también lo presentaron para Ha-DNM2 (Figura 30C). El 22,1% de las vesículas presentaron doble o triple marcaje, siendo uno de ellos tfn (tfn/GFP-hSNF5, tfn/Ha-DNM2, tfn/GFP-hSNF5/Ha-DNM2). De este 22,1%, el 43% de las vesículas resultaron positivas exclusivamente para tfn/Ha-DNM2, el 48,4% contuvo tfn/GFP-hSNF5/Ha-DNM2, mientras que sólo el 8,6% presentó marcaje para tfn/GFP-hSNF5 (Figura 30D). Este hecho sugiere que el reclutamiento de hSNF5 a vesículas vendría mediado por DN2.

En paralelo al anterior experimento, muestras de células COS7 transfectadas con pEGFP-C2, pEGFP-C2-hSNF5, pAdRSV-Sp-Ha o pAdRSV-Sp-Ha-DNM2, se recogieron y procesaron obteniendo extractos totales que fueron analizados mediante WB (Figura 31). El objetivo de este experimento consistió en determinar el nivel de expresión de los genes exógenos frente a los endógenos. Los resultados mostraron que la cantidad de proteína GFP-hSNF5 exógena prácticamente

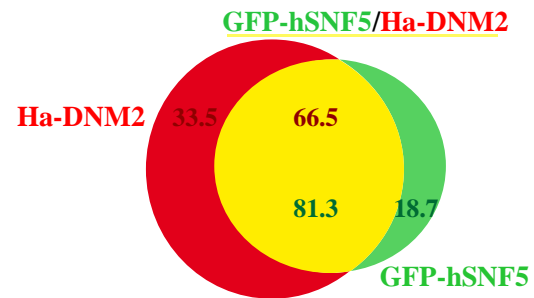
A



B



C



D

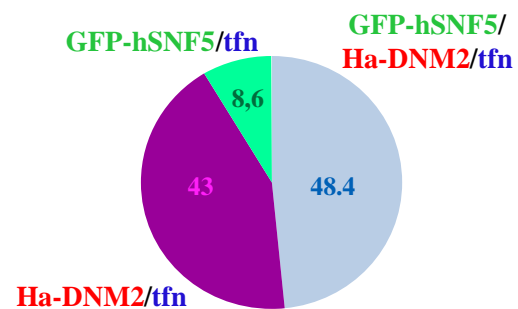


Figura 30. GFP-hSNF5 y Ha-DNM2 colocalizan en vesículas endocíticas en células COS7. (A) Inmunofluorescencia de una célula COS7 transfectada con construcciones de expresión para las proteínas GFP-hSNF5 (en verde) y Ha-DNM2 (en rojo), cultivada durante 5 min con transferrina-647 o tfn (en azul) y visualizada posteriormente al microscopio confocal. El panel derecho muestra la ampliación de una región con único, doble o triple marcaje. Las flechas blancas señalan vesículas endocíticas que presentan tfn, GFP-hSNF5 y Ha-DNM2. Barra de escala, 10 μ m. (B) Perfiles que representan la intensidad de fluorescencia para GFP-hSNF5, Ha-DNM2 y tfn a lo largo de dos líneas blancas dibujadas en el último panel ampliado, con triple marcaje, en (A). (C) Representación del porcentaje de estructuras punteadas que contienen GFP-hSNF5, Ha-DNM2 o GFP-hSNF5/Ha-DNM2, mediante diagrama de Venn. (D) Representación del porcentaje de vesículas endocíticas que contienen tfn, además de las proteínas GFP-hSNF5, Ha-DNM2 o GFP-hSNF5/Ha-DNM2. Los datos obtenidos en (C) y (D) proceden de la cuantificación de vesículas (> 8500) contenidas en 8 células de dos experimentos independientes.

quintuplicaba a la endógena (4,8), si bien debe mencionarse la disminución observada en la expresión de hSNF5 endógeno (8%) en células que expresaron *GFP-hSNF5*. Respecto a Ha-DNM2, la cantidad de proteína sintetizada por las células transfectadas duplicó (2,3) a la endógena. Los datos presentados corresponden a valores promedios de intensidad utilizando el programa Image J. Los datos se normalizaron respecto al nivel de expresión de los genes *hSNF5* o *DNM2* endógenos en células que expresaban GFP o Ha, respectivamente, teniendo en cuenta el porcentaje de transfección.

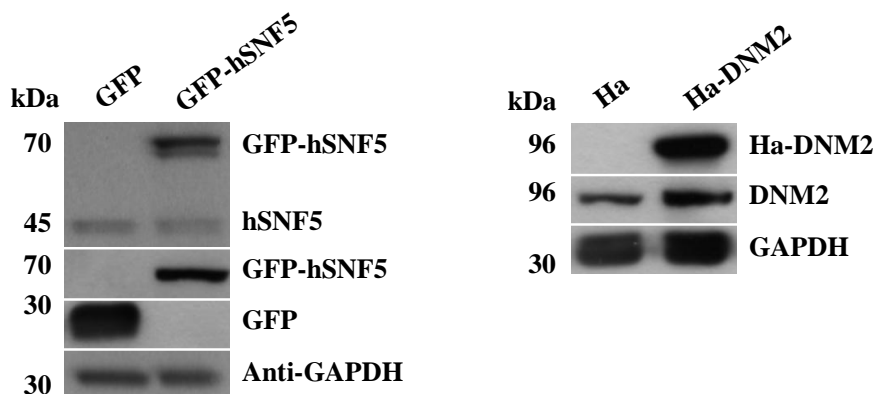


Figura 31. Expresión de *GFP-hSNF5* y *Ha-DNM2* en células COS7. Células COS7 fueron transfectadas al 80 % con las construcciones pEGFP-C2, pEGFP-C2-hSNF5, pAdRSV-Sp-Ha o pAdRSV-Sp-Ha-DNM2. Tras 30h, se obtuvieron extractos totales que fueron analizados mediante Western Blot. A la derecha de cada panel se muestran las proteínas reconocidas por los anticuerpos C-hSNF5,GFP, Ha, DNM2 y GAPDH,La expresión de *GAPDH* se utilizó como control de carga.

3.7 Estudio de la interacción entre hSNF5 y otras isoformas de DNMT mediante coimmunoprecipitación

Como se describió con anterioridad en la introducción, en mamíferos la DNMT se encuentra codificada por tres genes diferentes (*DNMT1*, *DNMT2* y *DNMT3*) que presentan múltiples variantes de splicing (Figura 5) (Cao et al., 1998). *DNMT1* presenta elevados niveles de expresión en tejido nervioso (Nakata et al., 1991; Ferguson et al. 2007), aunque su síntesis es capaz de detectarse en líneas celulares no neuronales (Liu et al., 2008; Ferguson et al., 2009). *DNMT2* es ubicua (Cao et al., 1998, Ferguson et al., 2007) mientras que *DNMT3* se expresa mayoritariamente en cerebro y testículo, y en menor cuantía, en pulmón y corazón.

La existencia de una elevada homología entre las tres isoformas y la capacidad de hSNF5 de interactuar con una de ellas, DNMT2 (aa), nos llevó a analizar la

posibilidad de interacción entre hSNF5 y el resto de isoformas. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de coimmunoprecipitación en los que células 239T se transfectaron con las construcciones pDSRed-monomer-Hyg-C1-hSNF5 y pEGFP-N1-DNM1 (bb), pEGFP-N1-DNM2 (ba) o pEGFP-N1-DNM3 (aaa), cuya expresión daba lugar a la síntesis de las proteínas DSRed-hSNF5, GFP-DNM1, GFP-DNM2 y GFP-DNM3, respectivamente. Tras 24 horas, se obtuvieron extractos totales que fueron sometidos a inmunoprecipitación con anticuerpos generados en cabra frente al epítipo GFP o la proteína endógena hSNF5 (Figura 32). Como control negativo, los lisados fueron sometidos a inmunoprecipitación en paralelo con inmunoglobulinas G no relacionadas (IgG) generadas en conejo. Un porcentaje del lisado y las fracciones inmunoprecipitadas se analizaron mediante WB para visualizar las proteínas co-inmunoprecipitadas.

Como se muestra en la Figura 32, hSNF5 coimmunoprecipitó con las tres isoformas y las tres isoformas coimmunoprecipitaron con hSNF5, en igual medida. La posible existencia de especialización dependiente de isoforma podría reflejar diferentes funciones llevadas a cabo por hSNF5 a nivel celular.

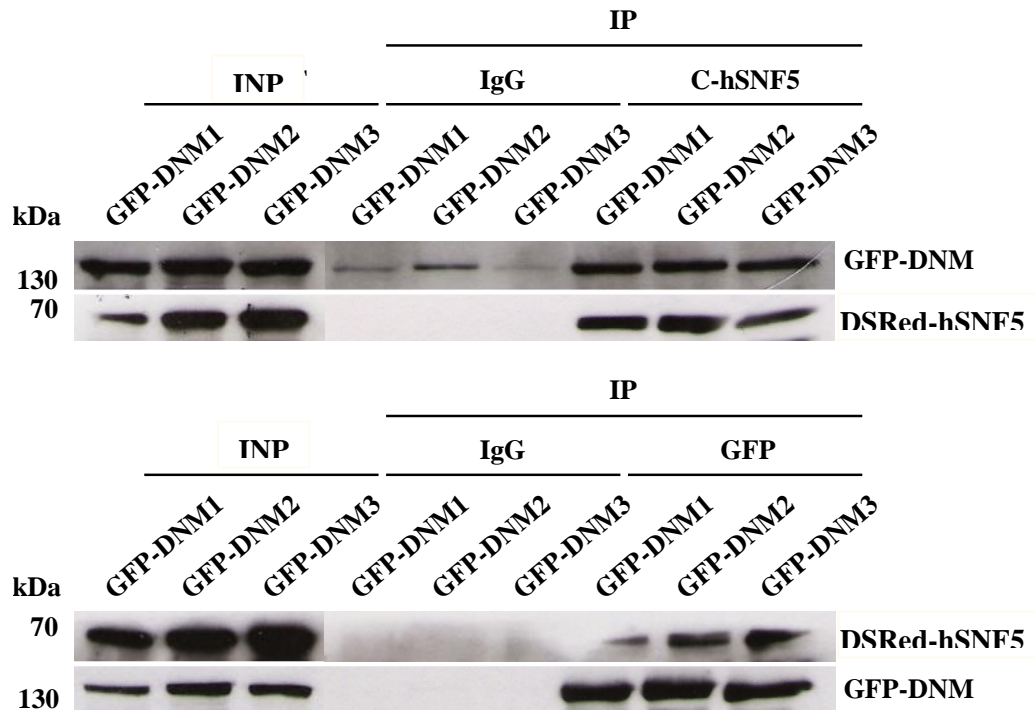


Figura 32. DSRed-5 interacciona con GFP-DNM1, GFP-DNM2 y GFP-DNM3 *in vivo* mediante ensayos de coimmunoprecipitación. Extractos totales de células 293T expresando las proteínas DSRed-hSNF5 y GFP-DNM1 (bb), GFP-DNM2 (ba) ó GFP-DNM3 (aaa) fueron inmunoprecipitados (IP) con los anticuerpos C-hSNF5 o GFP. Las proteínas coimmunoprecipitadas, mostradas en los paneles superiores de cada experimento, y las inmunoprecipitadas, mostradas en los paneles inferiores, se visualizaron utilizando los anticuerpos R-hSNF5 o GFP. Como control negativo, los lisados fueron inmunoprecipitados con inmunoglobulinas (IgG) generadas en ratón. Como control de expresión se utilizó una fracción del extracto total denominada INPUT (INP: 2% de la cantidad usada en la IP).

4-ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN ENTRE hSNF5 Y DNM2

4.1 Estudio del efecto del silenciamiento de hSNF5 sobre la endocitosis dependiente de DNM2

Dada la interacción existente entre las proteínas hSNF5 y DNM2, decidimos analizar si la carencia de hSNF5 afectaba a funciones dependientes de DNM2. DNM2 desempeña un papel fundamental en endocitosis, especialmente en la endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina (CME). Sin embargo, también se ha descrito su implicación en otros procesos endocíticos independientes de clatrina (Doherty y McMahon, 2009). Debido a lo anteriormente descrito decidimos investigar si el silenciamiento de hSNF5 afectaba a dos vías endocíticas dependientes de DNM2: la CME y endocitosis basal de fluido.

4.1.1 Efecto del silenciamiento de hSNF5 en la endocitosis mediada por clatrina

Con el fin de determinar si la ausencia de hSNF5 provocaba algún efecto en la CME utilizamos una estrategia basada en la inhibición de la expresión génica mediante siRNAs, seguida por estudios de internalización de transferrina (tfn), marcador de CME. Para llevar a cabo este ensayo se transfectaron células HeLa con los siRNAs Control (siControl) o hSNF5 (sihSNF5). A modo de control, se inhibió la expresión de DNM2 mediante siRNA (siDNM2), pues se ha descrito que tanto esta forma de silenciamiento, como el uso de mutantes (Lys44Ala o Lys535Ala) o inhibidores (dynasore, dynole-34-2 or dyngo), bloquean este tipo de endocitosis dependiente de DNM2 (McMahon y Bucrot, 2011). Tras 72 h, se añadió al medio de cultivo carente de suero fetal bovino, transferrina conjugada al fluorocromo Alexa fluor 647 (tfn) y posteriormente las células se fijaron y procesaron para IF.

Un análisis cualitativo (Figura 33A) y cuantitativo de los resultados (Figura 33C) mostró que, según lo esperado, el silenciamiento de *DNM2* provocó una disminución en la internalización de tfn de más del 90%. Sorprendentemente, resultados similares se obtuvieron al inhibir la expresión de *hSNF5* mediante siRNA, descendiendo la endocitosis de transferrina prácticamente en un 80%. El análisis cuantitativo de la

incorporación de tfn se llevó a cabo mediante la aplicación Granularity del programa Metamorph.

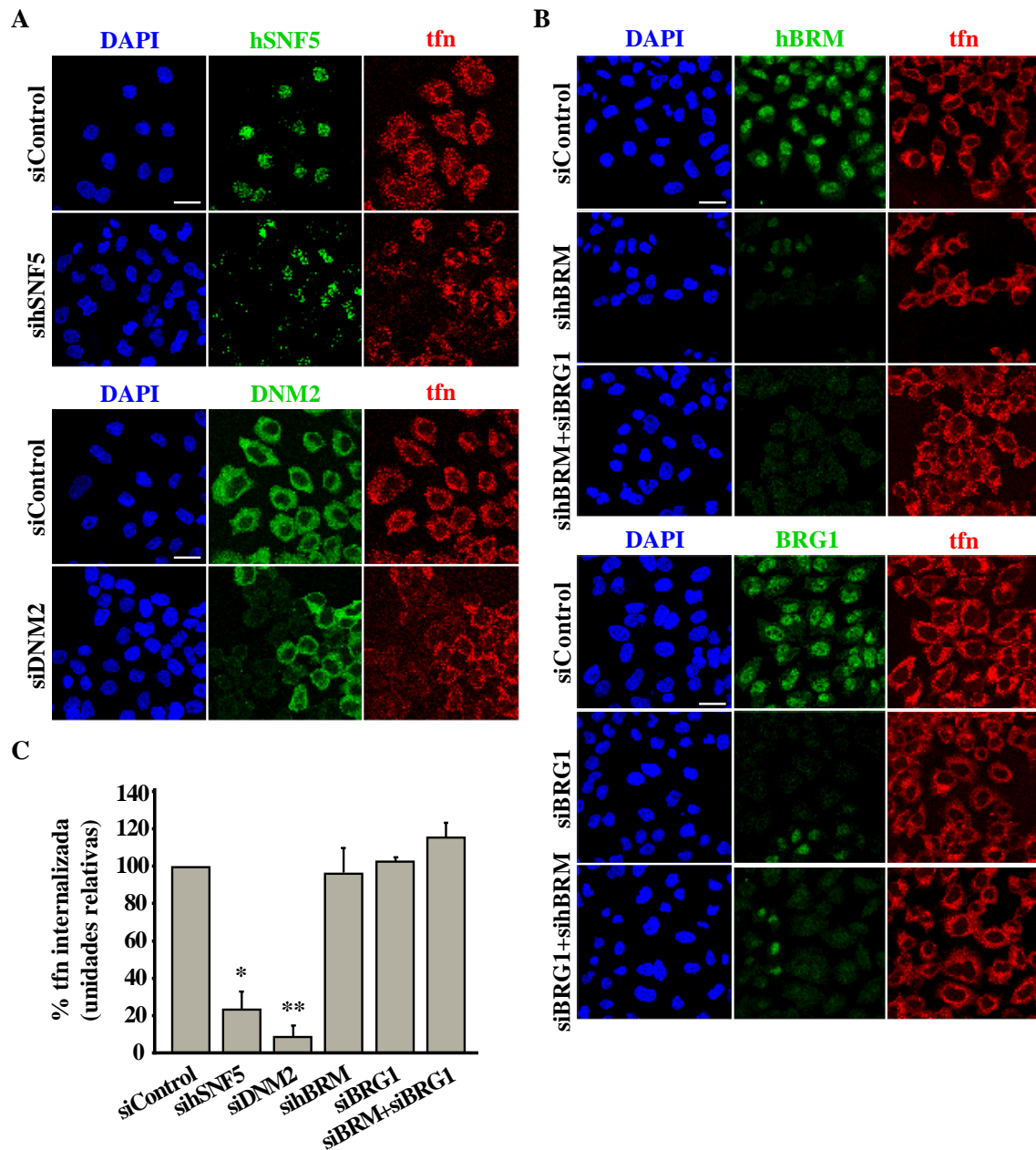


Figura 33. Inhibir la expresión de *hSNF5*, pero no de *hBRM* y/o *BRG1*, mediante RNA de interferencia (siRNA) provoca una disminución de la EMC en células HeLa. La EMC fue evaluada mediante la internalización de transferrina marcada con Alexa fluor 647 (tfn). **(A)** Células HeLa transfectadas con siRNAs Control (siControl), *hSNF5* (sihSNF5) o *DNM2* (siDNM2) y posteriormente expuestas a tfn (en rojo), se fijaron y marcaron para *hSNF5* o *DNM2* (en verde). **(B)** Células HeLa transfectadas con siRNAs Control (siControl), *hBRM* (sihBRM) y/o *BRG1* (siBRG1) y posteriormente expuestas a tfn (en rojo), se fijaron y marcaron para *hBRM* o *BRG1* (en verde). En A y B el DNA se tiñó con DAPI (en azul). Barra de escala en A y B: 25 μ m. **(C)** Cuantificación de la internalización de tfn en imágenes adquiridas al microscopio confocal en los experimentos A y B, utilizando la aplicación Granularity del programa Metamorph. Los datos obtenidos representan la media y la desviación estándar de > 150 células silenciadas por condición en tres experimentos independientes, normalizados respecto a la condición control. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un t-student * $p < 0,005$, ** $p < 0,0005$.

Con el fin de determinar si el complejo SWI/SNF era responsable de este efecto, células HeLa transfectadas con siRNAs, que inhibían específicamente la expresión de las ATPasa de este complejo remodelador de cromatina, hBRM (sihBRM) y/o BRG1 (siBRG1), se sometieron al ensayo previamente descrito. Como se observa en la Figura 33B y C, ni siquiera la inhibición conjunta de la expresión de hBRM y BRG1 afectó a la internalización de tfn. Además, el descenso en la internalización se observó mediante IF, tanto en un tipo celular no transformado de epitelio de retina (RPE1) transfectado con sihSNF5 (Figura 34), como en células HeLa transfectadas con otro siRNA para hSNF5 (sihSNF5.2) o un shRNA (pTER-hSNF5) (Figura 35). Como control, se transfectaron células RPE con siDNM2 y se sometieron a ensayos de internalización de tfn.

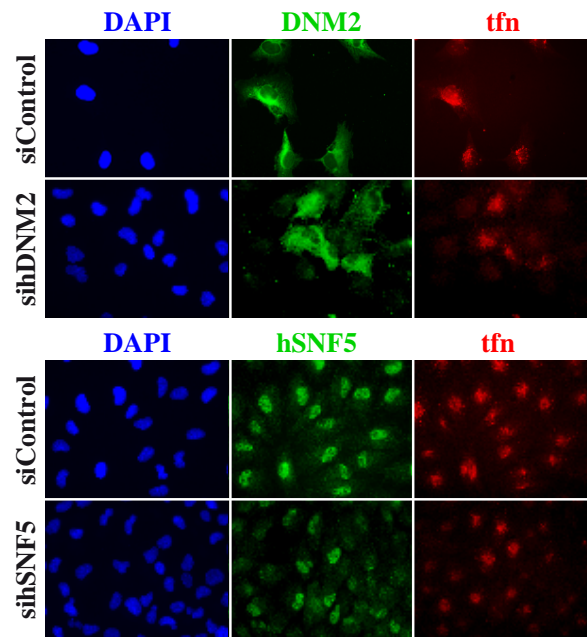


Figura 34. Inhibir la expresión de *hSNF5* mediante RNA de interferencia (siRNA) provoca una disminución de la CME en células RPE1. Células RPE1 transfectadas con los siRNA Control (siControl), hSNF5 (sihSNF5) o DN2 (siDNM2) se expusieron a transferrina marcada con Alexa fluor (tfn, en rojo) en ausencia de suero, se fijaron y se marcaron para DN2 o hSNF5 (en verde). El DNA se tiñó con DAPI (azul).

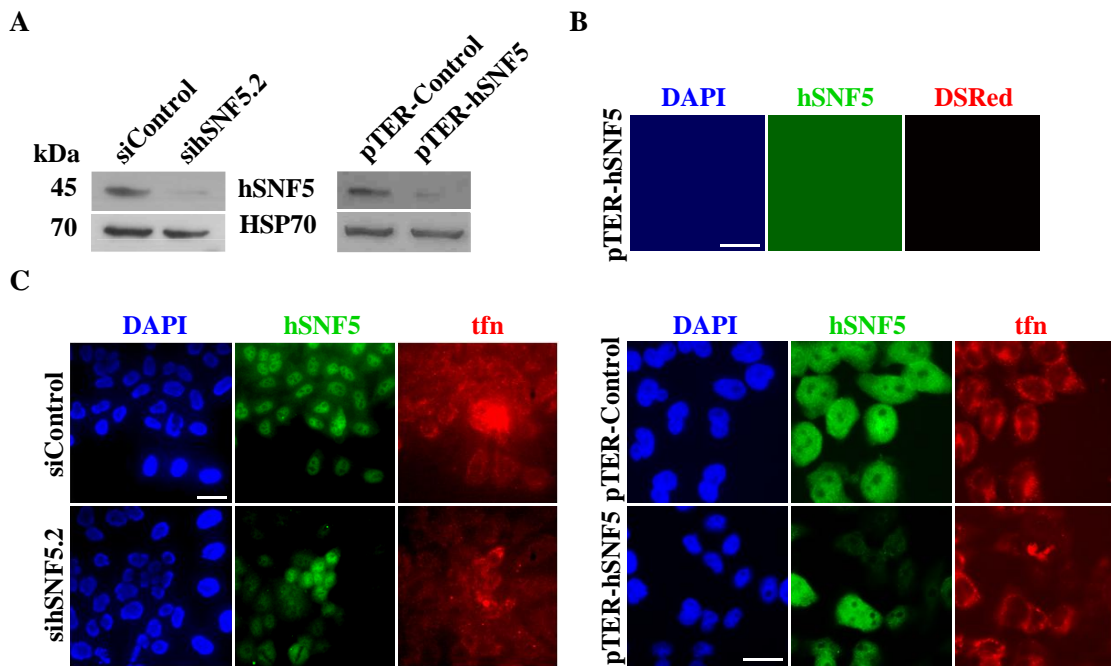


Figura 35. Inhibir la expresión de *hSNF5* mediante otro RNA de interferencia (siRNA) y un short hairping RNA (shRNA), provoca una disminución de la CME en células HeLa. La EMC fue evaluada mediante la internalización de transferrina marcada con Alexa fluor 647 (tfn, en rojo). (A) Extractos totales de células HeLa transfectadas con siRNA Control (siControl), siRNA *hSNF5.2* (sihSNF5.2), shRNA Control o shRNA *hSNF5* (clonados en el vector pTER), se analizaron mediante Western Blot utilizando anticuerpos frente a *hSNF5* y HSP70. (B) Paneles superiores: células HeLa transfectadas con pTER-*hSNF5* y pDSRed-monomer-Hyg-C1, y marcadas para *hSNF5*. El vector pDSRed-monomer-Hyg-C1 (DSRed) se utilizó como control de cotransfección. Paneles inferiores: células HeLa transfectadas con pTER-Control o pTER-*hSNF5*, expuestas a tfn y marcadas para *hSNF5*. (C) Células HeLa transfectadas con los siControl o sihSNF5.2, expuestas a tfn y marcadas para *hSNF5*. En B y C el DNA se tiñó con DAPI (en azul) y *hSNF5* se marcó en verde. Barra de escala 25 μ m.

Los resultados obtenidos demuestran que silenciar *hSNF5* afecta negativamente a la internalización de tfn, sugiriendo que *hSNF5* desempeña un papel en la endocitosis mediada por clatrina, con independencia del complejo SWI/SNF.

4.1.2 Efecto del silenciamiento de *hSNF5* en la endocitosis basal de fluido

Una vez demostrada la importancia de *hSNF5* en la CME decidimos analizar si la ausencia de esta proteína podría afectar a otras vías endocíticas dependientes de DNM2. Por ello, decidimos investigar el efecto que podría causar la inhibición de la expresión de *hSNF5* en la internalización de la fase fluida. En las células, este proceso

puede llevarse a cabo a pequeña escala, mediante vías dependientes e independientes de DNM2, o gran escala, mediante macropinocitosis, independiente de DNM2.

Cao H. y colaboradores demostraron en 2007 (Cao et al., 2007) la implicación de DNM2 en la absorción de fluido extracelular, utilizando moléculas de dextrano (polisacárido hidrofílico) como marcador de este tipo de endocitosis. Sus estudios descartaron la intervención de la CME o la vía mediada por caveolas en este proceso endocítico, aún siendo vías dependientes de DNM2. La inhibición de estas dos vías mediante siRNAs no produjo efecto alguno en la absorción de dicho polisacárido. Sin embargo, la ausencia de DNM2 o el bloqueo de su actividad provocaron un descenso de más del 60% en la internalización de dextrano en medio prácticamente carente de suero, afectando a la endocitosis de fluido. Si bien, no puede descartarse que la disrupción de una vía estimule otra vía compensatoria (Damke et al, 1995), ni que otros procesos endocíticos estén involucrados en menor medida.

Por el contrario, en ausencia de DNM2 la adición al medio del factor de crecimiento epidérmico EGF logró rescatar en gran medida la absorción de dextrano (Cao et al., 2007). Aunque este factor de crecimiento estimula sobre todo la CME, se ha descrito que a elevadas concentraciones activa también vías independientes de clatrina capaces de internalizar marcadores pinocíticos, como el dextrano. Entre ellas encontramos la macropinocitosis (independiente de DNM2), la vía mediada por caveolas (Sigismund et al., 2005; Orlichenko et al., 2006) o la llevada a cabo a partir de pliegues dorsales de membrana (ambas dependientes de DNM2) (Orth et al., 2006; Orth and McNiven, 2006). Por todo ello, la única vía a través de la cual puede internalizarse el dextrano en ausencia de DNM2 parece ser la vía macropinocítica.

Debido a lo anteriormente expuesto, decidimos investigar si el silenciamiento de *hSNF5* podría ejercer algún efecto sobre la endocitosis basal de fluidos (dependiente de DNM2) o sobre la endocitosis de fluidos estimulada mediante EGF, donde la macropinocitosis, independiente de DNM2, se activa. Estos ensayos aclararían si la ausencia de *hSNF5* afecta únicamente a vías dependientes de DNM2 o si por el contrario, otras vías en las que DNM2 no es directamente necesaria se ven perjudicadas. Para llevar a cabo estos ensayos, se transfectaron células HeLa con los siRNAs Control (siControl) o *hSNF5* (sihSNF5). En paralelo, y a modo de control, se inhibió la

expresión de *DNM2* mediante RNA de interferencia (siDNM2). Tras 72 h de la transfección, se añadió al medio de cultivo carente de suero dextrano conjugado al fluorocromo tetrametilrodamina (dxt). Finalmente, las células se fijaron y procesaron para inmunofluorescencia. El análisis cuantitativo de la incorporación de dxt se llevó a cabo determinando la intensidad integrada de la señal emitida por el fluorocromo, por área celular, utilizando el programa Metamorph.

Un análisis cualitativo (Figura 36A) y cuantitativo de los resultados (Figura 36C) mostró que, según lo esperado, el silenciamiento de *DNM2* provocó que la absorción de dxt en condiciones basales (medio carente de suero y EGF) se redujera un 46%. Sorprendentemente, resultados similares se obtuvieron al inhibir la expresión de *hSNF5* mediante siRNA, descendiendo la internalización casi un 40% respecto a la condición control (Figura 36A y C). Estos resultados demuestran la importancia de *hSNF5* en la endocitosis basal de fluidos, pero ¿su carencia afecta a vías endocíticas independientes de *DNM2*, como la macropinocitosis?. Para resolver esta cuestión se añadió EGF y dxt al medio de cultivo carente de suero de células HeLa transfectadas con los siControl, siDNM2 o sihSNF5. La elevada internalización (80-90%) observada tanto en ausencia de *DNM2* como de *hSNF5*, indicó que probablemente otra vía independiente de *DNM2* e implicada en la absorción de fluido se encontraba activa, la vía macropinocítica.

En conjunto, los resultados obtenidos, tanto en este apartado como en el anterior, sugieren que la proteína *hSNF5* desempeña un papel esencial en procesos endocíticos dependientes de *DNM2*, como la CME o la endocitosis basal de fluidos, sin afectar a vías independientes de *DNM2*, como la endocitosis de fluido estimulada.

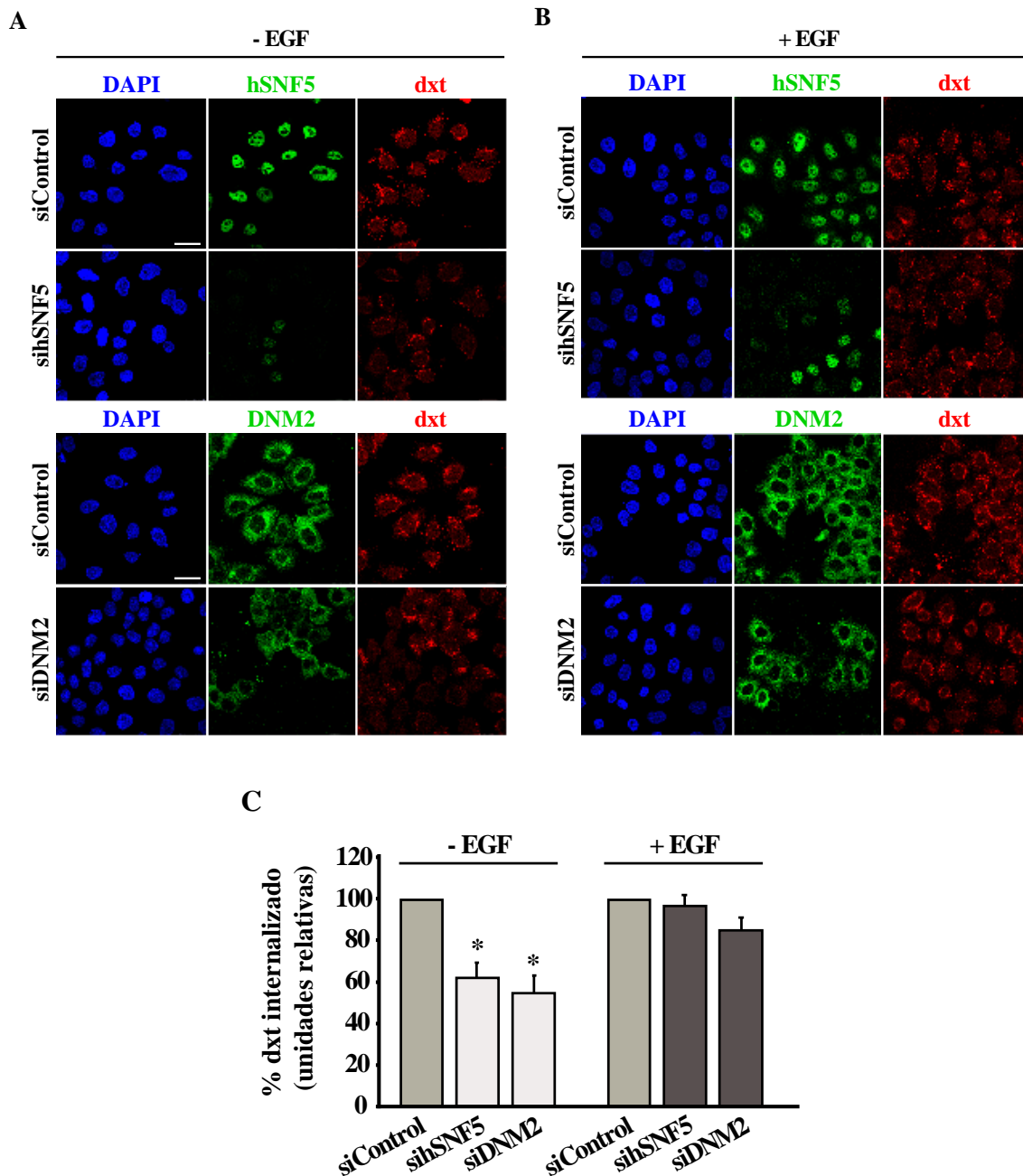


Figura 36. Inhibir la expresión de *hSNF5* provoca una disminución de la endocitosis basal de fluido en células HeLa. La endocitosis basal de fluido fue evaluada mediante la internalización de dextrano conjugado con tetrametilrodamina (dxt) en ausencia de suero y factor de crecimiento epidérmico (EGF). La endocitosis de fluido estimulada fue evaluada mediante la internalización de dxt en ausencia de suero y presencia de EGF. **(A)** Células HeLa transfectadas con siRNAs Control (siControl), *hSNF5* (sihSNF5) o *DNM2* (siDNM2) y posteriormente expuestas o no a EGF (+EGF,-EGF) y a dxt (en rojo), se fijaron y marcaron para *hSNF5* o *DNM2* (en verde). El DNA se tiñó con DAPI (en azul). Barra de escala: 25 μ m. **(B)** Cuantificación de la internalización de dxt en imágenes adquiridas en microscopio confocal en los experimentos realizados en A, determinando la intensidad integrada por unidad de área mediante el programa Metamorph. Los datos obtenidos representan la media y la desviación estándar de > 120 células silenciadas por condición en tres experimentos independientes, normalizados respecto a la condición control. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un t-student * $p < 0,005$.

4.2 Análisis de la actividad GTPasa y ensamblaje de DNM2 en presencia de hSNF5

La capacidad intrínseca de la DNM para formar polímeros helicoidales es esencial en su función celular (Ferguson y De Camilli, 2012). Aunque su unidad básica sea el dímero, en solución con baja concentración salina (baja fuerza iónica) y sin requerimiento nucleotídico adicional, los dímeros de DNM se asocian formando tetrámeros. Estos tetrámeros oligomerizan a su vez dando lugar a polímeros helicoidales (Carr y Hinshaw, 1997) de dimensiones similares en ausencia (Hinshaw y Schmid, 1995) o en presencia de moldes de membrana (Stowell et al., 1995; Takei et al., 1998), hecho que estimula su actividad GTPasa (Muhlberg et al., 1997).

Con el objetivo de analizar si la interacción hSNF5-DNM2 afectaba a la actividad GTPasa de DNM2, se llevó a cabo un ensayo colorimétrico *in vitro* que permite detectar la cantidad de fosfato (Pi) liberado en la hidrólisis de GTP. Para llevarlo a cabo se utilizaron proteínas (His-DNM2, GST-hSNF5 y GST) purificadas, ensayándose una concentración conocida de His-DNM2 frente a concentraciones crecientes de GST-hSNF5 o GST, como control. De este modo pudimos examinar si la presencia de hSNF5 alteraba la actividad GTPasa basal de DNM2, presentada por dímeros y tetrámeros en solución con elevada concentración salina (elevada fuerza iónica), y/o la actividad GTPasa de estructuras ensambladas más complejas en solución con baja fuerza iónica.

Como se muestra en la Figura 37A, la actividad GTPasa basal no se vio afectada por la presencia de hSNF5, pues la concentración de Pi liberado en la reacción catalizada por His-DNM2 resultó ser prácticamente idéntica a las obtenidas en presencia de concentraciones crecientes de GST-hSNF5 o GST durante el ensayo. Bajo estas condiciones de salinidad (elevada fuerza iónica) se observa como DNM2 permaneció en el sobrenadante (S) en ensayos de sedimentación, posiblemente formando dímeros y/o tetrámeros que permanecen solubles en solución (Figura 37A, panel inserto). Sin embargo, en condiciones de baja fuerza iónica la presencia de GST-hSNF5, y no de GST, provocó la inhibición de la actividad GTPasa presentada por DNM2 ensamblada (Figura 37B). Cabe señalar la existencia de una relación directa entre la inhibición de esta actividad y la concentración de GST-hSNF5 empleada, pues a mayor concentración

mayor inhibición. Bajo estas condiciones de baja fuerza iónica más del 80% de las moléculas de DNM2 aparecieron en el precipitado (P) en ensayos de sedimentación, posiblemente formando anillos o hélices insolubles (Figura 37B, panel inserto).

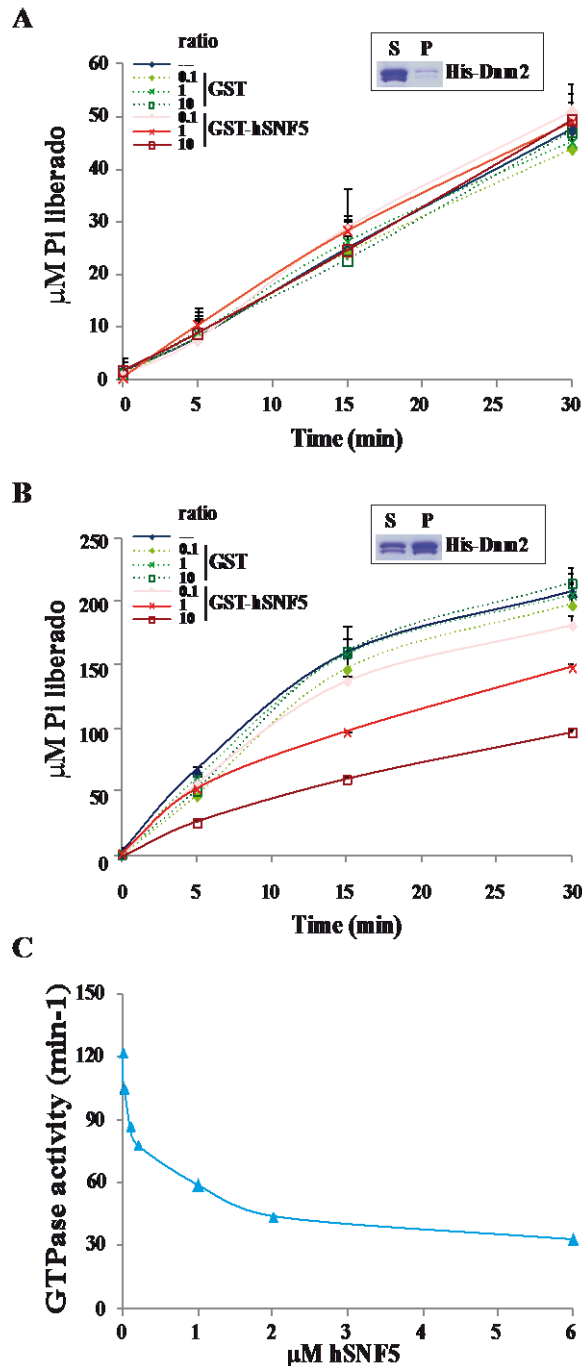


Figura 37. hSNF5 inhibe la actividad GTPasa de DNM2 ensamblada.

(A) Hidrólisis de GTP, medida en forma de liberación de fosfato (Pi), catalizada por 1 μM His-DNM2 (línea azul) incubada en ausencia o presencia de concentraciones crecientes (0.1, 1 o 10 μM) de GST (líneas discontinuas verdes) o GST-hSNF5 (líneas rojas) en condiciones de elevada fuerza iónica. En estas condiciones DNM2 se encuentra formando dímeros o tetrámeros que permanecen en la fracción soluble en un ensayo de sedimentación (panel superior derecho). (B) Hidrólisis de GTP, medida en forma de liberación de fosfato (Pi), catalizada por 0.2 μM de His-DNM2 (línea azul) incubada en ausencia o presencia de concentraciones crecientes (0.02, 0.2 o 2 μM) de GST (líneas discontinuas verdes) o GST-hSNF5 (líneas rojas) en condiciones de baja fuerza iónica. En estas condiciones DNM2 se encuentra ensamblada, hecho que permite la precipitación de dichas estructuras en un ensayo de sedimentación (panel superior derecho). Los datos representados en A y B corresponden al promedio y a la desviación estándar de los valores obtenidos en tres experimentos independientes. Se indican las ratios de las concentraciones empleadas en A y B (GST:His-DNM2 y GST-hSNF5:His-Dnm2). S:sobrenadante; P:precipitado. (C) Actividad GTPasa de 0.2 μM de His-Dnm2 en presencia de concentraciones crecientes de GST-hSNF5.

Para determinar hasta qué punto la interacción entre hSNF5 y DNM2 afectaba a la actividad ensamblada calculamos su constante catalítica (Kcat), definida por el número de moléculas de sustrato que cada sitio activo de una enzima convierte a

producto por unidad de tiempo, en presencia de cantidades crecientes de GST-hSNF5 o en su ausencia, en condiciones de baja salinidad. Como se muestra en la Figura 37C, al ensayar concentraciones idénticas (0,2 μM) de GST-hSNF5 e His-DNM2 (relación 1:1) se produjo un descenso de la Kcat de un 36%, alcanzándose el 60% cuando la relación fue de 10:1 (2:0,2 μM). Sin embargo, concentraciones elevadas de GST-hSNF5 (30:1) no consiguieron inhibir totalmente la actividad de DNМ2 ensamblada, manteniéndose en el 30% de su valor inicial.

Para analizar si hSNF5 impedía el ensamblaje de DNМ2 decidimos realizar un ensayo de sedimentación *in vitro* en condiciones de baja fuerza. Para llevarlo a cabo se incubó la proteína His-DNM2 (2 μM) en presencia de dos concentraciones (0,5 y 2 μM) de GST o GST-hSNF5 a 37°C 15 min. Tras este periodo, las muestras se centrifugaron obteniendo fracciones solubles (Sobrenadantes, S) y fracciones insolubles (Precipitados, P). Ambas fueron analizadas mediante geles de SDS-poliacrilamida y visualizadas mediante tinción con Coomassie. En paralelo, y como control experimental, se realizaron ensayos incubando independientemente las proteínas His-DNM2, GST o GST-hSNF5 en las mismas condiciones experimentales (Figura 38).

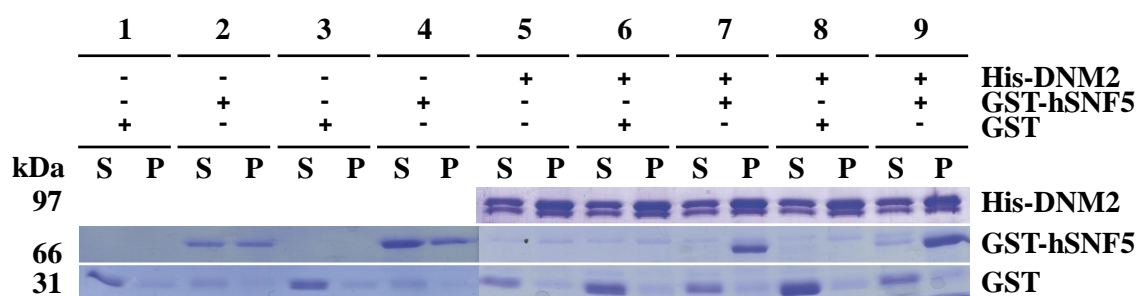


Figura 38. GST-hSNF5 no afecta el ensamblaje de His-DNM2 aunque el ensamblaje de His-DNM2 puede favorecer la precipitación de GST-hSNF5. Ensayo de sedimentación en ausencia o presencia de GST o GST-hSNF5. Los sobrenadantes (S) y precipitados (P) se analizaron mediante geles de SDS-poliacrilamida posteriormente teñidos con Coomassie. Los ensayos se realizaron en tampón de baja fuerza iónica conteniendo 0,5 (1) ó 2 (3) μM de GST; 0,5 (2) ó 2 (4) μM de GST-hSNF5; 2 μM de His-DNM2 (5); 2 μM de His-DNM2 y 0,5 (6) ó 2 (8) μM de GST; 2 μM de His-DNM2 y 0,5 (7) ó 2 (9) μM de GST-hSNF5.

Como se muestra en la Figura 38, ninguna condición ensayada perturbó el proceso de ensamblaje de DNМ2, obteniendo fracciones precipitadas idénticas (condición 5 frente a 6-9), hecho que demuestra la inocuidad de las proteínas GST y GST-hSNF5 respecto al ensamblaje. Sorprendentemente, observamos un cambio

drástico en la fracción GST-hSNF5 precipitada cuando se ensayó esta proteína en ausencia o presencia de His-DNM2 (condición 2 frente a 7 y 4 frente a 9). Cuando GST-hSNF5 fue incubada en solitario (condición 2 y 4), más de un 35 % de la proteína apareció en el precipitado, confirmando el hecho de que hSNF5 forma oligómeros en solución (Das et al., 2009). Sin embargo, en presencia de His-DNM2, GST-hSNF5 precipitó en más de un 95% (condiciones 7 y 9), hecho que podría sugerir que hSNF5 coprecipita con DNMT2 ensamblada. Cabe mencionar que esta coprecipitación podría reflejar agregación molecular inespecífica, por lo que estos datos podrían no demostrar interacción, aunque dicha interacción haya sido anteriormente verificada por las numerosas técnicas expuestas anteriormente.

En conjunto, estos resultados demuestran que hSNF5 inhibe la actividad GTPasa de DNMT2 ensamblada, sin impedir su ensamblaje.

4.3 Análisis de los niveles proteicos de DNMT2 en ausencia de hSNF5

Para evaluar si la ausencia de hSNF5 provocaba algún efecto en el nivel de expresión de *DNMT2* se utilizó una aproximación por RNA de interferencia. Para ello, se transfectaron células HeLa con siRNAs específicos que provocaron la inhibición de la expresión de *hSNF5* (sihSNF5) o *DNMT2* (siDNMT2), o inespecíficos como control (siControl). Como muestra la Figura 39, el silenciamiento de *hSNF5* no afectó a los niveles de mRNA de *DNMT2*, descartando un papel transcripcional de hSNF5 en la expresión de *DNMT2*.

Para descartar la existencia de cualquier efecto directo o indirecto de DNMT2 sobre la expresión de *hSNF5*, silenciamos *DNMT2* mediante siRNA y observamos que la ausencia de DNMT2 no provocó cambios estadísticamente significativos en los niveles de mRNA de *hSNF5*.

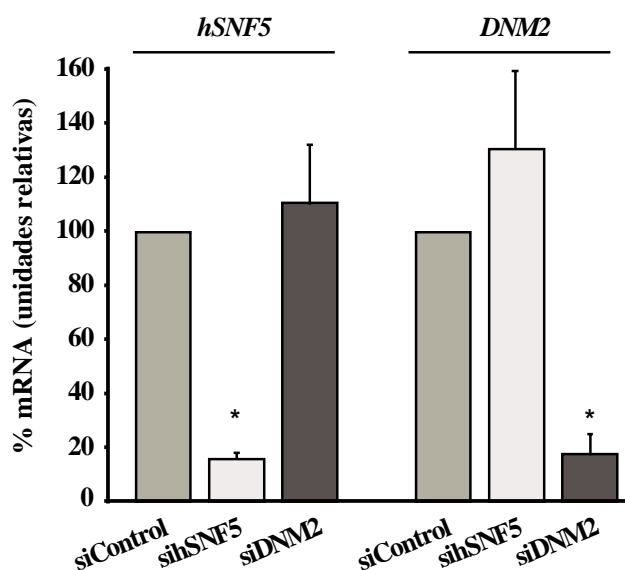


Figura 39. El silenciamiento de *hSNF5* o *DNM2* mediante RNA de interferencia (siRNA) no afecta a los niveles de RNA mensajero (% RNAm) de *DNM2* o *hSNF5*, respectivamente. Cuantificación relativa por RT-PCR del efecto del silenciamiento de *hSNF5* o *DNM2* en la expresión de *hSNF5* y *DNM2*, en célula HeLa transfectadas con los siRNAs (si) *Control*, *hSNF5* o *DNM2*. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes, normalizados respecto al siControl. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un t-student * $p < 0,005$.

Aunque el silenciamiento de *hSNF5* no causó efecto transcripcional alguno en la expresión de *DNM2*, quisimos evaluar si su ausencia podría afectar a los niveles proteicos de *DNM2*. Para ello, se llevó a cabo un fraccionamiento bioquímico a partir de células HeLa transfectadas con los siRNAs Control y *hSNF5*. El análisis mediante WB de los extractos nucleares y citoplásmicos obtenidos reveló un descenso de los niveles citoplásmicos de *DNM2*, provocado por el silenciamiento de *hSNF5*, visible en ambas fracciones (Figura 40A). Como control, se verificó que el silenciamiento de otros miembros del complejo SWI/SNF, como BRG1 y/o hBRM, no alteraba los niveles proteicos de *DNM2* (Figura 40B). Para ello, se analizaron extractos totales, obtenidos a partir de células HeLa transfectadas con los siRNAs Control, BRG1 y/o hBRM, mediante WB.

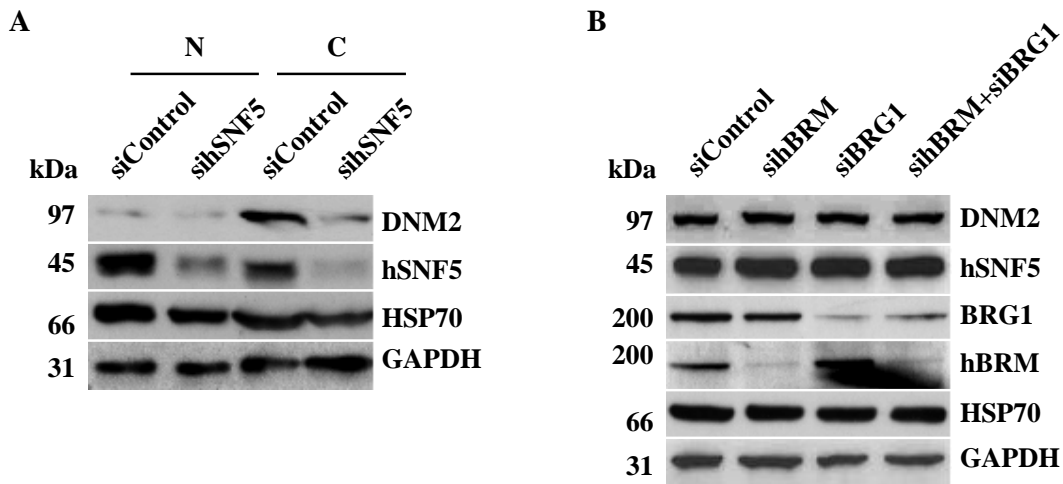


Figura 40. La inhibición de la expresión de *hSNF5*, pero no la de *hBRM* y/o *BRG1*, mediante RNA de interferencia (siRNA) provoca un descenso de los niveles de DNM2. (A) Extractos nucleares (N) y citoplásmicos (C) obtenidos a partir de células HeLa transfectadas con los siRNA (si) *Control* o *hSNF5* mediante fraccionamiento bioquímico. (B) Extractos totales obtenidos a partir de células HeLa transfectadas con los siRNA (si) *Control*, *hBRM* y/o *BRG1*. Los extractos obtenidos en (A) y (B) se analizaron mediante Western Blot. A la derecha de cada panel se muestran las proteínas detectadas por los anticuerpos DNM2, C-hSNF5, BRG1, hBRM, HSP70 y GAPDH. HSP70 y GAPDH se utilizaron como controles de carga

En conjunto, estos resultados demuestran que inhibir la expresión de *hSNF5*, y no la de otros componentes del complejo SWI/SNF, como *BRG1* y/o *hBRM*, afecta negativamente a los niveles de proteína DNM2. La inhibición de la expresión de DNM2 también afecta a los niveles citoplásmicos de hSNF5. Debido a la interacción existente entre estas dos proteínas en el citoplasma, verificada ampliamente mediante diversas técnicas, estos resultados sugieren que el silenciamiento afecta negativamente a la estabilidad proteica.

5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS HELA SILENCIADAS PARA hSNF5 Y DNM2.

En este trabajo se ha demostrado que la inhibición de la expresión de *hSNF5*, pero no la de otros miembros del complejo SWI/SNF como *BRG1* o *hBRM*, tiene un fuerte efecto sobre la endocitosis dependiente de DNM2. Por tanto, es posible que algunos cambios en la expresión de ciertos genes provocados por la carencia de hSNF5 no se deban a su papel como subunidad de este complejo remodelador, sino a efectos derivados de la deficiente endocitosis. Para diferenciar los efectos de transcripción génica provocados en ausencia de hSNF5 por el complejo SWI/SNF de los efectos derivados de la deficiente endocitosis, se analizó la expresión génica de células HeLa transfectadas con siRNAs para hSNF5, DNM2 o Control durante 72 h.

Los datos obtenidos se consideraron significativos cuando el cambio lineal de expresión, en aumento o disminución, fue mayor o igual a 1,5 veces con una $p < 0.1$ o < 0.08 en células con niveles reducidos de hSNF5 o DNM2, respectivamente. El análisis de expresión mostró que de los 133 genes desregulados tras silenciar hSNF5, 92 aumentaron su expresión mientras que 41 la disminuyeron, entre ellos hSNF5, cuya expresión descendió 2,5 veces. De los 649 genes desregulados en células silenciadas en DNM2, 514 aumentaron su expresión mientras que 135 la disminuyeron, entre ellos DNM2, cuya expresión fue de 2,2 veces menor. Hay que resaltar que los niveles de expresión de DNM2 no se vieron afectados en ausencia de hSNF5 ni viceversa. En común se desregularon 52 genes (Figura 42), 40 de los cuales aumentaron su expresión tanto en células silenciadas para hSNF5 como para *DNM2* (Tabla 11, anexo página 159). De estos 52 genes, 7 disminuyeron su expresión tanto en células silenciadas para *hSNF5* o *DNM2* (Tabla 12, anexo página 160).

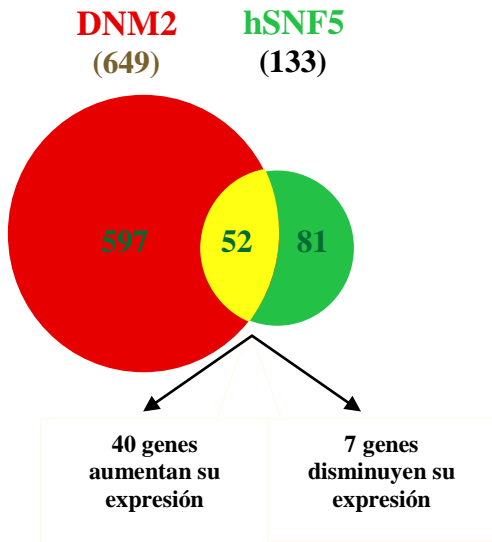


Figura 42. Número de genes desregulados en células HeLa silenciadas para *DNM2* o *hSNF5*. El silenciamiento de *DNM2* o *hSNF5* desreguló la expresión de 649 o 133 genes, respectivamente. Los genes comunes desregulados en su expresión, 52, se muestra en amarillo. 40 de ellos resultaron sobreexpresarse mientras 7 disminuyeron su expresión. La probabilidad de obtener 52 genes desregulados en común tras analizar la expresión de 21014 genes siguiendo una distribución hipergeométrica (R) es de $1,2 \cdot 10^{-43}$

Resulta interesante destacar que 13 (un 76,5 %) de los 17 genes más deregulados tras el silenciamiento de hSNF5 también presentaron desregulación tras silenciar DNM2: 11 aumentaron su expresión mientras que 2 la disminuyeron (Figura 43).

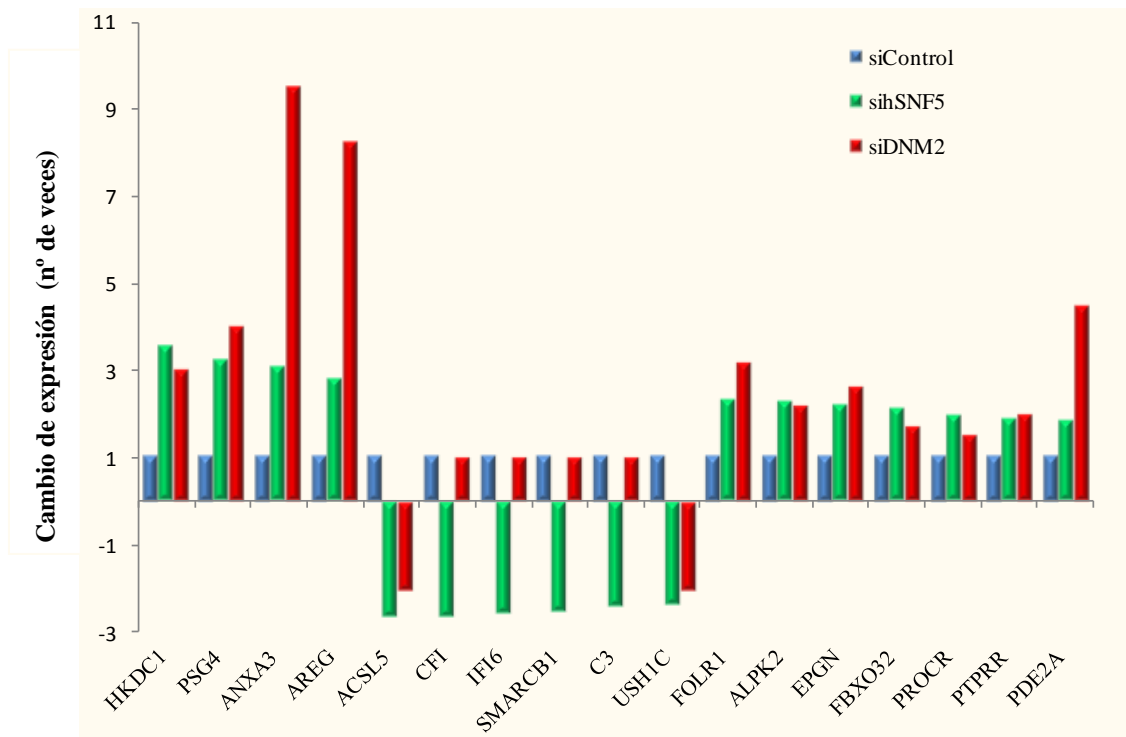


Figura 43. Nivel de expresión de los 17 genes más desregulados tras silenciar hSNF5 en células HeLa durante 72 h. 13 de los 17 genes también se desregularon con la misma tendencia tras silenciar DNM2 durante 72 h. hSNF5 fue el octavo gen más desregulado. Se muestra el cambio de expresión en número de veces respecto a la expresión mostrada por células transfectadas con siC.

Entre los genes comunes que aumentaron su expresión se encuentran genes implicados en metabolismo y crecimiento celular (HKDC1) o, cuya expresión da lugar a receptores (PROCR, PTPRR, FOLR1) o factores de crecimiento (AREG, EPGN). Su sobreexpresión ha sido ligada a cáncer.

El análisis de expresión génica en células humanas silenciadas para hSNF5 o DNM2 sugiere que, al menos en células HeLa, una parte importante del fenotipo transcripcional tras silenciar hSNF5 puede deberse a la deficiente endocitosis mas que a efectos transcripcionales directos de este supresor tumoral como miembro del complejo SWI/SNF.

DICUSIÓN

1. hSNF5 ES UNA PROTEÍNA NUCLEAR Y CITOPLÁSMICA

Como componente de complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF, hSNF5 es considerada una proteína nuclear (Muchardt et al., 1995; Wang et al., 1996) involucrada en el ensamblaje, la localización y la función de dicho complejo, sin descartar el desempeño de funciones con independencia del mismo (Doan et al., 2004). Sin embargo, ciertas evidencias han demostrado que, a pesar de su localización nuclear, hSNF5 puede localizar en el citoplasma en determinadas circunstancias. Entre ellas se encuentra la infección de células HeLa CD4+ por HIV-1, que dispara el transporte de hSNF5, mediado por la exportina, del núcleo al citoplasma (Figura 2). Aunque hSNF5 interacciona con la integrasa (IN) del HIV-1, parece que esta interacción no es la causante del exporte de hSNF5 al citoplasma, dado que partículas víricas carentes de IN también provocan su exporte. Puesto que el exporte comienza tras 30 min de la infección, posiblemente sea debido a la señalización iniciada por la entrada de las partículas retrovirales (vía fusión de membrana plasmática o endocitosis mediada por receptor) y ocurra antes de que cualquiera de ellas llegue al núcleo (Turelli et al., 2001).

En el modelo de regulación de exporte nuclear de hSNF5 postulado por Craig y colaboradores (Craig et al., 2002) se contemplan otras posibilidades. Sus investigaciones sugirieron la existencia de una NLS no identificada en los primeros 130 aa de la proteína e identificaron una NES en su dominio R2 (Figura 1). La localización citoplásmica mostrada por versiones truncadas de hSNF5 que carecían de su extremo carboxilo terminal (Δ 319-385 aa) les llevó a postular que la NES se encuentra oculta e inactiva en presencia de la región carboxilo terminal. Según estos investigadores, el exporte de hSNF5 hacia el citoplasma estaría mediado en primera instancia por señales fisiológicas aún desconocidas que provocarían el desenmascaramiento de la NES induciendo un cambio conformacional de hSNF5 o la retirada de alguna proteína unida a ella (Craig et al., 2002). El transporte núcleo-citoplasma es un proceso muy dinámico, finamente regulado y coordinado, necesario para el correcto funcionamiento celular. Esta regulación implica, en ciertos casos, el encubrimiento o enmascaramiento de la NLS/NES por modificaciones postraduccionales, conformación o unión a otras moléculas (proteínas/ácidos nucleicos), inhibiendo su interacción con la carioferina (exportina/importina). En el primer caso, la fosforilación de aminoácidos que

conforman la NLS/NES o adyacentes, puede enmascararlas (NF-AT2) (Beals et al., 1997), desenmascararlas (p105, p53) (Rivière et al., 1991; Stommel et al., 1999) o provocar un cambio en el patrón de unión a proteínas (p53) (Stommel et al., 1999). El segundo puede deberse a la formación de puentes di-sulfuro entre residuos de cisteínas bajo estrés oxidativo (factor de transcripción Yap1p) (Kuge et al., 2001). El último requeriría la retención de la proteína con NLS/NES en el núcleo o en el citoplasma (receptor de glucocorticoides, p53) debido a su interacción con moléculas que presentan localización específica (Nikolaev et al., 2003; Tago et al., 2004). A todo ello se suma la existencia de proteínas que son transportadas al núcleo acompañadas con otras proteínas, donde la formación del complejo sería previa a su reconocimiento por la carioferina (Yoshida y Blobel, 2001; Mosammaparast et al., 2002). Mutaciones que afecten a la NES o que provoquen un exporte nuclear constitutivo de hSNF5, como la versión hSNF5 Δ 319-385 encontrada en ciertos tumores rhabdoides (Versteeg et al., 1998), podrían afectar a las funciones desempeñadas por hSNF5 tanto en el núcleo como en el citoplasma conduciendo a la génesis tumoral, como ocurre con p53 (Moll et al., 1992; Schlamp et al., 1997).

Tanto el exporte transitorio de hSNF5 desde el núcleo al citoplasma bajo infección por HIV-1 (Turelli et al., 2001) como la identificación de una NES “oculta” en su secuencia (Craig et al., 2002) han constituido hasta la fecha las dos únicas evidencias que demuestran que, bajo ciertas condiciones, hSNF5 puede localizar temporalmente en el citoplasma. Sin embargo, los resultados mostrados en esta tesis demuestran que una fracción hSNF5 está presente constitutivamente en el citoplasma en condiciones normales de crecimiento. Técnicas de fraccionamiento bioquímico (Figura 12), inhibición de la expresión mediante siRNA (Figura 13) y de microscopía (Figura 14, 15, 17 y 18) han permitido alcanzar dicha conclusión. Entre estas últimas se encuentran los experimentos de FLIP, que permitieron analizar el movimiento de hSNF5 entre el núcleo y el citoplasma demostrando que esta proteína es transportada continuamente del núcleo al citoplasma (Figura 18B). La pérdida de toda la fluorescencia citoplásmica en este experimento (Figura 18) sugiere que la fracción de hSNF5 existente en este compartimento es totalmente móvil. La existencia de múltiples pendientes en la cinética de pérdida de fluorescencia nuclear (Figura 18C) refleja la presencia de fracciones múltiples formadas por distintas poblaciones de la proteína que pueden mostrar comportamientos diferentes en el núcleo (proteína libre en el

nucleoplasma, incorporada en el complejo SWI/SNF o unida a la cromatina). Además, el hecho de que una mínima fracción de la fluorescencia nuclear (25%) permanezca en este compartimento tras finalizar el experimento sugiere la existencia de cierta fracción inmóvil o poco móvil, que probablemente se encuentre formando parte del complejo SWI/SNF anclado fuertemente a cromatina. La cinética mostrada por el mutante deletado en la NES descrita fue diferente a la de la proteína completa (Figura 18C). Sin embargo su fluorescencia nuclear decae prácticamente a la mitad tras finalizar el experimento, hecho inesperado según lo publicado (Craig et al., 2002), y que sugiere la existencia de otras NES. El análisis de la secuencia de hSNF5 confirmó la posible existencia de otras NES cuya funcionalidad *in vivo* es por el momento desconocida.

hSNF5 se expresa en multitud de tipos celulares. En esta tesis se ha puesto de manifiesto la existencia de una fracción citoplásmica de hSNF5 en diferentes líneas celulares (HeLa, 293T, COS7 y RPE1). Sin embargo, desconocemos si la distribución núcleo-citoplasma se mantiene constante o varía en respuesta a ciertos estímulos celulares o si esta distribución permanece constante en otros tipos celulares. Resultados experimentales realizados durante esta tesis (no mostrados) demostraron que en ciertas condiciones de estrés térmico u oxidativo, producido por arsenito sódico, la relación núcleo-citoplasma permaneció invariable. Se desconoce cómo la alteración del tráfico núcleo citoplasma de hSNF5 podría afectar a los procesos celulares, ya sea de forma directa o debido al comportamiento aberrante del complejo SWI/SNF en ausencia de hSNF5.

En resumen, una fracción de hSNF5 está presente en el citoplasma en condiciones normales de crecimiento y se encuentra en constante intercambio dinámico con la población nuclear. A pesar de que la NES descrita está implicada en el tránsito, quizás no sea la única secuencia involucrada en el exporte. La fracción citoplásmica de hSNF5 podría desempeñar funciones en este compartimento con independencia del complejo SWI/SNF, adicionales a las llevadas a cabo en el núcleo. Por ello, el mantenimiento del equilibrio existente entre el núcleo y el citoplasma de hSNF5 podría ser esencial para el correcto funcionamiento celular.

2. hSNF5 INTERACCIONA CON PROTEÍNAS EN EL CITOPLASMA

El segundo objetivo llevado a cabo en esta tesis consistió en identificar proteínas que interaccionen con hSNF5 en el citoplasma celular y en el estudio posterior de la funcionalidad de dichas interacciones. En la Figura XX se muestran las interacciones identificadas en este trabajo, bien mediante espectrometría de masas o mediante ensayos de doble híbrido. Mediante experimentos de espectrometría de masas llevados a cabo con extractos citoplásmicos de células 293T se lograron identificar las interacciones entre hSNF5 y CAD, MMS19, RPS3, SLC25A5, KCTD5, α -Tubulina, Chaperonas (HSP70, HSP90, GRP78, CNX) y BAF155/SMARCC1. Mediante ensayo de doble híbrido se identificaron las interacciones entre hSNF5 y Cog2, Eif2b2, Scmh1, Smarcc2 y Dnm2/DNM2. El hecho de identificar asociaciones con más de una proteína del mismo complejo refuerza la veracidad de dicha interacción, sin embargo, muchas de estas interacciones no han sido confirmadas por otros métodos.

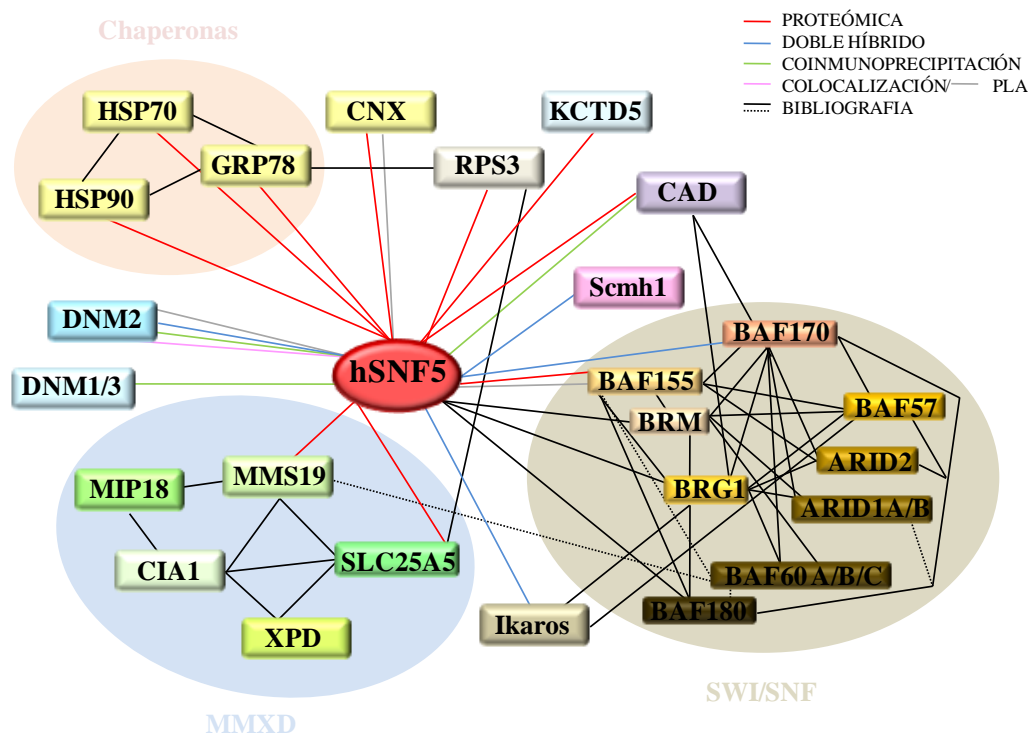


Figura 45. Representación esquemática de las interacciones entre hSNF5 y otras proteínas. Se muestran las interacciones entre hSNF5 y otras proteínas identificadas en esta tesis mediante diferentes técnicas (proteómica, doble híbrido, coimmunoprecipitación, colocalización y PLA) y recogidas en la bibliografía. Englobadas en esferas coloreadas en naranja, azul y marrón se muestran complejos multiprotéicos.

La interacción entre hSNF5 y DNM2 en el citoplasma ha sido estudiada con profundidad en esta tesis. A continuación se discuten algunos aspectos interesantes de la posible asociación de hSNF5 con CAD, MMS19, SLC25A5 y RPS3

2.1 hSNF5 interacciona con CAD

La enzima citoplásmica CAD cataliza los tres primeros pasos en la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas, que provee a la célula de los precursores esenciales para multitud de eventos relacionados con el crecimiento en eucariotas (Huang and Graves, 2003). Múltiples enzimas del metabolismo de los nucleótidos, incluyendo CAD, se encuentran sobreexpresadas en células tumorales, pudiendo presentar concentraciones de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) y nucleósidos trifosfato (NTPs) de 6 a 11 ó de 1.25 a 5 veces superiores, respectivamente, a las presentes en células normales (Traut, 1994). Respecto a CAD, tanto su expresión como actividad son elevadas en distintos tipos de células tumorales, describiéndose casos de amplificación génica, relacionando el incremento en la síntesis de pirimidinas con la transformación celular (Otto et al., 1989; Smith et al., 1990; Livingstone et al., 1992; Zhang et al., 2013).

La actividad de CAD está modulada por regulación alostérica y fosforilación. La primera de ellas incluye efectores alostéricos del dominio CPSII: inhibición por nucleótidos de uridina (UTP) y activación por fosforribosil-5`-pirofosfato (PRPP) (Jones, 1980a; Jones, 1980b). La segunda, involucra diferentes quinasas (MAP-K, PKA, PKC, S6) con efectos sinérgicos y antagónicos en la síntesis de pirimidinas. La estimulación por factores de crecimiento activan MAP-K activando proliferación. Antes de entrar en fase S, CAD es fosforilada en el dominio CPSII por MAP-K, aumentando la activación por PRPP acoplado a la pérdida de inhibición por UTP, y la síntesis de pirimidinas (Graves et al., 2000; Sigoillot et al., 2002). A la salida de fase S, CAD es desfosforilada en la serina específica fosforilada anteriormente por la MAP-K y fosforilada por la proteína quinasa A (PKA) también en el dominio CPSII, disminuyendo la síntesis de pirimidinas (Carrey et al., 1985; Banerjei et al., 1997). La proteína quinasa C (PKC) estimula la vía de las MAP-K y fosforila a CAD en el dominio DHO, pudiendo tener un efecto sinérgico con la fosforilación de CAD por MAP-K, favoreciendo la síntesis de pirimidinas y la proliferación celular (Sigoillot et al., 2007). Estudios recientes han demostrado que el complejo mTOR, que regula en mamíferos el crecimiento celular, la proliferación y la supervivencia, estimula indirectamente la actividad de CAD por fosforilación a través de la quinasa S6 (Nakashima et al., 2013; Robitaille et al., 2013; Ben-Sahra et al., 2013).

C-MYC juega un papel esencial en la regulación de la proliferación celular, estando frecuentemente sobreexpresado en tumores humanos (Aoki y Weber, 1981; Spencer et al., 1991; Henriksson y Luscher, 1996; Facchini y Penn, 1998; Oster et al., 2002; Massano et al., 2006). Existen numerosos estudios que demuestran que el aumento en la expresión de C-MYC provoca un aumento en la expresión de CAD (Miltenberger et al., 1995; Boyd y Famham, 1997; Bush et al., 1998). Además, C-MYC es fosforilado en respuesta a mitógenos por la vía MAP-K, favoreciendo la síntesis de pirimidinas. El complejo SWI/SNF juega un papel dual en la regulación de CAD, controlando el crecimiento celular y la proliferación (Pal et al., 2003). A niveles bajos de C-MYC el complejo actúa reprimiendo CAD, mientras que niveles elevados de C-MYC, como ocurre en multitud de cánceres, el complejo SWI/SNF activa su transcripción.

En este trabajo se ha descubierto la existencia de interacción entre hSNF5 y CAD mediante coimmunoprecipitación en extractos citoplásmicos de células tumorales (Figura 21A, 22B). La ausencia de señal en el ensayo PLA (Figura 23A y B) no descarta la existencia de interacción indirecta, a través de otras proteínas citoplásmicas, ni de interacción directa, no visible debido al gran tamaño de CAD o conformación de los anticuerpos. El dominio CPSII, cuya actividad representa el paso limitante en la síntesis de pirimidinas, es esencial para la interacción con hSNF5 (Figura 22C). Es precisamente en este dominio donde tienen lugar la mayoría de las regulaciones enzimáticas alostéricas y por fosforilación. Dado el carácter supresor tumoral de hSNF5, quizás la interacción con CAD disminuya su actividad. Quizás la unión favorezca la inhibición a través de efectores alostéricos o tal vez impida la fosforilación por MAP-K, regulando así la síntesis de pirimidinas y el crecimiento celular. Por otro lado, C-MYC se expresa a niveles elevados en diversos tumores humanos, incluyendo a los tumores rabdoides carentes de hSNF5, y tal vez en este estado el complejo SWI/SNF continúe activando la transcripción de CAD. De esta forma el complejo SWI/SNF regularía a CAD a través del control de su expresión a nivel de cromatina y a través del control de la actividad por la interacción con la fracción citoplásmica de hSNF5.

2.2 hSNF5 interacciona con MMS19, SLC25A5 y RPS3

En eucariotas existen muchas proteínas que conteniendo como cofactores grupos hierro/azufre (Fe/S) llevan a cabo diversas funciones celulares en la mitocondria, el citoplasma y el núcleo. La síntesis de estos grupos Fe/S se inicia en la mitocondria a través de una maquinaria de ensamblaje de grupos Fe/S (ISC) mientras que la maduración es asistida por una maquinaria citosólica (CIA) (Lill y Mühlenhoff, 2008; Lill, 2009; Sharma et al., 2010; Alfonso y Lukeš, 2011; Balk y Pilon, 2011; Lill et al., 2012; Rouault, 2012). Defectos en el ensamblaje de las proteínas Fe/S están asociados con severas y, a menudo, fatales enfermedades neurodegenerativas, metabólicas o hematológicas (Sheftel et al. 2010a; Cameron et al., 2011; Navarro-Sastre et al. 2011; Rouault, 2012).

Entre las ocho proteínas que conforman CIA (Sharma et al., 2010) se encuentran Cia1, Cia2 y Mms19, formando un complejo (CTC) que parece mediar la transferencia e inserción específica de los grupos Fe/S a las proteínas diana (Srinivasan et al., 2007; Weerapana et al., 2010; Gari et al., 2012; Stehling et al., 2012).

El hecho de que múltiples enzimas involucradas en reparación/replicación del DNA requieran grupos Fe/S para su función ha generado un nexo de unión entre la estabilidad genómica y la biogénesis de proteínas Fe/S (Rudolf et al., 2006; Klinge et al., 2007; Yeeles et al., 2009; Sheftel et al., 2010; White et al., 2011; Netz et al., 2012). A la proteína MMS19 se la han asociado funciones reguladoras del complejo TFIIF, implicado en transcripción y reparación por escisión de nucleótido (NER) (Zurita y Merino, 2003; Lauder et al., 1996; Seroz et al., 2000; Kou et al., 2008). Como proteína accesoria de NER su ausencia aumenta la sensibilidad al daño del DNA, descubriéndose en levaduras que su presencia es necesaria para una correcta concentración de Rad3 (XPD en humanos) en TFIIF (Kou et al., 2008). Además, MMS19 tiene otras funciones con independencia de TFIIF. Así, el complejo MMXD, formado por MMS19, XPD, CIA1, MIP18 (Cia2 en levaduras) y SLC25A5, una translocasa de nucleótidos de adenina que cataliza el cambio de ATP mitocondrial por ADP citosólico, está involucrado en segregación cromosómica. Recientemente se ha descrito a MMS19

como proteína central de la maquinaria CIA que interacciona con CIA1, SLC25A5 y proteínas citoplásmicas Fe/S (Van Wietmarschen et al., 2012).

La proteína RPS3 forma parte de la subunidad pequeña ribosomal 40S y está implicada en traducción (Bommer et al., 1991). Como proteína “libre” se le han asociado funciones mitóticas como proteína de unión a microtúbulos del huso (Sauer et al., 2005; Jang et al., 2012), reparadoras del DNA por escisión de base (BAR) como endonucleasa III (Wilson et al., 1994; Kim et al., 2005; Seong et al., 2012), reguladoras de la expresión génica formando parte del complejo NF- κ B, y apoptóticas inducidas por citoquinas y estrés (Jang et al., 2004, 2012). Además se ha descrito la posibilidad de que rpS3 utilice como cofactor grupos Fe/S (Lee et al., 2002).

El análisis proteómico llevado a cabo en este trabajo muestra que las proteínas MMS19, SLC25A5 y RPS3 coinmunoprecipitan con la fracción citoplásmica de hSNF5 en células tumorales en cultivo (Figura 21). La existencia de un grupo Fe/S en RPS3 liga esta proteína al complejo CIA. Tanto la presencia como la función de hSNF5 en este cuarteto proteico se desconocen, pudiendo interactuar de forma directa con una o más de una proteína de las tres descubiertas. Entre las diversas hipótesis planteadas se encuentran: **(1)** la existencia de un grupo Fe/S en hSNF5, hecho que requeriría la interacción entre esta proteína y el complejo CIA a través de MMS19 y/o SLC25A5; **(2)** la existencia de un grupo Fe/S en algún miembro del complejo SWI/SNF previo importe nuclear, por ejemplo en BAF155 que parece interactuar con hSNF5 en extractos citoplásmicos; **(3)** y/o la implicación de hSNF5 en el complejo MMXP, del cual MMS19 y SLC25A5 forman parte.

La ausencia de hSNF5 aumenta la sensibilidad al daño en el DNA implicando al complejo SWI/SNF en NER (Hara et al., 2002; Klochendler-Yeivin et al., 2006; Gong et al., 2008; Ray et al., 2009). Estudios recientes han revelado que hSNF5 interacciona con XPC (Ray et al., 2009), que recluta a TFIIH al sitio dañado (Yokoi et al., 2000) que a su vez interacciona con su regulador MMS19. Por tanto, las posibles interacciones entre hSNF5-MMS19, y hSNF5-rpS3 halladas en este trabajo podrían indicar otro nexo de unión de hSNF5 con reparación (NER, BAR), implicando su pérdida inestabilidad genética.

2.3 hSNF5 interacciona con DNM

Las dinaminas son GTPasas que se encuentran conservadas a lo largo de la evolución en eucariotas superiores. En mamíferos, la DNM se encuentra codificada por tres genes diferentes (*DNM1*, *DNM2* y *DNM3*) que presentan múltiples variantes de splicing (Figura 5) (Cao et al., 1998). A pesar de que la elevada identidad (~80%) mostrada por estas tres isoformas soporta la idea de un mecanismo molecular común, la existencia de esta triplicación génica (con múltiples variantes de splicing) a lo largo de la evolución podría reflejar especialización funcional a nivel de tejido e isoforma, y a nivel de orgánulo según variante/s de “splicing” presente/s (Ferguson y De Camilli, 2012). *DNM1*, *DNM2* y *DNM3* muestran diferencias en su patrón de expresión. *DNM1* es considerada la isoforma neuronal (Nakata et al., 1991; Ferguson et al. 2007), *DNM2* es ubicua (Cao et al., 1998, Ferguson et al. 2007) mientras que *DNM3* se expresa mayoritariamente en cerebro y en testículo, y en menor cuantía, en pulmón y corazón.

En esta tesis se ha descubierto la interacción entre hSNF5 y la proteína citoplásmica DNM2 a través de ensayo de doble híbrido en levaduras (Figura 24). Experimentos de “pull down” y de coimmunoprecipitación realizados posteriormente demostraron que esta interacción era directa (Figura 27) y reproducible en células humanas (Figura 28). La elevada identidad existente entre las tres isoformas de DNM llevó a investigar la posible interacción entre hSNF5 y las otras dos isoformas, DNM1 y DNM3. Los resultados obtenidos mediante ensayos de coimmunoprecipitación (Figura 32) demuestran que hSNF5 no sólo es capaz de interactuar con DNM2, sino también con DNM1 y DNM3, sugiriendo que tal vez hSNF5 ejerza un papel común a las tres isoformas en el citoplasma. Si bien hay que mencionar que el desempeño del mismo podría regular funciones específicas de tejido u orgánulo, teniendo en cuenta las diferencias en el patrón de expresión y la existencia de diferentes isoformas con localizaciones celulares específicas (Figura 5).

Un análisis de dominios reveló que el dominio HR3 de hSNF5 fue esencial para la interacción con DNM2 (Figura 25). En el modelo postulado por Craig y colaboradores (Craig et al., 2002) la región carboxilo terminal de hSNF5, que contiene el dominio HR3, podría ocultar la NES impidiendo el transporte de esta proteína del

núcleo al citoplasma. Este modelo contempla que un cambio conformacional, quizás mediado por la unión de otra proteína, podría desenmascarar la NES mediando el transporte. Teniendo en cuenta esta posibilidad y la esencialidad del dominio HR3 en la interacción con DNM2, quizás la interacción entre ambas proteínas en el núcleo podría mediar el desenmascaramiento de la NES. Sin embargo, la expresión de una versión nuclear de DNM2 (F-NLS-DNM2) no alteró la dinámica de transporte de Ha-hSNF5, aunque indujo cambios en la distribución nuclear de Ha-hSNF5 provocando la aparición de estructuras nucleares punteadas en las cuales localizaron ambas proteínas (Figura 26A). Quizás este hecho sea debido a que la existencia de una NLS adicional en DNM2 sea dominante, provocando acumulo de ambas proteínas en el núcleo. Además, a pesar de no presentar NLS teóricas, el análisis de secuencia reveló dos posibles NES en DNM2 (no mostrado). Por tanto, y aunque DNM2 presente una localización mayoritariamente citoplásmica, no puede descartarse que una fracción esté presente o presente en el núcleo bajo ciertas circunstancias desenmascarando la/s NES de hSNF5 disparando el transporte de ésta.

El análisis de dominios de DNM2 reveló que los dominios GTPasa y GED fueron fundamentales en la interacción con hSNF5 (Figura 25), sugiriendo un papel de hSNF5 en el ensamblaje de la DNM2 o quizás en su actividad GTPasa. Mientras el dominio GTPasa une e hidroliza GTP, el dominio GED interacciona con él promoviendo el ensamblaje y estimulando su actividad actuando como una GAP (Sever et al., 1999; Narayanan et al., 2005)

En células en cultivo la interacción entre DNM2 y hSNF5 endógenas localizó mayoritariamente en el citoplasma, mostrando una distribución punteada heterogénea (Figura 29). Además, ambas proteínas etiquetadas localizaron junto con tfn (Figura 30), una proteína de unión a hierro que facilita la entrada del mismo en las células, en estructuras punteadas. El proceso de internalización de tfn en la célula comienza por la interacción de la tfn, previamente unida a hierro, a su receptor, siendo posteriormente endocitada mediante CME hasta alcanzar los endosomas tempranos, donde el hierro es liberado. Posteriormente alcanza los endosomas de reciclaje para ser reconducida finalmente de vuelta a la superficie celular (Lakadamyali et al., 2006; Mayle et al., 2012). La unión de la tfn a su receptor conduce a la activación de DNM2 y cortactina,

que se asocian justo antes de la escisión de la vesícula, por la quinasa src regulando así la dinámica de actina que controla la formación de la vesícula (Kruchten y McNiven, 2006; Cao et al., 2010). Mattheyses y colaboradores demostraron que la clatrina y la DNM exhiben una variedad de comportamientos durante la endocitosis estando presentes en la escisión de la vesícula y manteniéndose en ella tras la escisión durante un tiempo variable (Mattheyses et al., 2011). Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que casi el 50% de las vesículas que transportaban tfn fueron positivas para GFP-hSNF5 y DSRed-DNM2, sugiriendo un posible papel de la interacción entre ambas proteínas en vesículas formadas tras la endocitosis.

3. EL SILENCIAMIENTO DE *hSNF5* AFECTA NEGATIVAMENTE A LA ENDOCITOSIS DEPENDIENTE DE DNM2

Uno de los resultados más sorprendentes de este trabajo fue el hecho de descubrir que la ausencia de hSNF5 afecta negativamente a vías endocíticas dependientes de DNM2.

Los resultados obtenidos tras silenciar hSNF5 en células humanas muestran una reducción en la internalización de tfn del 80% (Figura 33C) y de dxt del 40% (Figura 36C), introducidos en la célula mediante CME y endocitosis de fase fluida, respectivamente, ambas formas dependientes de DNM2. La menor reducción en la internalización de dxt respecto a la observada para tfn seguramente sea debido a la introducción de esta molécula por otras vías independientes de DNM2, pues se ha descrito que la fase fluida puede penetrar en las células mediante vías dependientes e independientes de esta GTPasa. El hecho de que la vía macropinocítica activada en presencia de EGF, descrita como independiente de DNM2, no se vea afectada en ausencia de hSNF5 (Figura 36B y C) demuestra especificidad de función de hSNF5 sobre vías dependientes de DNM2. Además, la ausencia de la/s ATPasa/s del complejo SWI/SNF, BRG1 y/o hBRM, no afecta a la internalización de tfn ni a la de dxt, sugiriendo que el efecto observado sobre la CME y la endocitosis de fase fluida no es debido a un efecto transcripcional llevado a cabo por este complejo remodelador.

La inhibición de vías dependientes de DNM2 en ausencia de hSNF5 puede ser debida, en parte, al aumento de la inestabilidad de la proteína DNM2 (Figura 40) sin que los niveles de mRNA de DNM2 se vean afectados (Figura 39). La causa de esta inestabilidad podría residir en la pérdida de interacción entre ambas moléculas, aunque no se descarta la posibilidad de que sea debido a un efecto indirecto provocado por la inhibición de la endocitosis. El hecho de que la inhibición de la expresión de la/s ATPasa/s del complejo SWI/SNF, BRG1 y/o hBRM, no altere ni los niveles de mRNA ni de proteína de DNM2 (Figura 39 y 40) demuestra independencia del complejo SWI/SNF.

Otra de las causas de la inhibición de la endocitosis tras el silenciamiento de hSNF5 puede residir en la regulación de la actividad GTPasa de DNM2 por parte de hSNF5. En ensayos de sedimentación *in vitro*, en ausencia de nucleótidos y en solución con baja fuerza iónica, la interacción existente entre ambas proteínas no afecta al ensamblaje de DNM2 (Figura 38). hSNF5 sedimenta parcialmente en ausencia de DNM2, posiblemente debido su capacidad intrínseca para interaccionar consigo misma a través de sus dominios R1 y R2 *in vivo* e *in vitro*, formando dímeros y estructuras multiméricas a concentraciones superiores a 0,1 μM (Das et al., 2009). Sin embargo, la presencia de DNM2 ensamblada provoca la sedimentación de hSNF5 prácticamente en su totalidad (Figura 38), sugiriendo que hSNF5 precipita con esta GTPasa en su estado ensamblado, quizás debido a la interacción existente entre ambas proteínas.

Uno de los modelos que podría explicar cómo la DNM actúa durante la endocitosis (Narayanan et al., 2005), y que incorpora observaciones previamente publicadas (Kosaka e Ikeda, 1983; Hinshaw y Schmid, 1995; Takei et al., 1995; Sweitzer and Hinshaw, 1998; Sever et al., 1999; Marks et al., 2001), contempla dos estados (Figura 45): un primer estado en el que esta proteína unida a GTP se comportaría como una GTPasa reguladora con capacidad para reorganizar la cubierta de clatrina, y un segundo estado en el que la hidrólisis del GTP estimulada por el ensamblaje dispararía finalmente la fisión de membrana. Para que la endocitosis pueda llevarse a cabo sería necesaria la existencia de un equilibrio preciso entre ambos estados, de forma que su perturbación llevaría a la alteración de este proceso celular. En el modelo propuesto, el dominio GED regularía negativamente el primer estado y positivamente el segundo. Confirmando este modelo, células humanas que

sobreexpresan mutantes en el dominio GED (K694A o R725A) de DNM, defectuosos en actividad GTPasa dependiente de ensamblaje, mostraron un aumento de la endocitosis sugiriendo que estos mutantes prolongarían el estado DNM unida a GTP controlando endocitosis (Sever et al., 1999). En *Drosophila*, mutaciones en el dominio GTPasa que reducen la afinidad por el GTP (*shi ts2*) mostraron defectos endocíticos que llevaron a un fenotipo de parálisis. Una segunda mutación (A738T o T749I) en la región carboxilo terminal del dominio GED (*supresor de shi* o *sushi*), descrito como dominio de interacción con el dominio GTPasa, afectó *in vitro* negativamente la actividad GTPasa basal y estimulada por ensamblaje sin afectar a dicho ensamblaje, rescatando el fenotipo de parálisis sin aumentar la capacidad de unión a GTP (Narayanan et al., 2005). Por tanto, puesto que una reducción en la actividad GAP del dominio GED rescata endocitosis, este dominio regula negativamente la función de la DNM *in vivo*. DNM2 podría actuar inicialmente durante la endocitosis como “andamiaje molecular” interaccionando a través de su dominio PRD con proteínas endocíticas accesorias, con dominios SH3, que controlan el ensamblaje de la cubierta y la maduración de la vesícula. En estados más tardíos, se ensamblaría en el cuello de vesículas endocíticas donde la actividad GTPasa estimulada por el ensamblaje dispararía la fisión de la vesícula.

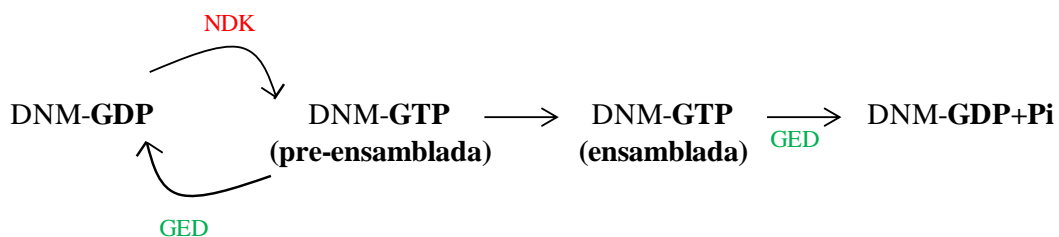


Figura 46. Modelo de actuación de la dinamina durante la endocitosis en dos pasos. Primero, DNM2 actuaría como una GTPasa reguladora durante un estado pre-ensamblado en el cual la relación entre el nivel de hidrólisis de GTP y/o el estado unido a GTP son críticos. Estos parámetros son positivamente regulados por la nucleósido difosfato quinasa (NDK) y negativamente regulados por el dominio GED de la DNM. Finalmente, DNM se ensamblaría en forma de collar en el cuello de las vesículas endocíticas, hecho que estimularía la actividad GTPasa y que estaría mediado en parte por el dominio GED (Narayanan et al., 2005).

Los ensayos realizados en este estudio demostraron que hSNF5 inhibe *in vitro* la actividad GTPasa de DNM2 ensamblada (Figura 37 B y C), indicando que hSNF5 contribuye a mantener a esta GTPasa en su configuración abierta y activa unida a GTP. Sin embargo, la presencia de hSNF5 no fue capaz de inhibir totalmente la actividad GTPasa de la DNM2 ensamblada, manteniéndose en valores cercanos al 30% (Figura 36 C). Todo ello sugiere que *in vitro*, la unión de hSNF5 modula pero no inhibe

completamente la actividad GTPasa de DNM2 ensamblada. Además, esta inhibición no es el resultado de defectos relacionados con el ensamblaje (Figura 38), a diferencia de la inhibición de la actividad mediada por otras proteínas que interaccionan con DNM2, como SNX9, BIN1/anfisina2 y auxilina, que alteran su ensamblaje (Owen et al., 1998; Newmyer et al., 2003; Soulet et al., 2005). Por tanto, hSNF5 puede ser considerado como un modulador de la actividad de DNM2 manteniéndola unida a GTP en estados iniciales de la endocitosis y regulando la llegada de diferentes efectores esenciales en la endocitosis dependiente de DNM2. De esta forma, su modo de actuación podría asemejarse al mostrado por los mutantes puntuales del dominio GED descritos anteriormente, que a pesar de inhibir la actividad GTPasa ensamblada sin afectar al ensamblaje son capaces de aumentar/rescatar la endocitosis.

Este efecto regulatorio no sólo podría estar involucrado en eventos de fisión de membrana dependientes de DNM2, sino también en múltiples funciones asociadas con DNM2, como la regulación del ensamblaje/desensamblaje de los filamentos de actina (Gu et al., 2010) o procesos dependientes de microtúbulos. Tal vez las alteraciones del citoesqueleto presentes en células rabdoides podría deberse a un defecto en la dinámica de la DNM2 en ausencia de hSNF5. Teniendo en cuenta la elevada identidad (~80%) que presentan las tres isoformas de DNM y la interacción existente entre éstas y hSNF5 (Figura 32) es lógico pensar que la actividad GTPasa de DNM1 y DNM3 también se encuentren reguladas por hSNF5 implicando quizás a esta proteína supresora de tumores en la regulación de la sinapsis y en la liberación de células espermáticas.

4 POSIBLE IMPLICACIÓN EN CÁNCER DE LA DESREGULACIÓN- INESTABILIDAD DE DNMT2 EN AUSENCIA DE hSNF5.

El complejo SWI/SNF es un potente supresor tumoral. Estudios recientes han revelado que el 19,6 % de los tumores encontrados en humanos presentan mutaciones en subunidades de este complejo (Wilson y Roberts, 2011; Romero y Sánchez-Céspedes, 2013; Kadoch et al., 2013). Sin embargo, sólo la inactivación bialélica de hSNF5 origina tumores rabdoideos, que contienen zonas compuestas por células con fenotipo rabdoide (indiferenciadas, con inclusiones citoplásmicas eosinófilas, cromatina descondensada y un gran nucléolo) inexistentes en los tumores originados por mutaciones en otros miembros del complejo SWI/SNF (Rorke et al., 1995,1996; Burger et al., 1998; Robert y Biegel, 2009). ¿Por qué mutaciones en hSNF5, y no en otros miembros del complejo SWI/SNF, provocan tumores tan agresivos?

En este trabajo se ha descrito una nueva función de hSNF5 en endocitosis dependiente de DNMT2 que quizás pueda estar involucrada en supresión tumoral. La ausencia de hSNF5 podría impedir, debido al efecto modulador sobre DNMT2 y al posible aumento de su inestabilidad, el reciclaje de los receptores de membrana aumentando así la señalización que tiene lugar a través de éstos.

Uno de los aspectos que ha llamado considerablemente la atención a lo largo de estos años es la contribución de la endocitosis a la señalización producida a través de receptores, que iniciada en la membrana plasmática persiste a través de la ruta endocítica aportando diversificación y especificidad al proceso. La señalización comienza con la activación de receptores de membrana plasmática unidos a sus ligandos. Como resultado de esta señalización los receptores son internalizados en endosomas tempranos donde se decide su destino: degradación en el lisosoma o reciclaje hacia la superficie celular a través de endosomas de reciclaje.

Se ha descrito que la endocitosis juega un papel, aunque ambiguo, en cáncer (Lanzetti y Di Fiore, 2008). Por un lado es un atenuador de la señalización, puesto que media degradación de receptores, y por lo tanto una candidata a vía supresora tumoral. Sin embargo, por otro lado también mantiene la señalización (señalización en

endosomas, reciclaje como medida preventiva a la degradación, activación de receptores como Notch) pudiendo comportarse como una potencial vía oncogénica. Además, la alteración de ciertas proteínas endocíticas involucradas en la regulación del ciclo celular, mitosis y apoptosis, puede originar cáncer. La endocitosis también desempeña un papel en progresión tumoral por estar involucrada en la restricción espacial de las señales necesarias para el movimiento celular así como en autofagia (Levine y Kroemer, 2008; Mizushima et al., 2008). Respecto al papel desempeñado por la endocitosis en supresión tumoral, se ha detectado que diversos genes de *Drosophila*, implicados en endocitosis como los homólogos a DNM, son supresores tumorales cuyas mutaciones potencian el crecimiento o llevan a la pérdida tanto de polaridad como de diferenciación (Lu y Bilder, 2005; Giebel y Wodarz, 2006). Así mismo, la endocitosis de integrinas a través de vías dependientes e independientes de clatrina reguladas por las GTPasas Rab y Arf6 se ha asociado a movilidad metastática (Cheng et al., 2004, Caswell et al., 2007).

Se ha descrito que BIN1/anfifisina2 interacciona con DNM2 desempeñando un papel en reciclaje endocítico (Wigge et al., 1997; Pant et al., 2009) y que en tumores rabdoideos *BIN1/anfifisina2* se expresa en menor cantidad que en células sanas (McKenna et al., 2012). Esto puede sugerir que *BIN1/anfifisina2* representa un mecanismo de control de la endocitosis dependiente de DNM2 adicional al descrito en este trabajo. En el análisis de expresión génica en ausencia de hSNF5 llevado a cabo en este estudio no se observó desregulación de *BIN1/anfifisina2* ni de otros genes que codifican proteínas implicadas directamente en endocitosis como, arrestinas, CALM, Dab2, endofilinas, EPS15, HIP o Numb entre otras (Lanzetti y Di Fiore, 2008; Pyrzynska et al., 2009). Aunque si la menor expresión de BIN1/anfifisina2 está directamente ligada a la carencia de hSNF5 o es consecuencia de alterar la endocitosis necesitaría ser clarificado.

El análisis de expresión génica tras silenciar DNM2 o hSNF5 sugiere que, al menos en células HeLa, una parte importante del fenotipo transcripcional tras silenciar hSNF5 puede deberse a la deficiente endocitosis mas que a efectos transcripcionales directos de este supresor tumoral como miembro del complejo SWI/SNF. De los 52 genes comunes desregulados en ausencia de hSNF5 o DNM2, 7 redujeron su expresión mientras que 40 de ellos mostraron sobreexpresión tanto en ausencia de hSNF5 como de DNM2 (Figura 42, 43). Entre ellos se encuentran genes que dan lugar a proteínas

implicadas en señalización, como receptores o ligandos, cuya sobreexpresión ha sido asociada a diversos tipos de cáncer. Por tanto, respecto a la implicación en cáncer, es posible que el aumento en la señalización a través de receptores de membrana no sea debido únicamente a la inhibición de la endocitosis dependiente de DNM2 en ausencia de hSNF5, sino también al aumento en la expresión de los mismos.

Por otra parte, el silenciamiento de DNM2 en células HeLa provocó una fuerte inducción de genes que codifican filamentos intermediarios tales como ACTG2 (“actin, gamma2, smooth muscle, enteric”), ACTA2 (“actin, alpha 2, smooth muscle, aorta”), KRT17 (“keratin-17”), KRT7 (“keratin 7) y MYL6 (“myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle). En ausencia de DNM2 la expresión de estos genes aumentó en 103, 3,9, 5,6, 3,1 y 1,7 veces, respectivamente. Es interesante destacar que una de las características más distintivas de los tumores rabdoideos, además de carecer de la proteína hSNF5, es la sobreexpresión de filamentos intermediarios y actina g (Judkins et al., 2004). El silenciamiento de hSNF5 no provoca la sobreexpresión de estos genes, si bien hay que recalcar que los experimentos de silenciamiento se han llevado a cabo en células HeLa. Sería necesario realizar los estudios transcripcionales en células primarias más similares a las células que dan lugar a los tumores rabdoideos.

Por otro lado, la inactivación de DNM2 o la ausencia de esta proteína se han asociado a fallos en la citocinesis (Thompson et al., 2002; Liu et al., 2008, Joshi et al., 2011). Es interesante mencionar que la aneuploidización o los defectos en segregación cromosómica observados, en ciertos casos, en células de tumores rabdoideos (Vries et al., 2005) son consecuencia de defectos en la citocinesis.

En conclusión, las funciones desempeñadas por hSNF5 tanto en el núcleo, formando parte del complejo SWI/SNF, como en el citoplasma, modulando endocitosis, podrían contribuir a explicar la especificidad y la agresividad del tipo de tumor desarrollado tras la inactivación de hSNF5.

CONCLUSIONES

1- hSNF5 es una proteína nuclear y citoplásmica. hSNF5 presenta una localización nuclear y citoplásmica en las líneas celulares HeLa, 293T y COS7. hSNF5 presenta un continuo tráfico entre el núcleo y el citoplasma en células HeLa.

2- hSNF5 interacciona con proteínas citoplásmicas. Mediante coimmunoprecipitación a partir de extractos citoplásmicos seguida de espectrometría de masas se han identificado las interacciones entre hSNF5 y CAD, MMS19, RPS3, SLC25A5, KCTD5, α -Tubulina, chaperonas (HSP70, HSP90, GRP78, Calnexina) y BAF155. Mediante ensayo de doble híbrido se ha identificado la posible interacción entre hSNF5 y Cog2, Eif2b2 y DNM2.

3- hSNF5 y DNM2 interactúan en el citoplasma de las líneas celulares 293T, HeLa y COS7. hSNF5 también interactúa con DNM1 y DNM3 en la línea celular 293T. Tanto los dominios Nt y HR3 de hSNF5 como los dominios GTPasa y GED de DNM2 son esenciales en la interacción, que es directa y tiene lugar en presencia de GDP, GTP o GTP γ S.

4- hSNF5 y DNM2 colocalizan en vesículas endocíticas que portan tfn en el citoplasma de células COS7.

5- *In vitro*, hSNF5 inhibe la actividad GTPasa de DNM2 ensamblada sin afectar a su ensamblaje.

6- El silenciamiento de *hSNF5*, pero no el de otros miembros del complejo SWI/SNF como *BRG1* o *hBRM*, inhibe vías endocíticas dependiente de DNM2, como CME y la endocitosis basal de fluidos, en células HeLa.

7- El silenciamiento de *hSNF5*, pero no el de otros miembros del complejo SWI/SNF como *BRG1* o *hBRM*, produce una disminución de los niveles de la proteína DNM2 sin afectar a los niveles del mRNA en células HeLa.

8- El análisis de expresión génica en células humanas silenciadas para *hSNF5* o *DNM2* indica que, al menos en células HeLa, una parte importante del fenotipo transcripcional en ausencia de hSNF5 parece deberse a la deficiente endocitosis más que a efectos transcripcionales directos provocados por la carencia de esta proteína en el núcleo.

ANEXO

Tabla 11. Genes comunes sobreexpresados tras silenciar hSNF5 o DNMT2 en células HeLa

SÍMBOLO GÉNICO	PROTEÍNA QUE CODIFICA	CAMBIO LINEAL	
		SihSNF5	SiDNMT2
HKDC1	Hexoquinase domain containing 1	3.52	3.02
PSG4	Pregnancy specific beta 1 glycoprotein 4	3.21	4.00
ANXA3	Annexin A3	3.07	9.52
AREG	Amphiregulin	2.80	8.24
FOLR1	Folate receptor 1	2.32	3.18
ALPK2	Alpha kinase 2	2.27	2.11
EPGN	Epithelial mitogen homolog	2.20	2.62
FBXO32	F box protein 32	2.11	1.72
PROCR	Protein C receptor	1.94	1.52
PTPRR	Protein tyrosine phosphatase, receptor type R	1.87	2.00
PDE2A	Phosphodiesterase 2A, cGMP stimulated	1.84	4.47
SLC25A16	Solute carrier familia 25 member 16	1.83	1.57
NEDD9	Neural precursor cell expressed, developmentally down regulated 9	1.79	1.88
GPNMB	Glycoprotein transmembrane nmb	1.77	1.71
TRIML2	Tripartite motif family like 2	1.75	2.04
GDF15	Growth differentiation factor 15	1.72	4.12
MFAP5	Microfibrillar associated protein 5	1.69	6.74
THBS1	Thrombospondin 1	1.67	1.56
CDKN1A	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	1.65	2.85
ITGB8	Integrin, beta8	1.65	2.70
MAPRE3	Microtubule associated protein 3, RP/EB family	1.64	1.79
PSG7	Pregnancy specific beta 1 glycoprotein 7	1.62	2.73
KRT80	Keratin 80	1.62	1.85
GRAMD3	Gram domain contain 3	1.61	2.42
HSD17B6	Hydroxysteroid (17 beta) dehydrogenase 6 homolog	1.61	1.68
PHLDA1	Pleckstrin homology like domain, family A member 1	1.60	2.36
GDA	Guanine deaminase	1.56	1.70
AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2	1.55	1.77
EMP1	Ephitelial membrane protein 1	1.55	2.57
MPP1	Membrane protein, palmitoylated 1, 35 kDa	1.54	1.63
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3	1.53	2.20
NEXN	Nexilin (F actin binding protein)	1.53	2.34
DAPP1	Dual adaptor of phosphotyrosine and 3 phosphoinositidose	1.52	2.14
LAMB3	Laminin beta 3	1.52	2.23
HIST2H4A	Histone cluster, H4	1.52	1.56
IL18	Interleukin 18	1.52	2.69
NTN4	Netrin 4	1.51	2.14
RBMS3	RNA binding motif, single stranded interacting protein	1.51	1.94
RGNEF	Rho guanine nucleotide exchange factor	1.50	1.86
C9orf150	Chromosome 9 open reading frame 150	1.50	1.52

Tabla 12. Genes comunes que disminuyen su expresion tras silencial hSNF5 o DNM2 en células HeLa

SÍMBOLO GÉNICO	PROTEÍNA QUE CODIFICA	CAMBIO LINEAL	
		Si <hsnf5< th=""> <th>SiDNM2</th> </hsnf5<>	SiDNM2
ACSL5	Acyl CoA synthetase long chain family member 5	2.64	2.08
CACNA1D	Calcium channel, voltage dependent, L type, alpha 1D	1.61	1.81
CREB3L1	cAMP responsive element binding protein 3 like 1	1.55	1.56
MYLK3	Myosin light chain kinase 3	1.65	2.54
PPYR1	Pancreatic polypeptide receptor 1	1.60	1.56
USH1C	Usher syndrome 1C	2.37	2.06
VIPR2	Vasocative intestinal peptide receptor 2	1.50	1.60

BIBLIOGRAFIA

- Aalfs J. D. y Kingston R. E. What does 'chromatin remodeling' mean? *Trends Biochem Sci.* 2000 25:548-555.
- Abrams E., Neugeborn L. y Carlson M. Molecular analysis of SNF2 and SNF5, genes required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1986. 6: 3643-3651.
- Adam EJ, Adam SA. Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J Cell Biol.* 1994;125(3):547-55.
- Adkins N.L, Watts M, Georgel P.T. To the 30-nm chromatin fiber and beyond. *Biochim Biophys Acta.* 2004. 1677(1-3):12-23.
- Adler H.T., Chinery R., Wu D.Y., Kussick S.J., Payne J.M., Fornace A.J. Jr, Tkachuk D.C. Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins. *Mol Cell Biol.* 1999. 19(10):7050-60.
- Ae K., Kobayashi N., Sakuma R., Ogata T., Kuroda H., Kawaguchi N., Shinomiya K., Kitamura Y. Chromatin remodeling factor encoded by *inl1* induces G1 arrest and apoptosis in *inl1*-deficient cells. *Oncogene.* 2002. 21(20):3112-20.
- Alfonzo JD, Lukeš J. Assembling Fe/S-clusters and modifying tRNAs: ancient co-factors meet ancient adaptors. *Trends Parasitol.* 2011;27(6):235-8.
- Aoki T. and Weber G. Carbamoyl phosphate synthetase (glutamine-hydrolyzing): increased activity in cancer cells. *Science.* 1981. 212: 463–465.
- Arents G. y Moudrianakis E. N. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995. 92: 11170-11174.
- Arnaudo AM, Garcia BA. Proteomic characterization of novel histone post-translational modifications. *Epigenetics Chromatin.* 2013. 6(1):24.
- Balk J, Pilon M. Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends Plant Sci.* 2011;16(4):218-26.
- Banerjee L. C. and Davidson J. N. Site-directed substitution of Ser1406 of hamster CAD with glutamic acid alters allosteric regulation of carbamyl phosphate synthetase II. *Somat Cell Mol. Genet.* 1997. 23: 37–49.
- Barylko B., Binns D., Lin K.M., Atkinson M.A., Jameson D.M., Yin H.L., Albanesi J.P. Synergistic activation of dynamin GTPase by Grb2 and phosphoinositides. *J Biol Chem.* 1998. 6:273(6):3791-7.
- Bashkurov P.V., Akimov S.A., Evseev A.I., Schmid S.L., Zimmerberg J., Frolov V.A. GTPase cycle of dynamin is coupled to membrane squeeze and release, leading to spontaneous fission. *Cell.* 2008. 135(7):1276-86.
- Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science.* 1997;275(5308):1930-4.
- Beckwith J.B., Palmer N.F. Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer.* 1978. 41:1937–48.
- Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, Manning BD. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science* 2013, 339:1323–1328.
- Betz B.L., Strobeck M.W., Reisman D.N., Knudsen E.S., Weissman B.E. Re-expression of hSNF5/INI1/BAF47 in pediatric tumor cells leads to G1 arrest associated with induction of p16ink4a and activation of RB. *Oncogene.* 2002. 21(34):5193-203.

- Biegel J.A. Molecular genetics of atypical teratoid/rhabdoid tumor. *Neurosurg Focus*. 2006. 20(1):E11.
- Biegel J.A., Tan L., Zhang F., Wainwright L., Russo P., Rorke L.B. Alterations of the hSNF5/INI1 gene in central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors and renal and extrarenal rhabdoid tumors. *Clin Cancer Res*. 2002. 8:3461–3467.
- Biegel J.A., Zhou J.Y., Rorke L.B., Stenstrom C., Wainwright L.M., Fogelgren B. Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res*. 1999. 59(1):74-9.
- Biegel JA, Rorke LB, Packer RJ, Emanuel BS. Monosomy 22 in rhabdoid or atypical tumors of the brain. *J Neurosurg*. 1990 Nov;73(5):710-4.
- Biggs PJ, Garen PD, Powers JM, Garvin AJ. Malignant rhabdoid tumor of the central nervous system. *Hum Pathol*. 1987;18(4):332-7.
- Bitoun M, Durieux AC, Prudhon B, Bevilacqua JA, Herledan A, Sakanyan V, Urtizbera A, Cartier L, Romero NB, Guicheney P. Dynamin 2 mutations associated with human diseases impair clathrin-mediated receptor endocytosis. *Hum Mutat*. 2009 ;30(10):1419-27.
- Blanco R., Iwakawa R., Tang M., Kohno T., Angulo B., Pio R. et al. A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines. *Hum Mutat*. 2009.30: 1199–1206.
- Bochar D.A., Wang L., Beniya H., Kinev A., Xue Y., Lane W.S., Wang W., Kashanchi F., Shiekhattar R. BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell*. 2000. 102:257-65.
- Böhm J. et al. Mutation spectrum in the large GTPase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy. *Hum Mutat*. 2012. 33(6):949-59.
- Bommer UA, Lutsch G, Stahl J, Bielka H. Eukaryotic initiation factors eIF-2 and eIF-3: interactions, structure and localization in ribosomal initiation complexes. *Biochimie*. 1991. 73(7-8):1007-19.
- Bonazzi M, Spanò S, Turacchio G, Cericola C, Valente C, Colanzi A, Kweon HS, Hsu VW, Polishchuck EV, Polishchuck RS, Sallese M, Pulvirenti T, Corda D, Luini. CtBP3/BARS drives membrane fission in dynaminin dependent transport pathways. *Nat. Cell Biol*. 2005. 7, 570–580.
- Bourdeaut F, Fréneaux P, Thuille B, Lellouch-Tubiana A, Nicolas A, Couturier J, Pierron G, Sainte-Rose C, Bergeron C, Bouvier R, Rialland X, Laurence V, Michon J, Sastre-Garau X, Delattre O. hSNF5/INI1-deficient tumours and rhabdoid tumours are convergent but not fully overlapping entities. *J Pathol*. 2007 Feb;211(3):323-30
- Boyd C., Smith M.J., Kluwe L., Balogh A., Maccollin M., Plotkin S.R. Alterations in the SMARCB1 (INI1) tumor suppressor gene in familial schwannomatosis. *Clin Genet*. 2008. 74(4):358-66.
- Boyd K. E. and Farnham P. J. Myc versus USF: discrimination at the cad gene is determined by core promoter elements. *Mol. Cell Biol*. 1997. 17: 2529–2537.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976. 72: 248-254.
- Buccione R., Orth J.D., McNiven M.A. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2004. 5, 647–657.
- Burger P.C., Yu I.T., Tihan T., Friedman H.S., Strother D.R., Kepner J.L., et al. Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system: a highly malignant tumor of infancy and childhood frequently mistaken for medulloblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *Am J Surg Pathol*. 1998. 22(9):1083–1092.
- Bush A., Mateyak M., Dugan K., Obaya A., Adachi S., Sedivy J. et al. c-myc null cells misregulate cad and gadd45 but not other proposed c-Myc targets. *Genes Dev*. 1988. 12: 3797–3802.

- Cairns, B. R., Y. J. Kim, et al. A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994. 91(5): 1950-4.
- Cairns, B. R., Y. Lorch, et al. RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*. 1996. 87(7): 1249-60.
- Cameron JM, Janer A, Levandovskiy V, Mackay N, Rouault TA, Tong WH, Ogilvie I, Shoubridge EA, Robinson BH. Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes. *Am J Hum Genet*. 2011;89(4):486-95.
- Campelo F., Malhotra V. Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Annu Rev Biochem*. 2012. 81:407-27.
- Cao H, Chen J, Krueger EW, McNiven MA. SRC-mediated phosphorylation of dynamin and cortactin regulates the “constitutive” endocytosis of transferrin. *Mol Cell Biol*. 2010; 30:781–792.
- Cao H., Chen J., Awoniyi M., Henley J.R., McNiven M.A. Dynamin 2 mediates fluid-phase micropinocytosis in epithelial cells. *J Cel Sci*. 2007. 120:4167-4177.
- Cao H., Garcia F., McNiven M.A. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 1998.
- Caramel J. (B)., Medjkane S., Quignon F., Delattre O. The requirement for SNF5/INI1 in adipocyte differentiation highlights new features of malignant rhabdoid tumors. *Oncogene*. 2008. 27:2035–44.
- Caramel J., Quignon F., Delattre O. RhoA-dependent regulation of cell migration by the tumor suppressor hSNF5/INI1. *Cancer Res*. 2008. 68(15):6154-61.
- Cardarelli F., Serresi M., Bizzarri R., Giacca M., and Beltram F. In Vivo Study of HIV-1 Tat Arginine-rich Motif Unveils Its Transport Properties *Molecular Therapy* . 2007.15 no. 7: 1313–1322.
- Carlson M., Laurent B.C. The SNF/SWI family of global transcriptional activators. *Curr Opin Cell Biol*. 1994. 6(3):396-402.
- Carr J.F., Hinshaw J.E. Dynamin assembles into spirals under physiological salt conditions upon the addition of GDP and gamma-phosphate analogues. *J. Biol. Chem*. 1997. 272:28030-35.
- Carrey E. A., Campbell D. G. and Hardie D. G. Phosphorylation and activation of hamster carbamyl phosphate synthetase II by cAMP-dependent protein kinase. A novel mechanism for regulation of pyrimidine nucleotide biosynthesis. *EMBO J*. 1985. 4: 3735–3742.
- Caswell PT, Spence HJ, Parsons M, White DP, Clark K, Cheng KW, Mills GB, Humphries MJ, Messent AJ, Anderson KI, McCaffrey MW, Ozanne BW, Norman JC. Rab25 associates with alpha5beta1 integrin to promote invasive migration in 3D microenvironments. *Dev Cell*. 2007;13(4):496-510.
- Chai B., J. Huang B. R., Cairns and B. C. Laurent. Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Dev*. 2005. 19:1656–1661.
- Chen M.S., Obar R.A., Schroeder C.C., Austin T.W., Poodry C.A., Wadsworth S.C., Vallee R.B. Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. *Nature*. 1991. 351(6327):583-6.
- Chen P., Zhao J., Li G. Histone variants in development and diseases. *Genet Genomics*. 2013. 40(7):355-65.
- Cheng KW, Lahad JP, Kuo WL, Lapuk A, Yamada K, Auersperg N, Liu J, Smith-McCune K, Lu KH, Fishman D, Gray JW, Mills GB. The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nat Med*. 2004;10(11):1251-6.

- Cheng S.W., Davies K.P., Yung E., Beltran R.J., Yu J., Kalpana G.V. c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Genet.* 1999. 22(1):102-5.
- Christiaans I., Kenter S.B., Brink H.C., van Os T.A., Baas F., van den Munckhof P., Kidd A.M., Hulsebos T.J. Germline SMARCB1 mutation and somatic NF2 mutations in familial multiple meningiomas. *J Med Genet.* 2011. 48(2):93-7
- Chudakov D.M, Matz M.V., Lukyanov S. and Lukyanov K.A Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiol Rev.* 2010. 90: 1103–1163.
- Clark S.G., Shurland D.L., Meyerowitz E.M., Bargmann C.I., van der Blik A.M. A dynamin GTPase mutation causes a rapid and reversible temperature-inducible locomotion defect in *C. elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997. 16;94(19):10438-43
- Cote, J., J. Quinn, et al. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science.* 1994. 265(5168): 53-60
- Craig E., Zhang Z.K., Davies K.P., Kalpana G.V. A masked NES in INI1/hSNF5 mediates hCRM1-dependent nuclear export: implications for tumorigenesis. *EMBO J.* 2002. 21(1-2):31-42.
- Damke H., Baba T., Van der Blik A.M., Schmid S.L. (1995) Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol.* 1995. 131: 69-80.
- Damke H., Baba T., Warnock D.E., Schmid S.L. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* 1994. 127:915-34.
- Das S, Cano J, Kalpana GV. Multimerization and DNA binding properties of INI1/hSNF5 and its functional significance. *J Biol Chem.* 2009. 284(30):19903-14.
- David C., McPherson P.S., Mundigl O., de Camilli P. A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 . 93(1):331-5.
- Dingwall C., Laskey R.A, Nuclear targeting sequences-a consensus? *Trends Biochem. Sci.* 16. 1991.478–481.
- Doan D.N., Veal T.M., Yan Z., Wang W., Jones S.N., Imbalzano A.N. Loss of the INI1 tumor suppressor does not impair the expression of multiple BRG1-dependent genes or the assembly of SWI/SNF enzymes. *Oncogene.* 2004. 23:3462-73.
- Doherty G.J., McMahon H.T. Mechanisms of Endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2009. 78:857-902
- Douglass EC, Valentine M, Rowe ST, Parham DM, Wilimas JA, Sanders JM, Houghton PJ. Malignant rhabdoid tumor: a highly malignant childhood tumor with minimal karyotypic changes. *Genes Chromosomes Cancer.* 1990 ;2(3):210-6.
- Doyon J.B., Zeitler B., Cheng J., Cheng A.T., Cherone J.M., Santiago Y., Lee A.H., Vo T.D., Doyon Y., Miller J.C., Paschon D.E., Zhang L., Rebar E.J., Gregory P.D., Urnov F.D., Drubin D.G. Rapid and efficient clathrin-mediated endocytosis revealed in genome-edited mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 2011. 13:331-7.
- Dufour C., Beaugrand A., Le Deley M.C., Bourdeaut F., Andre N., Leblond P., Bertozzi A.I., Frappaz D., Rialland X., Fouyssac F., Edan C., Grill J., Quidot M., Varlet P. Clinicopathologic prognostic factors in childhood atypical teratoid and rhabdoid tumor of the central nervous system: A multicenter study. *Cancer.* 2012. 118:3812–3821.
- Dundr M. and Misteli T. Measuring dynamics of nuclear proteins by photobleaching. *Curr Protoc Cell Biol.* 2003 :13: 13.5.

- Durieux A.C., Vignaud A., Prudhon B., Viou M.T., Beuvin M., Vassilopoulos S., Fraysse B., Ferry A., Lainé J., Romero N.B., Guicheney P., Bitoun M. A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Hum Mol Genet.* 2010.19(24):4820-36.
- Eaton K.W., Tooke L.S., Wainwright L.M., Judkins A.R., Biegel J.A. Spectrum of SMARCB1/INI1 mutations in familial and sporadic rhabdoid tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2011. 56(1):7-15.
- Egel R., Beach D. H. y Klar A. J. Genes required for initiation and resolution steps of mating-type switching in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984. 81: 3481-3485.
- Eisen J. A., Sweder K. S. y Hanawalt P. C. Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res.* 1995. 23: 2715-2723.
- Facchini L.M. & Penn, L.Z. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.* 1998. 12, 633–651.
- Faelber K., Posor Y., Gao S., Held M., Roske Y., Schulze D., Haucke V., Noé F., Daumke O. Crystal structure of nucleotide-free dynamin *Nature.* 2011. 477(7366):556-60.
- Fan H. Y., X. He et al. Distinct strategies to make nucleosomal DNA accessible. *Mol Cell.* 2003. 11(5): 1311-22.
- Farsad K., Ringstad N., Takei K., Floyd S.R., Rose K., De Camilli P. Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol.* 2001. 155(2):193-200. 2001
- Ferguson S.M., Brasnjo G., Hayashi M., Wölfel M., Collesi C., Giovedi S., Raimondi A., Wei Gong L., Ariel P., Paradise S., O'Toole E., Flavell R., Cremona O., Miesenböck G., Ryan T.A., De Camilli P. A Selective Activity-Dependent Requirement for Dynamin 1 in Synaptic Vesicle Endocytosis. *Science.* 2007. 316; 5824:570-574
- Ferguson S.M., De Camilli P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2012. 13, 75-88.
- Ferguson SM, Raimondi A, Paradise S, Shen H, Mesaki K, Ferguson A, Destaing O, Ko G, Takasaki J, Cremona O, O' Toole E, De Camilli P. Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell.* 2009;17(6):811-22.
- Finch T, Klug A., Solenoidal model for superstructure in chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73. 1976. 1897–1901.
- Fish K. N., Schmid S. L. and Damke, H. Evidence that dynamin-2 functions as a signal-transducing GTPase. *J. Cell Biol.* 2000. 150, 145–154.
- Ford M.G., Jenni S., Nunnari J. The crystal structure of dynamin. *Nature.* 2011;477(7366):561-566.
- Frühwald M.C., Hasselblatt M., Wirth S., Köhler G., Schneppenheim R., Subero J.I., Siebert R., Kordes U., Jürgens H., Vormoor J. Non-linkage of familial rhabdoid tumors to SMARCB1 implies a second locus for the rhabdoid tumor predisposition syndrome. *Pediatr Blood Cancer.* 2006. 47(3):273-8.
- Gadd S, Sredni ST, Huang CC, Perlman EJ; Renal Tumor Committee of the Children's Oncology Group. Rhabdoid tumor: gene expression clues to pathogenesis and potential therapeutic targets. *Lab Invest.* 2010. 90(5):724-38.
- Gari K, León Ortiz AM, Borel V, Flynn H, Skehel JM, Boulton SJ. MMS19 links cytoplasmic iron-sulfur cluster assembly to DNA metabolism. *Science.* 2012;337(6091):243-5.
- Giebel B, Wodarz A. Tumor suppressors: control of signaling by endocytosis. *Curr Biol.* 2006;16(3):R91-2.

- Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 1992 Mar 25;20(6):1425.
- Gold E. S., Underhill D. M., Morrissette N. S., Guo J., McNiven M. A., and Aderem A. Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J. Exp. Med.* 1999. 190, 1849–1856.
- Gong, F., D. Fahy, H. Liu, W. Wang, and M. J. Smerdon. Role of the mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complex in the cellular response to UV damage. *Cell Cycle.* 2008. 7:1067–1074.
- Görlich D, Kostka S, Kraft R, Dingwall C, Laskey RA, Hartmann E, Prehn S. Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol.* 1995;5(4):383-92.
- Grant B.D., Donaldson J.G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009. 10:597-608.
- Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, Huang M, Lazarowski E, Pope RM, Collins MA, Dahlstrand EN, Earp HS III, Evans DR: Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* 2000,403:328–332.
- Gray N.W., Fourgeaud L., Huang B., Chen J., Cao H., Oswald B.J., Hémar A., McNiven M.A. Dynamin 3 is a component of the postsynapse, where it interacts with mGluR5 and Homer *Curr Biol.* 2003. 13(6):510-5.
- Gresh L., Bourachot B., Reimann A., Guigas B., Fiette L., Garbay S., Muchardt C., Hue L, Pontoglio M., Yaniv M., Klochendler-Yeivin A. The SWI/SNF chromatin-remodeling complex subunit SNF5 is essential for hepatocyte differentiation. *EMBO J.* 2005. 24(18):3313-24.
- Grigliatti T.A., Hall L., Rosebluth R., Suzuki D.T. Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. XIV. A selection of immobile adults. *Mol. Gen. Genet.* 1973. 120:107-14.
- Grigoryev S.A., Woodcock C.L. Chromatin organization: the 30 nm fiber. *Exp Cell Res.* 2012. 318:1448–1455.
- Gu C., Yaddanapudi S., Weins A., Osborn T., Reiser J., Pollak M., Hartwig J., Sever S. Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.* 2010. 29(21):3593-606.
- Guidi C.J., Sands A.T., Zambrowicz B.P., Turner T.K., Demers D.A., Webster W., Smith T.W., Imbalzano A.N., Jones S.N. Disruption of *Ini1* leads to peri-implantation lethality and tumorigenesis in mice. *Mol Cell Biol.* 2001. 21(10):3598-603.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 1983. 166(4): 557-80.
- Hanzal-Bayer MF, Hancock JF. Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett.* 2007;581(11):2098-104.
- Hara, R., and A. Sancar. The SWI/SNF chromatin-remodeling factor stimulates repair by human excision nuclease in the mononucleosome core particle. *Mol. Cell. Biol.* 2002. 22:6779–6787.
- Hargreaves DC, Crabtree GR. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res.* 2011;21(3):396-420.
- Harvey M., McArthur M.J., Montgomery C.A., Jr Butel J.S., Bradley A., Donehower L.A. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet.* 1993. 5(3):225-9.
- Hasselblatt M., Isken S., Linge A., Eikmeier K., Jeibmann A., Oyen F., Nagel I., Richter J., Bartelheim K., Kordes U., Schneppenheim R., Frühwald M., Siebert R., Paulus W. High-resolution genomic analysis suggests the absence of recurrent genomic alterations other than SMARCB1 aberrations in atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013. 52(2):185-90.

- Henley J. R., Krueger E. W., Oswald B. J. and McNiven, M. A. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J. Cell Biol.* 1998. 141, 85–99.
- Henriksson M. and Luscher B. (1996) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv. Cancer Res.* 1996. 68: 109–182.
- Herskovits J.S., Burgess C.C., Obar R.A., Valle R.B. Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *J. Cell Biol.* 1993. 122:565-78
- Hewlett L.J., Prescott A.R., Watts C. The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *J Cell Biol.* 1994.124(5):689-703.
- Hinshaw J. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000. 16:483-519.
- Hinshaw JE, Schmid SL. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature.* 1995; 374(6518):190-2.
- Hirschhorn J. N., Brown S.A., et al. Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. 1992. *Genes Dev* 6(12A): 2288-98.
- Hogan, C. y P. Varga-Weisz. The regulation of ATP-dependent nucleosome remodelling factors. *Mutat Res.* 2007. 618(1-2): 41-51.
- Hopkins C.R., Miller K., Beardmore J.M. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and epidermal growth factor receptors: a comparison of constitutive and ligand-induced uptake. *J Cell Sci.* 1985. 3:173-86.
- Hornick J.L., Dal Cin P., Fletcher C.D.M. Loss of INI1 expression is characteristic of both conventional and proximal-type epithelioid sarcoma. *Am J Surg Pathol.* 2009. 33:542–550.
- Howes M.T., Kirkham M., Riches J., Cortese K., Walser P.J., Simpson F., Hill M.M., Jones A., Lundmark R., Lindsay M.R., Hernandez-Deviez D.J., et al. Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J Cell Biol.* 2010. 190(4):675-91.
- Huang M, Graves LM. De novo synthesis of pyrimidine nucleotides; emerging interfaces with signal transduction pathways. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(2):321-36.
- Hulsebos T.J., Plomp A.S., Wolterman R.A., Robanus-Maandag E.C., Baas F., Wesseling P. Germline mutation of INI1/SMARCB1 in familial schwannomatosis. *Am J Hum Genet.* 2007. 80(4):805-10.
- Imbalzano A.N., Jones S.N. Snf5 tumor suppressor couples chromatin remodeling, checkpoint control, and chromosomal stability. *Cancer Cell.* 2005. 7(4):294-5.
- Isakoff M.S., Sansam C.G., Tamayo P., Subramanian A., Evans J.A., Fillmore C.M., Wang X., Biegel J.A., Pomeroy S.L., Mesirov J.P., Roberts C.W. Inactivation of the Snf5 tumor suppressor stimulates cell cycle progression and cooperates with p53 loss in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* .2005.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol.* 1983 Jan;153(1):163-8.
- Itoh T., Erdmann K. S., Roux A., Habermann B., Werner H., and De Camilli P. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev. Cell.* 2005. 9, 791–804.
- Jackson E.M., Shaikh T.H., Gururangan S., Jones M.C., Malkin .D., Nikkel S.M., Zuppan C.W., Wainwright L.M., Zhang F., Biegel J.A. High-density single nucleotide polymorphism array analysis in patients with germline deletions of 22q11.2 and malignant rhabdoid tumor. *Hum Genet.* 2007. 122(2):117-27.
- Jackson E.M., Sievert A.J., Gai X., Hakonarson H., Judkins A.R., Tooke L., Perin J.C., Xie H., Shaikh T.H., Biegel J.A. Genomic analysis using high-density single nucleotide polymorphism- based

- oligonucleotide arrays and multiplex ligation-dependent probe amplification provides a comprehensive analysis of INI1/SMARCB1 in malignant rhabdoid tumors. *Clin Cancer Res.* 2009. 15:1923–1930.
- Jang CY, Kim HD, Zhang X, Chang JS, Kim J. Ribosomal protein S3 localizes on the mitotic spindle and functions as a microtubule associated protein in mitosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 ;429(1-2):57-62.
- Janson K., Nedzi L.A., David O., Schorin M., Walsh J.W., Bhattacharjee M., Pridjian G., Tan L., Judkins A.R., Biegel J.A. Predisposition to atypical teratoid/rhabdoid tumor due to an inherited INI1 mutation. *Pediatr Blood Cancer.* 2006. 47(3):279-84.
- Jenuwein T. y Allis C. D. Translating the histone code. *Science.* 2001. 293: 1074-1080.
- Jones M. E. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 1980a. 49: 253–279.
- Jones M. E. The genes for and regulation of the enzyme activities of two multifunctional proteins required for the de novo pathway for UMP biosynthesis in mammals. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* 1980b. 32: 165–182.
- Jones S.M., Howell K.E., Henley J.R., Cao H., McNiven M.A. Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science.* 1998. 279(5350):573-7.
- Joshi S, Braithwaite AW, Robinson PJ, Chircop M. Dynamin inhibitors induce caspase-mediated apoptosis following cytokinesis failure in human cancer cells and this is blocked by Bcl-2 overexpression. *Mol Cancer.* 2011;10:78.
- Judkins A.R., Mauger J., Ht A., Rorke L.B., Biegel J.A. Immunohistochemical analysis of hSNF5/INI1 in pediatric CNS neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2004. 28:644–650.
- Kadoch C, Hargreaves DC, Hodges C, Elias L, Ho L, Ranish J, Crabtree GR. Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat Genet.* 2013 ;45(6):592-601.
- Kaksonen M., Peng H.B., Rauvala H. Association of cortactin with dynamic actin in lamellipodia and on endosomal vesicles. *J Cell Sci.* 2000. 113 Pt 24:4421-6.
- Kalpana G.V., Marmon S., Wang, W., Crabtree G.R. and Goff S.P. (1994). Binding and stimulation of the HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science.*1994. 266:2002-2006.
- Kato H., Honma R., Sanda T., Fujiwara T., Ito E., Yanagisawa Y., Imai J., Okamoto T., Watanabe S. Knock down of hSNF5/Ini1 causes cell cycle arrest and apoptosis in a p53-dependent manner. *BBRC.* 2007. 361:580-585.
- Kaverina I., Krylyshkina O., Small J.V. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J. Cell Biol.* 1999. 146, 1033–1044.
- Kenniston J.A., Lemmon M.A. Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. *EMBO J.* 2010; 29: 3054–67.
- Kerr M.C., Teasdale R.D. Defining macropinocytosis. *Traffic.* 2009. 10(4):364-71.
- Kessels M.M., Engqvist-Goldstein A.E., Drubin D.G., Qualmann B. Mammalian Abp1, a signal-responsive F-actin-binding protein, links the actin cytoskeleton to endocytosis via the GTPase dynamin. *J Cell Biol.* 2001. 153(2):351-66.
- Kim SH, Lee JY, Kim J. Characterization of a wide range base-damage-endonuclease activity of mammalian rpS3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005. 328(4):962-7.
- King MC, Lusk CP, Blobel G. Karyopherin-mediated import of integral inner nuclear membrane proteins. *Nature.* 2006;442(7106):1003-7.

- Kleihues P., Louis D.N., Scheithauer B.W., Rorke L.B., Reifenberger G., Burger P.C., Cavenee W.K. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002. 61(3):215-25;
- Klein D.E., Lee A., Frank D.W., Marks M.S., Lemmon M.A. The pleckstrin homology domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding. *J Biol Chem.* 1998. 273(42):27725-33.
- Klinge S, Hirst J, Maman JD, Krude T, Pellegrini L. An iron-sulfur domain of the eukaryotic primase is essential for RNA primer synthesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2007; 14:875.
- Klochender-Yeivin A., Fiette L., Barra J., Muchardt C., Babinet C., Yaniv M. The murine SNF5/INI1 chromatin remodeling factor is essential for embryonic development and tumor suppression. *EMBO Rep.* 2000. 1(6):500-6.
- Klochender-Yeivin, A., E. Picarsky, and M. Yaniv. Increased DNA damage sensitivity and apoptosis in cells lacking the Snf5/Ini1 subunit of the SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Mol. Cell. Biol.* 2006. 26:2661–2674.
- Koeing J.H, Ikeda K. Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J Neurosci.* 1989. 9:3844-60
- Kohashi K., Oda Y., Yamamoto H., Tamiya S., Oshiro Y., Izumi T., Taguchi T., Tsuneyoshi M. SMARCB1/INI1 protein expression in round cell soft tissue sarcomas associated with chromosomal translocations involving EWS: a special reference to SMARCB1/INI1 negative variant extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Am J Surg Pathol.* 2008. 32(8):1168-74.
- Kordes U., Gesk S., Fruhwald M.C., Graf N., Leuschner I., Hasselblatt M., Jeibmann A., Oyen F., Peters O., Pietsch T., Siebert R., Schneppenheim R. Clinical and molecular features in patients with atypical teratoid rhabdoid tumor or malignant rhabdoid tumor. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010. 49:176–181.
- Kornberg R.D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science.* 1974;184(4139):868-71.
- Kosaka T., Ikeda K. Possible temperature- dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* 1983a. 14:207-25
- Kosaka T., Ikeda K. Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibirets. *J. Cell Biol.* 1983b. 97:499-507.
- Köster M., Frahm T., Hauser H. Nucleocytoplasmic shuttling revealed by FRAP and FLIP technologies. *Curr Opin Biotechnol.* 2005. 16:28-34.
- Kou H, Zhou Y, Gorospe RM, Wang Z. Mms19 protein functions in nucleotide excision repair by sustaining an adequate cellular concentration of the TFIIH component Rad3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(41):15714-9.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007. 128(4):693–705.
- Kozlov M.M. Dynamin: possible mechanism of "Pinchase" action. *Biophys J.* 1999. 77(1):604-16
- Kranenburg O, Verlaan I, Moolenaar WH. Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase. *J Biol Chem.* 1999;274(50):35301-4.
- Kreiger P.A., Judkins A.R., Russo P.A, et al. Loss of INI1 expression defines a unique subset of pediatric undifferentiated soft tissue sarcomas. *Mod Pathol.* 2009. 22:142–150.
- Kreitzer G., Marmorstein A., Okamoto P., Vallee R., Rodriguez-Boulan E. Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat Cell Biol.* 2000. 2(2):125-7.
- Kruchten AE, McNiven MA. Dynamin as a mover and pincher during cell migration and invasion. *J Cell Sci.* 2006; 119:1683–1690.

- Kruger W, Herskowitz I. A negative regulator of HO transcription, SIN1 (SPT2), is a nonspecific DNA-binding protein related to HMG1. *Mol Cell Biol.* 1991. 11(8):4135-46.
- Kruger W, Peterson CL, Sil A, Coburn C, Arents G, Moudrianakis EN, Herskowitz I. Amino acid substitutions in the structured domains of histones H3 and H4 partially relieve the requirement of the yeast SWI/SNF complex for transcription. *Genes Dev.* 1995. 9(22):2770-9.
- Kuge S, Arita M, Murayama A, Maeta K, Izawa S, Inoue Y, Nomoto A. Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol.* 2001;21(18):6139-50.
- Kumari S, Mg S, Mayor S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res.* 2010;20(3):256-75.
- la Cour T, Kiemer L, Mølgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel.* 2004;17(6):527-36.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. 227(5259): 680-5.
- Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell.* 2006; 124:997–1009.
- Lamaze C., Dujeancourt A., Baba T., Lo, C. G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell.* 2001. 7, 661–671.
- Lange A, McLane LM, Mills RE, Devine SE, Corbett AH. Expanding the definition of the classical bipartite nuclear localization signal. *Traffic.* 2010 ;11(3):311-23.
- Lanzetti L, Di Fiore PP. Endocytosis and cancer: an 'insider' network with dangerous liaisons. *Traffic.* 2008;9(12):2011-21.
- Lauder S, Bankmann M, Guzder SN, Sung P, Prakash L, Prakash S. Dual requirement for the yeast MMS19 gene in DNA repair and RNA polymerase II transcription. *Mol Cell Biol.* 1996 ;16(12):6783-93.
- Lee BJ, Cansizoglu AE, Süel KE, Louis TH, Zhang Z, Chook YM. Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell.* 2006;126(3):543-58.
- Lee CH, Kim SH, Choi JI, Choi JY, Lee CE, Kim J. Electron paramagnetic resonance study reveals a putative iron-sulfur cluster in human rpS3 protein. *Mol Cells.* 2002.13(1):154-6
- Lee D., Kim J.W., Seo T., Hwang S.G., Choi E.J., Choe J. SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. *J Biol Chem* 2002; 277:22330-7.
- Lee R.S., Stewart C., Carter S.L., Ambrogio L., Cibulskis K., Sougnez C., Lawrence M.S., Auclair D., Mora J., Golub T.R., Biegel J.A., Getz G., Roberts C.W. A remarkably simple genome underlies highly malignant pediatric rhabdoid cancers. *J Clin Invest.* 2012. 122:2983–2988.
- Lenz M., Morlot S., Roux A. Mechanical requirements for membrane fission: common facts from various examples. *FEBS Lett.* 2009. 583(23):3839-46.
- Lenz M., Prost J., Joanny J.F. Mechanochemical action of the dynamin protein. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 2008. 78(1 Pt 1):011911.
- Leonard M, Song BD, Ramachandran R, Schmid SL. Robust colorimetric assays for dynamin's basal and stimulated GTPase activities. *Methods Enzymol.* 2005;404:490-503.
- Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;132(1):27-42.

- Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Webert H, Wilbrecht C, Mühlenhoff U. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2012 ;1823(9):1491-508.
- Lill R, Mühlenhoff U. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:669-700.
- Lill R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*. 2009;460(7257):831-8.
- Lippincott-Schwartz J. and Patterson G.H. Development and Use of Fluorescent Protein Markers in Living Cells *Science*. 2003. 300: 87-91.
- Liu Y-W., Surka M.C, Schroeter T., Lukiyanchuk V., and Schmid S.L. Isoform and Splice-Variant Specific Functions of Dynamin-2 revealed by Analysis of Conditional Knock-Out Cells .*Molecular Biology of the Cell*. 2008. Vol. 19, 5347–5359.
- Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*. 1992. 70(6):923-35.
- Loidl P. Introduction: assembly, remodeling and modification of chromatin. *Cell Mol Life Sci*. 2001. 58:663-664.
- Lu H, Bilder D. Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*. *Nat Cell Biol*. 2005 ;7(12):1232-9.
- Lu J., Helton T.D., Blanpied T.A., Rácz B., Newpher T.M., Weinberg R.J., Ehlers M.D. Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. *Neuron*. 2007. 55(6):874-89.
- Luger K., Mader A. W., Richmond R. K., Sargent D. F. y Richmond T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997. 389: 251-260.
- Marfori M, Mynott A, Ellis JJ, Mehdi AM, Saunders NF, Curmi PM, Forwood JK, Bodén M, Kobe B. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(9):1562-77.
- Marks B, Stowell MH, Vallis Y, Mills IG, Gibson A, Hopkins CR, McMahon HT. GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature*. 2001;410(6825):231-5.
- Massano J, Regateiro F.S, Januário G., Ferreira A., Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod*. 102. 2006. 67–76.
- Mattheyses AL, Atkinson CE, Simon SM. Imaging single endocytic events reveals diversity in clathrin, dynamin and vesicle dynamics. *Traffic*. 2011; 12(10):1394-406.
- Mayle KM, Le AM, Kamei DT. The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(3):264-81.
- Mayor S., Pagano R.E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007. 8(8):603-12.
- McKenna E.S., Roberts C.W. Epigenetics and cancer without genomic instability. *Cell Cycle*. 2009. 8(1):23-6.
- McKenna E.S., Sansam C.G., Cho Y.J., Greulich H., Evans J.A., Thom C.S., Moreau L.A., Biegel J.A., Pomeroy S.L., Roberts C.W. Loss of the epigenetic tumor suppressor SNF5 leads to cancer without genomic instability. *Mol Cell Biol*. 2008. 28(20):6223-33.
- McKenna E.S., Tamayo P., Cho Y.J., Tillman E.J., Mora-Blanco E.L., Sansam C.G., Koellhoffer E.C., Pomeroy S.L., Roberts C.W. Epigenetic inactivation of the tumor suppressor BIN1 drives proliferation of SNF5-deficient tumors. *Cell Cycle*. 2012. 11(10):1956-65.

- McMahon H.T. and Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin mediated endocytosis. *Mol Cell Biol.* 2011. 12:517-533.
- McNiven M.A., Cao H., Pitts K.R., Yoon Y. The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends Biochem Sci.* 2000. 25(3):115-20.
- McNiven M.A., Kim L., Krueger E.W., Orth J.D., Cao H., Wong T.W. Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol.* 2000b. 151(1):187-98.
- Medina PP, Carretero J, Fraga MF, Esteller M, Sidransky D, Sanchez-Cespedes M. Genetic and epigenetic screening for gene alterations of the chromatin-remodeling factor, SMARCA4/BRG1, in lung tumors. *Genes Chrom Cancer* . 2004. 41:170–177.
- Medjkane S., Novikov E., Versteeg I., Delattre O. The tumor suppressor hSNF5/INI1 modulates cell growth and actin cytoskeleton organization. *Cancer Res.* 2004. 64(10):3406-13.
- Menon M. and Schafer D.A. Dynamin: Expanding Its Scope to the Cytoskeleton. *International Review of Cell and Molecular Biology.* 2013. Volume 302. 187-211 ¿219?
- Miltenberger R. J., Sukow K. A. and Farnham P. J. An E-box-mediated increase in cad transcription at the G1/S-phase boundary is suppressed by inhibitory c-Myc mutants. *Mol. Cell Biol.* 1995. 15: 2527–2535.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008;451(7182):1069-75.
- Mobley B.C., McKenney J.K., Bangs C.D., Callahan K., Yeom K.W., Schneppenheim R., Hayden MG., Cherry A.M., Gokden M., Edwards M.S., Fisher P. G., Vogel H. Loss of SMARCB1/INI1 expression in poorly differentiated chordomas. *Acta Neuropathol.* 2010.120(6):745-53.
- Modena P., Lualdi E., Facchinetti F., Galli L., Teixeira M.R., Pilotti S., Sozzi G. SMARCB1/INI1 tumor suppressor gene is frequently inactivated in epithelioid sarcomas. *Cancer Res.* 2005. 65(10):4012-9.
- Moll UM, Riou G, Levine AJ. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(15):7262-6.
- Morlot S. and Roux A. Mechanics of Dynamin-Mediated Membrane Fission *Annu. Rev. Biophys.* 2013. 42:629–49
- Morlot S., Galli V., Klein M., Chiaruttini N., Manzi J., Humbert F., Dinis L., Lenz M., Cappello G., Roux A. Membrane shape at the edge of the dynamin helix sets location and duration of the fission reaction. *Cell.* 2012. 151(3):619-29.
- Morlot S., Lenz M., Prost J., Joanny J.F., Roux A. Deformation of dynamin helices damped by membrane friction. *Biophys J.* 2010. 99(11):3580-8.
- Morozov A., Lee S.J., Zhang Z.K., Cimica V., Zagzag D., Kalpana G.V. INI1 induces interferon signaling and spindle checkpoint in rhabdoid tumors. *Clin Cancer Res.* 2007. 13(16):4721-30.
- Morozov A., Yung E., Kalpana G.V. Structure-function analysis of integrase interactor 1/hSNF5L1 reveals differential properties of two repeat motifs present in the highly conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 95(3):1120-5.
- Mosammaparast N, Ewart CS, Pemberton LF. A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *EMBO J.* 2002;21(23):6527-38.
- Muchardt C., Sardet C., Bourachot B., Onufryk C., Yaniv M. A human protein with homology to *Saccharomyces cerevisiae* SNF5 interacts with the potential helicase hbrm. *Nucleic Acids Res.* 1995. 23(7):1127-32.

- Muhlberg A.B., Warnock D.E., Schmid S.L. Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J.* 1997. 16:6676-83
- Nagl N.G. Jr, Zweitzig D.R., Thimmapaya B., Beck G.R. Jr, Moran E. The c-myc gene is a direct target of mammalian SWI/SNF-related complexes during differentiation-associated cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2006. 66(3):1289-93.
- Nakashima A, Kawanishi I, Eguchi S, Yu EH, Eguchi S, Oshiro N, Yoshino K, Kikkawa U, Yonezawa K. Association of CAD, a multifunctional protein involved in pyrimidine synthesis, with mLST8, a component of the mTOR complexes. *J Biomed Sci.* 2011;20:24.
- Nakata T., Iwamoto A., Noda Y., Takemura R., Yoshikura H., Hirokawa N. Predominant and developmentally regulated expression of dynamin in neurons. *Neuron.* 1991. 7; 3, 461–469.
- Narayanan R, Leonard M, Song BD, Schmid SL, Ramaswami M. An internal GAP domain negatively regulates presynaptic dynamin in vivo: a two-step model for dynamin function. *J Cell Biol.* 2005. 169(1):117-26.
- Navarro-Sastre A, Tort F, Stehling O, Uzarska MA, Arranz JA, Del Toro M, Labayru MT, Landa J, Font A, Garcia-Villoria J, Merinero B, Ugarte M, Gutierrez-Solana LG, Campistol J, Garcia-Cazorla A, Vaquerizo J, Riudor E, Briones P, Elpeleg O, Ribes A, Lill R. A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *Am J Hum Genet.* 2011;89(5):656-67.
- Neigeborn L. y Carlson M. Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1984. 108: 845-858.
- Netz DJ, et al. Eukaryotic DNA polymerases require an iron-sulfur cluster for the formation of active complexes. *Nat Chem Biol.* 2012; 8:125.
- Newmyer SL, Christensen A, Sever S. Auxilin-dynamin interactions link the uncoating ATPase chaperone machinery with vesicle formation. *Dev Cell.* 2003;4(6):929-40.
- Nikolaev AY, Li M, Puskas N, Qin J, Gu W. Parc: a cytoplasmic anchor for p53. *Cell.* 2003;112(1):29-40.
- Nishino Y., Eltsov M., Joti Y., Ito K., Takata H., Takahashi Y., Hihara S., Frangakis A.S., Imamoto N., Ishikawa T., Maeshima K. Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.* 2012. 31:1644–1653.
- Obar R.A., Collins C.A., Hammarback J.A., Shpetner H.S., Valle R.B. Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature.* 1990. 347:256-61
- Oh P., McIntosh D. P. and Schnitzer J. E. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell Biol.* 1998. 141, 101–114.
- Okazaki Y, Ohno H, Takase K, Ochiai T, Saito T. Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2000;275(46):35751-8.
- Olins A. L. y Olins D. E. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science.* 1974. 183: 330-332.
- Orlichenko L., Huang B., Krueger E., McNiven M.A. (2006) Epithelial growth factor induced phosphorylation of caveolin 1 at tyrosine14 stimulates caveolae formation in epithelial cells. *J Biol Chem.* 2006. 281:4570–4579.
- Ormo, M, Cubitt, AB, Kallio, K, Gross, LA, Tsien, RY and Remington, SJ (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science.* 1996. 273: 1392–1395.

- Orth J.D., Krueger E.W., Cao H., McNiven M.A. The large GTPase dynamin regulates actin comet formation and movement in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002. 99, 167–172.
- Orth J. D. and McNiven M. A. Dynamin at the actin-membrane interface. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003. 15, 31–39.
- Orth J.D., Krueger E.W., Weller S.G., McNiven M.A. A novel endocytic mechanism of epidermal growth factor receptor sequestration and internalization. *Cancer Res.* 2006. 66:3603–3610.
- Orth J.D., McNiven M.A. Get on my back! Rapid receptor internalization through circular dorsal ruffles. 2006. *Cancer Res* 66:11094–11096.
- Oruetxebarria I., Venturini F., Kekarainen T., Houweling A., Zuijderduijn L.M., Mohd-Sarip A., Vries R.G., Hoeben R.C., Verrijzer C.P. P16INK4a is required for hSNF5 chromatin remodeler-induced cellular senescence in malignant rhabdoid tumor cells. *J Biol Chem.* 2004. 279(5):3807-16.
- Oster S. K., Ho C. S., Soucie E. L. and Penn L. Z. The myc oncogene: Marvelously Y Complex. *Adv. Cancer Res.* 2002. 84: 81–154.
- Otto E, McCord S, Tlsty TD. Increased incidence of CAD gene amplification in tumorigenic rat lines as an indicator of genomic instability of neoplastic cells. *J Biol Chem.* 1989, 264(6):3390-6.
- Owen DJ, Wigge P, Vallis Y, Moore JD, Evans PR, McMahon HT. Crystal structure of the amphiphysin 2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J.* 1998;17(18):5273-85.
- Paine, PL, Moore, LC and Horowitz, SB (1975). Nuclear envelope permeability. *Nature.* 1975. 254: 109–114.
- Pal S, Yun R, Datta A, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Kumar J, Tempst P, Sif S. mSin3A/histone deacetylase 2- and PRMT5-containing Brg1 complex is involved in transcriptional repression of the Myc target gene cad. *Mol Cell Biol.* 2003 (21):7475-87.
- Pant S, Sharma M, Patel K, Caplan S, Carr CM, Grant BD. AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. *Nat Cell Biol.* 2009;11(12):1399-410.
- Park RJ, Shen H, Liu L, Liu X, Ferguson SM, De Camilli P. Dynamin triple knockout cells reveal off target effects of commonly used dynamin inhibitors. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 22):5305-12.
- Park, J. H., E. J. Park, H. S. Lee, S. J. Kim, S. K. Hur, A. N. Imbalzano, and J. Kwon. Mammalian SWI/SNF complexes facilitate DNA doublestrandbreak repair by promoting gamma-H2AX induction. *EMBO J.* 2006. 25: 3986–3997.
- Paschal B.M., Shpetner H.S., Valle R.B. MAP 1C is a microtubule-activated ATPase with translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J. Cell Biol.* 1987. 105:1273-82.
- Pelkmans L., Puntener D. and Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science.* 2002. 296, 535–539.
- Pepenella S., Murphy K.J., Hayes J.J. Intra- and inter-nucleosome interactions of the core histone tail domains in higher-order chromatin structure. *Chromosoma.* 2013.
- Peterson C. L., Dingwall A., et al. Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994. 91(8): 2905-8.
- Phelan M.L., Sif S., Narlikar G.J., Kingston R.E. Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell.* 1999. 3(2):247-53.
- Praefcke G.J., McMahon H.T. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004. 5(2):133-47.
- Prendergast F.G. Biophysics of the green fluorescent protein. *Methods Cell Biol.* 1999. 58:1-18

- Pyrzynska B, Pilecka I, Miaczynska M. Endocytic proteins in the regulation of nuclear signaling, transcription and tumorigenesis. *Mol Oncol.* 2009;3(4):321-38.
- Raimondi A., Ferguson S.M., Lou X., Armbruster M., Paradise S., Giovedi S., Messa M., Kono N., Takasaki J., Cappello V., O'Toole E., Ryan T.A., De Camilli P. Overlapping Role of Dynamin Isoforms in Synaptic Vesicle Endocytosis. *Neuron.* 2011. 70(6): 1100–1114.
- Ramachandran R., Schmid S.L. Real-time detection reveals that effectors couple dynamin's GTP-dependent conformational changes to the membrane. *EMBO J.* 2008. 27(1):27-37.
- Ray A, Mir SN, Wani G, Zhao Q, Battu A, Zhu Q, Wang QE, Wani AA. 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.* 2009 ;29(23):6206-19.
- Reardon MA, Weber G. Increased carbamoyl-phosphate synthetase II concentration in rat hepatomas: immunological evidence. *Cancer Res.* 1985;45(9):4412-5.
- Reubold T.F., Eschenburg S., Becker A., Leonard M., Schmid S.L., Vallee R.B., Kull F.J., Manstein DJ. Crystal structure of the GTPase domain of rat dynamin 1. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2005. 102(37):13093-8.
- Reyes J. C., Barra J., et al. Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2alpha). *Embo J.* 1998. 17(23): 6979-91.
- Richmond T. J., Finch J. T., Rushton B., Rhodes D. y Klug A. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature.* 1984. 311: 532-537.
- Rieske P., Zakrzewska M., Piaskowski S., Jaskólski D., Sikorska B., Papierz W., Zakrzewski K., Liberski PP. Molecular heterogeneity of meningioma with INI1 mutation. *Mol Pathol.* 2003. 56(5):299-301.
- Ringstad N., Nemoto Y., De Camilli P. The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997. 94(16):8569-74.
- Rivière Y, Blank V, Kourilsky P, Israël A. Processing of the precursor of NF-kappa B by the HIV-1 protease during acute infection. *Nature.* 1991;350(6319):625-6.
- Roberts C.W., Galusha S.A., McMenemy M.E., Fletcher C.D., Orkin S.H. Haploinsufficiency of Snf5 (integrase interactor 1) predisposes to malignant rhabdoid tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000. 97(25):13796-800.
- Roberts CW, Leroux MM, Fleming MD, Orkin SH. Highly penetrant, rapid tumorigenesis through conditional inversion of the tumor suppressor gene Snf5. *Cancer Cell.* 2002;2(5):415-25.
- Robitaille AM, Robitaille S, Shimobayashi M, Cornu M, Fava LL, Moe S, Prescianotto-Baschong C, Sauer U, Jenoe P, Hall MN: Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis. *Science* 2013, 339:1320–1323.
- Rodriguez-Nieto S, Can˜ada A, Pros E, Pinto AI, Torres-Lanzas J, Lopez-Rios F et al. Massive parallel DNA pyrosequencing analysis of the tumor suppressor BRG1/SMARCA4 in lung primary tumors. *Hum Mut.* 2011. 32: E1999–E2017.
- Romero OA, Sanchez-Céspedes M. The SWI/SNF genetic blockade: effects in cell differentiation, cancer and developmental diseases. *Oncogene.* 2013.
- Rorke L.B., Packer R., Biegel J. Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood. *J Neurooncol.* 1995. 24(1):21–28.
- Rorke LB, Packer RJ, Biegel JA. Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood: definition of an entity. *J Neurosurg.* 1996 ;85(1):56-65

- Rouault TA. Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Dis Model Mech.* 2012 ;5(2):155-64.
- Rout MP, Aitchison JD. Pore relations: nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic exchange. *Essays Biochem.* 2000;36:75-88.
- Roux A., Koster G., Lenz M., Sorre B., Manneville J.B., Nassoy P., Bassereau P. Membrane curvature controls dynamin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010. 107(9):4141-6.
- Rozenblatt-Rosen O., Rozovskaia T., Burakov D., Sedkov Y., Tillib S., Blechman J., Nakamura T., Croce C.M., Mazo A., Canaani E. The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 95(8):4152-7.
- Rudolf J, Makrantonis V, Ingledew WJ, Stark MJ, White MF. The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Mol Cell.* 2006;23(6):801-8.
- Saha, A., J. Wittmeyer, et al. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006. 7(6): 437-47.
- Salim K., Bottomley M.J., Querfurth E., Zvelebil M.J., Gout I., Scaife R., Margolis R.L., Gigg R., Smith C.I., Driscoll PC, Waterfield MD, Panayotou G. Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.* 1996. 15(22):6241-50.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.. *Molecular cloning: a laboratory manual*, "Cold Spring Harbor Laboratory" Cold Spring Harbor, New York. 1989
- Sandvig K, Pust S, Skotland T, van Deurs B. Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23(4):413-20.
- Sandvig K., Olsnes S., Petersen O.W., van Deurs B. Acidification of the cytosol inhibits endocytosis from coated pits. *J Cell Biol.* 1987. 105(2):679-89.
- Sandvig K., Torgersen M.L., Raa H.A., van Deurs B. Clathrin-independent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol.* 2008. 129(3):267-76.
- Sarnowski TJ, Ríos G, Jásik J, Swiezewski S, Kaczanowski S, Li Y, Kwiatkowska A, Pawlikowska K, Koźbiał M, Koźbiał P, Koncz C, Jerzmanowski A. SWI3 subunits of putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes play distinct roles during Arabidopsis development. *Plant Cell.* 2005;17(9):2454-72.
- Sauer G, Körner R, Hanisch A, Ries A, Nigg EA, Silljé HH. Proteome analysis of the human mitotic spindle. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(1):35-43
- Schafer, D. A. Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. *Traffic* 5. 2004. 463–469.
- Schlamp CL, Poulsen GL, Nork TM, Nickells RW. Nuclear exclusion of wild-type p53 in immortalized human retinoblastoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 1997 ;89(20):1530-6.
- Seong KM, Jung SO, Kim HD, Kim HJ, Jung YJ, Choi SY, Kim J. Yeast ribosomal protein S3 possesses a β -lyase activity on damaged DNA. *FEBS Lett.* 2012. 586(4):356-61.
- Seroz T, Winkler GS, Auriol J, Verhage RA, Vermeulen W, Smit B, Brouwer J, Eker AP, Weeda G, Egly JM, Hoeijmakers JH. Cloning of a human homolog of the yeast nucleotide excision repair gene MMS19 and interaction with transcription repair factor TFIIH via the XPB and XPD helicases. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(22):4506-13.
- Serrano M., Lee H., Chin L., Cordon-Cardo C., Beach D., DePinho R.A. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell.* 1996. 85(1):27-37.

- Sévenet N., Lellouch-Tubiana A., Schofield D., Hoang-Xuan K., Gessler M., Birnbaum D., Jeanpierre C., Jouvét A., Delattre O. Spectrum of hSNF5/INI1 somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet.* 1999. 8(13):2359-68.
- Sever S., Muhlberg A.B., Schmid S.L. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature.* 1999. 398(6727):481-6.
- Sharma AK, Pallesen LJ, Spang RJ, Walden WE. Cytosolic iron-sulfur cluster assembly (CIA) system: factors, mechanism, and relevance to cellular iron regulation. *J Biol Chem.* 2010;285(35):26745-51.
- Sheftel A, Stehling O, Lill R. Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 21:302.
- Shpetner H.S. and Vallee R.B. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interaction between microtubules. *Cell.* 1989. 59:421-32
- Sidiropoulos P.N., Mieke M., Bock T., Tinelli E., Oertli C.I., Kuner R., Meijer D., Wollscheid B., Niemann A., Suter U. Dynamin 2 mutations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy highlight the importance of clathrin-mediated endocytosis in myelination. *Brain.* 2012. 135(Pt 5):1395-411.
- Sigismund S., Woelk T., Puri C., Maspero E., Tacchetti C., Transidico P., Di Fiore P.P., Polo S. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005. 102:2760–2765.
- Sigoillot FD, Evans DR, Guy HI: Growth-dependent regulation of mammalian pyrimidine biosynthesis by the protein kinase A and MAPK signaling cascades. *J Biol Chem* 2002, 277:15745–15751.
- Sigoillot FD, Kotsis DH, Masko EM, Bame M, Evans DR, Evans HI: Protein kinase C modulates the up regulation of the pyrimidine biosynthetic complex, CAD, by MAP kinase. *Front Biosci* 2007, 12:3892-3898.
- Sigoillot FD, Kotsis DH, Serre V, Sigoillot SM, Evans DR, Guy HI. Nuclear localization and mitogen-activated protein kinase phosphorylation of the multifunctional protein CAD. *J Biol Chem.* 2005 8;280(27):25611-20.
- Sigoillot FD, Sigoillot SM, Guy HI. Breakdown of the regulatory control of pyrimidine biosynthesis in human breast cancer cells. *Int J Cancer.* 2004;109(4):491-8.
- Singleton M. R. y Wigley D.B. Modularity and specialization in superfamily 1 and 2 helicases. *J Bacteriol.* 2002. 184(7): 1819-26.
- Smith C. L. y Peterson C. L. A conserved Swi2/Snf2 ATPase motif couples ATP hydrolysis to chromatin remodeling. *Mol Cell Biol.* 2005. 25: 5880-5892.
- Smith KA, Gorman PA, Stark MB, Groves RP, Stark GR. Distinctive chromosomal structures are formed very early in the amplification of CAD genes in Syrian hamster cells. *Cell.* 1990. 63(6):1219-27.
- Smith, C. L., R. Horowitz-Scherer, et al. Structural analysis of the yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Nat Struct Biol.* 2003. 10(2): 141-5.
- Snapp EL, Altan N, Lippincott-Schwartz J. Measuring protein mobility by photobleaching GFP chimeras in living cells. *Curr Protoc Cell Biol.* 2003 21: 21.1.
- Sohn, D.H., Lee, K.Y., Lee, C., Oh, J, Chung, H., Jeon, S.H, Seong, R.H. SRG3 interacts directly with the major components of the SWI/SNF chromatin remodeling complex and protects them from proteasomal degradation. *J Biol Chem.* 2007. 282(14):10614-24.
- Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP. Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc).* 2007 Dec;72(13):1439-57.
- Sorre B., Callan-Jones A., Manzi J., Goud B., Prost J., Bassereau P., Roux A. Nature of curvature coupling of amphiphysin with membranes depends on its bound density. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. 109(1):173-8.

- Soulet F., Schmid S. L. and Damke, H. Domain requirements for an endocytosis-independent, isoform-specific function of dynamin-2. *Exp. Cell Res.* 2006. 312, 3539–3545.
- Soulet F, Yarar D, Leonard M, Schmid SL. SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell.* 2005;16(4):2058-67.
- Spencer C.A, Groudine M., Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells, *Adv. Cancer Res.* 56. 1991. 1–48.
- Srinivasan V, Netz DJ, Webert H, Mascarenhas J, Pierik AJ, Michel H, Lill R. Structure of the yeast WD40 domain protein Cia1, a component acting late in iron-sulfur protein biogenesis. *Structure.* 2007;15(10):1246-57.
- Stehling O, Vashisht AA, Mascarenhas J, Jonsson ZO, Sharma T, Netz DJ, Pierik AJ, Wohlschlegel JA, Lill R. MMS19 assembles iron-sulfur proteins required for DNA metabolism and genomic integrity. *Science.* 2012;337(6091):195-9.
- Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ, Wahl GM. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* 1999;18(6):1660-72.
- Stowell M.H., Marks B., Wigge P., McMahon H.T. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol.* 1999. (1):27-32.
- Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 1986;189(1):113-30.
- Suzuki D.T., Grigliatti T., Williamson R. Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. VII. A mutation (para-ts) causing reversible adult paralysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971. 68(5):890-3.
- Sweitzer SM, Hinshaw JE. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell.* 1998;93(6):1021-9.
- Swensen J.J., Keyser J., Coffin C.M., Biegel J.A., Viskochil D.H., Williams M.S. Familial occurrence of schwannomas and malignant rhabdoid tumour associated with a duplication in SMARCB1. *J Med Genet.* 2009. 46(1):68-72.
- Tago K, Tsukahara F, Naruse M, Yoshioka T, Takano K. Regulation of nuclear retention of glucocorticoid receptor by nuclear Hsp90. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;213(2):131-8.
- Takei K., Hauche V., Slepnev V., Farsad K., Salazar M., et al. Generation of coated intermediates of clathrin-mediated endocytosis on protein-free liposomes. *Cell.* 1998. 94:131-41.
- Takei K., McPherson P.S., Schmid S.L., De Camilli P. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature.* 1995. 374(6518):186-90.
- Tanabe K., Takei K. Dynamic instability of microtubules requires dynamin 2 and is impaired in a Charcot-Marie-Tooth mutant. *J Cell Biol.* 2009. 185(6):939-48.
- Tanabe K., Takei K. Dynamin 2 in Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Med Okayama.* 2012. 66(3):183-90.
- Taylor M.D., Gokgoz N., Andrusis I.L., Mainprize T.G., Drake J.M., Rutka J.T. Familial posterior fossa brain tumors of infancy secondary to germline mutation of the hSNF5 gene. *Am J Hum Genet.* 2000. 66(4):1403-6.
- Taylor M.J., Perrais D., Merrifield C.J. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol.* 2011. 9:e1000604.

- Thompson H.M., Cao H., Chen J., Euteneuer U., McNiven M.A. Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion. *Nat. Cell Biol.* 2004. 6, 335–342.
- Thompson H.M., Skop A.R., Euteneuer U., Meyer B.J., McNiven M.A. The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis. *Curr. Biol.* 2002. 12, 2111–2117.
- Tomlinson GE, Breslow NE, Dome J, Guthrie KA, Norkool P, Li S, Thomas PR, Perlman E, Beckwith JB, D'Angio GJ, Green DM. Rhabdoid tumor of the kidney in the National Wilms' Tumor Study: age at diagnosis as a prognostic factor. *J Clin Oncol.* 2005 Oct 20;23(30):7641-5.
- Traut T. W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol. Cell Biochem.* 1994.140: 1 22.
- Tremethick D.J. Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell.* 2007. 128 (4):651-4.
- Trobaugh-Lotrario A.D., Tomlinson G.E., Finegold M.J., Gore L., Feusner J.H. Small cell undifferentiated variant of hepatoblastoma: adverse clinical and molecular features similar to rhabdoid tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2009. 52(3):328-34.
- Tsikitis M., Zhang Z., Edelman W., Zagzag D., Kalpana G.V. Genetic ablation of Cyclin D1 abrogates genesis of rhabdoid tumors resulting from *Ini1* loss. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005. 102:12129-34.
- Turelli P., Doucas V., Craig E., Mangeat B., Klages N., Evans R., Kalpana G. and Trono D. Cytoplasmic Recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication. *Mol Cell .* 2001.7:1245-54.
- Vaid K.S., Guttman J.A., Babyak N., Deng W., McNiven M.A., Mochizuki N., Finlay B.B, Vogl A.W. The role of dynamin 3 in the testis. *J Cell Physiol.* 2007. 210(3):644-54.
- Vallis Y., Wigge P., Marks B., Evans P.R., McMahon H.T. Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol.* 1999. 11;9(5):257-60.
- Van der Blik A.M., Meyerowitz E.M. Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature.* 1991. 351:411-14.
- Van der Blik A.M., Redelmeier T.E., Damke H., Tisdale E.J., Meyerowitz E.M., Schmid S.L. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* 1993. 122:553-63

- Van Wietmarschen N, Moradian A, Morin GB, Lansdorp PM, Uringa EJ. The mammalian proteins MMS19, MIP18, and ANT2 are involved in cytoplasmic iron-sulfur cluster protein assembly. *J Biol Chem.* 2012 Dec 21;287(52):43351-8.
- Vardabasso C., Hasson D., Ratnakumar K., Chung C.Y., Duarte L.F., Bernstein E. Histone variants: emerging players in cancer biology. *Cell Mol Life Sci.* 2013
- Versteeg I., Medjkane S., Rouillard D., Delattre O. A key role of the hSNF5/INI1 tumour suppressor in the control of the G1-S transition of the cell cycle. *Oncogene.* 2002. 21(42):6403-12.
- Versteeg I., Sévenet N., Lange J., Rousseau-Merck M.F., Ambros P., Handgretinger R., Aurias A., Delattre O. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature.* 1998. 394(6689):203-6.
- Vries RG, Bezrookove V, Zuijderduijn LM, Kia SK, Houweling A, Oruetebarria I, Raap AK, Verrijzer CP. Cancer-associated mutations in chromatin remodeler hSNF5 promote chromosomal instability by compromising the mitotic checkpoint. *Genes Dev.* 2005;19(6):665-70.
- Wang W., Côté J., Xue Y., Zhou S., Khavari P.A, Biggar S.R., Muchardt C., Kalpana G.V., Goff S.P., Yaniv M., Workman J.L. and Crabtree G.R (1996) Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J* 15:5370-5382.
- Warnock DE, Hinshaw JE, Schmid SL. Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *J Biol Chem.* 1996;271(37):22310-4.
- Weaver A.M., Karginov A.V., Kinley A.W., Weed S.A., Li Y., Parsons J.T., Cooper J.A. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr. Biol.* 2001. 11, 370–374.
- Weerapana E, Wang C, Simon GM, Richter F, Khare S, Dillon MB, Bachovchin DA, Mowen K, Baker D, Cravatt BF. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature.* 2010 ;468(7325):790-5.
- Wei, X, Henke, VG, Strubing, C, Brown, EB and Clapham, DE (2003). Real-time imaging of nuclear permeation by EGFP in single intact cells. *Biophys J* 84: 1317–1327.
- White MF, Dillingham MS. Iron-sulphur clusters in nucleic acid processing enzymes. *Current opinion in structural biology.* 2011
- Wigge P, Vallis Y, McMahon HT. Inhibition of receptor-mediated endocytosis by the amphiphysin SH3 domain. *Curr Biol.* 1997;7(8):554-60.
- Williams B.O., Remington L., Albert D.M., Mukai S., Bronson R.T., Jacks T. Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53. *Nat Genet.* 1994. 7(4):480-4.
- Wilson B.G, Roberts C.W. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011. 11(7):481-92.
- Wilson DM 3rd, Deutsch WA, Kelley MR. Drosophila ribosomal protein S3 contains an activity that cleaves DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *J Biol Chem.* 1994 ;269(41):25359-64.
- Winston F., Carlson M. Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *Trends Genet.* 1992. 8(11):387-91.
- Wu D.Y., Tkachuk D.C., Roberson R.S., Schubach W.H. The human SNF5/INI1 protein facilitates the function of the growth arrest and DNA damage-inducible protein (GADD34) and modulates GADD34-bound protein phosphatase-1 activity. *Biol Chem.* 2002. 277(31):27706-15.
- Xu D., Farmer A., Collet G., Grishin N.V., Chook Y.M. (2012) Sequence and structural analyses of nuclear export signal in the NESdb database. *Mol Biol Cell* 23(18):3677-93.

- Yeeles JT, Cammack R, Dillingham MS. An iron-sulfur cluster is essential for the binding of broken DNA by AddAB-type helicase-nucleases. *J Biol Chem.* 2009; 284:7746.
- Yoshida K, Blobel G. The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. *J Cell Biol.* 2001;152(4):729-40. Yoshida Y., Kinuta M., Abe T., Liang S., Araki K., Cremona O., Di Paolo G., Moriyama Y., Yasuda T., De Camilli P., Takei K. The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *EMBO J.* 2004. 23(17):3483-91.
- Yu X., Odera S., Chuang C. H., Lu N. and Zhou Z. C. elegans dynamin mediates the signaling of phagocytic receptor CED-1 for the engulfment and degradation of apoptotic cells. *Dev. Cell.* 2006. 10, 743–757.
- Zamanian J.L., Kelly R.B. Intersectin 1L guanine nucleotide exchange activity is regulated by adjacent src homology 3 domains that are also involved in endocytosis. *Mol Biol Cell.* 2003. 14(4):1624-37.
- Zhang EY, Cristofanilli M, Robertson F, Reuben JM, Mu Z, Beavis RC, Im H, Snyder M, Hofree M, Ideker T, Omenn GS, Fanayan S, Jeong SK, Paik YK, Zhang AF, Wu SL, Hancock WS. Genome wide proteomics of ERBB2 and EGFR and other oncogenic pathways in inflammatory breast cancer. *J Proteome Res.* 2013. 12(6):2805-17.
- Zhang Z.K., Davies K.P., Allen J., Zhu L., Pestell R.G., Zagzag D., Kalpana G.V. Cell cycle arrest and repression of cyclin D1 transcription by INI1/hSNF5. *Mol Cell Biol.* 2002. 22(16):5975-88.
- Zheng J., Cahill S.M., Lemmon M.A., Fushman D., Schlessinger J., Cowburn D. Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. *J Mol Biol.* 1996. 255(1):14-21.
- Zuchner S., Noureddine M., Kennerson M., Verhoeven K., Claeys K., De Jonghe P., Merory J., Oliveira S.A., Speer M.C., Stenger J.E., et al., Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot–Marie–Tooth disease. *Nat. Genet.* 2005. 37, 289–294.
- Zurita M, Merino C. The transcriptional complexity of the TFIID complex. *Trends Genet.* 2003;19(10):578-84.