

# **Función de Brd2 en la Coordinación entre Proliferación y Diferenciación en el Sistema Nervioso Central de Vertebrados**

Trabajo realizado en el Departamento de Células Troncales, Reprogramación y Diferenciación Celular, CABIMER, para optar al grado de Doctor en Biología por el Licenciado Pablo García Gutiérrez, siguiendo el programa de doctorado de Biología Molecular y Biomedicina de la Universidad de Sevilla, y bajo la dirección del doctor Mario García Domínguez

Sevilla, Abril de 2013

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1. Proliferación celular y diferenciación</b>	1
1.1.1. La regulación del ciclo celular eucariótico	1
1.1.2. El destino celular se decide en la fase G1 del ciclo celular	6
1.1.3. Función de componentes del ciclo celular en diferenciación	7
1.1.4. Desarrollo del sistema nervioso de vertebrados y diferenciación neuronal	10
<b>1.2. Proteínas BET</b>	18
1.2.1. Familia de proteínas BET	18
1.2.2. Brd2	23
<b>1.3. Objetivos</b>	28
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	31
<b>3. RESULTADOS</b>	58
<b>3.1. Análisis funcional de distintos dominios de la proteína Brd2</b>	58
3.1.1. Las secuencias NLS1 y NLS2 están implicados de manera independiente en la localización nuclear de Brd2	58
3.1.2. Mutaciones en los bromodominios de Brd2 mutada tienen un efecto dominante negativo sobre la incorporación de BrdU	64
3.1.3. Los bromodominios de Brd2 no son suficientes para la asociación de la proteína con los cromosomas mitóticos	66

<b>3.2. Análisis funcional del motivo B</b>	69
3.2.1. El motivo B es necesario para la asociación de las proteínas Brd2, Brd3 y Brd4 con los cromosomas mitóticos	69
3.2.2. El motivo B es necesario para la correcta asociación de la proteína Brd2 con la cromatina en interfase	75
3.2.3. Identificación de proteínas que interaccionen con Brd2 a través de la región que contiene el motivo B	78
3.2.4. El motivo B media la interacción entre proteínas de la familia BET	80
3.2.5. La sobreexpresión del motivo B interfiere con la unión de Brd2 a los cromosomas mitóticos	89
3.2.6. La delección del motivo B afecta a la estimulación del ciclo celular asociada a la sobreexpresión de Brd2	90
3.2.7. La sobreexpresión de Brd2 interfiere con la diferenciación, siendo el efecto dependiente del motivo B	97
<b>3.3. Caracterización funcional de la interacción entre Brd2 y Pleiotrofina</b>	101
3.3.1. Brd2 interacciona con Pleiotrofina	101
3.3.2. Detección de las proteínas Brd2 y Ptn en células P19	109
3.3.3. Ptn neutraliza la interferencia con la diferenciación neuronal mediada por la sobreexpresión de Brd2	112
3.3.4. Expresión de los genes <i>Brd2</i> y <i>Ptn</i> en el tubo neural durante el desarrollo	114
3.3.5. Antagonismo entre Brd2 y Ptn en el tubo neural en desarrollo	117
3.3.6. Ptn interfiere con la interacción de la proteína Brd2 consigo misma y con su asociación con la cromatina	121
<b>4. DISCUSIÓN</b>	126
4.1. Función de Brd2 en los procesos de proliferación y diferenciación celular	126

4.2. El motivo B constituye un dominio de dimerización entre proteínas BET esencial para la función de éstas	135
4.3. Pleiotrofina es un antagonista de Brd2 durante el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados	141
<b>5. CONCLUSIONES</b>	149
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	151

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>1. Etapas del ciclo celular</b>	<b>2</b>
<b>2. La formación del tubo neural</b>	<b>11</b>
<b>3. La migración intercinética nuclear</b>	<b>12</b>
<b>4. Estructuras asociadas al tubo neural</b>	<b>16</b>
<b>5. Esquema de dominios de las proteínas BET</b>	<b>18</b>
<b>6. Proteínas que interactúan con Brd2</b>	<b>24</b>
<b>7. Los niveles de expresión de los genes <i>Brd2</i>, <i>Brd3</i> y <i>Brd4</i> se mantienen tras inducir el proceso de diferenciación neuronal en células P19</b>	<b>59</b>
<b>8. Localización de la proteína Brd2 endógena en células P19</b>	<b>60</b>
<b>9. La pérdida de la región NLS2 no afecta a la localización subcelular de Brd2</b>	<b>61</b>
<b>10. Localización celular de distintos fragmentos de Brd2</b>	<b>62</b>
<b>11. Alineamiento de los motivos conservados A y B en proteínas BET</b>	<b>63</b>
<b>12. Efecto de la sobreexpresión de distintos mutantes de la proteína Brd2 sobre la incorporación de BrdU</b>	<b>65</b>
<b>13. La proteína Brd2 endógena se asocia con los cromosomas mitóticos</b>	<b>67</b>
<b>14. La proteína Brd2 carente de la mitad carboxilo-terminal pero con los bromodominios intactos no se asocia con los cromosomas mitóticos</b>	<b>68</b>
<b>15. La doble mutación Y152K/N428A afecta a la capacidad de Brd2 de interactuar con los cromosomas</b>	<b>69</b>
<b>16. El motivo B de Brd2 está implicado en la asociación de la proteína con los cromosomas mitóticos</b>	<b>70</b>
<b>17. El motivo B está implicado en la asociación de Brd3 y Brd4 con los cromosomas en mitosis</b>	<b>71</b>

<b>18. La proteína Brd2 carente del motivo B recupera la capacidad de asociarse con los cromosomas en las últimas fases de la mitosis</b>	<b>72</b>
<b>19. Las proteínas Brd3 y Brd4 carentes del motivo B también recuperan la capacidad de asociarse con los cromosomas durante las últimas fases de la mitosis</b>	<b>73</b>
<b>20. La proteína Brd2 carente del motivo B no se disocia de los cromosomas mitóticos en presencia del inhibidor de desacetilasas de histonas TSA</b>	<b>74</b>
<b>21. Las proteínas Brd3 y Brd4 carentes del motivo B no se disocian de los cromosomas mitóticos en presencia de TSA</b>	<b>75</b>
<b>22. La asociación de Brd2 con la cromatina requiere la presencia del motivo B</b>	<b>76</b>
<b>23. El motivo B es necesario para la asociación in vitro de Brd2 con un péptido correspondiente a la cola de la histona H3 diacetilada</b>	<b>77</b>
<b>24. Identificación mediante la técnica de dos híbridos de proteínas que interaccionan con Brd2</b>	<b>79</b>
<b>25. Brd2 interacciona con un fragmento de Brd3 en el sistema de dos híbridos</b>	<b>80</b>
<b>26. El motivo B de Brd2 interacciona con el motivo B de Brd3 en el sistema de dos híbridos</b>	<b>81</b>
<b>27. El motivo B media la interacción entre proteínas BET</b>	<b>82</b>
<b>28. La interacción del motivo B de Brd2 consigo mismo es directa</b>	<b>83</b>
<b>29. Interacción de la proteína Brd2 consigo misma y con las proteínas Brd3 y Brd4 en extractos celulares</b>	<b>84</b>
<b>30. Interacciones entre las proteínas Brd3 y Brd4 en extractos celulares</b>	<b>85</b>
<b>31. El motivo B y el primer bromodominio está implicados en la interacción de la proteína Brd2 consigo misma</b>	<b>86</b>
<b>32. El motivo B está implicado en la interacción de Brd2 con Brd3</b>	<b>87</b>
<b>33. El motivo B está implicado en la interacción de la proteína Brd2 sobreexpresada con la proteína Brd2 endógena</b>	<b>87</b>

<b>34. Interacción de la proteína Brd2 consigo misma y con la proteína Brd3 mediante FRET</b>	<b>88</b>
<b>35. La sobreexpresión del motivo B de Brd2 interfiere con la unión de Brd2 a los cromosomas mitóticos</b>	<b>90</b>
<b>36. El motivo B es necesario para el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la expresión de los genes de ciclina D1 y ciclina A2</b>	<b>92</b>
<b>37. El motivo B es necesario para la asociación de Brd2 con los promotores de los genes de ciclina D1 y A2</b>	<b>93</b>
<b>38. El tratamiento de células P19 con ácido retinoico induce una disminución de la expresión de los genes <i>CcnD1</i> y <i>CcnA2</i></b>	<b>94</b>
<b>39. El motivo B es necesario para el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la expresión de los genes de ciclina D1 y A2 en presencia de ácido retinoico</b>	<b>95</b>
<b>40. El motivo B es necesario para el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la estimulación del ciclo celular</b>	<b>96</b>
<b>41. El motivo B es necesario para el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la diferenciación neuronal inducida en células P19</b>	<b>98</b>
<b>42. Expresión de Brd2 en el tubo neural embrionario</b>	<b>99</b>
<b>43. El motivo B es necesario para el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la diferenciación neuronal en embriones</b>	<b>101</b>
<b>44. La proteína Brd2 interacciona con la proteína Ptn en el sistema de dos híbridos</b>	<b>104</b>
<b>45. La proteína Brd2 interacciona con la proteína Ptn <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i></b>	<b>105</b>
<b>46. Ptn interacciona selectivamente con Brd2 a través de una región ácida</b>	<b>106</b>
<b>47. La región ácida de Brd2 no está conservada en otros miembros de la familia</b>	<b>107</b>
<b>48. Ptn interacciona con una región ácida de Brd2 ausente en Brd3 y brd4</b>	<b>108</b>
<b>49. Brd2 interacciona con Ptn y Mdk</b>	<b>108</b>
<b>50. Expresión de Brd2 y Ptn en células P19 tratadas con ácido retinoico</b>	<b>110</b>

<b>51. Fraccionamiento celular y análisis de las proteínas Brd2 y Ptn en células tratadas con ácido retinoico</b>	111
<b>52. Las proteínas Brd2 y Ptn endógenas interaccionan en células P19 tratadas con ácido retinoico</b>	112
<b>53. Ptn anula el efecto de la inhibición de la diferenciación neuronal inducida en células P19 provocado por Brd2</b>	113
<b>54. Expresión de los genes <i>Brd2</i>, <i>Ptn</i> y <i>Mdk</i> en el tubo neural de embriones de pollo</b>	116
<b>55. Ptn anula el efecto de inhibición de la diferenciación neuronal inducida en el tubo neural embrionario provocado por Brd2</b>	118
<b>56. Antagonismo entre Brd2 y Ptn en la migración de la cresta neural</b>	120
<b>57. Ptn desestabiliza la unión de Brd2 a la cromatina</b>	122
<b>58. Ptn interfiere con la interacción de Brd2 consigo mismo</b>	123
<b>59. El motivo B muestra una estructura de tipo <i>coiled coil</i></b>	138

# 1. INTRODUCCIÓN

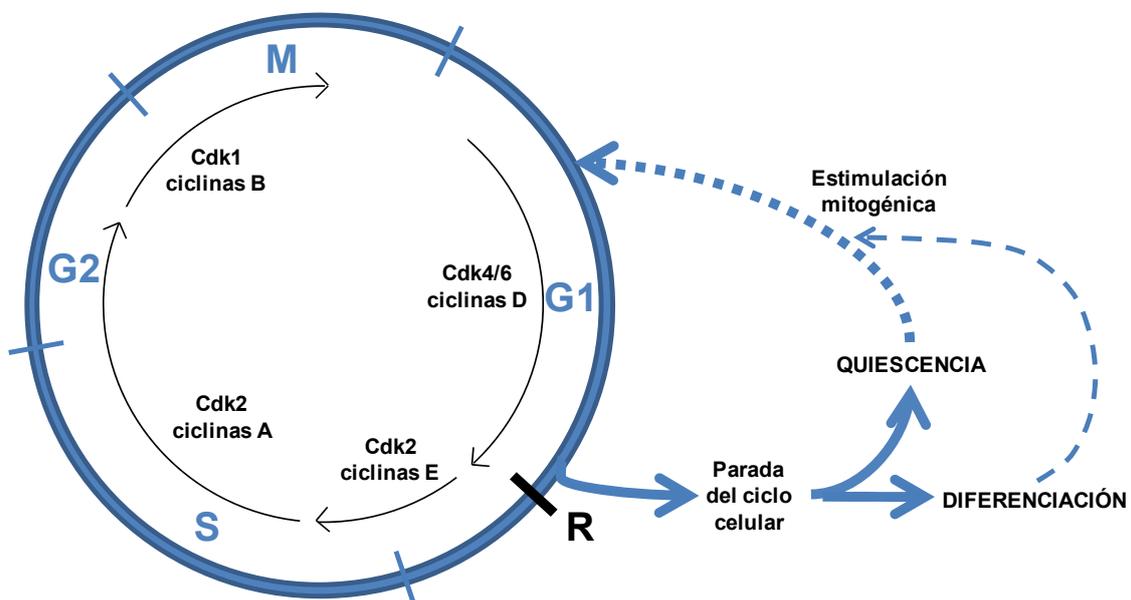
## 1.1. PROLIFERACIÓN CELULAR Y DIFERENCIACIÓN

El desarrollo de los distintos órganos y tejidos que constituyen el cuerpo de los metazoos requiere una adecuada coordinación entre el proceso de proliferación y el proceso de diferenciación celular, por medio del cual las células adquieren características fenotípicas peculiares que le permiten desempeñar funciones especializadas en el organismo. A pesar de la cantidad de información existente acerca de la relación entre los mecanismos de regulación que dirigen la diferenciación celular y elementos clave de la división celular, la compleja interconexión entre ambos procesos a lo largo del desarrollo sigue siendo poco conocida (Hindley y Philpott., 2012). Sin embargo, cada vez se conocen mejor los mecanismos que modelan el destino celular en la generación de estructuras pluricelulares y cómo la desregulación de estos mecanismos puede contribuir a la fisiopatología de multitud de enfermedades, como procesos neurodegenerativos o cancerosos (Wang et al., 2009).

### 1.1.1. La regulación del ciclo celular eucariótico

El ciclo celular implica una serie estereotipada de eventos regulados de forma precisa, necesaria para la adecuada formación de dos células hijas a partir de una célula madre. Más de cuatro décadas de estudio mediante aproximaciones bioquímicas, genéticas y embriológicas han conducido al establecimiento de un esquema común de etapas en el ciclo celular de las células eucarióticas: una fase de síntesis o replicación del DNA (fase S), una fase de reparto equitativo del material genético a las células hijas (fase M o mitosis) y dos fases intermedias, G1 (ó Gap 1) entre la fase M y la fase S y G2 (ó Gap 2) entre la fase S y la fase M, en las que se produce un crecimiento celular y la evaluación y preparación de las condiciones adecuadas para las fases S y M. La sucesión de etapas que constituyen el ciclo celular eucariótico parece a su vez estar regulada y coordinada en gran medida por un mecanismo celular conservado en organismos eucarióticos: la regulación cíclica de la actividad enzimática de Cdks, kinasas de residuos de serina o treonina dependientes de ciclinas (Cross et al., 2011). Las ciclinas implicadas en la regulación del ciclo celular, cuyos niveles en la célula están a su vez regulados por una sucesión periódica y coordinada de eventos de síntesis y degradación, son activadores de las Cdks, responsables en parte de la regulación de éstas. En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, la kinasa Cdc28, regulada por varias ciclinas y otras proteínas, coordina la

progresión del ciclo celular mediante la fosforilación de proteínas diana importantes para la replicación del DNA y el reparto de la información genética a las células hijas (Cross et al., 2011). En el caso de mamíferos, aunque el esquema general de la regulación del ciclo celular tiene varias similitudes con levaduras, la diversificación de los componentes y la especialización funcional de algunos de éstos en función del tipo celular o del estadio de desarrollo, complica su estudio (Cross et al., 2011). Así, en mamíferos, la familia de proteínas Cdk consta de 11 proteínas distintas y se han descrito 14 ciclinas implicadas en el control del ciclo celular, así como varias proteínas más, estructuralmente relacionadas, sin función conocida en la progresión del ciclo (Malumbres y Barbacid, 2005; Satyanarayana y Kaldis, 2009). El análisis genético y bioquímico de distintos factores de estas familias en cultivos celulares ha conducido al desarrollo de un modelo simplificado de regulación del ciclo celular de células de mamífero. Este modelo implica un grupo reducido de Cdks y ciclinas, directamente implicadas en la regulación del ciclo celular: tres Cdks interfásicas (Cdk2, Cdk4 y Cdk6), una mitótica (Cdk1) y nueve ciclinas pertenecientes a cuatro clases (ciclinas A, B, D y E) (Figura 1).



**Figura 1. Etapas del ciclo celular.** Diagrama de las fases del ciclo celular y de los complejos ciclinas/Cdk implicados en su progresión. En determinadas condiciones las células pueden parar el ciclo celular antes del punto de restricción (R) y entrar en quiescencia o diferenciarse. En el caso de células quiescentes y en determinados procesos de diferenciación, una adecuada estimulación mitogénica puede inducir la reanudación del ciclo celular. Adaptado de Blomen y Boonstra, 2007.

Tras la citocinesis (división del citoplasma entre dos células hijas), una célula hija puede continuar el ciclo celular o parar el ciclo y entrar en un estado conocido como “quiescencia” o G0, cuyos parámetros bioquímicos están aún pobremente definidos (Blomen y Boonstra, 2007; Malumbres y Barbacid, 2005). Si la célula va a seguir dividiéndose, progresa a lo largo de la fase G1 hacia la replicación del DNA. La progresión de la fase G1 está regulada por señales mitogénicas que inducen la expresión de las ciclinas D, que activan a las kinasas Cdk4 y/o Cdk6 (Malumbres y Barbacid, 2005). Estas enzimas fosforilan a las proteínas “bolsillo” (pRB, p105 y p130), inhibiendo su actividad represora de genes importantes para la progresión del ciclo celular y la replicación del DNA (Malumbres y Barbacid, 2005). Estas proteínas inhiben la transcripción de estos genes modulando la actividad de factores como las proteínas E2F activadoras (E2F1-3a), que tienen como diana genes que codifican proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular como las ciclinas E, necesarias para la activación de la kinasa Cdk2 y el inicio de la replicación del DNA (Cobrinik, 2005) o las ciclinas A y B (Malumbres y Barbacid, 2005).

Las proteínas “bolsillo” están hipofosforiladas al inicio de la fase G1 y varios de los múltiples sitios de fosforilación que muestran se fosforilan por las kinasas Cdk4 y/o Cdk6 activadas, lo que causa una inhibición parcial de estas proteínas y la activación de la transcripción de genes del ciclo (Cobrinik, 2005). Sin embargo, es la activación de la kinasa Cdk2 al final de G1, mediada por acumulación de las ciclinas E, lo que inactiva irreversiblemente estas proteínas al hiperfosforilarlas en un punto del ciclo celular conocido como “punto de restricción”, a partir del cual, la célula no requiere de estímulos mitogénicos para completar la división celular (Malumbres y Barbacid, 2001). Además de fosforilar las proteínas “bolsillo”, la actividad de la kinasa Cdk2 es importante para el inicio de la fase S, ya que favorece procesos relacionados con la replicación del DNA, como la carga de proteínas MCM en los orígenes de replicación así como para otros procesos, como la reparación del DNA o la duplicación y maduración del centrosoma (Malumbres y Barbacid, 2005). Una vez la célula entra en fase S, las ciclinas E se degradan rápidamente y la kinasa Cdk2 interacciona con la Ciclina A2 (Ciclina A1 en la línea germinal), que se acumula durante la fase S. Este nuevo complejo fosforila numerosas proteínas y parece ser requerido para la terminación de la replicación del DNA y la entrada en la fase G2. Al final de la fase S, las ciclinas A se asocian también con la kinasa Cdk1, que tiene sustratos en común con la kinasa Cdk2, y durante la fase G2, las ciclinas A se degradan y las ciclinas B se acumulan, formándose así complejos entre la kinasa Cdk1 y las ciclinas B, que regulan varios procesos durante la transición de G2 a M y la progresión de la mitosis. De

hecho, estos complejos fosforilan decenas de proteínas y regulan procesos como la condensación de la cromatina, la rotura de la envoltura nuclear, la fragmentación del aparato de Golgi o la separación de los centrosomas (Malumbres y Barbacid, 2005). Finalmente, la degradación de las ciclinas B, regulada por el complejo promotor de la anafase (APC), es requerida para completar la mitosis de forma adecuada (Lindqvist et al., 2009). Dicho complejo continúa promoviendo la degradación de las ciclinas B hasta la siguiente fase S, cuando se inactiva por fosforilación mediada por el complejo ciclinas A/Cdk2 y por interacción con el inhibidor Emi1 (Lindqvist et al., 2009).

Además de la regulación de la actividad de las Cdks por las ciclinas, se ha propuesto que los complejos Cdk/ciclina requieren para su activación la fosforilación mediada por el complejo CAK, y que pueden inactivarse mediante fosforilación por las kinasas Wee1 y Myt1, o a través de la interacción con proteínas CKI (*Cdk kinase inhibitors*) (Kaldis, 1999). Se han descrito dos familias de CKIs: las proteínas INK4 (p16, p15, p18 y p19) responsables de la inhibición preferente de las kinasas Cdk4 y Cdk6, y la familia Cip/Kip, compuesta por las proteínas p21, p27 y p57, que inhiben preferentemente las kinasas Cdk2 y Cdk1 (Blomen y Boonstra, 2007). Curiosamente, a concentraciones fisiológicas, las CKIs p21 y p27 favorecen la formación de complejos de Cdk4 y Cdk6 activos (Sherr y Roberts, 1999). La expresión de las CKIs de la familia INK4 desplaza a las proteínas p21 y p27 de los complejos de Cdk4 y Cdk6 activos, inhibiéndolos y liberando las proteínas p21 y p27 para la inhibición del complejo ciclinas E/Cdk2 (Sherr y Roberts, 1999).

A pesar de la aceptación general de este esquema como marco de referencia en el estudio de la regulación del ciclo celular en mamíferos, ha sido revisado y cuestionado durante la última década en base al análisis del efecto de la pérdida de uno o varios componentes en ratones (Malumbres y Barbacid, 2009; Satyanarayana y Kaldis, 2009). Se han generado ratones *knockout* y *knock in* observándose que la pérdida de componentes que se creían esenciales como Cdk2, Cdk4, Cdk6, Ciclina A1, Ciclina B2, Ciclina D1, Ciclina D2, Ciclina D3, Ciclina E1 y Ciclina E2 no afecta a la viabilidad y sólo conduce a fenotipos menores, como defectos hematopoyéticos en el caso de pérdida de la kinasa Cdk6 (Malumbres et al., 2004) o defectos en el desarrollo de linfocitos T en ausencia de la Ciclina D3 (Sicinska et al., 2003). El análisis de mutantes dobles y triples ha puesto de manifiesto la existencia de un fenómeno de compensación en el que la ausencia de algún componente puede suplirse por otros. Por ejemplo, la pérdida de cualquier ciclina D no tiene efecto en la viabilidad de los ratones, pero un mutante que carece de las tres ciclinas D muere en estadio 16.5 dpc de desarrollo (Kozar et al., 2004). Asimismo, la pérdida de Cdk4 o Cdk6 no tiene un

efecto drástico en la viabilidad, pero la pérdida conjunta de las dos provoca letalidad embrionaria, probablemente debido a una anemia severa por defectos en la hematopoyesis (Malumbres et al., 2004). De esta manera, la diversificación de los componentes regulatorios del ciclo celular en mamíferos ha permitido la especificación funcional de dichos componentes en el desarrollo de tejidos, tipos celulares o procesos concretos, dando lugar a fenómenos de redundancia funcional y compensación en caso de pérdida de algunos factores (Malumbres y Barbacid, 2005). Así, la pérdida de Cdk4 se compensa por Cdk6 y Cdk2, la de Cdk6 por Cdk4, la pérdida de Cdk2 por Cdk1 y Cdk4 y en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs), la pérdida conjunta de Cdk4, 6 y 2 se puede ver compensada por Cdk1, la única de las cuatro Cdk canónicas que es esencial (embriones sin Cdk1 mueren antes de alcanzar la fase de blastocisto) para la proliferación de MEFs (Santamaria et al., 2007). Aunque las ciclinas D activan preferentemente las kinasas Cdk4 y Cdk6, y las ciclinas E la kinasa Cdk2, la kinasa Cdk1 puede activarse por todas ellas en ausencia de las Cdk interfásicas y dirigir la progresión del ciclo celular (Santamaria et al., 2007). Sin embargo, ninguna de las Cdk interfásicas puede compensar la pérdida de la kinasa Cdk1 (Santamaria et al., 2007). Por ello, aunque la pérdida de algunas ciclinas se pueda compensar parcialmente por otras, es esencial para la viabilidad del ratón que haya al menos una ciclina D, la Ciclina A2, al menos una ciclina E y la ciclina B1 (Satyanarayana y Kaldis, 2009). A su vez, se requiere al menos una de las dos Cdk reguladas por las ciclinas D (Cdk4 o Cdk6) y la Cdk mitótica (Cdk1). Esta idea del mínimo esencial requerido para la proliferación de células de mamífero ha conducido al modelo del “ciclo celular esencial”, con una Cdk (Cdk1) y varias ciclinas como componentes suficientes para la regulación de la proliferación en varios tipos celulares (Malumbres y Barbacid, 2009). Sin embargo, la pérdida de cualquiera de los otros componentes del “ciclo celular clásico” tiene consecuencias fenotípicas menores: la pérdida de Cdk2 o Cdk4 provoca esterilidad, tamaño corporal reducido y defectos en la proliferación de progenitores neuronales (Cdk2) o de células beta pancreáticas (Cdk4) (Berthet et al., 2003; Ortega et al., 2003; Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999); la pérdida de Cdk6 provoca hipoplasia de timo e hígado y defectos hematopoyéticos (Malumbres et al., 2004); la pérdida de la Ciclina D1 provoca un tamaño corporal reducido, defectos neurológicos y de desarrollo de las glándulas mamarias (Fantl et al., 1995; Sicinski et al., 1995), y la pérdida de la Ciclina D2 defectos en el desarrollo del sistema inmunitario, en el desarrollo cerebelar y en la neurogénesis en adultos (Huard et al., 1999; Kowalczyk et al., 2004; Sicinski et al., 1996). Por lo tanto, estas observaciones han llevado a una transición del modelo de “ciclo celular clásico” a un modelo más complejo de “ciclos celulares especializados” en distintos tipos celulares y

procesos del desarrollo embrionario, así como en la vida adulta de los vertebrados (Malumbres y Barbacid, 2009).

### **1.1.2. El destino celular se decide en la fase G1 del ciclo celular**

Tras la división de una célula animal, las células hijas pueden iniciar una nueva ronda de división, diferenciarse o parar el ciclo celular y entrar en un estado de quiescencia o G0. Tanto la diferenciación celular, proceso mediante el cual una célula adquiere un fenotipo especializado que le permitirá realizar funciones específicas en el organismo, como la quiescencia, se asocian con una parada del ciclo (Blomen y Boonstra, 2007). Una gran proporción de las células del organismo adulto permanecen en un estado de parada de ciclo que es reversible y, bajo estímulos adecuados, pueden volver a entrar en el ciclo celular y dividirse (Blomen y Boonstra, 2007). Sin embargo, tras el proceso de diferenciación, otras células altamente especializadas como la mayor parte de las neuronas, interrumpen el ciclo celular irreversiblemente (Blomen y Boonstra, 2007). A su vez, otras células no diferenciadas se mantienen quiescentes en poblaciones locales estables de células troncales adultas, por lo que los procesos de quiescencia y diferenciación, aun estando estrechamente relacionados son procesos claramente diferenciables (Blomen y Boonstra., 2007). Las células quiescentes se han asociado con un metabolismo basal reducido, un menor tamaño y con la capacidad de reiniciar el ciclo bajo estímulos mitogénicos (Blomen y Boonstra, 2007; Yusuf y Fruman, 2003), mientras que muchas células diferenciadas son post-mitóticas, altamente especializadas y en algunos casos se asocian con una alta actividad metabólica (Blomen y Boonstra, 2007). Sin embargo, como se comentó anteriormente, algunas células diferenciadas pueden reactivar el ciclo celular, como los miotubos esqueléticos estimulados con suero *in vitro* (Tiainen et al., 1996).

Aunque la quiescencia no lleve necesariamente a la diferenciación (Blomen y Boonstra, 2007) y algunos tipos celulares diferenciados puedan reiniciar el ciclo celular (Tiainen et al., 1996), ambos procesos implican una parada del ciclo celular en la fase G1 (Figura 1). En ambos casos, la progresión del ciclo celular se interrumpe antes del punto de restricción (Sage et al., 2000), y se ha propuesto que es en la fase G1, cuando la célula es sensible a estímulos mitogénicos y de diferenciación, cuando se determina el destino celular (Blomen y Boonstra, 2007; Cremisi et al., 2003; Drayson et al., 2001). Se ha propuesto que el punto de restricción está regulado principalmente por la inactivación de las proteínas “bolsillo” (pRb, p105 y p130) (Sage et al., 2000). Como se comentó previamente, el efecto negativo en la transcripción de genes del

ciclo mediado por las proteínas “bolsillo” se inhibe por fosforilación de éstas, proceso que parece iniciarse por las kinasas Cdk4 y Cdk6 activas (Malumbres y Barbacid, 2005). Por lo tanto, dos de los marcadores moleculares más habituales de la quiescencia son la disminución del nivel de ciclinas D (Boonstra, 2003) y la presencia de pRb defosforilada (Ezhevsky et al., 2001). En este sentido, se ha observado una acumulación de proteína p130, que interacciona con proteínas E2F represoras como E2F3 e inhibe la transcripción de genes del ciclo, en células quiescentes (Mayol et al., 1998; Smith et al., 1996). Por otro lado, se ha descrito la acumulación de p27 y p21 durante la diferenciación de la mayor parte de los tipos celulares (Blomen y Boonstra, 2007; Durand et al., 1997; Zezula et al., 2001) y en varios tipos celulares quiescentes, como en células T de la sangre (Sherr y Roberts, 1995) o en fibroblastos (Coats et al., 1996). p21 también se acumula en otros tipos celulares, como células troncales hematopoyéticas (Cheng et al., 2000), donde se ha implicado tanto en la quiescencia como en la diferenciación celular (Hsieh et al., 2000).

A pesar de la existencia de elementos comunes entre los procesos de proliferación, quiescencia y diferenciación, y de que en algunos casos, como en células eritroides, se active la diferenciación al inducir la parada del ciclo (Matushansky et al., 2000), estos procesos son distinguibles. De hecho, en cultivos celulares, la falta de suero, la pérdida de adhesión del cultivo o la confluencia del cultivo pueden provocar la quiescencia sin inducir necesariamente la diferenciación a tipos celulares específicos (Coller et al., 2006). Además, en algunos casos, la parada de ciclo celular impide a su vez la diferenciación, como en células del epitelio intestinal (Quaroni et al., 2000), y en muchos casos, como en precursores eritroides, de queratinocitos o de oligodendrocitos, una parada de ciclo inducida por expresión de CKIs no es suficiente para inducir diferenciación (Harvat et al., 1998; Tamir et al., 2000; Tang et al., 1999), aunque en otros casos la sobreexpresión de CKIs se ha asociado con la expresión de marcadores de diferenciación (Erhardt et al., 1998; Matsumura et al., 1997).

### **1.1.3. Función de componentes del ciclo celular en diferenciación**

La adecuada coordinación entre parada del ciclo celular y diferenciación terminal requiere una estrecha interacción funcional entre las vías que inducen la diferenciación y la maquinaria que regula la progresión del ciclo. De hecho, la desregulación de factores del ciclo se ha relacionado con defectos en la diferenciación y/o en la supervivencia de células diferenciadas en varios modelos, como en neuronas, queratinocitos o adipocitos (revisado en Miller et al., 2007). La evidencia

creciente del papel que desempeñan componentes fundamentales del ciclo celular en el proceso de diferenciación, con independencia de su función en el ciclo, ha conducido a una revisión de la supuesta especificidad funcional de estos factores en la regulación de la proliferación (Budirahardja y Gönczy, 2009; Hindley y Philpott, 2012; McClellan y Slack, 2006; Miller et al., 2007).

La primera evidencia de funciones específicas de factores del ciclo en diferenciación se obtuvo a partir de la observación de que ratones carentes de algunas de estas proteínas mostraban fenotipos asociados a defectos específicos en diferenciación. Por ejemplo, la falta de Ciclina D1 se ha asociado a defectos en el desarrollo de la retina, defectos neurológicos y en la formación de lóbulos alveolares a partir del epitelio mamario (Fantl et al., 1995; Sicinsky et al., 1995). La falta de Ciclina D2 provoca un reducido número de células de los gránulos y la casi ausencia total de neuronas esteladas en el cerebelo (Huard et al., 1999), así como defectos en la neurogénesis adulta (Kowalczyk et al., 2004). La falta de Cdk6 provoca defectos hematopoyéticos relacionados con problemas en la expansión de compartimentos diferenciados más que con defectos en la proliferación de precursores hematopoyéticos tempranos (Malumbres et al., 2004). La falta de p27 se ha asociado con defectos en la migración radial y en la diferenciación de neuronas en la corteza cerebral (Kawauchi et al., 2006; Nguyen et al., 2006). La falta de p21 y p57 se ha asociado con defectos en el proceso de diferenciación muscular a miotubos (Zhang et al., 1999). La falta de p57 se ha asociado con un defecto en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas (Joseph et al., 2003), con defectos neurológicos y osteogénicos (Takahashi et al., 2000) y con defectos gastrointestinales (Yan et al., 1997). La ausencia de pRb se ha asociado con un defecto en la diferenciación y la supervivencia neuronal en los ganglios sensoriales y el sistema nervioso central, así como con defectos hematopoyéticos (Lee et al., 1994). La ausencia de la proteína p107 se ha relacionado con un defecto en la diferenciación de los progenitores neuronales (Vanderluit et al., 2007). La falta de la proteína p130 se ha asociado con defectos en el número de neuronas en la médula espinal y los ganglios de la raíz dorsal, así como en el número de miocitos en el miotomo (LeCouter et al., 1998).

Además del efecto específico observado en algunos eventos de diferenciación en ausencia de algunos elementos reguladores del ciclo, estudios genéticos y bioquímicos han evidenciado un papel activo de algunos de ellos en procesos de diferenciación celular. Por ejemplo, se ha propuesto que la Ciclina D1 inhibe por interacción directa al factor de transcripción C/EBP $\beta$ , importante en la diferenciación de preadipocitos, de manera independiente a su interacción con Cdks (Lamb et al.,

2003). A su vez, la Ciclina D1 inhibe también al factor de transcripción PPAR $\gamma$ , implicado también en la adipogénesis, y recluta desacetilasas de histonas a elementos del DNA regulados por dicho factor (Fu et al., 2005). Curiosamente, tanto factores E2F activadores como Cdk4 promueven la expresión de PPAR $\gamma$ , estableciéndose una interacción funcional según la cual la adipogénesis requiere en primer lugar la activación de Cdk4 y factores E2F para la expresión de factores de transcripción adipogénicos, y en segundo lugar la inhibición de la Ciclina D1 para la activación de PPAR $\gamma$  (Caldon et al., 2010). Asimismo, se ha descrito la regulación mediada por Ciclina D1 de otros factores de transcripción implicados en la diferenciación, como v-Myb (Ganter et al., 1998), BETA2/NeuroD (Ratineau et al., 2002), MyoD (Skapek et al., 1995), E2A (Chu et al., 2001) y los receptores de andrógenos y estrógenos (Neuman et al., 1997; Reutens et al., 2001). Otras ciclinas se han relacionado también con la regulación de factores de transcripción, como la Ciclina D3 con la activación de PPAR $\gamma$  (Sarruf et al., 2005) o la represión del factor hematopoyético Runx1 (Peterson et al., 2005), o la Ciclina D2 con la regulación del factor miogénico MyoD (Skapek et al., 1995). A su vez, algunas Cdk se han implicado en la regulación de factores transcripcionales específicos mediante su fosforilación, como la regulación negativa mediada por Cdk2 del factor Cdx2, importante para la diferenciación de células intestinales (Gross et al., 2005), o la inhibición de MyoD por Cdk4 (Zhang et al., 1999). Los factores inhibidores de las kinasas Cdk de la familia Cip/Kip también se han relacionado con la regulación de procesos específicos en varios modelos de diferenciación celular. Por ejemplo, se ha propuesto que la proteína p27 tiene un papel en la diferenciación neuronal independiente de su papel en el ciclo, estabilizando el factor neurogénico Neurogenina-2 (Nguyen et al., 2006), así como en la migración de varios tipos celulares, como neuronas de la corteza cerebral o células endoteliales (Goukassian et al., 2001; Nguyen et al., 2006). Curiosamente, p57 y p21 se han implicado también en la migración celular, y las tres proteínas Cip/Kip actúan a distintos niveles de la vía de las proteínas Rho, implicada en la reorganización del citoesqueleto (Besson et al., 2004; Tanaka et al., 2002; Yokoo et al., 2003). Otras proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular con papeles específicos en la diferenciación son las proteínas “bolsillo”, clásicamente asociadas al control de la transición de G1 a S, pero recientemente implicadas también en reparación del DNA, apoptosis o diferenciación (Korenjak y Brehm, 2005). Por ejemplo, se ha propuesto que la proteína pRb hipofosforilada puede interactuar con factores de transcripción como C/EBP- $\beta$ , NPR/B o MyoD y favorecer la inducción de la diferenciación mieloide, neuronal y muscular respectivamente (Lipinski y Jacks, 1999). A su vez, la proteína

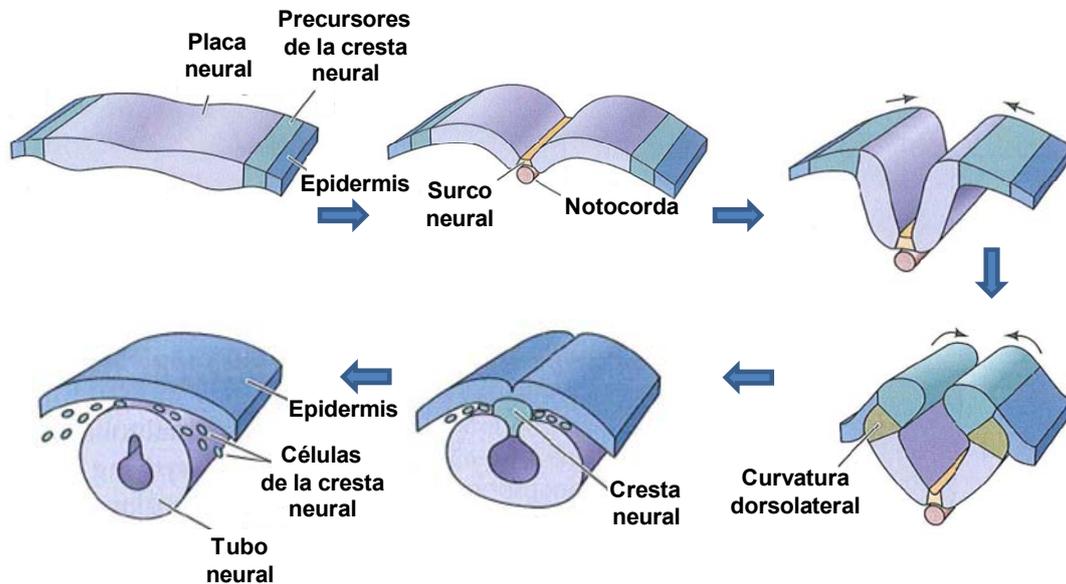
p107 interacciona con el factor de transcripción NeuroD, favoreciendo la diferenciación de células pituitarias (Batsche et al., 2005).

#### **1.1.4. Desarrollo del sistema nervioso de vertebrados y diferenciación neuronal**

El sistema nervioso de vertebrados se subdivide en dos grupos estructurales diferenciados en su origen embriológico: el sistema nervioso central (SNC), compuesto por el encéfalo y la médula espinal y el sistema nervioso periférico, compuesto por los nervios craneales y espinales y por los ganglios periféricos. Ambos grupos de estructuras derivan en última instancia del ectodermo. En el desarrollo embrionario temprano, una porción del ectodermo dorsal (el llamado ectodermo neural) se especifica para dar lugar a la placa neural, constituida por células de morfología columnar. En un proceso conocido como neurulación, la placa neural da lugar al tubo neural, del que deriva el SNC. En la parte más dorsal del tubo neural se distingue una población de células con capacidad de autorenovación y un extraordinario potencial de migración y diferenciación que originan la cresta neural, de la que derivan el sistema nervioso periférico y otras estructuras.

Durante el desarrollo embrionario temprano el tubo neural se forma por invaginación de un surco longitudinal en la línea media de la placa neural (surco neural), seguido de la curvatura de dicha placa en torno al surco neural y el posterior cierre en la línea media dorsal (Figura 2). De esta manera se forma una estructura cilíndrica separada del ectodermo superficial, compuesta originalmente por una única capa de células epiteliales que conforman el neuroepitelio. Todas las neuronas y células de la macroglía del SNC derivan de dicho neuroepitelio, cuyas células tienen propiedades de células troncales como la capacidad de autorenovación y cierto grado de pluripotencia (Yamashita, 2012). Aunque una tinción nuclear del neuroepitelio revela la presencia de núcleos celulares dispersos a distintos niveles, dicha estructura está constituida por una única capa de células polarizadas cuyos núcleos se distribuyen a lo largo del eje apico-basal, por lo que se trata de un monoepitelio pseudoestratificado (Chenn et al., 1998). Estas células contactan entre sí a través de distintos tipos de uniones especializadas hacia el lado apical, donde también contactan con el lumen central o ventrículo (Schoenwolf y Kelley, 1980). A nivel basal, la conexión entre las células es más laxa y menos especializada, y éstas conectan con la lámina basal del neuroepitelio (Rodríguez-Boulan y Nelson, 1989). La apariencia

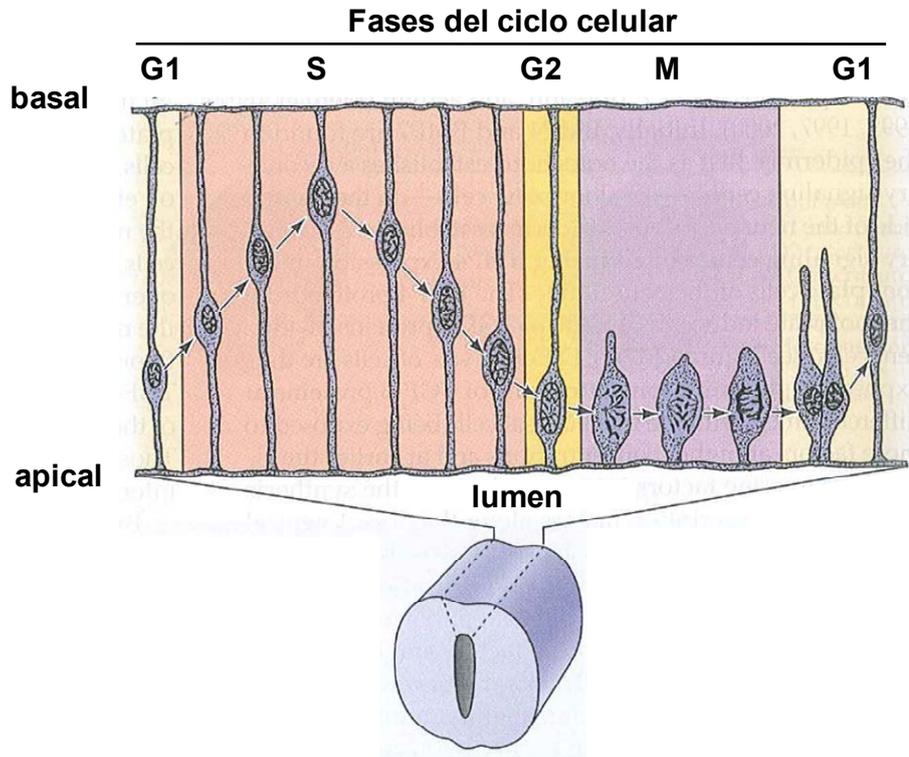
pseudoestratificada del neuroepitelio tiene como causa el movimiento en el eje apico-basal del núcleo de estas células acoplado a la progresión del ciclo celular, fenómeno conocido como migración intercinética nuclear (Chenn y McConnell, 1995).



**Figura 2. La formación del tubo neural.** Etapas en la formación del tubo neural embrionario. Adaptado de Gilbert, 2006.

Como consecuencia de este fenómeno, la mayor parte de las mitosis se observan sólo en la porción más apical del neuroepitelio (hacia la luz del tubo), mientras que los núcleos de células en fase S se localizan preferentemente en la zona más basal (revisado en Götz y Huttner, 2005). Así, el núcleo de estas células se mueve tras la mitosis del polo apical al basal, donde tiene lugar la replicación del DNA, para volver en G2 al polo apical, donde se divide (Figura 3). A pesar de que existe mucha información acerca de componentes del citoesqueleto y otras proteínas implicadas en la regulación de esta migración, y se han descrito defectos asociados a la perturbación de este proceso, las causas, la regulación y las consecuencias en el destino de las células neuroepiteliales de la migración intercinética nuclear aún no han sido esclarecidas por completo (Willardsen y Link, 2011). En el tubo neural se distinguen dos estructuras mediales constituidas por células postmitóticas que no contribuyen a la neurogénesis dentro del tubo, pero que constituyen centros de señalización importantes para el patrón territorial de neuronas en el tubo neural: la placa del techo, en la parte más dorsal y la placa del suelo, en la parte más ventral.

Las células neuroepiteliales, con capacidad de auto-renovación son el origen de neuronas y macroglía (la microglía deriva de precursores hematopoyéticos) (Kessarar et al., 2008). La formación de neuronas, o neurogénesis, en distintas áreas del tubo neural está coordinada espacio-temporalmente.



**Figura 3. La migración intercinética nuclear.** Esquema de la relación entre la fase del ciclo celular y la localización apico-basal del núcleo de células neuroepiteliales. Adaptado de Gilbert, 2006.

Así, en el tubo neural espinal, se inicia en la región ventral con anterioridad a la dorsal, y en el desarrollo del cerebro o del cerebelo, las neuronas de las capas más externas se originan después que las de las capas más internas (McConnell, 1988). Con la generación de las primeras poblaciones neuronales, el neuroepitelio da lugar a una estructura compartimentalizada en la que se distinguen dos regiones fundamentales: una zona que da hacia el ventrículo o luz del tubo neural, llamada zona ventricular, y otra más externa llamada manto, donde migran los progenitores que abandonan el ciclo celular para diferenciarse (Figura 4). Entre ambas capas, se puede distinguir a su vez una capa de células postmitóticas en proceso de migración aunque aún no expresan marcadores de diferenciación terminal, la zona

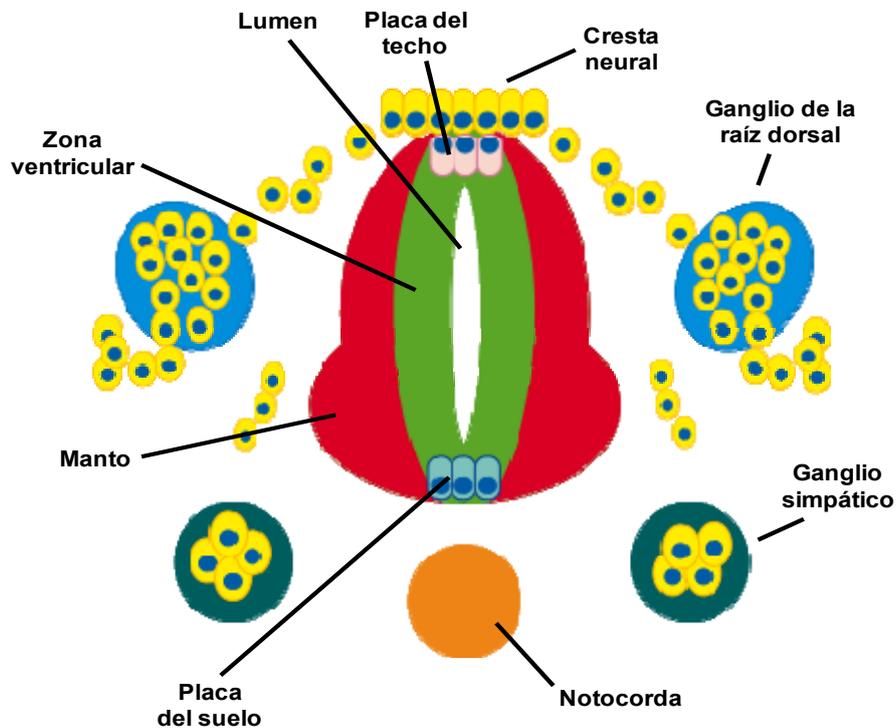
subventricular. A medida que avanza el desarrollo, el manto se engruesa por la aportación de nuevas neuronas desde la zona ventricular, cuyo tamaño se reduce progresivamente. En algunas estructuras derivadas del tubo neural, como el cerebro o el cerebelo, esta estructura en tres capas se complica para dar lugar a estructuras más complejas con varias capas diferenciadas. A su vez, en el tubo neural, un gradiente dorso-ventral de señales extracelulares genera diferentes zonas a partir de las cuales se generarán diversos tipos neuronales (Lewis, 2006). Por ejemplo, a nivel de la médula espinal, sólo células neuroepiteliales de la zona ventricular del tercio ventral darán lugar a motoneuronas, mientras que los progenitores más dorsales darán lugar a diversos tipos de interneuronas (revisado en Lewis, 2006). A este nivel, se ha observado que estructuras ventrales como la notocorda en primer lugar y la placa del suelo en segundo lugar, secretan la proteína Sonic hedgehog (Shh), y que estructuras dorsales como el ectodermo en primer lugar y la placa del techo posteriormente secretan proteínas BMP. De esta manera se establece un gradiente dorso-ventral de señales que regulan una compartimentación funcional del tubo neural (revisado en Lewis, 2006). Teniendo en cuenta que la diferenciación terminal de los progenitores neuronales requiere la parada del ciclo celular en la fase G1, la interacción entre los factores neurogénicos y la maquinaria que regula la progresión del ciclo celular resulta esencial para la adecuada generación de poblaciones neuronales funcionales (Swiss y Casaccia, 2010; Willardsen y Link, 2011). Se ha descrito que los progenitores neuronales pueden dividirse de manera asimétrica generando dos progenitores neuronales (división proliferativa) o dos neuronas (división neurogénica) o de manera asimétrica generando un progenitor y una neurona (también conocida como división neurogénica) (Willardsen y Link, 2011). A su vez, la división asimétrica puede tener lugar sin que ninguna de las células hijas pare el ciclo celular, generando progenitores con diferente restricción de linaje (Willardsen y Link, 2011). El fenómeno mejor caracterizado implicado en la determinación del destino de células neuroepiteliales es la partición de factores determinantes en la citocinesis (Willardsen y Link, 2011). Por ejemplo, se ha propuesto que, si bien en vertebrados el plano de división no se correlaciona tan exactamente con el tipo de división como en invertebrados, la segregación asimétrica del dominio apical sí se correlaciona con la generación de neuronas (Alexandre et al., 2010; Kosodo et al., 2004). Además se ha puesto de manifiesto que varias proteínas, como EGFR o TRIM32, se distribuyen asimétricamente en células hijas de progenitores neuronales que se dividen neurogénicamente (Schwamborn et al., 2009; Sun et al., 2005). A su vez, se ha indicado que en el neuroepitelio cortical de ratón, la mayoría de las células que heredan el centrosoma joven tienden a diferenciarse en neuronas mientras que las

que heredan el centrosoma materno tienden a mantenerse en la zona ventricular (Wang et al., 2009). Otro fenómeno asociado a la regulación del destino de los progenitores neuronales es la cinética del ciclo celular (Willardsen y Link, 2011). Particularmente, la duración de la fase G1 se ha asociado a la decisión de los progenitores corticales de generar una progenie proliferativa o diferenciada (Calegari et al., 2005; Pilaz et al., 2009). Según la hipótesis de la longitud del ciclo celular, los factores determinantes de la diferenciación sólo funcionan en una “ventana” temporal restringida del ciclo celular, en la fase G1, de manera que células con una fase G1 más corta responden de manera diferente a éstos (Willardsen y Link, 2011). Así, se ha descrito que impedir o favorecer la expansión de la fase G1 en progenitores neuronales, tiene efectos negativos o positivos respectivamente en la neurogénesis (Lange et al., 2009). Sin embargo, la manipulación de la duración del ciclo celular requiere actuar sobre componentes reguladores del ciclo, como el complejo Ciclina D1/Cdk4, y discriminar entre funciones específicas del ciclo y otras funciones relacionadas con el programa de diferenciación es muy complicado (Willardsen y Link, 2011). Por ejemplo, como se comentó anteriormente, se han descrito varias funciones específicas de la Ciclina D1 no relacionadas con el ciclo celular, como la regulación de determinados factores de transcripción (Fu et al., 2004) o la activación de factores proneurales (Lukaszewicz y Anderson, 2011). De hecho, se ha propuesto que la sobreexpresión de un mutante de Ciclina D1 que no interacciona con Cdk4/6 favorece la diferenciación neuronal de progenitores neuronales espinales y la disminución de los niveles de Ciclina D1 la inhibe, lo que se ha descrito como funciones de Ciclina D1 independientes del ciclo celular (Lukaszewicz y Anderson, 2011). Por otro lado, la inhibición conjunta del complejo Ciclina D1/Cdk4 (Lange et al., 2009), así como la inhibición parcial de Cdk2 (Calegari y Huttner, 2003), favorecen la neurogénesis, y la sobreexpresión conjunta de Ciclina D1 y Ciclina E1 (Pilaz et al., 2009) o del complejo Ciclina D1/Cdk4 (Lange et al., 2009) impiden el enlentecimiento de la fase G1 y afectan negativamente a la diferenciación neuronal. Además, en progenitores neurogénicos se ha observado una menor duración de la fase S (Arai et al., 2011). Por lo tanto, además de que factores del ciclo desempeñen funciones específicas en la diferenciación, la expansión de la fase G1 del ciclo de progenitores neuronales parece claramente asociada a la diferenciación neuronal. Otro fenómeno relacionado con la diferenciación neuronal es la migración intercinética nuclear (Willardsen y Link, 2011). Se ha propuesto que, en células neuroepiteliales de la retina del pez cebra, cuanto más tiempo pase el núcleo de un progenitor neural cerca del polo basal, mayor es la probabilidad de que se divida neurogénicamente en la siguiente mitosis (Baye y Link, 2007). Por lo tanto, si bien la regulación y los mecanismos implicados en la generación

de neuronas a partir de progenitores neuroepiteliales no se han caracterizado plenamente, una gran cantidad de estudios sugieren que el destino neurogénico de los progenitores está influenciado por múltiples procesos celulares y requiere la implicación de la maquinaria reguladora del ciclo celular (Willardsen y Link, 2011). De hecho, factores proneurales de la familia bHLH (*basic helix-loop-helix*) como la proteína Neurogenina-2 (Ngn2), implicada en la diferenciación neuronal, inducen una rápida reducción en el nivel de expresión de reguladores del ciclo celular como *CcnD1*, *CcnE1/2* o *CcnA2* (Lacomme et al., 2012).

El sistema nervioso periférico se origina a partir de la cresta neural. La cresta neural se forma en la parte más dorsal del tubo neural, en el límite donde la placa neural se encuentra con el ectodermo precursor de la epidermis. Durante la formación del surco neural, en células de la frontera entre la placa neural y el ectodermo precursor de la epidermis, varias señales como proteínas BMP, Wnt o FGF inducen la expresión de un conjunto de factores de transcripción, como Pax3 o Distalless-5, y Slug o FoxD3 posteriormente, que especifican el destino de cresta neural (Bang et al., 1999; Garcia-Castro et al., 2002; Lewis et al., 2004; Monsoro-Burq et al., 2003). Tras el cierre del tubo neural (incluso antes del cierre en algunas regiones) esas células, que quedan entre la parte más dorsal del tubo neural y el ectodermo precursor de la epidermis, forman la cresta neural (Figura 2), una población transitoria de células de extraordinaria capacidad migratoria y de diferenciación (Kulesa et al., 2009). Además de generar el sistema nervioso periférico, la cresta neural contribuye a la formación de estructuras esqueléticas faciales, de órganos endocrinos y paraendocrinos (como la médula adrenal o las células secretoras de calcitonina), de las células pigmentarias de la piel y de estructuras de tejido conjuntivo como las papilas dentales, la dermis, músculo liso y tejido adiposo del cuello y la cabeza, y tejido conjuntivo de varias glándulas, como el timo o el tiroides (Dupin y Sommer, 2012). La cresta neural es una estructura transitoria, ya que las células que la constituyen terminan por dispersarse poco después del cierre del tubo neural, y puede dividirse en cuatro regiones principales: la cresta neural craneal (que migra dorso-lateralmente para contribuir a tejidos faciales), troncal (que en primer lugar migra ventro-lateralmente para formar los ganglios de la raíz dorsal, los ganglios simpáticos, la médula adrenal y los nervios que rodean la aorta, y en segundo lugar dorso-lateralmente para formar los melanocitos de la piel), vagal y sacral (que genera los ganglios parasimpáticos entéricos) y cardíaca (que contribuye a la formación del tejido conjuntivo y muscular de arterias de los arcos aórticos y el septum entre la arteria aorta y la arteria pulmonar, además de otras estructuras). En el caso de la cresta neural troncal, la primera ola de migración sigue

una ruta ventral, a través de la sección anterior de los esclerotomos (cordones mesodérmicos metaméricos que darán lugar al cartílago vertebral), para dar lugar a células sensoriales (ganglios de la raíz dorsal), neuronas simpáticas, células adrenomedulares y células de Schwann (Figura 4).



**Figura 4. Estructuras asociadas al tubo neural.** Diagrama donde se muestran las distintas partes que se distinguen en un corte transversal de tubo neural embrionario donde se ha iniciado la migración de la cresta neural y la neurogénesis.

Las células de la cresta neural que da a la mitad posterior de los esclerotomos migran en el eje antero-posterior para reponer células perdidas y contribuir a esta primera ola migratoria. Posteriormente, las células de la cresta remanentes migran dorsolateralmente, entre la epidermis y la dermis (derivada de cordones mesodérmicos metaméricos conocidos como dermatomos) para formar los melanocitos de la piel. La migración de las células de la cresta neural requiere la transición del fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal (transición epitelio-mesénquima) y la separación del resto de células de la cresta, un proceso conocido como delaminación (Ahlfstrom y Erickson, 2009; Kulesa et al., 2009). Esta migración tiene lugar en haces discretos de patrón metamérico de manera sincrónica, programada rostro-caudalmente, lo que contribuye al patrón metamérico del sistema nervioso periférico (Krull, 2001). La delaminación de

células de la cresta neural implica el cambio de moléculas de superficie implicadas en la adhesión celular y, teniendo en cuenta que la migración tiene lugar de manera sincrónica en la fase S, requiere la coordinación de los mecanismos de delaminación y migración con la maquinaria reguladora del ciclo celular (Burstyn-Cohen et al., 2004). La posterior migración ventral de las células sigue vías estereotipadas primero entre los somitos epiteliales y luego invadiendo el esclerotomo para formar los ganglios de la raíz dorsal o acercándose ventralmente hacia la aorta para dar lugar a los ganglios simpáticos y las células cromafín (Gammill y Roffers-Agarwal, 2010). Aunque las células de la cresta no se diferencian hasta alcanzar el nicho en el que formarán los ganglios, se ha propuesto que el destino de las células de la cresta está en cierta medida restringido desde el inicio de la migración (Krispin et al., 2010). Por ejemplo, algunas células de la cresta están restringidas hacia destinos sensoriales o autónomos (Gammill y Roffers-Agarwal, 2011), y los progenitores melanocíticos están especificados antes de iniciar la migración (Wilson et al., 2004). La migración de las células de la cresta neural está influida por multitud de señales, receptores y proteínas de la matriz extracelular que ejercen efectos atrayentes y repelentes sobre las células que migran (Gammill y Roffers-Agarwal, 2011). En este sentido, se ha descrito que las células de la cresta neural expresan varios receptores Eph cuyos ligandos están restringidos a estructuras específicas, lo que se ha propuesto como uno de los mecanismos de guía (Santiago y Erickson, 2002). A diferencia de otros linajes del sistema nervioso periférico y del SNC, la neurogénesis en los ganglios simpáticos no está asociada a la parada de ciclo, sino que neuronas inmaduras pero diferenciadas siguen varias rondas de división antes de la diferenciación terminal (DiCicco-Bloom et al., 1990; Rohrer y Thoenen, 1987; Rothman et al., 1978; Tsarovina et al., 2008). De esta manera, la parada del ciclo celular y la diferenciación terminal ocurren en un amplio periodo del desarrollo y los mecanismos celulares y moleculares que regulan la gangliogénesis no se han caracterizado en detalle. Aún así, se ha propuesto que la coordinación adecuada entre la proliferación y la diferenciación es importante en este modelo de neurogénesis ya que, por ejemplo, factores de transcripción importantes para la diferenciación primaria de neuronas simpáticas son importantes también para la proliferación de las neuronas inmaduras y la supervivencia neuronal (Rohrer, 2011).

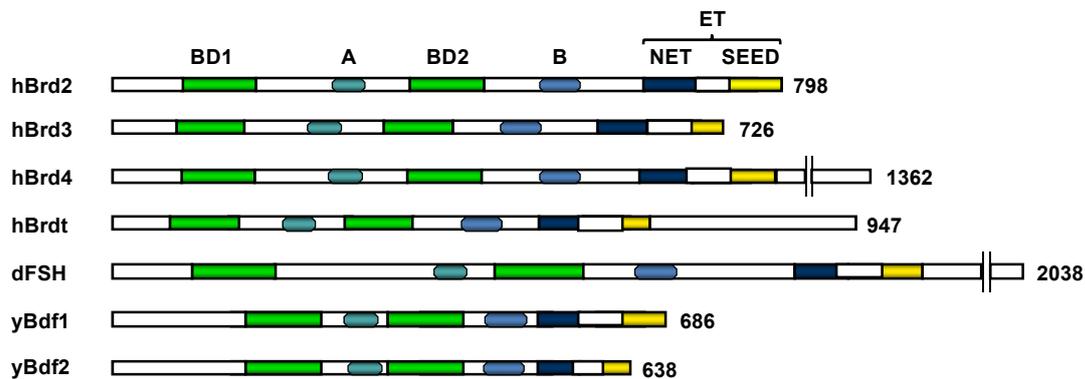
Por lo tanto, la adecuada coordinación entre factores determinantes de la diferenciación neuronal y elementos del ciclo celular resulta esencial para dar origen a las compleja estructuras del sistema nervioso de vertebrados. Una coordinación inapropiada entre ambos procesos se ha asociado en adultos con enfermedades del

sistema nervioso, como desórdenes neurodegenerativos crónicos o debidos a daño agudo (Wang et al., 2009).

## 1.2. Proteínas BET

### 1.2.1. Familia de proteínas BET

La familia de proteínas BET es una familia de correguladores transcripcionales conservada en organismos eucarióticos (Florence y Faller, 2001). Los miembros de esta familia se caracterizan por una estructura de dominios común (Figura 5): dos bromodominios en tándem, dos regiones conservadas llamadas motivos A y B y un dominio carboxilo-terminal llamado ET (*Extra-Terminal*). El dominio ET está constituido a su vez por dos subdominios: un dominio conservado llamado NET (*N-terminal ET*) y otro menos conservado llamado SEED (por la presencia de residuos de serina, ácido glutámico y ácido aspártico) (Paillisson et al., 2007).



**Figura 5. Esquema de dominios de las proteínas BET.** BD1, primer bromodominio; BD2, segundo bromodominio; A, motivo A; B, motivo B; ET, dominio *Extra-terminal*; NET, *N-terminal ET*. *h*, humanos; *d*, *Drosophila*; *y*, levaduras.

Los bromodominios son dominios de unos 120 residuos de aminoácido capaces de reconocer específicamente residuos de lisina acetilados (Filippakopoulos et al. 2012). Aunque los bromodominios se han implicado sobre todo en el reconocimiento de lisinas acetiladas en histonas, marcas de la cromatina asociadas a genes activos (Smith, 2008), también se ha descrito la asociación a través de estos dominios con proteínas no histónicas (Gamsjaeger et al., 2011; Huang et al., 2009). El genoma humano codifica un total de 61 bromodominios repartidos en 46 proteínas

relacionadas con la dinámica y estructura de la cromatina, como subunidades de complejos remodeladores de cromatina (BAZ1B), enzimas modificadoras de histonas (GCN5, PCAF, BRD9), helicasas (SMARCA), coactivadores transcripcionales (TRIM/TIF), proteínas estructurales del núcleo (PB1) o las proteínas BET (Filippakopoulos et al. 2012). Los motivos conservados A y B se han implicado independientemente en la localización nuclear de las proteínas BET de vertebrados (Guo et al., 2000; Fukazawa y Masumi et al., 2012). El dominio ET es esencial para la interacción de la proteína Brd2 con los factores E2F-1 y E2F-2 (Denis et al., 2000) y se ha implicado (particularmente el subdominio NET) en la interacción de Brd2, Brd3 y Brd4 con los factores NSD3 (*Nuclear SET domain-containing protein 3*), JMJD6 (*Jumonji domain containing protein 3*), CHD4 (*Chromodomain-helicase-DNA binding protein 4*), GLTSCR1 (*Glioma tumor suppressor candidate region gene 1 protein*) y ATAD5 (*ATPase family AAA domain-containing protein 5*) (Rahman et al., 2011).

Se han identificado cuatro miembros de la familia BET en mamíferos (Brd2, Brd3, Brd4 y Brdt), uno en *Drosophila* (FSH), dos en *Saccharomyces* (Bdf1 y Bdf2) y hasta 12 en *Arabidopsis* (GTE1-GTE12) (Florence y Faller, 2001). Las proteínas Bdf1 y Bdf2 actúan como factores generales de transcripción asociándose al factor TFIID de levaduras (Florence y Faller, 2001). La mutación *bdf1* provoca defectos en meiosis y transcripción y la doble mutación *bdf1* y *bdf2* es letal (Matangkasombut et al., 2000). En *Arabidopsis*, la proteína GTE4 se ha implicado en la activación y el mantenimiento de la proliferación en los meristemos y, por tanto, en el control del número de células de los órganos diferenciados (Della Rovere et al., 2010), y la proteína GTE6 en el desarrollo de la hoja, regulando la expresión de genes como *AS1* de manera dependiente de la acetilación del promotor (Chua et al., 2005). En *Drosophila*, la proteína FSH es un factor de efecto materno que participa en la regulación de la expresión del gen homeótico *Ubx* (Florence y Faller, 2001), y que interacciona con la metil-transferasa ASH1 en promotores de genes activos (Kockmann et al., 2013). Tanto la pérdida de función de FSH como de la proteína BET de *Caenorabditis* (BET-1) sugieren un papel de estas proteínas en el establecimiento y mantenimiento del destino celular (Leisy et al., 1996; Huang y Dawid, 1990; Shibata et al., 2010). En mamíferos, mientras que Brdt y Brd3 tienen una expresión restringida a ciertos órganos (sobre todo Brdt que se expresa fundamentalmente en la línea germinal masculina), Brd2 y Brd4 se expresan ubicuamente tanto en los tejidos adultos como en el embrión (Taniguchi et al., 1998; Rhee et al., 1998; Crowley et al., 2004; Shang et al., 2004). La proteína Brdt es esencial para la espermatogénesis (Shang et al., 2007) y se ha relacionado con la organización del cromocentro en espermátidas (Berkovits y

Wolgemuth, 2011), así como con la transcripción y el procesamiento de transcritos en espermatoцитos y espermátidas (Berkovits et al., 2012; Gaucher et al., 2012).

Se ha demostrado que tanto Brd2 como Brd4 son esenciales durante el desarrollo embrionario temprano (Houzelstein et al., 2002; Shang et al., 2009) y que Brd3 es esencial para la proliferación de células humanas HEK293 en cultivo (LeRoy et al., 2008), por lo que a pesar de la homología entre las proteínas y un grado significativo de solapamiento en el patrón de expresión de algunas de éstas, no parece darse un fenómeno de redundancia funcional. De hecho, tanto la pérdida de la proteína Brd2 como la reducción de los niveles de Brd4 producen la acumulación de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) en la fase G1 del ciclo celular (Houzelstein et al., 2002; Shang et al., 2009). La proteína Brd3 ha sido caracterizada en menor medida hasta la fecha, aunque se ha asociado a la activación de los genes *CcnD1* y *CcnA2* junto con Brd2 en células humanas HEK293 (LeRoy et al., 2008). A su vez, se ha indicado que interacciona con el factor de transcripción GATA1 de manera dependiente de la acetilación de dicho factor y que el reclutamiento de Brd3 por GATA1 a sus genes diana en precursores eritroides inhibe la maduración de estas células (Lamonica et al., 2011). A su vez, Brd3 interacciona con Brd7, una subunidad del complejo SWI/SNF (Yu et al., 2002). Su expresión se reduce durante la diferenciación endotelial de células troncales embrionarias de ratón (Ishii et al., 2005) y aumenta en progenitores neuronales del neuroepitelio cortical que van a generar neuronas (Arai et al., 2010).

La proteína Brd4 se ha caracterizado exhaustivamente. La principal función clásicamente atribuida a Brd4 es la estimulación de la elongación de la transcripción mediada por la RNA polimerasa II (Wu y Chiang, 2007). Brd4 fue originalmente llamado MCAP (*Mitotic Chromosomes-Associated Protein*) debido a que permanecía unido a cromosomas durante la mitosis cuando otros factores con bromodominios son excluidos de éstos (Dey et al., 2000). Brd4 se expresa ubicuamente en tejidos de ratón adulto (aunque en distinta cantidad) y en embriones de ratón (Dey et al., 2000). Es esencial en el desarrollo temprano de ratón, ya que embriones nulicigotos para *Brd4* mueren poco después de la implantación y ratones heterocigotos mueren en un 50% de los casos a los 12-17 días de nacer, mostrando pequeño tamaño y malformaciones faciales, oculares, de piel, testículos y cerebro (Houzelstein et al., 2002). La proteína Brd4 se ha asociado con un papel positivo en la regulación de la proliferación celular. De hecho, se ha propuesto que la activación de *Brd4* inducida por señales mitogénicas se da al principio de G1 y en la transición G0-G1 (Dey et al., 2000), sugiriendo un papel temprano (previo a S) de Brd4 en la entrada y progresión del ciclo celular.

Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) heterocigotos para *Brd4* muestran defectos en la tasa de proliferación (Houzelstein et al., 2002), y una bajada drástica en la expresión de *Brd4* causa una parada en G1 en células NIH/3T3 y MEFs (Mochizuki et al., 2008). Asimismo, la disminución del nivel de la proteína *Brd4*, impide la inducción de genes específicos de G1 como *CcnD1*, *CcnD2*, *Mcm2*, *Orc2*, *Dhfr*, *Top2a*, *Pcna* o *Hmgb1* en células NIH/3T3 sincronizadas (Mochizuki et al., 2008). Según este estudio, más de mil genes están desregulados (baja su expresión) en G1 en células con niveles bajos de *Brd4* y muchos de ellos tienen funciones conocidas relacionadas con la progresión de la fase G1 y la entrada en fase S (Mochizuki et al., 2008).

Se ha propuesto que el papel positivo de *Brd4* en la expresión de genes asociados con la fase G1 tiene lugar principalmente mediante el reclutamiento del factor P-TEFb activo (Jang et al., 2005). El complejo P-TEFb (Ciclina T1/Cdk9) actúa como regulador positivo de la elongación por la RNA polimerasa II fosforilando el residuo de serina 2 del CTD (*Carboxi-terminal Domain*) de la subunidad mayor de la RNA Polimerasa II, conduciendo a la liberación de factores de elongación negativos de la región promotora (Jang et al., 2005). Aunque tanto Cdk9 como la Ciclina T1 se expresan constitutivamente a lo largo del ciclo celular (Jang et al., 2005), la función de P-TEFb está finamente regulada a través del balance de reguladores positivos y negativos con los que interacciona (Yang et al., 2005). En células HeLa, aproximadamente la mitad del complejo está asociado a sus componentes inhibidores (la proteína HEXIM-1 y el RNA pequeño nuclear 7SK) y la otra mitad, activa, se asocia con *Brd4* (Yang et al., 2005). Se ha descrito que el complejo P-TEFb es reclutado de manera dependiente de *Brd4* a los cromosomas mitóticos al final de la anafase y este reclutamiento es esencial para la expresión de genes clave de la fase G1 temprana como *Cdk7* (Yang et al., 2008). Este comportamiento de P-TEFb gracias a su asociación con *Brd4* lo diferencia del resto de los factores de transcripción generales, que se disocian de los cromosomas durante la mitosis y entran posteriormente en el núcleo de las células hijas una vez se ha formado la envoltura nuclear, de manera dependiente de la maquinaria de importe nuclear (Yang et al., 2008). Teniendo en cuenta la capacidad de *Brd4* de asociarse con los cromosomas mitóticos y de activar genes tempranos al final de la mitosis, se ha propuesto que *Brd4* podría tener algún papel en la memoria epigenética celular marcando genes cuyo estado transcripcional activo debe ser preservado a través de la división celular (Dey et al., 2003; Nagashima et al., 2007; Yang et al., 2008). Por otra parte, se ha sugerido que *Brd4* podría contribuir a preservar un estado transcripcional activo, manteniendo el estado acetilado de la cromatina, que se pierde de manera dramática durante la mitosis, en

esos *loci*, ya que se ha visto que en células heterocigotas para *Brd4* hay una disminución en la acetilación específica de H3K14 y H4K12, que son marcas reconocidas por Brd4 (Nishiyama et al., 2006). Esta evidencia, junto con la de que Brd4 es desplazado de cromosomas meióticos desacetilados (en los que se produce una eliminación global de marcas epigenéticas para la reprogramación cigótica) (Nagashima et al., 2007), y de que Brd4 se asocia con los cromosomas mitóticos a lo largo de la embriogénesis temprana del pez zebra (incluso antes de la transición a media bástula, cuando no hay transcripción ni fases G1 y G2, sino una sucesión rápida de fases S y M) (Toyama et al., 2008), apuntan a un posible papel de Brd4 en el desarrollo y en la diferenciación y mantenimiento de linajes celulares. La sobreexpresión de Brd4 en células NIH/3T3 y HeLa se ha asociado con una inhibición de la entrada en S, probablemente a través de la interacción de Brd4 con la subunidad RFC-140 del complejo RFC (Replication Factor C) (Maruyama et al., 2002), un complejo esencial para la replicación del DNA en la fase S. Además del papel de Brd4 en la progresión del ciclo a través de G1 y S se ha propuesto también un papel de Brd4 en la transición G2-M (Dey et al., 2000; Farina et al., 2004; Maruyama et al., 2002). Por ejemplo, se ha visto que la microinyección de un anticuerpo específico contra Brd4 en el núcleo de células HeLa en fase S y G2 inhibe la entrada en mitosis (Dey et al., 2000). Otra evidencia a favor de una función de Brd4 en la entrada en mitosis surge de estudios sobre la interacción con SPA-1 (*Signal-induced Proliferation-Associated protein 1*). SPA-1 es una proteína de actividad GAP (*GTPase Activator Protein*) específica de las proteínas Rap1 y Rap2, de la superfamilia de proteínas Ras. SPA-1 se induce por factores mitogénicos y tiene un papel en el crecimiento y la adhesión celular (Farina et al., 2004). Se ha visto tanto *in vivo* como *in vitro* que Brd4 interacciona directamente con SPA-1 a través de una región que incluye su segundo bromodominio y que es capaz de estimular su actividad (Farina et al., 2004). La expresión ectópica de SPA-1 provoca una relocalización de parte de Brd4 en el citoplasma (SPA-1 localiza mayoritariamente en el citoplasma). Se ha descrito que el efecto negativo del exceso de SPA-1 en la entrada en mitosis puede deberse a la relocalización de Brd4, que afectaría a su función nuclear, apuntando de nuevo un posible papel de Brd4 en la entrada en mitosis (Farina et al., 2004). A su vez, la expresión ectópica de Brd4 provoca la relocalización de gran parte de SPA-1 en el núcleo, interfiriendo con la función de las proteínas Rap en la señalización mitogénica (Farina et al., 2004).

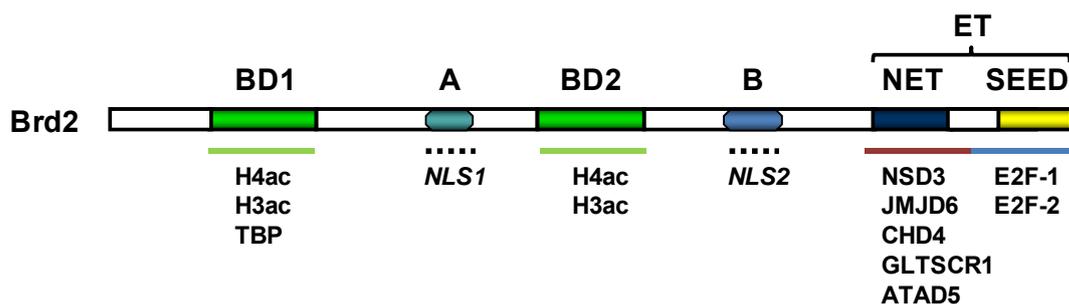
### 1.2.2. Brd2

El gen *BRD2* (anteriormente llamado *RING3: Really Interesting New Gene 3*, por tratarse del único gen conocido de la región genómica del “MHC clase II” cuya función no tenía una relación directa obvia con el sistema inmune) fue inicialmente identificado como una ORF, localizada en el cromosoma 6p21 humano, relacionada con el gen *FSH* (*Female sterile homeotic*) de *Drosophila* (Beck et al., 1992). Posteriormente se vio que este gen codificaba una quinasa de Ser/Thr nuclear de unos 85 kDa inducible por mitógenos (Denis y Green, 1996). Estudios de hibridación *in situ* en ratones demostró que el ortólogo murino (llamado inicialmente *Fsrg1* y posteriormente *Brd2*) se expresa en prácticamente todos los tejidos, siendo especialmente abundante en el embrión, y en testículo y ovario en adultos (Rhee et al., 1998).

Varios aspectos sugerían un papel de Brd2 en la regulación de la progresión del ciclo celular a través de la transcripción de genes del ciclo (Denis et al., 2000): la presencia de bromodominios, su relación con FSH, implicado en activación transcripcional, y su capacidad transformante (la sobreexpresión de Brd2 induce la formación de *foci* en fibroblastos de ratón, además de estar relacionado con la leucemia linfocítica crónica y aguda en ratón) (Denis y Green, 1996; Greenwald et al., 2004). En este contexto, Denis y colaboradores demostraron que Brd2 podía favorecer la transcripción dependiente de factores E2F (factores de transcripción implicados en la regulación de la progresión del ciclo celular) y transactivar promotores de genes del ciclo como *CcnD1*, *CcnA2*, *CcnE* y *Dhfr* (*dihidrofolato reductasa*) de manera dependiente de Ras (o efectores de la vía Ras) y E2Fs (Denis et al., 2000). También describieron la copurificación de Brd2 con factores E2F en un complejo de 330 kDa a partir de extractos nucleares de células HeLa y que tanto E2F-1 como E2F-2 (factores E2F activadores) interactuaban con la proteína Brd2 a través de los últimos 93 residuos de ésta (Denis et al., 2000). Asimismo, la disminución de los niveles de la proteína Brd2 en células HEK293 por interferencia mediada por RNA de cadena corta (*siRNA*) provoca una disminución drástica en los niveles de Ciclina D1 (LeRoy et al., 2008). En fibroblastos de rata (células Rat1), la expresión constitutiva de Brd2 produce una acumulación prematura de Ciclina A2 y una aceleración de la progresión del ciclo celular de manera dependiente de la región amino-terminal que contiene los dos bromodominios (Sinha et al., 2005).

Experimentos de inmunoprecipitación de oligonucleosomas y de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) demuestran que Brd2 interactúa tanto *in*

*vitro* como *in vivo* con la histona H4 acetilada en la lisina 12 (H4K12Ac) a través de los bromodominios, y que la especificidad de esa interacción es una propiedad intrínseca de los bromodominios de Brd2 (Kanno et al., 2004). Esta evidencia, junto con la capacidad de Brd2 de transactivar genes del ciclo y su interacción con E2Fs activadores, sugiere que Brd2 puede, bajo inducción mitogénica, favorecer la progresión del ciclo celular reclutando factores de transcripción y coactivadores a promotores de genes del ciclo celular específicamente acetilados (Sinha et al., 2005). Consistentemente, se ha visto que la interacción de Brd2 con H4K12Ac es esencial para el aumento de transcripción del gen de la Ciclina E inducido por expresión constitutiva de Brd2 (Kanno et al., 2004). Por otro lado, la interacción directa de Brd2 con TBP (*TATA-binding protein*) ha llevado a proponer que Brd2 puede actuar reclutando al factor TBP a un complejo transcripcional que incluye a E2F-1 (Peng et al., 2007). Además, la interacción entre Brd2 y E2F-2 requiere la presencia de histonas acetiladas (Crowley et al., 2002) lo que sugiere que la interacción bromodominio-histona acetilada puede tener un efecto alostérico que altere la conformación de la proteína, estabilizando su unión a otras proteínas. De esta manera, y dado que Brd2 también interacciona con otras proteínas implicadas en la transcripción como NSD3 o JMJD6 (Rahman et al., 2011) y con proteínas del complejo “Mediator” (componente multimérico esencial de la maquinaria general de transcripción por la RNA Polimerasa II) como Cdk8, TRAP220 así como con la subunidad mayor de la RNA Polimerasa II (Crowley et al., 2002), es posible que Brd2 medie el reclutamiento de factores reguladores y la formación de un complejo transcripcional activador de genes del ciclo celular en regiones de la cromatina acetiladas (Figura 6).



**Figura 6. Proteínas que interaccionan con Brd2.** Esquema de los dominios de la proteína Brd2 y de las interacciones descritas entre cada uno de ellos y distintas proteínas. Se indica también que los motivos A y B probablemente contienen señales de localización nuclear (*NLS1* y *NLS2*).

A su vez, experimentos de inmunoprecipitación de cromatina o ChIP (*Chromatin-Immunoprecipitation*), han mostrado que Brd2 interacciona físicamente con el promotor de los genes de Ciclina A2 (Sinha et al., 2005) y Ciclina D1 (LeRoy et al., 2008). La interacción de Brd2 con el gen de la Ciclina D1 se ha verificado en distintas regiones, incluida la región promotora, y es dependiente de la acetilación de H4K12 (LeRoy et al., 2008). La localización de Brd2 a lo largo del gen de Ciclina D1, junto con la evidencia de que Brd2 favorece la transcripción por la RNA Polimerasa II a lo largo de un polinucleosoma hiperacetilado *in vitro* (eliminando el bloqueo nucleosomal de la RNA Polimerasa II) (LeRoy et al., 2008), han llevado a proponer que Brd2 favorece la transcripción mediante el reclutamiento de factores de transcripción y coactivadores, así como ejerciendo una actividad intrínseca como chaperona de histonas (LeRoy et al., 2008).

Un aspecto interesante de Brd2 es su relocalización celular concomitante con la salida de ciclo y/o diferenciación. Se ha descrito que en fibroblastos de ratón (BALB/3T3), Brd2 (tanto la proteína endógena como expresada mediante transfección) aparece deslocalizada por todo el volumen celular cuando se para el ciclo celular privando al cultivo de suero, mientras que la reactivación del ciclo mediante la adición de suero reestablece la localización nuclear de Brd2 en pocas horas (Guo et al., 2000). Esta relocalización nuclear de Brd2 inducida por mitógenos en células que proliferan activamente es consistente con un papel en la transactivación de genes del ciclo celular dependientes de factores E2F. Se ha descrito que una región de seis aminoácidos (507KKKKRK512), definida como señal de localización nuclear o NLS (*Nuclear Localization Signal*) monopartita, es necesaria para la relocalización (Beck et al., 1992; Fukazawa y Masumi, 2012; Guo et al., 2000). Estudios del patrón de localización de Brd2 en el epitelio mamario de ratón adulto, donde Brd2 se expresa abundantemente (Rhee et al., 1998), evidencian un cambio en la localización subcelular de la proteína a medida que el epitelio se diferencia a alveolo glandular maduro con la entrada en la lactancia (Crowley et al., 2002). Concretamente, la proteína Brd2 se localiza en el núcleo de células epiteliales de alveolos mamaros de ratón que proliferan durante el embarazo, pero sólo se detecta en el citoplasma de estas células cuando abandonan el ciclo celular para diferenciarse en el momento de la lactancia (Crowley et al., 2002). Entre dos y cinco días después de la lactancia, la lámina basal de los alveolos se degrada produciendo una involución de los anillos alveolares concomitante con una entrada en apoptosis de las células alveolares. En este estadio, Brd2 vuelve a localizarse en el núcleo de las células alveolares (Crowley et al., 2002). Este patrón sugiere que Brd2, además de su función en la regulación

transcripcional de genes del ciclo, puede tener una función en la inducción de la apoptosis, posiblemente mediante la transactivación de genes proapoptóticos (Crowley et al., 2002; Zhou et al., 2006). Curiosamente se ha descrito la capacidad de E2F-1 de inducir apoptosis mediante la activación de genes proapoptóticos (laquinta et al., 2007). El cambio de localización celular de Brd2 asociado a una salida del ciclo celular en el contexto del desarrollo de tejidos también se ha observado durante el desarrollo del SNC en embriones de ratón (Crowley et al., 2004). Se ha descrito que la expresión de *Brd2* en embriones de ratón (de 11,5 dpc) es especialmente alta en el neuroepitelio del cerebro anterior y posterior, en los ganglios de la raíz dorsal y en la médula espinal (Crowley et al., 2004). Experimentos de inmunohistoquímica en cortes transversales del tubo neural embrionario muestran que a 9 dpc, cuando la mayoría de células están proliferando, la proteína Brd2 es nuclear. Sin embargo, a medida que avanza el desarrollo y se produce la neurogénesis (11-12 dpc), Brd2 se localiza en el núcleo de progenitores que siguen proliferando, pero muestra una localización citoplásmica en células postmitóticas que se diferencian en neuronas. En la región dorsal, donde la mayoría de progenitores interneuronales siguen proliferando a 11-12 dpc, se observa una mayor localización nuclear frente a la región ventrolateral de motoneuronas, donde el proceso de diferenciación se encuentra más avanzado (Crowley et al., 2004). En el caso de los ganglios de la raíz dorsal, se observa una localización nuclear de Brd2 en cortes histológicos de embriones de 11,5 dpc, estadio del desarrollo en que las células proliferan activamente, mientras que en estadios posteriores (15 dpc) Brd2 aparece mayoritariamente en el citoplasma, coincidiendo con el proceso de diferenciación neuronal (Crowley et al., 2004).

Los cambios de localización de Brd2 asociados a la salida del ciclo celular y a la diferenciación permiten especular con la posibilidad de que Brd2, además de estar implicado en la progresión del ciclo celular, desempeñe funciones adicionales durante el proceso de diferenciación, o en la coordinación entre ambos procesos. De hecho, una disminución en el nivel de la proteína Brd2 en ratones, se ha asociado con una reducción del número de neuronas GABAérgicas en varias estructuras cerebrales (Velisek et al., 2011). Por otro lado, embriones de ratón carentes de la proteína Brd2 muestran una disminución en la expresión de genes importantes para la diferenciación neuronal, como *NeuroD1* o *NeuroD4* (Gyuris et al., 2009). A su vez, la pérdida de la proteína, que resulta letal en estadios tempranos del desarrollo (11-13,5 dpc), se ha asociado con defectos en el cierre del tubo neural (Shang et al., 2009) y exencefalia (Gyuris et al., 2009), en consonancia con la abundante expresión de *Brd2* en el tubo neural (Crowley et al., 2004; Shang et al., 2009). La carencia de Brd2 también conlleva

una reducción significativa del tamaño de los embriones en estadios previos a la degeneración (Gyuris et al., 2009; Shang et al., 2009).

### **1.3. OBJETIVOS**

Teniendo en cuenta el cambio de localización de la proteína Brd2 asociado a la diferenciación neuronal (Crowley et al., 2004), el alto nivel de expresión de Brd2 en el sistema nervioso embrionario así como los defectos en la correcta estructuración del sistema nervioso central asociados a la carencia de dicha proteína (Shang et al., 2009) y la implicación de Brd2 en la regulación del ciclo celular (LeRoy et al., 2008) el objetivo general de esta tesis fue la caracterización funcional de la proteína Brd2 en el contexto de la diferenciación neuronal en el SNC de vertebrados.

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- 1- Estudiar la localización celular de Brd2 y la importancia de los dominios en la localización y función de esta proteína
- 2- Buscar proteínas que interaccionen con Brd2
- 3- Estudiar la funcionalidad de la interacción entre Brd2 y Brd3 y entre Brd2 y Pleiotrofina.





## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIALES:

#### 2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

##### 2.1.1 Líneas Celulares Animales.

###### 2.1.1.1 Líneas celulares.

Las líneas celulares animales utilizadas en este trabajo son la línea de ratón P19 y la línea humana HEK293T. La línea P19 deriva de un teratocarcinoma de ratón (McBurney y Rogers, 1982) y conserva cierto grado de pluripotencia. La línea humana HEK293T deriva de riñón embrionario (Graham et al., 1977) y se utilizó principalmente para la expresión de proteínas en experimentos de coimmunoprecipitación. Ambas líneas fueron suministradas por el Dr. José Carlos Reyes Rosa (Laboratorio de Epigenética. Departamento de Biología Molecular, CABIMER. Sevilla)

###### 2.1.1.2 Condiciones de Cultivo.

Todas las líneas fueron mantenidas en incubadores HEPA *Class 100* (Thermo), a 37° C y con una atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5%.

Como medio de cultivo rutinario se utilizó:

-Para células P19: *α-Modified Eagle* (α-MEM) provisto comercialmente de 4500 mg/l de glucosa, 584 mg/l de L-Glutamina y 110 mg/l de piruvato sódico (PAA Laboratories) suplementado con un 2,5% de suero fetal bovino (v/v) y un 7,5% de suero de ternera recién nacida (PAA Laboratories) y 10 ml/l de una solución de antibióticos compuesta por penicilina (100 U/ml) y estreptomina (10 mg/ml) (PAA Laboratories).

-Para células HEK293T: *Dulbecco's Modified Eagle* (DMEM) provisto comercialmente de 4500 mg/l de glucosa, 584 mg/l de L-Glutamina y 110 mg/l de piruvato sódico (PAA Laboratories) suplementado con un 7% de suero fetal bovino (v/v) (PAA Laboratories) y 10 ml/l de una solución de antibióticos compuesta por penicilina (100 U/ml) y estreptomina (10 mg/ml) (PAA Laboratories).

El tratamiento de células P19 con TSA se hacía añadiendo al cultivo TSA (500ng/ml) 4 horas antes de procesar las células para su análisis en el microscopio confocal.

La inducción con suero en células P19 para ver el efecto de la sobreexpresión de Brd2 y otras proteínas relacionadas se hizo cultivando las células P19 en medio  $\alpha$ -MEM suplementado con 0,1% de suero fetal bovino (v/v) durante 48 horas. Luego, el medio se cambió por  $\alpha$ -MEM suplementado con un 2,5% de suero fetal bovino (v/v) y un 7,5% de suero de ternera recién nacida (v/v) durante 18 horas antes de procesar las células para su análisis. Las transfecciones se realizaban 36 horas antes del procesamiento de las células, según un protocolo adaptado de Sinha et al., 2005.

El tratamiento con ácido retinoico de células P19 para acumular células en la fase G1 se hacía añadiendo ácido retinoico a una concentración final de 0,5  $\mu$ M a las células cultivadas en placas adherentes durante 16 horas, según un protocolo adaptado de Pao et al., 2011. Las transfecciones se realizaban 18 horas antes del tratamiento. La inducción de Ptn con ácido retinoico para el *Western Blot* o las inmunofluorescencias se hacía siguiendo el mismo protocolo, procesando las células 48 horas después del inicio del tratamiento. La inducción de Ptn para el experimento de *ChIP* se realizaba cultivando las células P19 en placas no adherentes con una concentración final de ácido retinoico de 0,5  $\mu$ M durante 48 horas, según un protocolo adaptado de Brunet-DeCarvalho et al., 2003.

La diferenciación de células P19 mediante tratamiento con ácido retinoico se hacía según el protocolo desarrollado por McBurney y colaboradores (McBurney et al., 1982). Brevemente,  $1,5 \times 10^6$  células P19 se sembraban en cajas de cultivo no adherentes con medio  $\alpha$ -MEM suplementado con un 5% de suero fetal bovino (v/v) y 0,5  $\mu$ M de ácido retinoico durante 4 días, con un cambio de medio a los 2 días. Luego, se tripsinizaban las células y se sembraban a una densidad de  $10^5$  células por ml en placas adherentes con medio  $\alpha$ -MEM suplementado con un 2,5% de suero fetal bovino (v/v) y un 7,5% de suero de ternera recién nacida (v/v), sin ácido retinoico, durante 6 días con cambio de medio cada dos días. A partir del segundo día se añadía al cultivo arabinósido C a una concentración final de 5  $\mu$ M para evitar la proliferación de células no neuronales.

## **2.1.2 Bacterias.**

### **2.1.2.1 Estirpes.**

En esta tesis se han utilizado dos estirpes de *Escherichia coli* como herramientas para técnicas de clonación molecular del DNA y para la inducción y purificación de proteínas, respectivamente: DH5 $\alpha$  y BL-21(DE3). Sus características genotípicas son:

-DH5 $\alpha$ : *supE44  $\Delta$ lac U169 ( $\Phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

-BL21 (DE3): *hsdS ga1 ( $\lambda$ cls857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene1)*

### **2.1.2.2 Condiciones de Cultivo.**

El medio de cultivo habitual de las estirpes bacterianas fue el medio Luria-Bertani (LB). Los antibióticos utilizados para la selección de bacterias transformadas fueron ampicilina (100  $\mu$ g/ml) o kanamicina (50  $\mu$ g/ml), según el plásmido.

Los cultivos en medio líquido crecieron en incubadores con una temperatura estable de 37° C y una agitación continua de 200 rpm. Para los cultivos en medio sólido se utilizaron estufas a la misma temperatura.

**LB:** 10 g/l de NaCl; 10 g/l de bacto-triptona; 5 g/l de extracto de levadura. Añadir 15 g/l de bacto-agar para el medio sólido.

## **2.1.3 Levaduras.**

### **2.1.3.1 Estirpes.**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue utilizada para llevar a cabo los escrutinios de dos híbridos con el sistema *DUALhybrid Kit* (Biotech). En concreto se usó la estirpe NMY51 que suministra el fabricante.

### **2.1.3.2 Condiciones de Cultivo.**

El medio estándar de crecimiento de la estirpe NMY51 era YPDA. Cuando se necesitaba un medio mínimo para establecer alguna de las restricciones de crecimiento del sistema, ese medio era el SC, que se preparaba a partir de sobres con medio de crecimiento sin histidina, leucina y triptófano (SC-His-Leu-Trp) (Q-BIOgene), y se suplementaba con los aminoácidos que hicieran falta en cada caso.

Las células se incubaron a 30° C y 250 rpm.

**YPD:** 10 g/l de extracto de levadura; 20 g/l de triptona (= bacto-peptona); 20 g/l de glucosa. Añadir 20 g/l de bacto-agar para obtener medio sólido. La mezcla debe ser esterilizada a 121° C durante 15 min.

**SC:** Añadir al contenido de los sobres Sc-His-Leu-Trp (Q-BIOgene) 20 g de bacto-agar para obtener 1 l de medio sólido. La mezcla debe ser esterilizada a 121° C durante 15 min. Tras su enfriamiento parcial, añadir en función del medio deseado 2 ml/l de una solución filtrada de histidina 1% (p/v), 6 ml/l de una de leucina 2% (p/v) y/o 2 ml/l de una de triptófano 1% (p/v).

## 2.2. ANTICUERPOS

Los anticuerpos primarios utilizados para el análisis de proteínas incluyen:

-Anticuerpos monoclonales de ratón:

ANTI-FLAG-M2 (Sigma-Aldrich; St Louise, MO, USA), Anti-His (GE Healthcare), Anti-BrdU (BU-33) (Sigma-Aldrich; St Louise, MO, USA).

-Anticuerpos monoclonales de rata:

Anti-HA High Affinity (3F10) (Roche),

-Anticuerpos policlonales de conejo:

Oct-3/4 (H-134) (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC), beta III Tub (ab18207) (abcam).

-Anticuerpos policlonales de cabra:

PTN (C-19) (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC), Anti-GFP (ab6673) (abcam).

Los anticuerpos secundarios producidos en burro incluyen:

Anti-Goat IgG Alexa 488 (Invitrogen), Anti-Rabbit IgG Alexa 546 (Invitrogen), Anti-Rabbit IgG Alexa DyLight 546 (Jackson ImmunoResearch), Anti-Mouse Cy3 (Jackson ImmunoResearch), Anti-Rabbit DyLight 488 (Jackson ImmunoResearch), Anti-Rabbit DyLight 549 (Jackson ImmunoResearch), Anti-Rat DyLight 549 (Jackson ImmunoResearch), Anti-Mouse DyLight 549 (Jackson ImmunoResearch).

Los anticuerpos secundarios producidos en cabra incluyen:

Anti-Rat IgG HRP (Sigma-Aldrich; St Louise, MO, USA), Anti-Mouse IgG HRP (Sigma-Aldrich; St Louise, MO, USA), Anti-Rabbit IgG HRP (Sigma-Aldrich; St Louise, MO, USA), Anti-Goat IgG HRP (Sigma-Aldrich; St Louise, MO, USA), Anti-Mouse Texas Red (Jackson ImmunoResearch).

Los anticuerpos policlonales de conejo producidos en el laboratorio para la detección de Brd2 incluyen:

-Anti-mouseBrd2C: el péptido usado como antígeno era (aminoácidos 698-780)

Estos anticuerpos se utilizaron para la detección de la proteína Brd2 de ratón por *Western Blot* e inmunofluorescencia.

-Anti-mouseBrd2I: el péptido usado como antígeno era (aminoácidos 164-274)

Estos anticuerpos se utilizaron para la inmunoprecipitación de la proteína Brd2 endógena de ratón en células P19.

-Anti-mouseBrd2N: el péptido usado como antígeno era (aminoácidos 50-651)

Estos anticuerpos se utilizaron para el experimento de inmunoprecipitación de cromatina (*ChIP*) en células P19

-Anti-chickenBrd2: el péptido usado como antígeno fue:

ERYVLSCLRKKPRKPYSETMKKPVGKKEELALEKKRELEKRLQDVSGQLNSAKKPPKKANEKPESAQQVAVS  
RLSASSRSDDSS

Estos anticuerpos se utilizaron para la detección de la proteína Brd2 de pollo mediante inmunofluorescencia.

### 2.3. CEBADORES PARA PCR EN TIEMPO REAL.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados en los experimentos de PCR a tiempo real.

Cebadores	<i>Forward 5'-3'</i>	<i>Reverse 5'-3'</i>
Brd2	CATGGACCTCAGCACTGTCAA	TCCTGTGCATCCCGGTAGTC
Brd3	ATGCCTCAGGAGGAAGTTGA	CTTGTTGGGAACCTGCATTT
Brd4	CGAATCCAGCTCCTCTGACAGT	AGAGTCCGTGCCAATGATTAG
Oct4	CCAATCAGCTTGGGCTAGAG	CTGGGAAAGGTGTCCCTGTA
Nfmt	CACGACCTCAGCAGCTACCA	GGTTCCCCGAAGTTCATTTTC
Gapdh	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	GGATGCAGGGATGATGTTCT
GFP	CAAGATCCGCCACAACATCG	GTCCATGCCGAGAGTGATCC
CcnD1	TCAAGACGGAGGAGACCTGT	CTCCTCTTCGCACTTCTGCT
CcnA2	CTTGGCTGCACCAACAGTAA	AGCAATGAGTGAAGGCAGGT
Promotor CcnD1	GGAGGACCCTCTTAGGGAAA	CGGACTGCTTCTCTCCAAAC
Promotor CcnA2	CCAGCGTTTCCCTATGTTGT	CTAGGCAGGAGCGTATGGAT

### 2.4. CONSTRUCCIONES DE EXPRESIÓN.

Todas las construcciones de expresión en células animales, excepto las fusiones con GFP y RFP, están basadas en el vector pAdRSV-S (Giudicelli et al., 2003). Las construcciones de fusión a GFP o RFP están basadas en los vectores pEGFP-C2 y pDSRed-monomer-N1 (Clontech), respectivamente.

Las construcciones cebo y presa empleadas en los ensayos de dos híbridos estaban basadas en los vectores pLexAN y pGAD-HA (Biotech), respectivamente.

Las construcciones de expresión de proteínas de fusión a GST en bacterias estaban basadas en el vector pGEX-6P-3 (GE Healthcare) y las de expresión de proteínas con etiquetas de colas de histidinas en bacterias estaban basadas e el vector pET28a+ (Novagen)

Todas las construcciones se realizaron mediante técnicas estándar de clonación molecular.

## MÉTODOS

### 2.5. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE DNA

### **2.5.1. Aislamiento de DNA plasmídico bacteriano.**

Las extracciones a pequeña escala de DNA plasmídico se llevaron a cabo mediante el método de la lisis alcalina. Si se requería DNA de mayor calidad, por ejemplo para secuenciar, se utilizaba el kit *GFX Micro Plasmid Prep* (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para las grandes extracciones de DNA de alta calidad, imprescindible para poder transfectar células animales, se utilizaron rutinariamente los sistemas *JET star* (GENOMED), según las instrucciones del fabricante.

### **2.5.2. Aislamiento de DNA plasmídico de levaduras.**

Para aislar el DNA plasmídico de los clones positivos del sistema de dos híbridos se recogían las células de 1,5 ml de cultivo y se resuspendían en 100 µl de solución de lisis. Luego se añadía un volumen de fenol y cloroformo 1:1 (v/v) y se agitaba en vortex durante 10 min. La mezcla se incubaba a 65° C durante 5 min y se centrifugaba 5 min a 15000 x g. El sobrenadante se precipitaba con acetato sódico 3 M (pH 5,2) y etanol 96%. El precipitado se lavaba con etanol 70% y se resuspendía en 30 µl de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Se usaban 2 µl para electroporar la estirpe DH5α de *E. coli*.

**Solución de lisis:** LiCl 2,5 M; Tris-HCl (pH 8) 50 mM; Triton X-100 4% (v/v); EDTA (pH 8) 20 mM.

### **2.5.3. Introducción de DNA.**

#### **2.5.3.1 Transfección transitoria de células animales.**

Las transfecciones transitorias de las células P19 y las células HEK293T se realizaron con lipofectamine 2000 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **2.5.3.2 Transformación de bacterias.**

Se utilizaron dos métodos de transformación de *E. coli*, el choque térmico y la electroporación. Para la transformación por choque térmico se combinaba 0,1-0,5 µg de DNA plasmídico con 100 µl de células competentes. Tras 15 min en hielo, las células se calentaban a 42° C durante 2 min, se volvían a enfriar y se les añadía 900 µl de LB. Después, y en función del gen de resistencia que portase el plásmido introducido, la mezcla se incubaba a 37° C entre 60 y 90 min. Finalmente las células

se sembraban en cajas o matraces de LB con el antibiótico de selección correspondiente.

Para la electroporación se combinaban de 0,05-0,25 µg de DNA plasmídico con 50 µl de células electrocompetentes. Las células se colocaban en una cubeta *Gene Pulser* de 2 mm de separación entre electrodos (Bio-Rad) y se sometían a un choque eléctrico de 2500 V y 15 µF en un aparato *Easyject optima* (Equibio). Inmediatamente tras el pulso se añadía a la mezcla 1 ml de LB y se incubaba a 37° C entre 60 y 90 minutos. Finalmente las células se sembraban en cajas o matraces de LB con el antibiótico de selección correspondiente.

### **2.5.3.3 Transformación de levaduras.**

Esta técnica se utilizaba exclusivamente para el sistema de dos híbridos, tanto para los escrutinios con genotecas de cDNA como para la posterior verificación y especificación de las interacciones.

Para la transformación de levaduras, se utilizaba el método del acetato de litio (LiAc). El siguiente protocolo describe la manera de realizar 8 transformaciones discretas y las variantes necesarias para realizar todo un escrutinio de dos híbridos (texto en *itálica* y entre paréntesis). En el caso del escrutinio las cantidades son mayores, puesto que para obtener los más de 10<sup>6</sup> dobles transformantes necesarios se requerían 25 transformaciones en cajas de 15 cm de diámetro. El proceso completo se realizaba en condiciones de esterilidad. Se resuspendían 2 o 3 colonias de la levadura en 50 µl (*100 µl*) de H<sub>2</sub>O Milli-Q y se sembraban en una caja (*dos cajas*) de YPD (*SC-Leu*) que se incubaba a 30° C o/n. Tras resuspender las células en 5 ml (*10 ml*) de H<sub>2</sub>O Milli-Q, se inoculaba un matraz con 100 ml (*500 ml*) de YPDA (*SC-Leu*) con la cantidad de biomasa necesaria para obtener una DO<sub>600</sub> de 0,1. El cultivo se incubaba a 30° C y 250 rpm durante unas 5 h, hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,4. El cultivo se centrifugaba a temperatura ambiente (RT) y 3000 x g durante 5 min. Se descartaba el sobrenadante y se volvía a resuspender el precipitado celular en 40 ml (*200 ml*) de H<sub>2</sub>O Milli-Q. El cultivo se centrifugaba a RT y 3000 x g durante 5 min. Se descartaba el sobrenadante y se volvía a resuspender el precipitado celular en 20 ml (*100 ml*) de una solución hecha con tampón Tris/EDTA (TE) y LiAc: TE/LiAc 1X. El cultivo se centrifugaba a RT y 3000 x g durante 5 min. Se descartaba el sobrenadante y se volvía a resuspender el precipitado celular en 350 µl (*2,5 ml*) de TE/LiAc 1X. Para cada transformación se combinaban en un tubo de 1,5 ml 50 µl de células competentes, 5 µl de solución de DNA *carrier* y al menos 100 ng de DNA plasmídico. Tras mezclar bien con la micropipeta, se añadían 300 µl de una solución hecha con polietilenglicol (PEG)

y LiAc (PEG/LiAc) y se mezclaba todo de nuevo (*para las 25 transformaciones del escrutinio se combinan los 2,5 ml de células, 125 µl de solución de DNA carrier y 12,5 µg de la genoteca de cDNA, se mezcla todo, se añaden 15 ml de PEG/LiAc y se vuelve a mezclar antes de hacer 25 alícuotas de 700 µl*). Los tubos se incubaban a 30° C durante 30 min y después se someten a un choque térmico de 42° C durante 15 min. Los tubos se centrifugaban a RT y 3000 x g durante 30 s, se retiraban los sobrenadantes y los precipitados celulares se resuspendían en 500 µl (400 µl) de H<sub>2</sub>O Milli-Q. De cada tubo se sembraban 100 µl de células (400 µl) en cajas de 10 cm de diámetro con el medio selectivo correspondiente (*Sc-Leu-Trp-His+3-amino-1, 2, 4-triazol (3AT)*). Las cajas se incubaban a 30° C entre 48 y 72 h.

**TE 10X:** Tris-HCl 100 mM (pH 7,5); EDTA 10 mM. La solución se esteriliza antes de su uso.

**TE/LiAc 1X (100 ml):** 10 ml de TE 10X; 10 ml de LiAc 1 M; 80 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q. La solución se esteriliza por filtración antes de su uso.

**PEG/LiAc (15 ml):** 1,5 ml de TE 10X; 1,5 ml de LiAc 1 M; 12 ml de PEG-3350 50% (v/v). La solución se esteriliza por filtración antes de su uso.

**Solución de DNA carrier:** DNA de esperma de salmón 10 mg/ml. La solución se hierve durante 5 min y se conserva a -20° C.

## **2.5.4 Análisis y cuantificación de DNA.**

### **2.5.4.1 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.**

Para la electroforesis de DNA en geles de agarosa se han utilizado aparatos *Mini-Sub Cell GT* (Bio-Rad) y geles de agarosa al 0,7-2% (p/v) en tampón Tris-borato/EDTA (TBE) 0,5X. El porcentaje de agarosa variaba en función del tamaño de los fragmentos de DNA que se pretendían analizar. A todos los geles se les añadía bromuro de 3,8-diamino-6-etil-5-fenil fenantridio (etidio) a una concentración final de 5 µg/ml.

Antes de realizar las electroforesis se añadía a cada muestra 1/10 de su volumen en tampón de carga 10X. Para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA analizados se utilizaba el patrón comercial *1 Kb Plus Ladder* (Invitrogen).

El DNA se visualizaba con un aparato transiluminador *Universal Hood II* (Bio-Rad), se fotografiaba con la ayuda de la aplicación informática *Quantity One 1-D Analysis Software* (Bio-Rad) y se imprimía con un equipo *Digital Graphic Printer UP-D895MD* (Sony).

**TBE 0,5X:** Tris-borato 45 mM; EDTA 1 mM (pH 8).

**Tampón de carga 10X:** azul de bromofenol 0,25% (p/v); xileno-cianol FF 0.25% (p/v); glicerol 30% (v/v).

#### **2.5.4.2. PCR.**

La amplificación de fragmentos de DNA se realizó mediante PCR utilizando un aparato *T-personal* (Biometra). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores fueron sintetizados por la firma SIGMA-Genosys.

Para una reacción típica se utilizaban concentraciones de 1  $\mu$ M de cada cebador, 2 mM de cada desoxirribonucleótido y 1 mM de  $MgCl_2$ , así como 5  $\mu$ l del tampón comercial 10X de la DNA polimerasa, de 20 a 50 ng de DNA molde, 2.5 U de DNA polimerasa y  $H_2O$  Milli-Q hasta un volumen final de 50  $\mu$ l. Si el amplicón presentaba un alto porcentaje de G+C, entonces la mezcla de reacción incorporaba también un 5% de DMSO (v/v) para ayudar a la rotura de los triples enlaces existentes entre este par de nucleótidos. Se ha utilizado el sistema *Expand High Fidelity PCR System* (Roche).

#### **2.5.4.3. PCR a tiempo real.**

Para la PCR a tiempo real se utilizaban placas de 96 pocillos (Applied Biosystems) y el kit comercial SensiMix SYBR Low-ROX kit (BIOLINE) en un termociclador 7500 FAST Real-Time PCR System de Applied Biosystems. Se siguieron las instrucciones del fabricante. Para los experimentos de *ChIP*, se analizaban 3  $\mu$ l de una dilución 1/10 del DNA final por cada caso, siempre por triplicado. Para el análisis del cDNA de células P19, se analizaban 3  $\mu$ l de una dilución 1/10 del cDNA total, por triplicado en cada caso. Para la normalización se utilizaba la expresión del gen *GAPDH* endógeno o, en el caso en el que las células analizadas hubieran sido transfectadas, la expresión de la ORF de *GFP* expresada a partir de un vector cotransfectado. El algoritmo para el análisis relativo está descrito en Pfaff et al., 2001.

### **2.5.5. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA.**

#### **2.5.5.1. Método de aislamiento de RNA.**

El aislamiento de RNA, tanto de células como de órganos animales, se llevaba a cabo con el sistema *RNeasy*<sup>®</sup> (QIAGEN), según las instrucciones del fabricante.

#### **2.5.5.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa.**

Las electroforesis de RNA se realizaron de la misma manera que las de DNA, aunque el porcentaje de los geles de agarosa siempre era del 1% (p/v) y nunca se utilizaba patrón.

**Tampón de carga 10X:** azul de bromofenol 0,25% (p/v); xileno-cianol FF 0,25% (p/v); glicerol 30% (p/v).

### **2.5.5.3. Experimentos de RT-PCR.**

Para la obtención de cDNA a partir de RNA se utilizó el sistema *Super-Script™ First-Strand Synthesis for RT-PCR* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron tal como ya se ha descrito, a partir de 1 µl de la reacción de retrotranscripción.

## **2.6. MÉTODOS DE SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.**

### **2.6.1. Inducción de la síntesis de proteínas heterólogas en *E. coli*.**

Para la expresión de polipéptidos fusionados con la proteína Glutación S-transferasa (GST) o con una etiqueta de 6 residuos de histidina se clonaba la secuencia del polipéptido de interés en el vector pGEX-6P-3 (GE Healthcare) o pET28a+ (Novagen), se transformaba la estirpe BL21 (DE3) de *E. coli* y se inducía la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG.

El ensayo a pequeña escala tenía como objetivo comprobar que la inducción de la síntesis de la proteína funcionaba correctamente. Para ello se electroporaba un vial de la estirpe BL21 (DE3) de *E. coli* con el plásmido de interés y se inoculaba 1/10 del volumen en 25 ml de LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Se dejaba crecer el cultivo hasta una DO<sub>600</sub> de 0,6, se recogía 1 ml como control (muestra 1) y al resto se le añadía IPTG 1 mM para inducir la síntesis de la proteína de fusión. Tras 2 h de inducción, se recogía 1 ml del cultivo (muestra 2). Para evitar la acción de las proteasas, las células de las muestras 1 y 2 se resuspendían en 1 ml de PBS 1X suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM. Después, y siempre en frío, se rompían con 6 pulsos de ultrasonidos de 30 s cada uno, separados por intervalos de reposo de la misma duración para mitigar el calentamiento. Los ultrasonidos se suministraban mediante un dispositivo *Digital Sonifier S-450D* (Branson) dotado con una bocina de 13 mm y una micropunta de 3 mm. La amplitud del aparato se fijaba al 40% W y Hz. Tras centrifugar a 15000 x g y 4° C durante 10 min, se añadían entre 300 y 500 µl de tampón de carga desnaturizante 1X a los sobrenadantes (citosol) y a los precipitados (membranas y cuerpos de inclusión).

Posteriormente, todas las muestras se sometían a una electroforesis en gel de acrilamida y en presencia de SDS (SDS-PAGE) para comprobar *de visu* la inducción de la síntesis en la muestra 2 y la solubilidad de la proteína inducida.

Si se observaba que la proteína de fusión se sintetizaba en buena cantidad y permanecía soluble en el citosol, se podía proceder a su purificación repitiendo previamente el proceso de inducción a gran escala. En estos casos se solía inocular una fracción del volumen del vial completo de BL21 (DE3) por cada 250 ml de LB. A título orientativo, para la rotura de las células procedentes de 1 l de cultivo se empleaban 30 ml de PBS 1X con PMSF 1mM y se suministraban 10 pulsos de ultrasonidos con la bocina de 13 mm y la punta estándar del aparato.

### **2.6.2 Purificación de Proteínas Recombinantes.**

Las proteínas recombinantes fusionadas con la GST se purificaron mediante cromatografía de afinidad por glutatión con la matriz *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare). Las proteínas recombinantes fusionadas con una etiqueta de seis aminoácidos histidina se purificaron mediante cromatografía de afinidad por níquel en columnas *HisTrap* (GE Healthcare). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

### **2.6.3. Ensayos de *pull down in vitro*.**

Para el *pull down*, las proteínas basadas en Brd2 fusionadas a GST habían sido purificadas previamente por cromatografía de afinidad por glutatión y en algunos casos escindidas de la GST mediante tratamiento con la enzima PreScission (GE Healthcare), siguiendo instrucciones del fabricante. Las proteínas etiquetadas con colas de 6 residuos de histidinas habían sido purificadas mediante una resina de unión a níquel (His-trap, Novagen). Para el ensayo de *pull down*, de 0,5 a 1 g de las proteínas de fusión a GST unidas a una matriz de sefarosa cargada de Glutatión (GE Healthcare) se incubaron con 500 ng de proteínas purificadas etiquetadas con colas de 6 residuos de histidinas o con un epítipo Flag en 200  $\mu$ l de tampón 1 y se lavaron con el tampón 1 y luego con el tampón 1 suplementado con 400 mM de NaCl. Las muestras se hirvieron en tampón de Laemmli y se analizaron mediante Western Blot

Para el *pull down* con los péptidos correspondientes a colas de histonas acetiladas, se utilizaron péptidos biotinilados con gran afinidad por las matrices comerciales de estreptavidina. En este caso se combinaba 1  $\mu$ g de proteína de fusión a GST con 2  $\mu$ g de péptido biotinilado (Upstate) y tampón de interacción hasta un volumen final de 200  $\mu$ l. La mezcla se incubaba a 4° C y en agitación parabólica

durante 2 h. Se añadían 15 µl de matriz magnética de estreptavidina *Dynabeads M-280 Streptavidin* (DynaL Biotech) y se completaba la incubación durante 1 h más. Posteriormente, la matriz se lavaba 3 veces con tampón de interacción utilizando el dispositivo imantado *DynaL MPC-S Magnetic Particle Concentrator* (DynaL Biotech). Se añadían 20 µl de tampón de carga desnaturante 2X y se agitaba la matriz en vortex para soltar las proteínas agregadas. La muestra se sometía a SDS-PAGE y se analizaba por *Western Blot*.

**Tampón 1:** 20mM Tris-HCl, pH 7.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 0.01% Nonidet P-40

**Tampón de interacción:** HEPES 20 mM (pH 7,5); NaCl 500 mM; EDTA 1 mM; NP-40 0,2% (v/v); BSA 0,25% (p/v); cóctel de inhibidores de proteasas *1X Complete EDTA-free* (Roche).

**Tampón de carga desnaturante 4X:** Tris-HCl 0,2 M (pH 6,8); glicerol 32% (v/v); SDS 6,4% (p/v); 2-mercaptoetanol 16% (v/v); azul de bromofenol 0,005% (p/v).

#### 2.6.4 SDS-PAGE.

Se seguía el protocolo de Laemmli para geles discontinuos de poliacrilamida en condiciones desnaturantes.

Para preparar los extractos de células animales apropiados para esta técnica, las células se recogían y resuspendían con tampón de urea. Si se trataba de células de crecimiento adherente, antes era necesario desprenderlas de sus cajas. Para ello, y tras un lavado con PBS 1X, se rascaba la superficie de las mismas con un trozo de goma plana y estéril, en presencia de este mismo tampón. Si el extracto resultaba demasiado viscoso, se podía terminar de homogeneizar con jeringuillas de 1 ml antes de proceder a su cuantificación.

Para asegurar la desnaturación proteica, las muestras se hervían durante 5 min en tampón de carga desnaturante 1X justo antes de ser aplicadas al gel. Si las proteínas de interés no superaban los 100 kDa, se añadía el patrón de masas moleculares *SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range* (Bio-Rad), con proteínas entre los 97,4 (Fosforilasa B) y los 14,4 kDa (Lisozima). Si superaban los 100 kDa, el patrón añadido era el *SDS-PAGE Molecular Weight Standards High Range* (Bio-Rad), con proteínas entre los 200 (Miosina) y los 45 kDa (Ovoalbúmina).

Las proteínas se visualizaban tras incubar el gel en una solución de azul de Coomassie a RT, durante 15 min y en agitación suave. El exceso inespecífico de tinción se contrarrestaba con 2 o 3 lavados con la solución desteñidora.

**Tampón de urea:** Tris 10 mM (pH 8); urea 8 M.

**PBS 1X:** NaCl 0,136 M; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM.

**Gel de empaquetamiento:** Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8); poliacrilamida (Acrilamida y bis-Acrilamida 29:1) 4% (v/v); SDS 0,1% (p/v). Se polimeriza con APS 0,1% (p/v) y TEMED 0,05% (v/v).

**Gel de separación:** Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8); poliacrilamida (acrilamida y bis-acrilamida 29:1) 7-12% (v/v); SDS 0,1% (p/v). Se polimeriza con APS 0,1% (p/v) y TEMED 0,05% (v/v).

**Tampón de carga desnaturizante 4X:** Tris-HCl 0,2 M (pH 6,8); glicerol 32% (v/v); SDS 6,4% (p/v); 2-mercaptoetanol 16% (v/v); azul de bromofenol 0,005% (p/v).

**Tampón de electroforesis:** Tris 25 mM; glicina 192 mM (pH 8,3); SDS 0,1% (p/v).

**Solución de azul de Coomassie:** Coomassie R-250 (SIGMA) 0,1% (p/v); ácido acético 10% (v/v); metanol 40% (v/v).

**Solución desteñidora:** ácido acético 10% (v/v); metanol 40% (v/v).

## 2.6.5 Determinación de la Concentración de Proteínas.

Los extractos de células para SDS-PAGE se cuantificaron según el método de Bradford, usando el reactivo de Bio-Rad según las instrucciones del fabricante. Para las rectas patrón se utilizaban cantidades crecientes de una solución comercial de BSA de concentración conocida (TaKaRa).

## 2.6.7 Sistema de Dos Híbridos en levaduras.

El sistema de dos híbridos *DUALhybrid Kit* (Biotech) se utilizó para investigar interacciones proteína-proteína.

Su fundamento es el siguiente: la secuencia de una proteína problema se clonaba fusionada a la del dominio de unión al DNA (DBD) del factor transcripcional dimérico LexN (en el plásmido pLexAN, que permite el crecimiento de la levadura en medio sin triptófano). A su vez, la secuencia de otra proteína problema se clona fusionada a la de su dominio de transactivación (AD) (en el plásmido pGAD-HA, que permite el crecimiento de la levadura en medio sin leucina). Si existe interacción entre ambas, el factor transcripcional queda reconstituido y es capaz de activar la transcripción de los genes reporteros de la estirpe NMY51 de *S. cerevisiae*, como *HIS3* (que permite el crecimiento en medio sin histidina) o *LacZ* (cuya expresión produce color en los ensayos con 2-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) y X-Gal), entre otros.

Utilizando como *cebo* una construcción de expresión de un fragmento carboxilo-terminal de Brd2, este sistema fue aprovechado para rastrear una genoteca de cDNA en busca de nuevas interacciones. Se eligió para ello una genoteca comercial de embrión de ratón de 11 dpc clonada en el plásmido pGAD-HA (Biotech).

Antes de las transformaciones masivas necesarias para analizar toda la genoteca (al menos  $10^6$  dobles transformantes), fue necesario valorar la activación de *HIS3* que provocaban por sí solas las proteínas *cebo* y que podía provocar el crecimiento de numerosos falsos positivos. Estas *pruebas de autoactivación* se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante e implicaban la adición al medio selectivo final de 3AT, un inhibidor competitivo del producto de *HIS3* que, a la concentración apropiada, era capaz de contrarrestar esa activación basal pero no una activación más potente provocada por una interacción real del sistema. La concentración de 3AT utilizada en el escrutinio de esta tesis fue de 3 mM.

Los dobles transformantes capaces de crecer en medio selectivo sin histidina y con 3AT se sometían a ensayos cualitativos de actividad  $\beta$ -galactosidasa, a modo de segunda verificación. Si ésta resultaba positiva, sus plásmidos pGAD-HA eran extraídos y su secuencia analizada.

Si se deseaba concretar qué dominios estaban implicados en las interacciones descubiertas, se procedía de la misma manera pero subdividiendo las secuencias originales y comparando, mediante ensayos cuantitativos de actividad  $\beta$ -galactosidasa, los diferentes niveles de expresión de *LacZ* generados por cada par de plásmidos.

#### **2.6.8. Ensayo de la actividad $\beta$ -Galactosidasa.**

Para el análisis de la actividad  $\beta$ -Galactosidasa, se sembraban las colonias problema y sus controles en cajas de medio selectivo de 10 cm de diámetro y se incubaban a 30° C durante 72 h. Una vez se adquiría la biomasa suficiente, se calentaban 5 ml de tampón de fosfato potásico 1 M (pH 7) a 50° C, se fundían 5 ml de agarosa 1% (p/v) en H<sub>2</sub>O Milli-Q y se dejaban reposar a la misma temperatura. Todo lo anterior se combinaba con 100  $\mu$ l de SDS 10% (p/v), 600  $\mu$ l de N, N'-dimetil-formamida (DMF) y 100  $\mu$ l de X-Gal 4% (p/v) en DMF y la mezcla se vertía directamente sobre las levaduras. La caja se dejaba secar durante 5 min y se incubaba en oscuridad a 30° C. Los resultados eran visibles tras un periodo de entre 30 min y 12 h, según la estabilidad de la interacción.

**Tampón de fosfato potásico 1 M (pH 7):** 174,2 g/l de  $K_2HPO_4$ ; 136,1 g/l de  $KH_2PO_4$ .

### **2.6.9. Extracto diferencial con distintas cantidades de sal.**

Para el extracto diferencial,  $3,5 \times 10^6$  células P19 se resuspendían primero en 250  $\mu$ l de tampón A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, Complete protease inhibitor cocktail (Roche)) con 100 mM de NaCl. Tras 10 minutos de incubación a 4°C y una centrifugación de 10 min a 3.500xG, el sobrenadante resultante constituía la fracción A y el pellet resultante se incubaba con 250  $\mu$ l del mismo tampón pero en este caso contenía una concentración de NaCl de 520 mM. Tras 30 min de incubación a 4°C, se centrifugaba a 12.000xG durante 15 min y el sobrenadante resultante constituía la fracción B. Se analizaban por *Western Blot* 12  $\mu$ l de cada fracción.

## **2.7. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS.**

### **2.7.1. Experimentos de *Western Blot*.**

Para realizar los ensayos de *Western Blot*, en vez de teñir las proteínas analizadas mediante SDS-PAGE, éstas se transferían a una membrana de nitrocelulosa *Trans-Blot<sup>®</sup> Transfer Medium* (Bio-Rad) o de PVDF (Biorad). La transferencia se llevaba a cabo con un aparato de transferencia semi-seca *Fastblot B 33* (Biometra).

El proceso se verificaba tiñendo las proteínas de la membrana con una solución de rojo Ponceau S, tras lo cual se añadía solución de bloqueo durante 1 h. Los anticuerpos contra la proteína problema (anticuerpos primarios) se añadían en la misma solución, y se dejaban actuar durante 90 min en una cámara húmeda. Posteriormente, la membrana se lavaba durante 3 periodos de 8 min con solución de lavado y se incubaba de nuevo durante 45 min con anticuerpos conjugados con peroxidasa, capaces de reconocer la región constante de los primarios. Tras 3 nuevos lavados, la membrana se revelaba con el sistema de inmunodetección quimioluminiscente *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de la señal luminosa se utilizaban películas fotográficas *Hyperfilm MP* (GE Healthcare) y el aparato Hyperprocessor SRX-101A (GE Healthcare).

**Tampón de transferencia semi-seca:** Tris 48 mM; SDS 0,0375% (p/v); glicina 39 mM; metanol 40% (v/v).

**Solución de bloqueo:** leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana) 5% (p/v) en solución de lavado o BSA (SIGMA) 5% (p/v) en solución de lavado.

**Solución de lavado (PBT):** monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween-20) 0,1% (v/v) en PBS 1X.

**PBS 1X:** NaCl 0,136 M; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM.

**Solución de rojo Ponceau S:** Ponceau S (SIGMA) 0,1% (p/v); ácido acético 5% (v/v).

## 2.7.2 Inmunoprecipitación de proteínas.

Tras un lavado con PBS 1X, las células de una caja de 10 cm de diámetro (5·10<sup>6</sup> células) se desprendían mediante un rascador en presencia de 1 ml de PBS frío. Después, y siempre en hielo, las células se rompían en un tubo de 1,5 ml mediante incubación con 250 µl de tampón IP. Tras incubar durante 10 min en agitación y a 4°C, se añadía gota a gota NaCl hasta una concentración final de 600 mM. Tras incubar 10 min en agitación a 4°C, se centrifugaba a 3.500xG durante 10 min a 4°C y se descartaba el pellet. El sobrenadante se diluía 3 veces con tampón de dilución. Se utilizaban 400 ng de proteína total por ensayo y se incubaban toda la noche con 30 µl de una matriz anti-flag M2 Affinity Gel (SIGMA) equilibrada al 50% en tampón IP, en el caso de proteínas transfectadas. Para proteínas endógenas, se utilizaban 30 µl de matriz *rProtein A Sepharose 4 Fast Flow* (GE Healthcare) equilibrada al 50% en tampón IP. Las mezclas se incubaban a 4° C y en agitación parabólica durante 1 h. Con esto se eliminaba el posible *ruido de fondo* debido a la unión inespecífica a la matriz de algunas proteínas del extracto. En el caso de las proteínas endógenas, los sobrenadantes se incubaban o/n, a 4° C y en agitación parabólica con la cantidad apropiada de anticuerpo capaz de precipitar la proteína de interés (siguiendo instrucciones del fabricante ó 5 µl del suero del anticuerpo anti-mBrd2l generado en el laboratorio, según el caso). En el caso de las proteínas endógenas, se añadían a cada tubo 30 µl de matriz *Protein A Sepharose 4 Fast Flow* equilibrada al 50% en tampón IP. Las mezclas se incubaban a 4° C y en agitación parabólica durante 1 h. Durante este tiempo la matriz quedaba unida a la región constante de los anticuerpos presentes en las muestras. En cualquier caso, la matriz de cada tubo se lavaba 3 veces con tampón de lavado y se resuspendía agitando en vortex con 20 µl de tampón de carga desnaturizante 2X. Las muestras se analizaban mediante SDS-PAGE y experimentos de *Western Blot*.

**PBS 1X:** NaCl 0,136 M; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM.

**Tampón IP:** 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, Complete protease inhibitor cocktail (Roche), 150 mM NaCl.

**Tampón de dilución:** 50 mM Tris-HCl pH 7.5, Complete protease inhibitor cocktail (Roche).

**Tampón de lavado:** 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,3% Triton X-100, Complete protease inhibitor cocktail (Roche), 150 mM NaCl.

**Tampón de carga desnaturizante 4X:** Tris-HCl 0,2 M (pH 6,8); glicerol 32% (v/v); SDS 6,4% (p/v); 2-mercaptoetanol 16% (v/v); azul de bromofenol 0,005% (p/v).

### 2.7.3 Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP).

1 x 10<sup>6</sup> células HEK293T o P19 sembradas en placas de 100 mm se transfectaban con lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se fijaban 48 horas después añadiendo la solución de fijación, que contenía formaldehído, directamente al medio de cultivo (la concentración final de formaldehído era 1%) y se incubaba 10 min a 37°C. Luego, la fijación se paraba añadiendo Glicina a una concentración final de 0,1M e incubando la placa durante 5 min a temperatura ambiente. El medio se cambiaba y las células se lavaban dos veces usando PBS frío complementado con el coctel de inhibidores de proteasas Complete (Roche). Luego, las células se recogían con un rascador en PBS con inhibidores y se centrifugaban durante 5 min a 3600 x g y 4°C y se resuspendían en 1 ml de tampón de lisis. El lisado se sonicaba en hielo para obtener fragmentos de DNA de entre 400 y 500 pb usando un baño de ultrasonidos *Bioruptor* (Diogenode), fijado a la máxima potencia y con ciclos de encendido y apagado de 30 segundos durante 7,5 minutos. Después de la sonicación, el material se centrifugaba 5 min a 3600 x g y 4°C para tomar el sobrenadante (cromatina) y descartar el pellet (restos celulares). Una alícuota de la cromatina se trataba con Proteinasa K y el DNA se recuperaba mediante extracción con fenol/cloroformo para cuantificar la concentración del DNA y comprobar el tamaño de los fragmentos de DNA en un gel de agarosa al 1,2%.

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación de la cromatina, se utilizaban de 20 a 30 µg de cromatina diluida 10 veces en tampón de *ChIP*. Para reducir la precipitación inespecífica, la cromatina diluida se incubaba con 30 µl de matriz de Agarosa conjugada a proteína A (GE Healthcare) bloqueada con DNA de esperma de salmón y BSA durante 4 horas a 4°C en agitación. La cromatina se separaba de la matriz por centrifugación, se le añadían 30 µl de una matriz de sefarosa conjugada con anticuerpos que reconocen el epítipo Flag (Sigma) al 50% en tampón de *ChIP*, y se

incubaba durante toda la noche a 4°C en agitación. En el caso de que se inmunoprecipitara la proteína Brd2 endógena, se añadían a la cromatina 20 µl del suero de conejo que contenía el anticuerpo anti-mBrd2N (o el mismo volumen de suero pre-inmune como control) y se incubaba toda la noche a 4°C en agitación. En este último caso, a la mañana siguiente se añadían 30 µl de matriz de Agarosa conjugada a proteína A (GE Healthcare) bloqueada con DNA de esperma de salmón y BSA y se incubaba durante 2 horas a 4°C en agitación. En todos los casos, se retiraba una alícuota de cromatina para el análisis de la cantidad inicial de DNA problema en cada caso. Tras la incubación, la matriz se compactaba por centrifugación (1 min a 1500 x g a 4°C) y el sobrenadante, que contenía cromatina no retenida, se descartaba. La matriz se lavaba durante 5 min a 4°C en rotación con cada uno de los tres tampones de lavado (1, 2 y 3) y luego dos veces con el tampón TE. El DNA se eluía incubando dos veces la matriz lavada con tampón de elución durante 15 min a temperatura ambiente y en rotación. El sobrenadante se recuperaba por centrifugación (5 min a 1500 x g a temperatura ambiente) y se añadía NaCl 0,2M a las muestras para incubarlas toda la noche a 65°C y revertir la fijación inicial con paraformaldehído. Posteriormente, se trataban las muestras con Proteínasa K y el DNA se recuperaba mediante extracción con fenol/cloroformo. El DNA se precipitaba con 100% de etanol, 10% de acetato sódico y 0,1% de glicógeno, lavando con 70% de etanol y finalmente se resuspendía el pellet de DNA en 30-40 µl de agua libre de DNAsas.

La cuantificación de las regiones de interés del DNA resultante se realizaba mediante PCR a tiempo real con el sistema 7500 FAST Real-Time PCR System de Applied Biosystems.

**Tampón de fijación:** 50mM Hepes pH8.0; 0.1M NaCl; 1mM EDTA pH8.0; 0.5mM EGTA pH8.0.

**Tampón de lisis:** 5mM Pipes pH8.0; 85mM KCl; 0.5% NP-40

**Tampón de lisis nuclear:** 1% SDS; 10mM EDTA pH8.0; 50mM Tris-HCl pH8.1

**Tampón de *ChIP*:** 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100; 1.2 mM EDTA pH8.0; 16.7 mM Tris-HCl pH8.1; 167mM NaCl

**Tampón de lavado 1:** 0.1% SDS; 1% Triton-X100; 2mM EDTA pH8.0; 20mM Tris-HCl pH8.1; 150mM NaCl

**Tampón de lavado 2:** 0.1% SDS; 1% Triton-X100; 2mM EDTA pH8.0; 20mM Tris-HCl pH8.1; 500mM NaCl

**Tampón de lavado 3:** 0.25M LiCl; 1% NP-40; 1% Sodium Deoxycholate; 1mM EDTA pH8.0; 10mM Tris-HCl pH8.1

**Tampón de elución:** 1% SDS, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>

#### **2.7.4 Inmunofluorescencia en Células Animales.**

Para estos experimentos las células se cultivaban en placas de doce pocillos sobre cubreobjetos de vidrio previamente esterilizados. Se lavaban los cubreobjetos con PBS 1X y las células se fijaban con paraformaldehído (PFA) 3,75% (p/v) en PBS 1X durante 10 min (30 segundos para visualizar la proteína Brd2 endógena). Las células se permeabilizaban con Triton X-100 0,5% (v/v) en PBS 1X durante 15 min (Tween 0,01% en PBS 1X en el caso de la proteína Brd2 endógena). Los cubreobjetos se sometían a 3 lavados con Triton X-100 0,25% (v/v) en PBS 1X (PBT) o Tween 0,01% en PBS 1X (PBT2) en el caso de la proteína Brd2 endógena. Los cubreobjetos se bloqueaban durante 1 h con solución de bloqueo y después se incubaban en la misma solución con la cantidad adecuada del anticuerpo capaz de reconocer la proteína de interés (anticuerpo primario). La incubación se llevaba a cabo en una cámara húmeda durante 90 min. Los cubreobjetos se sometían a 3 lavados con PBT o PBT2. Los cubreobjetos se incubaban durante 45 min en solución de bloqueo con el anticuerpo capaz de detectar la región constante del anticuerpo primario (anticuerpo secundario). La incubación se llevaba a cabo en una cámara húmeda durante 45 min y en oscuridad. Los cubreobjetos se sometían entonces a 3 lavados con PBT o PBT2. En el último se podía añadir 4'-6-Diamino-2-fenil-indol (DAPI) 0,1 µg/ml para teñir el núcleo. Si esto se hacía eran necesarios varios lavados rápidos adicionales con H<sub>2</sub>O Milli-Q para eliminar su exceso. Las muestras se montaban y sellaban en portaobjetos para su visualización al microscopio. Para ello se usaba una mezcla comercial de glicerol 80% (v/v) en PBS 1X (Vectashield, Vector), así como laca de uñas.

En el caso de los experimentos llevados a cabo para detectar la incorporación del análogo de timidina 5-Bromo-2'-desoxi-uridina (BrdU) en el DNA celular, las células se incubaban con (50 µM) de BrdU durante 2 horas antes de procesarlas. Después del bloqueo, las células se trataban con HCl 2M a 37°C durante 10 min. Luego, se restablecía el pH del tampón tratando con Bórax (0,1 M) durante 10 min y se lavaba 3 veces cada cubre con PBT. En el caso control en el que se visualizaba la transfección por expresión de GFP, dicha proteína se detectó con anticuerpos específicos.

**PBS 1X:** NaCl 0,136 M; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM.

**Solución de bloqueo:** suero fetal bovino 10% (v/v) en PBT o PBT2.

#### **2.7.5 Inmunofluorescencia en embriones de pollo y ratón.**

Para la inmunofluorescencia de embriones de pollo y ratón, se preparaban secciones transversales de 50  $\mu\text{m}$  de grosor con el vibratomo del tubo neural embrionario previamente diseccionado e incluido en un bloque de agarosa al 4%. Posteriormente, las secciones se bloqueaban en PBS con Triton X-100 al 0,25% y suero de burro al 5%. Los anticuerpos primarios se incubaban en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Tras realizar tres lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con PBS con Triton X-100 al 0,25%, se incubaban las muestras con los anticuerpos secundarios correspondientes en la misma solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras realizar tres lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con PBS con Triton X-100 al 0,25%, las secciones se montaron en Vecta Shield (Vector) para su análisis con un microscopio confocal.

### **2.7.6 Hibridación *in situ* de Embriones de Ratón.**

Esta técnica nos permitió analizar el patrón de expresión espacial de Brd2, Ptn y Mdk durante el desarrollo embrionario. Para poder aplicarla se necesitaba un fragmento de RNA sonda de entre 200 y 1000 bases de longitud capaz, por su condición *antisentido*, de hibridar con el mRNA del gen problema. Esta *ribosonda antisentido* se sintetizó y marcó con digoxigenina *in vitro* con la ayuda de la RNA polimerasa del fago T7 (Promega) y del sistema *DIG RNA Labeling Mix* (Roche), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. De la misma forma se sintetizó y marcó un fragmento idéntico al propio mRNA del gen, una *ribosonda sentido* que, al ser incapaz de hibridar, fue utilizada como control negativo en el experimento.

Los embriones de pollo fueron fijados a 4° C y durante 5 h en una solución de PFA 4% (p/v) en PBS 1X, mediante agitación suave. Después se procedió a su desecación, que también se realizó en agitación suave, pero a RT. Fueron 3 lavados de 5 min con cada una de las siguientes soluciones: PBS 1X, metanol 25% (v/v) en PBS 1X, metanol 50% (v/v) en PBS 1X, metanol 75% (v/v) en PBS 1X y metanol. Llegados a este punto los embriones se podían almacenar a -20° C durante algunos días, hasta la realización del experimento.

El resto del protocolo se describe a continuación.

Permeabilización de los embriones e hibridación con la sonda marcada con digoxigenina:

- A. Rehidratación de los embriones: los embriones se incubaron 5 min en metanol 75% (v/v) en PBS 1X, 5 min en metanol 50% (v/v) en PBS 1X, 5 min en metanol 25% (v/v) en PBS 1X y 3 veces de 5 min cada una en PBT.
- B. Blanqueado de los embriones: los embriones se sumergieron durante 30 min y en oscuridad en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2% (v/v) en PBT. Después se lavaron 3 veces con PBT, 5 min cada vez.
- C. Tratamiento de los embriones con una solución de Proteinasa K 10 µg/ml en PBT: los embriones de 8,5 días se trataron durante 5 min y los embriones de 10,5 días se trataron durante 10 min, siempre sin agitación. Después los embriones se sometían a 2 lavados de 5 min con PBT. A partir de aquí, la manipulación de los embriones se realiza con extremo cuidado (sin agitación) para evitar su disgregación.
- D. Post-fijación de los embriones en glutaraldehído 0,2% (p/v) y PFA 4% (p/v) en PBS 1X: 20 min a RT seguidos de 2 lavados de 5 min en PBT.
- E. Prehibridación: tras precalentar el tampón de hibridación los embriones se incubaron a 68° C durante 90 min.
- F. Hibridación: tras añadir 3 µl de ribosonda (1 µg/µl) por cada 300 µl de tampón de hibridación, los embriones se incubaron a 68° C o/n.

Lavados e incubación con el anticuerpo α-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina:

- A. Tras retirar el tampón de hibridación con la ribosonda, los embriones se lavaron con la solución 1 a 68° C y durante 3 periodos de 30 min. Después se hizo lo propio con la solución 2.
- B. Los embriones se lavaron con tampón Tris-salino con Tween-20 (TBST) 1X durante 3 periodos de 5 min y se incubaron durante 90 min y en agitación suave en una solución de suero bovino fetal inactivado 10% (v/v) en TBST 1X.
- C. Los embriones se incubaron en agitación suave, a 4° C y o/n, en una dilución 1:2000 del anticuerpo α-digoxigenina conjugado con la fosfatasa alcalina (Roche). Para ello se empleó la misma solución de suero bovino fetal inactivado 10% (v/v) en TBST 1X.

Lavado y revelado de la actividad fosfatasa alcalina:

- A. Tras lavar en agitación suave con TBST 1X durante 10 periodos de 5 min, los embriones se incubaron también en agitación suave con NTMT preparado en el momento del experimento. Fueron 3 periodos de 10 min cada uno.
- B. Los embriones se incubaron en oscuridad y sin agitación con *4-nitro blue tetrazolium chloride* (NBT) 4.5 µg/ml y *5-bromo-4-cloro-3-indolyl phosphate* (BCIP) 3.5 µg/ml en NTMT.
- C. En el momento en el que el marcaje fue lo suficientemente intenso, se lavó abundantemente con PBT.

**PBS 1X:** NaCl 0,136 M; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM.

**PBT:** Tween-20 0,1% (v/v) en PBS 1X.

**SSC 20X:** NaCl 3 M; citrato sódico 0,3 M. El pH se ajusta a 7.

**Tampón de hibridación:** formamida 50% (v/v); SSC 5X; tRNA de levadura 50 µg/ml (Roche); SDS 1% (p/v); heparina 50 µg/ml (Sigma).

**Solución 1:** formamida 50% (v/v); SSC 5X; SDS 1% (p/v).

**Solución 2:** formamida 50% (v/v); SSC 2X; Tween-20 0,1% (v/v).

**TBST 1X:** Tris-HCl 25 mM (pH 7,5); NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Tween-20 0,1% (v/v).

**NTMT:** NaCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM (pH 9,5); MgCl<sub>2</sub> 50 mM; Tween-20 0,1% (v/v).

### 2.7.7 FRET

El análisis por FRET en células P19 estaba basado en las proteínas GFP y RFP y se analizó con el programa Leica Application Suite Advanced Fluorescence. La proteína de fusión RFP-Brd2 derivada del plásmido pDsRed-monomer-Hyg-N1 (Clontech) se analizó junto con proteínas de fusión a GFP derivadas del plásmido pEGFPC2 (Clontech). Se utilizó un objetivo de inmersión HCX PL APO lambda blue 63x y se registraron las siguientes longitudes de onda: canal verde (excitación del donador/emisión del donador=488 nm/496-526 nm. AOTF 21%), el canal rojo (excitación del aceptor/emisión del aceptor=543 nm/579-661 nm. AOTF 40%) y el canal FRET (excitación del donador/emisión del aceptor= 488 nm/535-577 nm). Se obtenía un cálculo ratiométrico de la señal FRET según instrucciones del programe utilizado.

## 2.8. OTROS MÉTODOS

### 2.8.4 Citometría de Flujo.

El citómetro de flujo se utilizó para averiguar la proporción de células que se encontraba en cada fase del ciclo celular en un cultivo problema. La preparación de las muestras para citometría se llevó a cabo de la siguiente manera:

- A. Las células se recogían y se fijaban mediante la adición gota a gota de una solución con 1/10 de medio completo y 9/10 de metanol. Después se agitaban suavemente a 4° C durante 15-30 min. Si se trataba de células de crecimiento adherente, primero se desprendían de sus cajas de cultivo como si fueran a ser subcultivadas, con solución de *tripsina-EDTA* (0,05%-0,02%) 1X (PAA Laboratories).
- B. Tras dos lavados con PBS 1X, centrifugando suavemente para evitar la formación de agregados, las células se resuspendían en solución de tinción y se agitaban suavemente a RT, durante 1 h y en oscuridad.
- C. Seguidamente, las muestras se analizaban en un citómetro *BD FACSCalibur* (BD Biosciences) y los porcentajes se calculaban con la aplicación *ModFit LT* (Verity Software House).

**PBS 1X:** NaCl 0,136 M; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM.

**Solución de Tinción:** Triton X-100 0,1% (v/v); citrato sódico 0,1% (p/v); RNasa A 0,1 mg/ml; yoduro de propidio 5 µg/ml.

### 2.8.4 Electroporación de embriones de pollo.

Las electroporaciones de embriones de pollo se realizaban según se ha descrito en Itasaki et al., 1999. Brevemente, los huevos fertilizados se incubaban a 37°C hasta que el embrión alcanzara los estadios del desarrollo indicados. El DNA, resuspendido en 10 mM Tris (pH 8.0), se inyectaba en el tubo neural a nivel del tubo neural espinal torácico y las electroporaciones se llevaban a cabo mediante un

electroporador BTX820 (Quantum) con los siguientes parámetros: 6 pulsos de 25 V y 50 milisegundos a una frecuencia de 1 Hz. Para evaluar la eficiencia de electroporación se cotransfectaba sistemáticamente un vector de expresión de GFP (pEGFP-N1) y solo los embriones eficientemente electroporados se analizaban por inmunofluorescencia. Tras la electroporación, los huevos se incubaban durante 30 horas. Los embriones se extraían luego en PBS, se fijaban en paraformaldehído al 4% en PBS durante 3 horas para el análisis por inmunofluorescencia y se deshidrataban en series de metanol.

## 2.9. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS.

Las secuencias de DNA y proteínas estudiadas en este trabajo se obtuvieron de bases de datos disponibles en Internet, principalmente la del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Para la búsqueda de pautas abiertas de lectura, localización de dianas de restricción o traducción de secuencias nucleotídicas se utilizó la aplicación *DNA Strider 1.3*, diseñada por Christian Mark (Service de Biochimie, Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, Francia). Alternativamente, también se empleó el programa informático *pDRAW32* (Acaclone Software). Para el diseño de cebadores de PCR se utilizó la aplicación *Amplify 1.2*, diseñada por B. Engels (Department of Genetics, University of Wisconsin, EE.UU.).

La búsqueda de secuencias similares a una dada entre las contenidas en las bases de datos se realizó con la aplicación BLAST, disponible en [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Para la identificación de dominios en secuencias proteicas se empleó la aplicación SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*), disponible *online* en [smart.embl-heidelberg.de](http://smart.embl-heidelberg.de).

La elección de secuencias dentro del mRNA de los genes para el diseño de shRNAs (*short hairpin RNAs*) efectivos se realizó con la ayuda de la aplicación *siRNA Target Finder*, de dominio público en [www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html).

Por último, para los alineamientos de secuencias de proteínas se utilizó el programa CLUSTAL-X.

El número de acceso de las secuencias de aminoácidos utilizadas en los alineamientos de secuencias era:

hBrd2: NP\_001106653.1

hBrd3: NP\_031397.1

hBrd4: NP\_490597.1

hBrdt: NP\_001229735.1

mBrd2: NP\_034368.2

gBrd2: NP\_001025845.1

xBrd2: NP\_001128282.1

cBrd2: NP\_871879.1

oBrd2: BAD93258.1

dBrd2: NP\_001259321.1

sBdf1: CAA79377

sBdf2: CAA98636.1



### **3. RESULTADOS**

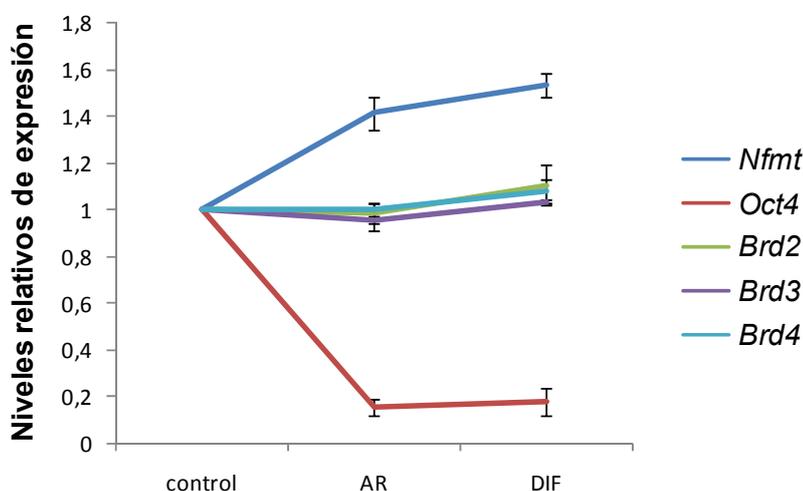
#### **3.1. Análisis funcional de distintos dominios de la proteína Brd2**

##### **3.1.1. Las secuencias NLS1 y NLS2 están implicadas de manera independiente en la localización nuclear de Brd2**

Teniendo en cuenta que la función mejor caracterizada de la proteína Brd2 es su papel en la transactivación de genes importantes para la progresión del ciclo celular, como *CcnD1*, *CcnA2* o *Dhfr*, (Denis et al., 2000; LeRoy et al., 2008; Sinha et al., 2005) y la creciente evidencia del papel que factores implicados en la regulación del ciclo celular desempeñan en la diferenciación neuronal (McClellan et al., 2006), resulta de gran interés el estudio de la implicación de Brd2 en la coordinación de los procesos de división celular y diferenciación neuronal. Dicho interés se ve reforzado por la abundante expresión del gen *Brd2* en el sistema nervioso central de embriones de ratón (Crowley et al., 2004; Gyuris et al. 2009; Shang et al., 2009; Shang et al., 2011; Taniguchi et al., 2001), por los defectos en el desarrollo del tubo neural asociados a la ausencia de la proteína Brd2 (Gyuris et al., 2009) y por la evidencia de que la proteína Brd2 se detecta tanto en progenitores en proliferación como en neuronas postmitóticas en el tubo neural y en los ganglios de la raíz dorsal del embrión de ratón (Crowley et al., 2004). Otro aspecto interesante de la proteína Brd2 consiste en que tanto en el tubo neural como en los ganglios de la raíz dorsal del embrión de ratón, si bien la proteína se detecta en el núcleo en progenitores neuronales que proliferan, su localización se vuelve parcialmente citoplásmica en neuronas postmitóticas (Crowley et al., 2004).

Las células P19, derivadas de un teratocarcinoma de ratón (Jones-Villeneuve et al., 1982) se pueden diferenciar *in vitro* a tipos celulares de linaje endodérmico, mesodérmico y ectodérmico (McBurney et al., 1982). Se ha demostrado que el tratamiento de células P19 con ácido retinoico induce su diferenciación neuronal (Jones-Villeneuve et al., 1983). El protocolo de diferenciación incluye dos fases (Jones-Villeneuve et al., 1983). En la primera fase las células se mantienen en suspensión en presencia de ácido retinoico durante 4 días. En este período se induce una parada del ciclo celular en la fase G1 y las células se agregan formando unas estructuras esféricas llamadas cuerpos embrioides. En la segunda fase los cuerpos embrioides se disgregan y se transfieren a placas adherentes donde se mantienen varios días en ausencia de ácido retinoico. En este período tiene lugar la emisión de neuritas y se produce la diferenciación terminal. Se ha escogido este modelo de

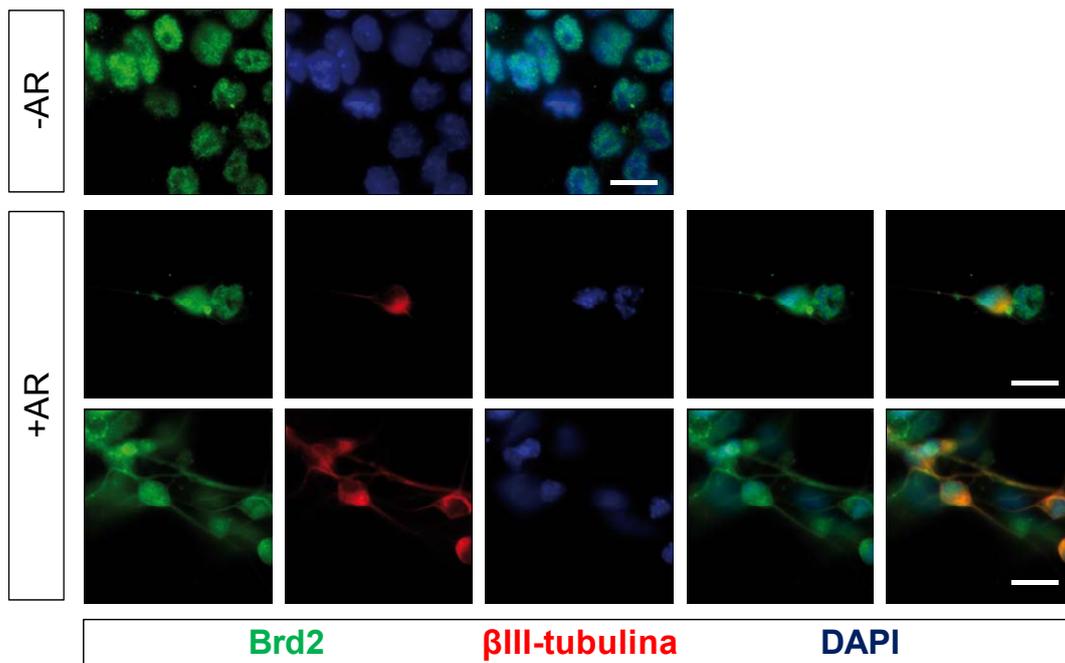
diferenciación neuronal para analizar en primer lugar la expresión de los genes *Brd2*, *Brd3* y *Brd4* durante el proceso de diferenciación neuronal. En la Figura 7, en la que se representa el nivel relativo de expresión de los genes *Brd2*, *Brd3* y *Brd4* en células P19 en condiciones de crecimiento, tratadas con ácido retinoico durante 4 días y tras 6 días en placas adherentes después de retirar el ácido retinoico, se observa que la expresión de dichos genes se mantiene a lo largo del proceso de diferenciación neuronal. En el análisis se incluye el nivel de expresión del gen *Oct4*, marcador de pluripotencia cuya expresión es reprimida al inicio del programa de diferenciación (Yamada et al., 2013) y la expresión del gen *Nfnt* (neurofilamentos), marcador neuronal que se activa tras la inducción de la diferenciación neuronal (Weber et al., 1983).



**Figura 7. Los niveles de expresión de los genes *Brd2*, *Brd3* y *Brd4* se mantienen tras inducir el proceso de diferenciación neuronal en células P19.** Niveles de expresión de los genes indicados determinados mediante PCR en tiempo real a partir de cDNA obtenido por retrotranscripción de RNA total de células P19 no tratadas (control), tratadas con ácido retinoico durante 4 días (AR) o diferenciadas a neuronas (DIF) tras 6 días de cultivo en placas adherentes después del tratamiento con ácido retinóico. La expresión de *Oct4*, marcador de pluripotencia, se reduce drásticamente al principio del proceso de diferenciación mientras que la expresión de *Nfnt*, marcador específico de neuronas, se incrementa a lo largo del proceso. El valor de expresión para cada gen y condición se normalizó respecto al valor de expresión del gen control de expresión constitutiva *Gapdh* en cada condición. Los valores representados se relativizaron al valor de expresión correspondiente a células P19 no diferenciadas (control). En la gráfica se han representado valores medio y desviación estándar correspondientes a tres determinaciones independientes.

Teniendo en cuenta que el gen que codifica la proteína Brd2 mantiene sus niveles de expresión a lo largo del proceso de diferenciación neuronal, se procedió a continuación a analizar la expresión de la proteína en células en condiciones de

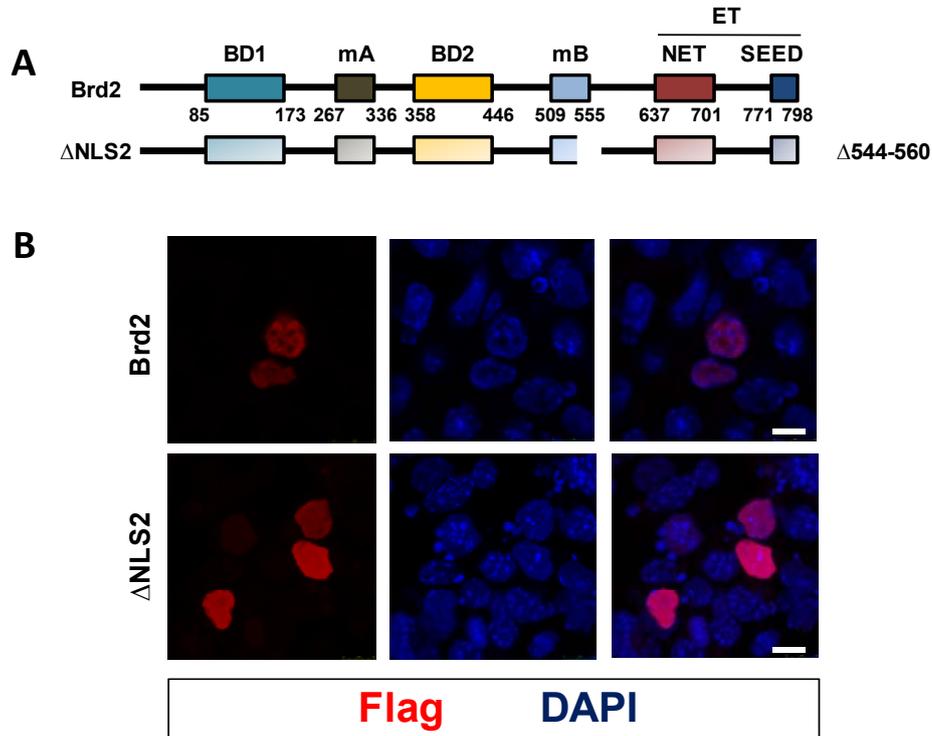
crecimiento y de diferenciación. Para ello se utilizaron anticuerpos desarrollados en nuestro laboratorio que reconocen selectivamente la proteína Brd2 de ratón. Mediante experimentos de inmunofluorescencia se detectó la proteína en el núcleo de células P19 en condiciones de crecimiento y parcialmente en el citoplasma tras inducir el proceso de diferenciación neuronal (Figura 8).



**Figura 8. Localización de la proteína Brd2 endógena en células P19.** Inmunofluorescencia de células P19 en condiciones de proliferación (-AR) y tras aplicarles el protocolo completo de diferenciación mediado por ácido retinoico (+RA). La proteína endógena Brd2 se detectó con anticuerpos obtenidos contra Brd2 (verde) y el marcador neuronal  $\beta$ III-tubulina con el anticuerpo Tuj-1 (rojo). El DNA se tiñó con DAPI. La barra de escala equivale a 20  $\mu$ m.

Este cambio de localización puede ser relevante para el proceso de diferenciación neuronal e implicar una alteración de las funciones de Brd2. Un cambio de localización celular de Brd2 ha sido previamente descrito en fibroblastos de ratón BALB/3T3, donde la proteína aparece parcialmente en el citoplasma en células cultivadas en ausencia de suero. La adición de suero al cultivo tiene un efecto mitogénico e induce la acumulación de Brd2 en el núcleo, perdiéndose la señal citoplásmica (Guo et al., 2000). En esta línea celular, se ha demostrado que la secuencia conservada KKKK RK (que incluye los residuos de aminoácido 552 a 557), constituye una señal de localización nuclear o NLS (*Nuclear Localization Signal*) responsable de la acumulación de Brd2 en el núcleo tras la adición de suero (Guo et

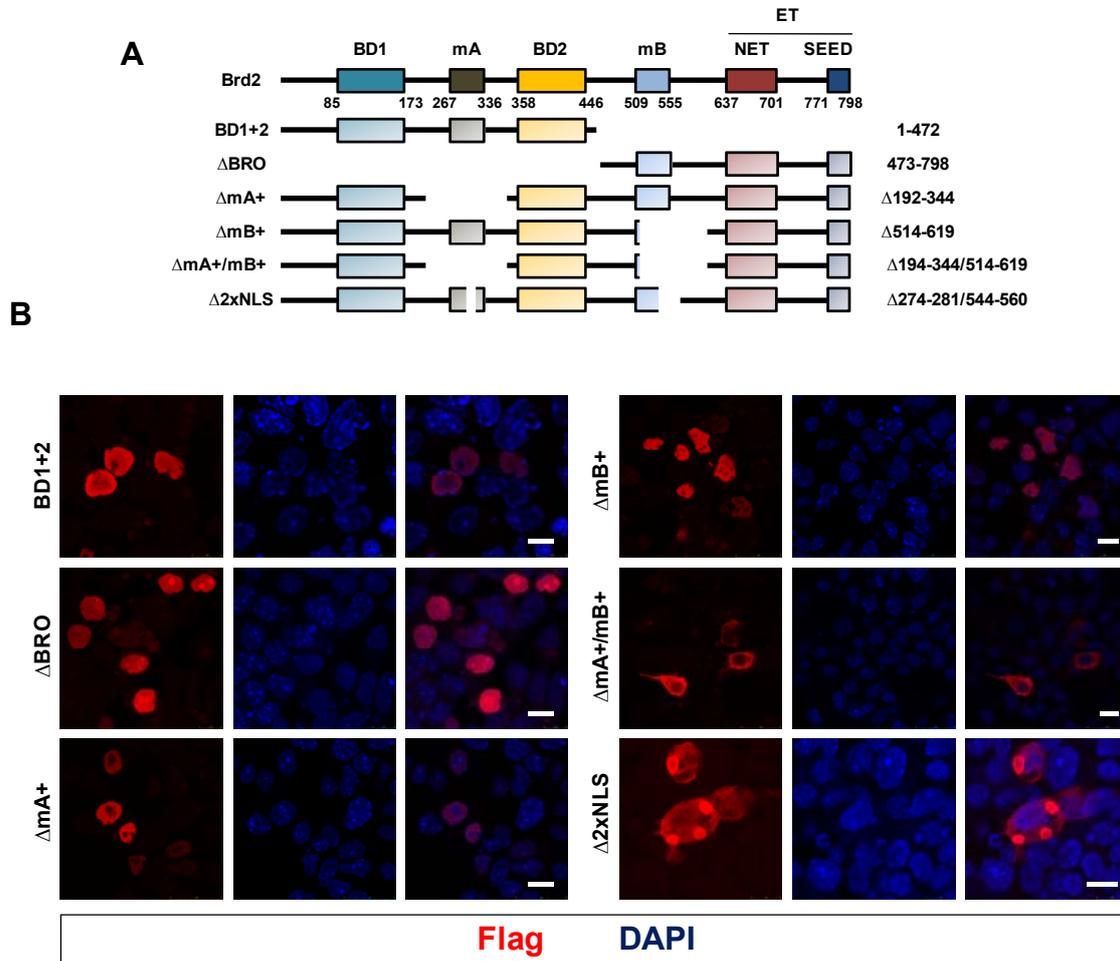
al., 2000). Esta NLS se encuentra en una región conservada localizada entre el segundo bromodominio y el dominio ET, denominada motivo B (Paillisson et al., 2007), y no estudiada previamente. Sin embargo, se comprobó que en células P19 la pérdida de esta secuencia no impedía la localización nuclear de la proteína (Figura 9).



**Figura 9. La pérdida de la región NLS2 no afecta a la localización subcelular de Brd2. (A)** Esquema de las proteínas analizadas. Se indica a la derecha la deleción ( $\Delta$ ) realizada en la construcción  $\Delta$ NLS2. **(B)** Localización celular de las proteínas indicadas etiquetadas con un epítipo Flag expresadas en células P19 mediante transfección transitoria. Las proteínas se visualizaron mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos contra el epítipo Flag y microscopía confocal. El DNA se tiñó con DAPI. Las imágenes son representativas de al menos el 95% de 75 células analizadas. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m. BD1, bromodominio 1; BD2, bromodominio 2; mA, motivo A; mB, motivo B; ET, dominio extra terminal; NET, dominio N-terminal del dominio ET; SEED, dominio rico en residuos de S, T, E y D.

Con el objetivo de definir el dominio o los dominios involucrados en la localización nuclear de Brd2 en células P19, se analizó mediante inmunofluorescencia, la localización celular de distintos fragmentos de la proteína Brd2 etiquetados con un epítipo Flag (Figura 10A). Así, se comprobó que tanto la mitad amino-terminal (fragmento BD1+2, que incluye los residuos de aminoácido 1 a 472) como la mitad carboxilo-terminal (fragmento  $\Delta$ BD1+2 que incluye los residuos de aminoácido 473 a

798) de Brd2 mostraban una localización nuclear, lo cual indicaba la presencia de secuencias implicadas en el importe nuclear en cada una de las mitades (Figura 10).



**Figura 10. Localización celular de distintos fragmentos de la proteína Brd2.** (A) Esquema de los distintos fragmentos de la proteína Brd2 analizados. En la parte superior se indican los distintos dominios descritos en la proteína Brd2. Los números indican los residuos de aminoácido que delimitan los distintos dominios. A la izquierda se muestra el nombre utilizado para designar cada fragmento y a la derecha se indican los aminoácidos que constituyen, o de los que carece ( $\Delta$ ), cada proteína. (B) Localización celular de las proteínas indicadas en el esquema etiquetadas con un epítipo Flag, expresadas en células P19 y visualizadas mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal con anticuerpos contra el epítipo Flag. El DNA se tiñó con DAPI. Las imágenes son representativas de al menos el 95% de 70-100 células analizadas por construcción. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

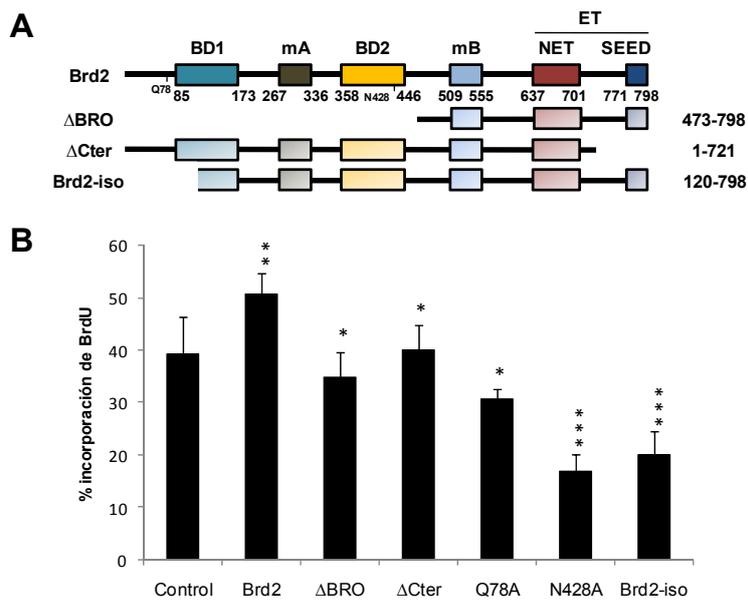
Un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas Brd2, Brd3 y Brd4 de ratón revela la presencia de dos secuencias conservadas ricas en residuos básicos (Figura 11): las secuencias 274KKKGVKRK281 y 544KREKKKKKKRKEKH560, localizadas respectivamente en dos regiones conservadas y designadas previamente como motivos A y B (Paillisson et al., 2007).



### 3.1.2. Mutaciones en los bromodominios de Brd2 tienen un efecto dominante negativo sobre la incorporación de BrdU

Teniendo en cuenta el papel de la proteína Brd2 en la transactivación de genes de ciclo celular, se investigó el efecto de la sobreexpresión de la proteína Brd2 y de versiones mutantes de éstas en la incorporación de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), nucleótido sintético análogo de la timidina que se incorpora en el DNA durante la replicación del mismo (fase S del ciclo celular). Para los ensayos de incorporación, el BrdU se añadía al medio de cultivo dos horas antes de procesar las células. Teniendo en cuenta que se ha descrito que la asociación de Brd2 a la cromatina tiene lugar a través de los bromodominios (Dey et al., 2003) y que Brd2 interacciona con el factor de transcripción E2F1 a través de la región carboxilo-terminal (Denis et al., 2000), también se incluyeron en los ensayos versiones de Brd2 carentes de la mitad amino-terminal ( $\Delta$ BRO), que incluye los bromodominios, o de la región carboxilo-terminal implicada en la interacción con el factor E2F1 ( $\Delta$ Cter). Además se ha descrito que el cambio de glutamina a alanina en la posición 78 de Brd2 (Q78A) y el cambio de asparagina a alanina en la posición 382 (N382A) afectan respectivamente a la capacidad del primer y el segundo bromodominio de Brd2 para interaccionar *in vitro* con un péptido correspondiente a la cola de la histona H4 acetilada en la lisina 12 (Nakamura et al., 2007; Huang et al., 2007). Por lo tanto, para evaluar el efecto de la pérdida de función de cada bromodominio por separado, también se incluyeron en este análisis los mutantes Q78A y N382A de Brd2. Por último, se ha indicado que el gen *Brd2* da lugar a dos transcritos de diferente tamaño (3,8 Kb y 4,6 Kb) en la mayoría de los órganos analizados (Thorpe et al., 1998), de los cuales sólo el transcrito de 3,8 Kb da lugar a una proteína Brd2 completa (Shang et al., 2011). Se han propuesto dos codones de inicio de la traducción en este transcrito (Thorpe et al., 1998). Estos codones de inicio de la traducción (ATG1 y ATG2) se localizan en regiones del transcrito que corresponden a exones diferentes. Existe otro transcrito alternativo de 3 Kb del gen *Brd2* específico de testículos (Thorpe et al., 1998) y que sólo incluye el segundo de los dos codones de inicio de la traducción. Si bien la proteína Brd2 completa se traduce a partir de ATG1, el transcrito de 3Kb solo incluye en su secuencia ATG2, por lo que la proteína de Brd2 traducida a partir de ese transcrito carece de los primeros 119 residuos de aminoácido, y por lo tanto de parte del primer bromodominio (Thorpe et al., 1998). La funcionalidad de esta isoforma alternativa (Brd2-iso) no había sido caracterizada previamente y decidimos incluirla en nuestro estudio de incorporación de BrdU. En la Figura 12A se muestra un esquema de las distintas proteínas utilizadas en los ensayos de incorporación. Tras transfectar

células P19 con vectores de expresión de las proteínas indicadas etiquetadas con un epítipo Flag, y después de someterlas a un pulso de dos horas en presencia de BrdU, las células se analizaron mediante inmunofluorescencia para detectar el epítipo Flag y la molécula BrdU. Como control, todas las construcciones se co-transfectaron con un vector de expresión de la proteína GFP. En la Figura 12B se muestra la proporción de células que incorporaban BrdU, respecto del total de células transfectadas (células que expresaban la proteína GFP).



**Figura 12. Efecto de la sobreexpresión de distintos mutantes de la proteína Brd2 sobre la incorporación de BrdU. (A)** Esquema de las proteínas analizadas. Se indica la posición de los residuos de aminoácido Q78 y N428, mutados en las construcciones Q78A y N428A respectivamente. **(B)** Porcentaje de incorporación de BrdU, tras un pulso de dos horas, en células P19 transfectadas con vectores de expresión de las proteínas indicadas. Como control se utilizó el vector de expresión vacío. La molécula BrdU se detectó mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra BrdU. Todas las construcciones se cotransfectaron con un vector de expresión de la proteína GFP y el porcentaje de incorporación se refirió en cada caso al total de células transfectadas, determinado por expresión de este marcador. Se representa el valor medio y la desviación típica correspondiente a tres experimentos independientes. La significación de las diferencias respecto al control se analizó estadísticamente mediante la prueba t de Student, obteniéndose los siguientes valores de significación respecto a las diferencias con el control: \* $P=0.2-0.8$ , \*\* $P=0.1$ , \*\*\* $P<0.02$ .

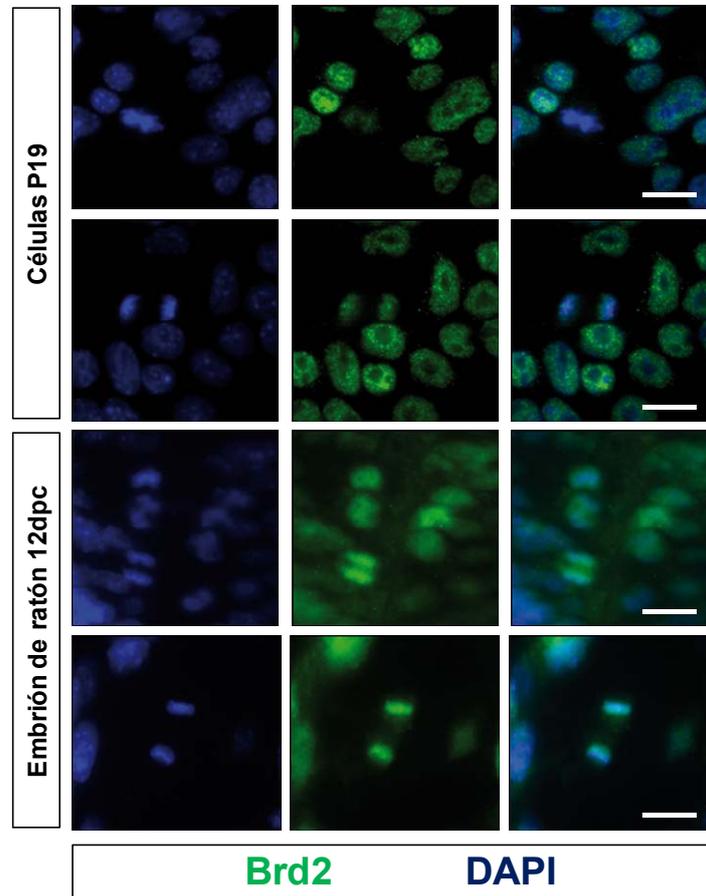
Como se observa en la Figura 12, la sobreexpresión de las proteínas ΔBRO y ΔCter no tuvo un efecto significativo sobre la incorporación de BrdU respecto al caso control y respecto a la sobreexpresión de Brd2, que indujo un pequeño aumento en la proporción de células que incorporaban BrdU. En cambio, la sobreexpresión de las

proteínas N428A y Brd2-iso, provocó una disminución significativa en la proporción de células que incorporaban BrdU, lo que indicaría que mutantes en los bromodominios podrían ejercer un efecto dominante negativo sobre la función de la proteína Brd2 endógena. Sorprendentemente, el mutante Q78A no mostró efecto alguno sobre la incorporación de BrdU. Estos resultados indican que dos mutaciones diferentes en el primer bromodominio, delección parcial de éste en la isoforma alternativa o mutación puntual en la proteína Q78A, tienen consecuencias estructurales y/o funcionales diferentes. Asimismo indican que las mutaciones puntuales Q78A y N428A, en el primer y segundo bromodominio respectivamente, aun mostrando alteraciones similares en su capacidad de reconocimiento de colas de histonas acetiladas *in vitro*, muestran alteraciones funcionales diferentes *in vivo*.

### **3.1.3. Los bromodominios de Brd2 no son suficientes para la asociación de la proteína con los cromosomas mitóticos**

Una propiedad peculiar de las proteínas BET es su capacidad para mantenerse unidas a los cromosomas durante la mitosis (Dey et al., 2003). Aunque durante la mitosis tiene lugar una disminución drástica de la actividad transcripcional general (Martínez-Balbás et al., 1995) y la mayoría de las proteínas implicadas en el metabolismo del DNA se disocian de los cromosomas (RNA polimerasas, factores de transcripción, complejos remodeladores de cromatina, enzimas modificadoras de histonas, etc.), algunas proteínas implicadas en la regulación transcripcional se mantienen unidas a los cromosomas (Dey et al., 2005). Como se comentó en el apartado de introducción, se ha propuesto que en algunos casos, como en el caso de las proteínas MLL o GATA1, la retención de estos factores en *loci* silenciados durante la mitosis está relacionada con la temprana activación (o con el mantenimiento del estado reprimido) de estos genes al final de la mitosis y al inicio la fase G1 en las células hijas (Follmer et al., 2011; Kadauke et al., 2012). En el caso de las proteínas BET, se ha demostrado la asociación de Brd2 y Brd4 con los cromosomas durante la mitosis (Dey et al., 2003) y, al menos en el caso de Brd4, un papel de la proteína en el etiquetado de genes implicados en la progresión del ciclo celular para su reactivación temprana al final de la mitosis (Zhao et al., 2011). En nuestro grupo, hemos comprobado la asociación a los cromosomas tanto de las proteínas Brd2, Brd3 y Brd4 etiquetadas con un epítipo Flag y expresadas mediante transfección transitoria (ver siguiente apartado), así como de la proteína Brd2 endógena en células P19 y en progenitores neuronales del tubo neural del embrión de ratón (Figura 13). Para la

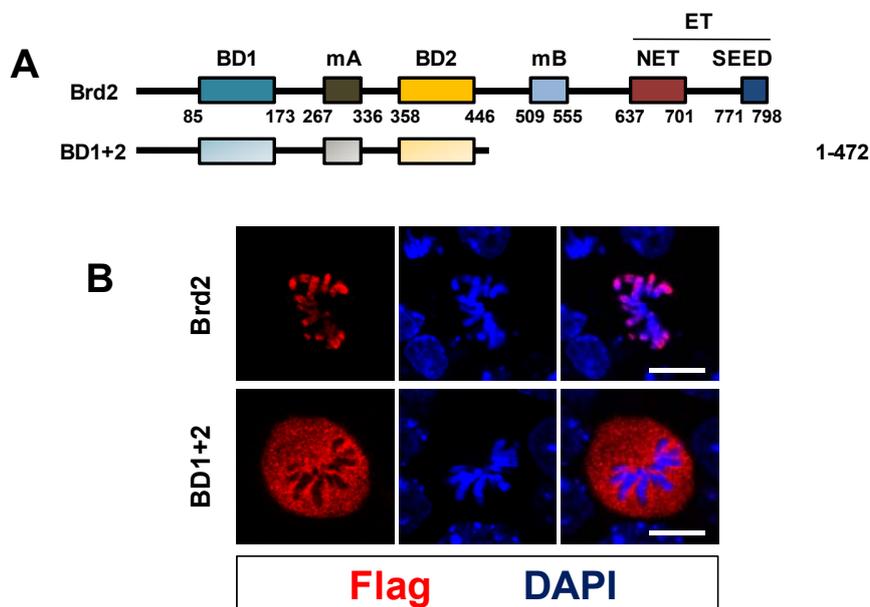
detección de la proteína Brd2 endógena se obtuvieron anticuerpos policlonales en conejo a partir de la región carboxilo-terminal de la proteína Brd2 de ratón (aminoácidos 698 al 780).



**Figura 13. La proteína Brd2 endógena se asocia con los cromosomas mitóticos.** Inmunofluorescencia en células P19 o secciones del tubo neural de embriones de ratón de 12 dpc a nivel torácico, utilizando anticuerpos contra Brd2 de ratón. Las inmunofluorescencias se analizaron mediante microscopía confocal (células P19) o de fluorescencia (embrión de ratón). El DNA se tiñó con DAPI. La barra de escala equivale a 20  $\mu$ m.

En el transcurso del análisis de dominios de Brd2 implicados en su localización nuclear atrajo nuestra atención la observación de que una proteína truncada carente de la mitad carboxilo-terminal (que incluye desde el aminoácido 473 hasta el final de la proteína (Figura 14A) pero con los dos bromodominios intactos era incapaz de asociarse a los cromosomas durante la mitosis (Figura 14B). Se ha propuesto que la interacción tanto de Brd2 como de Brd4 con los cromosomas tiene lugar a través de los bromodominios y se ha demostrado que mutaciones en cualquiera de ellos afecta a

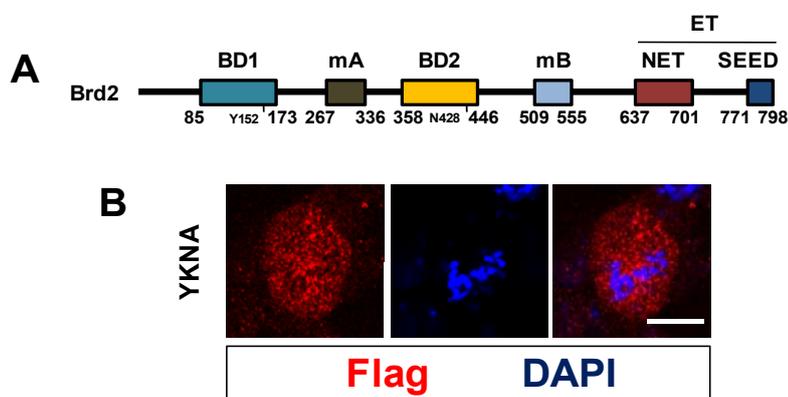
dicha capacidad (Huang et al., 2007; Nakamura et al., 2007). De hecho, se ha determinado que cada uno de los bromodominios de Brd2 tiene capacidad por sí solo de interactuar *in vitro* con colas de histonas acetiladas (Nakamura et al., 2007; Huang et al., 2007). Se ha descrito a su vez, que el primer bromodominio de la proteína Brd2 humana cristaliza en forma dimérica y es capaz de interactuar con la proteína Brd2 completa en experimentos de coimmunoprecipitación (Nakamura et al., 2007). Mutaciones en el primer bromodominio, como la mutación que provoca el cambio de tirosina a lisina en la posición 153 (Y153K), afectan tanto a la capacidad de dimerización del primer bromodominio como a la capacidad de éste de reconocer *in vitro* colas de la histona H4 acetiladas en la lisina 12 (Nakamura et al. 2007).



**Figura 14.** La proteína Brd2 carente de la mitad carboxili-terminal pero con los bromodominios intactos no se asocia con los cromosomas mitóticos. (A) Esquema de las proteínas analizadas. (B) Localización de las proteínas indicadas etiquetadas con un epítipo Flag, expresadas en células P19 y visualizadas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra el epítipo Flag y microscopía confocal. El DNA se tiñó con DAPI. Las imágenes son representativas de al menos el 93% de 14-25 células analizadas por construcción. La barra de escala equivale a 10  $\mu\text{m}$ .

Como se ha comentado, esta capacidad de reconocer colas de histona H4 acetiladas se ve igualmente alterada en el mutante puntual del segundo bromodominio N382A (Huang et al., 2007). Por lo tanto, como control negativo en el análisis de asociación con los cromosomas mitóticos se incluyó una construcción con la doble mutación Y152KN428A, alterada tanto en su capacidad de interacción con colas de

histona acetiladas a través de sus dos bromodominios, como en su capacidad de dimerizar con la proteína silvestre a través del primer bromodominio. Como se observa en la Figura 15, dicha construcción no se retenía en los cromosomas mitóticos, lo que confirma una vez más el papel directo de los bromodominios en el reconocimiento y la asociación a los cromosomas. Sin embargo, la incapacidad del fragmento de Brd2 que incluye los dos bromodominios intactos (proteína BD1+2, Figura 14) de mantenerse unido a los cromosomas y la observación de que otras proteínas con bromodominios como Brg1 (Muchardt et al., 1996) e incluso proteínas con dos bromodominios en tándem como TAFII250 (Liu et al., 2008) aparecen disociadas de los cromosomas durante la mitosis, sugiere que los bromodominios de Brd2 no son suficientes para la asociación de la proteína con los cromosomas *in vivo*.



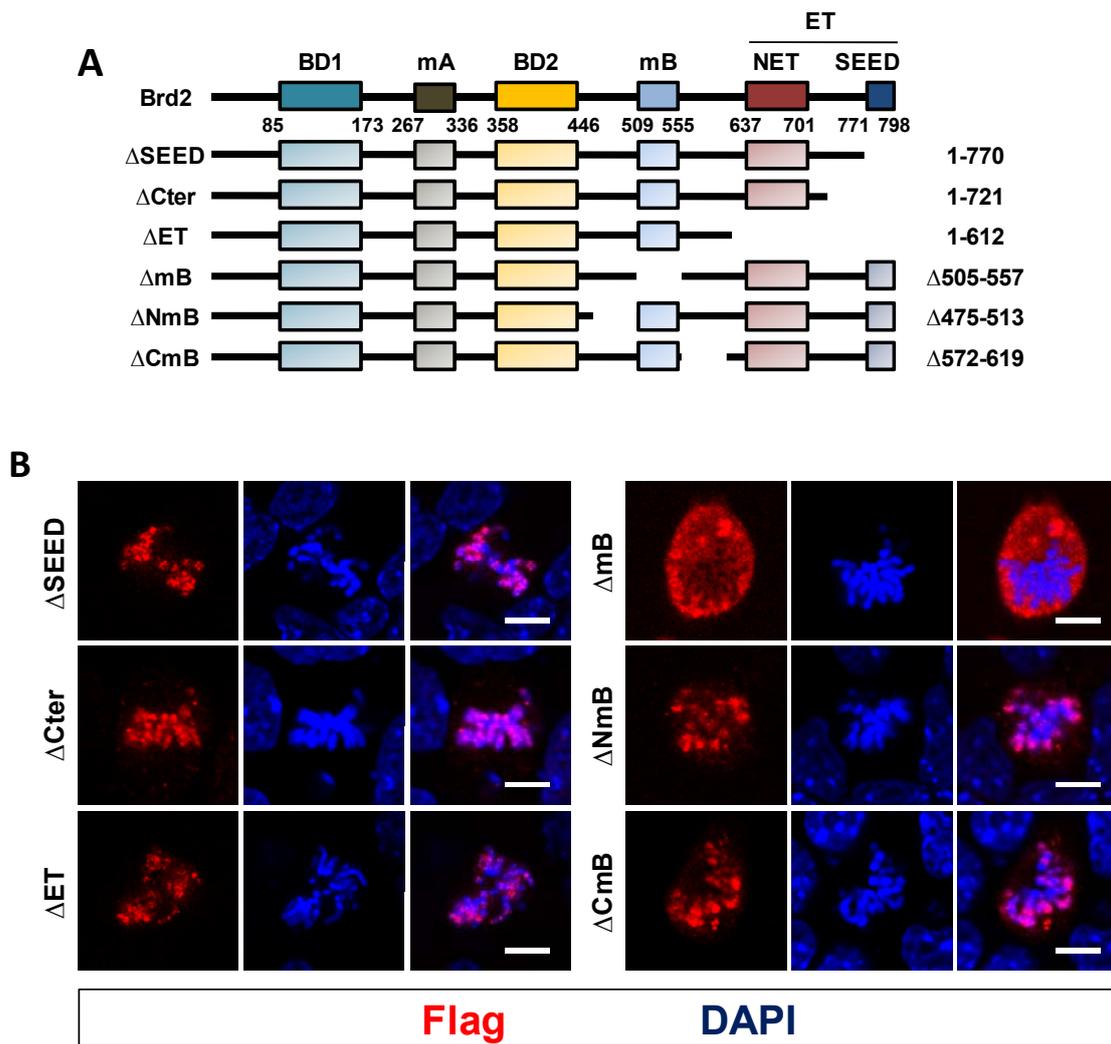
**Figura 15. La doble mutación Y152KN428A afecta a la capacidad de Brd2 de interactuar con los cromosomas en mitosis. (A)** Esquema de dominios de la proteína Brd2 donde se indica la posición de los aminoácidos Y152 y N428. **(B)** Localización de la proteína indicada etiquetada con un epítipo Flag, expresada en células P19 y visualizadas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra el epítipo Flag y microscopía confocal. El DNA se tiñó con DAPI. Las imágenes son representativas de 22 de 25 células analizadas. La barra de escala equivale a 10 µm. YKNA, Y152KN428A.

### 3.2. Análisis funcional del motivo B

#### 3.2.1. El motivo B es necesario para la asociación de las proteínas Brd2, Brd3 y Brd4 con los cromosomas

Previamente a este trabajo no se disponía de información acerca de la posible implicación de dominios adicionales a los bromodominios en la asociación de las proteínas BET con los cromosomas. Por este motivo, para definir con precisión la región de la mitad carboxilo-terminal de Brd2 (desde el residuo de aminoácido 473)

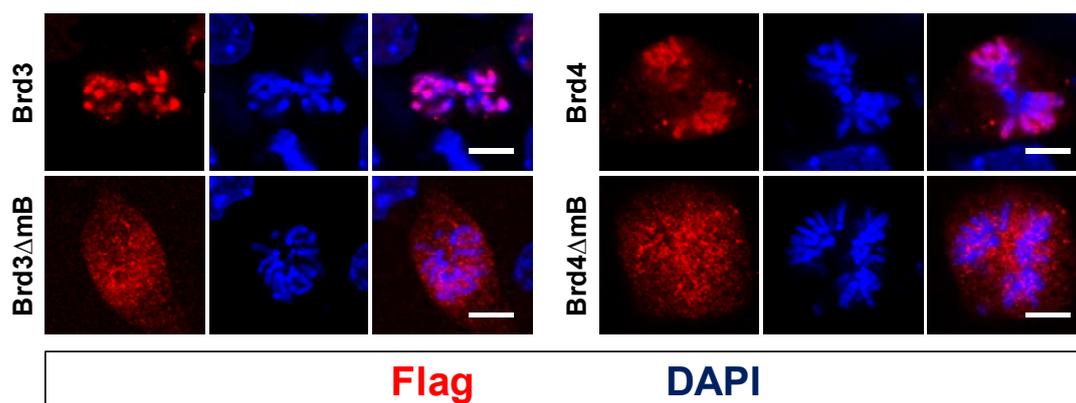
implicada en su asociación con los cromosomas, se analizó por inmunofluorescencia la localización de varios fragmentos de Brd2 etiquetados con un epítipo Flag correspondientes a deleciones seriadas desde el final de la ORF (proteínas  $\Delta$ SEED,  $\Delta$ Cter y  $\Delta$ ET, Figura 16A). Como se observa en la Figura 16B, la pérdida de la región carboxilo-terminal desde el residuo de aminoácido 613 ( $\Delta$ ET) no tuvo efecto sobre la localización de la proteína en los cromosomas mitóticos. Por lo tanto, la región del fragmento  $\Delta$ ET (Figura 16) ausente en la construcción BD1+2 (Figura 14), y que se corresponde con los residuos de aminoácido del 473 al 612, debe ser importante para la asociación con los cromosomas mitóticos.



**Figura 16. El motivo B de Brd2 está implicado en la asociación de la proteína con los cromosomas mitóticos. (A)** Esquema de los distintos fragmentos de la proteína Brd2 analizados. **(B)** Localización de las proteínas indicadas etiquetadas con un epítipo Flag, expresadas en células P19 y visualizadas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra el epítipo Flag y microscopía confocal. El DNA se tiñó con DAPI. Las imágenes son representativas de al menos el 95% de 14-25 células analizadas por construcción. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

Esta región incluye la secuencia conservada entre proteínas BET designada anteriormente como motivo B (Paillisson et al., 2007), por lo que decidimos analizar en detalle si la pérdida de dicho motivo tenía algún efecto en la localización de Brd2. Como se observa en la Figura 16B, una proteína carente del motivo B (proteína  $\Delta mB$ , Figura 16A) aparece disociada de los cromosomas. Para descartar que el efecto de la pérdida del motivo B en la capacidad de Brd2 de asociarse con los cromosomas se debía principalmente a una alteración general de la estructura de la proteína se comprobó que deleciones de similar longitud, por delante y por detrás del motivo B, no afectaban a la capacidad de asociación con los cromosomas mitóticos. Así, una proteína carente de un fragmento localizado hacia el extremo amino-terminal de dicho motivo ( $\Delta NmB$ , residuos de aminoácido del 475 al 513) y otra proteína carente de un fragmento localizado hacia el extremo carboxilo-terminal de dicho motivo ( $\Delta CmB$ , residuos de aminoácido del 572 al 619) se mantenían unidas a los cromosomas (Figura 16B).

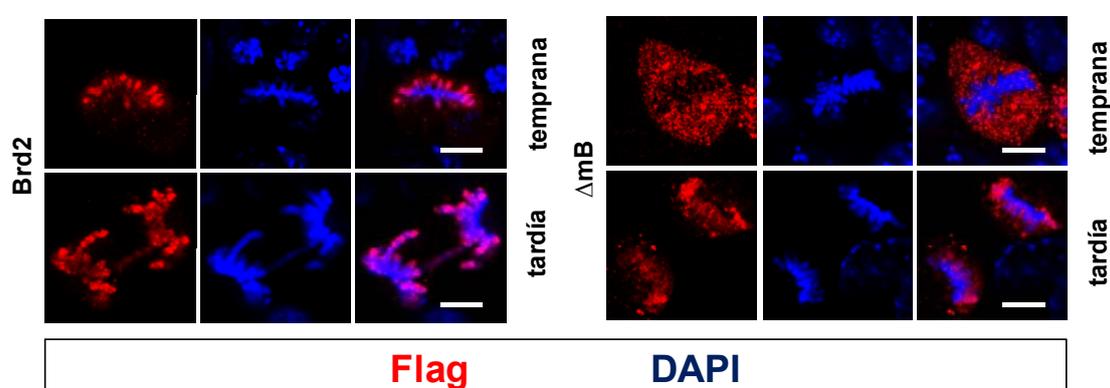
Teniendo en cuenta la conservación del motivo B entre los distintos miembros de la familia de proteínas BET, nos preguntamos si el motivo B era también importante para la asociación a los cromosomas de las proteínas Brd3 y Brd4. Para responder a esa pregunta, se analizó mediante inmunofluorescencia la localización de las proteínas Brd3 y Brd4 etiquetadas con un epítipo Flag así como la localización de proteínas Brd3 y Brd4 carentes del motivo B (deleción de los residuos de aminoácidos del 432 al 501 en el caso de Brd3 y del 483 al 552 en el caso de Brd4) en células P19 en mitosis.



**Figura 17. El motivo B está implicado en la asociación de Brd3 y Brd4 con los cromosomas en mitosis.** Localización de las proteínas Brd3 y Brd4 o de versiones de éstas carentes del motivo B ( $\Delta mB$ ) etiquetadas con un epítipo Flag, expresadas en células P19 y visualizadas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra el epítipo Flag y microscopía confocal. El DNA se tiñó con DAPI. Las imágenes son representativas de al menos el 95% de 14-25 células analizadas por construcción. La barra de escala equivale a 10  $\mu m$ .

Como se observa en la Figura 17, la adecuada asociación de las proteínas Brd3 y Brd4 con los cromosomas requiere, al igual que en el caso de Brd2, la presencia del motivo B.

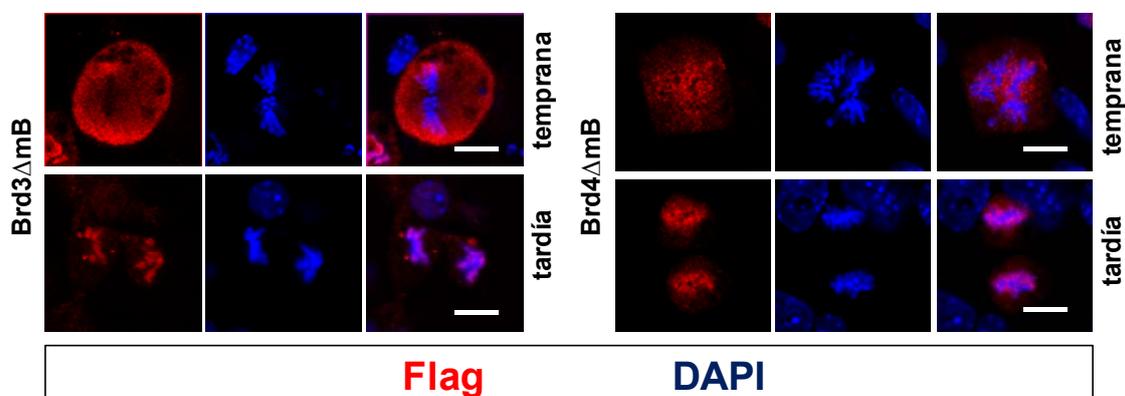
Un análisis detallado de la dinámica de asociación de Brd2 con los cromosomas a lo largo de la mitosis reveló que la proteína Brd2 carente del motivo B, aunque aparece completamente dissociada de los cromosomas en las primeras fases de la mitosis (profase y metafase), recupera cierta capacidad de asociación a partir de anafase (Figura 18).



**Figura 18. La proteína Brd2 carente del motivo B recupera la capacidad de asociarse con los cromosomas en las últimas fases de la mitosis.** Localización de las proteínas indicadas etiquetadas con un epítipo Flag, expresadas en células P19 y visualizadas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra el epítipo Flag y microscopía confocal. Se analizó la localización de las proteínas indicadas durante las primeras (profase-metafase; temprana) o últimas (anafase-telofase; tardía) fases de la mitosis. El DNA se tiñó con DAPI. Las imágenes son representativas de al menos el 95% de 14-25 células analizadas por construcción. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

Este fenómeno se observó también en el caso de las proteínas Brd3 y Brd4 carentes del motivo B, como se muestra en la Figura 19. Esta observación sugiere que la interacción de las proteínas Brd2, Brd3 y Brd4 con los cromosomas sigue una dinámica bifásica a lo largo de la mitosis: una primera fase (mitosis temprana) que comprende desde profase a metafase, donde el motivo B es más importante para la retención de Brd2 y una segunda fase (mitosis tardía) que comprende desde el inicio de la anafase al final de la mitosis, donde se observa un cierto grado de reasociación cromosómica en ausencia del motivo B. Se ha descrito previamente que la mitosis discurre siguiendo una dinámica bifásica respecto a los niveles de acetilación de las histonas (Kruhlak et al., 2001). Al inicio de la mitosis se observa una desacetilación

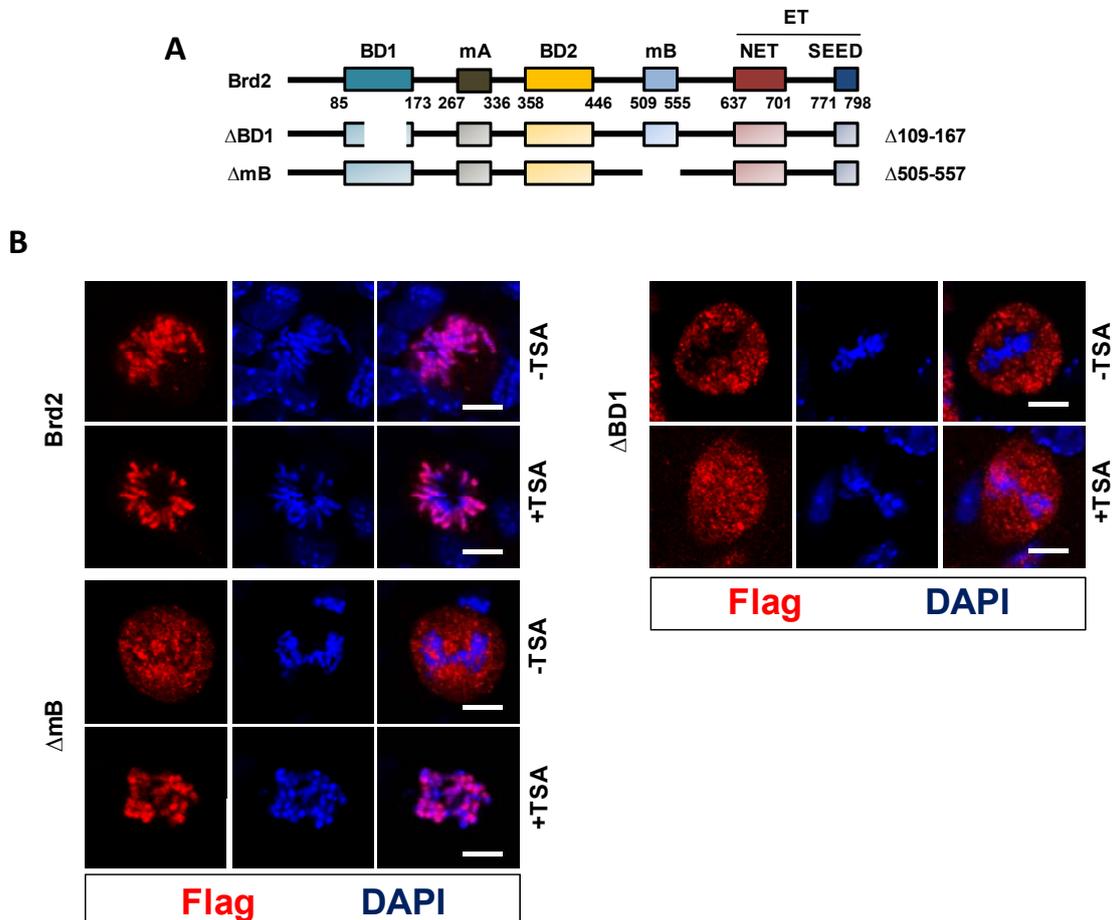
global de las histonas y a partir de metafase algunas marcas de acetilación comienzan a recuperarse, por lo que se observa un incremento en los niveles globales de acetilación de las histonas (Kruhlak et al., 2001).



**Figura 19.** Las proteínas Brd3 y Brd4 carentes del motivo B también recuperan la capacidad de asociarse a los cromosomas durante las últimas fases de la mitosis. Localización de las proteínas indicadas etiquetadas con un epítipo Flag, expresadas en células P19 y visualizadas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra el epítipo Flag y microscopía confocal. Se analizó la localización de las proteínas indicadas durante las primeras (profase-metafase; temprana) o últimas (anafase-telofase; tardía) fases de la mitosis. El DNA se tiñó con DAPI. Las imágenes son representativas de al menos el 95% de 14-25 células analizadas por construcción. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

Teniendo en cuenta que la interacción de la proteína Brd2 con los cromosomas tiene lugar a través de los bromodominios y que éstos reconocen selectivamente marcas de acetilación en las histonas, se investigó la posibilidad de que el motivo B estuviera implicado en la estabilización de la unión de la proteína Brd2 a los cromosomas especialmente en condiciones de hipoacetilación de las histonas. Para investigar este aspecto se analizó mediante inmunofluorescencia la localización de las proteínas silvestre y carente del motivo B etiquetadas con un epítipo Flag durante etapas tempranas de la mitosis en células P19 tratadas con el inhibidor de desacetilasas de histona Tricostatina A (TSA). Como se observa en la Figura 20, en estas condiciones la proteína Brd2 carente del motivo B se mantenía unida a los cromosomas durante la mitosis temprana, por lo que dicho motivo resultaba especialmente importante para el reconocimiento o la estabilidad de la asociación con los cromosomas hipoacetilados. Como control negativo, se comprobó que la proteína Brd2 carente de un fragmento del primer bromodominio (del residuo de aminoácido 109 al 167) no interactuaba con los cromosomas mitóticos en presencia de TSA

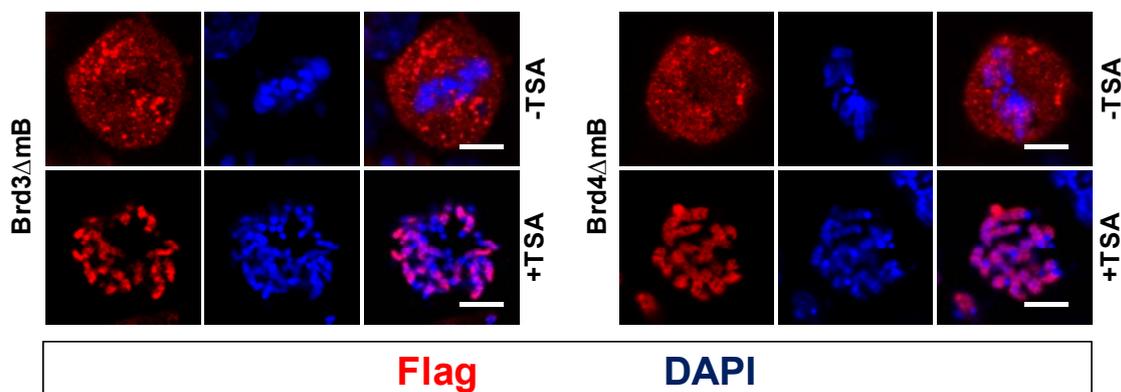
(proteína  $\Delta$ BD1, Figura 15), poniendo de manifiesto una vez más la esencialidad de la integridad de los bromodominios para el adecuado reconocimiento de las colas de histona acetiladas por parte de la proteína Brd2.



**Figura 20. La proteína Brd2 carente del motivo B no se disocia de los cromosomas mitóticos en presencia del inhibidor de desacetilasas de histonas TSA. (A)** Esquema de las proteínas analizadas. **(B)** Localización de las proteínas indicadas etiquetadas con un epítipo Flag, expresadas en células P19 y visualizadas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra el epítipo Flag y microscopía confocal. Se analizó la localización de las proteínas indicadas en células P19 tratadas con 500 ng/ml TSA (+TSA), o sin tratar (-TSA), durante 4 horas antes de procesarlas para su análisis. El DNA se tiñó con DAPI. Las imágenes son representativas de al menos el 95% de 14-25 células analizadas por construcción. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

Por último, se investigó si, al igual que ocurre con Brd2, la inhibición de la desacetilación de histonas mediante tratamiento con TSA durante la mitosis temprana impedía la disociación de las proteínas Brd3 y Brd4 carentes del motivo B de los cromosomas. Como se observa en la Figura 21, las proteínas Brd3 y Brd4 carentes del

motivo B se mantuvieron unidas a los cromosomas durante la mitosis temprana en células P19 tratadas con TSA, por lo que, al igual que ocurre con Brd2, el motivo B es especialmente relevante para la asociación de las proteínas Brd3 y Brd4 con los cromosomas en condiciones de hipoacetilación de histonas.

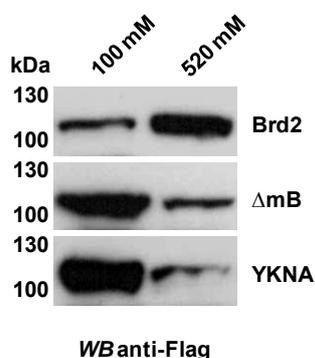


**Figura 21. Las proteínas Brd3 y Brd4 carentes del motivo B no se disocian de los cromosomas mitóticos en presencia de TSA.** Localización de las proteínas indicadas etiquetadas con un epítipo Flag, expresadas en células P19 y visualizadas mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra el epítipo Flag y microscopía confocal. Se analizó la localización de las proteínas indicadas tratadas con 500 ng/ml TSA (+TSA), o sin tratar (-TSA), durante 4 horas antes de procesarlas para su análisis. El DNA se tiñó con DAPI. Las imágenes son representativas de al menos el 95% de 14-25 células analizadas por construcción. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

### 3.2.2. El motivo B está implicado en la asociación de la proteína Brd2 con la cromatina en interfase

Con el objetivo de investigar si el motivo B resultaba también importante para la asociación de la proteína Brd2 con la cromatina en interfase se comparó, en células P19 creciendo exponencialmente, la capacidad de extracción con distintas concentraciones de sal de la proteína silvestre con la de la proteína Brd2 carente del motivo B. En condiciones de crecimiento exponencial se determinó una proporción de células en interfase de  $94\% \pm 3$ . Como control negativo se utilizó una construcción de expresión del mutante doble Y152KN428A de Brd2, descrito anteriormente (Figura 15), afectado en la capacidad de cada uno de los bromodominios de reconocer marcas de acetilación y por tanto de interactuar con los cromosomas. Para analizar la estabilidad de la asociación a la cromatina de las proteínas indicadas, las células P19 se transfectaron con construcciones de expresión de dichas proteínas etiquetadas con un epítipo Flag, para a continuación someterlas a extracción nuclear con dos

cantidades distintas de sal y detección de las proteínas etiquetadas mediante la técnica de *Western Blot*. Así, las células fueron sometidas secuencialmente a extracción con concentraciones de NaCl de 100 y 520 mM. Cuanto más estable es la unión de una proteína a la cromatina, mayor es la cantidad de sal requerida para su extracción.

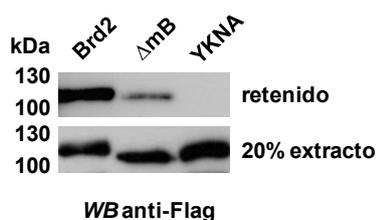


**Figura 22. La asociación de Brd2 con la cromatina requiere la presencia del motivo B.** Células P19, transfectadas con las construcciones indicadas, etiquetadas con un epítipo Flag, fueron sometidas secuencialmente a extracción de proteínas con concentraciones de NaCl de 100 y 520 mM. Las proteínas extraídas fueron analizadas mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo Flag. En cada carril se analizó un 10% del volumen total de cada extracto. YKNA, Y152KN428A.

Como se observa en la Figura 22, la extracción de la mayor parte de la proteína Brd2 requiere una concentración alta de NaCl (520 mM), mientras que la mayor parte de la proteína Brd2 carente del motivo B era extraída con concentraciones de NaCl de 100 mM, de manera similar a la proteína mutada en los bromodominios. Este resultado indica que la estabilidad de la asociación de Brd2 con la cromatina en células que se encuentran mayoritariamente en interfase se ve comprometida en ausencia del motivo B, por lo que el requerimiento del motivo B para la adecuada interacción con la cromatina no está restringido a la mitosis.

Con el objetivo de poner en evidencia una implicación del motivo B de Brd2 en el reconocimiento de marcas de acetilación en histonas, se realizó un ensayo de *pull-down in vitro* con extractos de células P19 transfectadas con distintas construcciones de expresión Brd2 y un péptido sintético correspondiente a la cola de la histona H3 acetilada. Se ha descrito que, si bien los bromodominios son dominios que reconocen histonas acetiladas, existe cierta selectividad en el patrón de marcas de acetilación que cada bromodominio es capaz de reconocer (Hassan et al., 2007). En el caso de la

proteína Brd2, se ha determinado la interacción *in vitro* de cada uno de los bromodominios con varias marcas de acetilación de las histonas H3 y H4 (véase la sección de introducción). En experimentos *in vivo* con la proteína Brd2 humana completa también se ha puesto de manifiesto su interacción con varias de estas marcas, incluida la marca de acetilación de la lisina 14 en la histona H3 (H3K14Ac) (Ito et al., 2011; Kanno et al., 2004; LeRoy et al., 2008), por lo que para los experimentos de *pull-down* se utilizó un péptido de histona H3 diacetilado que incluía esta marca. El péptido, biotinilado e inmovilizado mediante microesferas magnéticas acopladas a estreptavidina, se incubó con extractos celulares procedentes de células transfectadas con construcciones de expresión de la proteína Brd2 y de la proteína Brd2 carente del motivo B etiquetadas con un epítipo Flag. Como control negativo, se utilizó la proteína Brd2 con la doble mutación Y152KN428A. Mediante la técnica de *Western Blot* se analizó y comparó la cantidad de proteína presente en los extractos celulares con la cantidad retenida por el péptido acetilado.

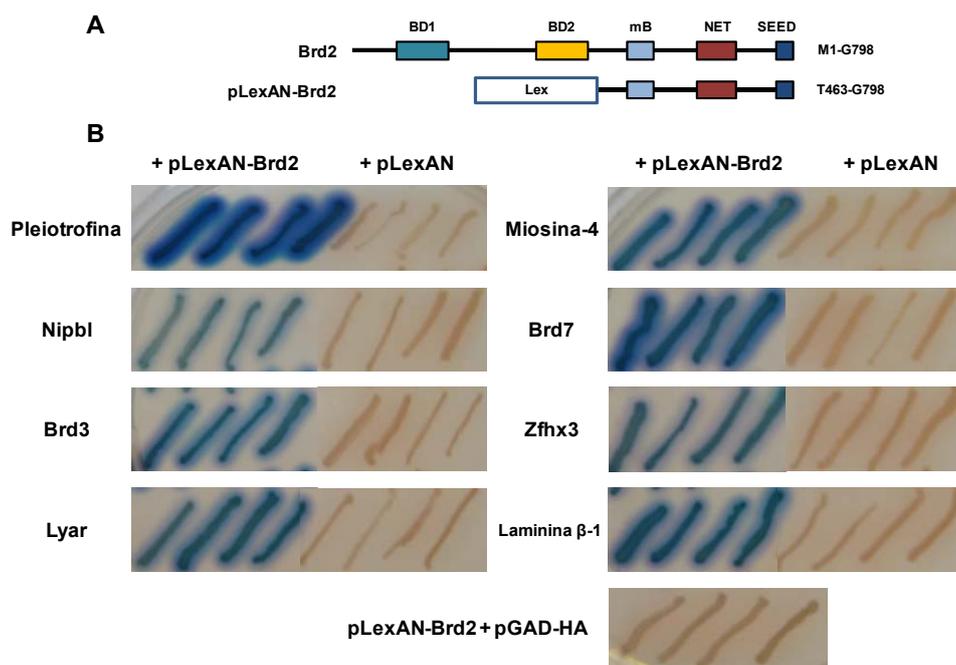


**Figura 23. El motivo B es necesario para la asociación *in vitro* de Brd2 con un péptido correspondiente a la cola de la histona H3 diacetilada.** Extractos totales de proteínas de células P19 transfectadas con las construcciones de expresión de las proteínas indicadas, etiquetadas con un epítipo Flag, se incubaron con microesferas magnéticas acopladas a estreptavidina, cargadas con un péptido sintético biotinilado correspondiente a la cola de la histona H3 acetilada en los residuos K9 y K14. Las proteínas retenidas, así como el 20% de cada extracto utilizado, se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo Flag.

Como se observa en la Figura 23, la proteína Brd2, en ausencia del motivo B, pierde gran parte de su capacidad de interaccionar con el péptido acetilado, aunque retiene algo de capacidad de asociación en comparación con el control negativo, el mutante Y152KN428A afectado en los bromodominios.

### **3.2.3. Identificación de proteínas que interaccionen con Brd2 a través de la región que contiene el motivo B**

La importancia del motivo B en la localización nuclear de Brd2 y en su interacción con la cromatina en interfase y con los cromosomas durante la mitosis nos llevó a interesarnos por la caracterización funcional de dicho motivo. Como primer abordaje, se optó por la búsqueda de proteínas capaces de interaccionar con la región que incluye el motivo B en la proteína Brd2. Se han descrito previamente varias interacciones entre Brd2 y otras proteínas (véase la sección de Introducción). A pesar de las interacciones descritas, hasta la fecha del inicio del presente estudio no se había demostrado ninguna interacción que tuviera lugar gracias al motivo B, o a través de éste, que nos permitiera inferir un posible mecanismo que implicara al motivo B en la interacción de Brd2 con la cromatina. Para identificar proteínas capaces de interaccionar con la región de Brd2 que incluye al motivo B se realizó un escrutinio de dos híbridos en levaduras, utilizando como cebo una fusión de la mitad carboxilo-terminal de Brd2 (del aminoácido 463 al 798) y la proteína LexA de *E. coli*, clonado en el vector pLexA-N del sistema DUALhybrid kit de Biotech (Figura 24A). Dicho fragmento incluía el motivo B de Brd2 y carecía de los dos bromodominios, evitando así el efecto negativo que conlleva la sobreexpresión de los bromodominios en el crecimiento del cultivo de las levaduras transformadas. La construcción cebo se cotransformó en la estirpe de levadura NMY51 junto con una genoteca comercial de embrión de ratón de 11 días de desarrollo, clonada en el vector pGAD-HA de Biotech. Se analizaron alrededor de  $2 \times 10^6$  transformantes, de entre los cuales, 150 crecieron en medio selectivo. El análisis de los 150 clones aislados dio como resultado la identificación de 8 proteínas diferentes (Tabla 2). La interacción de estas proteínas con el fragmento de Brd2 codificado en la construcción cebo fue recomprobada mediante un ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Así, en la Figura 24B se muestran colonias de levaduras cotransformadas con la construcción cebo y con las construcciones presa indicadas, sembradas en medio no selectivo en presencia del compuesto X-gal, sustrato de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. En el caso de interacción entre las proteínas expresadas por el sistema de dos híbridos se induce el gen *lacZ*, que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Esta enzima es responsable de la hidrólisis del sustrato X-gal, generándose un compuesto azul insoluble que colorea las colonias de levadura.



**Figura 24. Identificación mediante la técnica de dos híbridos de proteínas que interactúan con Brd2.** (A) Esquema de la proteína recombinante de Brd2 carente de los bromodominios y fusionada al dominio de unión al DNA de LexA (Lex), utilizada en el escrutinio de dos híbridos. A la derecha se indican los aminoácidos incluidos en el fragmento. (B) Ensayo β-galactosidasa de levaduras cotransformadas con la construcción de Brd2 utilizada como cebo (pLexAN-Brd2) o el vector de expresión vacío como control (pLexAN), junto con cada uno de los clones presa indicados que se aislaron (clonados en el vector pGAD-HA). Como control negativo se cotransformaron levaduras con pLexAN-Brd2 y el vector de expresión pGAD-HA vacío. El color azul muestra interacción entre las proteínas.

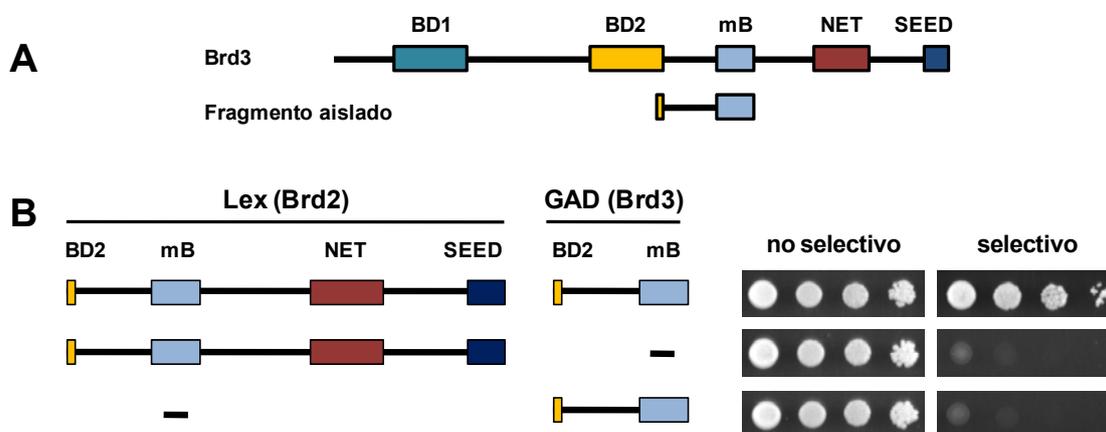
**Tabla 2. Proteínas que interactúan con Brd2 identificadas en el escrutinio de dos híbridos.**

	Número de clones aislados	ID proteína	Fragmento aislado (aminoácidos)	Dominios deducidos (aminoácidos)	Localización celular *
Pleiotrofina	2	NP_032999.1	A32-A151	Región básica carboxilo-terminal	N,C
Nipbl	1	NP_081983.2	I210-Q449	Región rica en glutamina (418 a 462)	N
Brd3	141	NP_075825.3	K402-K501	Motivo B (432 a 501)	N
Lyar	1	NP_079557.2	T154-K388	Posible NLS bipartita (182-198) y (280-295)	N
Miosina-4	1	NP_034985.2	T941-K1047	Región rica en ácido glutámico (848 a 1586)	C
Brd7	2	NP_036177.1	M1-P166	Bromodominio (148 a 218). NLS (67 a 82)	N
Zfhx3	1	NP_796237.2	A552-A768	Homeobox (617 a 665). NLS (648 a 662)	N
Laminina β-1	1	NP_032508.2	G1715-K1805	-	E

\*N, nuclear; C, citoplásmica; E, extracelular.

### 3.2.4. El motivo B media la interacción entre proteínas de la familia BET

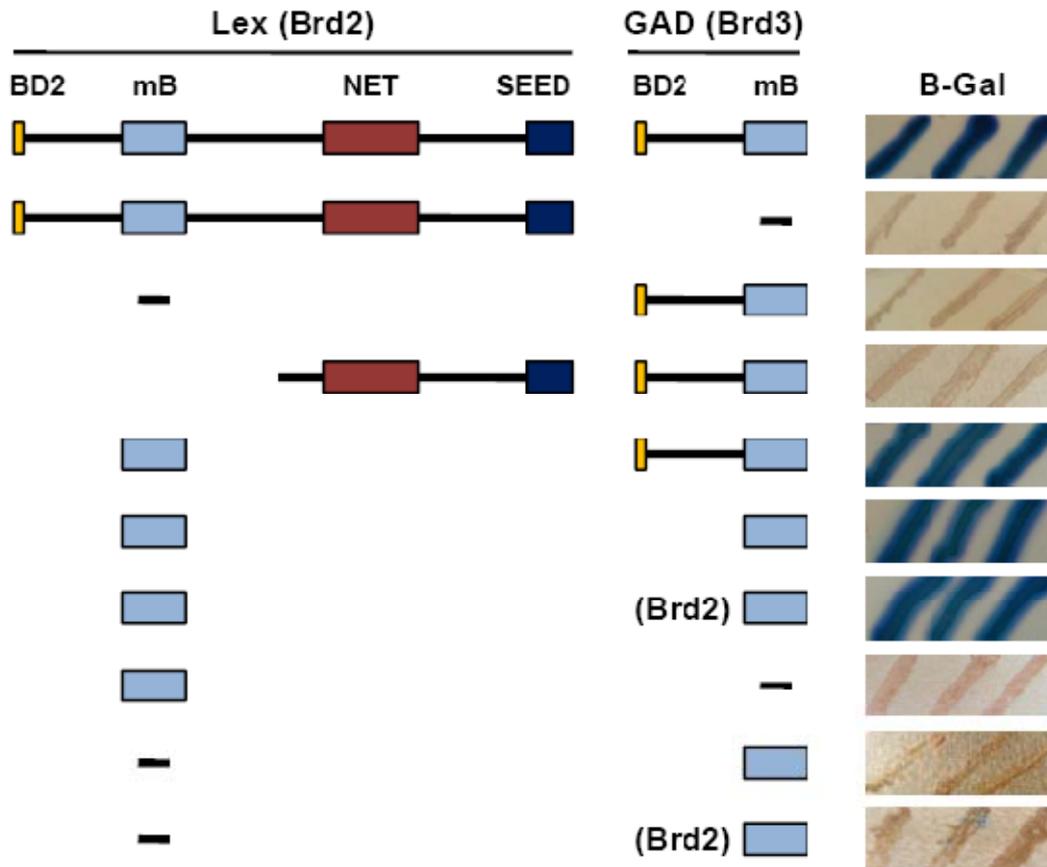
Sorprendentemente, 141 de los 150 clones analizados se correspondieron con un fragmento de la proteína Brd3 que incluía el motivo B de dicha proteína junto con secuencias adicionales (la mayoría de fragmentos analizados se correspondieron con la región de Brd3 comprendida entre los aminoácidos 402 y 501). En la Figura 25 se muestra un esquema del fragmento de Brd3 mayoritariamente aislado en el escrutinio de dos híbridos y la recomprobación, mediante crecimiento de las levaduras cotransformadas en medio selectivo, de su interacción con el fragmento de Brd2 utilizado para el escrutinio.



**Figura 25. Brd2 interacciona con un fragmento de Brd3 en el sistema de dos híbridos. (A)** Esquema del fragmento de Brd3 codificado en la mayoría de los 141 clones aislados en el escrutinio. **(B)** Crecimiento en medio selectivo de levaduras cotransformadas con la construcción de Brd2 utilizada como cebo en el escrutinio (Lex (Brd2)) y con uno de los clones aislados que codifican el fragmento de Brd3 (GAD (Brd3)). Como control negativo, se cotransformaron los vectores correspondientes, pLexA y pGAD-HA vacíos (-).

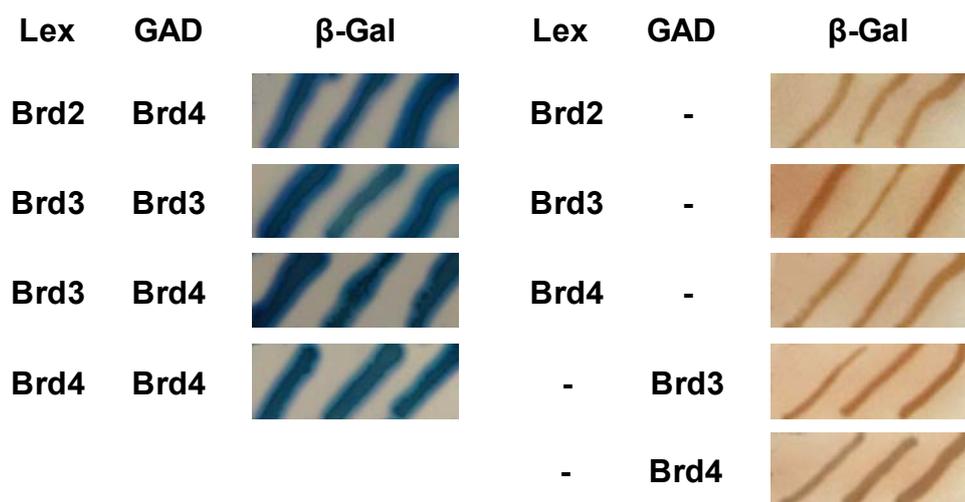
Teniendo en cuenta que tanto la construcción cebo de Brd2 como la construcción presa de Brd3 aislada en el escrutinio contenían secuencias adicionales al motivo B, se determinó con precisión qué región estaba implicada en la interacción. Para ello, se realizó un ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa en levaduras cotransformadas con las diferentes construcciones de expresión de los fragmentos de Brd2 y Brd3 indicados en la Figura 26. Al igual que en el escrutinio, las construcciones cebo fueron basadas en el vector pLexA-N y las construcciones presa en el vector pGAD-HA, indicando la coloración azul interacción entre las proteínas expresadas. Como se observa en la Figura 26, un fragmento correspondiente al motivo B de Brd2

era capaz de interactuar con un fragmento correspondiente al motivo B de la proteína Brd3, así como con un fragmento correspondiente al motivo B de Brd2.



**Figura 26. El motivo B de Brd2 interactúa con el motivo B de Brd3 en el sistema de dos híbridos.** Interacción entre las proteínas expresadas por las construcciones cebo (Lex) y presa (GAD) y los correspondientes vectores vacíos (-), según se indica en el esquema, visualizada por coloración azul de ensayos  $\beta$ -galactosidasa. Todas las construcciones cebo están basadas en Brd2 y todas las construcciones presa en Brd3, salvo en los casos indicados entre paréntesis.

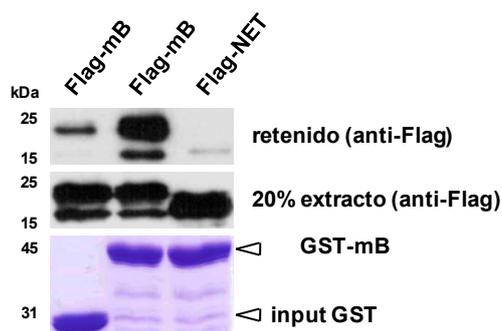
Considerando la conservación del motivo B entre las proteínas BET, se comprobó si el fragmento correspondiente al motivo B de la proteína Brd2 era capaz de interactuar con un fragmento correspondiente al motivo B de la proteína Brd4, así como el resto de combinaciones posibles entre fragmentos con el motivo B de las proteínas Brd2, Brd3 y Brd4. Como se observa en la Figura 27, el motivo B de Brd2, Brd3 o Brd4 era capaz de interactuar por sí solo con el motivo B de cualquiera de las tres proteínas en el sistema de dos híbridos en levaduras.



**Figura 27. El motivo B media interacción entre proteínas BET.** Interacción entre las proteínas expresadas por construcciones cebo (Lex) y presa (GAD) y los correspondientes vectores vacíos (-) como control según se indica en el esquema, visualizada por coloración azul de ensayos  $\beta$ -galactosidasa. Todos los fragmentos corresponden al motivo B de las proteínas indicadas.

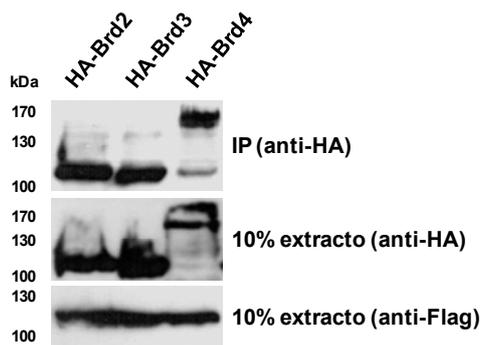
Con el objetivo de investigar si la interacción mediada por el motivo B de la proteína Brd2 era directa, se realizó un ensayo de *pull-down in vitro* (Figura 23). Para ello, se expresaron en *E. coli* y se purificaron las siguientes proteínas recombinantes: una fusión de la proteína Glutación S-transferasa (GST) con el fragmento de Brd2 correspondiente a los aminoácidos 482 a 595, que incluye el motivo B (proteína GST-mB, Figura 28); una fusión de la proteína GST con el fragmento de Brd2 correspondiente a los aminoácidos 482 a 595 etiquetado con un epítipo Flag (proteína Flag-mB, Figura 28); una fusión de la proteína GST con el fragmento de Brd2 correspondiente a los aminoácidos 620 a 720, que incluye el dominio NET pero no el motivo B, etiquetado con un epítipo Flag (proteína Flag-NET, Figura 28), como control negativo. Las tres proteínas recombinantes junto con la proteína GST se expresaron en la estirpe BL21 de *E. coli* y se purificaron por cromatografía de afinidad con una matriz de glutatión-sefarosa. Para la elución de las proteínas Flag-mB y Flag-NET se utilizó la proteasa PreScission, capaz de realizar el corte entre la proteína GST y la proteína fusionada a ésta. Por lo tanto estas proteínas se purificaron libres del fragmento de GST. Las proteínas GST y GST-mB se dejaron unidas a la matriz. En los experimentos de *pull-down* se analizó la capacidad de estas proteínas unidas a la matriz de retener las proteínas Flag-mB y Flag-NET. Como se observa en la Figura 28, la proteína Flag-mB fue eficientemente retenida por la proteína GST-mB inmovilizada en comparación con la proteína Flag-NET, y no fue eficientemente retenida por la

proteína GST sola, lo que evidenció la capacidad del motivo B de la proteína Brd2 de interactuar directamente con el motivo B de otra molécula de Brd2 *in vitro*.



**Figura 28. La interacción del motivo B de Brd2 consigo mismo es directa.** Experimentos de *pull-down in vitro* de fragmentos de Brd2 correspondientes al motivo B y al dominio NET etiquetados con un epítipo Flag (Flag-mB y Flag-NET respectivamente) y la proteína de fusión entre GST y el motivo B (GST-mB), o la proteína GST sola como control, ambas inmovilizadas en matriz de glutatión-sefarosa. Las proteínas retenidas (retenido) y un 20% del volumen de péptido purificado utilizado en cada caso (20% péptido) se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos específicos contra el epítipo Flag. El 100% de las proteína GST o GST-mB utilizadas por ensayo se muestra en una tinción por Coomasie del gel de proteínas.

Con el objetivo de investigar la interacción entre las proteínas Brd2, Brd3 y Brd4 en células animales, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación en cultivos de la línea humana HEK293T. Para estudiar la interacción entre la proteína Brd2 consigo misma y con las proteínas Brd3 y Brd4 se cotransfectaron las células con un plásmido de expresión de la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo Flag (Flag-Brd2) junto con plásmidos de expresión de las proteínas Brd2, Brd3 o Brd4 etiquetadas con un epítipo HA (HA-Brd2, HA-Brd3 y HA-Brd4, respectivamente). En cada caso se llevó a cabo la precipitación de la proteína etiquetada con el epítipo Flag y se analizó la coimmunoprecipitación de la proteína etiquetada con el epítipo HA. Para ello se utilizaron anticuerpos contra el epítipo Flag conjugados a una matriz de sefarosa. Como se muestra en la Figura 29, las tres proteínas HA-Brd2, HA-Brd3 y HA-Brd4 interaccionaron *in vivo* con la proteína Flag-Brd2. Para investigar el resto de interacciones entre las proteínas Brd2, Brd3 y Brd4, se realizaron experimentos similares de coimmunoprecipitación en células HEK293T, utilizando vectores de expresión de las proteínas Brd3 o Brd4 etiquetadas con un epítipo Flag (Flag-Brd3 y Flag-Brd4 respectivamente) y de las proteínas Brd3 o Brd4 etiquetadas con un epítipo HA (HA-Brd3 y HA-Brd4 respectivamente).

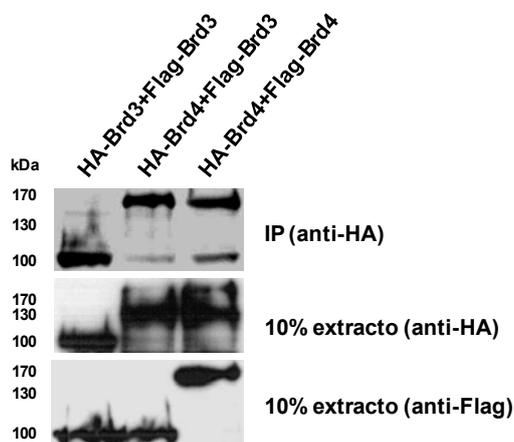


**Figura 29. Interacción de la proteína Brd2 consigo misma y con las proteínas Brd3 y Brd4 en extractos celulares.** Coimmunoprecipitación con matriz de agarosa conjugada con anticuerpos contra el epítipo Flag, utilizando extractos proteicos de células HEK293T transfectadas con un vector de expresión que codifica la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo Flag (Flag-Brd2) junto con vectores de expresión de las proteínas indicadas etiquetadas con un epítipo HA (HA-Brd2, HA-Brd3 y HA-Brd4 respectivamente). Las proteínas coimmunoprecipitadas se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo HA (IP). Un 10% de los extractos también se analizó mediante *Western Blot* para determinar la cantidad de proteína etiquetada con los epítipos Flag y HA presente en los extractos antes de la precipitación.

Como se observa en la Figura 30, también las proteínas Brd3 y Brd4 fueron capaces de interactuar consigo mismas y entre sí.

El siguiente objetivo consistió en investigar la relevancia del motivo B en la interacción de la proteína Brd2 consigo misma en células HEK293T. Ya se ha comentado que se ha descrito que el primer bromodominio de la proteína Brd2 humana etiquetado con un epítipo Flag es capaz de interactuar in vivo con otro fragmento equivalente de la proteína Brd2 etiquetado con la proteína GFP y que algunas mutaciones puntuales, como la mutación Y152K, afectan negativamente a dicha interacción (Nakamura et al., 2007). Por lo tanto, en nuestro análisis decidimos tener en cuenta estos resultados y se incluyó una construcción de expresión de la proteína Brd2 con la mutación Y152K sola o en combinación con la delección del motivo B. Para la realización de este análisis se cotransfectaron células HEK293T con vectores de expresión de la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo Flag (Flag-Brd2) junto con vectores de expresión de las siguientes proteínas etiquetadas con un epítipo HA: la proteína Brd2 silvestre (HA-Brd2), la proteína Brd2 carente del motivo B (carente del fragmento que incluye los aminoácidos 505 al 557; HA- $\Delta$ mB), la proteína Brd2 con el cambio Y152K (HA-Y152K) y una proteína Brd2 carente del motivo B y con el cambio Y152K (HA- $\Delta$ mB/Y152K). Como se observa en la Figura 31, tanto la pérdida del motivo B como el cambio Y152K afectaron notablemente a la interacción de la

proteína Brd2 consigo misma. Aunque el efecto observado fue algo mayor cuando la pérdida del motivo B se combinaba con el cambio Y152K, la pérdida del motivo B por sí sola tuvo un efecto claro en la interacción.

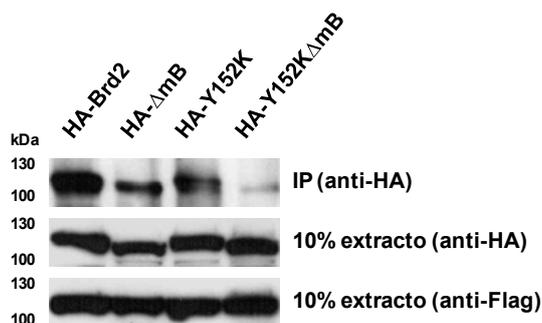


**Figura 30. Interacciones entre las proteínas Brd3 y Brd4 en extractos celulares.** Coinmunoprecipitación con matriz de agarosa conjugada con anticuerpos contra el epítipo Flag, utilizando extractos proteicos de células HEK293T transfectadas con vectores de expresión de las proteínas Brd3 o Brd4 etiquetadas con un epítipo Flag (Flag-Brd3 y Flag-Brd4 respectivamente) junto con vectores de expresión de las proteínas Brd3 o Brd4 etiquetadas con un epítipo HA (HA-Brd3 y HA-Brd4 respectivamente). Las proteínas coinmunoprecipitadas se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo HA (IP). Un 10% de los extractos también se analizó mediante *Western Blot* para determinar la cantidad de proteína etiquetada con los epítipos Flag y HA presente en los extractos antes de la precipitación.

Siguiendo la misma metodología, se investigó también la implicación del motivo B de Brd2 en su interacción con la proteína Brd3. En este caso se cotransfectaron las células con vectores de expresión de las proteínas Flag-Brd2 o Flag- $\Delta$ B y vectores de expresión de la proteína HA-Brd3 (Figura 27). En la Figura 32 se muestra cómo la ausencia del motivo B de Brd2 redujo considerablemente su capacidad para interactuar con la proteína Brd3.

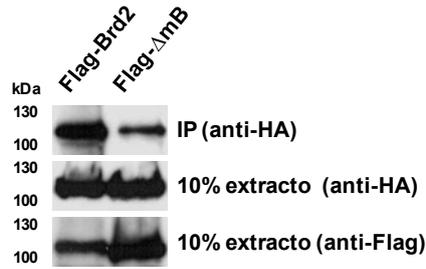
A continuación se analizó la implicación del motivo B en la interacción de un fragmento de la proteína Brd2 con la proteína Brd2 endógena. Para ello, se utilizaron los anticuerpos generados en conejo contra el fragmento carboxilo-terminal de la proteína Brd2 de ratón (aminoácidos 698 al 780), que corresponde a la región carboxilo-terminal de la proteína, a continuación del motivo B, y que por lo tanto no incluye a éste (Figura 33A). Para el análisis se transfectaron células P19 con dos construcciones de expresión diferentes etiquetadas con el epítipo Flag: una que

expresaba un fragmento de Brd2 carente la región carboxilo-terminal, pero con el motivo B intacto (Flag- $\Delta$ ET; aminoácidos 1 al 612) y otra que expresaba un fragmento de Brd2 que carecía tanto de la región carboxilo-terminal como del motivo B (Flag-BD1+2; aminoácidos 1 al 472) (Figura 33A). Por lo tanto, el anticuerpo generado era incapaz de reconocer ninguna de estas dos proteínas, pero si la proteína Brd2 endógena.

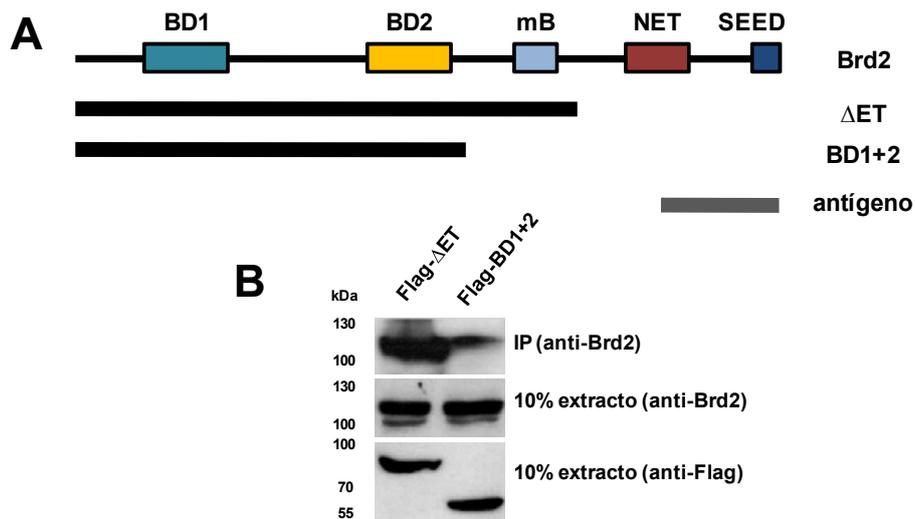


**Figura 31. El motivo B y el primer bromodominio están implicados en la interacción de la proteína Brd2 consigo misma.** Coinmunoprecipitación con matriz de agarosa conjugada con anticuerpos contra el epítipo Flag, utilizando extractos proteicos de células HEK293T transfectadas con vectores de expresión de la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo Flag (Flag-Brd2) junto con vectores de expresión de la proteína Brd2, Brd2 carente del motivo B, Brd2 con la mutación puntual Y152K, o ambas mutaciones combinadas, etiquetadas con un epítipo HA (HA-Brd2, HA- $\Delta$ mB, HA-Y152K y HA-Y152K $\Delta$ mB respectivamente). Las proteínas coimmunoprecipitadas se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo HA (IP). Un 10% de los extractos también se analizó mediante *Western Blot* para determinar la cantidad de proteína etiquetada con los epítipos Flag y HA presente en los extractos antes de la precipitación.

Mediante el uso de anticuerpos contra el epítipo Flag conjugados a una matriz de sefarosa se precipitaron las proteínas etiquetadas con el epítipo Flag expresadas en las células y la presencia de la proteína Brd2 endógena en los precipitados se analizó mediante el uso del anticuerpo generado en conejo. Como se muestra en la Figura 33B, la proteína que incluye el motivo B (Flag- $\Delta$ ET) coimmunoprecipitó eficientemente la proteína Brd2 endógena, en comparación con la proteína que carece del motivo B (Flag-BD1+2). Por lo tanto, el motivo B de Brd2 es importante para su interacción con la proteína Brd2 endógena.

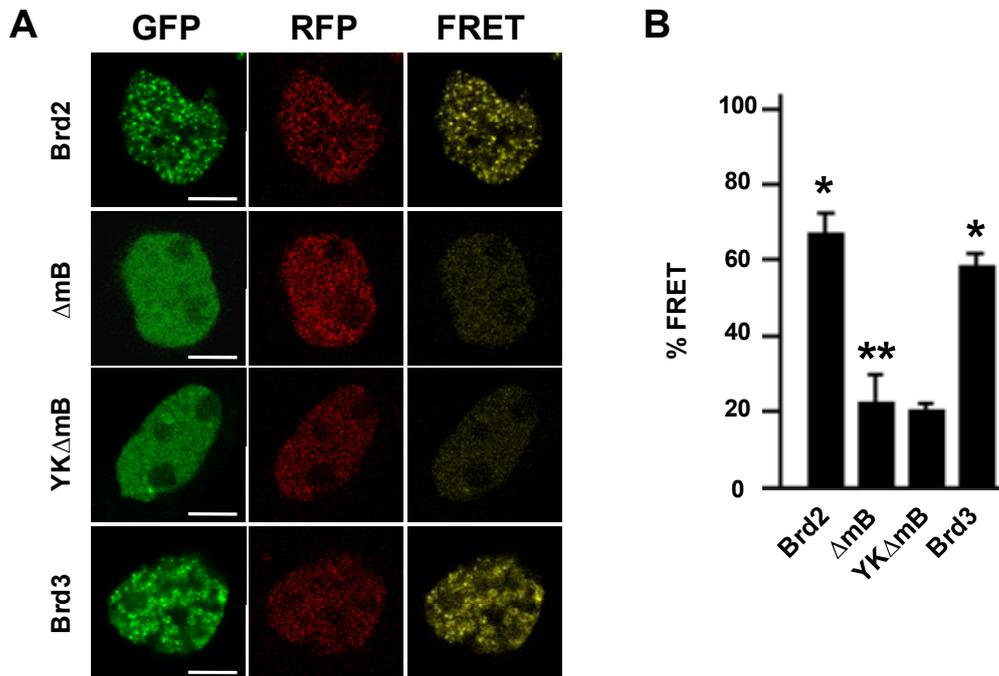


**Figura 32. El motivo B está implicado en la interacción de Brd2 con Brd3.** Coimmunoprecipitación con matriz de agarosa conjugada con anticuerpos contra el epítipo Flag, utilizando extractos proteicos de células HEK293T transfectadas con vectores de expresión de la proteína Brd2 silvestre o carente del motivo B etiquetada con un epítipo Flag (Flag-Brd2 y Flag- $\Delta$ mB respectivamente) junto con un vector de expresión de la proteína Brd3 etiquetada con un epítipo HA (HA-Brd3). Las proteínas coimmunoprecipitadas se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo HA (IP). Un 10% de los extractos también se analizó mediante *Western Blot* para determinar la cantidad de proteína etiquetada con los epítipos Flag y HA presente en los extractos antes de la precipitación.



**Figura 33. El motivo B está implicado en la interacción de la proteína Brd2 sobreexpresada con la proteína Brd2 endógena.** (A) Esquema del antígeno carboxilo-terminal utilizado para la obtención de anticuerpos contra Brd2, y de las construcciones utilizadas en el experimento de coimmunoprecipitación:  $\Delta$ ET y BD1+2, correspondientes respectivamente a la proteína Brd2 carente de la región carboxilo-terminal o de la región carboxilo-terminal y el motivo B. Los anticuerpos generados, capaces de reconocer la proteína Brd2 endógena, no eran capaces de reconocer las proteínas expresadas a partir de las construcciones indicadas. (B) Coimmunoprecipitación con anticuerpos contra el epítipo Flag conjugados a una matriz de agarosa, utilizando extractos de células P19 transfectadas con vectores de expresión de las proteínas indicadas en (A), etiquetadas con un epítipo Flag (Flag- $\Delta$ ET y Flag-BD1+2 respectivamente). Las proteínas coimmunoprecipitadas se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos contra Brd2 (IP). Un 10% de los extractos también se analizó mediante *Western Blot* para determinar la cantidad de proteína etiquetada con el epítipo Flag y de proteína Brd2 endógena presente en los extractos antes de la precipitación.

Finalmente, para tener una evidencia más de la función del motivo B en la interacción de la proteína Brd2 consigo misma, así como de la interacción entre proteínas BET *in vivo*, se realizó un ensayo de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) en células P19.



**Figura 34. Interacción de la proteína Brd2 consigo misma y con la proteína Brd3 mediante FRET. (A)** Análisis de FRET en células P19 cotransfectadas con vectores de expresión de la fusión GFP-Brd2 y de vectores de expresión de fusiones RFP con las proteínas indicadas: Brd2,  $\Delta$ mB, YK $\Delta$ mB y Brd3, correspondientes respectivamente a las proteínas Brd2, Brd2 carente del motivo B, Brd2 carente del motivo B y con la mutación puntual Y152K y Brd3. En los paneles se muestra la emisión de la proteína GFP (GFP), la emisión de la proteína RFP (RFP) y la emisión debida a FRET (FRET) en cada caso. **(B)** Cuantificación de la eficiencia de FRET a partir de cinco experimentos independientes. Se muestran valores medios y desviación estándar. La significación de las diferencias entre los casos se analizó estadísticamente mediante la prueba t de Student. Los valores de significación para las diferencias con el control YK $\Delta$ mB fueron: \* $P < 0,001$  y \*\* $P = 0,6$ . La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

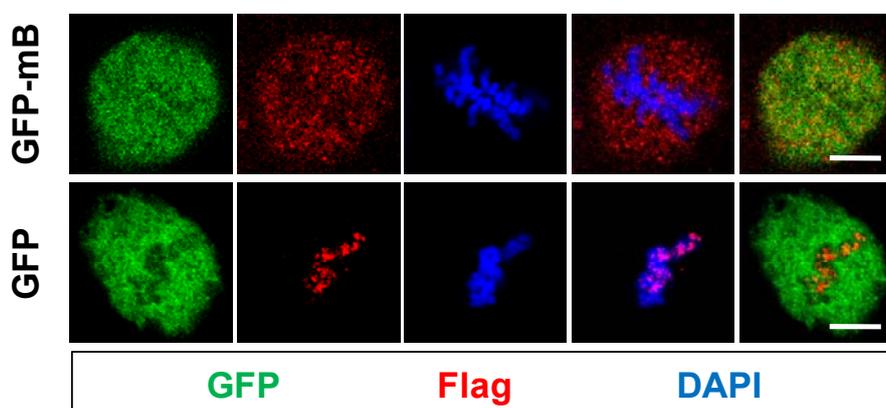
Para ello se cotransfectaron células P19 con vectores de expresión de una fusión de la proteína Brd2 con la proteína fluorescente roja (RFP, *Red Fluorescent Protein*) y de fusiones de las proteínas Brd2, Brd2 carente del motivo B, Brd2 carente del motivo B en combinación con la mutación Y152K y Brd3. En el caso de la fusión con RFP, la proteína Brd2 se colocó en la región amino-terminal de la proteína de fusión (Brd2-RFP), mientras que en el caso de la fusión con GFP, las proteínas se

colocaron en la región carboxilo-terminal de la proteína de fusión (GFP-Brd2, GFP- $\Delta$ mB, GFP-Y152K/ $\Delta$ mB y GFP-Brd3). La técnica de FRET permite analizar la aproximación entre dos fluoróforos debida a la interacción entre las proteínas recombinantes. Sólo cuando la distancia entre los fluoróforos es menor de 100Å (Pollok et al., 1999), debido a la interacción entre las proteínas recombinantes, la energía emitida por el fluoróforo donador tras su excitación puede excitar a su vez al fluoróforo aceptor. De esta manera, la señal debida a la energía emitida por el aceptor tras ser excitado por del donador, se utiliza como indicativo de la interacción entre las proteínas recombinantes. En este caso el fluoróforo GFP actúa como donador para el fluoróforo RFP, que actúa como aceptor, ya que el rango de emisión de la GFP solapa con el de excitación de la RFP (Liu et al., 2008). Las células transfectadas con las construcciones indicadas fueron procesadas para el análisis mediante microscopía confocal y se analizó, tras excitar el fluoróforo donador, tanto la emisión de éste como la señal debida a la interacción entre el fluoróforo donador y el aceptor (señal de FRET). La señal de FRET obtenida en los distintos casos se normalizó teniendo en cuenta la emisión de los fluoróforos donador y aceptor por separado siguiendo una normalización ratiométrica. Como se observa en la Figura 34, se obtuvo una señal FRET positiva para los pares de proteínas GFP-Brd2/Brd2-RFP y GFP-Brd3/Brd2-RFP, significativamente mayor a la observada para los pares GFP- $\Delta$ mB/Brd2-RFP y GFP-Y152K/ $\Delta$ mB. Estos resultados confirman la interacción entre proteínas BET *in vivo*, así como la importancia del motivo B en la interacción de la proteína Brd2 consigo misma. Resulta especialmente interesante la observación de que, utilizando la técnica de FRET, la pérdida del motivo B (GFP- $\Delta$ mB) es suficiente para reducir el nivel de la señal de FRET hasta un nivel semejante al de la señal de la proteína que combina la pérdida del motivo B con la mutación en el primer bromodominio que afecta a la dimerización a través de éste (GFP-Y152K/ $\Delta$ mB), lo que refuerza la importancia del motivo B en la interacción.

### **3.2.5. La sobreexpresión del motivo B de Brd2 interfiere con la capacidad de Brd2 de interactuar con los cromosomas mitóticos**

Teniendo en cuenta que los resultados anteriormente expuestos demuestran la relevancia de la interacción a través del motivo B para la asociación de Brd2 con los cromosomas, se investigó la posibilidad de interferir con dicha capacidad mediante la sobreexpresión de un fragmento de Brd2 correspondiente al motivo B. Este fragmento, al interactuar con el motivo B de la proteína Brd2 silvestre podría afectar a la

capacidad de ésta de asociarse con los cromosomas. Para investigar esta posibilidad, se cotransfectaron células P19 con vectores de expresión de la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo Flag (Flag-Brd2) junto con vectores de expresión de una fusión entre la GFP y un fragmento de Brd2 (aminoácidos 463 al 565) que incluye al motivo B (GFP-mB). Como control, se cotransfectaron las células con el vector de expresión de la proteína GFP. La localización de la proteína Flag-Brd2 se analizó en las primeras fases de la mitosis y, como se muestra en la Figura 35, dicha proteína apareció dissociada de los cromosomas sólo en el caso en el que las células se cotransfectaron con el plásmido de expresión de la proteína de fusión GFP-mB. Este resultado confirmó la importancia de la interacción mediada por el motivo B en la asociación de Brd2 con los cromosomas mitóticos.



**Figura 35. La sobreexpresión del motivo B de Brd2 interfiere con la unión de Brd2 a los cromosomas mitóticos.** Localización de la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo Flag en células P19 transfectadas con vectores de expresión de la GFP como control (GFP) o de una fusión de GFP con el motivo B de Brd2 (GFP-mB), visualizada por inmunofluorescencia con microscopio confocal. El DNA se tiñó con DAPI. Las imágenes son representativas de al menos 7 de 8 células analizadas. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

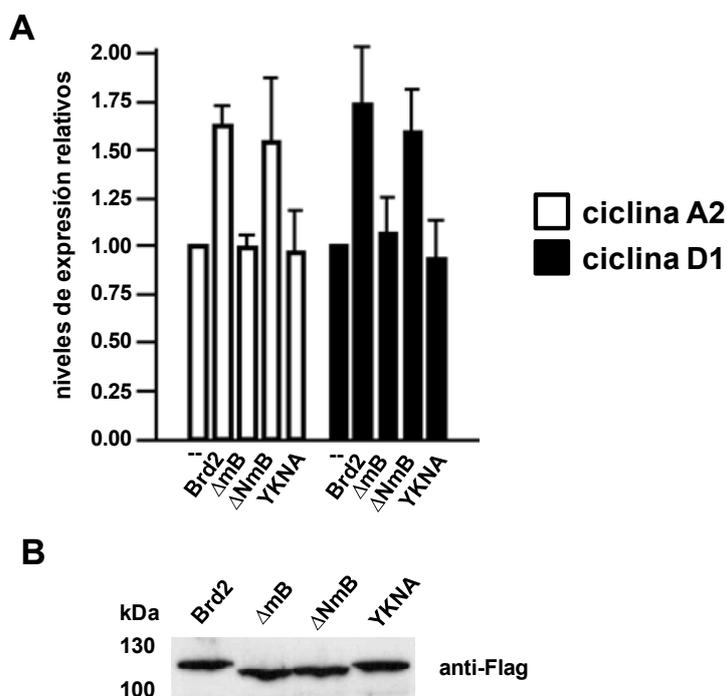
### 3.2.6. La delección del motivo B afecta a la estimulación del ciclo celular asociada a la sobreexpresión de Brd2

Se ha demostrado previamente un papel de Brd2 en proliferación como activador transcripcional de genes relacionados con el ciclo celular (véase la sección de Introducción). Concretamente se ha demostrado que la sobreexpresión de Brd2 estimula la expresión del gen *CcnA2* y la progresión del ciclo celular en fibroblastos de rata (Sinha et al., 2005) y que la disminución de los niveles de la proteína Brd2 induce una reducción en el nivel de expresión del gen *CcnD1* en células humanas de la línea

HEK293 (LeRoy et al., 2008). Teniendo esto en cuenta, se investigó si la sobreexpresión de Brd2 en las células P19 provocaba un incremento en la expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1* y si dicho efecto era dependiente de la presencia del motivo B. El efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la expresión del gen *CcnA2* en fibroblastos de rata se observó en condiciones de estimulación con suero (Sinha et al., 2005), por lo que se optó por cultivar las células P19 en medio con bajo suero (0,1%) durante 48 horas para luego estimular la proliferación añadiendo suero (10% final) durante 18 horas antes de procesar las células para el análisis de expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1*. Las células se transfectaron 12 horas antes de la inducción con suero con vectores de expresión de las proteínas Brd2 y Brd2 carente del motivo B ( $\Delta$ mB). Como control positivo del experimento se utilizó un vector de expresión de la proteína Brd2 carente del fragmento que incluye los aminoácidos 475 al 513 ( $\Delta$ NmB), que no tiene afectado el motivo B y en consecuencia es capaz de interactuar con los cromosomas (Figura 16). Como control negativo, se utilizó un vector de expresión de la proteína Brd2 con las mutaciones puntuales Y152K y N428A (Y152KN428A) en los bromodominios que, como se mostró anteriormente, está afectada en su capacidad de interactuar con la cromatina (Figura 15, 22 y 23). El nivel de expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1* se normalizó respecto al nivel de expresión del gen *Gapdh*. En la Figura 36A se muestra el nivel de expresión de los genes indicados relativizado al nivel de expresión de los mismos genes en células P19 transfectadas con el vector de expresión vacío y sujetas al mismo tratamiento con suero. Como se observa en dicha figura, la sobreexpresión de Brd2 en estas condiciones produjo un incremento en la expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1* y este efecto dependía de la presencia del motivo B. Como se esperaba, la proteína  $\Delta$ NmB tuvo el mismo efecto que la proteína Brd2 silvestre, mientras que la proteína Y152KN428A no tuvo efecto significativo en la expresión de los genes analizados. Las condiciones de transfección fueron puestas a punto para conseguir el mismo nivel de expresión de proteínas a partir de las distintas construcciones utilizadas, según se determinó mediante *Western Blot* a partir de extractos de proteínas realizados a partir de una fracción de las mismas células utilizadas para las extracciones de RNA total (Figura 36B).

Como se comentó en la sección de Introducción, se ha descrito que la proteína Brd2 se asocia con el promotor del gen que codifica la ciclina D1 en experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (*ChIP, Chromatin Immunoprecipitation*) en células HEK293 transfectadas con vectores de expresión de la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo Flag (LeRoy et al., 2008). Teniendo en cuenta el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la transactivación de los genes *CcnA2* y *CcnD1* en células

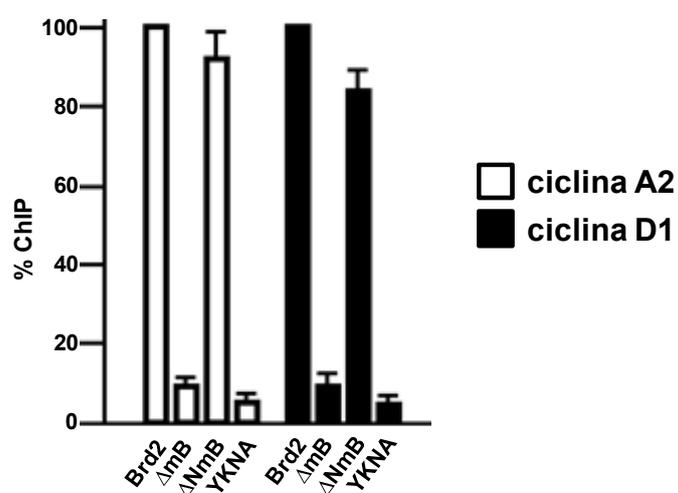
P19 y la importancia del motivo B en dicho efecto, se investigó la interacción de Brd2 con el promotor de los genes *CcnA2* y *CcnD1* en esta línea celular, así como el efecto de la pérdida del motivo B en dicha interacción.



**Figura 36. El motivo B es necesario para el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la expresión de los genes de ciclina D1 y A2. (A)** Niveles relativos de expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1* determinados mediante PCR en tiempo real a partir de la retrotranscripción de RNA total de células P19 transfectadas con vectores de expresión de las proteínas indicadas, etiquetadas con un epítipo Flag, y sujetas a estimulación con suero. Los niveles de expresión se normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Gapdh* y se relativizaron al nivel de expresión en las células P19 transfectadas con el vector de expresión vacío (-). La significación de las diferencias entre los casos se analizó estadísticamente mediante la prueba t de Student. Los valores de significación para las diferencias fueron: entre el control (-) y Brd2 o  $\Delta$ NmB,  $P \leq 0,01$ ; entre el control (-) y  $\Delta$ mB o YKNA,  $P \geq 0,45$ . **(B)** *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo Flag de las distintas proteínas utilizadas en (A) expresadas en células P19. Se analizaron 10  $\mu$ g de proteína total por carril.  $\Delta$ mB, delección del motivo B;  $\Delta$ NmB, delección de 38 aminoácidos anteriores al motivo B; YKNA, mutación doble Y152KN482A.

Se utilizaron nuevamente los mismos controles que en los experimentos anteriores, las construcciones de expresión de las proteínas  $\Delta$ NmB e Y152KN482A como controles positivo y negativo respectivamente. Para analizar la interacción de estas proteínas con el promotor de los genes *CcnA2* y *CcnD1* se realizó un ensayo de *ChIP* en células P19 transfectadas con vectores de expresión de las proteínas Brd2,  $\Delta$ mB y los controles  $\Delta$ NmB e Y152KN482A, todas ellas etiquetadas con un epítipo

Flag. La cromatina de las células transfectadas fragmentada por sonicación se incubó con una matriz de sefarosa conjugada con anticuerpos contra el epítipo Flag. Los fragmentos de DNA eluidos se analizaron mediante PCR en tiempo real con cebadores específicos de las regiones promotoras de los genes *CcnA2* o *CcnD1*. El valor obtenido en cada caso se normalizó al nivel obtenido utilizando como molde el DNA total procedente de un 10% del extracto de cromatina previo a la precipitación y los valores normalizados se relativizaron al valor obtenido para la proteína Brd2.

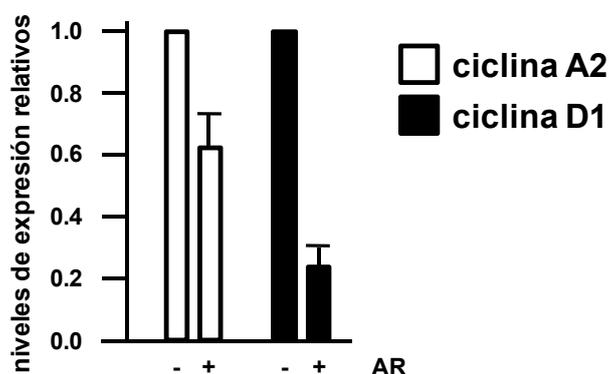


**Figura 37. El motivo B es necesario para la asociación de Brd2 con los promotores de los genes de ciclina D1 y A2.** Niveles de asociación de las proteínas indicadas etiquetadas con un epítipo Flag con el promotor de los genes *CcnA2* y *CcnD1* en células P19 transfectadas, determinados por experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (*ChIP*) con anticuerpos contra el epítipo Flag. Se utilizaron las mismas proteínas descritas en la Figura 36. Los niveles de asociación se relativizaron a los de la construcción Brd2 silvestre (100%). La significación de las diferencias entre los casos se analizó estadísticamente mediante la prueba t de Student. Los valores de significación para las diferencias fueron: entre Brd2 y ΔNmB o YKNA,  $P \leq 0,001$ , y entre Brd2 y ΔNmB,  $P \geq 0,5$ .

Como se muestra en la Figura 37, el motivo B resultó ser esencial para la adecuada asociación de Brd2 con las regiones promotoras de los genes *CcnA2* y *CcnD1*. Como se esperaba, la proteína ΔNmB tuvo la misma capacidad de interaccionar con las regiones analizadas que la proteína Brd2 silvestre, mientras que la proteína Y152KN428A, al tener afectada la estructura de los bromodominios, perdía la capacidad de asociarse con estas regiones.

Según se ha descrito en (Pao et al., 2011), el tratamiento con ácido retinoico provoca en células P19 una parada del ciclo celular en la fase G1, concomitante con el

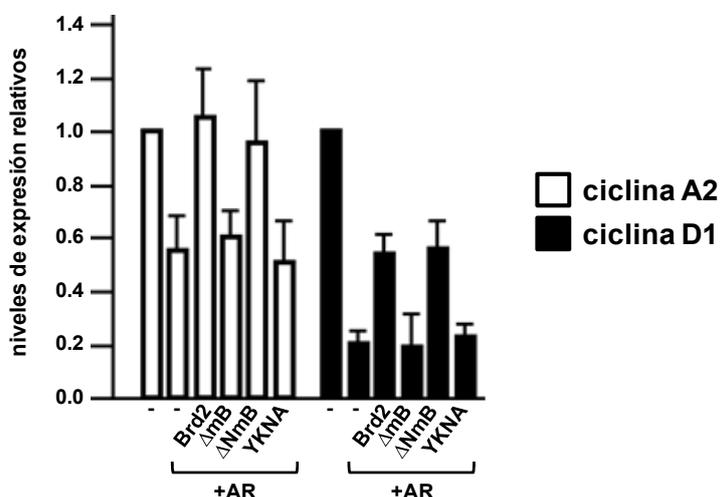
inicio del proceso de diferenciación neuronal. Teniendo en cuenta el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la expresión de genes del ciclo celular, nos preguntamos si dicha sobreexpresión podría interferir con la parada del ciclo celular inducida por ácido retinoico y si dicho efecto sería dependiente de la integridad del motivo B. En primer lugar, se comprobó que el tratamiento con ácido retinoico a una concentración de 0,5  $\mu$ M durante 18 horas inducía una disminución en los niveles de expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1* en células P19.



**Figura 38. El tratamiento de células P19 con ácido retinoico induce una disminución de la expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1*.** Niveles relativos de expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1* determinados mediante PCR en tiempo real a partir de la retrotranscripción de RNA total de células P19 transfectadas con el vector de expresión vacío y tratadas (+) o no (-) durante 18 horas con ácido retinoico (AR). Los niveles de expresión se normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Gapdh* y se relativizaron al nivel de las células transfectadas con el vector de expresión vacío y no tratadas con ácido retinoico. La significación de las diferencias entre los casos se analizó estadísticamente mediante la prueba t de Student. El valor de significación para las diferencias debidas a la adición de AR fue de  $P < 0,005$ .

Como se observa en la Figura 38, el nivel relativo de expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1* determinado mediante PCR en tiempo real, disminuyó en torno a un 45 y 80% respectivamente. En segundo lugar, se transfectaron células P19 con vectores de expresión de las proteínas Brd2, Brd2 carente del motivo B ( $\Delta$ mB) y los mutantes  $\Delta$ NmB e Y152KN428A y se analizó el nivel de expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1* tras el tratamiento con ácido retinoico (Figura 39). Las células se transfectaron 6 horas antes del tratamiento con ácido retinoico y el nivel de expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1* se determinó mediante PCR en tiempo real. En la Figura 39 se muestra el nivel de expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1* en cada condición,

normalizado al nivel correspondiente de expresión del gen *Gapdh* y relativizado al nivel de expresión en células P19 transfectadas con el vector de expresión vacío y no tratadas con ácido retinoico.

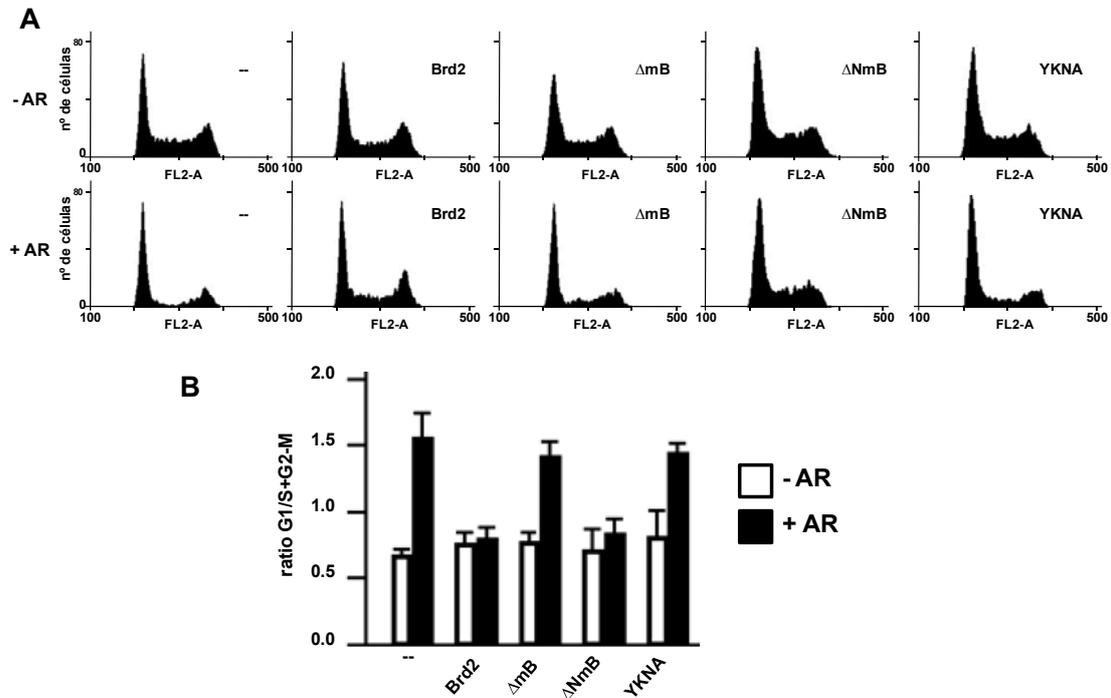


**Figura 39. El motivo B es necesario para el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la expresión de los genes de ciclina D1 y A2 en presencia de ácido retinoico.** Niveles relativos de expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1* determinados mediante PCR en tiempo real a partir de la retrotranscripción de RNA total de células P19 transfectadas con el vector de expresión vacío y tratadas (+) o no (-) durante 18 horas con ácido retinoico (AR). Los niveles de expresión se normalizados respecto al nivel de expresión del gen *Gapdh* y se relativizaron al nivel de las células transfectadas con el vector de expresión vacío y no tratadas con ácido retinoico. Se utilizaron las mismas construcciones descritas en la Figura 36. La significación de las diferencias entre los casos se analizó estadísticamente mediante la prueba t de Student. Los valores de significación para las diferencias fueron: de la adición de AR,  $P < 0,005$ ; entre el control y Brd2 o  $\Delta NmB$  en presencia de AR,  $P < 0,02$ ; entre el control y  $\Delta mB$  o YKNA en presencia de AR,  $P \geq 0,4$ .

Como se observa, la sobreexpresión de Brd2 anuló la inhibición de los genes *CcnA2* y *CcnD1* inducida por el tratamiento con ácido retinoico, siendo dicho efecto dependiente de la presencia del motivo B. Como se esperaba, el efecto de la proteína  $\Delta NmB$  fue similar al observado con la proteína Brd2 silvestre y el efecto de la proteína Y152KN428A similar al de la proteína  $\Delta mB$ .

Finalmente se investigó si el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1* en células tratadas con ácido retinoico se correlacionaba con un efecto fenotípico en el perfil del ciclo celular. Para ello, se analizó por citometría de flujo el perfil del ciclo de células P19 transfectadas con los vectores de expresión utilizados en el experimento anterior (correspondientes a las

proteínas Brd2,  $\Delta$ mB,  $\Delta$ NmB e Y152KN428A) tratadas o no con ácido retinoico. Se utilizaron las mismas condiciones de transfección y el mismo tratamiento con ácido retinoico que en el experimento anterior y se comparó, en cada caso, el perfil del ciclo de células tratadas con el perfil del ciclo de células no tratadas.



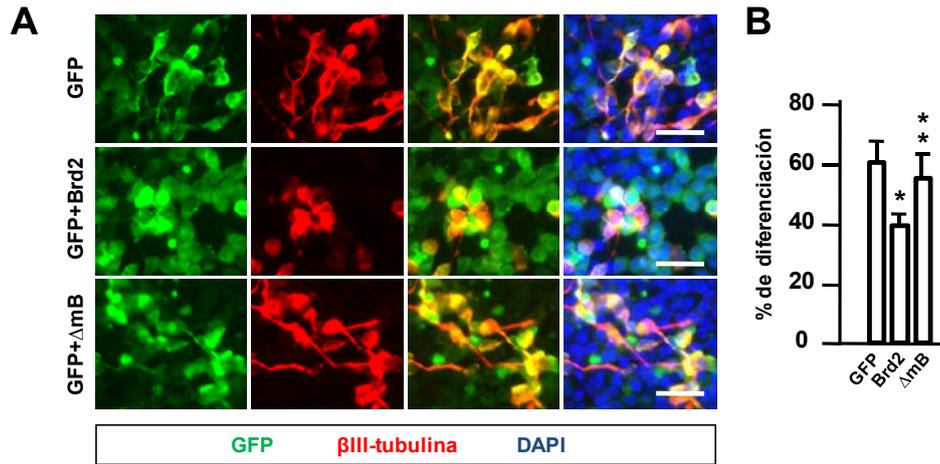
**Figura 40. El motivo B es necesario para el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la estimulación del ciclo celular en presencia de ácido retinoico. (A)** Perfil del ciclo celular determinado por citometría de flujo a partir de células P19 transfectadas con vectores de expresión de las proteínas indicadas o con el vector de expresión vacío (-) y tratadas (+AR) o no (-AR) con ácido retinoico. Se utilizaron las mismas construcciones descritas en la Figura 36. **(B)** Relación entre el número de células en la fase G1 del ciclo celular respecto al número de células en el resto de fases de cada uno de los casos descritos en (A). Se representa el valor medio y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. La significación de las diferencias entre los casos se analizó estadísticamente mediante la prueba t de Student. Los valores de significación para las diferencias fueron: para el control o  $\Delta$ mB debido al tratamiento con AR,  $P < 0,02$ ; para Brd2 debido al tratamiento con AR,  $P = 0,58$ ; para las diferencias entre control, Brd2 y  $\Delta$ mB en ausencia de AR,  $P \geq 0,3$ ; entre Brd2 y el control o  $\Delta$ mB tras el tratamiento con AR,  $P < 0,02$ ; entre el control y  $\Delta$ mB tras el tratamiento con AR,  $P = 0,35$ . Las proteínas  $\Delta$ NmB e YKNA se comportaron como las proteínas silvestre y  $\Delta$ mB respectivamente.

En la figura 40A se muestra el perfil del ciclo de una muestra representativa de cada caso y en la Figura 40B se muestra una gráfica donde se representa para cada caso la relación entre el número de células en la fase G1 del ciclo celular respecto al número de células en el resto de fases del ciclo. Como se observa en dicha gráfica, el

tratamiento con ácido retinoico en células transfectadas con el vector de expresión vacío indujo una acumulación de células en la fase G1 del ciclo celular (un cambio aproximadamente de 0,7 a 1,5 que refleja un incremento del 40% al 60% de células en G1). Como se puede observar, la sobreexpresión de Brd2 anuló la acumulación de células en la fase G1 inducida por ácido retinoico, siendo el efecto dependiente de la presencia del motivo B. Una vez más, la proteína  $\Delta$ NmB mostró el mismo efecto que la proteína Brd2 silvestre, mientras que la proteína Y152KN428A, al igual que la proteína  $\Delta$ mB, no tuvo un efecto significativo.

### **3.2.7. La sobreexpresión de Brd2 interfiere con la diferenciación neuronal, siendo el efecto dependiente del motivo B**

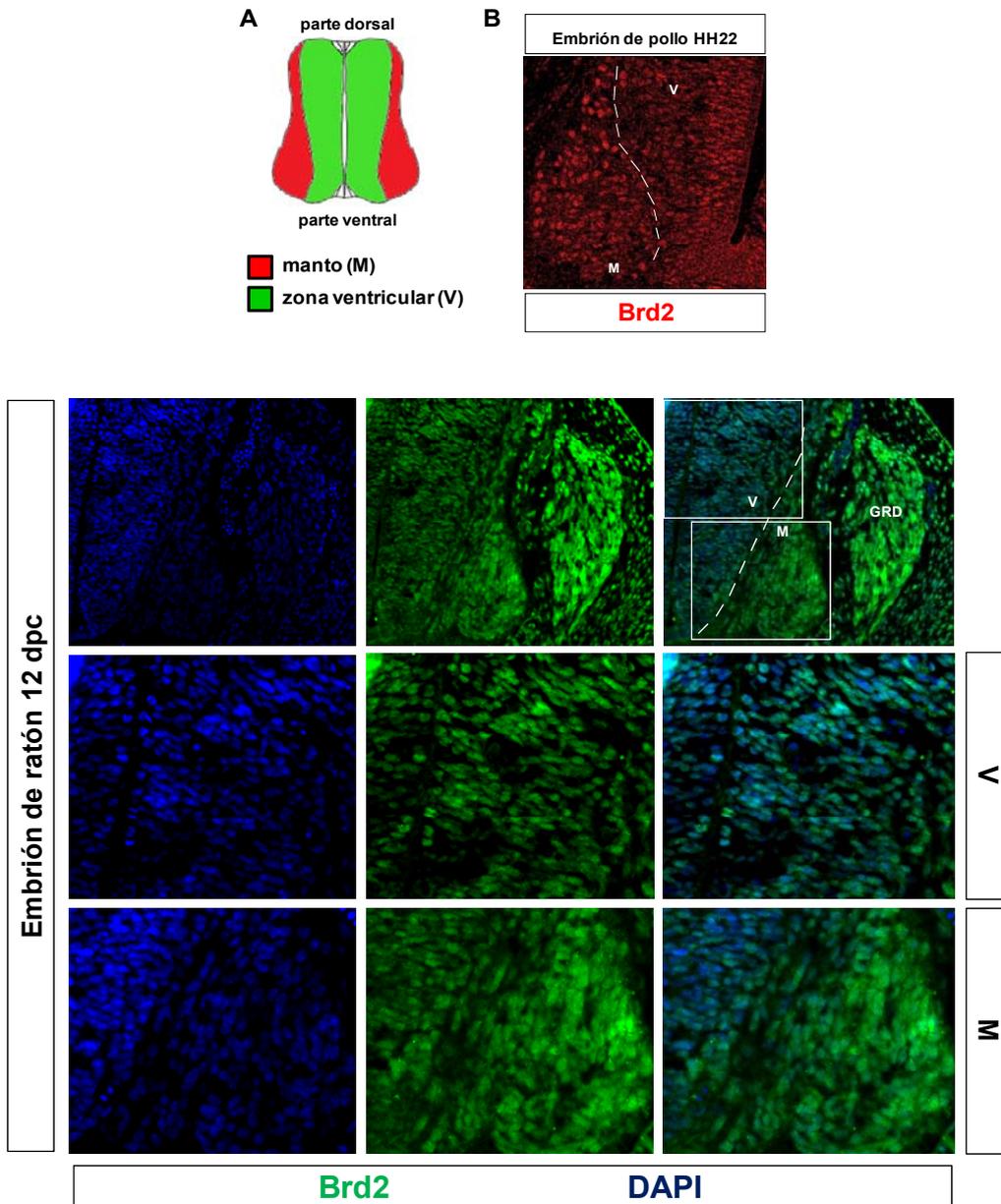
Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de Brd2 en células P19 neutralizaba la acumulación de células en la fase G1 del ciclo celular inducida por tratamiento con ácido retinoico, nos preguntamos si dicho efecto podría tener consecuencias sobre el proceso de diferenciación neuronal que normalmente induce el ácido retinoico. Una forma alternativa al uso de ácido retinoico para inducir diferenciación neuronal en células P19 consiste la transfección de éstas con vectores de expresión del factor neurogénico NeuroD2 y de su cofactor E12 (Farah et al., 2000). Este protocolo resulta más sencillo de aplicar, más controlable y de menor duración que el uso de ácido retinoico. Si bien la eficacia depende del porcentaje de transfección, en condiciones normales el porcentaje de transfección de células P19 es de al menos un 50%. Así, el porcentaje de neurogénesis se determinó analizando solo las células transfectadas (células que expresaban GFP a partir de un vector de expresión que se cotransfectaba en todas las condiciones), y calculando el porcentaje de estas que expresaban el marcador neuronal  $\beta$ III-Tubulina. La aplicación de este protocolo resultaba en la expresión del marcador  $\beta$ III-Tubulina en el 60% de las células transfectadas tres días después de la transfección (Figura 41). Por lo tanto, se realizaron experimentos de neurogénesis para analizar como afectaba a este porcentaje la sobreexpresión de la proteína Brd2 silvestre o carente del motivo B ( $\Delta$ mB). Así, vectores de expresión de estas proteínas, o el vector de expresión vacío como control, se cotransfectaron junto con vectores de expresión de NeuroD2, E12 y GFP, y se evaluó el porcentaje de neurogénesis a los tres días. Como se muestra en la Figura 41, la sobreexpresión de Brd2 redujo significativamente la proporción de células transfectadas que expresaban el marcador neuronal  $\beta$ III-Tubulina (aproximadamente un 23%), dependiendo este efecto de la presencia del motivo B.



**Figura 41. El motivo B es necesario para el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la diferenciación neuronal inducida en células P19. (A)** Inmunofluorescencia de células P19 transfectadas con vectores de expresión del factor neurogénico NeuroD2 y de su cofactor E12, junto con vectores de expresión de las proteínas indicadas: GFP sola o en combinación con Brd2 o Brd2 carente del motivo B ( $\Delta$ mB). Se evaluó la neurogénesis como el porcentaje de células transfectadas (células que expresaban GFP) en las que se detectaba el marcador neuronal  $\beta$ III-tubulina. El DNA se tiñó con DAPI. La barra de escala equivale a 50  $\mu$ m **(B)** Representación del porcentaje de neurogénesis cuantificando a partir de 2 a 3 áreas de cuatro experimentos independientes. En cada caso se representa el valor medio y la desviación estándar. La significación de las diferencias entre los casos se analizó estadísticamente mediante la prueba t de Student. Los valores de significación para las diferencias respecto al control (GFP) fueron \* $P < 0,01$  y \*\* $P = 0,37$ .

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió investigar el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la diferenciación neuronal en un modelo animal. Para ello se optó por el tubo neural del embrión de pollo, un modelo muy utilizado para este tipo de análisis. Como se comentó en la sección de Introducción, el tubo neural embrionario es la estructura precursora del sistema nervioso central de vertebrados. Se trata de un modelo muy útil para el estudio de la coordinación entre los procesos de proliferación y diferenciación neuronal gracias a la marcada compartimentación que existe entre estos procesos. En un corte transversal del tubo neural se pueden distinguir principalmente dos zonas (Figura 42A): un neuroepitelio pseudoestratificado situado hacia la luz del tubo neural, llamado zona ventricular, compuesto por progenitores neurales que proliferan, y un compartimento marginal, llamado manto, hacia el cual los progenitores neuronales, tras salir del ciclo celular, migran para establecerse y diferenciarse en neuronas (ver la sección de Introducción). Se ha comentado que Crowley y colaboradores describieron que la proteína Brd2 en el tubo neural de embriones de ratón se detecta en el núcleo de células que proliferan en la

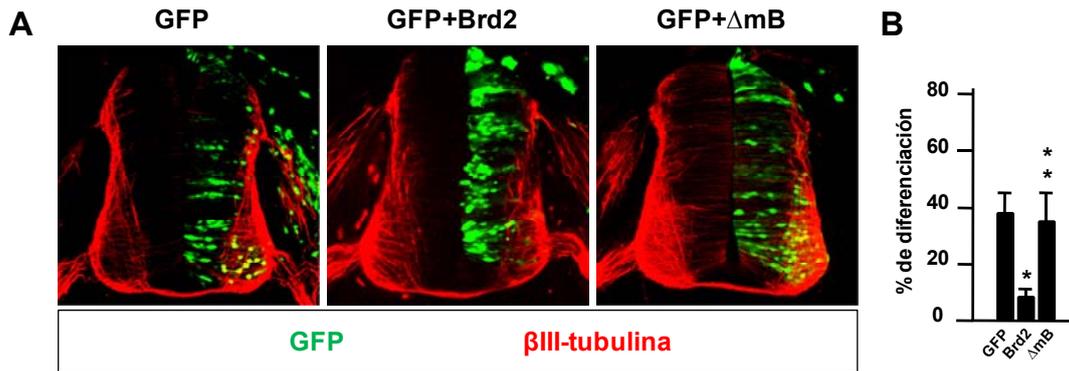
zona ventricular y en el citoplasma en neuronas del manto o de los ganglios de la raíz dorsal (Crowley et al., 2004).



**Figura 42. Expresión de Brd2 en el tubo neural embrionario.** (A) Diagrama donde se muestran las dos principales regiones que se distinguen en un corte transversal del tubo neural embrionario, la zona ventricular (V), donde se localizan los progenitores en proliferación y el manto (M), hacia donde migran y se establecen las células tras salir del ciclo celular para diferenciarse en neuronas. (B) Inmunofluorescencia de un corte transversal del tubo neural del embrión de pollo en estadio HH22 de desarrollo, analizada con anticuerpos contra la proteína Brd2 de pollo y microscopía confocal. En la imagen se señalan la zona ventricular (V) y el manto (M). (C) Inmunofluorescencia de una sección transversal del tubo neural del embrión de ratón a 12 dpc de desarrollo, analizada con anticuerpos contra la proteína Brd2 de ratón, y microscopía de fluorescencia. En las filas inferiores se muestran detalles ampliados de las regiones señaladas en la fila superior correspondientes a la zona ventricular (V) y al manto (M). También se señala un ganglio de la raíz dorsal (GRD). El DNA se tiñó con DAPI.

Utilizando anticuerpos generados en nuestro laboratorio contra la proteína Brd2 de pollo y de ratón se analizó mediante inmunofluorescencia la presencia y localización de esta proteína en el tubo neural embrionario. Como se observa en las Figuras 42B y 42C, el patrón de distribución de la proteína Brd2 en el tubo neural de embriones de pollo y ratón confirmó en parte las observaciones descritas en (Crowley et al., 2004): la proteína Brd2 se detectó en el núcleo de células de la zona ventricular, pero sólo parcialmente en el citoplasma de neuronas del manto y de los ganglios de la raíz dorsal.

Gracias a la técnica de electroporación *in ovo*, es posible transfectar células de la zona ventricular del tubo neural y evaluar el impacto de la transfección en su capacidad para diferenciarse. Esta técnica consiste en la microinyección de vectores de expresión en la luz del tubo neural y la aplicación de micropulsos eléctricos unidireccionales, de tal modo que sólo las células de la zona ventricular de la mitad del tubo, aquella que da al cátodo del electrodo, son transfectadas, permaneciendo la otra mitad sin transfectar como control del experimento (García-Domínguez et al., 2003). Gracias a esta técnica, se pueden realizar experimentos de ganancia de función para analizar el impacto de la sobreexpresión de proteínas en el proceso de neurogénesis. Para ello, se electroporó el tubo neural de embriones de pollo en estadio HH17 de desarrollo con vectores de expresión de la proteína Brd2 silvestre o carente del motivo B (Brd2 y  $\Delta$ mB respectivamente), o el vector de expresión vacío como control, y se evaluó el porcentaje de neurogénesis espontánea que ocurre de manera natural (sin sobreexpresión de factores neurogénicos). En todos los casos se coelectroporó un vector de expresión de la GFP para detectar las células transfectadas. Los embriones electroporados se analizaron 30 horas después de la electroporación mediante inmunofluorescencia en cortes transversales del tubo neural a nivel torácico. El porcentaje de neurogénesis se determinó como el porcentaje de células transfectadas (GFP positivas) que se localizaban en el manto (región en la que se expresa el marcador neuronal  $\beta$ III-Tubulina), indicativo de la diferenciación neuronal. En la Figura 43 se observa cómo 30 horas después de la electroporación del vector de expresión vacío, cerca de un 40 por ciento de las células electroporadas se encuentran en el manto. Sin embargo, la sobreexpresión de la proteína Brd2, provocó una reducción notable del porcentaje de neurogénesis (en torno al 10%), mientras que la sobreexpresión de la proteína  $\Delta$ mB no mostró ningún efecto.



**Figura 43. El motivo B es necesario para el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la diferenciación neuronal en embriones. (A)** Inmunofluorescencia de cortes transversales del tubo neural de embriones de pollo electroporados en estadio HH17 de desarrollo con vectores de expresión de las proteínas indicadas. El manto se marcó con anticuerpos contra el marcador neuronal  $\beta$ III-tubulina y las células electroporadas se monitorizaron por expresión de la GFP. Se evaluó la neurogénesis como el porcentaje de células electroporadas (GFP positivas) que se localizaban en el manto en la mitad electroporada. **(B)** Representación del porcentaje de neurogénesis correspondiente a cuatro secciones de cinco experimentos independientes. La significación de las diferencias entre los casos se analizó estadísticamente mediante la prueba t de Student. Los valores de significación para las diferencias respecto al control (GFP) fueron \* $P < 0,02$  y \*\* $P = 0,75$ .

### 3.3. Caracterización funcional de la interacción entre Brd2 y Pleiotrofina

#### 3.3.1. Brd2 interacciona con Pleiotrofina

En el escrutinio de dos híbridos que se realizó para identificar proteínas capaces de interactuar con el fragmento de Brd2 que incluía el motivo B se identificaron dos clones correspondientes a la proteína Pleiotrofina (Ptn) (aminoácidos 32 al 151) (Figura 24 y Tabla 1). Ptn, de 18 kDa, junto con Midkine (Mdk), de 13 kDa, pertenece a una familia de factores secretados con afinidad por la heparina conservados en metazoos (Muramatsu, 2002). Si bien la identidad de secuencia entre Ptn y Mdk es cercana al 50%, la estructura terciaria de ambas, resuelta por resonancia magnética nuclear, es similar (Iwasaki et al., 1997; Kilpelainen et al., 2000). Ambas proteínas se expresan abundantemente durante el desarrollo embrionario, donde se han relacionado con la organogénesis del hígado, los pulmones y los riñones (Asahina et al., 2002; Mitsiadis et al., 1995; Piscione y Rosenblum, 2002; Sakurai et al., 2001; Weng y Liu, 2010), con la angiogénesis (Koutsoumpa et al., 2012), el desarrollo de extremidades (Mitapalli et al., 2009) y sistema óseo (Dreyfus et al., 1998; Imai et al., 2009), así como con el desarrollo del sistema nervioso central y periférico (Kadomatsu y Muramatsu, 2004). La pérdida de cada una de estas proteínas por separado no

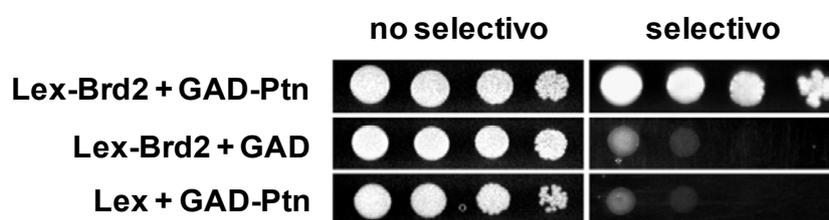
conlleva defectos fenotípicos apreciables, siendo los ratones mutantes viables y fértiles. Se han descrito algunos defectos en memoria y potenciación a largo plazo relacionados con la pérdida de Ptn o Mdk y defectos en el procesamiento del dolor a nivel de la médula espinal relacionados con la pérdida de Ptn (Amet et al., 2001; Gramage y Herradon, 2010; Nakamura et al., 1998). Sin embargo, la pérdida conjunta de ambas proteínas afecta severamente a la viabilidad de los ratones mutantes (Muramatsu et al., 2006), sugiriendo una redundancia funcional entre ambas proteínas y un efecto de compensación durante el desarrollo en los mutantes simples. Ambas proteínas se han relacionado funcionalmente con la estimulación de la proliferación (Chauhan et al., 1993) y con la parada del ciclo celular, la migración y la diferenciación dependiendo del tipo celular (Hienola et al., 2004; Mikelis et al., 2009). La expresión de Ptn y Mdk en el organismo adulto se ve drásticamente reducida y restringida temporalmente a estructuras específicas, como algunos tipos celulares del giro dentado (Nakamura et al., 1998) o del cerebelo (Basille-Dugay et al., 2013). Su expresión en adultos también se ha asociado con procesos inflamatorios (Muramatsu, 2002) o cancerosos (Hatzia Apostolou et al., 2005; Satyamoorthy et al., 2000). Además, tanto Ptn como Mdk se han vinculado con la respuesta a daños por lesión o isquemia en el sistema nervioso y en la piel, ya que las lesiones inducen un incremento transitorio en la expresión de los genes correspondientes en diversos tipos celulares próximos al daño (Jin et al., 2009; Yeh et al., 1998). Al ser proteínas secretadas, en parte su función se realiza mediante la interacción con varios tipos de receptores de superficie celular. Hasta la fecha se han identificado cinco receptores de superficie celular de alta afinidad con los que ambas proteínas pueden interaccionar: N-syndecan (Raulo et al., 1994), PTP $\zeta$  (*Protein Tyrosine Phosphatase*  $\zeta$ ) (Maeda et al., 1999), ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), Integrinas (Mikelis et al., 2009; Muramatsu et al., 2004) y LRP (*LDL receptor Related Protein*) (Muramatsu et al., 2000). El receptor N-syndecan no tiene actividad enzimática en sus dominios intracelulares y regula respuestas celulares a través de la quinasa Src (Kinnunen et al. 1998). Los receptores PTP $\zeta$  y ALK tienen actividad fosfatasa y quinasa respectivamente sobre residuos de tirosina y ambos se han relacionado con la señalización por las quinasas PI3 y Erk, entre otras vías (Qi et al. 2001; Stoica et al. 2001). La interacción de Ptn y Mdk con integrinas se ha relacionado con la migración y diferenciación de células endoteliales (Mikelis et al., 2009). El receptor LRP pertenece a la familia del receptor de LDL y media la endocitosis de Mdk, y aunque su papel en la endocitosis de la proteína Ptn no ha sido demostrado si se ha descrito que interacciona con ésta (Shibata et al. 2002). La interacción de Mdk y/o Ptn con los distintos receptores se ha asociado con la regulación de diversas funciones específicas en una gran variedad de tipos celulares.

Algunas de las funciones mejor caracterizadas están relacionadas con el desarrollo del sistema nervioso, donde se detectan altos niveles de expresión de ambos genes a lo largo del desarrollo y en estadios postnatales (Revisado en Kadomatsu y Muramatsu, 2002). Por ejemplo, se ha demostrado que la interacción de Ptn con el receptor N-syndecan es importante para la estimulación del crecimiento de neuritas en varias líneas celulares derivadas de neuroblastomas o de progenitores neurales (Hampton et al., 1992; Kinnunen et al., 1998; Li et al., 1990; Rauvala, 1989; Yanagisawa et al., 2010) y que la interacción de Ptn con PTP $\zeta$  potencia la migración de neuronas corticales *in vitro* (Maeda y Noda, 1998). La interacción de Ptn y Mdk con ALK se ha relacionado con la regulación de la proliferación de neuronas simpáticas inmaduras (Reiff et al., 2011) y se ha demostrado que la interacción entre Mdk y el receptor LRP es importante para el papel de Mdk en supervivencia neuronal (Muramatsu et al. 2000). Además de interactuar con receptores de la membrana plasmática, tanto Mdk como Ptn se han detectado en el citoplasma y en el núcleo de varios tipos celulares, como en neuronas del tubo neural o de los ganglios de la raíz dorsal en embriones, o en células de la dermis (Mitsiadis et al., 1995). De hecho, recientemente se ha descrito que la proteína nucleolar Nucleolina, en células endoteliales estimuladas, puede acumularse en la membrana celular y actuar como receptor de baja afinidad para Ptn, mediando su entrada en el citoplasma y su translocación al núcleo, lo cual es importante para la migración y diferenciación de estas células (Koutsoumpa et al., 2013). Si bien la información que existe acerca de las funciones y los mecanismos de acción de Ptn es extensa, aunque dispersa y fragmentaria, hasta la fecha del inicio del presente estudio no se disponía de información sobre los mecanismos de acción, dianas de interacción o funciones de la proteína Ptn en el interior celular.

En primer lugar se volvió a comprobar la interacción entre la proteína recombinante codificada en la construcción cebo utilizada en el escrutinio de dos híbridos (LexA-Brd2) y la proteína recombinante codificada en uno de los dos clones presa identificados (GAD-Ptn). Para ello se cotransformaron levaduras con ambas construcciones y se sembraron en medio selectivo (Figura 44). Como controles se analizaron cada una de las construcciones en presencia del vector contrario vacío. Como se observa en la Figura 44, sólo las levaduras que expresaban las dos proteínas recombinantes crecieron en medio selectivo.

A continuación se investigó la interacción de las proteínas Brd2 y Ptn expresadas en la línea celular HEK293T mediante experimentos de coimmunoprecipitación. Para ello, se cotransfectaron las células con vectores de expresión de la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo Flag (Flag-Brd2) y de la

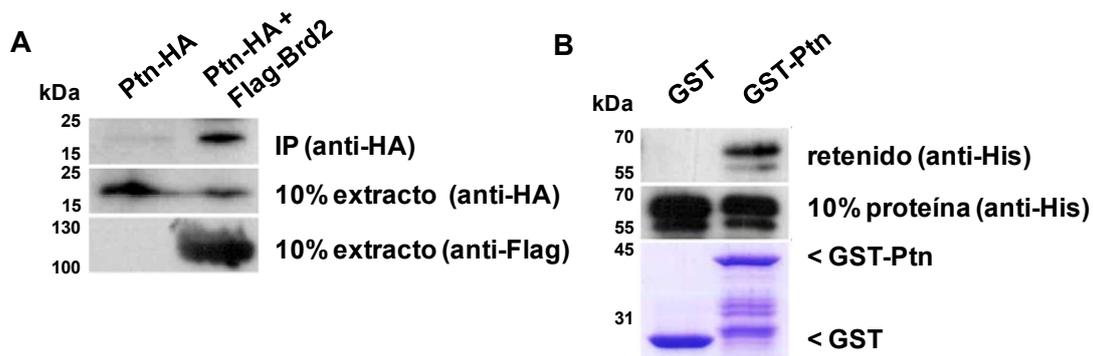
proteína Ptn etiquetada con un epítipo HA (Ptn-HA), y los extractos se incubaron con anticuerpos contra el epítipo Flag conjugados a una matriz de sefarosa. Como control se analizaron células transfectadas sólo con el vector de expresión de la proteína Brd2.



**Figura 44. La proteína Brd2 interacciona con la proteína Ptn en el sistema de dos híbridos.** Crecimiento en medio selectivo y no selectivo de levaduras cotransformadas con la construcción de Brd2 utilizada como cebo en el escrutinio de dos híbridos (Lex -Brd2) y uno de los clones presa aislados en el escrutinio, que se corresponde con un fragmento de la proteína Ptn (GAD-Ptn). Como control negativo, se utilizaron los vectores correspondientes, pLexA y pGAD-HA vacíos (Lex y GAD respectivamente).

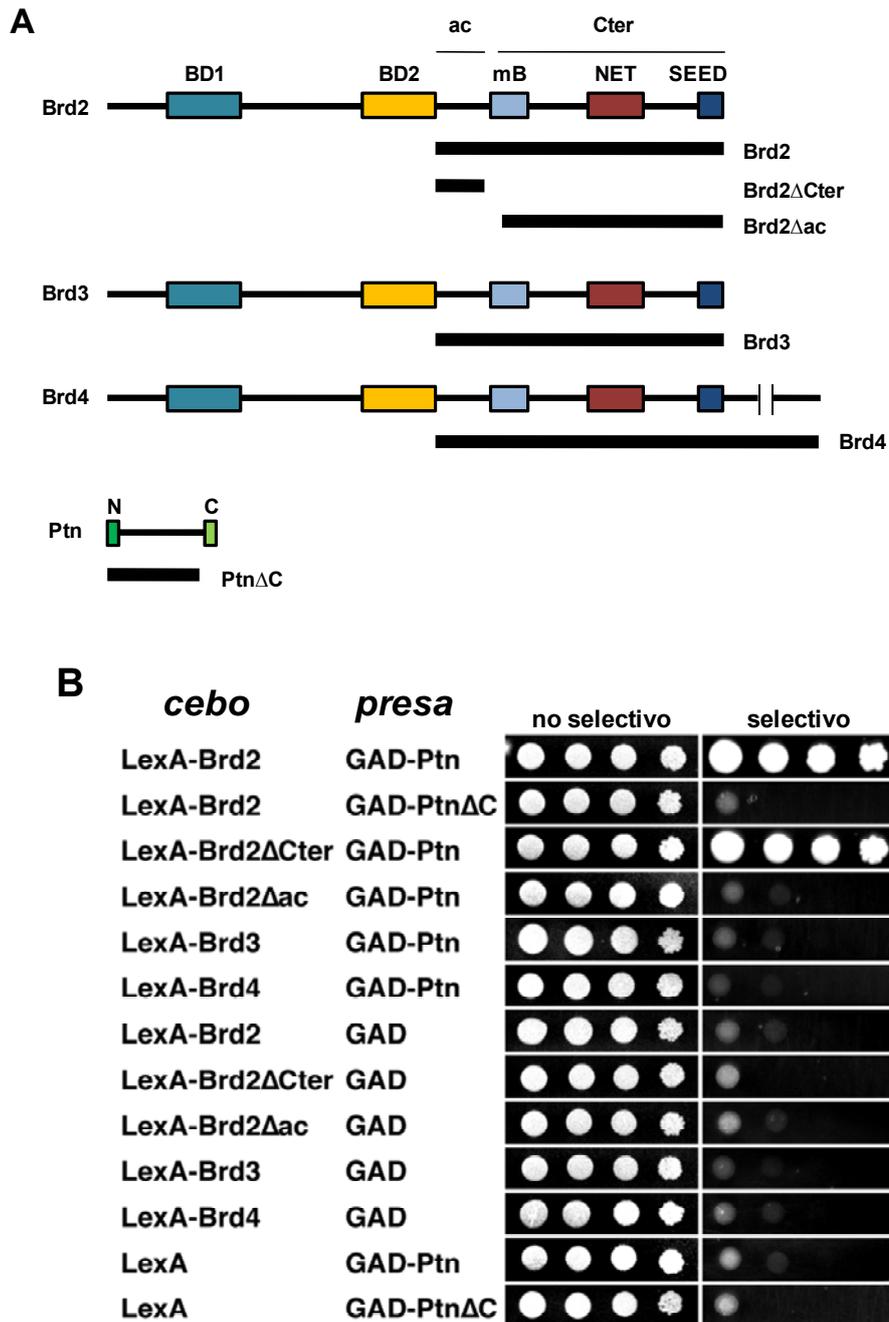
Como se muestra en la Figura 45A, la proteína Ptn eficientemente coprecipitaba con Brd2, demostrando la interacción entre ambas. Para investigar si la interacción entre las proteínas Brd2 y Ptn era directa, se realizó un ensayo de *pull-down in vitro* en el que se utilizó un fragmento de la proteína Brd2 (aminoácidos 50 al 651) etiquetado con una cola de histidinas, y una fusión de la proteína GST y Ptn (GST-Ptn) o la proteína GST como control. Las tres proteínas se expresaron en la estirpe BL21 de *E. coli* y se purificaron bien con una matriz de agarosa cargada con níquel en el caso de la proteína Brd2, bien con una matriz de glutatión-sefarosa en el caso de las proteínas GST y GST-Ptn. Las proteínas GST y GST-Ptn se dejaron unidas a la matriz y se incubaron con el fragmento de Brd2 purificado, para determinar si este era retenido en los precipitados. Como se observa en la Figura 45B, la proteína GST-Ptn (y no la proteína GST) era capaz de retener eficazmente el fragmento de Brd2.

Para investigar si la proteína Ptn era capaz de interaccionar también con las proteínas Brd3 y Brd4, se analizó el crecimiento en medio selectivo de levaduras cotransformadas con construcciones cebo que codificaban las proteínas Brd2, Brd3 o Brd4 carentes de los bromodominios fusionadas a la proteína Lex (Figura 46A) junto con construcciones presa que expresan la proteína Ptn. Como se muestra en la Figura 46B, sólo las levaduras cotransformadas con vectores de expresión correspondientes a las proteínas Brd2 y crecieron en medio selectivo.



**Figura 45. La proteína Brd2 interacciona con la proteína Ptn *in vivo* e *in vitro*.** (A) Ensayos de coimmunoprecipitación de extractos de células HEK293T transfectadas con un vector de expresión de la proteína Ptn etiquetada con un epítipo HA (Ptn-HA), junto con vectores de expresión de la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo Flag (Flag-Brd2) o el vector de expresión vacío como control. Para la precipitación se utilizaron anticuerpos contra el epítipo Flag conjugados a una matriz de agarosa. Las proteínas coimmunoprecipitadas se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo HA (IP (anti-HA)). Un 10% del extracto también se analizó mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo HA o el epítipo Flag para determinar la cantidad de proteína etiquetada con los epítipos Flag y HA presente en los extractos antes de la precipitación. (B) Experimentos de *pull-down in vitro* del fragmento purificado de Brd2 (aminoácidos 50 al 651) etiquetado con 6 histidinas y la proteína de fusión entre GST y Ptn (GST-Ptn) o la proteína GST como control, ambas inmovilizadas en matriz de glutatión-sefarosa. Las proteínas retenidas (retenido) y un 10% de volumen de la proteína purificada (10% proteína) se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo de histidinas. El 100% de las proteínas GST o GST-Ptn utilizadas por ensayo se muestran en una tinción de Coomassie del gel de proteínas.

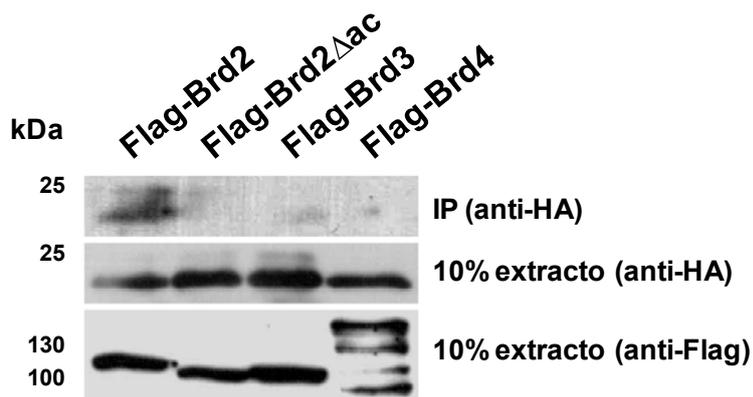
Por lo tanto, sólo la proteína Brd2, y no Brd3 ni Brd4, era capaz de interactuar con Ptn. Dado que el fragmento de la proteína Brd2 utilizado en el escrutinio de dos híbridos contenía diferentes dominios de la proteína, se investigó qué región de Brd2 mediaba la interacción con Ptn. Teniendo en cuenta que la secuencia de Ptn contiene un número elevado de aminoácidos básicos (Zhang et al., 1999), el fragmento de Brd2 utilizado en el escrutinio se dividió en dos regiones: una amino-terminal rica en residuos acídicos (ac) y otra carboxilo-terminal (Cter) que incluía el resto de la proteína (Figura 46A). Por otro lado, se ha descrito que la secuencia de Ptn muestra dos regiones básicas ricas en lisinas (aminoácidos 33 al 45 y 154 al 165) y que la pérdida de la región básica carboxilo-terminal (aminoácidos 143 al 168) tiene consecuencias funcionales (Bernard-Pierrot et al., 2001; Zhang et al., 1999). Por lo tanto, en el análisis de interacción se incluyó una construcción de expresión de la proteína Ptn carente de la región carboxilo-terminal (Ptn $\Delta$ C).



**Figura 46. Ptn interactúa selectivamente con Brd2 a través de una región ácida. (A)** Esquema de las proteínas analizadas en el estudio de la interacción entre proteínas BET y Ptn mediante la técnica de dos híbridos. **(B)** Crecimiento en medio selectivo de levaduras cotransformadas con las construcciones cebo y presa indicadas. Como control se utilizaron los vectores correspondientes, pLexA y pGAD-HA, vacíos (LexA y GAD respectivamente).

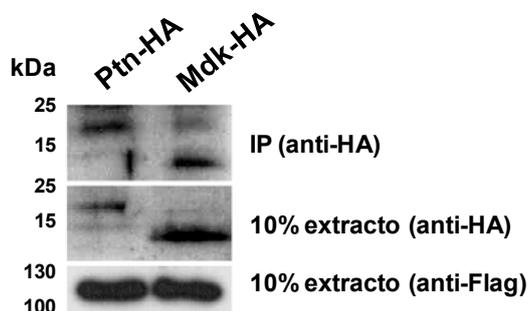
La interacción entre los fragmentos descritos se analizó mediante la técnica de dos híbridos por crecimiento en medio selectivo. Como se observa en la Figura 46B, la





**Figura 48. Ptn interacciona con una región acídica de Brd2 ausente en Brd3 y Brd4.**

Ensayos de coimmunoprecipitación de extractos de células HEK293T transfectadas con un vector de expresión de la proteína Ptn etiquetada con un epítipo HA (Ptn-HA) junto con vectores de expresión de las proteínas indicadas etiquetadas con un epítipo Flag (Flag-Brd2, Flag-Brd2 $\Delta$ ac, Flag-Brd3 y Flag-Brd4). Para la precipitación se utilizaron anticuerpos contra el epítipo Flag conjugados a una matriz de agarosa. Las proteínas coimmunoprecipitadas se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo HA (IP). Un 10% de los extractos también se analizó mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo HA o el epítipo Flag para determinar la cantidad de proteína etiquetada con los epítipos Flag y HA presente en los extractos antes de la precipitación.



**Figura 49. Brd2 interacciona con Ptn y Mdk.** Ensayos de coimmunoprecipitación de extractos de células HEK293T transfectadas con un vector de expresión de la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo Flag (Flag-Brd2) junto con plásmidos de expresión de las proteínas Ptn o Mdk etiquetadas con un epítipo HA (Ptn-HA y Mdk-HA respectivamente). Para la precipitación se utilizaron anticuerpos contra el epítipo Flag conjugados a una matriz de agarosa. Las proteínas coimmunoprecipitadas se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo HA (IP). Un 10% del extracto se analizó también mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo HA o el epítipo Flag para determinar la cantidad de proteína etiquetada con los epítipos Flag y HA presente en los extractos antes de la precipitación.

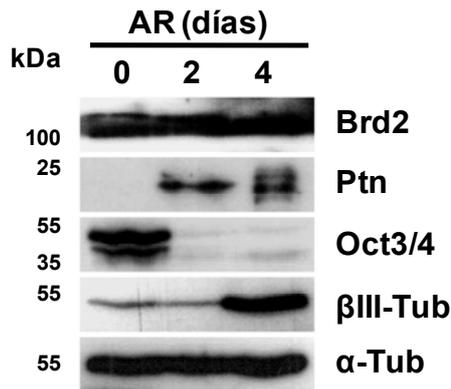
Como se observa en la Figura 49, Mdk, al igual que Ptn, precipitaba eficientemente con Brd2, demostrando la interacción de Brd2 con ambos miembros de

la familia. Teniendo en cuenta la redundancia funcional entre ambas proteínas, decidimos en adelante investigar sólo la función de la interacción entre Brd2 y Ptn.

### 3.3.2. Detección de las proteínas Brd2 y Ptn en células P19

Teniendo en cuenta el papel de la proteína Ptn en la regulación de funciones relacionadas con la diferenciación neuronal y que tanto *Brd2* como *Ptn* se expresan abundantemente en el sistema nervioso central de vertebrados durante el desarrollo embrionario, se analizó la expresión de Ptn y Brd2 en la línea celular P19, con la finalidad de utilizar esta línea celular como modelo para investigar si la interacción entre Brd2 y Ptn tenía alguna función en la diferenciación neuronal. Ya se ha mostrado que la expresión del gen *Brd2* se mantenía constante a lo largo del proceso de diferenciación *in vitro* de las células P19 (Figura 7). Asimismo, se ha publicado que si bien la proteína Ptn no se detecta en células P19 en condiciones de proliferación, el tratamiento con ácido retinoico induce la expresión de Ptn, detectándose de forma significativa, tanto en el medio extracelular como en el interior de las células, a partir del día 2 de tratamiento (Brunet-De Carvalho et al., 2003). Por lo tanto, se analizó la expresión de Brd2 y Ptn en células P19 en condiciones de crecimiento y tras 2 y 4 días de tratamiento con ácido retinoico. Las proteínas se analizaron mediante *Western Blot* anticuerpos contra Brd2 y contra Ptn (Figura 50). Como controles del proceso de diferenciación se analizó la caída de expresión del marcador de pluripotencia Oct3/4, y el incremento de expresión del marcador neuronal  $\beta$ III-Tubulina. Como control de carga, se analizó la proteína de expresión constitutiva  $\alpha$ -Tubulina. Como se observa en la Figura 50, el nivel de proteína Brd2 se mantuvo constante durante todo el proceso, mientras que la proteína Ptn se detectó a partir de los dos días de tratamiento. Como se esperaba, el nivel de la proteína Oct3/4 se redujo drásticamente al inicio del tratamiento y el nivel de la proteína neuronal  $\beta$ III-Tubulina aumentó notablemente en el cuarto día de tratamiento con ácido retinoico (Figura 50).

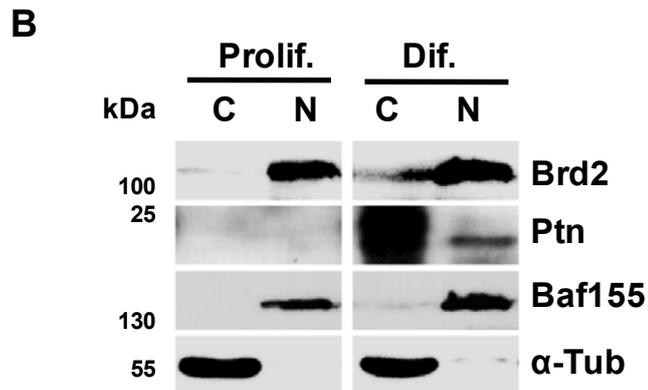
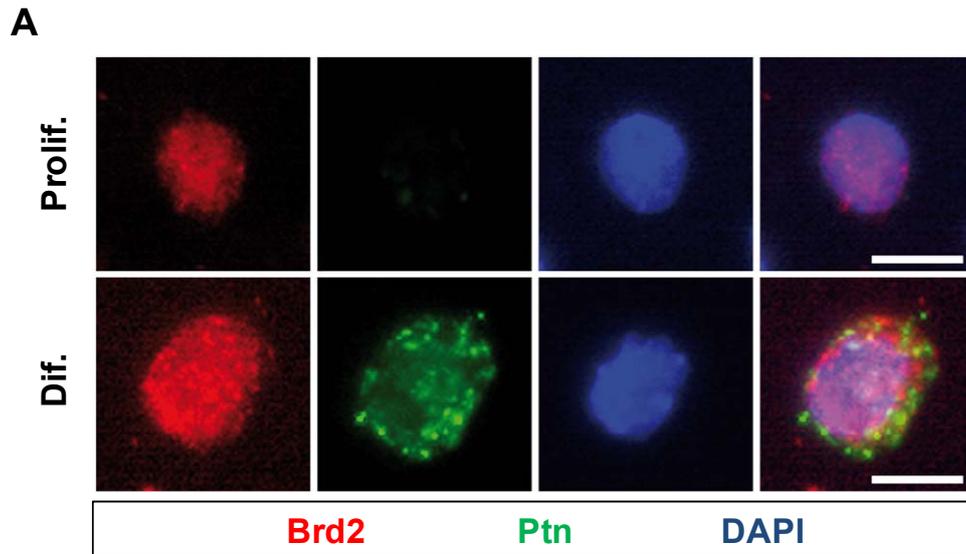
A continuación se investigó la localización celular de las proteínas Ptn y Brd2. Para ello se utilizaron células P19 en condiciones de crecimiento y sometidas a tratamiento con ácido retinoico durante dos días para inducir la expresión de Ptn. Mediante experimentos de inmunofluorescencia se detectó Ptn en células P19 tratadas con ácido retinoico, mostrando una localización mayoritariamente citoplásmica, aunque también se observó señal en el núcleo (Figura 51A).



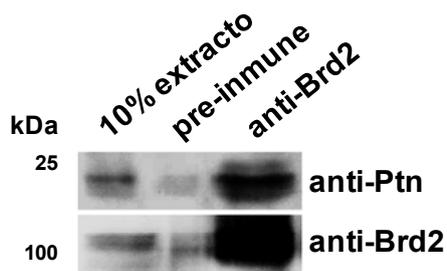
**Figura 50. Expresión de Brd2 y Ptn en células P19 tratadas con ácido retinoico.** *Western Blot* de células P19 tratadas con ácido retinoico (AR) durante los días indicados en la parte superior. Se analizaron 20 µg de extracto total en cada caso y la membrana se incubó con anticuerpos contra las proteínas endógenas indicadas.

La proteína Brd2, mayoritariamente localizada en el núcleo, tanto en células en condiciones de crecimiento como en células tratadas, mostró una señal perinuclear apreciable en estas últimas (Figura 51A). Para analizar con precisión las fracciones nuclear y citoplásmica de ambas proteínas se realizaron extractos fraccionados de células P19 en condiciones de crecimiento y tras dos días de tratamiento con ácido retinoico. Como controles del fraccionamiento se analizaron los marcadores Baf155 (nuclear) y α-Tubulina (mayoritariamente citoplásmico). Como se observa en la Figura 51B, la mayor parte de la proteína Brd2 se localizaba en el núcleo en cualquier condición, aunque tras el tratamiento con ácido retinoico se observó de forma minoritaria una fracción citoplásmica. En el caso de Ptn, detectada sólo tras el tratamiento con ácido retinoico, se observó una localización mayoritariamente citoplásmica, aunque también se pudo apreciar una fracción significativa nuclear.

Teniendo en cuenta la coexpresión de las proteínas Brd2 y Ptn endógenas en células P19 en presencia de ácido retinoico, se investigó la interacción entre ambas mediante experimentos de inmunoprecipitación. Así, extractos de células P19 en condiciones de inducción de Ptn se incubaron con los anticuerpos generados en nuestro laboratorio contra Brd2 o con suero preinmune, y se determinó en cada caso la cantidad de Ptn coprecipitada. Para la precipitación de anticuerpos se utilizó proteína A conjugada a una matriz de agarosa. Como se observa en la Figura 52, la proteína Ptn endógena precipitaba eficientemente al utilizar anticuerpos contra Brd2 pero no suero preinmune, demostrando la interacción entre las proteínas endógenas en condiciones de inducción con ácido retinoico.



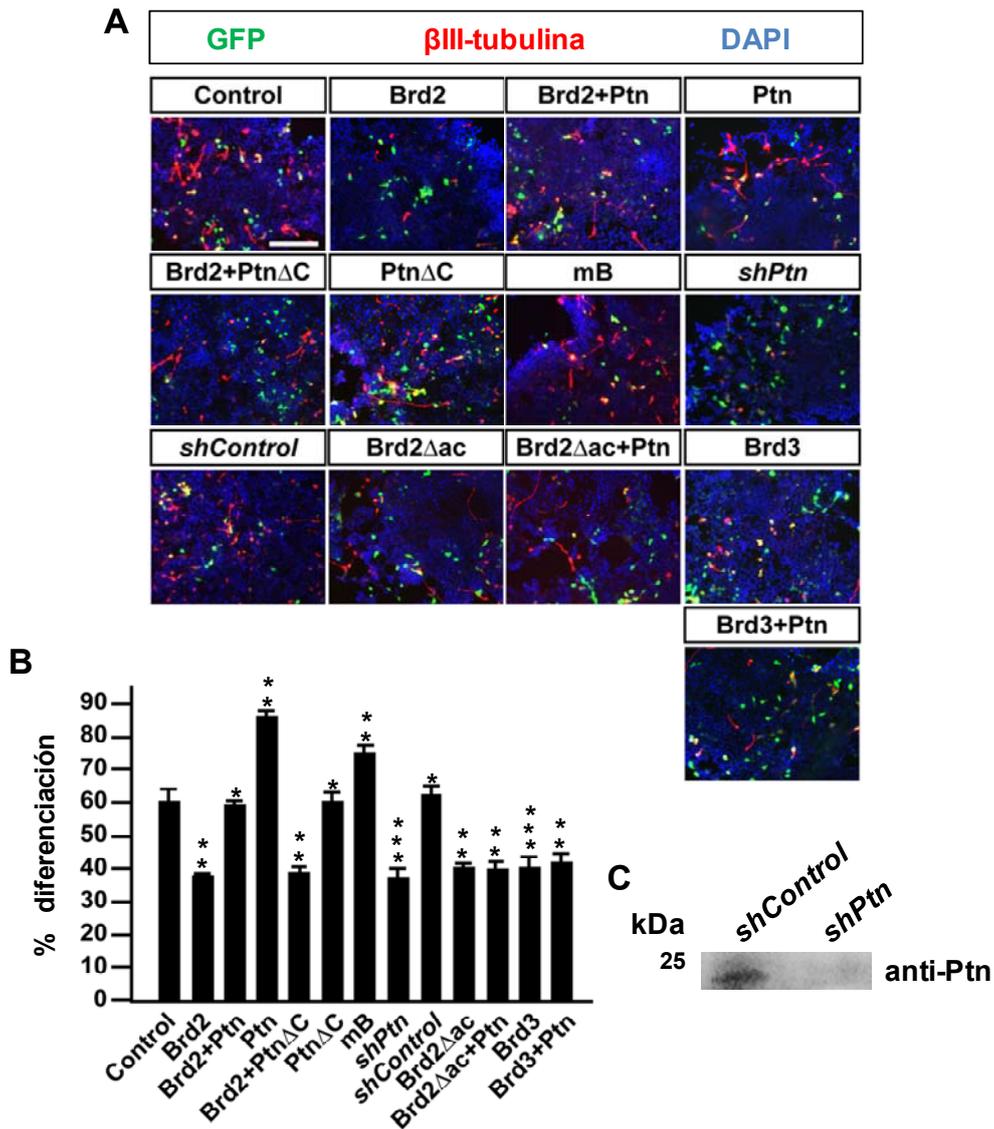
**Figura 51. Fraccionamiento celular y análisis de las proteínas Brd2 y Ptn en células P19 tratadas con ácido retinoico. (A)** Inmunofluorescencia de células P19 tratadas durante 2 días con ácido retinoico (Dif.) o con vehículo (Prolif.) utilizando anticuerpos contra la proteína Brd2 de ratón y anticuerpos contra Ptn. Las células se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. El DNA se tiñó con DAPI. La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m. **(B)** *Western Blot* de extractos fraccionados de células P19 tratadas durante 2 días con ácido retinoico (Dif.) o con vehículo (Prolif.). 20  $\mu$ g de fracción citoplásmica (C) y 5  $\mu$ g de la fracción nuclear (N) se analizaron utilizando anticuerpos contra las proteínas endógenas indicadas.  $\alpha$ -Tub,  $\alpha$ -Tubulina.



**Figura 52. Las proteínas Brd2 y Ptn endógenas interactúan en células P19 tratadas con ácido retinoico.** Ensayos de coimmunoprecipitación de la proteína Ptn endógena con Brd2 en extractos de células P19 tratadas durante 2 días con ácido retinoico. Para la precipitación se utilizaron anticuerpos contra la proteína Brd2 de ratón (anti-Brd2) o suero pre-inmune como control, junto con Proteína A conjugada a una matriz de agarosa. La proteína Ptn coimmunoprecipitada en cada caso se analizó, junto con un 10% del extracto, mediante *Western Blot* con anticuerpos contra la proteína Ptn (anti-Ptn). La proteína Brd2 inmunoprecipitada en cada caso también se analizó, junto con un 10% del extracto, mediante *Western Blot* con los mismos anticuerpos contra Brd2 utilizados para la precipitación (anti-Brd2).

### 3.3.3. Ptn neutraliza la interferencia con la diferenciación neuronal mediada por la sobreexpresión de Brd2

Teniendo en cuenta que la sobreexpresión de la proteína Brd2 interfiere con la diferenciación neuronal, según se ha mostrado anteriormente (Figuras 40 y 41), y que la proteína Ptn se ha relacionado con diferenciación neuronal (Hienola et al., 2004) y se induce en células P19 al inicio del protocolo de diferenciación neuronal con ácido retinoico, se investigó el efecto de la interacción entre Ptn y Brd2 en la diferenciación neuronal en células P19. Para ello se transfectaron células P19 con construcciones de expresión de las proteínas NeuroD2 y E12 junto con vectores de expresión de GFP (para identificar las células transfectadas) y de las proteínas Brd2 y Ptn silvestres y mutantes (Figura 53). Tres días después de la transfección, las células se procesaron para su análisis mediante inmunofluorescencia del marcador neuronal  $\beta$ III-Tubulina y GFP. En la Figura 53A se muestra una imagen representativa de cada caso. A partir de las imágenes adquiridas se determinó la proporción de células transfectadas que expresaban el marcador  $\beta$ III-Tubulina.



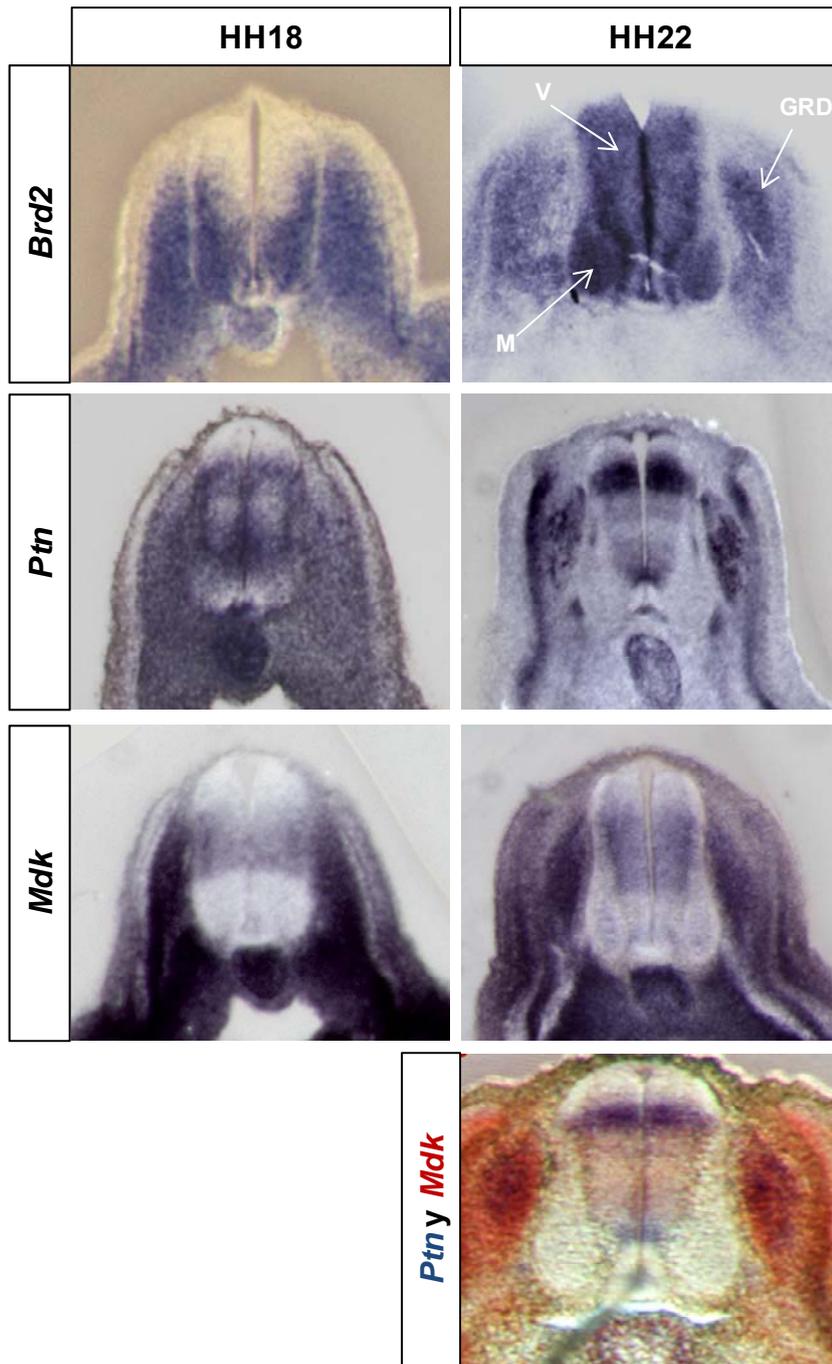
**Figura 53. Ptn anula el efecto de inhibición de la diferenciación neuronal inducida en células P19 provocado por Brd2. (A)** Inmunofluorescencias de células P19 cotransfectadas con vectores de expresión de las proteínas GFP, NeuroD2 y E12 junto con vectores de expresión de las proteínas indicadas, o el vector de expresión vacío como control. Tres días después de la transfección, se procesaron las muestras para su análisis mediante microscopía de fluorescencia. Se evaluó la neurogénesis como el porcentaje de células transfectadas (células que expresan GFP) que también expresaban el marcador neuronal  $\beta$ III-Tubulina. El DNA se tiñó con DAPI. La barra de escala equivale a 100  $\mu$ m. **(B)** Representación del porcentaje de neurogénesis cuantificando a partir de dos a tres áreas de cuatro experimentos independientes. La significación de las diferencias respecto al control se analizó estadísticamente mediante la prueba t de Student, obteniéndose los siguientes valores de significación: \* $P \geq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$ . **(C)** *Western Blot* de extractos totales de células P19 transfectadas con los vectores *shPtn* o *shControl*, correspondientes a moléculas de interferencia de RNA tipo horquilla contra *Ptn* o control, y tratadas con ácido retinoico durante dos días, utilizando anticuerpos contra Ptn. Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína total en cada caso.

Como se observa en la Figura 53B, la sobreexpresión de Ptn estimuló la diferenciación neuronal y anuló el efecto negativo de la sobreexpresión de Brd2 sobre la diferenciación, pero no el de la proteína Brd2 carente de la región acídica con la que interacciona Ptn, sugiriendo un efecto antagonista de Ptn sobre Brd2 en el proceso de diferenciación. A su vez, la proteína Ptn carente de la mitad carboxilo-terminal (incapaz de interactuar con la proteína Brd2) no tuvo un efecto significativo sobre la neurogénesis inducida ni sobre la inhibición mediada por Brd2. Por otro lado, la sobreexpresión de un fragmento de Brd2 correspondiente al motivo B, que se demostró que interfería con la asociación de Brd2 con los cromosomas (Figura 35), favoreció la diferenciación neuronal de manera similar a Ptn. En consonancia con un papel de Ptn en la diferenciación neuronal, la reducción de los niveles de Ptn por expresión de una molécula de RNA de cadena corta de tipo horquilla (*shRNA*) complementaria de la secuencia del mRNA de *Ptn*, tuvo un efecto negativo sobre la neurogénesis. En la Figura 53C se muestra la reducción de los niveles de Ptn provocada por la transfección de un vector de expresión de la molécula *shRNA* de *Ptn* en comparación con la expresión de una molécula *shRNA* control no relacionada. Finalmente, se investigó el efecto de la sobreexpresión de Brd3, que según se demostró no interaccionaba con Ptn (Figuras 46 y 48). Como se observa en la Figura 53B, la sobreexpresión de Brd3 tuvo un efecto similar al de la sobreexpresión de Brd2 en la neurogénesis, sin embargo, la coexpresión de Ptn no anuló dicho efecto, de manera similar a lo que ocurría con la proteína Brd2 carente del motivo de interacción con Ptn.

#### **3.3.4. Expresión del gen *Ptn* en el tubo neural durante el desarrollo**

Se ha descrito previamente que los genes *Ptn* y *Mdk* se expresan en una gran variedad de órganos y tejidos durante el desarrollo embrionario de ratones, como en el corazón, órganos sensoriales, pulmones, procesos faciales, extremidades, piel, sistema genito-urinario, sistema digestivo y, sobre todo, sistema nervioso (Mitsiadis et al., 1995). Si bien el patrón de expresión de ambos genes muestra un significativo grado de solapamiento, en algunos sistemas se observa un patrón de expresión diferencial. Por ejemplo, Ptn pero no Mdk se detecta en los ganglios de la raíz dorsal en estadios tempranos del desarrollo (días 9-10 dpc) (Mitsiadis et al., 1995). Un análisis de expresión de *Ptn* mediante hibridación *in situ* en el embrión de pollo ha mostrado un amplio patrón de expresión en diversos órganos y tejidos, especialmente en el tubo neural, donde se expresa desde el estadio de desarrollo HH10 al HH29

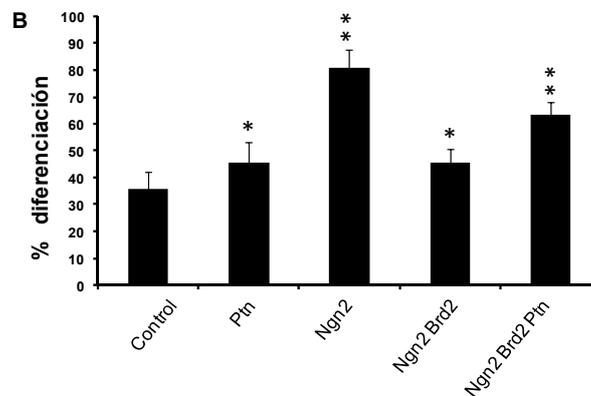
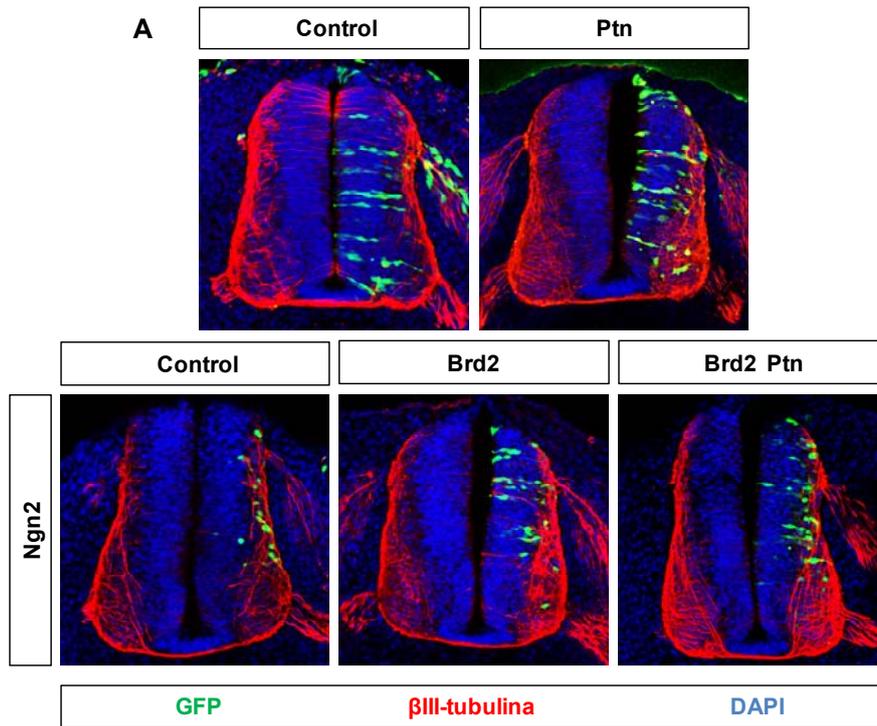
(Mittapalli et al., 2009). Antes de abordar el análisis funcional de la interacción entre *Brd2* y *Ptn* decidimos analizar en detalle el patrón de expresión de los genes *Brd2*, *Ptn* y *Mdk* en secciones transversales del tubo neural del embrión de pollo en dos estadios, uno temprano (HH18) y otro más tardío (HH22). Para ello se generaron sondas de RNA antisentido complementarias del mRNA de dichos genes marcadas con digoxigenina, que se hibridaron en secciones transversales del tubo neural a nivel torácico, obtenidas mediante corte en vibratomo de embriones fijados. Según se muestra en la Figura 54, los experimentos de hibridación *in situ* confirmaron el patrón de expresión descrito previamente (Mittapalli et al., 2009) y mostraron nuevos aspectos. Tanto en estadios tempranos como tardíos, *Ptn* y *Mdk* mostraron un patrón de expresión complementario a lo largo del eje dorso-ventral aunque también un grado significativo de solapamiento. El patrón de ambos solapaba en gran medida con el de *Brd2*, más uniforme a lo largo del eje dorso-ventral. En estadios tardíos se observó una expresión mayoritaria de los tres genes en la zona ventricular, aunque destacaba un incremento en los niveles de expresión en la región entre zona ventricular y manto, coincidiendo con las células que salen del ciclo celular y comienzan a migrar hacia el manto en las etapas iniciales del proceso de diferenciación. Además, los tres genes se expresaban en los ganglios de la raíz dorsal. También cabe destacar en estadios tardíos la elevada expresión de *Ptn* en células de la placa del techo y la expresión de *Brd2* en motoneuronas. Estos resultados demuestran, que a pesar del complicado patrón de expresión de *Ptn* y *Mdk* en el tubo neural en desarrollo, el patrón de expresión de *Brd2* solapa ampliamente con el de estos genes, en especial en células que han iniciado el proceso de diferenciación neuronal, localizadas en la región de transición entre zona ventricular y manto.



**Figura 54. Expresión de los genes *Brd2*, *Ptn* y *Mdk* en el tubo neural de embriones de pollo.** Fotografías con lupa binocular de hibridaciones *in situ* de secciones transversales del tubo neural de embriones de pollo de los estadios indicados (HH18 o HH22) utilizando sondas de RNA antisentido complementarias del mRNA de *Brd2*, *Ptn* o *Mdk*, marcadas con digoxigenina (azul) o fluoresceína (rojo). V, zona ventricular; M, manto; GRD, ganglio de la raíz dorsal.

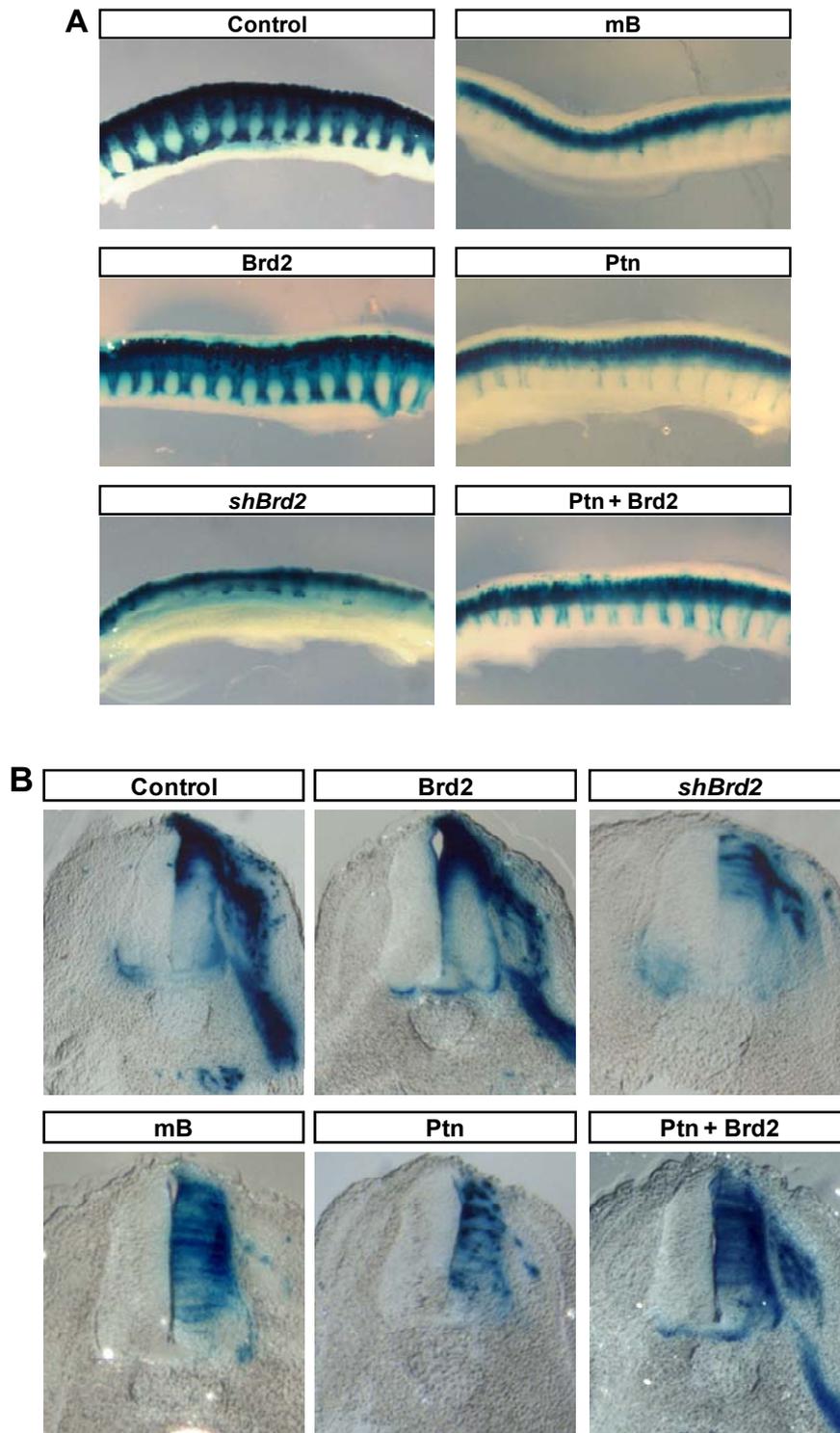
### 3.3.5. Antagonismo entre Ptn y Brd2 en el tubo neural en desarrollo

El complicado patrón de expresión de *Ptn* en el tubo neural en desarrollo, complementario y solapante con el de *Mdk*, hace difícil un estudio funcional detallado del proceso de neurogénesis como el que se ha realizado en células P19. Sin embargo, teniendo en cuenta que el patrón de expresión de *Brd2* en el tubo neural solapaba con el de *Ptn* o *Mdk*, decidimos abordar, aunque de una manera más simple que en células P19, el estudio de los efectos de la sobreexpresión de *Brd2* y *Ptn* sobre la neurogénesis en el tubo neural. Para ello se utilizó la técnica de electroporación *in ovo* del tubo neural. Se ha descrito previamente que la adición de las proteínas *Ptn* o *Mdk* purificadas a células P19 en condiciones de crecimiento no induce la diferenciación neuronal de estas células (Brunet-de Carvalho et al., 2003). Sin embargo, la expresión de *Ptn* favorecía la diferenciación neuronal de células P19 en condiciones en las que este proceso se inducía con factores neurogénicos (Figura 53B). Mediante la electroporación de una construcción de expresión de *Ptn* junto con el vector de expresión de la GFP, se observó que *Ptn* por sí solo inducía ligeramente la neurogénesis en el tubo neural, ya que afectaba en cierto grado a la proporción de células que expresaban GFP localizadas en el manto, puesto de manifiesto por expresión del marcador  $\beta$ III-Tubulina (45% de neurogénesis respecto al 36% en el control) (Figura 55). En cambio, la electroporación del factor neurogénico neurogenina-2 (*Ngn2*) sí mostró un notable incremento de las células electroporadas en el manto (81%), tal como se ha descrito anteriormente (García-Domínguez et al., 2003). Al igual que ocurría en células P19, la electroporación de un vector de expresión de *Brd2* junto con un vector de expresión de *Ngn2*, mostró que *Brd2* anulaba en parte la capacidad neurogénica de *Ngn2* (46% de neurogénesis respecto a 81% en presencia de *Ngn2* sólo). Sin embargo, la sobreexpresión de *Ptn* en estas condiciones anuló de manera apreciable el efecto de *Brd2* (63% de neurogénesis en comparación con 46% en presencia de *Ngn2* y *Brd2*) (Figura 55). Por lo tanto, en el proceso de neurogénesis en el tubo neural embrionario, al igual que ocurría en células P19, *Ptn* es capaz de antagonizar a *Brd2*, favoreciendo la diferenciación neuronal.



**Figura 55. Ptn anula el efecto de inhibición de la diferenciación neuronal inducida en el tubo neural embrionario provocado por Brd2. (A)** Inmunofluorescencia de cortes transversales del tubo neural de embriones de pollo electroporados en estadio HH17 de desarrollo con vectores de expresión de las proteínas indicadas. Como control se utilizó el vector de expresión vacío. El manto se marcó con anticuerpos contra el marcador neuronal  $\beta$ III-tubulina y las células electroporadas se monitorizaron por expresión de la GFP. Se evaluó la neurogénesis como el porcentaje de células electroporadas (GFP positivas) que se localizaban en el manto en la mitad electroporada. **(B)** Representación del porcentaje de neurogénesis correspondiente a cuatro secciones de cinco experimentos independientes. La significación de las diferencias entre los casos se analizó estadísticamente mediante la prueba t de Student, obteniéndose los siguientes valores de significación respecto a las diferencias con el control: \* $P=0.17-0.25$ , \*\* $P<0.01$ .

Existen varias evidencias que sugieren un papel de las proteínas Ptn y Mdk en el desarrollo de la cresta neural, formada tras el cierre del tubo neural mediante una transición de epitelio a mesénquima a partir del borde entre la placa neural y la epidermis. La cresta neural da lugar a una gran variedad de estructuras a lo largo del eje antero-posterior del organismo, como el sistema nervioso periférico (incluido los ganglios de la raíz dorsal), procesos craneofaciales y melanocitos de la piel (LeDouarin et al., 2008). Se ha publicado que Ptn es capaz de inducir la transición de epitelio a mesénquima en una línea celular de glioblastoma humano U373 (Perez-Pinera et al., 2006) y que en cultivos de células troncales humanas junto con células estromales PA6, que expresan abundantemente Ptn (Vazin et al., 2009), se induce la diferenciación de las células troncales a células de la cresta neural, entre otros tipos celulares del sistema nervioso central (Mizuseki et al., 2003). La proteína Mdkb de *Danio rerio* se ha implicado en estadios tempranos de especificación celular en la placa del borde neural (Liedtke y Winkler, 2008) y la presencia de elementos de respuesta a AR en el promotor del gen *Mdk* (Matsubara et al., 1990) así como la inducción de *Mdk* y *Ptn* por tratamiento con AR en células P19 (Brunet-de Carvalho et al., 2003) relacionan ambas proteínas con la señalización mediada por AR, importante en el desarrollo de la cresta neural (Aybar et al., 2002). Teniendo en cuenta esto y el elevado nivel de expresión de Ptn en la placa del techo del tubo neural y en los ganglios de la raíz dorsal, regiones en las que también se expresaba Brd2 (Figura 54), se investigó el efecto de la interacción entre Ptn y Brd2 en la migración de las células de la cresta neural. Para ello, se electroporó la región dorsal del tubo neural de embriones de pollo de estadio HH18 de desarrollo con un vector de expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, para monitorizar las células electroporadas, junto con distintas construcciones de expresión de Brd2 y Ptn. La expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa permitía analizar mediante un ensayo de coloración azul, por metabolización del compuesto X-gal, el flujo migratorio ventro-lateral de las células electroporadas. En la Figura 56A se muestran fotografías a la lupa del tronco de embriones *in toto*, analizados mediante ensayo  $\beta$ -galactosidasa 30 h tras electroporar las construcciones indicadas, mientras que en la Figura 56B se muestran cortes transversales de estos embriones a nivel de la corriente de migración de la cresta. En la Figura 56 se observa cómo la sobreexpresión de Brd2 no mostró un efecto significativo sobre la migración de las células de la cresta. Sorprendentemente, la sobreexpresión de Ptn redujo drásticamente el flujo migratorio. Dado que en el proceso de neurogénesis hemos descrito que Ptn parece ser un antagonista de Brd2 nos preguntamos si en el proceso de migración de la cresta podría ocurrir algo similar.



**Figura 56. Antagonismo entre Brd2 y Ptn en la migración de células de la cresta neural.** (A) El tubo neural de embriones de pollo se electroporó a nivel dorsal con un vector de expresión del gen *lacZ* y con construcciones de expresión de las proteínas indicadas, o de una molécula *shRNA* contra *Brd2*, o con el vector de expresión vacío (control), y se analizó la expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa mediante coloración X-gal. Se muestra una vista lateral *in toto* del lado electroporado. Las electroporaciones se realizaron en el estadio de desarrollo HH17 y los embriones se analizaron 30 h después. (B) Secciones transversales a nivel de uno de los haces de migración de la cresta neural de los embriones mostrados en (A).

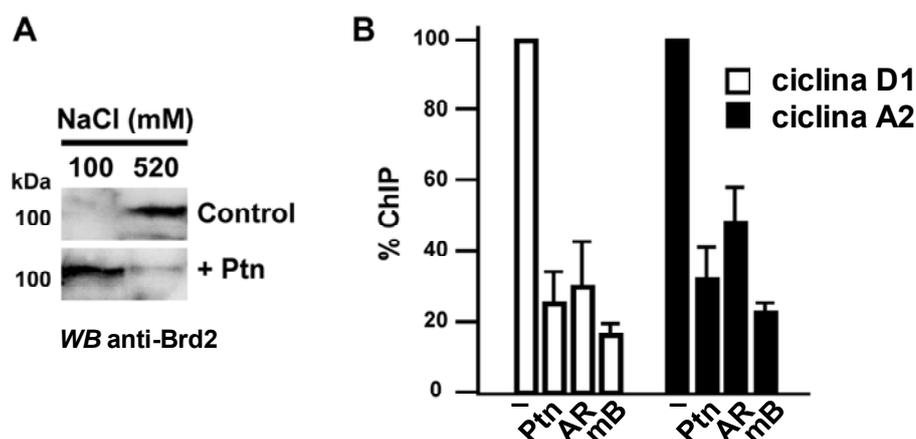
El efecto inhibitorio de Ptn, de ser cierto que se debía a un antagonismo sobre Brd2, indicaría que Brd2 es necesario para la migración de la cresta.

Para analizar esta hipótesis se redujeron los niveles de Brd2 en las células de la región dorsal del tubo neural mediante electroporación de un vector de expresión de una molécula *shRNA* de *Brd2*. Como se observa en la figura, la expresión de la molécula *shRNA* de *Brd2* interfirió notablemente con el proceso de migración, indicando que Brd2 era necesario para este proceso. De hecho, la expresión del fragmento de Brd2 correspondiente al motivo B, que previamente se ha demostrado que interfería con la función de Brd2 (Figuras 35 y 53), produjo un efecto similar al de la molécula *shRNA*. Por último, si Ptn interfiere con la función de Brd2 en la migración de la cresta nos preguntamos si el efecto de Ptn podría paliarse si junto con Ptn se sobreexpresaba también Brd2. Como se observa en la Figura 56, la sobreexpresión de Brd2 se tradujo en una notable recuperación del proceso de migración inhibido por Ptn. Estos resultados por lo tanto manifiestan de nuevo un efecto antagonista de Ptn sobre Brd2 en un proceso diferente al de la diferenciación neuronal.

### **3.3.6. Ptn interfiere con la interacción de la proteína Brd2 consigo misma y con su asociación con la cromatina**

Teniendo en cuenta el antagonismo de Ptn sobre Brd2 y que Brd2 actúa como transactivador de genes importantes para la progresión del ciclo celular (LeRoy et al., 2008), se investigó si la expresión de Ptn podría afectar a la capacidad de la proteína Brd2 de asociarse con la cromatina. Para analizar la estabilidad de la asociación de la proteína Brd2 con la cromatina, las células P19 fueron transfectadas con construcciones de expresión de Ptn o con el vector de expresión vacío como control y la proteína Brd2 endógena fue extraída del núcleo de las células con cantidades distintas de sal. Los extractos se analizaron mediante *Western Blot* con anticuerpos contra Brd2. Así, las células se sometieron a extracción secuencial con 100 y 520 mM de NaCl. Ya se ha mencionado (apartado 3.2.2) que una mayor estabilidad en la asociación de Brd2 con la cromatina necesita de una mayor concentración de sal para la extracción. Como se observa en la Figura 57A, en ausencia de Ptn, la extracción de la mayor parte de la proteína Brd2 requirió una concentración alta de NaCl (520mM). Sin embargo, en presencia de Ptn, una fracción mayor de la proteína Brd2 endógena pudo extraerse con una concentración de NaCl de 100 mM, indicando que la proteína Ptn desestabilizaba la asociación de Brd2 con la cromatina.

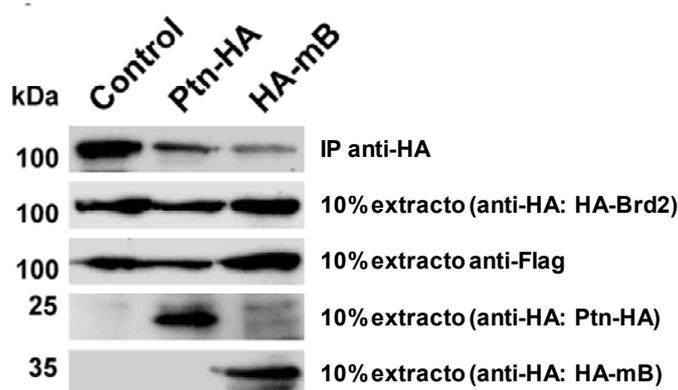
Teniendo en cuenta el papel de Brd2 en la activación de los genes de ciclinas *CcnA2* y *CcnD1* se investigó si la expresión de Ptn tenía algún efecto en la asociación de la proteína Brd2 endógena con el promotor de estos genes. Para ello se transfectaron células P19 con vectores de expresión de la proteína Ptn o con el vector de expresión vacío y se analizó la asociación de la proteína Brd2 con el promotor de los genes *CcnA2* y *CcnD1* mediante experimentos de *ChIP*, utilizando anticuerpos contra Brd2 generados en nuestro laboratorio o suero preinmune como control. Los fragmentos de DNA precipitados se analizaron mediante PCR en tiempo real con cebadores específicos de las regiones promotoras de los genes *CcnA2* y *CcnD1*. En la Figura 57B se muestran los valores normalizados y relativizados al valor obtenido usando suero preinmune.



**Figura 57. Ptn desestabiliza la unión de Brd2 a la cromatina.** (A) Células P19 transfectadas con un vector de expresión de Ptn (+Ptn) o con el vector de expresión vacío (control), fueron sometidas a extracción secuencial con el mismo volumen de tampones que contenían 100 y 520 mM de NaCl. En cada fracción se determinó la presencia de la proteína Brd2 endógena mediante *Western Blot* (WB) con anticuerpos contra Brd2. En cada carril se analizó un 10% del volumen total de cada extracto. (B) Células P19 transfectadas con un vector de expresión de Ptn (Ptn) o de un fragmento de Brd2 correspondiente al motivo B (mB), o con el vector de expresión vacío como control (-), o sometidas a tratamiento con ácido retinoico durante 2 días (AR), se utilizaron para experimentos de *ChIP* con anticuerpos contra Brd2 de ratón. Los fragmentos de cromatina precipitados se analizaron mediante PCR en tiempo real con cebadores correspondientes a las regiones promotoras de los genes *CcnD1* (barras blancas) y *CcnA2* (barras negras). Los valores se normalizaron a los obtenidos a partir de un 10% de los extractos antes de la precipitación y a los niveles obtenidos a partir de una precipitación con suero preinmune, y se relativizaron a los niveles mostrados por el control (100%). Se muestran valores medios y desviación estándar de 3 experimentos independientes analizados por triplicado. La significación de las diferencias respecto al control se analizó estadísticamente mediante la prueba t de Student, obteniéndose un valor de significación  $P < 0.04$  en todos los casos.

Se observa que la expresión de Ptn afectó negativamente a la asociación de Brd2 con el promotor de los genes *CcnA2* y *CcnD1*. También se investigó si el tratamiento con ácido retinoico, que sabíamos que provocaba una inducción de Ptn, o la sobreexpresión del fragmento de Brd2 correspondiente al motivo B, tenían un efecto similar. Como se muestra en la Figura 57B, tanto el tratamiento con ácido retinoico como la expresión del motivo B afectaron negativamente a la asociación de la proteína Brd2 endógena con las regiones promotoras mencionadas.

Los resultados anteriores indican que tanto Ptn como el péptido correspondiente al motivo B provocaban el mismo efecto de disociación de Brd2 de la cromatina. Además, en apartados anteriores se ha descrito que el motivo B era necesario para la asociación de Brd2 con la cromatina, mediada por la interacción entre proteínas BET a través de este dominio. Dada la proximidad entre la región ácida de Brd2 que media la interacción con Ptn y el motivo B, se investigó si la expresión de Ptn podría interferir con la interacción entre la proteína Brd2 consigo misma.



**Figura 58. Ptn interfiere con la interacción de Brd2 consigo mismo.** Ensayos de coimmunoprecipitación de extractos de células HEK293T transfectadas con un vector de expresión de la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo Flag (Flag-Brd2) junto con un vector de expresión de la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo HA (HA-Brd2). Además, las células se transfectaron con un vector de expresión de la proteína Ptn etiquetada con un epítipo HA (Ptn-HA), o de un fragmento de Brd2 correspondiente al motivo B etiquetado con un epítipo HA (HA-mB), o con el vector de expresión vacío como control. Para la precipitación se utilizaron anticuerpos contra el epítipo Flag conjugados a una matriz de agarosa y la proteína HA-Brd2 coimmunoprecipitada en cada caso se analizó mediante *Western Blot* con anticuerpos contra el epítipo HA (IP). Un 10% de los extractos también se analizó mediante *Western Blot* para determinar la cantidad de proteína etiquetada con los epítipos Flag y HA presente en los extractos antes de la precipitación.

Para ello se cotransfectaron células 293T con vectores de expresión de la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo Flag (Flag-Brd2) y vectores de expresión de la proteína Brd2 etiquetada con un epítipo HA (HA-Brd2), junto con vectores de expresión de la proteína Ptn o del motivo B etiquetados con un epítipo HA. Los ensayos de precipitación se llevaron a cabo con anticuerpos contra el epítipo Flag conjugado a una matriz de sefarosa y las proteínas precipitadas se analizaron mediante *Western Blot*. Como se muestra en la Figura 58, la expresión de Ptn tuvo un efecto negativo en la capacidad de la proteína Brd2 de interactuar consigo misma, muy similar al efecto provocado por la sobreexpresión del péptido correspondiente al motivo B. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el antagonismo que Ptn ejerce sobre Brd2 podría deberse a que Ptn interfiere con la interacción entre moléculas de Brd2 mediada por el motivo B, y necesaria para la asociación de Brd2 con la cromatina.



## 4.DISCUSIÓN

### 4.1. Función de Brd2 en los procesos de proliferación y diferenciación celular

Hasta la fecha del inicio del presente estudio, la función mejor caracterizada de la proteína Brd2 era la transactivación de genes importantes para la progresión del ciclo celular, como los genes *CcnA2* (Sinha et al., 2005), *CcnD1* (LeRoy et al., 2008), *Dhfr* (Denis et al., 2000) o *Myc* (Delmore et al., 2001). Esa función de Brd2 en la regulación del ciclo celular es consistente con la observación de que Brd2 interacciona con los factores E2F-1 y E2F-2 (Denis et al., 2000) y es capaz de activar la transcripción de un gen testigo regulado tanto por sitios de unión de E2F-1 (Peng et al., 2007) como por secuencias reguladoras del promotor de los genes *CcnD1*, *CcnA2* y *Dhfr* (Denis et al., 2000; Guo et al., 2000). Asimismo, la proteína Brd2 se asocia con el promotor de los genes *CcnA2* y *CcnD1* y la disminución en los niveles de Brd2 causa una disminución en los niveles de Ciclina D1 en células HEK293T (LeRoy et al., 2009). La observación de que factores del suero y la expresión de las proteínas H-Ras y MEKK estimulan el efecto de Brd2 en la transcripción de genes del ciclo (Denis et al., 2000; Peng et al., 2006) sugiere que la función activadora de Brd2 está sujeta a regulación por las rutas de señalización que controlan el ciclo celular. De hecho, el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la estimulación de la transcripción de los genes *CcnA2* y *CcnD1* es más evidente en condiciones de estimulación por suero (Figura 35A). Se ha propuesto un papel de Brd2 como adaptador que, a través de sus bromodominios, es capaz de mediar el ensamblaje de la maquinaria de transcripción sobre *loci* cromatínicos específicos, ricos en marcas de acetilación de las histonas (Denis et al., 2006; LeRoy et al., 2008). Este modelo de Brd2 como adaptador de la maquinaria general de transcripción se sustenta en la capacidad de Brd2 de interaccionar con distintos componentes asociados a la RNA Polimerasa II (Denis et al., 2006; LeRoy et al., 2008; Sinha et al., 2005). En este contexto, se ha descrito la interacción entre la proteína Brd2 y factores de transcripción específicos, como E2F-1 y E2F-2 (Peng et al., 2007) o cofactores como Meis 1 (Denis et al., 2006) así como la copurificación de Brd2 con enzimas modificadoras de histonas como HDAC11, CBP o p300 (Denis et al., 2006), con subunidades del complejo Mediator, que media la interacción entre el complejo de preiniciación de la transcripción y factores de transcripción específicos (Kornberg, 2005), como TRAP220 (Crowley et al., 2002), Cdk8 (Crowley et al., 2002) o TAF<sub>II</sub>250 (Denis et al., 2006) y con subunidades del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF, como Brg-1 y Baf155 (Denis et al.,

2006), o Brd7 (Zhou et al., 2006). También se ha descrito la copurificación de Brd2 con la subunidad mayor de la RNA Polimerasa II (Crowley et al., 2002; Denis et al., 2006) y con la proteína TBP (Peng et al., 2007). Se ha descrito que los efectos de la sobreexpresión de Brd2 en la activación de genes del ciclo celular son más evidentes en condiciones de activación mitogénica, mediada por adición de suero (Sinha et al., 2005). Un papel de la proteína Brd2 como adaptador estructural que recluta factores de transcripción y la maquinaria de inicio de la transcripción a promotores de genes del ciclo etiquetados con marcas de acetilación, explicaría que el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la expresión de estos genes sea más evidente en condiciones de estimulación por suero, en las que se inducen y acumulan muchos de los factores necesarios para la activación transcripcional. Por el contrario, en condiciones de proliferación en las que las rutas de señalización que convergen en Brd2 así como las proteínas que forman parte del complejo de activación de la transcripción estarían activas de manera virtualmente constitutiva, los efectos de la sobreexpresión de Brd2 serían menores. De hecho, la sobreexpresión de Brd2 no conlleva un efecto dramático en la incorporación de BrdU en células P19 que crecen de manera exponencial (Figura 12). En cambio, en condiciones en las que se induce una parada del ciclo celular por adición de ácido retinoico también se observa un efecto significativo de la sobreexpresión de Brd2 (Figuras 39 y 40). Es posible que en estas condiciones en las que los distintos componentes implicados en la activación de genes del ciclo se hayan aún presentes, se produzca una reducción en los niveles de Brd2, una inactivación de la proteína, o un desensamblaje de proteínas. Sin embargo, no hemos observado variaciones en los niveles de Brd2 en presencia de ácido retinoico (Figura 50). Por lo tanto, la sobreexpresión de Brd2 podría conducir a un mantenimiento de la actividad de la proteína o desplazar el equilibrio hacia la asociación de proteínas con la cromatina en condiciones en las que normalmente se desensamblan.

Se ha publicado previamente que los dos bromodominios de Brd2 son capaces de interactuar directamente con marcas de acetilación de histonas (Ito et al., 2011; Kanno et al., 2004; LeRoy et al., 2008) y que son esenciales para su función en la transcripción de genes del ciclo (Sinha et al., 2005). De hecho, se ha descrito que la droga JQ-1, capaz de bloquear la interacción de los bromodominios de las proteínas BET con histonas acetiladas (Filippakopoulos et al., 2010), inhibe la expresión de *c-Myc* y el crecimiento e induce apoptosis en varias líneas celulares cancerosas en las que los genes *BET* están desregulados, como en leucemia de linaje mixto (Dawson et al., 2011), leucemia linfoblástica aguda (Ott et al., 2012), neuroblastoma (Schnepp y

Maris, 2013), linfoma de Burkitt o leucemia mieloide aguda (Mertz et al., 2011). Consistentemente con esta observación, la proteína Brd2 con la estructura de los bromodominios alterada (mutante Y152K/N428A de Brd2) es incapaz de asociarse con los cromosomas (Figura 15), de interaccionar eficientemente con la cromatina (Figura 22) o con la cola de la histona H3 diacetilada (Figura 23) y, por tanto, su sobreexpresión no tiene efecto en la expresión de los genes *CcnA2* y *CcnD1* (Figura 36). Además, la expresión de un fragmento de la proteína Brd2 que carece de los bromodominios ( $\Delta$ BRO) no tiene efecto en la incorporación de BrdU en células P19 (Figura 12). Sorprendentemente, tanto la sobreexpresión de una proteína Brd2 con la estructura del segundo bromodominio alterada (mutante N428A, Figura 12) como de una proteína Brd2 carente de un fragmento del primer bromodominio (Brd2-iso, Figura 12) tienen un efecto negativo en la incorporación de BrdU en células P19 en condiciones de proliferación, lo que sugiere un posible efecto dominante negativo sobre la proteína Brd2 endógena. Sin embargo, la expresión de una proteína Brd2 con la estructura del primer bromodominio alterada (mutante Q78A, Figura 12) no muestra efecto en la incorporación de BrdU. Por lo tanto, tanto la pérdida de los bromodominios como la alteración de la estructura del primer bromodominio mediante la mutación Q78A tienen consecuencias funcionales *in vivo* diferentes a la mutación N428A que afecta al segundo bromodominio o a la pérdida de parte del primer bromodominio en la proteína Brd2-iso, a pesar de que las consecuencias de las mutaciones Q78A y N428A en la interacción de los bromodominios con histonas acetiladas *in vitro* son similares (Huang et al., 2007; Nakamura et al., 2007). Se ha descrito que el primer bromodominio puede mediar la dimerización de la proteína Brd2 (Nakamura et al., 2007), por lo que alteraciones que afecten a la estructura del segundo bromodominio o deleciones que afecten al primer bromodominio sin alterar la capacidad de dimerizar podrían tener como consecuencia un efecto dominante negativo sobre la proteína endógena al interaccionar con ésta y formar híbridos no funcionales. Sin embargo, la mutación Q78A, que afecta a la dimerización (Nakamura et al., 2007), no mostraría un efecto negativo en la función de la proteína endógena. Por otro lado, mutantes de Brd2, como las proteínas  $\Delta$ BRO y los mutantes Q78A y Y152KN428A, que no interaccionan con la cromatina pero conservan la región carboxilo-terminal, descrita como el dominio de interacción con E2F-1 (Denis et al., 2000), también podría tener un efecto dominante, ya que podrían secuestrar a E2F-1. Sin embargo, no se ha observado dicho efecto (Figuras 12 y 36), lo que sugiere que la interacción de E2F-1 con la región carboxilo-terminal de Brd2 dependa de la integridad de la proteína, de forma que ésta pueda adoptar una conformación estructural adecuada. Consistentemente con lo publicado previamente (Sinha et al., 2005), la expresión de

una proteína Brd2 carente de la región carboxilo-terminal de interacción con E2F-1 tampoco afecta a la incorporación de BrdU en células P19 en condiciones de proliferación (Figura 12).

La función de Brd2 como proteína adaptadora en la transcripción de genes del ciclo celular no excluye la posibilidad de que, dependiendo del contexto celular, intervenga en la activación de otros genes. Por ejemplo se ha indicado que en embriones de ratón carentes de la proteína Brd2 hay una disminución de la expresión de genes importantes para la diferenciación neuronal, como *NeuroD1* o *NeuroD4* (Gyuris et al., 2010) y que la proteína Brd2 se asocia con el promotor de genes que codifican citoquinas proinflamatorias, como *IL-6* o *TNF- $\alpha$*  en macrófagos, siendo esta asociación requerida para la adecuada respuesta inflamatoria (Belkina et al., 2013). Además, mutaciones que causan una disminución en el nivel de expresión de *BRD2* en humanos se han asociado con la epilepsia mioclónica juvenil (Cavalleri et al., 2007) y la mutación de *Brd2* en heterocigosis conduce a una reducción en el número de neuronas GABAérgicas en estructuras cerebrales como la corteza, el estriado y el núcleo talámico ventromedial en ratones (Velisek et al., 2011). La expresión reducida de *Brd2* en ratones se ha vinculado también a la obesidad no asociada a diabetes de tipo 2 (Wang et al., 2009) y a defectos en la producción de citoquinas pro-inflamatorias por macrófagos (Belkina et al., 2013). Teniendo en cuenta que la proteína Brd2 se ha copurificado con proteínas implicadas en la represión transcripcional, como la desacetilasa de histonas HDAC11 (Denis et al., 2006) o la proteína Brd7 (Zhou et al., 2006), además de tener un papel en la coactivación de genes del ciclo, Brd2 podría funcionar como adaptador en la represión de algunos genes. Por ejemplo, la disminución de los niveles de la proteína Brd2 causa un incremento en la expresión del gen que codifica la insulina en células beta pancreáticas, y en preadipocitos se ha propuesto un papel de Brd2 como corepresor de PPAR- $\gamma$  en la inhibición de la adipogénesis (Wang et al., 2011). Curiosamente, se ha propuesto el mismo papel para la Ciclina D1, que también interacciona con PPAR- $\gamma$  (Fu et al., 2004).

La función de Brd2 como adaptador de múltiples factores conlleva un amplio abanico funcional durante el desarrollo. En este contexto, resulta interesante la observación de que los genes *Brd2*, *Brd3* y *Brd4* se expresan a lo largo del proceso de diferenciación neuronal inducida en células P19 (Figura 7). Asimismo, el nivel de proteína Brd2 se mantiene en distintas etapas de dicho proceso (Figura 50), de manera que se detecta tanto en progenitores neuronales como en neuronas postmitóticas en el tubo neural embrionario (Figura 42). Teniendo en cuenta el papel de Brd2 en la regulación de la expresión de genes del ciclo y que la diferenciación

neuronal se ha asociado a la parada del ciclo celular en la fase G1 (Blomen y Boonstra, 2007; Canzoniere et al., 2004; Georgopoulou et al., 2006; Lange et al., 2009), es razonable considerar la implicación de Brd2 en la coordinación entre los procesos de proliferación y diferenciación. Se han publicado varios trabajos que subrayan la importancia de la adecuada coordinación entre el ciclo celular y la diferenciación neuronal (revisado en Lange y Calegari., 2010 y Cremisi et al., 2003). Como se comentó en la sección de Introducción, según la hipótesis de la longitud del ciclo celular, la sensibilidad de los progenitores neuronales del neuroepitelio a los factores que regulan la diferenciación neuronal está temporalmente restringida a una “ventana” del ciclo celular (revisado en Minde y Brian., 2011). Particularmente, la duración de la fase G1 del ciclo en los progenitores neuronales se ha relacionado con la tendencia de éstos a generar neuronas (Calegari et al., 2005). Durante el desarrollo embrionario, cuando se inicia el proceso neurogénico, los progenitores neuronales pasan de tener divisiones proliferativas (una célula progenitora genera dos células hijas progenitoras) a tener divisiones neurogénicas (una célula progenitora genera al menos una neurona (división asimétrica) o dos neuronas (división simétrica)) (Lange et al., 2009). Se ha demostrado que, en embriones de ratón, los progenitores que se van a dividir neurogénicamente muestran un aumento en la duración de la fase G1 de más de un 20% en relación a aquellos que se dividen proliferativamente y que la duración general de la fase G1 de los progenitores neuronales aumenta conforme aumenta el grado de neurogénesis a lo largo del desarrollo (Calegari et al., 2005; Takahashi et al., 1995). Se ha publicado a su vez que, en embriones de ratón, el retraso de la transición de la fase G1 a la fase S mediante la inhibición parcial de los complejos Cdk2/Ciclina A y Cdk2/Ciclina E así como mediante la disminución en los niveles de complejo Cdk4/Ciclina D1 en progenitores neuronales inducen una neurogénesis prematura (Calegari y Huttner., 2003; Lange et al., 2009). A su vez, la sobreexpresión del complejo Cdk4/Ciclina D1 en progenitores neuronales impide el enlentecimiento de la fase G1 asociado a la división neurogénica (sin afectar al crecimiento celular, al plano de división o a la migración intercinética nuclear), lo cual inhibe la neurogénesis y provoca una expansión del territorio de progenitores neuronales (Lange et al., 2009). Además, se ha indicado que inhibidores del ciclo celular como pRb hipofosforilada o TIS21 son marcadores de progenitores neurogénicos (Georgopoulou et al., 2006; Iacopetti et al., 1999), que la sobreexpresión de factores que inhiben la proliferación como TIS21 (Canzoniere et al., 2004) o BM88 (Politis et al., 2007) promueve la neurogénesis y que la disminución en los niveles de factores antiproliferativos como Pml (Regad et al., 2009) o BM88 (Georgopoulou et al., 2006) inhibe la neurogénesis. Asimismo, factores secretados que aumentan la duración de la fase G1 de los

progenitores neuronales como IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-I*) o neurotrofina-3 (Lukaszewicz et al., 2002) inducen la diferenciación neuronal mientras que factores secretados con actividad mitogénica como bFGF la inhiben (Lukaszewicz et al., 2002). Aunque en estos estudios es muy difícil separar la función de los factores investigados en el ciclo celular de otras funciones específicas en la diferenciación neuronal independientes de su papel en la coordinación del ciclo celular, parece claro que enlentecer la progresión de la fase G1 sin impedir la transición G1-S ni la división, es un factor clave en la determinación del destino de las células hijas de los progenitores neuronales.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente resulta interesante la observación de que la sobreexpresión de Brd2 tiene un efecto negativo en la diferenciación neuronal tanto en células P19 como en el tubo neural embrionario (Figuras 41 y 43). Considerando el efecto negativo de la sobreexpresión de Brd2 en la parada del ciclo inducida por ácido retinoico y que la sobreexpresión de Brd2 mantiene niveles de expresión elevados de los genes *CcnD1* y *CcnA2* (Figuras 36, 39 y 40), el efecto de inhibición de la diferenciación neuronal podría deberse a una interferencia con el enlentecimiento de la fase G1 requerida para la división neurogénica. Alternativamente, en el caso en que aún así tuviera lugar la división neurogénica, el exceso de Brd2 podría interferir con la parada de ciclo en la fase G1 necesaria para la migración y diferenciación de las células. Se ha descrito que la reactivación de factores que promueven la progresión del ciclo celular en neuronas induce apoptosis (ElShamy et al., 1998; Park et al., 1996) y que inhibidores de Cdks promueven la supervivencia neuronal en ausencia de soporte trófico (Park et al., 1996). El exceso de Brd2 en neuronas recién formadas en el neuroepitelio podría inducir apoptosis al forzar la progresión del ciclo celular. De hecho, la sobreexpresión de Brd2 se ha asociado a apoptosis en una línea celular derivada de un carcinoma nasofaríngeo humano (Zhou et al., 2006) y se ha publicado que la pérdida de la proteína pRb provoca defectos en neurogénesis y apoptosis de progenitores neuronales que entran ectópicamente en fase S en el tubo neural (Lee et al., 2013). El hecho de que la sobreexpresión de la proteína Brd2 carente del motivo B, que no tiene efecto en la expresión de los genes *CcnD1* y *CcnA2*, no tenga efecto en la diferenciación neuronal, concuerda con lo expuesto. Asimismo, la sobreexpresión de un fragmento de Brd2 correspondiente al motivo B (mB) que afecta a la capacidad de Brd2 de asociarse con los cromosomas (Figura 35) y con el promotor de los genes *CcnD1* y *CcnA2* en interfase (Figura 57B) estimula la neurogénesis inducida en células P19 (Figura 53), quizás debido a que provoca un retraso en la transición de la fase G1 a la fase S. La expresión de Ptn

también interfiere con la asociación de Brd2 con el promotor de genes del ciclo (Figura 57), y por lo tanto favorece la diferenciación neuronal inducida en células P19 (Figura 53) y en el tubo neural de embriones de pollo (Figura 55). Sin embargo, no se puede descartar que el efecto de Ptn en la neurogénesis se deba, además de al antagonismo funcional con Brd2, a otras funciones específicas de la proteína Ptn. De hecho, la interacción de Ptn con varios receptores de superficie celular se ha implicado en diversos procesos relacionados con la diferenciación neuronal, como la migración (Maeda y Noda, 1998), el crecimiento de neuritas (Yanagisawa et al., 2003) o la supervivencia neuronal (Muramatsu et al., 2000).

Resulta interesante el antagonismo funcional entre Brd2 y Ptn en la migración de células de la cresta neural (Figura 56). La sobreexpresión de Brd2 no afecta a la migración de las células de la cresta neural, pero la inhibición de su expresión o la sobreexpresión de Ptn o del motivo B, que son antagonistas de Brd2, tienen un efecto negativo en el proceso. Se ha descrito que, si bien la reducción de los niveles de Ciclina D1 se han asociado con un efecto positivo en la diferenciación de progenitores neuronales, se requieren altos niveles de esta proteína para la delaminación y migración de células de la cresta neural (Burstyn-Cohen et al., 2004; Shoval et al., 2007). De hecho, se ha observado que el nivel de expresión de *CcnD1* aumenta significativamente en células epiteliales de la línea media dorsal del tubo neural y en células de la cresta neural que están emigrando (Burstyn-Cohen et al., 2004). La migración de la mayor parte de las células de la cresta neural a nivel troncal tiene lugar de manera sincrónica en la fase S del ciclo celular, siendo la transición de G1 a S un evento necesario para la transición a un fenotipo mesenquimal y la delaminación de estas células (Burstyn-Cohen y Kalcheim, 2002). En estas células, una disminución en los niveles de la Ciclina D1 al interferir con vías de señalización como la ruta de la  $\beta$ -catenina (Burstyn-Cohen et al., 2004), sobreexpresando una molécula dominante negativo de E2F-1 o mediante la inducción de la translocación nuclear de p27 (Burstyn-Cohen y Kalcheim, 2002) puede afectar de manera determinante a la transición de la fase G1 a la fase S y, por tanto, a la delaminación y migración celular. Curiosamente, a diferencia de lo que se observa en los progenitores neuronales del neuroepitelio del tubo neural, se ha observado una disminución de la duración de la fase G1 en células de la cresta neural migratorias (Paglini y Rovasio, 1999). En este sentido, el efecto negativo sobre la migración de la cresta que se produce al interferir con Brd2 puede estar relacionado con su función en la activación del gen *CcnD1*. De hecho, se ha indicado que en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) carentes de la proteína Brd2 se para el ciclo celular en la fase G1 (Shang et al., 2009). Las

diferencias en la regulación de los procesos de delaminación de células de la cresta neural y de diferenciación de células del neuroepitelio responde a la implicación de diferentes vías de señalización y a la peculiaridad de las células de la cresta neural, células con un extraordinario potencial migratorio, de proliferación y de diferenciación (Kalcheim y Burstin-Cohen, 2005). Es interesante que se haya puesto de manifiesto que la expresión del gen *CcnD1* es también importante para la migración de otros tipos celulares, como fibroblastos o células de epitelio mamario (Li et al., 2006).

Resulta curioso que, tanto en células P19 diferenciadas a neuronas (Figura 8) como en neuronas del tubo neural de embriones de ratón y pollo (Figura 42) parte de la proteína Brd2 se detecta en el citoplasma. Previamente, Crowley y colaboradores, basándose en experimentos de inmunohistoquímica con anticuerpos contra la proteína Brd2 en cortes transversales del tubo neural de embriones de ratón, describieron que la proteína Brd2 mostraba una localización citoplásmica en neuronas del manto y de los ganglios de la raíz dorsal (Crowley et al., 2004). Sin embargo, en imágenes más resolutivas obtenidas mediante la técnica de inmunofluorescencia con anticuerpos desarrollados en nuestro laboratorio contra la proteína Brd2 de ratón o de pollo en cortes transversales del tubo neural embrionario, hemos puesto de manifiesto que, aunque detectamos parte de la proteína Brd2 en el citoplasma, la señal asociada al compartimento nuclear sigue siendo mayoritaria (Figura 42). Por lo tanto esta discrepancia podría deberse a diferencias en las técnicas utilizadas. Curiosamente, otras proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular como E2F-1 (Wang et al., 2010), N-myc (Wakamatsu et al., 1993), la kinasa CK2 (Avila et al., 1994), Cdk4 (Negis et al., 2011) o Ciclina D1 (Sumrejkanchanakij et al., 2005) se acumulan en el citoplasma en células que se diferencian a neuronas. Aunque el mecanismo o la funcionalidad de la mayor parte de estos cambios de localización celular no han sido caracterizados, se ha indicado que en el caso de la Ciclina D1 la acumulación en el citoplasma de progenitores neuronales corticales que salen del ciclo y se diferencian terminalmente tiene lugar mediante la inhibición de su importe nuclear, y que la relocalización nuclear de esta proteína en neuronas se asocia con apoptosis (Sumrejkanchanakij et al., 2005). Es interesante destacar que la proteína Brd2 también se ha detectado en el citoplasma en células beta pancreáticas quiescentes (Wang et al., 2009) y en células acinares post-mitóticas del epitelio mamario de ratones (Crowley et al., 2002). En este último caso, la relocalización nuclear de Brd2 se asocia con la apoptosis de éstas células (Crowley et al., 2002). Curiosamente, en el proceso de diferenciación neuronal se ha descrito que tiene lugar un cambio en el subtipo de importinas- $\alpha$  que la célula expresa, lo que podría justificar en parte la relocalización de

proteínas (Perry y Fainzilber., 2009). A su vez, resulta de interés en este contexto destacar que la proteína Zfhx3, que se aisló en el escrutinio de dos híbridos con Brd2, se transloca al citoplasma en células P19 tratadas con ácido retinoico cultivadas en suspensión y vuelve a translocarse al núcleo en fases más avanzadas del proceso, cuando las neuronas empiezan a desarrollar neuritas. Esta localización nuclear está relacionada con la diferenciación neuronal (Jung et al., 2005). Además, la inducción de Lyar (que se aisló también en el escrutinio de dos híbridos con Brd2) en células P19 sigue una dinámica similar a la de Ptn, una rápida activación a las 24 del inicio del tratamiento con ácido retinoico (Ido et al., 1994).

En el análisis de regiones de Brd2 implicadas en su localización nuclear, encontramos que dos secuencias conservadas, la región NLS1 (274KKKGVK RK281) y la región NLS2 (544KRKREK KKKKKRKEKH560), están implicadas de manera independiente en la localización nuclear de Brd2 (Figura 10). Posteriormente a la obtención de estos resultados, se publicó que las regiones 277KGVK RKADTTTP288 y 544KPKRKREK KEK KKKR K559 de la proteína Brd2 humana se comportan como NLS en la línea celular humana HEK293T (Masumi et al. 2012). La primera solapa con la secuencia 274KKKGVK RK281 conservada en la proteína Brd2 de ratón, cuya implicación en la localización de Brd2 en células P19 pusimos de manifiesto (Figura 9), y la segunda solapa con la secuencia 544KRKREK KKKKKRKEKH560 de ratón, cuya implicación en la localización de Brd2 en células P19 y en células BALB/3T3 de ratón También se ha puesto de manifiesto (Figura 10; Guo et al., 2000). En la línea celular HEK293T, la pérdida de la región 277KGVK RKADTTTP288 provoca una localización parcial punteada de Brd2 en el citoplasma, aunque la mayor parte de la proteína sigue en el núcleo, mientras que la pérdida conjunta de las regiones 277KGVK RKADTTTP288 y 544KPKRKREK KEK KKKR K559 provoca una localización mayoritariamente citoplásmica de la proteína. La pérdida de la región 544KPKRKREK KEK KKKR K559 no altera la localización nuclear de Brd2 (Masumi et al. 2012). Por lo tanto, en la línea celular HEK293T las regiones 277KGVK RKADTTTP288 y 544KPKRKREK KEK KKKR K559, contenidas en los motivos A y B respectivamente, están también implicadas de manera independiente en la localización nuclear de la proteína Brd2 humana, aunque la pérdida de la región 277KGVK RKADTTTP288 provoca una localización citoplásmica parcial de la proteína. La caracterización detallada de los mecanismos de translocación de Brd2 al núcleo y su regulación podría arrojar luz sobre la regulación de la función de la proteína Brd2 durante el proceso de diferenciación neuronal.

## 4.2. El motivo B constituye un dominio de dimerización entre proteínas BET esencial para la función de éstas

Teniendo en cuenta que muchas proteínas con bromodominios, e incluso proteínas con dos bromodominios en tándem como TAF<sub>II</sub>250 (Kruhlak et al., 2001), se disocian de los cromosomas durante la mitosis, la asociación de las proteínas BET con los cromosomas sugiere la posible implicación de estructuras adicionales a los bromodominios en la interacción de Brd2 con la cromatina. A pesar de la capacidad de los bromodominios de Brd2 de interaccionar *in vitro* con colas de histonas acetiladas (Huang et al., 2007; Nakamura et al., 2007; Umehara et al., 2010a; Umehara et al., 2010b) hemos observado que, *in vivo*, la asociación de Brd2 con los cromosomas requiere no solo los bromodominios, sino también una región conservada entre el segundo bromodominio y el dominio ET conocida como motivo B (Paillisson et al., 2007). Sorprendentemente, aunque la proteína Brd2 carente del motivo B (Brd2 $\Delta$ mB) aparece disociada de los cromosomas en las primeras fases de la mitosis, una reasociación significativa se observa en fases más avanzadas, a partir de anafase (Figura 18). En este contexto resulta de interés destacar la observación previamente publicada de que la mitosis progresa siguiendo una dinámica bifásica respecto a la acetilación de las colas de las histonas: se observa una desacetilación global de la mitosis en las primeras fases de la mitosis y una progresiva re-acetilación en fases más tardías (Kruhlak et al., 2001; Sasaki et al., 2009). Esto sugiere que el requerimiento del motivo B podría depender del estado de acetilación de la cromatina. De hecho, la asociación de esta proteína con los cromosomas observada tras tratar las células con el inhibidor de desacetilasas de histonas TSA apoya esta idea y subraya la importancia del motivo B en condiciones de hipoacetilación (Figura 20). Sin embargo, a pesar de la reasociación de la proteína Brd2 $\Delta$ mB a los cromosomas en anafase, nuestros datos indican que el motivo B es importante para el reconocimiento eficiente de la cromatina independientemente de la fase del ciclo celular. La necesidad de una menor concentración de NaCl para la extracción de la proteína Brd2 $\Delta$ mB en un cultivo celular asincrónico (Figura 22), así como la disociación de las regiones promotoras de los genes *CcnD1* y *CcnA2* (Figura 37), y de la cola de histona H3 diacetilada (Figura 23), apoyan esta noción. La aparente discrepancia entre la asociación cromosómica de la proteína Brd2 $\Delta$ mB en la mitosis tardía o en presencia de TSA y la pérdida de su capacidad de interacción con un péptido de histona H3 acetilada podría explicarse por las diferentes aproximaciones experimentales, ya que las condiciones del ensayo de *pull-down in vitro* (concentración de NaCl) se ajustaron para discriminar pequeñas diferencias en la capacidad de unión entre la proteína silvestre y la proteína Brd2 $\Delta$ mB.

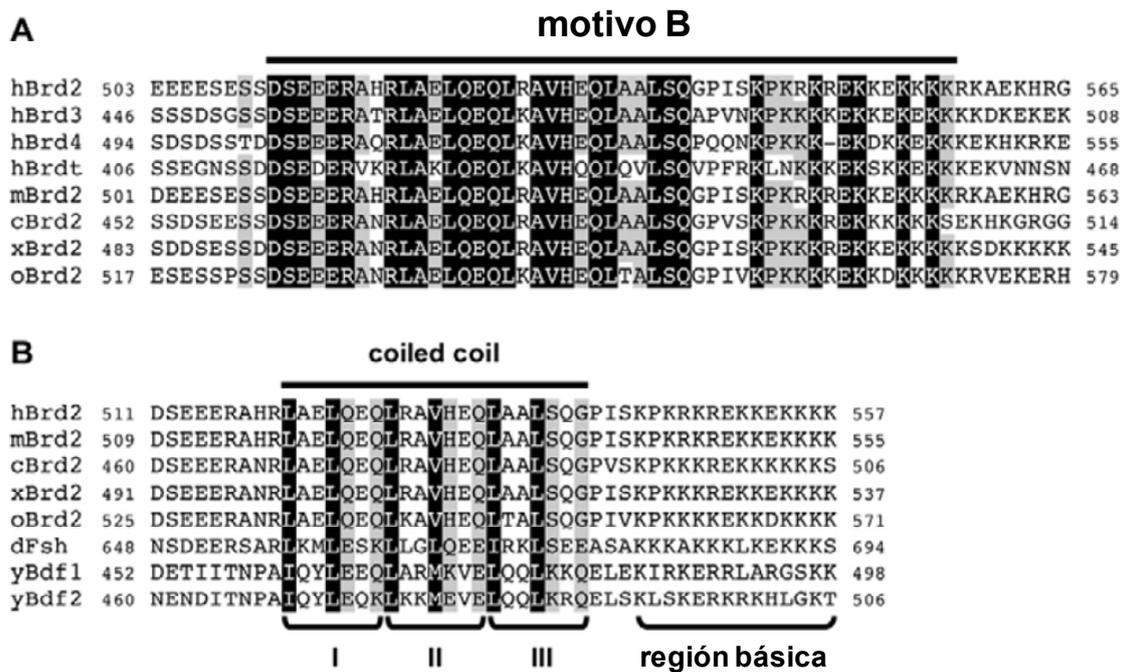
Además, aunque se observa una reasociación de la proteína Brd2 $\Delta$ mB a los cromosomas en experimentos de inmunofluorescencia, la afinidad o la estructura de la proteína Brd2 $\Delta$ mB asociada podría ser diferente de la de la proteína silvestre, como indican los experimentos de *ChIP* (Figura 37) y de extracción diferencial (Figura 22) en cultivos asincrónicos. Nuestros resultados por lo tanto indicarían que en anafase tiene lugar una asociación aberrante de la proteína Brd2 $\Delta$ mB con los cromosomas que en consecuencia tendría un impacto negativo en la memoria transcripcional, siendo el motivo B relevante, no sólo para el reconocimiento físico de la cromatina acetilada, sino también para la adecuada conformación funcional de las proteínas BET.

En contraste con Brd4 o Brdt, que reconocen preferentemente la cola de la histona H4 diacetilada (Dey et al., 2003; Morinière et al., 2009; Sasaki et al., 2009), Brd2 parece reconocer más eficientemente la histona H4 monoacetilada en la lisina 12 (H4K12ac) (Ito et al., 2011; Kanno et al., 2004). Sin embargo, se ha descrito la interacción de Brd2 con otras marcas de acetilación, como la histona H4 acetilada en la lisina 5 (H4K5ac) o en la lisina 8 (H4K8ac) (Kanno et al., 2004; Umehara et al., 2010b). Si bien la marca H4K12ac se mantiene durante la mitosis (Ito et al., 2011), las marcas H4K5ac y H4K8ac se pierden significativamente durante la mitosis (Kruhlak et al., 2001; Sasaki et al., 2009). Asimismo, la proteína Brd2 es capaz de reconocer la histona H3 diacetilada en las lisinas 9 y 14 (H3K9acK14ac) (Figura 23), marcas que decrecen significativamente durante la mitosis, aunque se retengan parcialmente cerca del sitio de inicio de la transcripción de genes de activación temprana (Kouskouti y Talianidis, 2005). Aunque distintos trabajos previamente publicados indican la interacción de Brd2 con diferentes marcas de acetilación de histonas, se observan aparentes discrepancias en la bibliografía sobre la selectividad de interacción de Brd2 con marcas de acetilación específicas. Estas discrepancias podrían deberse a la diferencia entre las aproximaciones experimentales utilizadas en cada caso, ya que el reconocimiento selectivo de marcas específicas se ha puesto de manifiesto mediante ensayos de *pull-down* o de SPR *in vitro*, o mediante procesamiento de imágenes fluorescentes en tiempo real *in vivo*, normalmente recurriendo a la sobreexpresión de proteínas: la proteína completa, o fragmentos truncados que incluyen sólo los bromodominios, e incluso proteínas quiméricas (Dey et al., 2003; Huang et al., 2007; Ito et al., 2011; Kanno et al., 2004; Morinière et al., 2009; Nakamura et al., 2007; Sasaki et al., 2009; Umehara et al., 2010b). Además, nuestros resultados indican que las proteínas BET pueden interactuar entre sí a través del motivo B, lo que complica la caracterización de la selectividad del reconocimiento de marcas de histonas por las proteínas BET endógenas.

Varias evidencias apoyan el papel del motivo B en la interacción entre proteínas BET: (a) la interacción del motivo B de Brd2 consigo mismo y con el motivo B de Brd3 y Brd4 en el sistema de dos híbridos (Figuras 26 y 27); (b) la interacción del motivo B de Brd2 recombinante con la fusión GST-mB en ensayos de *pull-down in vitro* (Figura 28); (c) la coimmunoprecipitación de Brd2 dependiente del motivo B (Figuras 31 y 33); y (d) la señal FRET significativa entre Brd2-RFP y GFP-Brd2 o GFP-Brd3, dependiente del motivo B al menos en el caso de Brd2 (Figura 34). La función de muchos factores de transcripción depende de su capacidad para formar estructuras diméricas, ya sea entre proteínas idénticas (homodimerización) o diferentes (heterodimerización) (Almoutzias et al., 2008). Se ha propuesto previamente que el primer bromodominio de Brd2 está implicado en la homodimerización de la proteína ya que el fragmento amino-terminal de Brd2 que lo incluye es capaz de coimmunoprecipitar un fragmento equivalente fusionado a GFP o a la proteína completa recombinante (Nakamura et al., 2007). Sin embargo, nuestros resultados muestran que el motivo B es tan necesario como el primer bromodominio para la interacción de la proteína Brd2 consigo mismo (Figura 31). De hecho, el motivo B es crucial para la señal de FRET y su pérdida tiene por sí sola un efecto similar a la pérdida conjunta del motivo B junto con mutaciones en el primer bromodominio que afectan a la dimerización (Figura 34). Por lo tanto, el motivo B y el primer bromodominio de Brd2 podrían cooperar en la adquisición de una configuración funcionalmente adecuada para el reconocimiento eficiente de marcas específicas de acetilación de la cromatina por parte de los bromodominios. Además, nuestros resultados muestran que el motivo B no sólo media la interacción de Brd2 consigo mismo, sino que también media la interacción entre las distintas proteínas BET (Figuras 26, 27, 29 y 30). Teniendo esto en cuenta, es razonable especular que la interacción entre proteínas BET podría modular la funcionalidad de estas proteínas. De hecho, la ausencia de redundancia funcional entre las proteínas BET a pesar de la homología y del solapamiento en el patrón de expresión de los distintos miembros (Gyuris et al., 2009; Houzelstein et al., 2002; LeRoy et al., 2008; Shang et al., 2009) estaría de acuerdo con una función dependiente de la interacción entre proteínas BET diferentes.

La secuencia de aminoácidos del motivo B está muy conservada entre las distintas proteínas BET de vertebrados (Figura 59A). Un análisis de la secuencia del motivo B de la proteína Brd2 con la herramienta bioinformática Jpred3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) indica que esta región probablemente no está desordenada, sino que se ajusta a una posible estructura tipo *coiled coil*. De

hecho, un análisis de esta secuencia con la herramienta bioinformática COIL (Lupas et al., 1991) indica una alta probabilidad de que esta región se ajuste a una estructura en *coiled coil*. Concretamente, se obtuvo un valor de >96% para esta región con una ventana de escaneo de 21 residuos, en contraste con la baja probabilidad (<1%) obtenida para los bromodominios, cuya estructura es bien conocida y diferente del *coiled coil* (Huang et al., 2007; Nakamura et al., 2007).



**Figura 59. El motivo B contiene un posible *coiled coil*.** (A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos correspondiente a una región entre el segundo bromodominio y el dominio ET de varias proteínas BET de vertebrados. Los aminoácidos conservados en todas las secuencias aparecen en recuadros negros mientras que aminoácidos conservados en al menos 6 de las 8 secuencias aparecen en recuadros grises. La región conservada indicada constituye el motivo B (Paillisson et al., 2007). (B) Alineamiento del motivo B de diferentes proteínas BET de mamíferos a levaduras. Las tres repeticiones heptapeptídicas del posible *coiled coil* aparecen señaladas (I, II y III). Los recuadros negros indican residuos no polares relevantes en esta estructura y los recuadros grises indican posibles residuos expuestos al solvente (Grigoryan y Keating, 2008). También se indica la región básica conservada en posición carboxilo-terminal del motivo B. Los alineamientos se realizaron con la herramienta ClustalX 2.0.11.

Además, la probabilidad obtenida para el motivo B fue similar a la obtenida para secuencias de *coiled coils* previamente descritas, como la cremallera de leucina clásica de la proteína GcN4 de *S. cerevisiae* (>99%) (O'Shea et al., 1991). El alineamiento de la secuencia del motivo B de proteínas BET de varias especies revela

el alto grado de conservación de los residuos que definen una estructura en *coiled coil* (Figura 59B). Las estructuras *coiled coil* consisten en repeticiones de una héptada (abcdefg) con residuos de aminoácido hidrofóbicos en las posiciones a y d y residuos de aminoácidos polares expuestos al solvente en las posiciones e y g (Grigoryan y Keating, 2008). Esta disposición de residuos está conservada en la secuencia del motivo B de la proteína Brd2 de distintas especies (Figura 59B). Como los *coiled coils* median habitualmente la dimerización de proteínas (Grigoryan y Keating, 2008), esta observación apoya el papel del motivo B en la dimerización entre proteínas BET. Las estructuras tipo *coiled coil* median habitualmente la dimerización entre proteínas y la dimerización está implicada en la funcionalidad de multitud de factores y co-factores transcripcionales pertenecientes a diversas familias (Amoutzias et al., 2008). Sin embargo, no podemos descartar la implicación de otras secuencias del motivo B contiguas al *coiled coil*, como la región básica conservada carboxilo-terminal, en la adecuada conformación de los dímeros. De hecho, en el ensayo de FRET la interacción de la proteína Brd2 consigo mismo requería que en un caso el fluoróforo estuviera fusionado al extremo amino-terminal de Brd2 (GFP-Brd2) y en el otro al extremo carboxilo-terminal de Brd2 (Brd2-RFP) (Figura 34). Esta observación podría indicar que las dos moléculas de Brd2 interaccionan con orientaciones opuestas a través del motivo B. La presencia de residuos de aminoácido de carácter ácido hacia el extremo amino-terminal del motivo B y residuos de aminoácido de carácter básico hacia el carboxilo-terminal (Figura 59A) podría estar implicada en la orientación de la interacción entre moléculas de la proteína Brd2. Recientemente se ha descrito que en la proteína Brd4, la fosforilación de residuos de serina localizados en la región amino-terminal al motivo B mediada por la kinasa CK2 (*Casein kinase 2*) regula un cambio conformacional importante para la adecuada asociación de Brd4 a los genes *c-Myc* o *c-Fos* (Wu et al., 2013). Concretamente, Wu y colaboradores proponen que, en ausencia de fosforilación, esta región interacciona intramolecularmente con el segundo bromodominio, bloqueando su capacidad de interaccionar con la cromatina. La fosforilación incrementa su afinidad por la región básica del motivo B (localizada hacia el extremo carboxilo-terminal de dicho motivo), liberando el segundo bromodominio, lo que da lugar a una conformación funcional en Brd4. Aunque Wu y colaboradores proponen que la interacción entre la región fosforilada y la región básica del motivo B tiene lugar en una misma molécula de Brd4, en los experimentos que realizan para demostrar dicha interacción utilizan péptidos correspondientes a pequeños fragmentos de la proteína Brd4, por lo que no se demuestra que la interacción entre ambas regiones sea intramolecular. Teniendo en cuenta que la región fosforilable y la región básica flanquean el posible *coiled coil* del motivo B, cabe la posibilidad de que la

fosforilación estimule la homodimerización de Brd4, lo que supondría un mecanismo de regulación funcional de una proteína BET a través de la regulación de su dimerización. Dicha homodimerización liberaría el segundo bromodominio de las dos moléculas implicadas y el complejo sería funcional para la asociación con la cromatina. Curiosamente, sólo dos de los siete residuos de serina fosforilables por CK2 están conservados en la secuencia de la proteína Brd2 que, en su lugar, presenta una sucesión de residuos de ácido glutámico que le confieren carácter ácido a la región. Además, en el caso de Brd2, la pérdida de esta región ácida (proteína Brd2 $\Delta$ NmB) no tiene consecuencias significativas en su capacidad de asociarse con los cromosomas (Figura 16) o la cromatina (Figura 37) o de estimular la expresión de genes de ciclo (Figuras 36 y 39). Según el modelo de Wu y colaboradores, la proteína Brd2 $\Delta$ NmB sería constitutivamente activa.

La importancia del motivo B en la función de Brd2 se ve reflejada en la incapacidad de Brd2 de asociarse con la cromatina en ausencia de dicho motivo (Figuras 16, 22, 23 y 37). De esta manera, la sobreexpresión de Brd2 carente del motivo B no tiene efecto en la expresión de los genes *CcnD1* y *CcnA2* (Figura 36), en la acumulación de células en la fase G1 inducida por tratamiento con ácido retinoico en células P19 (Figuras 39 y 40) o en la diferenciación neuronal en células P19 (Figura 41) o en el tubo neural embrionario (Figura 43). A su vez, la sobreexpresión de un fragmento de Brd2 que incluye el motivo B interfiere con la dimerización de la proteína Brd2 (Figura 58), afectando a la capacidad de Brd2 de asociarse con los cromosomas (Figura 35) y con las regiones promotoras de los genes *CcnD1* y *CcnA2* (Figura 57).

Debido a su papel en la regulación del ciclo celular, la alteración del patrón de expresión de distintas proteínas BET se ha asociado con diversos tipos de cáncer (Crawford et al., 2008; Filippakopoulos et al., 2010; French, 2012; French et al., 2003; French et al., 2008; Greenwald et al., 2004; Zuber et al., 2011), y la inhibición de la asociación de las proteínas BET con la cromatina, mediada por drogas que mimetizan marcas específicas de acetilación, contrarresta eficientemente la progresión de varios tipos de cáncer en modelos de ratón (Dawson et al., 2011; Delmore et al., 2011; Filippakopoulos et al., 2010; Mertz et al., 2011; Prinjha et al., 2012; Zuber et al., 2011). En este contexto, el conocimiento preciso de las características estructurales implicadas en la asociación de las proteínas BET a la cromatina podría contribuir a mejorar el diseño de drogas, de manera que resulten más específicas y eficaces en el bloqueo de proteínas BET con fines terapéuticos.

### 4.3. Ptn es un antagonista de Brd2 durante el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados

En nuestra búsqueda de proteínas capaces de interactuar con la mitad carboxilo-terminal de Brd2, descubrimos la interacción entre Brd2 y la proteína Ptn (Figura 24), que fue verificada en el sistema de dos híbridos (Figura 44), en experimentos de coimmunoprecipitación de las proteínas recombinantes (Figura 44) y endógenas (Figura 52) en líneas celulares y en experimentos de *pull-down in vitro* (Figura 45). Curiosamente, la interacción entre Brd2 y Ptn tiene lugar a través de una región básica carboxilo-terminal de Ptn y una región ácida de Brd2 no conservada en las otras proteínas BET de vertebrados (Figuras 46, 47 y 48). La interacción entre ambas y el hecho de que se expresan abundantemente en el sistema nervioso central de embriones de vertebrados en los mismos estadios (Crowley et al., 2003; Gyuris et al., 2009; Mitsiadis et al., 1995; Yanagisawa et al., 2010), además de estar presentes en los mismos compartimentos celulares en células P19 en las que se induce la expresión de *Ptn* mediante tratamiento con AR (Figura 51), anticipaban una relación funcional entre ambas.

Como se comentó en el apartado 3.3.1. de la sección de Resultados, varios estudios han asociado la función de Ptn con la estimulación de distintos procesos relacionados con la diferenciación neuronal. A su vez, Ptn se ha relacionado con la estimulación de la proliferación en otros tipos celulares (Chauhan et al., 1993), por lo que su función en diferenciación podría relacionarse con un papel en la regulación del ciclo celular. De hecho, en células P19 en las que se induce la diferenciación neuronal mediante tratamiento con AR, se activa la expresión transitoria de *Ptn* al principio del tratamiento, cuando se empiezan a acumular las células en la fase G1 del ciclo (Brunet-De Carvalho et al., 2003). El hecho de que la sobreexpresión de Brd2 en células P19 interfiere con la diferenciación neuronal y que Ptn se ha relacionado con la diferenciación neuronal de progenitores neuronales, sugiere un antagonismo funcional entre ambas proteínas en el proceso de diferenciación neuronal. Varios de los resultados obtenidos apoyan esta teoría: (a) la sobreexpresión de Ptn anula el efecto antineurogénico de la sobreexpresión de Brd2 en células P19 (Figura 53); (b) dicho efecto requiere la interacción entre Brd2 y Ptn, ya que Ptn no puede anular el efecto de Brd2 $\Delta$ ac y Ptn $\Delta$ C no puede antagonizar el efecto de Brd2 (Figura 53); (c) la sobreexpresión de Ptn anula el efecto negativo de la sobreexpresión de Brd2 en la diferenciación de progenitores neuronales del tubo neural (Figura 55); (d) Ptn interfiere con la homodimerización de Brd2 y con su asociación a la cromatina (Figuras 57 y 58). El hecho de que la inhibición de Ptn mediante el uso en células P19 de una molécula

*shRNA* muestre un efecto similar en neurogénesis al de la sobreexpresión de Brd2 (Figura 53) sugiere que gran parte de la función de Ptn, al menos en los primeros estadios de la diferenciación neuronal inducida, podría estar relacionada con antagonizar la función de Brd2. Aun así, trabajos previos han implicado la interacción de Ptn con varios receptores de superficie celular en la estimulación de la diferenciación en varios modelos (Hampton et al., 1992; Kinnunen et al., 1998; Li et al., 1990; Maeda y Noda, 1998; Muramatsu et al. 2000; Rauvala, 1989; Reiff et al., 2011; Yanagisawa et al., 2010), por lo que es posible que el efecto de Ptn en la diferenciación implique la activación de varias vías de señalización, además de ser un antagonista de Brd2. De hecho, la expresión de Ptn por sí sola no es suficiente para inducir la diferenciación en células P19 (Brunet-De Carvalho et al., 2003) ni tiene efectos dramáticos en progenitores neuronales (Figura 55), lo que indica que otros mecanismos adicionales son necesarios para especificar el destino neuronal.

Teniendo en cuenta la importancia de la dimerización de Brd2 a través del motivo B para su función como transactivador de genes del ciclo y que la proteína Ptn interacciona con una región ácida próxima a este dominio, es razonable suponer que la interacción de Ptn con Brd podría interferir con la dimerización de Brd2. El efecto de Ptn sobre la dimerización de Brd2 es similar al efecto de la sobreexpresión de un fragmento de Brd2 correspondiente al motivo B (Figura 58). De hecho, la expresión de Ptn interfiere con la interacción de la proteína Brd2 endógena con la cromatina y con las regiones promotoras de los genes *CcnD1* y *CcnA2* (Figura 57), probablemente mediante la interferencia con la formación de dímeros funcionales. Así, el antagonismo de Ptn con Brd2 durante el proceso de diferenciación neuronal probablemente tenga lugar, al menos en parte, como consecuencia de una alteración estructural de la proteína Brd2. En este sentido, la expresión de un fragmento de Brd2 correspondiente al motivo B, que afecta a la dimerización y función de Brd2 (Figura 35, 57 y 58), también favorece la diferenciación neuronal en células P19 (Figura 53). Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de Brd3 conlleva un efecto antineurogénico similar al de Brd2; sin embargo, Ptn interacciona selectivamente con Brd2, por lo que no muestra efectos sobre la actividad antineurogénica de Brd3 (Figura 53). La homología entre las proteínas Brd2 y Brd3 y la asociación de Brd3 con el promotor de genes del ciclo (LeRoy et al., 2008) así como su papel en la activación de la proliferación (Dawson et al., 2011) explican un efecto de la sobreexpresión de Brd3 en la diferenciación neuronal similar al de Brd2 (Figura 53). Dado que el gen *Brd3* mantiene su expresión en células P19 a lo largo del proceso de diferenciación neuronal (Figura 7), es razonable especular acerca de la importancia de antagonizar

Brd2 durante la diferenciación neuronal si otros miembros de la familia BET insensibles a Ptn se expresan. Teniendo en cuenta la posibilidad de heterodimerización entre proteínas BET, es posible que Ptn, aun cuando sólo interacciona con Brd2, tenga un efecto indirecto sobre Brd3, interfiriendo con su capacidad de dimerización con Brd2. Por otro lado, se ha demostrado que cambios en la dosis de una sola de las proteínas BET tienen consecuencias fenotípicas. Así, la mutación de *Brd4* en heterocigosis conlleva defectos proliferativos en MEFs (Houzelstein et al., 2002).

En el apartado 4.1. de la Discusión se comentó que el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la diferenciación podría deberse a: (1) una interferencia con el enlentecimiento de la fase G1 importante para que los progenitores neuronales se comprometan y dividan neurogénicamente o (2) una interferencia con la parada del ciclo celular tras una división neurogénica. En este sentido, el efecto positivo de Ptn en la diferenciación neuronal podría deberse a que, al interferir con la asociación de Brd2 con la cromatina, favorece tanto el enlentecimiento de la fase G1 en interfase como la parada del ciclo celular en la célula hija. Se ha publicado que una disminución en los niveles del complejo Cdk4/Ciclina D1 en progenitores neuronales se relaciona con una neurogénesis prematura (Lange et al., 2009). Sin embargo, en el caso de Ptn, la sobreexpresión de la proteína no es suficiente para inducir la diferenciación en progenitores neuronales del tubo neural (Figura 55), lo que indica que otros mecanismos adicionales son necesarios para especificar el destino neuronal. Por ejemplo, la proteína p27 estimula la diferenciación neuronal a través de su efecto en el ciclo celular y a través de efectos no relacionados con la regulación del ciclo, como la estabilización del factor neurogenina-2 o el bloqueo de la señalización por RhoA (Nguyen et al., 2006). Curiosamente, la actividad fosfatasa del receptor PTP- $\zeta$ , que es inhibida por ligandos como Ptn, se ha visto implicada en la activación de la señalización por proteínas Rho (Tamura et al., 2006). Se ha publicado que la asociación de Brd4 con los cromosomas es importante para la reactivación temprana tras la mitosis de genes importantes para el ciclo celular (Zhao et al., 2011). Teniendo esto en cuenta, es posible que el antagonismo de Ptn sea relevante de manera especial durante la mitosis en divisiones neurogénicas, por lo que investigar la interacción de Ptn y Brd2 durante la mitosis, así como determinar el efecto de la sobreexpresión de Brd2 en la duración de la fase G1 de los progenitores neuronales podría arrojar luz sobre los mecanismos de acción de Ptn.

La presencia de parte de Brd2 en el citoplasma de las neuronas del manto del tubo neural o de los ganglios de la raíz dorsal (Figura 42) así como en células P19

diferenciadas a neuronas (Figura 8) sugiere un posible papel de la relocalización de Brd2 en la diferenciación neuronal. Esta localización se observa de forma temprana, coincidiendo con la inducción de Ptn por ácido retinoico en células P19 (Figura 51). Teniendo en cuenta que la mayor parte de la proteína Ptn se localiza en el citoplasma de éstas células, es posible que Ptn bloquee la NLS2 de Brd2 presente en el motivo B y cercana al dominio de interacción con Ptn (Figura 10), secuestrando en el citoplasma la proteína Brd2 sintetizada *de novo*. Este fenómeno se observa en otras proteínas, como por ejemplo Nucleolina. Esta proteína de expresión ubicua es preferentemente nucleolar pero se localiza parcialmente en la membrana plasmática de algunos tipos celulares, como en varias líneas tumorales (Hovanessian et al., 2010; Krust et al., 2011; Watanabe et al., 2010), en células endoteliales (Christian et al., 2003; Hovanessian et al., 2010), en macrófagos (Miki et al., 2012), en células musculares durante el desarrollo (Alete et al., 2006), en células del epitelio intestinal (Turck et al., 2006) y en neuronas (Kleinman et al., 1991). En la superficie de estas células Nucleolina puede interactuar con multitud de proteínas, como laminina-1 (Kibbey et al., 1995), PTP $\sigma$  (Alete et al., 2006), PTP $\gamma$  o la integrina  $\alpha_v\beta_3$  (Koutsoumpa et al., 2012b) y a su vez puede mediar la internalización de varios ligandos, como las proteínas Ptn y Mdk (Hovanessian, 2006; Koutsoumpa et al., 2012b). Se ha descrito que, al menos en células endoteliales, en condiciones de estimulación angiogénica es la proteína Nucleolina sintetizada *de novo* en el citoplasma la que se transporta a la superficie celular (Hovanessian et al., 2010). Dicho transporte requiere la activación de varias rutas de señalización, la fosforilación de Nucleolina por CK2 y su interacción con la Miosina 9 (Ding et al., 2012). Sin embargo, nuestros resultados, así como publicaciones previas, también muestran que Ptn se localiza en el núcleo (Figura 51, Blondet et al., 2005; Koutsoumpa et al., 2013; Mitsiadis et al., 1995). Es interesante destacar que Nucleolina se ha implicado en la translocación nuclear de Ptn y Mdk (Koutsoumpa et al., 2012a; Shibata et al., 2002). Curiosamente, la entrada al núcleo de Ptn mediada por Nucleolina es importante para la migración de células endoteliales (Huang et al., 2006; Koutsoumpa et al., 2012a) y la presencia de nucleolina en la superficie celular se ha relacionado con la diferenciación neuronal (Kibbey et al., 1995) y de células del epitelio intestinal (Turck et al., 2005), así como con las uniones neuromusculares (Alete et al., 2006). Además, la estimulación de Nucleolina con ligandos extracelulares se ha relacionado a su vez con la liberación de calcio y con la señalización mediada por calcio (Losfeld et al., 2008), proceso importante en varios modelos de diferenciación, incluida la neurogénesis (Jaskova et al., 2012). Por tanto, la entrada de Ptn en la célula mediada por la proteína Nucleolina, junto a la activación de otros procesos de señalización celular, parece importante en varios modelos de

diferenciación celular. Es interesante que la proteína Lyar (también aislada en el escrutinio de dos híbridos con Brd2) interacciona con Nucleolina impidiendo su procesamiento proteolítico, lo que es esencial para el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación de células troncales (Li et al., 2009).

Los experimentos de electroporación de la región dorsal del tubo neural del embrión de pollo confirman el antagonismo entre Ptn y Brd2 en la migración de células de la cresta neural (Figura 56). El efecto negativo de la sobreexpresión de Ptn en la migración de células de la cresta neural podría deberse a la disminución del nivel de expresión del gen *CcnD1* debida a la interferencia de Ptn con la función de Brd2. Curiosamente, la estimulación exógena con AR, que induce la expresión de *Ptn* en células P19 (Brunet de Carvalho et al., 2003), alarga la duración de la fase G1 en células de la cresta neural de pollo e incrementa su tasa de proliferación y retención (Salvarezza y Rovasio, 1997). Por otro lado, se ha propuesto un papel de Mdk, a través de su interacción con el receptor Alk, en la proliferación de las neuronas inmaduras de los ganglios simpáticos, derivadas de la cresta neural, de manera que la interferencia con la señalización de Alk afecta negativamente al tamaño de estos ganglios (Reiff et al., 2011). Estos resultados, unidos al patrón de expresión de *Ptn* y *Mdk* en células asociadas con la cresta neural (Figura 54), sugieren una función de Ptn/Mdk en la formación de la cresta, aparentemente en contradicción con la inhibición que ejerce la sobreexpresión de Ptn en el proceso de migración (Figura 56). Por lo tanto, el antagonismo Ptn-Brd2 en la cresta neural puede contemplarse como un mecanismo de modulación en la función de ambas proteínas que no conlleva la inhibición total de la función de una o de la otra. Así, este antagonismo podría estar implicado en mantener el dinamismo y la fuente de la cresta, ya que la pérdida de células por delaminación debe compensarse con el aporte de nuevas células proliferativas de zonas dorso-laterales vecinas (Kalcheim y Burstyn-Cohen, 2005). De hecho, Ptn es esencial para la retención y la autorrenovación de una población adecuada de células troncales hematopoyéticas en el nicho vascular de la médula ósea (Himburg et al., 2012). Curiosamente, existen similitudes entre la cresta neural y el sistema hematopoyético, ya que en ambos casos, a partir de poblaciones originalmente reducidas pero con capacidad de autorrenovación, se originan amplias poblaciones de distintos tipos celulares que se dispersan por diversos órganos (Le Douarin et al., 2008).

La importancia de Brd2 en el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados se refleja también en los defectos en el desarrollo del tubo neural, como defectos en el cierre dorsal del tubo, asociados a la mutación de *Brd2* en ratones (Gyuris et al., 2009;

Shang et al., 2009, y en el déficit de neuronas GABAérgicas en modelos adultos de ratón con niveles reducidos de Brd2 (Shang et al., 2011). Sin embargo, debido a la importancia de Brd2 durante la proliferación, la temprana muerte de embriones *knock outs* para el gen *Brd2* (alrededor de los 11 días dpc) complica el estudio funcional de Brd2 en los procesos de diferenciación neuronal y migración de la cresta neural (Gyuris et al., 2009; Shang et al., 2009). En este sentido, el análisis de *knock outs* condicionales podría arrojar luz sobre estos procesos. Recientemente se ha publicado que la falta de Brd2 en ratones se traduce en un déficit de neurogénesis en el tubo neural debido a una mayor proliferación de los progenitores (Tsume et al., 2012), lo que parece discrepar con publicaciones anteriores y con nuestros resultados. Una posible explicación a los efectos observados en los ratones analizados por Tsume y colaboradores podría encontrarse en la existencia de efectos polares asociados a la estrategia de mutación.

Se ha señalado anteriormente que la redundancia funcional existente entre las proteínas Ptn y Mdk podría explicar la viabilidad y la ausencia de defectos importantes en el fenotipo de ratones carentes de una u otra proteína (Muramatsu et al., 2006), ya que la pérdida conjunta de ambas compromete seriamente la viabilidad de los ratones (dos terceras partes no llegan a nacer y los que nacen muestran una reducción significativa de tamaño y defectos en la actividad motora, en el desarrollo del tubo digestivo y del sistema auditivo) (Muramatsu et al., 2006). La pérdida de Ptn conlleva algunos defectos en el sistema nervioso (defectos en el procesamiento de las señales nociceptivas a nivel de la médula espinal y defectos en la memoria o en la regulación de la ansiedad (Amet et al., 2001; Gramage y Herradon, 2010; Himburg et al., 2012; Nakamura et al., 1998). Sin embargo, se ha descrito que la mutación de *Ptn* en ratones se traduce en un aumento del número de células en la corteza motora, debido a un retraso en el proceso de neurogénesis (Hienola et al., 2004). Probablemente este efecto, sin graves consecuencias fenotípicas para el ratón adulto, sugiere una ausencia de redundancia funcional, al menos temporalmente, y sugiere un papel de Ptn en interferir con el ciclo celular, apoyando nuestra hipótesis de un antagonismo con Brd2. Por otro lado, mutaciones en el gen que codifica la proteína Nipbl (que se aisló en el escrutinio de dos híbridos con Brd2) se han relacionado con el síndrome de Cornelia de Lange, que implica malformaciones faciales y de las extremidades, defectos en el desarrollo del sistema nervioso y del sistema digestivo, así como otros rasgos fenotípicos que afectan también a estructuras en cuyo desarrollo se han implicado Brd2 y/o Ptn (Liu y Banyam, 2010). La proteína Nipbl se ha implicado en la carga de las cohesinas, proceso esencial para la mitosis y la reparación del DNA y

recientemente implicado en la regulación transcripcional mediante la interacción de las cohesinas con el complejo Mediator (Kagey et al., 2010; Oka et al., 2011). De hecho, Nipbl interacciona con otras proteínas implicadas en la regulación transcripcional, como las desacetilasas de histonas HDAC1 y HDAC3 (Jahnke et al., 2008). A su vez, la diferenciación de células eritroides induce la asociación de Nipbl y cohesinas con regiones reguladoras distantes, importantes para la activación transcripcional de los genes de las globinas (Chien et al., 2011), y la función de Nipbl se ha asociado también al proceso de la migración de axones en neuronas (Seitan et al., 2006). Se han descrito por separado funciones de Brd2 y Ptn en otros sistemas en los que no se vería reflejado un antagonismo. Por ejemplo, Ptn inhibe la diferenciación de pre-adipocitos (Gu et al., 2007), al igual que Brd2 (Wang et al., 2009). A su vez, tanto Ptn (Achour et al., 2009) como Brd2 (Belkina et al., 2013) son importantes para la expresión de citoquinas inflamatorias por células de la sangre. Por lo tanto, o bien las funciones de ambas proteínas en estos sistemas son independientes, o la interacción entre ambas no siempre se traduce en un antagonismo.

Por lo tanto, parece que la interacción funcional entre Brd2 y la familia de proteínas Ptn/Mdk podría haber evolucionado en metazoos como un mecanismo de modulación de la función de uno de los miembros de la familia BET, importante para el desarrollo y la organogénesis.



## 5. CONCLUSIONES

1. Los bromodominios de la proteína Brd2 no son suficientes para la asociación de ésta con los cromosomas mitóticos.
2. Una región conservada de unos 40 aminoácidos, designada como motivo B y situada entre el segundo bromodominio y el dominio ET de las proteínas BET, es necesaria para la asociación de éstas con los cromosomas mitóticos y el reconocimiento correcto de la cromatina acetilada.
3. El motivo B muestra una estructura en *coiled coil* y permite la interacción entre proteínas BET, sugiriendo que dicho motivo constituye un dominio de homo- y heterodimerización entre proteínas BET.
4. La sobreexpresión de Brd2 interfiere con el proceso de diferenciación neuronal, probablemente debido a que un exceso de Brd2 mantiene niveles elevados de ciclinas D1 y A2.
5. Tanto la interferencia con la neurogénesis como el efecto sobre los niveles de ciclinas, asociados ambos con la sobreexpresión de Brd2, dependen de la integridad del motivo B.
6. La proteína Pleiotrofina interacciona selectivamente con Brd2 y no con otros miembros de la familia BET de vertebrados, ya que la interacción depende de una región ácida presente exclusivamente en Brd2.
7. La interacción entre Brd2 y Pleiotrofina conduce a un antagonismo funcional en el proceso de neurogénesis. De este modo, en células P19, la inducción de la diferenciación neuronal dispara la síntesis de Pleiotrofina, que anula el efecto de interferencia con la neurogénesis ejercido por Brd2.
8. El antagonismo entre Pleiotrofina y Brd2 también se manifiesta en el tubo neural embrionario, tanto en el proceso de neurogénesis en el neuroepitelio como en el proceso de migración de la cresta neural. En este caso, la sobreexpresión de Pleiotrofina interfiere con el proceso de migración, que puede ser restaurado mediante la sobreexpresión de Brd2.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahlstrom, J. D. and C. A. Erickson (2009). "New views on the neural crest epithelial-mesenchymal transition and neuroepithelial interkinetic nuclear migration." Commun Integr Biol **2**(6): 489-93.
- Ahlstrom, J. D. and C. A. Erickson (2009). "The neural crest epithelial-mesenchymal transition in 4D: a 'tail' of multiple non-obligatory cellular mechanisms." Development **136**(11): 1801-12.
- Alexandre, P., A. M. Reugels, et al. "Neurons derive from the more apical daughter in asymmetric divisions in the zebrafish neural tube." Nat Neurosci **13**(6): 673-9.
- Amet, L. E., S. E. Lauri, et al. (2001). "Enhanced hippocampal long-term potentiation in mice lacking heparin-binding growth-associated molecule." Mol Cell Neurosci **17**(6): 1014-24.
- Arai, Y., J. N. Pulvers, et al. "Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production." Nat Commun **2**: 154.
- Aybar, M. J. and R. Mayor (2002). "Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick." Curr Opin Genet Dev **12**(4): 452-8.
- Baer, A. S., Y. A. Syed, et al. (2009). "Myelin-mediated inhibition of oligodendrocyte precursor differentiation can be overcome by pharmacological modulation of Fyn-RhoA and protein kinase C signalling." Brain **132**(Pt 2): 465-81.
- Bang, A. G., N. Papalopulu, et al. (1999). "Expression of Pax-3 in the lateral neural plate is dependent on a Wnt-mediated signal from posterior nonaxial mesoderm." Dev Biol **212**(2): 366-80.
- Basille-Dugay, M., M. M. Hamza, et al. "Spatio-temporal characterization of the pleiotrophinergic system in mouse cerebellum: Evidence for its key role during ontogenesis." Exp Neurol.
- Batsche, E., P. Moschopoulos, et al. (2005). "Retinoblastoma and the related pocket protein p107 act as coactivators of NeuroD1 to enhance gene transcription." J Biol Chem **280**(16): 16088-95.
- Baye, L. M. and B. A. Link (2007). "The disarrayed mutation results in cell cycle and neurogenesis defects during retinal development in zebrafish." BMC Dev Biol **7**: 28.

- Beck, S., I. Hanson, et al. (1992). "A homologue of the *Drosophila* female sterile homeotic (*fsh*) gene in the class II region of the human MHC." DNA Seq **2**(4): 203-10.
- Belkina, A. C., B. S. Nikolajczyk, et al. "BET Protein Function Is Required for Inflammation: Brd2 Genetic Disruption and BET Inhibitor JQ1 Impair Mouse Macrophage Inflammatory Responses." J Immunol **190**(7): 3670-8.
- Berkovits, B. D., L. Wang, et al. "The testis-specific double bromodomain-containing protein BRDT forms a complex with multiple spliceosome components and is required for mRNA splicing and 3'-UTR truncation in round spermatids." Nucleic Acids Res **40**(15): 7162-75.
- Berkovits, B. D. and D. J. Wolgemuth "The first bromodomain of the testis-specific double bromodomain protein Brdt is required for chromocenter organization that is modulated by genetic background." Dev Biol **360**(2): 358-68.
- Bernard-Pierrot, I., J. Delbe, et al. (2001). "The lysine-rich C-terminal tail of heparin affin regulatory peptide is required for mitogenic and tumor formation activities." J Biol Chem **276**(15): 12228-34.
- Berthet, C., E. Aleem, et al. (2003). "Cdk2 knockout mice are viable." Curr Biol **13**(20): 1775-85.
- Besson, A., M. Gurian-West, et al. (2004). "p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation." Genes Dev **18**(8): 862-76.
- Blomen, V. A. and J. Boonstra (2007). "Cell fate determination during G1 phase progression." Cell Mol Life Sci **64**(23): 3084-104.
- Boonstra, J. (2003). "Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle." J Cell Biochem **90**(2): 244-52.
- Brunet-de Carvalho, N., D. Raulais, et al. (2003). "HB-GAM/Pleiotrophin and Midkine are differently expressed and distributed during retinoic acid-induced neural differentiation of P19 cells." Growth Factors **21**(3-4): 139-49.
- Budirahardja, Y. and P. Gonczy (2009). "Coupling the cell cycle to development." Development **136**(17): 2861-72.
- Burstyn-Cohen, T., J. Stanleigh, et al. (2004). "Canonical Wnt activity regulates trunk neural crest delamination linking BMP/noggin signaling with G1/S transition."

Development **131**(21): 5327-39.

Caldon, C. E., R. L. Sutherland, et al. (2010). "Cell cycle proteins in epithelial cell differentiation: implications for breast cancer." Cell Cycle **9**(10): 1918-28.

Calegari, F., W. Haubensak, et al. (2005). "Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development." J Neurosci **25**(28): 6533-8.

Calegari, F. and W. B. Huttner (2003). "An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis." J Cell Sci **116**(Pt 24): 4947-55.

Carreras, E., S. Turner, et al. "Estrogen receptor signaling promotes dendritic cell differentiation by increasing expression of the transcription factor IRF4." Blood **115**(2): 238-46.

Cavalleri, G. L., N. M. Walley, et al. (2007). "A multicenter study of BRD2 as a risk factor for juvenile myoclonic epilepsy." Epilepsia **48**(4): 706-12.

Chauhan, A. K., Y. S. Li, et al. (1993). "Pleiotrophin transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 679-82.

Cheng, T., N. Rodrigues, et al. (2000). "Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1." Science **287**(5459): 1804-8.

Chenn, A. and S. K. McConnell (1995). "Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis." Cell **82**(4): 631-41.

Chenn, A., Y. A. Zhang, et al. (1998). "Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells." Mol Cell Neurosci **11**(4): 183-93.

Chu, C. and D. S. Kohtz (2001). "Identification of the E2A gene products as regulatory targets of the G1 cyclin-dependent kinases." J Biol Chem **276**(11): 8524-34.

Chua, Y. L., S. Channeliere, et al. (2005). "The bromodomain protein GTE6 controls leaf development in Arabidopsis by histone acetylation at ASYMMETRIC LEAVES1." Genes Dev **19**(18): 2245-54.

Coats, S., W. M. Flanagan, et al. (1996). "Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle." Science **272**(5263): 877-80.

- Cobrinik, D. (2005). "Pocket proteins and cell cycle control." Oncogene **24**(17): 2796-809.
- Coller, H. A., L. Sang, et al. (2006). "A new description of cellular quiescence." PLoS Biol **4**(3): e83.
- Cremisi, F., A. Philpott, et al. (2003). "Cell cycle and cell fate interactions in neural development." Curr Opin Neurobiol **13**(1): 26-33.
- Cross, F. R., N. E. Buchler, et al. "Evolution of networks and sequences in eukaryotic cell cycle control." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **366**(1584): 3532-44.
- Crowley, T., M. Brunori, et al. (2004). "Change in nuclear-cytoplasmic localization of a double-bromodomain protein during proliferation and differentiation of mouse spinal cord and dorsal root ganglia." Brain Res Dev Brain Res **149**(2): 93-101.
- Crowley, T. E., E. M. Kaine, et al. (2002). "Reproductive cycle regulation of nuclear import, euchromatic localization, and association with components of Pol II mediator of a mammalian double-bromodomain protein." Mol Endocrinol **16**(8): 1727-37.
- Dawson, M. A., R. K. Prinjha, et al. "Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia." Nature **478**(7370): 529-33.
- Della Rovere, F., C. A. Airoidi, et al. "The Arabidopsis BET bromodomain factor GTE4 regulates the mitotic cell cycle." Plant Signal Behav **5**(6): 677-80.
- Denis, G. V. and M. R. Green (1996). "A novel, mitogen-activated nuclear kinase is related to a Drosophila developmental regulator." Genes Dev **10**(3): 261-71.
- Denis, G. V., M. E. McComb, et al. (2006). "Identification of transcription complexes that contain the double bromodomain protein Brd2 and chromatin remodeling machines." J Proteome Res **5**(3): 502-11.
- Denis, G. V., C. Vaziri, et al. (2000). "RING3 kinase transactivates promoters of cell cycle regulatory genes through E2F." Cell Growth Differ **11**(8): 417-24.
- Dey, A., F. Chitsaz, et al. (2003). "The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 8758-63.
- Dey, A., J. Ellenberg, et al. (2000). "A bromodomain protein, MCAP, associates with

- mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition." Mol Cell Biol **20**(17): 6537-49.
- DiCicco-Bloom, E., E. Townes-Anderson, et al. (1990). "Neuroblast mitosis in dissociated culture: regulation and relationship to differentiation." J Cell Biol **110**(6): 2073-86.
- Drayson, M. T., R. H. Michell, et al. (2001). "Cell proliferation and CD11b expression are controlled independently during HL60 cell differentiation initiated by 1,25 alpha-dihydroxyvitamin D(3) or all-trans-retinoic acid." Exp Cell Res **266**(1): 126-34.
- Dreyfus, J., N. Brunet-de Carvalho, et al. (1998). "HB-GAM/pleiotrophin: localization of mRNA and protein in the chicken developing leg." Int J Dev Biol **42**(2): 189-98.
- Dupin, E. and L. Sommer "Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood." Dev Biol **366**(1): 83-95.
- Durand, B., F. B. Gao, et al. (1997). "Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation." EMBO J **16**(2): 306-17.
- Erhardt, J. A. and R. N. Pittman (1998). "Ectopic p21(WAF1) expression induces differentiation-specific cell cycle changes in PC12 cells characteristic of nerve growth factor treatment." J Biol Chem **273**(36): 23517-23.
- Ezhevsky, S. A., A. Ho, et al. (2001). "Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G(1) cyclin-dependent kinase complexes in vivo." Mol Cell Biol **21**(14): 4773-84.
- Fantl, V., G. Stamp, et al. (1995). "Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development." Genes Dev **9**(19): 2364-72.
- Farah, M. H., J. M. Olson, et al. (2000). "Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells." Development **127**(4): 693-702.
- Farina, A., M. Hattori, et al. (2004). "Bromodomain protein Brd4 binds to GTPase-activating SPA-1, modulating its activity and subcellular localization." Mol Cell Biol **24**(20): 9059-69.
- Filippakopoulos, P. and S. Knapp "The bromodomain interaction module." FEBS Lett **586**(17): 2692-704.

- Florence, B. and D. V. Faller (2001). "You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators." Front Biosci **6**: D1008-18.
- Follmer, N. E. and N. J. Francis (2011). "Speed reading for genes: bookmarks set the pace." Dev Cell **21**(5): 807-8.
- Fu, M., M. Rao, et al. (2005). "Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment." J Biol Chem **280**(17): 16934-41.
- Fu, M., C. Wang, et al. (2004). "Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions." Endocrinology **145**(12): 5439-47.
- Fukazawa, H. and A. Masumi "The conserved 12-amino acid stretch in the inter-bromodomain region of BET family proteins functions as a nuclear localization signal." Biol Pharm Bull **35**(11): 2064-8.
- Gallant, M., C. Beaulieu, et al. "Discovery of MK-7246, a selective CRTH2 antagonist for the treatment of respiratory diseases." Bioorg Med Chem Lett **21**(1): 288-93.
- Gammill, L. S. and J. Roffers-Agarwal "Division of labor during trunk neural crest development." Dev Biol **344**(2): 555-65.
- Gamsjaeger, R., S. R. Webb, et al. "Structural basis and specificity of acetylated transcription factor GATA1 recognition by BET family bromodomain protein Brd3." Mol Cell Biol **31**(13): 2632-40.
- Ganter, B., S. Fu, et al. (1998). "D-type cyclins repress transcriptional activation by the v-Myb but not the c-Myb DNA-binding domain." EMBO J **17**(1): 255-68.
- Garcia-Castro, M. I., C. Marcelle, et al. (2002). "Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer." Science **297**(5582): 848-51.
- Garcia-Dominguez, M., C. Poquet, et al. (2003). "Ebf gene function is required for coupling neuronal differentiation and cell cycle exit." Development **130**(24): 6013-25.
- Gaucher, J., F. Boussouar, et al. "Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt." EMBO J **31**(19): 3809-20.
- Gaudet, D. A., Y. Wang, et al. "Low temperature induced defence gene expression in winter wheat in relation to resistance to snow moulds and other wheat

- diseases." Plant Sci **180**(1): 99-110.
- Gervais, F. G., N. Sawyer, et al. "Pharmacological characterization of MK-7246, a potent and selective CRTH2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T-helper type 2 cells) antagonist." Mol Pharmacol **79**(1): 69-76.
- Gotz, M. and W. B. Huttner (2005). "The cell biology of neurogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(10): 777-88.
- Goukassian, D., A. Diez-Juan, et al. (2001). "Overexpression of p27(Kip1) by doxycycline-regulated adenoviral vectors inhibits endothelial cell proliferation and migration and impairs angiogenesis." FASEB J **15**(11): 1877-85.
- Gramage, E. and G. Herradon "Genetic deletion of pleiotrophin leads to disruption of spinal nociceptive transmission: evidence for pleiotrophin modulation of morphine-induced analgesia." Eur J Pharmacol **647**(1-3): 97-102.
- Greenwald, R. J., J. R. Tumang, et al. (2004). "E mu-BRD2 transgenic mice develop B-cell lymphoma and leukemia." Blood **103**(4): 1475-84.
- Gross, I., B. Lhermitte, et al. (2005). "Phosphorylation of the homeotic tumor suppressor Cdx2 mediates its ubiquitin-dependent proteasome degradation." Oncogene **24**(54): 7955-63.
- Guo, N., D. V. Faller, et al. (2000). "Activation-induced nuclear translocation of RING3." J Cell Sci **113** ( Pt 17): 3085-91.
- Guo, N., D. V. Faller, et al. (2000). "Activation-induced nuclear translocation of RING3." J Cell Sci **113** ( Pt 17): 3085-91.
- Gyuris, A., D. J. Donovan, et al. (2009). "The chromatin-targeting protein Brd2 is required for neural tube closure and embryogenesis." Biochim Biophys Acta **1789**(5): 413-21.
- Hampton, B. S., D. R. Marshak, et al. (1992). "Structural and functional characterization of full-length heparin-binding growth associated molecule." Mol Biol Cell **3**(1): 85-93.
- Harvat, B. L., A. Wang, et al. (1998). "Up-regulation of p27Kip1, p21WAF1/Cip1 and p16Ink4a is associated with, but not sufficient for, induction of squamous differentiation." J Cell Sci **111** ( Pt 9): 1185-96.

- Hassan, A. H., S. Awad, et al. (2007). "Selective recognition of acetylated histones by bromodomains in transcriptional co-activators." Biochem J **402**(1): 125-33.
- Hatziapostolou, M., J. Delbe, et al. (2005). "Heparin affin regulatory peptide is a key player in prostate cancer cell growth and angiogenicity." Prostate **65**(2): 151-8.
- Hienola, A., M. Pekkanen, et al. (2004). "HB-GAM inhibits proliferation and enhances differentiation of neural stem cells." Mol Cell Neurosci **26**(1): 75-88.
- Hindley, C. and A. Philpott "Co-ordination of cell cycle and differentiation in the developing nervous system." Biochem J **444**(3): 375-82.
- Houzelstein, D., S. L. Bullock, et al. (2002). "Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4." Mol Cell Biol **22**(11): 3794-802.
- Hsieh, J. K., D. Kletsas, et al. (2000). "p53, p21(WAF1/CIP1), and MDM2 involvement in proliferation and apoptosis in an in vitro model of conditionally immortalized human vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(3): 636-44.
- Huang, B., X. D. Yang, et al. (2009). "Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA." Mol Cell Biol **29**(5): 1375-87.
- Huang, D. H. and I. B. Dawid (1990). "The maternal-effect gene fsh is essential for the specification of the central region of the Drosophila embryo." New Biol **2**(2): 163-70.
- Huang, H., J. Zhang, et al. (2007). "Solution structure of the second bromodomain of Brd2 and its specific interaction with acetylated histone tails." BMC Struct Biol **7**: 57.
- Huard, J. M., C. C. Forster, et al. (1999). "Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2." Development **126**(9): 1927-35.
- Iaquinta, P. J. and J. A. Lees (2007). "Life and death decisions by the E2F transcription factors." Curr Opin Cell Biol **19**(6): 649-57.
- Imai, S., T. J. Heino, et al. (2009). "Osteocyte-derived HB-GAM (pleiotrophin) is associated with bone formation and mechanical loading." Bone **44**(5): 785-94.
- Ishii, H., K. Mimori, et al. (2005). "Differentially expressed genes in endothelial

- differentiation." DNA Cell Biol **24**(7): 432-7.
- Ito, T., T. Umehara, et al. (2011). "Real-time imaging of histone H4K12-specific acetylation determines the modes of action of histone deacetylase and bromodomain inhibitors." Chem Biol **18**(4): 495-507.
- Iwasaki, W., K. Nagata, et al. (1997). "Solution structure of midkine, a new heparin-binding growth factor." EMBO J **16**(23): 6936-46.
- Jang, M. K., K. Mochizuki, et al. (2005). "The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription." Mol Cell **19**(4): 523-34.
- Jin, L., C. Jianghai, et al. (2009). "Pleiotrophin and peripheral nerve injury." Neurosurg Rev **32**(4): 387-93.
- Jones-Villeneuve, E. M., M. W. McBurney, et al. (1982). "Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells." J Cell Biol **94**(2): 253-62.
- Jones-Villeneuve, E. M., M. A. Rudnicki, et al. (1983). "Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells." Mol Cell Biol **3**(12): 2271-9.
- Joseph, B., A. Wallen-Mackenzie, et al. (2003). "p57(Kip2) cooperates with Nurr1 in developing dopamine cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15619-24.
- Kadauke, S., M. I. Udugama, et al. (2012). "Tissue-specific mitotic bookmarking by hematopoietic transcription factor GATA1." Cell **150**(4): 725-37.
- Kadomatsu, K. and T. Muramatsu (2004). "Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer." Cancer Lett **204**(2): 127-43.
- Kaldis, P. (1999). "The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals." Cell Mol Life Sci **55**(2): 284-96.
- Kanno, T., Y. Kanno, et al. (2004). "Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells." Mol Cell **13**(1): 33-43.
- Kanno, T., Y. Kanno, et al. (2004). "Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells." Mol Cell **13**(1): 33-43.
- Kawauchi, T., K. Chihama, et al. (2006). "Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1 contributing to actin organization and cortical neuronal migration." Nat Cell Biol

8(1): 17-26.

Kessarlis, N., N. Pringle, et al. (2008). "Specification of CNS glia from neural stem cells in the embryonic neuroepithelium." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **363**(1489): 71-85.

Kilpelainen, I., M. Kaksonen, et al. (2000). "Heparin-binding growth-associated molecule contains two heparin-binding beta -sheet domains that are homologous to the thrombospondin type I repeat." J Biol Chem **275**(18): 13564-70.

Kinnunen, A., T. Kinnunen, et al. (1998). "N-syndecan and HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule) associate with early axonal tracts in the rat brain." Eur J Neurosci **10**(2): 635-48.

Kockmann, T., M. Gerstung, et al. "The BET protein FSH functionally interacts with ASH1 to orchestrate global gene activity in Drosophila." Genome Biol **14**(2): R18.

Korenjak, M. and A. Brehm (2005). "E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development." Curr Opin Genet Dev **15**(5): 520-7.

Kosodo, Y., K. Roper, et al. (2004). "Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells." EMBO J **23**(11): 2314-24.

Koutsioumpa, M., G. Drosou, et al. "Pleiotrophin expression and role in physiological angiogenesis in vivo: potential involvement of nucleolin." Vasc Cell **4**: 4.

Koutsioumpa, M., C. Polytarchou, et al. "Interplay between alphavbeta3 integrin and nucleolin regulates human endothelial and glioma cell migration." J Biol Chem **288**(1): 343-54.

Kowalczyk, A., R. K. Filipkowski, et al. (2004). "The critical role of cyclin D2 in adult neurogenesis." J Cell Biol **167**(2): 209-13.

Kozar, K., M. A. Ciemerych, et al. (2004). "Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins." Cell **118**(4): 477-91.

Krispin, S., E. Nitzan, et al. "Evidence for a dynamic spatiotemporal fate map and early fate restrictions of premigratory avian neural crest." Development **137**(4): 585-

- Kruhlak, M. J., M. J. Hendzel, et al. (2001). "Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin." J Biol Chem **276**(41): 38307-19.
- Krull, C. E. (2001). "Segmental organization of neural crest migration." Mech Dev **105**(1-2): 37-45.
- Kulesa, P. M., F. Lefcort, et al. (2009). "The migration of autonomic precursor cells in the embryo." Auton Neurosci **151**(1): 3-9.
- Lacomme, M., L. Liaubet, et al. "NEUROG2 drives cell cycle exit of neuronal precursors by specifically repressing a subset of cyclins acting at the G1 and S phases of the cell cycle." Mol Cell Biol **32**(13): 2596-607.
- Lamb, J., S. Ramaswamy, et al. (2003). "A mechanism of cyclin D1 action encoded in the patterns of gene expression in human cancer." Cell **114**(3): 323-34.
- Lamonica, J. M., W. Deng, et al. "Bromodomain protein Brd3 associates with acetylated GATA1 to promote its chromatin occupancy at erythroid target genes." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(22): E159-68.
- Lange, C., W. B. Huttner, et al. (2009). "Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors." Cell Stem Cell **5**(3): 320-31.
- Le Douarin, N. M., G. W. Calloni, et al. (2008). "The stem cells of the neural crest." Cell Cycle **7**(8): 1013-9.
- LeCouter, J. E., B. Kablar, et al. (1998). "Strain-dependent embryonic lethality in mice lacking the retinoblastoma-related p130 gene." Development **125**(23): 4669-79.
- Lee, E. Y., N. Hu, et al. (1994). "Dual roles of the retinoblastoma protein in cell cycle regulation and neuron differentiation." Genes Dev **8**(17): 2008-21.
- LeRoy, G., B. Rickards, et al. (2008). "The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription." Mol Cell **30**(1): 51-60.
- Lewis, J. L., J. Bonner, et al. (2004). "Reiterated Wnt signaling during zebrafish neural crest development." Development **131**(6): 1299-308.
- Lewis, K. E. (2006). "How do genes regulate simple behaviours? Understanding how

- different neurons in the vertebrate spinal cord are genetically specified." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1465): 45-66.
- Li, Y. S., P. G. Milner, et al. (1990). "Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity." Science **250**(4988): 1690-4.
- Liedtke, D. and C. Winkler (2008). "Midkine-b regulates cell specification at the neural plate border in zebrafish." Dev Dyn **237**(1): 62-74.
- Lindqvist, A., V. Rodriguez-Bravo, et al. (2009). "The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network." J Cell Biol **185**(2): 193-202.
- Lipinski, M. M. and T. Jacks (1999). "The retinoblastoma gene family in differentiation and development." Oncogene **18**(55): 7873-82.
- Liu, Y., X. Wang, et al. (2008). "Structural basis and binding properties of the second bromodomain of Brd4 with acetylated histone tails." Biochemistry **47**(24): 6403-17.
- Lukaszewicz, A. I. and D. J. Anderson "Cyclin D1 promotes neurogenesis in the developing spinal cord in a cell cycle-independent manner." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(28): 11632-7.
- Maeda, N., K. Ichihara-Tanaka, et al. (1999). "A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta." J Biol Chem **274**(18): 12474-9.
- Maeda, N. and M. Noda (1998). "Involvement of receptor-like protein tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta and its ligand pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in neuronal migration." J Cell Biol **142**(1): 203-16.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2001). "To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer." Nat Rev Cancer **1**(3): 222-31.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2005). "Mammalian cyclin-dependent kinases." Trends Biochem Sci **30**(11): 630-41.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing

- paradigm." Nat Rev Cancer **9**(3): 153-66.
- Martinez-Balbas, M. A., A. Dey, et al. (1995). "Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin." Cell **83**(1): 29-38.
- Maruyama, T., A. Farina, et al. (2002). "A Mammalian bromodomain protein, brd4, interacts with replication factor C and inhibits progression to S phase." Mol Cell Biol **22**(18): 6509-20.
- Matangkasombut, O., R. M. Buratowski, et al. (2000). "Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID." Genes Dev **14**(8): 951-62.
- Matsubara, S., M. Take, et al. (1994). "Mapping and characterization of a retinoic acid-responsive enhancer of midkine, a novel heparin-binding growth/differentiation factor with neurotrophic activity." J Biochem **115**(6): 1088-96.
- Matsumura, I., J. Ishikawa, et al. (1997). "Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakaryoblastic leukemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21(WAF1/Cip1) by STAT5." Mol Cell Biol **17**(5): 2933-43.
- Matsuura, O., K. Kadomatsu, et al. (2002). "Midkine expression is associated with postnatal development of the lungs." Cell Struct Funct **27**(2): 109-15.
- Matushansky, I., F. Radparvar, et al. (2000). "Manipulating the onset of cell cycle withdrawal in differentiated erythroid cells with cyclin-dependent kinases and inhibitors." Blood **96**(8): 2755-64.
- Mayol, X. and X. Grana (1998). "The p130 pocket protein: keeping order at cell cycle exit/re-entrance transitions." Front Biosci **3**: d11-24.
- McBurney, M. W., E. M. Jones-Villeneuve, et al. (1982). "Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line." Nature **299**(5879): 165-7.
- McClellan, K. A. and R. S. Slack (2006). "Novel functions for cell cycle genes in nervous system development." Cell Cycle **5**(14): 1506-13.
- McConnell, S. K. (1988). "Development and decision-making in the mammalian cerebral cortex." Brain Res **472**(1): 1-23.
- Mertz, J. A., A. R. Conery, et al. "Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(40): 16669-74.

- Mi, S., R. H. Miller, et al. (2009). "Promotion of central nervous system remyelination by induced differentiation of oligodendrocyte precursor cells." Ann Neurol **65**(3): 304-15.
- Mikelis, C., E. Sfaelou, et al. (2009). "Integrin alpha(v)beta(3) is a pleiotrophin receptor required for pleiotrophin-induced endothelial cell migration through receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta." FASEB J **23**(5): 1459-69.
- Miller, J. P., N. Yeh, et al. (2007). "Interweaving the cell cycle machinery with cell differentiation." Cell Cycle **6**(23): 2932-8.
- Mitsiadis, T. A., M. Salmivirta, et al. (1995). "Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis." Development **121**(1): 37-51.
- Mittapalli, V. R., B. Christ, et al. (2009). "Pleiotrophin is expressed in avian somites and tendon anlagen." Histochem Cell Biol **132**(4): 413-22.
- Mizuseki, K., T. Sakamoto, et al. (2003). "Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5828-33.
- Mochizuki, K., A. Nishiyama, et al. (2008). "The bromodomain protein Brd4 stimulates G1 gene transcription and promotes progression to S phase." J Biol Chem **283**(14): 9040-8.
- Moll, R., E. Sievers, et al. (2009). "Endothelial and virgular cell formations in the mammalian lymph node sinus: endothelial differentiation morphotypes characterized by a special kind of junction (complexus adhaerens)." Cell Tissue Res **335**(1): 109-41.
- Monsoro-Burq, A. H., R. B. Fletcher, et al. (2003). "Neural crest induction by paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos requires FGF signals." Development **130**(14): 3111-24.
- Muchardt, C., J. C. Reyes, et al. (1996). "The hbrm and BRG-1 proteins, components of the human SNF/SWI complex, are phosphorylated and excluded from the condensed chromosomes during mitosis." Embo J **15**(13): 3394-402.
- Muramatsu, H., K. Zou, et al. (2000). "LDL receptor-related protein as a component of

- the midkine receptor." Biochem Biophys Res Commun **270**(3): 936-41.
- Muramatsu, H., P. Zou, et al. (2006). "Female infertility in mice deficient in midkine and pleiotrophin, which form a distinct family of growth factors." Genes Cells **11**(12): 1405-17.
- Muramatsu, T. (2002). "Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis." J Biochem **132**(3): 359-71.
- Nagashima, T., T. Maruyama, et al. (2007). "Histone acetylation and subcellular localization of chromosomal protein BRD4 during mouse oocyte meiosis and mitosis." Mol Hum Reprod **13**(3): 141-8.
- Nakamura, E., K. Kadomatsu, et al. (1998). "Disruption of the midkine gene (Mdk) resulted in altered expression of a calcium binding protein in the hippocampus of infant mice and their abnormal behaviour." Genes Cells **3**(12): 811-22.
- Nakamura, Y., T. Umehara, et al. (2007). "Crystal structure of the human BRD2 bromodomain: insights into dimerization and recognition of acetylated histone H4." J Biol Chem **282**(6): 4193-201.
- Neuman, E., M. H. Ladha, et al. (1997). "Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4." Mol Cell Biol **17**(9): 5338-47.
- Nguyen, L., A. Besson, et al. (2006). "p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex." Genes Dev **20**(11): 1511-24.
- Nishiyama, A., A. Dey, et al. (2006). "Brd4 is required for recovery from antimicrotubule drug-induced mitotic arrest: preservation of acetylated chromatin." Mol Biol Cell **17**(2): 814-23.
- Ortega, S., I. Prieto, et al. (2003). "Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice." Nat Genet **35**(1): 25-31.
- Ott, C. J., N. Kopp, et al. "BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia." Blood **120**(14): 2843-52.
- Paillisson, A., A. Levasseur, et al. (2007). "Bromodomain testis-specific protein is expressed in mouse oocyte and evolves faster than its ubiquitously expressed paralogs BRD2, -3, and -4." Genomics **89**(2): 215-23.

- Pao, P. C., N. K. Huang, et al. (2011). "A novel RING finger protein, Znf179, modulates cell cycle exit and neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells." Cell Death Differ **18**(11): 1791-804.
- Peng, J., W. Dong, et al. (2007). "Brd2 is a TBP-associated protein and recruits TBP into E2F-1 transcriptional complex in response to serum stimulation." Mol Cell Biochem **294**(1-2): 45-54.
- Perez-Pinera, P., S. Alcantara, et al. (2006). "Pleiotrophin disrupts calcium-dependent homophilic cell-cell adhesion and initiates an epithelial-mesenchymal transition." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(47): 17795-800.
- Pilaz, L. J., D. Patti, et al. (2009). "Forced G1-phase reduction alters mode of division, neuron number, and laminar phenotype in the cerebral cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(51): 21924-9.
- Piscione, T. D. and N. D. Rosenblum (2002). "The molecular control of renal branching morphogenesis: current knowledge and emerging insights." Differentiation **70**(6): 227-46.
- Pollok, B. A. and R. Heim (1999). "Using GFP in FRET-based applications." Trends Cell Biol **9**(2): 57-60.
- Qi, M., S. Ikematsu, et al. (2001). "Haptotactic migration induced by midkine. Involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta. Mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **276**(19): 15868-75.
- Quaroni, A., J. Q. Tian, et al. (2000). "p27(Kip1) is an inducer of intestinal epithelial cell differentiation." Am J Physiol Cell Physiol **279**(4): C1045-57.
- Rahman, S., M. E. Sowa, et al. "The Brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of pTEFb by recruiting multiple proteins, including NSD3." Mol Cell Biol **31**(13): 2641-52.
- Rane, S. G., P. Dubus, et al. (1999). "Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia." Nat Genet **22**(1): 44-52.
- Ratineau, C., M. W. Petry, et al. (2002). "Cyclin D1 represses the basic helix-loop-helix transcription factor, BETA2/NeuroD." J Biol Chem **277**(11): 8847-53.
- Raulo, E., M. A. Chernousov, et al. (1994). "Isolation of a neuronal cell surface receptor

- of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3)." J Biol Chem **269**(17): 12999-3004.
- Rauvala, H., R. Pihlaskari, et al. (1989). "Extracellular adhesive molecules in neurite growth." Biosci Rep **9**(1): 1-12.
- Reiff, T., L. Huber, et al. "Midkine and Alk signaling in sympathetic neuron proliferation and neuroblastoma predisposition." Development **138**(21): 4699-708.
- Reutens, A. T., M. Fu, et al. (2001). "Cyclin D1 binds the androgen receptor and regulates hormone-dependent signaling in a p300/CBP-associated factor (P/CAF)-dependent manner." Mol Endocrinol **15**(5): 797-811.
- Rhee, K., M. Brunori, et al. (1998). "Expression and potential role of Fsrp1, a murine bromodomain-containing homologue of the Drosophila gene female sterile homeotic." J Cell Sci **111** ( Pt 23): 3541-50.
- Rodriguez-Boulan, E. and W. J. Nelson (1989). "Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype." Science **245**(4919): 718-25.
- Rohrer, H. "Transcriptional control of differentiation and neurogenesis in autonomic ganglia." Eur J Neurosci **34**(10): 1563-73.
- Rohrer, H. and H. Thoenen (1987). "Relationship between differentiation and terminal mitosis: chick sensory and ciliary neurons differentiate after terminal mitosis of precursor cells, whereas sympathetic neurons continue to divide after differentiation." J Neurosci **7**(11): 3739-48.
- Rothman, T. P., M. D. Gershon, et al. (1978). "The relationship of cell division to the acquisition of adrenergic characteristics by developing sympathetic ganglion cell precursors." Dev Biol **65**(2): 322-41.
- Sage, J., G. J. Mulligan, et al. (2000). "Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization." Genes Dev **14**(23): 3037-50.
- Sakurai, H., K. T. Bush, et al. (2001). "Identification of pleiotrophin as a mesenchymal factor involved in ureteric bud branching morphogenesis." Development **128**(17): 3283-93.
- Santamaria, D., C. Barriere, et al. (2007). "Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle." Nature **448**(7155): 811-5.

- Santiago, A. and C. A. Erickson (2002). "Ephrin-B ligands play a dual role in the control of neural crest cell migration." Development **129**(15): 3621-32.
- Satyamoorthy, K., N. H. Chehab, et al. (2000). "Aberrant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells." Cell Growth Differ **11**(9): 467-74.
- Satyamoorthy, K., M. Oka, et al. (2000). "An antisense strategy for inhibition of human melanoma growth targets the growth factor pleiotrophin." Pigment Cell Res **13 Suppl 8**: 87-93.
- Satyanarayana, A. and P. Kaldis (2009). "Mammalian cell-cycle regulation: several Cdk, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms." Oncogene **28**(33): 2925-39.
- Schnepp, R. W. and J. M. Maris "Targeting MYCN: A Good BET for Improving Neuroblastoma Therapy?" Cancer Discov **3**(3): 255-7.
- Schoenwolf, G. C. and R. O. Kelley (1980). "Characterization of intercellular junctions in the caudal portion of the developing neural tube of the chick embryo." Am J Anat **158**(1): 29-41.
- Schwamborn, J. C., E. Berezikov, et al. (2009). "The TRIM-NHL protein TRIM32 activates microRNAs and prevents self-renewal in mouse neural progenitors." Cell **136**(5): 913-25.
- Shang, E., Q. Cui, et al. (2011). "The bromodomain-containing gene BRD2 is regulated at transcription, splicing, and translation levels." J Cell Biochem **112**(10): 2784-93.
- Shang, E., H. D. Nickerson, et al. (2007). "The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation." Development **134**(19): 3507-15.
- Shang, E., G. Salazar, et al. (2004). "Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brdt in the mouse testis." Gene Expr Patterns **4**(5): 513-9.
- Shang, E., X. Wang, et al. (2009). "Double bromodomain-containing gene Brd2 is essential for embryonic development in mouse." Dev Dyn **238**(4): 908-17.

- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev **13**(12): 1501-12.
- Shibata, Y., T. Muramatsu, et al. (2002). "Nuclear targeting by the growth factor midkine." Mol Cell Biol **22**(19): 6788-96.
- Shibata, Y., H. Takeshita, et al. "Double bromodomain protein BET-1 and MYST HATs establish and maintain stable cell fates in *C. elegans*." Development **137**(7): 1045-53.
- Sicinska, E., I. Aifantis, et al. (2003). "Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias." Cancer Cell **4**(6): 451-61.
- Sicinski, P., J. L. Donaher, et al. (1996). "Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis." Nature **384**(6608): 470-4.
- Sicinski, P., J. L. Donaher, et al. (1995). "Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast." Cell **82**(4): 621-30.
- Sinha, A., D. V. Faller, et al. (2005). "Bromodomain analysis of Brd2-dependent transcriptional activation of cyclin A." Biochem J **387**(Pt 1): 257-69.
- Sinha, A., D. V. Faller, et al. (2005). "Bromodomain analysis of Brd2-dependent transcriptional activation of cyclin A." Biochem J **387**(Pt 1): 257-69.
- Skapek, S. X., J. Rhee, et al. (1995). "Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase." Science **267**(5200): 1022-4.
- Smith, C. L. (2008). "A shifting paradigm: histone deacetylases and transcriptional activation." Bioessays **30**(1): 15-24.
- Smith, E. J., G. Leone, et al. (1996). "The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state." Mol Cell Biol **16**(12): 6965-76.
- Stoica, G. E., A. Kuo, et al. (2001). "Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin." J Biol Chem **276**(20): 16772-9.
- Sun, Y., S. K. Goderie, et al. (2005). "Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells." Neuron **45**(6): 873-86.

- Swiss, V. A. and P. Casaccia "Cell-context specific role of the E2F/Rb pathway in development and disease." Glia **58**(4): 377-90.
- Takahashi, K., T. Kobayashi, et al. (2000). "p57(Kip2) regulates the proper development of labyrinthine and spongiotrophoblasts." Mol Hum Reprod **6**(11): 1019-25.
- Tamir, A., T. Petrocelli, et al. (2000). "Stem cell factor inhibits erythroid differentiation by modulating the activity of G1-cyclin-dependent kinase complexes: a role for p27 in erythroid differentiation coupled G1 arrest." Cell Growth Differ **11**(5): 269-77.
- Tanaka, H., T. Yamashita, et al. (2002). "Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity." J Cell Biol **158**(2): 321-9.
- Tang, X. M., J. S. Beesley, et al. (1999). "Cell cycle arrest induced by ectopic expression of p27 is not sufficient to promote oligodendrocyte differentiation." J Cell Biochem **76**(2): 270-9.
- Taniguchi, Y., Y. Matsuzaka, et al. (1998). "Nucleotide sequence of the ring3 gene in the class II region of the mouse MHC and its abundant expression in testicular germ cells." Genomics **51**(1): 114-23.
- Taniguchi, Y., H. Suzuki, et al. (2001). "Isolation and characterization of three genes paralogous to mouse Ring3." Nucleic Acids Res Suppl(1): 247-8.
- Thorpe, K. L. and S. Beck (1998). "DNA sequence and structure of the mouse RING3 gene: identification of variant RING3 transcripts." Immunogenetics **48**(1): 82-6.
- Tiainen, M., D. Pajalunga, et al. (1996). "Terminally differentiated skeletal myotubes are not confined to G0 but can enter G1 upon growth factor stimulation." Cell Growth Differ **7**(8): 1039-50.
- Toyama, R., M. L. Rebert, et al. (2008). "Brd4 associates with mitotic chromosomes throughout early zebrafish embryogenesis." Dev Dyn **237**(6): 1636-44.
- Tsarovina, K., J. Schellenberger, et al. (2008). "Progenitor cell maintenance and neurogenesis in sympathetic ganglia involves Notch signaling." Mol Cell Neurosci **37**(1): 20-31.
- Tsutsui, T., B. Hesabi, et al. (1999). "Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27(Kip1) activity." Mol Cell Biol **19**(10): 7011-9.

- Vanderluit, J. L., C. A. Wylie, et al. (2007). "The Retinoblastoma family member p107 regulates the rate of progenitor commitment to a neuronal fate." J Cell Biol **178**(1): 129-39.
- Vazin, T., K. G. Becker, et al. (2009). "A novel combination of factors, termed SPIE, which promotes dopaminergic neuron differentiation from human embryonic stem cells." PLoS One **4**(8): e6606.
- Velisek, L., E. Shang, et al. "GABAergic neuron deficit as an idiopathic generalized epilepsy mechanism: the role of BRD2 haploinsufficiency in juvenile myoclonic epilepsy." PLoS One **6**(8): e23656.
- Wang, F., H. Liu, et al. "Brd2 disruption in mice causes severe obesity without Type 2 diabetes." Biochem J **425**(1): 71-83.
- Wang, W., B. Bu, et al. (2009). "Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases." Prog Neurobiol **89**(1): 1-17.
- Wang, X., J. W. Tsai, et al. (2009). "Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex." Nature **461**(7266): 947-55.
- Weber, K., G. Shaw, et al. (1983). "Neurofilaments, a subclass of intermediate filaments: structure and expression." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **48 Pt 2**: 717-29.
- Weng, T. and L. Liu "The role of pleiotrophin and beta-catenin in fetal lung development." Respir Res **11**: 80.
- Willardsen, M. I. and B. A. Link "Cell biological regulation of division fate in vertebrate neuroepithelial cells." Dev Dyn **240**(8): 1865-79.
- Wilson, Y. M., K. L. Richards, et al. (2004). "Neural crest cell lineage segregation in the mouse neural tube." Development **131**(24): 6153-62.
- Wu, S. Y. and C. M. Chiang (2007). "The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation." J Biol Chem **282**(18): 13141-5.
- Xu, D., A. Farmer, et al. (2010). "Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin-beta proteins." Curr Opin Struct Biol **20**(6): 782-90.
- Yamada, T., Y. Urano-Tashiro, et al. (2013). "Involvement of Crosstalk between Oct4 and Meis1a in Neural Cell Fate Decision." PLoS One **8**(2): e56997.

- Yamashita, M. (2012). "From neuroepithelial cells to neurons: Changes in the physiological properties of neuroepithelial stem cells." Arch Biochem Biophys.
- Yan, G. Z. and E. B. Ziff (1997). "Nerve growth factor induces transcription of the p21 WAF1/CIP1 and cyclin D1 genes in PC12 cells by activating the Sp1 transcription factor." J Neurosci **17**(16): 6122-32.
- Yanagisawa, H., Y. Komuta, et al. "Pleiotrophin induces neurite outgrowth and up-regulates growth-associated protein (GAP)-43 mRNA through the ALK/GSK3beta/beta-catenin signaling in developing mouse neurons." Neurosci Res **66**(1): 111-6.
- Yang, Z., N. He, et al. (2008). "Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression." Mol Cell Biol **28**(3): 967-76.
- Yang, Z., J. H. Yik, et al. (2005). "Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4." Mol Cell **19**(4): 535-45.
- Yeh, H. J., Y. Y. He, et al. (1998). "Upregulation of pleiotrophin gene expression in developing microvasculature, macrophages, and astrocytes after acute ischemic brain injury." J Neurosci **18**(10): 3699-707.
- Yokoo, T., H. Toyoshima, et al. (2003). "p57Kip2 regulates actin dynamics by binding and translocating LIM-kinase 1 to the nucleus." J Biol Chem **278**(52): 52919-23.
- Yu, Y., S. Zhu, et al. (2002). "Screening of BRD7 interacting proteins by yeast two-hybrid system." Sci China C Life Sci **45**(5): 546-52.
- Yusuf, I. and D. A. Fruman (2003). "Regulation of quiescence in lymphocytes." Trends Immunol **24**(7): 380-6.
- Zezula, J., P. Casaccia-Bonnel, et al. (2001). "p21cip1 is required for the differentiation of oligodendrocytes independently of cell cycle withdrawal." EMBO Rep **2**(1): 27-34.
- Zhang, N., R. Zhong, et al. (1999). "Domain structure of pleiotrophin required for transformation." J Biol Chem **274**(19): 12959-62.
- Zhang, P., C. Wong, et al. (1999). "p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step." Genes Dev **13**(2): 213-24.

Zhao, R., T. Nakamura, et al. (2011). "Gene bookmarking accelerates the kinetics of post-mitotic transcriptional re-activation." Nat Cell Biol **13**(11): 1295-304.

Zhou, M., X. J. Xu, et al. (2006). "BRD2 is one of BRD7-interacting proteins and its over-expression could initiate apoptosis." Mol Cell Biochem **292**(1-2): 205-12.