

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE COMPLEJOS
CON ACTIVIDAD HISTONA ACETILTRANSFERASA EN
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

LORENA E. ROSALENY PERALVO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 26 d'
Abril de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Luis Franco Vera
- D. Vincent Gèli
- D^a. Marian Martínez Balbás
- D^a. Susana Rodríguez Navarro
- D. Esteban Ballestar Tarín

Va ser dirigida per:

D^a. Ana Belén Ruiz García

D. Vicente Tordera Donderis

©Copyright: Servei de Publicacions

Lorena E. Rosaleny Peralvo

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6827-5

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

Análisis estructural y funcional de complejos con
actividad histona acetiltransferasa en
Saccharomyces cerevisiae

Lorena Estefanía Rosaleny Peralvo

13 de junio de 2007

VICENTE TORDERA DONDERIS, Doctor en Biología y Profesor titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València, y ANA BELÉN RUIZ GARCÍA, Doctora en Biología,

CERTIFICAN que la presente tesis doctoral titulada “Análisis estructural y funcional de complejos con actividad histona acetiltransferasa en *Saccharomyces cerevisiae*” ha sido realizada bajo su dirección por la licenciada en Bioquímica Lorena Estefanía Rosaleny Peralvo.

Fdo. Vicente Tordera Donderis

Fdo. Ana Belén Ruiz García



ÍNDICE	3
---------------	----------

Índice

1	Introducción	15
1.1.	La cromatina, una estructura dinámica	16
1.2.	Modificaciones postraduccionales de la cromatina	25
1.2.1.	Acetilación	29
1.2.2.	Metilación	39
1.2.3.	Fosforilación, ubiquitinación y sumoilación	45
1.2.4.	El código de histonas y la herencia epigenética	47
2	Objetivos	53
3	Análisis bioquímico de complejos histona acetiltransferasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
3.1.	Antecedentes	59
3.1.1.	Complejos histona acetiltransferasa de levadura	59

3.1.2. Aislamiento cromatográfico de actividades HAT en levadura . . .	66
3.1.3. La técnica TAP aplicada a la caracterización de complejos HAT	68
3.2. Materiales y métodos	73
3.2.1. Medios de cultivo	73
3.2.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas	74
3.2.3. Transformación de <i>E. coli</i>	74
3.2.4. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas en análisis bio- químicos	76
3.2.5. Construcción de cepas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79
3.2.6. Transformación de levadura con acetato de litio	82
3.2.7. Aislamiento de actividades HAT	83
3.2.8. Ensayos de actividad HAT	87
3.2.9. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (<i>SDS-PAGE</i>)	90
3.2.10. Análisis mediante <i>western-blotting</i>	91
3.2.11. Análisis de complejos proteicos mediante TAP	94
3.3. Resultados y discusión	100
3.3.1. Detección de una nueva actividad HAT con especificidad sobre la histona H3	100
3.3.2. Análisis de las actividades HAT A4-I y A4-II	106
3.3.3. Actividades HAT dependientes de <i>SAS3</i>	109

3.3.4. Actividades HAT dependientes de <i>GCN5</i>	122
3.3.5. Actividad HAT dependiente de <i>ESAI</i>	127
3.3.6. Actividades HAT dependientes de <i>ELP3</i> , <i>HPA2</i> , <i>SAS2</i> y <i>NUT1</i> .	132
4 Localización genómica de HATs y de marcas epigenéticas mediante ChIP-chip	137
4.1. Antecedentes	139
4.1.1. Chips de DNA	139
4.1.2. Análisis de localización genómica (ChIP-chip)	141
4.2. Materiales y métodos	147
4.2.1. Cepas de levadura empleadas	147
4.2.2. Inmunoprecipitación de cromatina	148
4.2.3. Amplificación del DNA e hibridación en macrochip	151
4.3. Resultados y discusión	155
4.3.1. Diseño de un nuevo método de análisis de localización genómica en <i>S. cerevisiae</i>	155
4.3.2. Sitios de unión de HATs en el genoma de levadura	160
4.3.3. Asociación de Sas3p y Gcn5p a cromatina acetilada en la lisina 14 de la histona H3 <i>in vivo</i>	169
4.3.4. Asociación de Hpa2, Elp3p, Nut1p y Sas2p a cromatina y activación transcripcional	177

5 Efectos sobre la longevidad y el perfil transcriptómico de la delección de los genes <i>HAT1</i> y <i>HAT2</i> del complejo HAT B de levadura	183
5.1. Antecedentes	185
5.1.1. El envejecimiento en levadura y la cromatina	185
5.1.2. El silenciamiento y la acetilación de histonas	187
5.2. Materiales y métodos	189
5.2.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	189
5.2.2. Determinación de esperanza de vida	190
5.2.3. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina	191
5.2.4. Extracción de RNA total, marcaje radiactivo de muestras e hibridación de macrochips	193
5.2.5. Cuantificación de las señales de hibridación y procedimientos de normalización	193
5.3. Resultados y discusión	195
5.3.1. La delección del gen <i>HAT2</i> produce un incremento en la esperanza de vida	195
5.3.2. Análisis de la función de HAT B en la retención de Sir2p	198
5.3.3. Efectos de la delección de los genes <i>HAT1</i> y <i>HAT2</i> en el perfil transcripcional	201
5.3.4. Funciones de Hat2p independientes del complejo HAT B	204

ÍNDICE	7
6 Conclusiones finales	207
Bibliografía	211

Agradecimientos

- A Alejandro Gaita por todo,
- a Ana Poveda por su continuo apoyo
- a Titín por enseñarme a navegar en el proceloso mundo de la ciencia
- a Felicidad por ser esa amiga que es, y será
- a Ana Ruiz por ser a veces esa madre (madraza que es :)
- a Mercé por esos continuos detalles que te hacen darte cuenta de que vale la pena seguir viviendo
- a mis padres porque sin ellos no hubiera sido posible
- a Ramón por ser el experto experimental del grupo y saber de mucho, más que muchos
- a los padres de Álex por haber hecho de él lo que es
- a mis abuelos paternos por lo mucho que me han ayudado y por todas esas cenas de los miércoles
- a mis abuelos maternos (in memoriam) por haber sido un ejemplo de las cosas buenas y sencillas de la vida
- a mi tía Merche por su apoyo espiritual
- a mi hermano Javi por ser mi hermano
- a mi tía M^aCarmen, mi tío Jesus, mi prima Eva y mi primo Jesus Javier, por saber que están ahí
- a mi tía M^aLuz, mi tío Tomás, mi primo Tomás y mi primo Jaume por formar parte de mi familia y ser tan viajeros
- a M^a José por “su visión” sobre Irlanda
- a Gema por ser la que primero llegó al “otro lado” y por compartir tantas cosas

-
- a Bárbara por ser la segunda que llegó al “otro lado” y ser incansable
 - a Julia por su maravillosa voz
 - a M^a Jesus por compartir la experiencia de este viaje
 - a Juan por su “hispanidad” :D
 - a José Enrique por ser como un director más
 - a Pedro, Cucha y Mariela por haber sido directores de departamento durante mi estancia en él, y por supuesto al actual secretario Marcel.lí
 - a Amparo por ser vecina de laboratorio y haber emprendido el viaje a Alemania
 - a Sara por haber sido la “sal” del laboratorio
 - a Paqui por limpiar, que si no fuera por ella cómo estaría el asunto...pues muy sucio
 - a Juan Ramón por ser el manitas que lo arregla todo, y todo y todo.
 - a Pedro por hacer tan bien su trabajo
 - a Ethel por haber sido mi primera “niñera” de laboratorio
 - a M^a Carmen Bañó por ser mi pre-directora
 - a M^a Àngels por ser ella
 - a Lola por tener tanta energía, yo no sé de verdad de dónde la sacas (¿del nescafé?)
 - a Paco Marco por ser el manitas de los ordenadores
 - a Santi por empezar en el duro mundo de la bioinformática
 - a Begoña, María, Ana, Joanna y Toni, por encargarse de los papeles que se necesitan para sobrevivir en este mundo

- a Paula por haber sido tan buena anfitriona en Viena, me llevé un buenísimo recuerdo de la ciudad
- a Arnau por darme buenas ideas sobre la exposición de la tesis
- a Piedachu por ser filobioinformática
- a Pepe por ser becario precario, ahora sabes lo que se siente ¿eh?
- a Gus por ser guru local de GNU/Linux
- a Isma, ¡que por fin aprobó la Bioquímica!
- a Tente, por ser físico, y dentro de poco Ingeniero de materiales
- a Carlos por ser/haber sido tan buen amigo de Álex, que pena que no uses linux, xe
- a Pascual por toda la lata que le he dado durante este tiempo
- a César, que no nos olvidamos de tí :)
- a mi mecánico del coche de toda la vida, Rafa, gracias a él he llegado sana y salva todos los días a la facultad
- al vim, ¿quién lo iba a decir?, al KDE, al konqueror, al kmail, a la konsole (aunque parezca mentira), al gaim, al amsn, al Xpdf, KGhostview y GV, al Kdict, al B3, al LaTeX (of course), al Xdvi, a la Woody, a Ubuntu, y por supuestoísimo Debian rulez!!!!
- a todos mis profesores, y en especial a mi profesor de cuarto de EGB (Ismael), y a los que realmente han hecho que esté aquí: mis profesores de C.O.U., como Concha Gil de Biología, el profe de Química José Bañuls, a la de Física, M^a José Climent, y por supuesto a Inmaculada Garrido de Matemáticas, y por último a Luis Franco por introducirnos a la Cromatina y hacer que nos hagamos preguntas profundas.

Presentación

El presente trabajo se ha realizado en el laboratorio de Modificación de Histonas del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València. El trabajo se encuentra estructurado en una introducción general a la cromatina y sus modificaciones, y tres bloques con estudios independientes, conteniendo cada uno sus apartados de antecedentes, materiales y métodos y resultados. El primero de los bloques versa sobre la caracterización a nivel bioquímico de varios de los complejos Histona Acetiltransferasa (HAT) descritos en nuestro laboratorio. El segundo bloque trata sobre la localización genómica (ChIP-chip) de seis HATs de levadura y del patrón de acetilación de la lisina 14 de la histona H3 en levadura. Parte de la investigación referida a este segundo bloque ha sido recogida en un artículo enviado recientemente:

Rosaleny, L.E., Ruiz-García, A.B., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J.E. y Tordera, V. 2007. Sas3p and Gcn5p histone acetyltransferases are recruited to similar genes. Aceptado con revisiones en *Genome Biology*.

Por último, el tercer bloque presenta un estudio sobre el efecto de la mutación de dos subunidades de HAT B sobre la esperanza de vida y el transcriptoma de *Saccharomyces cerevisiae*, y que ha dado lugar a la publicación:

Rosaleny, L.E., Antúnez, O., Ruiz-García, A.B., Pérez-Ortín, J.E. y Tordera, V. 2005. Yeast *HAT1* and *HAT2* deletions have different life-span and transcriptome phenotypes. *FEBS Lett.* **569**:4063-4068

Abreviaturas

ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
CoA	Coenzima A
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPM	Desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitol (1,4-threo-mercaptobutano-2,3-diol)
DO	Densidad Óptica
EDTA	Ácido etilendiamino-tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol bis(2-aminoetil éter-N,N,N',N'-tetraacético)
HAT	Histona Acetiltransferasa
HDAC	Histona Desacetilasa
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
HMT	Histona Metiltransferasa
IGR	Región intergénica (<i>InterGenic Region</i>)
MES	Ácido 2-morfolin-etanosulfónico
min	minutos
MOPS	Ácido 4-morfolin-propanosulfónico
Ni-NTA	Níquel Nitrilotriacético
NuA3 (NuA4)	<i>Nucleosomal Acetyltransferase of H3 (of H4)</i>
ORF	Marco de lectura abierto (<i>Open Reading Frame</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polietilenglicol
RSF	<i>Remodelling and Spacing Factor</i>
RSC	<i>Remodel the Structure of Chromatin</i>
SAGA	<i>Spt-Ada-Gcn5 Acetyltransferasa</i>
SALSA	<i>SAGA ALtered Spt8 Absent</i>
SLIK	<i>SAGA-LIKE</i>
SDS	Dodecil sulfato sódico
SSC	<i>Sodium Saline Citrate</i>
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i>
TBP	<i>TATA-Binding Protein</i>
TEMED	N,N,N',N'-TEtraMetilEtileno-Diamino
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

Parte 1

Introducción

1.1 La cromatina, una estructura dinámica

La información genética contenida en los núcleos de las células eucariotas se encuentra formando una estructura denominada cromatina. Esta estructura fue detectada por primera vez en el año 1879 por W. Flemming. Flemming observó unos filamentos que se coloreaban fuertemente en presencia de colorantes básicos. De ahí el nombre de cromatina, del griego *khroma*, coloreado. Más tarde se relacionó esta materia coloreada con las ideas de G. Mendel y se le atribuyó el papel de almacén de la información heredable dentro de la célula.

El almacenamiento de la información genética en las células eucariotas no es un problema sencillo de resolver. ¿Cómo introducir una fina cuerda de 200 metros de largo en una esfera de un centímetro de diámetro? Lo que aplicado al campo de la biología celular se traduce en que la longitud del DNA genómico es considerablemente superior al diámetro de la célula. En el caso de la célula de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que es un esferoide de unos 4 μm de diámetro, su DNA posee 12 Mpb, equivalente a unos 8 cm de longitud si los 16 segmentos de DNA que componen su genoma se colocaran extendidos uno tras otro. De esto se desprende que el empaquetamiento necesario para acomodar en el núcleo de la célula tal cantidad de DNA es importante. Por otro lado, una serie de maquinarias celulares (relacionadas con la replicación, la transcripción, la reparación del DNA, etc. . .) deben ser capaces de acceder rápidamente a esta maraña de DNA y proteínas que constituye la cromatina, en respuesta a estímulos externos y endógenos. La cromatina es, por tanto, una entidad extremadamente dinámica implicada en un gran número de procesos celulares.

La estructura cromatínica está constituida por unas unidades denominadas nucleosomas (fig. 1.1). El nucleosoma consiste en unos 147 pb de DNA, enrollados 1.75 vueltas alrededor de un complejo octamérico de cuatro proteínas denominadas histonas. El octámero está formado por dos copias de cada una

de las histonas internas: H2A, H2B, H3 y H4, organizado en dos dímeros de (H2A·H2B), y un tetrámero (H3·H4)₂. A raíz de la descripción de la estructura del nucleosoma a una resolución de 2.8 Å [1] se identificaron las interacciones que lo estabilizan. Fundamentalmente éstas se producen entre el DNA y las histonas y entre histonas dentro de un nucleosoma.

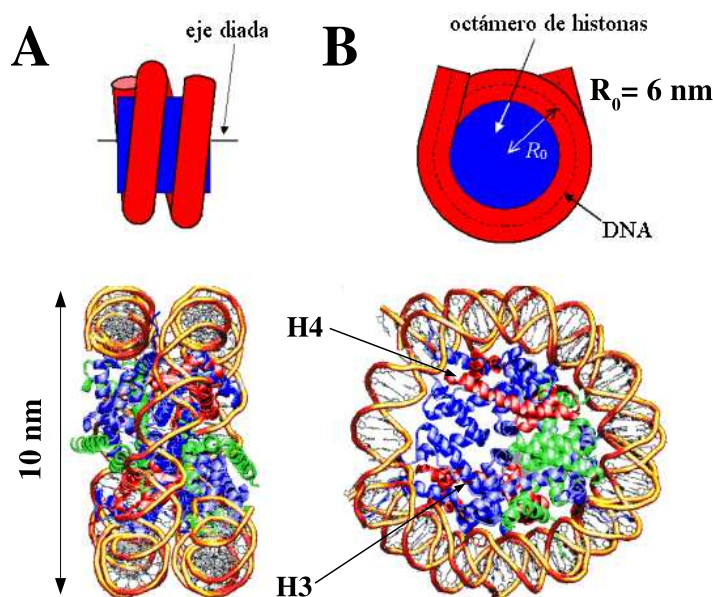


Figura 1.1. **Esquema de la estructura de un nucleosoma humano.** (A) Visión longitudinal a lo largo del eje de la diada de la superhélice de DNA de un nucleosoma humano con las cuatro histonas internas, en una versión simplificada y en un modelo de cintas. (B) El nucleosoma se observa desde un corte transversal a la superhélice de DNA. El modelo de cintas ha sido elaborado por R. Sendra a partir de las coordenadas publicadas en [2].

Además de las histonas internas, la histona externa H1 interacciona con el DNA en el segmento que entra y sale del nucleosoma. El DNA internucleosomal tiene una longitud que varía desde los 10 pb por término medio en *S. cerevisiae* hasta los 30-50 pb de los metazoos [3]. Las histonas se encuentran muy conservadas entre organismos tan distintos como la levadura de la cerveza, el anfibio *Xenopus laevis* y los humanos. Son proteínas pequeñas (11 a 16 kDa) y básicas que, por lo general, contienen dos dominios claramente diferenciados. Uno de ellos es un dominio amino terminal de 15 a 30 aminoácidos no estructurados, de

carácter básico. Este dominio amino terminal no contribuye significativamente a la estructura de los nucleosomas ni a su estabilidad, pero está implicado en el plegamiento de los nucleosomas en estructuras de orden superior. El otro es un dominio globular que posee un motivo estructural muy importante para los contactos moleculares dentro del octámero de histonas internas, que organiza las vueltas del DNA nucleosomal, y que se denomina *histone fold*. Este motivo consiste en unos 65 aminoácidos que se estructuran en una organización extendida tipo hélice-vuelta-hélice. En concreto, contiene una hélice α corta, un giro β , una hélice α larga, otro giro β , y otra hélice α corta.

La compactación de la cromatina se produce en un primer nivel debido a la organización generada por los nucleosomas. Estos producen una fibra de unos 11 nm de diámetro, cuya estructura recuerda a “cuentas en un collar”. Esta organización del DNA sufre un segundo nivel de compactación dependiente de interacciones entre los extremos amino terminales de las histonas con el DNA y de la unión de la histona H1 con el DNA espaciador, para dar lugar a la fibra de 30 nm. Existen dos modelos que explican la compactación producida en esta etapa. El primero es el modelo del solenoide [4], que supone una distribución de seis nucleosomas por vuelta de solenoide. El segundo es el modelo zig-zag [5] según el cual el DNA espaciador o internucleosomal sigue una trayectoria recta entre nucleosomas sucesivos.

Las histonas internas son objeto de una serie de modificaciones postraduccionales, sobre todo a nivel de sus dominios amino terminales. Estas modificaciones son principalmente la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación. Muchas de ellas son reversibles y su papel en la señalización y regulación de diferentes procesos celulares ha sido ampliamente estudiado en los últimos años. Originalmente a la cromatina se le atribuyó una función simplemente estructural, y en principio, represora de la actividad transcripcional. Sin embargo, numerosos estudios han ido confirmando la excepcional fluidez de esta estructura, a la que deben acceder una gran cantidad de proteínas reguladoras para facilitar los procesos celulares que implican el metabolismo del DNA. Existe un grupo de proteínas llamadas reguladores cromatínicos, que engloba todos aquellos factores que permiten mantener la cromatina en un estado dinámico [3].

Estos factores se pueden clasificar en cuatro tipos. En primer lugar, los complejos remodeladores de la cromatina que utilizan la energía liberada por el adenosín trifosfato (ATP) para alterar la estructura de la cromatina. A continuación se encontrarían las enzimas modificadoras de las histonas, muy estudiadas durante los últimos años, las carabinas moleculares de histonas, encargadas de su ensamblaje y, por último, las variantes de histonas. Todos estos factores proteicos interactúan en el contexto de la cromatina empaquetada. Su capacidad de modificar la estructura de la cromatina hace que sean buenos candidatos para proporcionar posibles mecanismos de la regulación dinámica de la expresión génica. La rápida respuesta de la cromatina de los organismos a cambios ambientales y en las etapas del desarrollo se correlaciona con los aspectos epigenéticos de la regulación. La herencia epigenética consiste en un tipo de herencia que no transfiere a la siguiente generación cambios en la secuencia primaria del DNA, y su importancia en los procesos celulares ha sido ampliamente demostrada en las últimas décadas. Ésta se analizará en el apartado 1.2.4.

Las carabinas de histonas escoltan a estos componentes proteicos de la cromatina desde su lugar de síntesis hasta la región de DNA en la que serán depositadas para la formación de los nucleosomas, impidiendo interacciones inespecíficas de las histonas con el DNA. Las etapas del proceso de ensamblaje son básicamente tres según el modelo actual [3]. En un primer paso los tetrámeros de las histonas H3 y H4 se depositan en el DNA en una reacción lenta, que se cree que es la limitante. En el segundo paso se produce una asociación rápida de dímeros de H2A y H2B con los tetrámeros. Finalmente tiene lugar el enrollamiento del DNA alrededor del octámero de histonas. Durante el proceso de ensamblaje, las carabinas o complejos de ensamblaje de histonas deben trabajar en concierto con actividades remodeladoras de la cromatina que espacien los nucleosomas adecuadamente. La mayor parte del proceso de ensamblaje se lleva a cabo durante la fase S del ciclo celular, cuando se replica el DNA. En él intervienen complejos de ensamblaje de histonas, como son CAF-1 (*Chromatin Assembly Factor 1*) y RCAF (*Replication Coupled Assembly Factor*), presentes tanto en humanos como en levadura. Estos dos complejos de ensamblaje o carabinas de histonas, interactúan con tetrámeros H3/H4 con un patrón de acetilación de

histonas específico que implica que las lisinas 5 y 12 de la histona H4 estén acetiladas. Además también se efectúa deposición de histonas fuera de la fase S para reestablecer nucleosomas alterados por la reparación del DNA o en segmentos de DNA activamente transcritos. Por otro lado, la alteración de los nucleosomas producida tras el paso de la maquinaria transcripcional en segmentos altamente transcritos debe ser reparada, relocalizando de nuevo los nucleosomas. Se ha identificado un complejo de ensamblaje de histonas en mamíferos que actúa fuera de la fase S al cual se le ha dado el nombre de HIRA (*Histone Regulation A*). HIRA ensambla la histona H4 y una variante de la histona H3 en zonas transcripcionalmente activas [6]. En realidad los genes *HIR* (*Histone Regulation*) de levadura fueron identificados previamente como reguladores negativos de la expresión de histonas [7].

Como se ha comentado anteriormente, los complejos de ensamblaje de histonas deben actuar conjuntamente con actividades remodeladoras de la cromatina. Así parece ocurrir, por ejemplo, con *ARP4* (*Actin-related proteins 4*), un gen esencial en levadura componente del complejo remodelador de la cromatina INO80 y del complejo histona acetiltransferasa NuA4. Las proteínas Arp4 pueden interactuar con las histonas internas *in vitro*, y su mutación condicional provoca defectos en la estructura de la cromatina del DNA episomal [8]. Se ha propuesto que las proteínas Arp que constituyen el complejo INO80 puedan tener actividad de ensamblaje de histonas que ayude al complejo durante la reorganización de los nucleosomas. Otro ejemplo de un complejo remodelador de la cromatina que podría contener actividad carabina de histonas es RSF (*Remodelling and Spacing Factor*), descubierto en humanos como participante en el inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II en moldes de cromatina *in vitro* [9]. RSF es capaz de unir histonas H3/H4 y promover el ensamblaje de cromatina *in vitro* [10]. Se cree que la subunidad Rsf-1 sería la implicada en la actividad de ensamblaje de histonas.

Para conseguir una cromatina estructuralmente abierta y funcionalmente competente para la activación transcripcional, las células emplean dos tipos de complejos multiproteicos. Los que utilizan la energía del ATP para producir cambios en la estructura de la cromatina reciben el nombre de complejos remodelado-

res de la cromatina. Otros catalizan enzimáticamente reacciones que modifican covalentemente las histonas. De este último grupo de complejos tratará el apartado 1.2 (pág. 25).

Los complejos remodeladores de la cromatina se clasifican en diversas familias según la similitud estructural de su subunidad adenosín trifosfatasa (ATPasa). Los complejos de este tipo identificados en *S. cerevisiae* se muestran en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. **Complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP presentes en *S. cerevisiae*.** Adaptada de [3].

Familia de ATPasa	Complejo	Subunidades
ISWI	Isw1a [11]	Isw1p, Ioc3p
	Isw1b [11]	Isw1p, Ioc2p, Ioc4p
	Isw2	Isw2p, Itc1p
SWI2/SNF2	SWI/SNF	Snf2p, Arp7p, Arp9p, Rtt102p, Snf11p, Snf12p, Snf5p, Snf6p, Swi1p, Swi3p, Swp82, Taf14p
	RSC	Sth1p, Rsc1p, Rsc2p, Rsc3p, Rsc4p, Rsc6p, Rsc8p, Rsc9p, Rsc30p, Rsc58p, Htl1p, Npl6p, Sfh1p, Rtt102p
	SWR1 [12]	Swr1p, Act1p, Arp4p, Rvb1p, Rvb2p, Arp6p, Yaf9p, Vps71p, Vps72p, Swc1p, Aor1p, God1p
INO	INO80	Ino80p, Act1p, Arp4p, Arp5p, Arp8p, Ies1p, Ies3p, Nhp10p, Rvb1p, Rvb2p, Taf14p
CHD	CHD1	Chd1p

Los complejos remodeladores son capaces de reconocer nucleosomas con distinta composición y modificaciones. Se debe remarcar que los nucleosomas se encuentran en formas muy especializadas. Esa especialización viene determinada por la presencia de distintas variantes de las histonas en los nucleosomas y, sobre todo, por los diferentes estados de modificación postraduccional (acetilación, metilación, etc...) en los que se pueden presentar. De ahí que exista una gran diversidad de remodeladores, capaces de reconocer esa diversidad de sustratos.

Las funciones celulares que desarrollan estos complejos son muy variadas.

La regulación de la activación transcripcional es, quizás, la más estudiada. Los nucleosomas posicionados en elementos reguladores impiden la unión de factores transcripcionales, lo que causa represión génica. Gracias a los remodeladores el posicionamiento de los nucleosomas es, sin embargo, dinámico. Los complejos remodeladores ayudan a posicionar nucleosomas en una localización determinada en genes reprimidos, y los reposicionan para permitir la activación. Esto explica por qué la actividad remodeladora puede tener tanto efectos activadores como represores de la transcripción. Por ejemplo, se han descrito remodeladores del grupo SWI2/SNF2 que regulan la transcripción alterando el posicionamiento de nucleosomas en promotores [13]. Asimismo, complejos del grupo ISWI tienen funciones importantes en el ensamblaje de cromatina y en la formación de series de nucleosomas con espaciamiento ordenado, lo que se cree que causa represión genética [14]. Se ha observado que estos complejos se asocian con represores que se unen a DNA y son necesarios para la represión de ciertos genes, probablemente a través de la organización de cromatina represiva [15, 16]. Apoyando estos hechos, estudios recientes sugieren que el posicionamiento de nucleosomas por ISW1 podría restringir la capacidad de TBP (*TATA-Binding Protein*) y TFIIB para ocupar el promotor, impidiendo la transcripción basal [17].

Los complejos remodeladores de la cromatina también están implicados en la deposición de variantes de histonas. La expresión de los genes de las histonas se produce mayoritariamente durante la fase S, pero fuera de esta fase se expresan otras proteínas histonas a un nivel bajo, aunque constante. Estas se denominan variantes de histonas o histonas de reemplazo. Las variantes de histonas pueden tener una similitud de secuencia muy alta con la histona canónica, como es el caso de la variante H3.3 de eucariotas superiores con tan sólo una diferencia de unos pocos aminoácidos, o bien presentar diferencias más sustanciales como en la variante macroH2A que aparece en el cromosoma X inactivo de ratones hembra, con un 60 % de su secuencia distinta respecto a la forma canónica [18]. La histona H4 no dispone de variantes [19], y la variante H3.3 no existe en levadura, aunque se cree que la misma histona canónica H3 desempeña la función que H3.3 lleva a cabo en otros organismos [20]. Las variantes de las histonas se han vinculado a diferentes procesos celulares, como el establecimiento del cinetoco-

ro en el caso de la variante centromérica de H3 (CENP-A en mamíferos y Cse4p en *S. cerevisiae*). Por otro lado, la variante de H2A llamada Htz1p en levadura (H2A.Z en metazoos), está implicada en la formación de fronteras que eviten la expansión de la cromatina silenciada desde los telómeros [21]. Existen varios indicios que apuntan a que el complejo remodelador SWR1 es el intercambiador de H2A por Htz1 en un proceso dependiente de ATP [22, 12, 23].

Asimismo, el vínculo entre los complejos remodeladores de las familias SWI2/SNF2 y CHD con la elongación de la transcripción se estableció hace años [24, 25, 26]. Ha sido en los últimos años cuando los complejos de la familia ISWI también se han relacionado con este proceso. Según el trabajo de 2003 de Morillon *et al.* [27], estos complejos pueden regular la transición del inicio de la transcripción a la elongación. Las dos formas del complejo ISW1 de levadura, Isw1a e Isw1b, presentarían un perfil de ocupación distinto en los genes objetivo. Isw1a ocuparía la zona 5' (promotor) de los genes, mientras que Isw1b quedaría asociado a las regiones 3'. Se ha sugerido que la proteína Ioc4 sería capaz de reconocer las regiones 3' de los genes gracias a su motivo PWWP (prolina y triptófano conservado) presente en muchas histona metiltransferasas (HMT). Al haberse demostrado que las zonas 3' de los genes contienen la histona H3 metilada en la lisina 36, se propone que el motivo PWWP pueda reconocer esta posición metilada [28].

Algunos complejos remodeladores de la cromatina también se han relacionado con procesos de reparación del DNA. Así, el complejo de *S. cerevisiae* INO80 se ha asociado con una función de reparación de la rotura de la doble cadena de DNA. INO80 interaccionaría con la histona H2A fosforilada en la serina 129 presente en las proximidades de las roturas de doble hebra, y se ha propuesto que este remodelador podría eliminar nucleosomas cercanos al punto de corte para permitir la unión de los extremos rotos [29, 30, 31]. Por otro lado, también se ha implicado al complejo SWR1 en la reparación del DNA, puesto que es reclutado a la rotura de doble hebra [29]. Otro complejo de levadura al que se le ha atribuido una función en la reparación del DNA es el complejo RSC (*Remodel the Structure of Chromatin*), habiéndose hallado interacción física de algunas subunidades del complejo con regiones próximas a roturas de doble cadena del

DNA [32].

Finalmente, los complejos remodeladores también parecen participar en la cohesión de las cromátidas hermanas en el proceso de reparto de cromosomas durante la división celular. El complejo cohesina media este importante proceso. Se han identificado hasta la fecha dos complejos miembros de la familia de remodeladores SWI2/SNF2 con una función en la cohesión de cromátidas hermanas. Uno de ellos es la proteína Snf2 de humanos, la cual se ha copurificado con componentes del complejo cohesina [33]. El otro es el complejo esencial RSC de levadura. Se han detectado defectos de cohesión en cepas mutantes *rsc*, e interacciones genéticas entre mutantes *rsc* y componentes o reguladores del complejo cohesina y componentes del cinetocoro [34, 35].

En suma, lejos de ser una estructura estática y pasiva, la cromatina se encuentra organizada de manera dinámica, con constantes cambios en la posición de los nucleosomas, y en la naturaleza o en las modificaciones de las histonas que los forman. Los responsables de generar toda esta dinámica son un amplio grupo de complejos proteicos. La variabilidad de estructuras que potencialmente se puede llegar a producir a causa de la modificación de los nucleosomas y la metilación del DNA, es actualmente la base bioquímica más sólida que existe para explicar la herencia epigenética.

1.2 Modificaciones postraduccionales de la cromatina

Las histonas están sujetas a un gran número de modificaciones postraduccionales catalizadas enzimáticamente, que incluyen la acetilación y metilación de lisinas (K), la metilación de argininas (R), la fosforilación de serinas (S) y treoninas (T), y la ubiquitinación, sumoilación, ADP-ribosilación y biotinilación de lisinas. Por si esta complejidad fuera poca, dentro de la metilación disponemos de varias posibilidades. Las lisinas se pueden mono-, di- o trimetilar, y las argininas son mono- o dimetiladas. Además, las argininas dimetiladas pueden serlo simétrica o asimétricamente. Asimismo estas modificaciones pueden ser reversibles a excepción de la trimetilación de lisinas, para la cual no se ha hallado

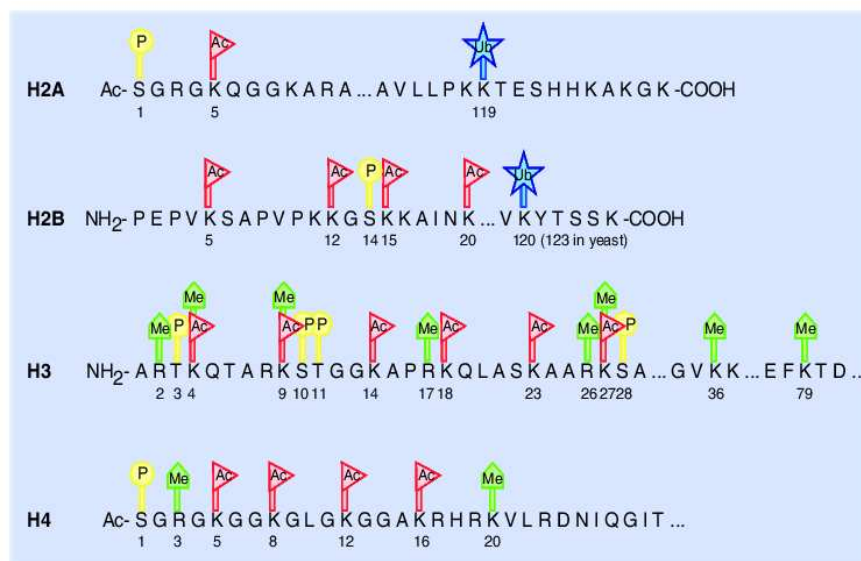


Figura 1.2. **Modificaciones postraduccionales más importantes de las histonas internas.** Las formas coloreadas representan las modificaciones conocidas de las histonas internas, donde Ac en un triángulo rojo es acetilación, P en un octógono amarillo, fosforilación, Me en un pentágono verde, metilación y Ub en una estrella azul, ubiquitinación. Extraído de [36].

ninguna actividad enzimática capaz de revertirla.

La mayor parte de las marcas¹ postraduccionales se producen sobre las regiones de los extremos amino o carboxilo de las histonas (fig. 1.2). Recientemente se han descubierto también modificaciones en el dominio globular de las histonas (revisado en [37]), como se puede apreciar en la figura 1.3.

Los efectos que tienen sobre las cargas de los residuos las modificaciones más importantes son diversos. En el caso de la acetilación sobre una lisina, se elimina la carga positiva del grupo ϵ -amino. La adición de un grupo fosfato a una serina o treonina, añade dos cargas negativas al residuo modificado. Por último, la metilación no afecta ni al estado de protonación de la lisina ni al de la arginina.

En la actualidad se considera que las histonas son la diana de tantas actividades enzimáticas modificadoras porque la cromatina es la estructura donde tienen lugar todos los procesos del metabolismo de DNA. Las modificaciones covalentes de las histonas podrían modular la función y/o estructura de la fibra de cromatina, de forma que diferentes modificaciones tendrán distintas consecuencias funcionales. De hecho existen numerosos ejemplos sobre combinaciones de modificaciones específicas que se correlacionan con funciones biológicas. Uno de ellos, por ejemplo, es la correlación de la trimetilación de la histona H3 en la lisina 9 [38, 39] y la hipoacetilación de las histonas H3 y H4 [40, 41] con la represión transcripcional en eucariotas superiores.

De acuerdo con estas ideas se ha propuesto la existencia de un código de histonas [42, 43] (pág. 47) formado por el conjunto de modificaciones postraduccionales, que dictaría el estado de la cromatina. La combinación precisa de modificaciones de histona específicas de *locus* se debe a los efectos combinados del reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas a los *loci* específicos y a la especificidad inherente de las propias enzimas.

¹Las marcas son modificaciones covalentes sobre las histonas en sitios específicos.

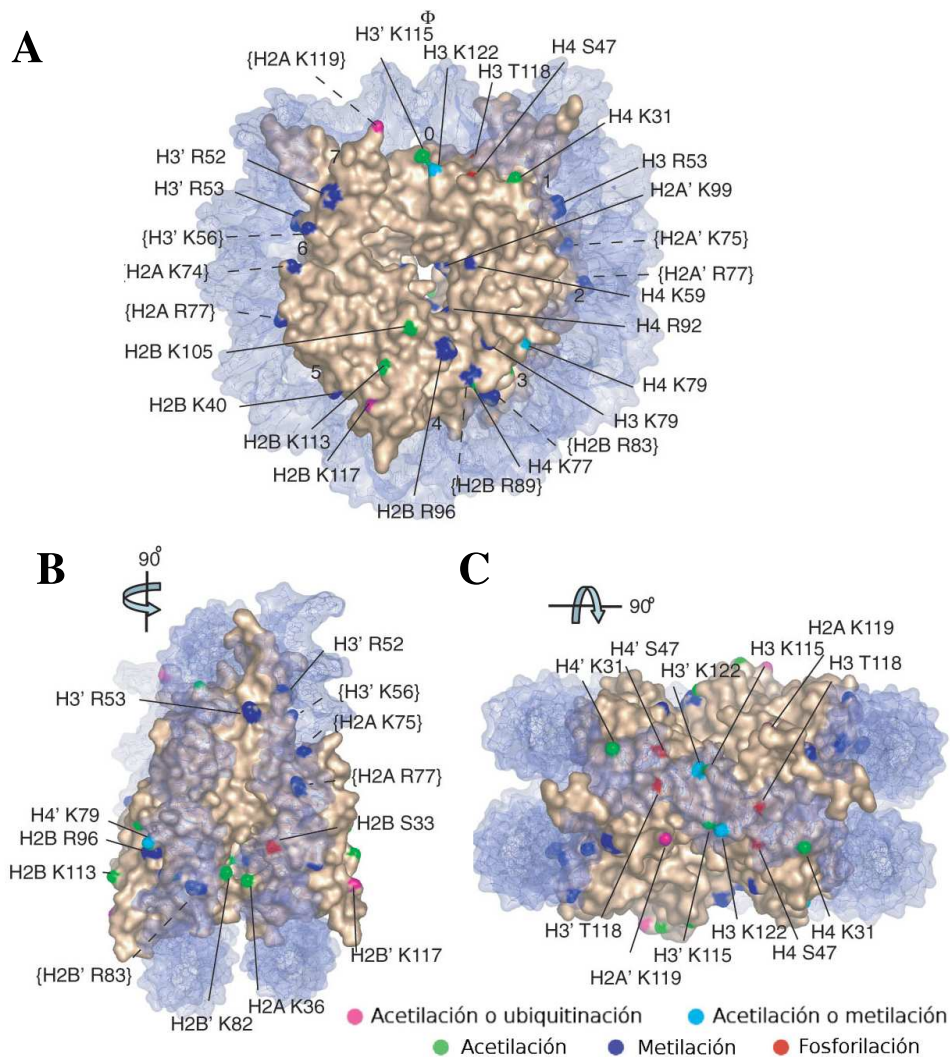


Figura 1.3. Mapa tridimensional de las modificaciones de histonas identificadas en la superficie del del nucleosoma de *Xenopus laevis*. (A) Visión inferior del eje de la superhélice de DNA de la representación de superficie del nucleosoma de vertebrados (sin los extremos flexibles). Los grupos funcionales de residuos modificados están coloreados de acuerdo con el tipo de modificación postraduccional, con la acetilación en verde, la fosforilación en rojo, la metilación en azul, los sitios que pueden estar tanto acetilados como ubiquitinados en púrpura, y los sitios que pueden estar tanto acetilados como metilados en azul claro. La superhélice del DNA es violeta claro, con las localizaciones de la superhélice (0-7) indicadas. Los sitios ambiguos de modificación están indicados con llaves y líneas discontinuas. (B) Vista como en A pero girada 90° alrededor del eje de la diada molecular (Φ). (C) Vista como en A pero girada 90° alrededor del eje horizontal de la molécula. Extraído de [37].

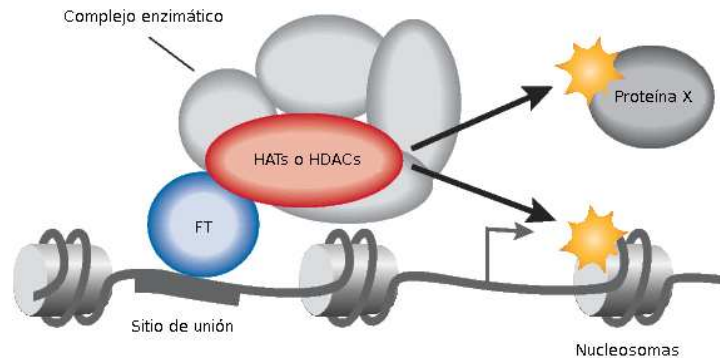


Figura 1.4. **Modelo de reclutamiento de actividades modificadoras de histonas (en este caso HATs o HDACs).** Las HATs y HDACs son dirigidas a sus promotores diana a través de una interacción física con un factor transcripcional específico de secuencia (FT). Generalmente estas actividades funcionan dentro de un complejo multimolecular, en el que otras subunidades son necesarias para que la subunidad catalítica pueda modificar nucleosomas alrededor del sitio de unión. Las HATs o HDACs también pueden modificar otros factores (proteína X) aparte de las histonas para regular la transcripción. Extraído de [44].

En cuanto al reclutamiento de las actividades modificadoras de histonas, se explica en base a interacciones directas del complejo con reguladores transcripcionales específicos de secuencia (fig. 1.4). Ya que las subunidades catalíticas de estos complejos enzimáticos no poseen capacidad de unión a DNA por ellas mismas, el mecanismo de reclutamiento propuesto precisa que se produzca la interacción del complejo con algún factor transcripcional con especificidad de reconocimiento de secuencia. Este modelo de reclutamiento no sólo es válido para el relacionado con la regulación transcripcional, sino también para el causado por reparación del DNA o el establecimiento de la heterocromatina centromérica. Otro mecanismo bastante diferente consiste en el direccionamiento de la metilación de la lisina 9 de la histona H3 a la cromatina próxima a los centrómeros (en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* y en mamíferos) mediado por pequeños RNAs no codificantes [45]. Este tipo de mecanismo no se produce en *S. cerevisiae*.

Por otro lado, la especificidad de cada enzima por una histona y por residuos

específicos dentro de esa histona es una característica intrínseca de la mayoría de las actividades que modifican histonas.

1.2.1. Acetilación

La reacción de acetilación de las histonas está catalizada por enzimas HAT que transfieren un grupo acetilo desde el acetil CoA al grupo ϵ -amino de la cadena lateral de residuos de lisina específicos de la cola amino terminal (en ocasiones del dominio globular) de las histonas. La reacción contraria está catalizada por actividades histona desacetilasa, abreviada como HDAC (fig. 1.5). Clásicamente la acetilación de histonas en determinadas regiones de la cromatina se ha asociado a la activación génica. De hecho dominios cromosómicos silenciados se encuentran hipoacetilados, y regiones activas transcripcionalmente se hallan enriquecidas en histonas acetiladas [40]. Como mecanismo de regulación transcripcional se ha propuesto que al perder las histonas acetiladas parte de su carga positiva, disminuye su afinidad por el DNA y esto afecta a las interacciones nucleosoma-nucleosoma. Estos cambios generarían una estructura más abierta que permitiría la interacción de la maquinaria transcripcional con el DNA [46, 47]. Asimismo, el modelo es coherente con la observación de que la desacetilación produce una estructura más compactada que dificulta la unión de factores proteicos [48].

En la actualidad queda fuera de toda duda que las modificaciones químicas de las histonas afectan directamente a la transcripción, tanto basal como regulada, y a su iniciación y elongación. También afectan a la replicación, reparación y recombinación del DNA, de modo que participan en la regulación del ciclo celular y de procesos de diferenciación, desarrollo y apoptosis celular (revisado en [49, 36]).

La acetilación y la desacetilación de histonas se puede clasificar en dirigida o global según qué tipo de regiones genómicas sean las afectadas por estas modificaciones [50]. Las modificaciones dirigidas se producen en promotores de genes, como la desacetilación del promotor del gen *INO1* de levadura por el complejo

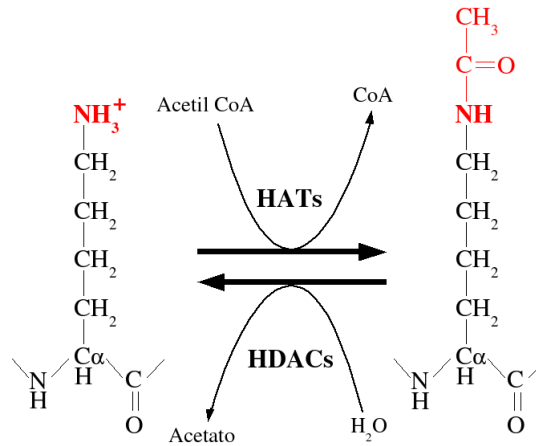


Figura 1.5. **Estructura molecular de la lisina y la acetil-lisina.** La acetilación de histonas es catalizada por complejos HATs, y revertida por complejos HDACs. Modificada a partir de una imagen de <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch4G.htm>.

Rpd3 [51] o la acetilación por parte de SAGA del promotor del gen *HIS3* [52]. La acetilación o desacetilación global no dirigida se produce independientemente de proteínas de unión a DNA de secuencia específica. Este tipo de acetilación se descubrió cuando la delección de las HDACs *RPD3* y *HDA1*, o la de las HATs *GCN5* o *ESAI* produjeron incrementos o disminuciones de los niveles de acetilación en un dominio de 4.25 kb de cromatina que no poseía secuencias conocidas para el reclutamiento de estas actividades [53]. Se cree que la actuación de los complejos HAT o HDAC de forma no dirigida (global) a lo largo del genoma puede contribuir al cambio rápido del estado de acetilación de la cromatina [54].

1.2.1.1. Histona acetiltransferasas

Los complejos HATs se han clasificado tradicionalmente en dos grandes grupos: A y B, en función de su localización subcelular y de su capacidad de modificar histonas ensambladas en nucleosomas [55]. Las HATs de tipo A son enzimas nucleares que pueden acetilar histonas ensambladas en cromatina, y que

habitualmente están relacionadas con procesos de regulación de la transcripción. Por su parte, los complejos de tipo B se han descrito clásicamente como complejos de localización citoplasmática, y que únicamente acetilan histonas libres, presuntamente para su posterior deposición en la cromatina. Sin embargo, nuestro grupo ha sugerido recientemente que la clasificación debería basarse sólo en la capacidad de acetilar histonas nucleosomales, puesto que el complejo HAT B de *S. cerevisiae* ha sido detectado en el núcleo [56, 57]. Por el momento se conocen dos HATs de tipo B en levadura. La primera, denominada HAT B y cuya subunidad catalítica es la proteína Hat1, tiene especificidad por la histona H4. La segunda, que contiene como subunidad catalítica a Gcn5p y es específica por la histona H3, recibe el nombre de Hat B3.1 [58]. El resto de HATs que han sido aisladas pertenecen al tipo A.

Han sido descritas más de veinte proteínas de distintos organismos eucariotas (ver tabla 1.2 en pág. 34) con actividad HAT que intervienen en la regulación de la expresión de los genes y en otros procesos celulares esenciales. Estas proteínas se encuentran en diferentes organismos eucariotas, en los que se han vinculado con un gran número de funciones [59]: ensamblaje de nucleosomas, replicación, reparación y recombinación del DNA, apoptosis celular, transcripción basal, elongación del transcrito por la RNA polimerasa II, o el silenciamiento transcripcional, sin olvidar la regulación transcripcional. Es destacable que muchas de las proteínas que poseen actividad HAT (así como muchas de las proteínas que contienen otro tipo de actividad modificadora de histonas) actúan *in vivo* formando parte de complejos de elevada masa molecular, e incluso pueden formar parte de distintos complejos (por ejemplo Gcn5p de levadura se encuentra en los complejos ADA, A2, SAGA y SALSA/SLIK [60, 61, 62]). Las HATs, por tanto, se encuentran *in vivo* asociadas a otras proteínas auxiliares formando complejos multiproteicos cuyas propiedades, en particular su especificidad de sustrato, no suelen coincidir con las de la subunidad catalítica HAT que poseen. Los complejos con actividad HAT son los responsables de establecer los estados de acetilación apropiados para producir, directa o indirectamente, alguna de las múltiples funciones vinculadas con esta modificación.

Familias de Histona Acetiltransferasas

Las histona acetiltransferasas se pueden clasificar en cinco grandes familias y dos categorías independientes. Estas familias son las siguientes:

- GNATs por *Gcn5-related AcetylTransferases*
- MYST por histona acetiltransferasas relacionadas con *MOZ*, *Ybf2/Sas3*, *Sas2* y *Tip60*
- p300/CBP
- La familia de HATs relacionadas con hormonas nucleares
- La familia de HATs que son factores transcripcionales generales asociados a TBP (como Taf1p de levadura y TAFII250 de humanos)

Por otro lado el complejo TFIIIC de humanos se considera una categoría independiente, así como la proteína Nut1, debido a la falta de similitud estructural con enzimas de otras familias.

La familia GNAT comprende HATs que muestran similitud de secuencia y de estructura con Gcn5p. Las HATs de este grupo contienen tres regiones de secuencia conservada de una longitud total de unos 18 aminoácidos (motivos D, A y B del dominio histona acetiltransferasa). Algunos de los miembros de esta familia también poseen otros dominios funcionales, como una región amino terminal de homología con PCAF de metazoos, y un bromodominio carboxilo terminal que interacciona con residuos de lisinas acetilados de histonas.

Una de las funciones más relevantes asignadas a los miembros de la familia GNAT ha sido la activación de la transcripción. De hecho, la proteína Gcn5 fue descrita inicialmente como coactivador transcripcional. Los mecanismos por los que estas enzimas son capaces de activar la transcripción están siendo estudiados principalmente en levadura. Se ha demostrado que el complejo dependiente de Gcn5p, SAGA, estimula la activación de Gal4-VP16 (quimera entre dominio de unión a DNA del activador de levadura Gal4, y el factor transcripcional del

virus del herpes simplex, VP16) requiriendo para ello su actividad HAT [63]. El reclutamiento de SAGA (un complejo con similitudes al complejo STAGA de humanos) hacia los activadores ocurre a través de contactos con la proteína Tra1 de levadura. Sorprendentemente, el complejo SAGA está implicado tanto en la activación del promotor del gen *ARG1* por el activador Gcn4, como en la represión del mismo promotor mediante el complejo ArgR/Mcm1 [64].

La reparación del DNA es otra de las funciones de las HATs de la familia GNAT. El complejo STAGA se asocia con la proteína de unión a DNA dañado por radiación UV-DDB (*UV-DNA Double strand Break*), también llamada p127, y a SAP130 [65]. El complejo HAT humano TFTC (similar a SAGA de levadura) también se asocia con SAP130, y exhibe mayor actividad sobre nucleosomas que contienen DNA irradiado con luz UV [66]. Asimismo, en levadura se ha demostrado recientemente, que Hat1p (miembro de la familia de GNATs) se une a roturas de doble hebra de DNA, incrementando la acetilación de la lisina 12 de H4 (sitio específico de acetilación de Hat1p) [67].

Los miembros de la familia MYST se identificaron inicialmente como supuestas HATs en base a una región en el dominio MYST, que es homóloga al dominio canónico de unión a acetil CoA (motivo A), encontrado en la superfamilia GNAT. Este dominio MYST contiene además del motivo A, un dedo de zinc importante para la función HAT [49]. Las HATs de esta familia desempeñan un amplio rango de funciones celulares, de modo similar a las GNATs, aunque las HATs MYST también tienen un papel en el silenciamiento de la transcripción. El cromodominio que contienen algunas de las HATs pertenecientes a esta familia, el cual es responsable de la unión a lisinas metiladas en histonas nucleosomales, también podría mediar su papel en el silenciamiento. De hecho, el silenciamiento génico fue la función por la que se caracterizaron los genes de levadura *SAS2* y *SAS3*. Estos fueron seleccionados porque su mutación potencia defectos de silenciamiento epigenéticos en cepas mutantes *sir1* [68]. Tanto Sas2p como Sas3p promueven el silenciamiento en el *locus* de levadura *HML*, mientras que lo antagonizan en *HMR*. Además, Sas2 promueve el silenciamiento en los telómeros, probablemente a través de la acetilación de la lisina 16 de H4 para mantener las fronteras de la heterocromatina telomérica [69, 70]. La histona

Tabla 1.2. Familias conocidas de histona acetiltransferasas en distintos organismos. Modificada a partir de [3].

familia HAT	Enzima HAT	Organismos conocidos	Complejo	Especificidad	Función
GNAT	Gcn5	De levadura a humanos	SAGA, ADA, SALS/SLIK, HAT A2, HAT B3.1	H3, H2B	Coactivador
	PCAF	Humanos, ratón	PCAF	H3, H4	Coactivador
	Hat1	Levadura	HAT B, HAT A3	H4 (K5, K12), H2B	Deposición de histonas, silenciamiento
	Elp3	De levadura a humanos	Elongador	H3, H4	Elongación transcripcional
	Hpa2	Levadura		H3, H4	Desconocida
	ATF-2	Humanos, ratón		H2B, H4	Factor de transcripción específico de secuencia
MYST	Sas2	Levadura	SAS	H4 K16	Silenciamiento
	Sas3	Levadura	NuA3	H3, H4, H2A	Silenciamiento
	MORF	Humanos		H4>H3	Desconocida
	Tip60	Humanos	TIP60	H4>>H3, H2A	Interacción con Tat del HIV, reparación de DNA, Apoptosis
	Esa1	Humanos, levadura	NuA4	H4, H2A	Progresión en el ciclo celular
	MOF	Mosca de la fruta	MSL	H4 (K16)	Compensación de la dosis por hiperactivación del cromosoma X
	Hbo1/Chm	Humanos, mosca de la fruta	HBO1	H3, H4	Replicación del DNA
	MOZ	Humanos	AML1	H3, H4>H2A	Activación de la transcripción, otras funciones desconocidas
	CLOCK	Ratón, mosca de la fruta	CLOCK/BMAL1	H3, H4	Regulación transcripcional genes ritmo circadiano
p300/CBP	p300	Organismos multicelulares		H2A, H2B, H3, H4	Coactivador
	CBP			H2A, H2B, H3, H4	Coactivador
Coactivadores receptores de hormonas	ACTR	Humanos, ratón		H3>H4	Coactivadores receptores de hormonas
	SRC-1			H3>H4	Coactivadores receptores de hormonas
	TIF2				Coactivadores receptores de hormonas
TAFII250	Taf1/TAFII250	De levadura a humanos	TFIID	H3>H4, H2A	Factor asociado a TBP, Progresión en el ciclo celular
TFIIIC	TFIIIC220	Humanos	TFIIIC	H3, H4>H2A	Transcripción mediada por RNA polimerasa III
	TFIIIC110				
	TFIIIC90				
Nut1	Nut1	Humanos, levadura	Mediador	H3>H4	Transcripción mediada por RNA polimerasa II

desacetilasa Sir2p parece tener un papel antagonista al de Sas2p, en cuanto a que desacetila el mismo residuo que acetila Sas2p. En *Drosophila* se ha caracterizado una MYST denominada Chameau (Chm), homóloga a la humana HBO1, que es supresor dominante de la variegación por efecto de posición [71].

La activación de la transcripción es otra de las funciones de las proteínas de la familia MYST. El complejo NuA4, cuya subunidad catalítica es la proteína MYST Esa1, puede unirse específicamente a nucleosomas asociados a activadores para producir una activación transcripcional *in vitro* [63]. Además, la proteína Tra1, única subunidad común entre NuA4 y SAGA (dependiente de Gcn5), es capaz de interactuar con activadores ácidos [72]. Cabe resaltar que se ha descrito que NuA4 toma parte en la acetilación global genómica, aunque también se encuentra presente en promotores de genes específicos [73, 53]. También el complejo NuA3 de levadura, que contiene la proteína MYST Sas3 [74], desempeña un papel en la transcripción. NuA3 interactúa con Spt16p, la cual forma parte del complejo implicado en la elongación de la transcripción FACT (*F*acilitates *C*hromatin *T*ranscription). MOZ humana (*M*onocytic *l*eukaemia *Z*inc *f*inger), otra HAT de tipo MYST, estimula la transcripción mediada por el complejo AML-1 (*A*cute *M*yeloid *L*eukaemia 1), aunque probablemente esté mediada por su dominio de transactivación, y no por su dominio HAT [75].

Por otro lado, Esa1p es esencial en *S. cerevisiae*, y NuA4, el complejo multiproteico del que forma parte, es imprescindible para el crecimiento celular. Estudios sobre proteínas asociadas a Esa1 y su homóloga humana, Tip60 (*T*at *i*nteractive *p*rotein, *60* *kDa*), han mostrado conexiones entre ellas y el control de la proliferación celular. Por ejemplo, la proteína TRRAP humana, homóloga a Tra1 de levadura, interactúa con c-Myc, E2F y E1A (oncoproteína de adenovirus) y es requerida para sus actividades de transformación celular [76, 77, 78]. El complejo HAT NuA4 es necesario para la transcripción dependiente de p53 en levadura, presuntamente a través de su subunidad Yng2 (homóloga al supresor de tumores humano ING1). Especialmente llamativo es el hecho de que en levadura el doble mutante *gcn5Δsas3Δ* sea sintético letal y bloquee el ciclo celular en la transición G2/M [79]. La reparación del daño en DNA también se encuentra entre las funciones de las HATs de este tipo. Concretamente NuA4 es necesario

para la función de p53 expresada en levadura, y asimismo mutaciones en subunidades del complejo NuA4 potencian la sensibilidad a agentes que dañan el DNA [80]. La subunidad Yng2 de NuA4 está implicada en la respuesta al daño en DNA durante la fase S, lo que sugiere un papel importante para ese complejo en el mantenimiento cromosómico en la replicación del DNA [81]. En particular se ha demostrado que la acetilación dependiente de Esa1p es requerida para la reparación de roturas de DNA de doble cadena (DDSB, *DNA Double Strand Break*), e implica un complejo que contiene Arp4p en los lugares de rotura. Curiosamente, Tip60p, homóloga de Esa1p en humanos, también está implicada en reparación del DNA y apoptosis [82].

La familia de HATs p300/CBP incluye a las dos proteínas homólogas p300 y CBP de eucariotas multicelulares, que son normalmente referidas como una única entidad (p300/CBP) por ser consideradas homólogos estructurales y funcionales. p300/CBP es un activador transcripcional global con papeles críticos en gran número de procesos celulares, como el control del ciclo celular, la diferenciación y la apoptosis. Las HATs de esta familia estimulan la transcripción de genes interaccionando, directamente o a través de otras proteínas, con factores de transcripción de unión a promotores, como CREB, receptores nucleares de hormonas y activadores relacionados con oncoproteínas [83].

La familia de HATs relacionadas con hormonas nucleares también se ha vinculado con la activación transcripcional, pero en este caso desencadenada por señales hormonales. Esta familia de HATs se halla implicada en otro sistema de activación transcripcional, como demuestran las actividades HAT de los coactivadores humanos ACTR y SRC-1, que interaccionan con receptores nucleares de hormonas [83].

Finalmente, la familia de HATs que son TAFs (*TBP Associated Factor*) incluye a la humana TAFII250 que posee dos bromodominios y una actividad quinasa asociada. Se ha postulado que la actividad HAT de TAFII250 podría estar relacionada con la formación del complejo de iniciación de la transcripción [83]. La proteína homóloga de TAFII250 en levadura es Taf1/Taf145 [84]. Taf1p forma parte de TFIID, y carece de bromodominios, por lo que se ha propuesto que la

proteína Bdf1, que se asocia a las histonas H3 y H4 y posee dos bromodominios, podría corresponder al extremo carboxilo terminal de TAFII250 de organismos superiores [85, 86].

1.2.1.2. Histona desacetilasas

Las histona desacetilasas (HDACs en adelante) están clasificadas en varias familias que están conservadas de levadura a humanos [87, 88]. Las HDACs de clase I, II y III de humanos, son homólogas a las HDACs de levadura Rpd3p, Hda1p y Sir2p, respectivamente. Las clases I y II son sensibles al inhibidor de HDACs tricostatina A (TSA) [89], mientras que la clase III es insensible y su actividad requiere NAD^+ como cofactor [90]. Al igual que las HATs, las HDACs se han visto implicadas en una serie de funciones celulares muy diversas, como son la represión transcripcional, el desarrollo, la diferenciación celular, la inactivación del cromosoma X en hembras de mamíferos y la variegación por efecto de posición en la mosca de la fruta.

La clase I incluye a HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8 de mamíferos, mientras que la clase II incluye a HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 y HDAC10. Ambas clases están definidas por su homología a las dos HDACs de levadura mencionadas anteriormente, Rpd3p y Hda1p.

Las HDACs de clase I poseen una localización nuclear y se expresan en todo tipo de tejidos. Las funciones con las que se han relacionado las HDACs I son diversas, entre ellas se encuentran la represión transcripcional y la diferenciación celular. Ejemplos de HDACs de este tipo son el complejo remodelador de la cromatina NuRD (presente en mosca de la fruta, ratón y humanos) que contiene HDAC1 y HDAC2, y el complejo Sin3 que comparte las subunidades catalíticas HAT, y contiene el correpresor transcripcional general Sin3 [91]. Los complejos de clase I interaccionan en mamíferos con una gran variedad de reguladores transcripcionales, muchos de ellos proteínas de unión a DNA, como el represor Mad de [92] y los correpresores de hormona dependientes de receptor NCoR y SMRT [93]. El complejo HDAC de levadura Rpd3/Sin3 se asocia al factor trans-

cripcional Ume6 para reprimir genes de meiosis temprana en crecimiento vegetativo [94]. Los complejos de esta clase también interaccionan con otro tipo de proteínas aparte de factores transcripcionales, como son: DNA metiltransferasas o histona metiltransferasas (Dnmt3p o Su(Var)3-9 [95, 96]), factores reguladores del desarrollo (proteínas del grupo Polycomb [97]) y reguladores del crecimiento celular (p33ING1 [98]).

A diferencia de las HDACs I, las HDACs de tipo II se expresan de modo específico de tejido en mamíferos, y algunas de ellas (HDAC4, HDAC5 y HDAC7) se movilizan del citoplasma al núcleo tras la fosforilación. Los miembros de esta familia participan en la diferenciación del músculo esquelético por interacción con proteínas de la familia del factor transcripcional específico de músculo MEF2 [99]. También interaccionan con los correpresores NCoR, SMRT y BcoR (correpressor específico del gen *BCL6*) [100, 101].

En último lugar, las HDACs de clase III se definen por guardar homología con el dominio catalítico del factor transcripcional de silenciamiento Sir2p (*Silent mating type Information Regulator 2*). Sir2p se aisló genéticamente como un miembro de la familia SIR de proteínas de levadura. Las cuatro proteínas SIR (Sir1, Sir2, Sir3 y Sir4) están implicadas en la formación de cromatina silenciada altamente compactada que está hipoacetilada en H3 y H4 [40, 41].

Regulación de la función de HATs y HDACs

Las HATs y HDACs controlan multitud de procesos celulares a través de la acetilación de sustratos cromatínicos. La desregulación de HATs y HDACs se ha relacionado con el desarrollo de un gran número de tumores humanos [102, 103]. Se ha demostrado que la función de las HATs y las HDACs está fuertemente regulada en las células a través de los tres mecanismos fundamentales [44] que se comentan a continuación.

El primero de los mecanismos consiste en la modulación de los niveles de proteína. Ésta ha sido documentada en ratón para HDAC1, para la cual el nivel de mRNA aumenta tras la hiperacetilación de las histonas [104], y también se

incrementa en una línea de linfocitos de ratón estimulada con factores de crecimiento [105].

En segundo lugar la actividad de estos enzimas puede ser incrementada o disminuida por distintos medios. En algunos casos la modificación postraduccional de la propia enzima, como la fosforilación de CBP [106] o la sumoilación de HDAC4 [107] consiguen alterar la actividad enzimática. En otras ocasiones las interacciones con otras proteínas son las que modifican la actividad HAT o HDAC. Por ejemplo se ha descrito que la actividad HAT de p300/CBP es estimulada por factores transcripcionales específicos de secuencia como HNF1- α [108] y Elk1 en su forma fosforilada [109]. También la disponibilidad de cofactores metabólicos puede afectar a la actividad, como es el caso de Sir2p. Sir2p, que requiere el cofactor NAD⁺, se encuentra relacionada genéticamente con algunas enzimas de rutas metabólicas de NAD⁺, lo que sugiere que los niveles de acetilación y las redes metabólicas están acoplados [110].

Por último, la disponibilidad de los enzimas puede regularse por su capacidad para interactuar con factores transcripcionales específicos, que a veces implica el cambio de su localización subcelular. Un ejemplo típico de regulación por localización subcelular es el de la fosforilación de HDACs de tipo II. HDAC5 se fosforila por proteína quinasas dependientes de Ca²⁺/Calmodulina (CaMKs) para ser relocalizada al citoplasma en un proceso de crucial importancia para la diferenciación muscular [111]. Por otro lado, CBP puede ser metilada por CARM1 (*Coactivator ARginine Methyltransferase 1*) de modo que disminuye su afinidad por CREB fosforilado, y se encuentra disponible para interactuar con otros factores de transcripción [112].

1.2.2. Metilación

La metilación postraduccional de las histonas fue descrita hace más de cuatro décadas [113, 114], pero las funciones asociadas a esta modificación covalente han permanecido sin desvelar durante mucho tiempo. La metilación de histonas nucleosomales en múltiples residuos y en patrones definidos forman parte del

sistema de señalización postulado en la hipótesis del código de histonas. Esta modificación se lleva a cabo sobre las cadenas laterales básicas de arginina y lisina, generalmente de las regiones amino terminales de las histonas H3 y H4, aunque también se metilan residuos de las zonas globulares.

Las lisinas se pueden mono-, di- y trimetilar por acción de histona metiltransferasas (HMTs), mientras que las argininas únicamente se pueden monometilar y dimetilar por las proteína arginina metiltransferasas (PRMTs). Dentro de las HMTs específicas de lisinas encontramos la familia SET, que se caracteriza por poseer un dominio SET (*Su(Var) Enhancer of Zeste Trithorax*). Dot1p es la única HMT que no contiene dominio SET, aunque se ha determinado la estructura cristalina de las enzimas Dot1p de levadura y humanos, observándose propiedades estructurales semejantes a las de las proteínas SET, y también a las de las PRMTs [115, 116]. Por otro lado, la dimetilación de la arginina puede ser asimétrica o simétrica, siendo catalizadas las reacciones por PRMTs de tipo I o de tipo II respectivamente.

La metilación de histonas se había considerado una modificación postraduccional irreversible hasta muy recientemente. Dos trabajos demostraron que la forma monometilada de la arginina es desmetilada a citrulina por la enzima humana PAD4, lo que dejaría por resolver el problema de la regeneración del residuo de arginina para permitir posteriores modificaciones [117, 118]. Asimismo se ha descrito otra enzima humana, LSD1, capaz de desmetilar las formas mono- y dimetiladas de la lisina 4 de la histona H3 a través de una reacción redox que genera formaldehído [119], regenerando el residuo de lisina que puede volver a ser metilado. Sin embargo, aún no se han descrito enzimas que desmetilen la forma trimetilada de la lisina.

Históricamente la metilación ha sido vinculada a la represión transcripcional y al establecimiento de heterocromatina. Dependiendo del residuo metilado y de su relación con otras modificaciones de la cromatina en su entorno, esta modificación se encuentra asociada a una función diferente. Por ejemplo, la metilación de la lisina 9 de H3 se ha relacionado con la formación de heterocromatina y la represión transcripcional, mientras que la metilación de la lisina

4 de H3 se asocia a la activación de la transcripción génica [36]. La heterocromatina se puede describir estructuralmente como largos segmentos de genoma, enriquecidos en secuencias repetitivas, con baja densidad de genes y con series de nucleosomas de espaciado regular. Además, bioquímicamente estos dominios heterocromatínicos se caracterizan por la hipoacetilación de histonas, la metilación de la lisina 9 de la histona H3, y la metilación del DNA. Sin embargo, la metilación en la lisina 9 no es un marcador de heterocromatina en *S. cerevisiae*, puesto que no se produce en este organismo. La inactivación del cromosoma X en mamíferos, la impronta (*imprinting*), y el establecimiento de heterocromatina constitutiva son procesos que poseen mecanismos similares a los de la represión transcripcional heredable, y que dependen de HMTs con distintas especificidades.

Por otro lado, la metilación se ha relacionado con la activación de la transcripción, concretamente en los procesos de inicio y elongación de la transcripción. Se ha determinado que los genes activos se hallan metilados en la lisina 4 y 36 de H3, lo que sugiere su participación en la activación génica [120, 121]. Según el modelo actual desarrollado a partir de estudios en *S. cerevisiae*, la monoubicuitinación (ver apartado 1.2.3) de la lisina 123 de H2B facilita el reclutamiento de Set1, una HMT específica de la lisina 4 de H3 [122]. Esto induciría la metilación de este residuo y conjuntamente al reclutamiento de Set1, se produciría el del complejo de elongación Paf1, lo cual coincidiría con la fosforilación de la serina 5 del dominio carboxilo terminal (CTD) de la RNA polimerasa II [123, 124]. Sin embargo algunos autores han apuntado que la monometilación de la lisina 4 de H3 no se ve afectada por la pérdida del complejo Paf1, ni por la pérdida de la monoubicuitinación de la lisina 123 de H2B [125]. A continuación la metilación de K4 de H3 podría ser seguida de la desubicuitinación de la K123 de H2B por Ubp8p, componente del complejo HAT SAGA [126], lo que permitiría el reclutamiento de Set2. Esta segunda HMT metilaría la lisina 36 de H3, lo que coincide con la fosforilación de la serina 2 del CTD y el inicio de la etapa de elongación.

Algunos autores han sugerido que la metilación de histonas en genes activos podría tener un papel de marcador de larga duración para la propagación del es-

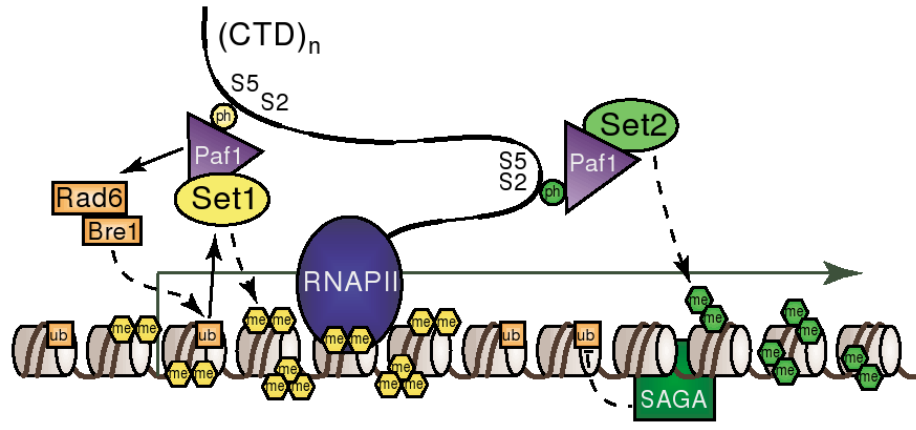


Figura 1.6. **Metilación de histonas y activación transcripcional.** Se representa la interacción entre la fosforilación de los residuos de serina 2 y 5 del CTD de la RNA polimerasa II, la metilación de las lisinas 4 y 36 de H3, y la ubiquitinación de la lisina 123 de H2B. Extraído de la revisión [122].

tado activo tras la división celular [122]. De hecho, una de las funciones que se le han atribuido a la metilación de histonas es el mantenimiento de la memoria celular de estados transcripcionales activos y reprimidos a lo largo del desarrollo en metazoos. Las proteínas tipo SET del grupo Trithorax (TrxG), con actividad HMT sobre la lisina 4 de H3, se han relacionado con la propagación del estado activado [127], mientras que las del grupo Polycomb (PcG), también con el dominio SET, median el estado reprimido de la cromatina a través de dos familias de complejos con actividad HMT, los complejos represores PRC1 y PRC2 [128]. La impronta genómica es otro de los procesos en los que se halla implicada la metilación de las histonas y en este caso también la metilación del DNA. En mamíferos la impronta consiste en la represión monoalélica de los genes heredados por vía materna o paterna. La detección de metilación de histonas específicas de alelos en genes con impronta sugirió una relación entre ambos procesos [129]. La pérdida de este fenómeno en un subconjunto de genes de células de ratón deficientes en un componente de un complejo Polycomb, apunta a una relación entre el proceso de desarrollo y los complejos remodeladores de la cromatina que dependen de proteínas tipo PcG [130].

La metilación de la lisina 79 en la histona H3 fue la primera de las modificaciones postraduccionales localizada fuera del extremo amino terminal de las histonas [131, 132]. Ensayos *in vivo* han revelado que esta posición es necesaria para la correcta formación y mantenimiento de cromatina silenciada en las tres regiones de este tipo que aparecen en *S. cerevisiae* (telómeros, *loci* de determinación sexual *HMR* o *HML*, y rDNA) [131, 133, 134], a pesar de que la lisina 79 no se encuentra metilada en ninguna de esas regiones. Se ha propuesto un modelo en el que la metilación de la posición 79 actúa previniendo la unión de las proteínas SIR a las regiones de cromatina activa, o eucromatina. Así se aseguraría que estos factores SIR se encuentran disponibles para el ensamblaje de estructuras heterocromáticas en las localizaciones adecuadas [135]. El modelo se apoyó en la observación de que el 90 % de las moléculas de H3 en levadura se encuentran metiladas en esa posición, y este porcentaje concuerda con la fracción de genoma que en ese organismo forma parte de eucromatina [131]. Por otro lado, otro trabajo posterior demostró que la metilación de K79 de H3 se producía a lo largo de las regiones eucromáticas del genoma de levadura (asimismo en regiones eucromáticas de eucariotas superiores), pero que se halla infrarepresentada en heterocromatina [134]. A nivel estructural, esta modificación se ha encontrado en la superficie del nucleosoma, en una región accesible al solvente, la cual se había identificado como genéticamente importante para la estructura de la cromatina silenciada. Dot1p es la HMT responsable de esta modificación en levadura, y su homóloga hDOT1L ha sido implicada en la desregulación de genes diana de MLL (*Mixed Lineage Leukemia*) en leucemia.

1.2.2.1. Relación entre metilación y acetilación de histonas

Recientemente se ha sugerido la existencia de una coordinación entre las actividades responsables de la metilación y la acetilación de histonas. Debido a que la metilación del extremo amino terminal de H3 se ha visto implicada en mediar la interacción con nucleosomas de diversas actividades HAT y una HDAC, resulta atractivo pensar que la metilación de determinados residuos de H3 pueda servir como transductor universal de la acetilación de histonas [136].

Entre las HATs cuya actividad se ha vinculado con la metilación de H3 se encuentran NuA3 (ver apartado 3.1.1 en pág. 64), NuA4, SAGA y SALSA/SLIK.

En *S. cerevisiae* se ha descrito una hipermetilación de la lisina 4 de H3 tras la activación transcripcional de las secuencias UAS (*Upstream Activation Sequence*) de *GALI-10*. Esta hipermetilación es dependiente de la actividad ubicuitín proteasa de Ubp8p, y se piensa que puede estabilizar aún más el reclutamiento de SAGA y SALSA/SLIK [137]. La estabilización se produciría gracias a la interacción de los cromodominios de Chd1, una proteína con actividad ATPasa y helicasa componente de SAGA y SALSA/SLIK, con la lisina 4 de H3 metilada. Respaldo esta teoría, se ha comprobado que SALSA/SLIK muestra una actividad preferencial sobre péptidos amino terminales de H3 dimetilados en la lisina 4 frente a la histona sin modificar [138].

La actividad NuA4 que acetila la lisina 8 de H4 también se ha visto relacionada con la trimetilación de la lisina 4 de H3 y la di- o trimetilación de la lisina 36 de H3. Un estudio mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) mostró que la asociación de Esa1p, subunidad catalítica de NuA4, al promotor activado de *MET16*, depende de la presencia de Set1 y Spp1 (componentes del complejo HMT COMPASS de levadura), y de Set2 [139]. Además, las subunidades Esa1 y Eaf3 de NuA4, contienen cromodominios, y se han detectado interacciones genéticas entre *SET2*, *EAF1* y *EAF2* (componentes también de NuA4) [140]. Todos estos datos sugieren fuertemente que NuA4 interacciona con los residuos de lisina 4 y 36 de H3 una vez metilados por Set1p y Set2p, respectivamente.

La actividad HDAC Rpd3 de levadura también se ha visto relacionada con la metilación del extremo amino terminal de H3 [141, 142]. Se han identificado dos complejos Rpd3 según su tamaño: Rpd3L y Rpd3S. El complejo pequeño Rpd3S contiene la subunidad Eaf3, la cual posee un cromodominio que permite a Rpd3S unirse a la lisina 36 de H3 metilada. Esta metilación se produce por acción de Set2, una HMT asociada a la RNA polimerasa II. Se ha propuesto que la desacetilación por Rpd3 elimina la acetilación asociada a la elongación para evitar inicios intragénicos de la transcripción [141, 142].

1.2.3. Fosforilación, ubiquitinación y sumoilación

Fosforilación

La fosforilación de histonas ha sido vinculada a múltiples procesos celulares: condensación de cromosomas en mitosis y meiosis [143], la reparación del DNA, procesos de activación y represión transcripcional [144, 145] y apoptosis o muerte celular programada [146]. Se pueden fosforilar residuos de serina y treonina de las cuatro histonas internas y también de H1, tanto en residuos de serina, como de treonina [147, 36].

Por ejemplo, la proteína Snf1, una quinasa de histonas, que fosforila la serina 10 de la histona H3, es requerida para una activación transcripcional adecuada [148]. Además esta fosforilación es necesaria para la acetilación dependiente de Gcn5p en la vecina lisina 14 [149]. En el caso de la reparación del DNA, la quinasa de punto de control (*checkpoint*) ATM (Mec1 en levadura), es reclutada a la zona en la que se ha producido la rotura del DNA y fosforila la histona H2A en levadura, o la variante H2AX en mamíferos [36]. Otra función en la que se ha visto involucrada la fosforilación es la condensación de la cromatina. La fosforilación de H2A (en la serina 1 y la treonina 119), y de H3 (en la treonina 3 y en las serinas 10 y 28) parecen ser marcas de cromatina mitótica condensada [143]. Asimismo, la fosforilación de la serina 10 de la histona H3 también se ha relacionado con la condensación y segregación de cromosomas durante la mitosis [150, 151].

Al igual que la metilación, la fosforilación parece ser una marca que actúa conjuntamente con otras modificaciones generando patrones que son reconocidos por diferentes complejos implicados en llevar a cabo distintos procesos. Así, la fosforilación de la serina 10, induce la acetilación de la lisina 14 en H3, lo cual se ha correlacionado con la activación de la transcripción de un conjunto de genes regulados por Gcn5p [149, 148].

Ubicuitinación

Muchas proteínas son susceptibles de ser ubicuitinadas. En *S. cerevisiae* esta modificación consiste en la conjugación covalente de una porción de la proteína ubicuitina (Ubi4p) de 381 aminoácidos a un residuo de lisina [152]. En general todas las proteínas, incluyendo las histonas, pueden ser poli-ubicuitinadas, lo que se ha sugerido es una marca para la degradación de la proteína en el proteasoma [153]. Por otra parte se ha descrito que la mono-ubicuitinación de lisinas, una modificación que en este caso no está asociada a la degradación de proteínas, puede participar en la regulación de la actividad de las proteínas. La mono-ubicuitinación de las histonas, por ejemplo, consiste en la adición de únicamente 76 aminoácidos de Ubi4p (9 kDa). Así, por ejemplo, determinados precursores inactivos de factores transcripcionales de la RNA polimerasa II son procesados en el proteasoma a sus formas activas, de manera dependiente de mono-ubicuitinación, para modular la transcripción [152]. Las histonas H2A, H2B, H3, H1 y la variante H2A.Z de muchos organismos eucariotas también pueden ser mono-ubicuitinadas. En la mosca de la fruta y vertebrados las formas ubicuitinadas de H2A y H2B se localizan en la región 5' no codificante de genes con elevados niveles de expresión, dando lugar a la idea de que la ubicuitinación de histonas es requerida para la activación transcripcional. Se ha descrito que la metilación de la lisina 4 y 79 de la histona H3 son dependientes de la ubicuitinación de H2B, y estas combinaciones de modificaciones pueden afectar al estado de transcripción de determinados genes [123].

Sumoilación

La sumoilación es un proceso similar a la ubicuitinación, pero implica la conjugación de la proteína SUMO (*S*mall *U*biquitin-related *M*Odifier), cuya masa molecular es de 11 kDa y en *S. cerevisiae* se encuentra codificada por el gen *SMT3*. La sumoilación de histonas ha sido relacionada con la represión transcripcional mediada por el reclutamiento de histona desacetilasas y de la proteína heterocromatínica HP1 [154, 155]. También se ha sugerido que esta marca parti-

cipa en la atenuación de la expresión de genes transcripcionalmente activos, que posteriormente serán reprimidos [156].

1.2.4. El código de histonas y la herencia epigenética

La idea de que una serie de modificaciones postraduccionales covalentes en las histonas pueda tener una función de tipo informativo, que vaya más allá de la variación conformacional del nucleosoma por cambios en la carga de los aminoácidos, fue sugerida hace más de una década por varios grupos, entre ellos el nuestro [157, 158]. En los últimos años los descubrimientos sobre nuevas posiciones en las histonas que pueden ser modificadas y las funciones biológicas de alguna de las marcas ya conocidas o recientemente descritas, ha arrojado nuevos datos que finalmente han configurado la hipótesis del “código de histonas” [42, 159]. La enorme variedad de modificaciones covalentes y la densidad de estas marcas sobre las histonas han alentado los intentos por explicar cómo la cromatina puede mediar la regulación de la función génica y la expresión a través de estas modificaciones. De hecho, la cromatina ha demostrado ser una plataforma de señalización extraordinariamente compleja que integra señales endógenas y exógenas a la célula [160]. Esto redundaría en un sistema que permitiría la adaptación rápida de la expresión génica a estímulos fisiológicos y, simultáneamente, la transmisión de patrones de expresión heredables a la siguiente generación celular.

Esencialmente, la hipótesis del código de histonas asume que, en combinación o bien secuencialmente, las marcas en residuos de las histonas nucleosomales son una fuente de información epigenética. La información epigenética es aquella información heredable que produce cambios en la función y la expresión génica y no requiere alteraciones en la secuencia de DNA. Esta información estaría contenida en la combinación de marcas presentes en las histonas que forman los nucleosomas y en extensos dominios de cromatina formados por nucleosomas que comparten las mismas modificaciones covalentes. Así, estas modificaciones permitirían almacenar una mayor cantidad de información en la cromati-

na que la que contiene la secuencia de DNA, y además serían capaces de liberar esa información según unas reglas determinadas por el código. La transmisión de datos codificados por las histonas de las células madres a las células hijas, explicaría por qué las células hijas contienen los mismos dominios genómicos silenciados que sus progenitoras.

El código postulado implica una serie de reglas [159]:

- Las marcas postraduccionales pueden alterar estructuralmente el estado de la cromatina directamente, influyendo sobre las interacciones histona-histona o histona-DNA.
- Las marcas individuales sobre una histona pueden influir en la modificación de subsiguientes posiciones dentro de la misma histona (en *cis*), o bien en residuos de otras histonas del mismo nucleosoma (en *trans*).
- Las marcas pueden servir de anclaje a módulos de unión de proteínas reguladoras (por ejemplo bromodominios y cromodominios), que así leerían las marcas producidas por las actividades modificadoras de la cromatina (HATs, HDACs, HMTs, etc...).
- Las modificaciones que se producen en las histonas pueden ser heredables.

Recientemente se ha propuesto un modelo en el que las modificaciones químicas de aminoácidos de las regiones globulares del octámero de histonas descritas en los últimos años [161, 162, 163, 164] podrían ejercer un papel relevante en la movilidad de los nucleosomas [37], vinculando las modificaciones de las histonas y los complejos remodeladores de la cromatina. Estos aminoácidos se encuentran formando contactos histona-DNA, y por tanto son excelentes candidatos a modular la afinidad del octámero por el DNA mediante la modificación química de sus cadenas laterales. El modelo sugiere que la acción de complejos remodeladores de la cromatina expondría estos residuos modificables de las histonas, que se encuentran en la superficie lateral del nucleosoma, presentándolos a las actividades modificadoras de histonas (por ejemplo HATs). La modificación química de éstos alteraría la afinidad del octámero por el DNA, debilitando

esta interacción, y permitiendo el deslizamiento de éste a lo largo del DNA, produciendo nucleosomas remodelados establemente, o de alta movilidad. Esto facilitará el acceso a las proteínas que deben interactuar con el DNA (participantes en procesos de replicación, reparación, transcripción, etc ...). Por otro lado los nucleosomas requerirían de una nueva remodelación para permitir la acción de enzimas que eliminaran las modificaciones reversibles tales como la acetilación (HDACs) y la fosforilación (fosfatasas). Así se conseguiría obtener de nuevo nucleosomas de baja movilidad en los que las interacciones histona-DNA no se han debilitado. El cambio dinámico en el estado de los nucleosomas se debe a la naturaleza química de las interacciones entre las proteínas efectoras y la cromatina. La unión de proteínas reguladoras de la cromatina (principalmente complejos remodeladores y complejos con actividad modificadora de histonas) ha sido descrita como un proceso dinámico según estudios recientes sobre la unión de proteínas específicas de heterocromatina con afinidad por lisinas metiladas [165, 166]. En estos trabajos se demuestra que la proteína silenciadora Hpl1 de mamíferos se encuentra en un rápido intercambio con el entorno, de modo que no permanece asociada estáticamente a sus sitios de unión. Asimismo, el hecho de que la interacción de los módulos con la cromatina (interacciones cromodominio/metil-lisina y bromodominio/acetil-lisina) sea débil y sus constantes de disociación sea para ambos casos del orden de 10^{-4} - 10^{-6} , implica que la concentración de DNA asociado con proteínas efectoras y la de DNA “libre” son de magnitudes similares, de modo que las moléculas cambian continuamente de su forma libre a la unida a cromatina. Esto daría cuenta de cómo se puede conseguir un tiempo de respuesta breve para la lectura de las marcas epigenéticas a pesar de que éstas presentan una tasa de recambio bastante baja.

La hipótesis de la movilización regulada de los nucleosomas implementa el código de histonas diferenciando las posibles modificaciones químicas en dos tipos. Las de tipo I, que se localizan principalmente en las colas amino terminales de las histonas, y funcionan como reclutadores de proteínas efectoras estabilizadoras de la cromatina. Y por otro lado las de tipo II, que se posicionan fundamentalmente en la superficie lateral del nucleosoma (región del octámero en la interfaz histonas-DNA, que en las histonas corresponde al dominio globular), y

comprenden todas las modificaciones que alteran las interacciones directas entre DNA e histonas.

Se han propuesto dos nuevos conceptos dentro de la biología de las histonas que complementan el código de histonas [167]: los interruptores binarios y los casetes de modificación. Estos conceptos pueden explicar mecánicamente cómo se produce la lectura del código de histonas, y por ende, cómo ejerce su función. Recibe el nombre de interruptor binario el modelo según el cual la fosforilación de un residuo de serina o treonina próximo a un residuo metilado (lisina o arginina) produciría la pérdida de la unión del módulo efector que se encontrara interactuando con la marca de metil-lisina. Uno de los aspectos más interesantes de esta hipótesis es que ha establecido unas reglas para la predicción funcional. Si el residuo de lisina metilado se encuentra en primer lugar en el interruptor de tipo metil/fosfo, como es el caso del formado por la lys9/ser10 de la histona H3, éste codificará un estado silenciado de la cromatina. Mientras que si la lisina se posiciona en segundo lugar, como ejemplo teórico se puede tomar el interruptor thr22/lys23 de la histona H3, la cromatina se encontraría en un estado activado transcripcionalmente.

El esquema que se encuentra en la figura 1.7 muestra una serie de posibles interruptores binarios, a la vez que ilustra la gran densidad y complejidad de las marcas presentes en las histonas nucleosomales. También resulta llamativo que todos los posibles interruptores binarios se localicen en los extremos amino terminales, en los bordes de las regiones helicoidales, o bien en los bucles que conectan las hélices α del motivo *histone fold*. Esto permitiría que fueran accesibles a actividades modificadoras de histonas. Este modelo no incluye explícitamente otros posibles interruptores binarios (por ejemplo acetil/fosfo o ubicuitil/fosfo) en los que la fosforilación liberaría los módulos de unión a acetil-lisinas o ubicuitil-lisinas. Estos tipos de interruptores podrían no ser necesarios puesto que la acetilación y la ubicuitinación son modificaciones reversibles por actividades enzimáticas.

Por otro lado un casete de modificación consiste en una secuencia de 3 a 5 aminoácidos que contiene un número elevado de marcas covalentes distintas. Por

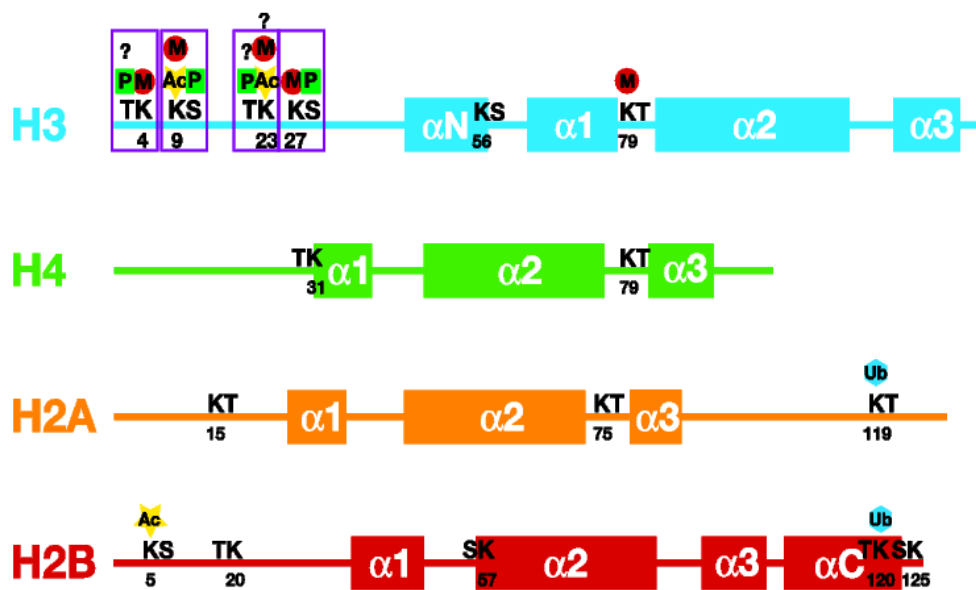


Figura 1.7. **Modelo de interruptor binario.** Se representan las secuencias de las cuatro histonas internas humanas, en las que se han señalado la presencia de motivos T/SK y KS/T (T, treonina; S, serina; K, lisina). Además se han indicado los lugares conocidos de modificaciones postraduccionales en los interruptores propuestos (P, fosforilación; M, metilación; Ac, acetilación; Ub, ubiquitinación). Se muestran cuatro posibles interruptores metil/fosfo en el extremo amino terminal de la histona H3. Extraído de [167].

ejemplo el extremo amino terminal de la histona H4 cuya secuencia es Ser-Gly-Arg-Gly-Lys, puede contener hasta 3 marcas, fosforilación en la primera posición, metilación en la tercera y acetilación en la quinta. Esto generaría hasta 2^3 posibles patrones de modificación en ese casete. Las modificaciones en residuos adyacentes a las marcas reconocidas por los sitios de unión de los módulos efectores pueden afectar el reconocimiento y la unión de los mismos. La presencia de los casetes de modificación en las histonas sugiere que puedan existir módulos con la capacidad de reconocer estos complejos patrones de modificación.

Algunos autores, pese a reconocer el papel que puedan desempeñar *in vivo* las modificaciones de las histonas, cuestionan la existencia de un código de señalización [168, 50]. Argumentan que el número total de modificaciones no contiene necesariamente más información que la suma de las modificaciones individuales. Estos autores apuntan que sólo si la lectura de los patrones se produjera combinatoriamente, esto evidenciaría un código. También se ha sugerido que los patrones de modificaciones de histonas que poseen diversos grupos de genes [168] podrían ser el resultado de una cascada de eventos, implicando la acetilación y la desacetilación de lisinas individuales. Por último, los dos tipos de acetilación descritos hasta la fecha (global y dirigida a promotores) son difíciles de integrar en la hipótesis del código de histonas, y aún no se han encontrado los mecanismos moleculares que dictarían el comportamiento de las actividades modificadoras de histonas para cada cada ámbito.

Parte 2

Objetivos

Como se ha visto en las páginas previas, las modificaciones de las histonas constituyen un mecanismo del que las células de los organismos eucariotas se han dotado evolutivamente, por el cual señalizan regiones de la cromatina más o menos definidas. De este modo, las diferentes funciones que ejerce esta estructura nucleoproteica pueden ser facilitadas o reguladas. Sin embargo, pese a la abrumadora acumulación de datos que sustentan la existencia de una interrelación entre las funciones y las modificaciones (o su secuencialidad), se está aún lejos de establecer vínculos inequívocos donde las causas y sus efectos se encuentren bien identificados y separados. Siendo la acetilación de las histonas una de las modificaciones más extendidas, el objetivo general de este trabajo ha sido profundizar en el conocimiento de las actividades histona acetiltransferasa existentes en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

El enfoque inicial ha continuado la trayectoria bioquímica del laboratorio, donde se habían identificado varios complejos HAT. No obstante para algunos de ellos no se habían establecido las subunidades catalíticas correspondientes. El primero de los objetivos del trabajo ha consistido, pues, en caracterizar la composición de estos complejos estudiando las subunidades catalíticas de los complejos HAT A1 y HAT A4.

En una segunda aproximación se ha empleado el análisis de localización genómica que implica inmunoprecipitación de cromatina combinada con chips de DNA. Esta potente técnica permite confeccionar mapas transcripcionales que describen el posicionamiento detallado de activadores transcripcionales y el estudio de los patrones de modificaciones postraduccionales en el genoma. Con el uso de esta técnica se ha pretendido aumentar el conocimiento sobre las funciones que pueda ejercer *in vivo* la acetilación de histonas. Concretamente uno de los objetivos ha sido la localización genómica de diversas HATs (Sas3p, Sas2p, Nut1p, Gcn5p, Hpa2 y Elp3p) utilizando macrochips de ORFs de *S. cerevisiae*. Dado que las HATs mencionadas son específicas por la histona H3, otro de los objetivos fue analizar el efecto de la delección de sus genes sobre la acetilación de la lisina 14 de la histona H3, una posición que se ha relacionado con frecuencia con la actividad transcripcional.

Finalmente, y también con objeto de establecer nuevas conexiones entre la acetilación de las histonas y sus posibles funciones, se ha realizado un estudio de la relación entre esta modificación y el envejecimiento celular. Dentro de este último punto, y debido a que determinados componentes del complejo HAT B habían sido vinculados con el silenciamiento transcripcional (proceso íntimamente relacionado con el envejecimiento en levadura), el último de los objetivos ha sido investigar el efecto de la delección de los genes dos de los componentes del complejo HAT B (Hat1p y Hat2p) sobre el envejecimiento y el transcriptoma celular.

Parte 3

Análisis bioquímico de complejos histona acetiltransferasa de *Saccharomyces cerevisiae*

“Las cubiertas [del plan de negocio de Epiphyte Corp.] están hechas con un papel duro fabricado a mano a partir de paja de arroz, fibras de bambú, cáñamo salvaje y agua cristalina de glaciación por unos artesanos arrugados que trabajan en un templo rodeado por la niebla y esculpido en roca volcánica situado en una isla que sólo es conocida por viajeros aburridos de la Costa Oeste enfundados en spandex y con buena capacidad aeróbica. Calígrafos de la dinastía Ming reconstruidos molecularmente han dibujado sobre la portada un mapa impresionista del mar de China Meridional empleando pinceles de crines de unicornio mojados en tinta manufacturada por monjes estilistas ciegos a base de trozos de carbón vegetal producidos al quemar a mano fragmentos de la Cruz Verdadera.”

Neal Stephenson, en **Criptonomicón**, Libro I: El Código Enigma.

3.1 Antecedentes

3.1.1. Complejos histona acetiltransferasa de levadura

En la levadura *S. cerevisiae*, se han descrito hasta la actualidad nueve genes codificantes de proteínas que poseen actividad catalítica HAT *in vitro* (tabla 3.1).

Tabla 3.1. Genes de histona acetiltransferasas identificados en *S. cerevisiae*.

No esenciales	<i>HAT1</i>	<u>H</u> istone <u>A</u> cetyl <u>T</u> ransferase <u>1</u>
	<i>GCN5</i>	<u>G</u> eneral <u>C</u> ontrol <u>N</u> on-derepressible <u>5</u>
	<i>ELP3/HPA1</i>	<u>E</u> Longator <u>P</u> rotein <u>3</u>
	<i>HPA2</i>	<u>H</u> istone <u>P</u> utative <u>A</u> cetyltransferase <u>2</u>
	<i>SAS3</i>	<u>S</u> omething <u>A</u> bout <u>S</u> ilencing <u>3</u>
	<i>SAS2</i>	<u>S</u> omething <u>A</u> bout <u>S</u> ilencing <u>2</u>
	<i>NUT1/MED5</i>	<u>N</u> egative <u>r</u> egulation of <u>U</u> RS2 <u>1</u>
Esenciales	<i>ESAI</i>	<u>E</u> ssential <u>S</u> as2 <u>A</u> cetyltransferase <u>1</u>
	<i>TAF1^a/TAFIII45</i>	<u>T</u> BP <u>A</u> ssociated <u>F</u> actor <u>II</u> <u>45</u>

^aNombre estándar actual.

Los análisis de actividades HAT en levadura llevados a cabo en nuestro laboratorio durante la década de los 90, habían permitido identificar hasta el inicio del presente trabajo cinco complejos HAT distintos. Por orden de elución en el sistema cromatográfico empleado en nuestro laboratorio para la separación de actividades HAT, (fig. 3.1 en pág. 67), los cinco complejos son: HAT A1, HAT A2, HAT A3, HAT B y HAT A4 [169, 170]. De estos cinco complejos nuestro grupo identificó la subunidad catalítica de tres de ellos: Gcn5p para el complejo A2 y Hat1p para los complejos HATB y A3. Paralelamente otros autores habían descrito, utilizando un método de purificación semejante al nuestro, la existencia de una serie de complejos HAT que podrían coincidir en parte con algunos de los que se habían purificado en nuestro laboratorio [60, 171]. Por orden de elución obtuvieron los complejos ADA, NuA4 (Nucleosomal Acetyltransferase of H4), NuA3 (Nucleosomal Acetyltransferase of H3) y SAGA (Spt-Ada-Gcn5

Acetiltransferasa).

Más recientemente se han descrito pequeñas variantes de algunos de estos complejos: SALSA (*SAGA altered Spt8 absent*) y SLIK (*SAGA -LIKE*) como variantes de SAGA [61, 62] y picNuA4 (*piccolo* NuA4) como variante de NuA4 [172]. Todos estos complejos se encuentran en el núcleo celular, si bien el complejo HAT B también se localiza en el citoplasma [56, 57]. Algunos de estos complejos comparten la misma subunidad catalítica. Así HAT B y HAT A3 son dependientes de Hat1p [170], mientras que SAGA [60], SLIK [62], SALSA [61], ADA [173], HAT A2 [169] y HAT B3.1 [58] lo son de Gcn5p. Por su parte, Esa1p es la subunidad catalítica de NuA4 [174] mientras que Sas3p lo es de NuA3 [74].

En la tabla 3.2 se recogen diversas características sobre las actividades HAT descritas por nuestro grupo.

Tabla 3.2. **Complejos HAT descritos por nuestro laboratorio con anterioridad al comienzo de este trabajo.** Las especificidades sobre las distintas histonas se refieren a ensayos HAT *in vitro*. Datos extraídos de [175, 169, 176, 56].

Nombre del complejo	Especificidad de histona		Localización subcelular	Subunidades
	libres	nucleosomales		
A1	H2B (<i>S. cerevisiae</i>) H4 y H2A (<i>G. gallus</i>)	H2A (<i>G. gallus</i>)	Nuclear	No determinadas
A2	H3>H4>>H2A (<i>G. gallus</i> y <i>S. cerevisiae</i>)	H3>>H2B (<i>G. gallus</i>)	Nuclear	Gcn5, Ada2, Ada3
A3	H4 (<i>S. cerevisiae</i>) H4>H3 (<i>G. gallus</i>)	- -	Nuclear	Hat1, Hat2
A4	H3>H4 (<i>G. gallus</i>)	H3>H4 (<i>G. gallus</i>)	Nuclear	No determinadas
B	H4 (<i>S. cerevisiae</i>) H4 (<i>G. gallus</i>)	- -	Nuclear y citoplasmático	Hat1, Hat2, Hif1

Complejo HAT A1

El complejo denominado HAT A1 eluye en primer lugar en nuestro gradiente cromatográfico. Es una actividad termoestable [55] cuya especificidad de sustra-

to varía en función de la procedencia de las histonas. Así, mientras que en cuanto a histonas libres el complejo acetila fundamentalmente la histona H2B de levadura, acetila preferentemente las histonas H4 y H2A de pollo (*Gallus gallus*). Por otro lado, cuando se utilizan histonas de pollo ensambladas en nucleosomas como sustrato, el complejo acetila mayoritariamente H2A [175].

Complejo HAT A2

En segundo lugar en nuestro gradiente eluye HAT A2, que acetila principalmente H3 libre tanto de pollo como de levadura, y al menos H3 nucleosomal de pollo. La subunidad catalítica de HAT A2 es Gcn5p, ya que en el mutante *gcn5Δ* se reduce significativamente la actividad hacia la histona H3 libre en las fracciones cromatográficas donde eluye A2, y se elimina totalmente sobre H3 nucleosomal [169]. Respecto a la proteína recombinante rGcn5, se ha demostrado que es capaz de acetilar H3 libre, y nucleosomal cuando se dan las condiciones adecuadas de concentración de NaCl y MgCl₂ [176]. La capacidad de A2 de modificar la histona H3 libre o nucleosomal es dependiente de las proteínas Ada2 y Ada3. En los mutantes *ada2Δ* y *ada3Δ* desaparece la acetilación sobre H3 en la región donde eluye habitualmente A2 [177]. Asimismo, Ada2p ha sido detectada con métodos inmunológicos en HAT A2 purificado [176]. Todo esto, junto con el hecho de que Ada2p interacciona directamente con Gcn5p, e indirectamente con Ada3p [178, 173], sugiere que ambas proteínas forman parte de A2. Además, el complejo cuya actividad está asociada a Gcn5p tiene una masa molecular aparente de 170 kDa si se determina por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa [170], o de 480 kDa si la técnica empleada es la filtración en gel [176]. Una presumible forma asimétrica de este complejo sería la causa más probable de esta disparidad de tamaños según la técnica analítica. Se ha propuesto que el complejo HAT A2 sea una variante del complejo ADA descrito por otros autores [60] (ver complejos ADA, SAGA y SALSA/SLIK).

Complejo HAT A3

El tercer complejo en eluir es HAT A3, cuyo sustrato es la histona H4 libre,

pero no la nucleosomal. Esta enzima se encuentra asociada a cromatina, ya que en extractos a partir de protoplastos lisados en ausencia de NaCl la actividad asociada a A3 disminuye respecto a la obtenida cuando se usa un tampón con NaCl que consigue solubilizar este complejo y disociarlo de la cromatina [55]. Otro dato que apunta hacia la naturaleza nuclear de este complejo, es su detección en la fracción nuclear de un fraccionamiento subcelular [175]. Las proteínas Hat1 y Hat2 forman parte de este complejo, como se ha demostrado al desaparecer la actividad asociada a éste en mutantes *hat1Δ*, *hat2Δ* o *hat1Δ hat2Δ*, y al identificar a la proteína Hat1 de 42 kDa como su subunidad catalítica en un ensayo en gel [170]. Por otro lado, el tamaño del complejo HAT A3 es de aproximadamente 110 kDa, como se determinó por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa [170].

Complejo HAT A4

El último complejo de tipo A es HAT A4, el cual posee especificidad principalmente sobre la histona H3 libre y nucleosomal, y en menor medida por la histona H4. Este complejo se detectó por primera vez en un extracto procedente de una cepa mutante *hat1Δ*, cuya capacidad para acetilar la histona H3 libre o nucleosomal permanece incluso en un doble mutante *hat1Δ gcn5Δ* [170]. La dificultad en identificar esta actividad anteriormente se debió a su solapamiento parcial con el complejo HAT B. Por ello, este complejo fue fácilmente detectado en mutantes *hat1Δgcn5Δ*, en los que únicamente aparecen las actividades HAT A1 y A4 [170]. Además, la localización nuclear de esta enzima fue demostrada cuando su actividad fue hallada en la fracción nuclear de un extracto proteico de una cepa mutante *hat2Δ*, en la que tanto el complejo HAT A3, como el B habían desaparecido [170]. En cuanto a la especificidad hacia oligonucleosomas, se determinó que esta actividad es más eficiente a 150 mM de NaCl que a cualquier otra concentración salina probada [177].

Complejo HAT B

El complejo HAT B es la actividad que eluye, junto con el A4, en último lugar en el sistema de fraccionamiento original puesto a punto por nuestro laboratorio. Se trata de una actividad citoplasmática, como se desprende del hecho de encontrarse en la fracción soluble de los extractos realizados, y que acetila únicamente H4 libre [175, 170, 56]. Al igual que el complejo HAT A3, las proteínas Hat1 y Hat2 forman parte del complejo B, ya que su actividad desaparece totalmente en cepas *hat1Δ*, *hat2Δ* y *hat1Δhat2Δ* [170]. Otro componente de este complejo ha sido identificado mediante doble híbrido. Esta técnica demostró que Hif1p interacciona con Hat1p y la histona H4, y además que ambas interacciones dependían de la presencia de Hat2p, lo que sugiere un papel de molécula puente o estabilizadora entre Hat1p y H4 para esta proteína [56]. Por otro lado, nuestro grupo y otros han demostrado que las proteínas componentes de HAT B se localizan principalmente en el núcleo [56, 57], lo cual entra en contradicción con la definición clásica de enzima HAT de tipo B. Esto ha planteado la cuestión de si la clasificación en complejos de tipo A y B debería basarse exclusivamente en la capacidad para acetilar histonas ensambladas en nucleosomas (tipo A) o sólo histonas libres (tipo B), sin considerar la localización subcelular. Por otro lado, el análisis por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de fracciones que contenían este complejo reveló que su masa molecular es de 130 kDa [170].

Complejos ADA, SAGA y SALS/SLIK

Los complejos ADA, SAGA y SALS/SLIK, además del ya descrito A2, tienen en común la subunidad catalítica HAT Gcn5p [60, 61, 62]. Todos estos complejos son capaces de acetilar las histonas H3 y H2B nucleosomales [60, 179, 62]. Mediante análisis con anticuerpos específicos, se detectó la proteína Ada2 en los complejos ADA y SAGA, mientras que Spt3p, Spt7p y Spt20p sólo formaban parte de SAGA [60]. Varios indicios apuntaron a que Ada3 también era un componente de ADA y SAGA, como el hecho de que Ada3p es necesaria para la actividad de ambos complejos [60]. Por último se habían obtenido otros complejos con masas moleculares similares conteniendo Ada2 y Ada3 [180]. Por

otro lado, la determinación de las masas moleculares de ambas actividades por filtración en gel mostró un tamaño de 0.8 MDa para ADA, y de 1.8 MDa para SAGA [181]. Ahc1p (*ADA hat complex component 1*) forma parte únicamente del complejo ADA [181], mientras que miembros de las familias de proteínas Spt y TAF se hallan exclusivamente en SAGA.

El complejo SALSA es la forma activa del complejo SAGA para la activación del gen *HIS3*. SALSA contiene una versión truncada de Spt7p a la que le faltan 40 kDa de la parte carboxilo terminal y no contiene Spt8p [61]. Por su lado, SLIK fue identificado también como un complejo variante de SAGA por su similitud en composición proteica [62]. Al igual que en SALSA, la forma de Spt7p que coeluye con SLIK se halla truncada, no contiene Spt8p, y presenta una subunidad nueva que no se encuentra en SAGA, Rtg2p (relacionada con la ruta de señalización retrógrada entre núcleo y mitocondria) [62]. Debido a su parecido, y ya que no se ha conseguido probar que se trate de dos complejos diferentes, en adelante nos referiremos a la forma alternativa de SAGA como SALSA/SLIK. Recientemente se ha ligado la función histona desubcunitinasa a los complejos SAGA y SALSA/SLIK. Se ha descubierto que la proteína Ubp8 es un componente no esencial de ambos complejos y que posee actividad desubcunitinasa [137]. Esta proteína forma parte de un módulo de SAGA integrado por las proteínas Sus1-Sgf11-Ubp8 [182]. Ya se había descrito previamente [183, 184] que la asociación de Ubp8 a SAGA depende de Sgf11p de acuerdo con su pertenencia al módulo mencionado. Además de sustentar la posibilidad de la coexistencia de diversas actividades modificadoras de la cromatina en un único complejo, este módulo podría vincular la transcripción dependiente de SAGA con el exporte de mRNA nuclear, en el que está implicada la proteína Sus1 [185].

Complejo NuA3

El complejo NuA3, que eluye antes de SAGA en un gradiente similar al utilizado en nuestro grupo, tiene especificidad por la histona H3 libre y nucleosomal [171]. La proteína Sas3 fue identificada como la subunidad catalítica de este complejo tras la purificación de NuA3 en sucesivas cromatografías, y se-

cuenciación peptídica [74]. Las proteínas Taf14 e Yng1 también fueron identificadas como componentes de NuA3 en el mismo trabajo [74]. Asimismo, Sas3p interacciona con Spt16p, la cual es, junto con Pob3p, componente del complejo heterodimérico FACT [74]. FACT (*F*acilitates *C*hromatin *T*ranscription) facilita la elongación de la transcripción desestabilizando los nucleosomas, y reensamblando la estructura nucleosomal posteriormente al paso de la RNA polimerasa II. Recientemente se ha demostrado que la capacidad de Sas3p para unirse a sustratos nucleosomales depende de las histona metiltransferasas Set1p y Set2p, y las lisinas 4 y 36 de la histona H3, sus respectivas dianas [136]. Se ha propuesto que la unión de NuA3 a histonas metiladas es el mecanismo por el que esta actividad HAT se dirige a la cromatina, y una forma por la que la metilación de la histona H3 puede mediar la transcripción [136].

Complejo NuA4

La actividad NuA4 eluye tras ADA, y posee especificidad sobre las histonas H4 y H2A nucleosomales, y al menos sobre H4 libre [171, 174]. Esa1p fue detectada por métodos inmunológicos en las fracciones en las que aparecía NuA4, y la inmunoprecipitación específica de esta proteína eliminó esta actividad de sus fracciones características, indicando claramente que Esa1p es la subunidad catalítica de NuA4 [174]. La purificación del complejo NuA4 mediante medios cromatográficos permitió la identificación de Tra1p, una proteína del grupo ATM (*A*taxia *T*elangiectasia *M*utated), como componente del complejo [174]. Es destacable que Tra1p también forme parte del complejo SAGA [72]. Por otro lado, la masa molecular de NuA4 resultó ser de 1.3 MDa, según fue determinada por cromatografía de exclusión molecular [174]. El complejo NuA4 comparte varias subunidades con SWR1-com, un complejo remodelador que deposita Htz1p, variante de la histona H2A, en la eucromatina [23]. Se ha demostrado que NuA4 acetila esta variante de histona para evitar la extensión de la heterocromatina a regiones activas [186, 187]. Estos datos han relacionado la función del complejo NuA4 con la restricción de la cromatina silenciada. También resulta destacable que el complejo NuA4 sea hasta ahora la única actividad histona acetiltransferasa esencial descrita en levadura, de modo que una cepa *esal* termosensible detiene

su crecimiento en la fase G2/M [188]. Taf1p es también esencial para la levadura, sin embargo recientemente se ha cuestionado que esta proteína ejerza actividad HAT *in vivo* [189].

3.1.2. Aislamiento cromatográfico de actividades HAT en levadura

Al comienzo de este trabajo la composición de los complejos HAT A1 y HAT A4 era desconocida, tanto en cuanto a sus subunidades catalíticas, como a las posibles subunidades que las acompañan. Por tanto, uno de los objetivos del presente trabajo ha sido identificar las subunidades catalíticas de los complejos A1 y A4, obtenidos según un protocolo establecido previamente en nuestro grupo de investigación. Este método permite obtener las actividades HAT en forma de complejos multiproteicos nativos gracias a sus condiciones suaves. El sistema precisa de la obtención de extractos proteicos crudos de levadura a partir de protoplastos. A continuación, el incremento de la fuerza iónica del extracto consigue disociar de la cromatina aquellos complejos que se asocian a ella. Después, este extracto crudo es ultracentrifugado y el sobrenadante, una vez dializado, es sometido a una cromatografía de intercambio aniónico de tipo Q Sepharose FF (Amersham Biosciences). La elución se lleva a cabo mediante un gradiente lineal de fuerza iónica, desde 80 mM hasta 380 mM en cloruro sódico.

El ensayo HAT de las fracciones cromatográficas obtenidas permite detectar dos picos de actividad expresados en cuentas por minuto o CPM (fig. 3.1.A). Pese a que la presencia de estos dos picos podría indicar la existencia de dos complejos HAT diferentes, en nuestro grupo de investigación se había establecido previamente la necesidad de estudiar la especificidad sobre histonas de todas las fracciones eluidas para diferenciar entre distintas actividades HAT [175, 170]. Para determinar estas especificidades, se incubó cada fracción cromatográfica con histonas en presencia de [1-¹⁴C]acetil CoA, tras lo cual la mezcla de reacción se sometió a electroforesis y posterior fluorografía del gel. Este método permite analizar la radiactividad incorporada en cada una de las histonas (fig. 3.1.B).

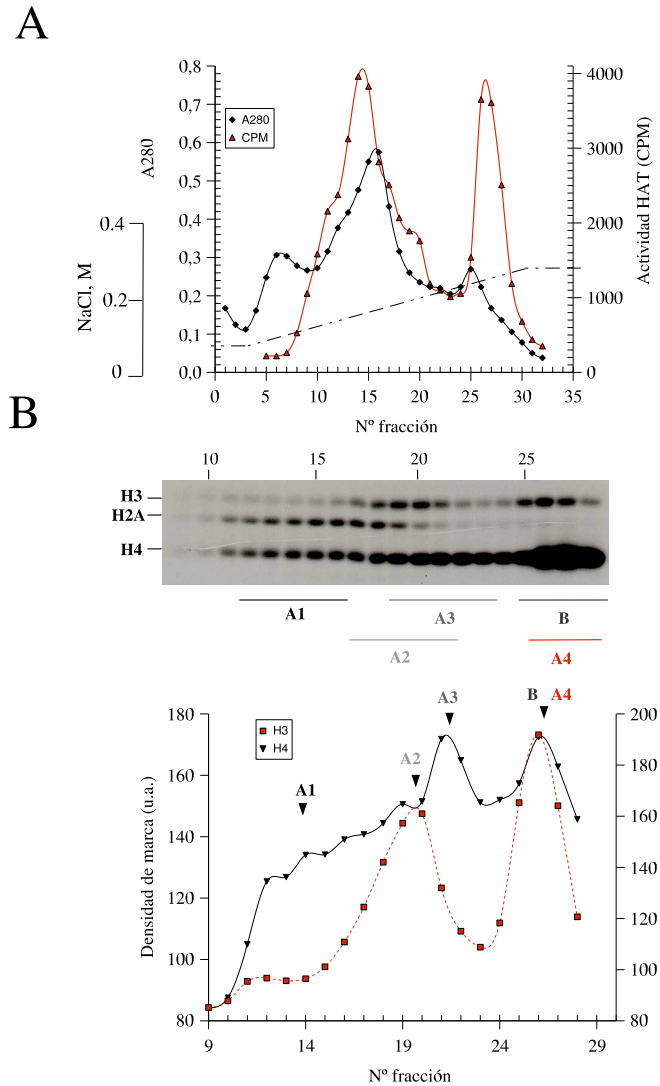


Figura 3.1. Actividades HAT en un extracto total de *S. cerevisiae* silvestre (BMA64-1A). (A) Fraccionamiento en Q Sepharose del extracto total de una cepa de levadura silvestre. Las proteínas retenidas se eluyeron mediante un gradiente lineal de 80 a 380 mM NaCl. Se representa la A_{280} de las fracciones recogidas y la actividad HAT de las fracciones tras ensayarlas con histonas libres de eritrocito de pollo y $[1-^{14}\text{C}]$ acetil CoA. (B) Fluorografía de las histonas tras el ensayo y su separación por electroforesis en un gel del 16% de poliacrilamida en presencia de SDS. Se indica la posición de 3 de las histonas internas. La gráfica inferior muestra el densitometrado de la histona H3 y H4 de la fluorografía. Este sistema permite detectar los picos de actividad específicos sobre cada histona. Se consignan los nombres de cinco de los complejos HAT aislados. Figura extraída de [177].

El densitometrado de las bandas radiactivas correspondiente a cada histona en el gel indica la presencia de varias actividades HAT que solapan parcialmente (fig. 3.1.B). Estas actividades, al ser ensayadas con histonas internas de eritrocito de pollo, eluyen en un orden que ha sido empleado para denominar a las distintas enzimas (ver apartado 3.1.1). El sistema ha sido empleado para clasificar los distintos complejos enzimáticos HAT separados por cromatografía de intercambio iónico. El fundamento de la clasificación de los complejos estriba en su capacidad para acetilar específicamente alguna de las histonas internas.

Es importante destacar que en los ensayos HAT se utilizaron como sustrato histonas libres e histonas nucleosomales procedentes de eritrocito de pollo. La obtención de histonas de levadura precisa de una metodología más compleja, siendo los nucleosomas de levadura mucho más inestables que los de eritrocito. Estas razones nos impulsaron a efectuar todos los ensayos con sustratos procedentes de eritrocito de pollo.

3.1.3. La técnica TAP aplicada a la caracterización de complejos HAT

En los últimos años han sido desarrolladas una serie de técnicas orientadas a la caracterización de proteínas especialmente poco abundantes en la célula. La separación de mezclas complejas de proteínas mediante geles bidimensionales o múltiples pasos cromatográficos, y su posterior identificación en un espectrómetro de masas acoplado, ha conseguido la identificación de proteínas en un nivel sin precedentes de sensibilidad. La metodología de purificación por afinidad en tándem (TAP, *Tandem Affinity Purification*) fue descrita por primera vez en un trabajo en levadura llevado a cabo en el EMBL (Heidelberg) por el grupo de B. Séraphin en 1999 [190]. El TAP permite recuperar complejos proteicos altamente purificados a partir de extractos que contienen una baja concentración de los mismos. Además las proteínas así recuperadas pueden analizarse estructural y funcionalmente ya que se obtienen en condiciones nativas.

3.1.3 La técnica TAP aplicada a la caracterización de complejos HAT 69

Para la purificación de los complejos empleando esta técnica, se debe sustituir la copia silvestre de la región codificante de la proteína de interés por una versión que contiene una etiqueta dual de afinidad. La etiqueta está constituida por las unidades de unión de IgG de la proteína A de *Staphylococcus aureus* seguida de un sitio de corte de la proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus*), y finalmente la secuencia del péptido de unión a la calmodulina (CBP). Una excelente descripción del método (fig. 3.2) se haya detallada en el trabajo de 2001 de Puig *et al.* [191] (ver también http://www.cnrs-gif.fr/cgm/epissage/index_gb.html).

Hasta la fecha se han llevado a cabo usando TAP tres grandes estudios a nivel global de la composición de complejos proteicos en levadura. Estos han utilizado TAP acoplado a la identificación por espectrometría de masas de las proteínas asociadas a la proteína etiquetada (diana). En 2002 el primero de ellos consiguió etiquetar 1739 proteínas, y realizar una purificación y una identificación de las proteínas acompañantes mediante MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) de 589 de ellas [192]. Este trabajo además de asignar componentes a complejos, contribuyó a trazar un mapa de las interacciones entre proteínas en el contexto celular de la levadura (interactoma). El mismo año, otro trabajo en el que el sistema de purificación consistió en una única etapa de inmunoprecipitación con un anticuerpo que reconoce el epítipo Flag, describió la purificación de 755 proteínas [193]. En él, las proteínas recuperadas tras la etapa de purificación fueron analizadas mediante LC-MS/MS (*Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*) para la identificación de los componentes de los complejos obtenidos. Esto permitió la descripción de nuevas conexiones entre distintos elementos en la red de interacciones globales. Muy recientemente han sido publicados otros dos trabajos más exhaustivos que emplearon la técnica TAP [194, 195]. Uno de ellos es el estudio de 2006 de Gavin *et al.*, en el que se lograron purificar 1992 proteínas de fusión con TAP, y se utilizó un método alternativo de purificación para las proteínas de membrana [194]. Por otro lado, en el trabajo de Krogan *et al.* del mismo año, se purificaron 4562 proteínas que fueron analizadas por MALDI-TOF y LC-MS/MS [195]. El uso de ambos métodos de espectrometría de masas simultáneamente consiguió incrementar el éxito en las identificaciones, y por tanto la cobertura del interactoma y

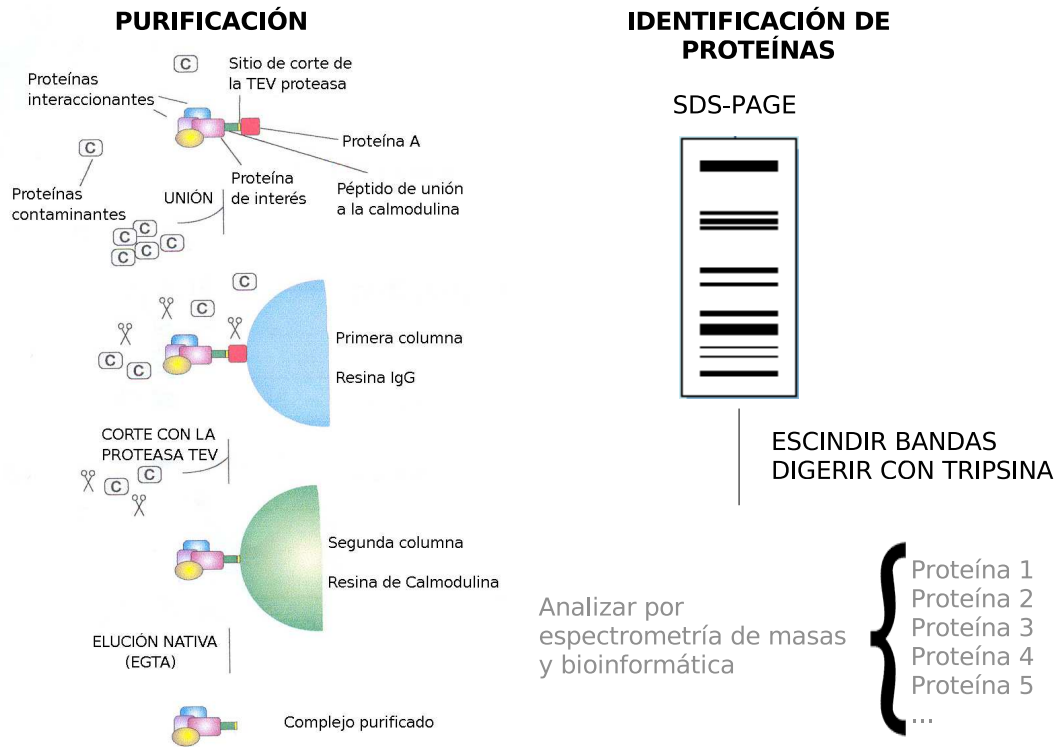


Figura 3.2. **Esquema del protocolo TAP.** El método TAP permite la caracterización de complejos proteicos presentes en las células. La aproximación TAP consiste en introducir una etiqueta doble de afinidad en la proteína diana, inmunoprecipitar esta proteína junto con las proteínas asociadas en la primera columna de afinidad, eluir el material asociado a esta columna mediante el corte con una proteasa que libera la proteína diana unida a la parte CBP de la etiqueta con sus proteínas asociadas, y por último purificar este complejo con una segunda cromatografía de afinidad de la que se eluye por acción del cambio conformacional que se produce en la calmodulina en ausencia de iones calcio. Los complejos proteicos purificados son resueltos generalmente por SDS-PAGE, de modo que las proteínas se separan de acuerdo con su masa. Más tarde las proteínas son escindidas del gel, se digieren con tripsina y se analizan por espectrometría de masas. Los algoritmos de búsqueda en bases de datos son entonces empleados para identificar proteínas específicas a partir de sus espectros de masas.

3.1.3 La técnica TAP aplicada a la caracterización de complejos HAT 71

la confianza de los resultados.

En el campo de los complejos HAT de *S. cerevisiae*, la técnica TAP se ha aplicado al estudio de al menos cuatro complejos. En el primero de estos trabajos se describió la composición del complejo Elongador empleando las subunidades Elp1, Elp2 y Elp3 etiquetadas para su purificación. Esto permitió la detección de Elp4, Elp5 y Elp6, que etiquetadas también copurificaron con los otros componentes del complejo holo-Elongador de 6 subunidades [196].

Otro de estos trabajos se centró en el estudio del complejo HAT B, para lo cual se purificó Hat2-TAP procedente de extractos nucleares con resina de calmodulina, y a continuación se emplearon dos pasos de cromatografía convencional [57]. Esta estrategia consiguió detectar Hat1p, Hat2p e Hif1p de HAT B (asociadas a H4 y H3) en un complejo de 500 kDa con actividad sobre H4 y H2A libres.

El complejo TFIID comparte con SAGA cinco proteínas TAF (Taf5, Taf6, Taf9, Taf10 y Taf12). La purificación de las proteínas comunes proporcionó información sobre cuatro nuevos componentes de SAGA: Sgf11p, Sgf29p, Sgf73 y Ubp8 [197]. Para comprobar que Sgf11p era efectivamente un componente de SAGA, ésta se purificó mediante TAP, lo que permitió obtener esencialmente todas las subunidades de SAGA [183]. Otro componente de SAGA descubierto usando la técnica de TAP, ha sido la proteína Sus1, que copurificó con el complejo nuclear de exportación de mRNA Sac3-Thp1, y también con 17 de las proteínas que constituyen SAGA [185].

El complejo HAT SAS también ha sido objeto de estudio utilizando TAP. En un trabajo reciente se etiquetaron dos de los componentes conocidos del complejo, Sas2p con la etiqueta TAP y Sas4p con MYC, y tras la purificación por afinidad en tándem sólo se obtuvieron tres proteínas con una puntuación adecuada mediante MudPIT¹ para ser componentes *bona fide* del complejo [198]. Estas fueron Sas2p, Sas4p y Sas5p, que eluyeron en un complejo de aproximadamente 450 kDa según un análisis por cromatografía de exclusión molecular. Sin

¹*Multidimensional Protein Identification Technology.*

embargo, la determinación de la masa molecular mediante centrifugación en un gradiente de glicerol indicó un tamaño de 125 kDa mucho más de acuerdo con la hipótesis de que SAS sea un complejo formado únicamente por las tres subunidades mencionadas. Se cree que el tamaño que predice la exclusión molecular estaría sesgado por no tratarse de un complejo globular.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1. Medios de cultivo

3.2.1.1. Medios para *Escherichia coli*

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó LB-Miller (1 % (p/v) triptona, 0.5 % (p/v) extracto de levadura y 1 % (p/v) de cloruro sódico), el cual se suplementó con ampicilina (LBA) a razón de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cultivo para la selección de cepas con marcador de resistencia a ese antibiótico, o bien con ampicilina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cloranfenicol (LBACl) a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cuando fue necesario. Para el cultivo en placa, se emplearon los mismos medios pero adicionando 2 % (p/v) de agar. Todos los medios empleados fueron autoclavados 20 min a 120°C.

3.2.1.2. Medios para *Saccharomyces cerevisiae*

La mayor parte de los cultivos se realizaron en YPD (1 % (p/v) extracto de levadura, 2 % (p/v) peptona y 2 % (p/v) D-glucosa). Para la selección de transformantes se empleó YPD con geneticina (G418) a una concentración final de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antibiótico, o bien YPD con noursetricina (clonnatTM) a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En el caso de tratarse de una cepa transformada con plásmido portador de marcador de auxotrofia, se utilizó medio mínimo sintético completo (SC). El medio SC contiene una mezcla de los aminoácidos que necesita la levadura, a excepción del que le permite sintetizar el gen marcador que se integra junto con el DNA transformante. Este medio contiene 0.67 % (p/v) de *yeast nitrogen base w/o amino acids* (Difco), 2 % (p/v) glucosa, 0.067 % de una mezcla preparada de aminoácidos, y los requerimientos necesarios según sea el caso: adenina, uracilo e histidina a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y leucina, lisina y triptófano a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La mezcla de

aminoácidos empleada contiene aquellos aminoácidos que no se suelen emplear como marcadores de auxotrofía. Para preparar 26 g, se mezclaron 2 g de arginina-HCl, 2 g de isoleucina, 2 g de lisina-HCl, 2 g de metionina, 2 g de serina, 3 g de fenilalanina, 2 g de treonina, 2g de tirosina y 9 g de valina.

El medio de crecimiento para los cultivos empleados para TAP fue YPDA (1 % (p/v) extracto de levadura, 2 % (p/v) peptona, 2 % (p/v) glucosa y 0.01 % adenina hemisulfato).

Todos los medios empleados fueron autoclavados 20 min a 120°C.

3.2.2. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas

Para la obtención de los plásmidos y la conservación de los mismos se empleó la cepa de *E. coli* DH5 α . Los plásmidos empleados como molde para las PCRs en las estrategias de disrupción génica o etiquetado en *loci* cromosómicos (ver apartado 3.2.5) se exponen en la tabla 3.3.

3.2.3. Transformación de *E. coli*

El sistema de transformación de este microorganismo fue el descrito por Hanahan *et al.* [203] con algunas modificaciones. Un cultivo de 100 mL de DH5 α en medio LB-Miller a una DO₆₀₀ de 0.3-0.4, se enfrió en hielo y se recogió por centrifugación a 1500 \times g a 4°C durante 10 min. El sedimento celular se resuspendió en 30 mL de disolución RF1 (0.1 M RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM acetato potásico, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) glicerol, pH 5.8) fría y se incubó 30 min en hielo. Las células se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones y se resuspendieron en 3 mL de disolución RF2 (10 mM MOPS pH 6.8, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) glicerol) fría. Se tomaron alícuotas de 100 μ L de esta suspensión de células competentes para la transformación, y se almacenaron a -80°C.

Tabla 3.3. Plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Procedencia
pFA6a-KanMX4	Integración del marcador KanMX4 (procedente de <i>E. coli</i>) en delección de genes por recombinación homóloga	Wach <i>et al.</i> , 1994 [199]
pAG25 (pFA6a-natMX4)	Integración del marcador natMX4 (procedente de <i>S. noursei</i>) en delección de genes por recombinación homóloga	Goldstein y McCusker, 1999 [200]
pFA6a-13Myc-kanMX6	Integración del marcador kanMX6 para etiquetado con 13 epítomos MYC en Ct de los genes	Longtine <i>et al.</i> , 1998 [201]
pGA2256 (6HA-his3MX6)	Integración del marcador his3MX6 para etiquetado con 6 epítomos HA en Ct de los genes	Knop <i>et al.</i> , 1999 [202]
pYM3-6HA-klTRP1	Integración del marcador TRP1 de <i>K. lactis</i> para etiquetado con 6 epítomos HA en Ct de los genes	Knop <i>et al.</i> , 1999 [202]
pYM6-9MYC-klTRP1	Integración del marcador TRP1 de <i>K. lactis</i> para etiquetado con 9 epítomos MYC en Ct de los genes	Knop <i>et al.</i> , 1999 [202]

El procedimiento de transformación consistió en tomar una alícuota de 100 μL de células competentes e incubarla 10 min en hielo. A continuación se añadió el DNA a transformar (aproximadamente 25 ng en 10 μL), se agitó suavemente y se incubó en hielo 30 min. Las células se sometieron a un choque térmico de 2 min a 37°C, y se volvieron a enfriar en hielo. Se agregaron 200 μL de medio LB-Miller y se incubó 1 h con agitación a 37°C. Finalmente la suspensión se sembró en placas LBA (medio LB-Miller suplementado con ampicilina) o LBACI (medio LB-Miller suplementado con ampicilina y cloranfenicol), dependiendo del DNA transformante. Se realizaron diluciones si se consideró necesario. Las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de transformantes.

3.2.4. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en análisis bioquímicos

En la siguiente tabla se detallan los genotipos y la procedencia de las cepas empleadas para el análisis bioquímico y por cromatografías de afinidad en tándem (TAP) de los complejos HAT.

Tabla 3.4. Cepas de levadura utilizadas en análisis cromatográficos.

Nombre	Genotipo	Procedencia
BY4742	<i>MATα, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, ura3Δ0</i>	EUROSCARF C.B. Brachmann [204]
LPY2990	<i>MATα, his3Δ200, leu2-3,112, trp1Δ1, ura3Δ52, esa1Δ::HIS3, pLP795 (ESA1 URA3 CEN)</i>	L. Pillus [188]
LPY3291	<i>MATα, his3Δ200, leu2-3,112, trp1Δ1, ura3Δ52, esa1Δ::HIS3, pLP863 (esa1-Δ414 TRP1 CEN)</i>	L. Pillus [188]
BMA64-1A	<i>MATα, ade2-1, his3-11,15, leu2-3,112, trp1Δ-2, ura3-1, can1-100</i>	M. Minet

3.2.4 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en análisis bioquímicos

Nombre	Genotipo	Procedencia
BQS1435	BMA64-1A <i>SAS3-TAP(CBP-T7-TEV-Protein A)-KanMX6</i>	M. Pamblanco
BQS1436	BMA64-1A <i>TAF14-TAP(CBP-T7-TEV-Protein A)-KanMX6</i>	M. Pamblanco
BQS1437	BMA64-1A <i>YNG1-TAP(CBP-T7-TEV-Protein A)-KanMX6</i>	M. Pamblanco
BQS1033	BY4742 <i>sas3Δ0::LEU2</i>	S. Rodríguez-Navarro
BQS1176	BQS1033 <i>hat1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
BQS1178	BY4742 <i>hat1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
BQS1181	BY4742 <i>gcn5Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
BQS1197	BY4742 <i>NUT1-HA6-HIS3</i>	Este trabajo
BQS1201	BQS1181 <i>hat1Δ::natMX4</i>	Este trabajo
BQS1204	BY4742 <i>hpa2Δ::natMX4</i>	Este trabajo
BQS1206	BY4742 <i>nut1Δ::natMX4</i>	Este trabajo
BQS1209	BY4742 <i>SPT7-HA6-HIS3</i>	Este trabajo
BQS1212	BY4742 <i>elp3Δ::natMX4</i>	Este trabajo
BQS1216	BY4742 <i>SAS3-HA6-HIS3</i>	Este trabajo
BQS1218	BY4742 <i>HPA2-HA6-HIS3</i>	Este trabajo
BQS1314	BY4742 <i>sas2Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
BQS1334	BY4742 <i>RTG2-HA6-HIS3</i>	Este trabajo
BQS1339	BQS1181 <i>SAS3-HA6-HIS3</i>	Este trabajo
BQS1340	BY4742 <i>GCN5-HA6-HIS3</i>	Este trabajo
BQS1350	BY4742 <i>GCN5-MYC13-kanMX6</i>	Este trabajo
BQS1351	BQS1216 <i>GCN5-MYC13-kanMX6</i>	Este trabajo
BQS1354	BQS1340 <i>SAS3-MYC13-kanMX6</i>	Este trabajo

Recolección de células de *S. cerevisiae* para análisis cromatográfico y purificación TAP

Para los experimentos que requirieron análisis cromatográfico, las células se crecieron en medio YPD a 28°C o a 37°C. Los cultivos se airearon mediante agitación orbital a 200 rpm y se recogieron a una DO₆₀₀ de 0.8-1.0.

En el caso de la purificación por cromatografía de afinidad en tándem (TAP), los cultivos se incubaron a 30°C en cámara de crecimiento o incubador, con agitación orbital hasta una DO₆₀₀ de 2.0 a 3.0. Las células se recogieron mediante centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 5500×g. Las células se lavaron con un volumen de agua estéril a 4°C correspondiente a la mitad del volumen inicial del cultivo, se pesaron, se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente, y se mantuvieron a -80°C hasta su lisis posterior (ver apartado 3.2.11 en pág. 94).

3.2.5. Construcción de cepas en *Saccharomyces cerevisiae*

Básicamente se realizaron dos tipos de manipulación sobre genes de levadura relacionados con procesos de modificación de la cromatina. Por una parte se realizaron disrupciones, y por otra etiquetados de los genes estudiados con epítotos estándar. Estas manipulaciones emplearon una estrategia que permite obtener la construcción a transformar en un único paso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [205].

3.2.5.1. Interrupción de marcos de lectura abiertos

Para la obtención de los mutantes con disrupciones de marcos de lectura abiertos (ORFs), se utilizó la técnica de *PCR targeting* [205]. Ésta se basa en la transformación de *S. cerevisiae* con un DNA lineal, que contiene zonas homólogas al inicio y final del gen a eliminar, y un gen marcador en la zona central, de modo que por recombinación homóloga se elimina la región del gen entre las zonas mencionadas, como se muestra en la fig. 3.3.

El plásmido pFA6a-KanMX4 [199] contiene el gen de resistencia a genética, y se empleó como origen del marcador para un subconjunto de las cepas construidas. Por otro lado, el casete natMX4 procede del plásmido pAG25 [200], y confiere resistencia al antibiótico clonnatTM. Este último casete se utilizó alternativamente al de resistencia a genética, o en casos en los que se requiriera la generación de dobles mutantes.

Para cada transformación, se generó la cantidad suficiente de casete (aproximadamente 100 ng) en una reacción de PCR empleando como DNA molde 0.5 μ g del plásmido correspondiente, y 0.5 μ M de los oligonucleótidos denominados S1 y S2 (fig. 3.3A). El oligonucleótido S1 contiene en su extremo 5' los 45 nucleótidos homólogos al extremo 5' del marco de lectura abierto a interrumpir, seguidos de una pequeña secuencia de la zona del *Multiple Cloning Site* (MCS)

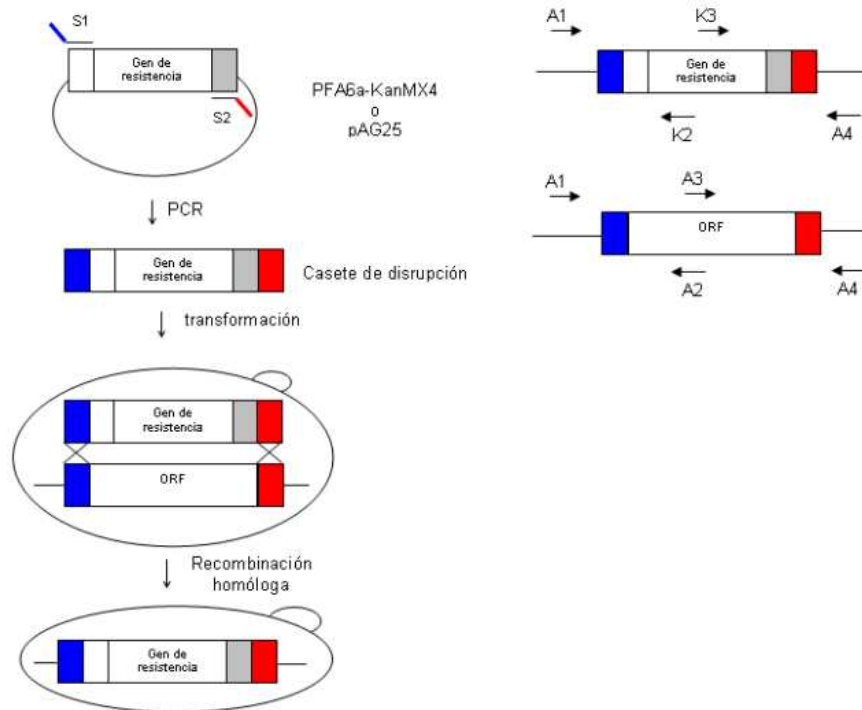


Figura 3.3. **Construcción de cepas con genes delecionados en *S. cerevisiae*.** (A) Esquema de la obtención de ORFs interrumpidas en el genoma según la técnica de recombinación homóloga a través de pequeñas zonas de homología flanqueantes desarrollada por A. Wach [199]. (B) Disposición de los oligonucleótidos utilizados para la verificación de la integración.

contigua a la región 5' del marcador (5'-CG TAC GCT GCA GGT CGA C-3'). El oligonucleótido S2 contiene en su extremo 5' los 45 nucleótidos homólogos al extremo 3' del marco de lectura abierto a interrumpir, seguidos de 18 nucleótidos derivados de la zona del MCS contigua a la región 3' del marcador (5'-AT CGA TGA ATT CGA GCT CG-3').

Una vez generado el casete de interrupción se transformó la cepa de levadura correspondiente según el protocolo de Gietz *et al.* [206] con modificaciones (ver apartado 3.2.6). La verificación de la correcta integración se realizó por PCR. El análisis se basa en la obtención de productos de distinto tamaño según se haya producido, o no, la integración del casete. Así, se diseñaron dos oligonucleótidos que hibridan fuera del gen (A1: región 5' y A4: región 3'), y dos que lo hacen in-

ternamente (A2: hebra no codificante y A3: hebra codificante). Del mismo modo se diseñaron 2 oligonucleótidos de las mismas características que A2 y A3 para el interior del gen de resistencia (o marcador), llamados K2 y K3 (fig. 3.3B). La comprobación se efectuó mediante una reacción de PCR que empleó como molde el DNA genómico extraído [207] de una colonia transformante, y el juego de oligonucleótidos A1, A2 y K2, o bien A3, A4 y K4. Así, cuando se produce la integración del casete se espera un producto A1-K2, de un tamaño diferente al del producto A1-A2, o bien un producto K3-A4, distinto al A3-A4. Siempre se realizó una PCR control con DNA de una cepa silvestre, para la que los productos a obtener eran A1-A2 o A3-A4, según qué juego de oligonucleótidos se empleara.

3.2.5.2. Etiquetado de genes

Los *loci* que codificaban proteínas que se deseaban etiquetar fueron sometidos a una estrategia similar a la del apartado anterior. El *locus* cromosómico de la levadura se manipula para que contenga en su extremo carboxilo terminal una secuencia que codifica una sucesión de seis epítomos HA¹ (seguida por el marcador de selección *TRP1* de *Kluyveromyces lactis* o *HIS3* de *Schizosaccharomyces pombe*), o bien 9 o 13 epítomos MYC² (seguidos del marcador *TRP1* de *Kluyveromyces lactis* o KanMX6, respectivamente). La técnica para obtener estos etiquetados [202] se basa también en la obtención de un casete que contiene zonas homólogas, en este caso de la región 3' de la ORF.

La amplificación de los plásmidos pGA2256, pGA2265 (pYM3-6HA-klTRP1) y pGA2267 (pYM6-9MYC-klTRP1), cedidos por P. M. Alepuz, con los oligonucleótidos 1A (48 últimos nucleótidos de la ORF en fase y sin el codón de terminación, seguidos de 17 nucleótidos comunes de los plásmidos) y 1B (48 nucleótidos de después del codón de terminación de la ORF seguidos de 17 nucleótidos comunes de los plásmidos) generaron los casetes necesarios. En el oligonucleótido 1A la secuencia común es 5'-TCC GGT TCT GCT GCT AG-3',

¹Contenido en la proteína hemaglutinina del virus de la gripe humana.

²Secuencia de la proteína c-myc humana.

y en el 1B es 5'-CCT CGA GGC CAG AAG AC-3'. Con este casete se transformó la levadura (ver apartado 3.2.6), y por recombinación homóloga la etiqueta se integró junto con el marcador de selección.

La verificación de la integración se realizó de manera similar al apartado anterior. Se analizó por PCR el DNA genómico de los transformantes, empleando los oligonucleótidos A3 y A4, que rinden productos considerablemente más largos en el caso de que se haya producido la integración de la etiqueta y el marcador. Finalmente, las colonias que dieron positivo en los análisis por PCR fueron comprobadas por *western-blot* (ver apartado 3.2.10).

3.2.6. Transformación de levadura con acetato de litio

La transformación de levadura se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Gietz *et al.* [206] en condiciones de esterilidad. Las células son crecidas en YPD hasta una concentración de aproximadamente 10^7 células/mL (se asumió que una DO600 de 0.6 corresponde a una concentración de 1.2×10^7 células/mL). Se recogieron 2×10^8 células por centrifugación a 3000 rpm durante 4 min. Las células se lavaron con 5 mL de agua estéril fría y se centrifugaron a 4000 rpm durante 2 min. Tras decantar el sobrenadante las células se resuspendieron en 200 μ L de acetato de litio 0.1 M y TE 1 \times (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) fresco preparado a partir de acetato de litio 1 M y TE 10 \times . Esta mezcla se incubó 15 min a 30°C, y a continuación se adicionaron 5 μ L de DNA *carrier* (de esperma de salmón) 10 mg/mL previamente hervido y enfriado en hielo. Inmediatamente se mezcló con unos 100 ng del DNA a transformar agitando en vórtex. Se añadió 1.2 mL de PEG 40 %, TE 1 \times , acetato de litio 0.1 M, y la mezcla fue incubada con agitación durante 30 min a 30 °C. Transcurrido ese tiempo se indujo el choque térmico incubando 20 min a 42 °C. A continuación se eliminó el PEG por centrifugación y las células se lavaron con agua estéril. El sedimento de células se resuspendió en 250 μ L de agua estéril. Cuando la construcción a insertar portaba un marcador de auxotrofia, se plaqueó en dos placas de SC sin el requerimiento correspondiente. En el caso de marcador de resistencia a un an-

tibiótico (clonnatTM o geneticina) las células se inocularon en 5 mL de YPD y fueron incubadas 4 horas a 30 °C. Tras recoger las células, éstas se resuspendieron en 250 μ L de agua y se sembraron en dos placas de YPD con el antibiótico adecuado.

3.2.7. Aislamiento de actividades HAT mediante técnicas cromatográficas

Obtención de extractos totales de levadura con actividad HAT

La preparación de extractos proteicos de levadura se basó en el método descrito en el trabajo de 1989 de López-Rodas *et al.* [55] con modificaciones. Brevemente, las células recogidas en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a 1500 \times g y se lavaron una vez con agua destilada. Se determinó el peso húmedo de las células, y se resuspendieron en medio de pretratamiento (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 75 mM 2-mercaptoetanol) a razón de 10 mL/g. Las células se incubaron 30 min en hielo con una agitación suave. Después de esta incubación las células se lavaron con medio de incubación (25 mM NaH₂PO₄ pH 6.5, 1.1 M D-sorbitol). Finalmente se resuspendieron en medio de incubación, a una proporción 5 mL/g de células, que contenía 1 mg zimoliasa 20T (Seikagaku Corp.) por g de células. Esta suspensión celular se incubó aproximadamente 45 min, lo cual es suficiente para que se produzca la digestión de la mayor parte de la pared celular. Tras la obtención de los protoplastos, éstos se recogieron por centrifugación a 1500 \times g durante 5 min a 4°C, y fueron lavados 3 veces con medio de incubación. Los protoplastos se lisaron en medio hipotónico (75 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.25 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoetanol, 0.05 % Tween 20, 1 mM PMSF, 1 pastilla de Cocktail de inhibidores de proteasas CompleteTM de Roche por cada 50 mL de tampón) con la ayuda de un homogeneizador tipo *potter*. Habitualmente se lisaron con un volumen de 25 μ L de medio hipotónico por cada mL de cultivo original. Al lisado se le añadió NaCl sólido hasta una concentración final de 0.5 M para propiciar la disociación de proteínas asociadas

a cromatina, y se agitó durante 30 min a 4°C. El lisado se sometió a ultracentrifugación a 100000×g (Ultracentrífuga Beckman L-70) durante 1 h a 4°C. El sobrenadante fue dializado frente a tampón de extracción (40 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 % glicerol, 0.1 % Tween 20, 1 mM PMSF).

3.2.7.1. Cromatografía de afinidad de metal inmovilizado

El extracto dializado se sometió a una primera cromatografía de tipo *IMAC* (*Immobilized-Metal Affinity Chromatography*), de acuerdo con el trabajo de 1998 de Eberharter *et al.* [171] con modificaciones. Se tomó un volumen de extracto equivalente a 150-200 unidades de absorbancia a 280 nm y se incubó a 4°C en un agitador orbital con 2 mL de resina de níquel nitrilotriacético agarosa (Ni-NTA) de Quiagen durante al menos 3 h. A continuación la resina se depositó en una columna y se lavó con 10 volúmenes de tampón de extracción. Las proteínas retenidas se eluyeron con otros 10 volúmenes de tampón de extracción suplementado con 300 mM de imidazol. El eluido se recogió en un colector de fracciones en alícuotas de 1 mL. Se determinó el contenido en proteínas de cada fracción midiendo la A_{280} . Se reunieron las fracciones con valores de absorbancia superiores a 0.07, y el volumen resultante se dializó en una tripa de diálisis (tamaño de exclusión de 10-14 kDa) frente a tampón B-80 mM en NaCl (el tampón B básico contiene 15 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.25 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoetanol, 0.05 % (v/v) Tween 20, 10 % glicerol (v/v), 10 mM NaCl, 1 mM PMSF).

3.2.7.2. Cromatografías de intercambio iónico

El eluido de la cromatografía de Ni-NTA dializado fue clarificado por centrifugación a 27000×g durante 15 min a 4°C, y el sobrenadante se aplicó en una columna de un diámetro de 1 cm que contenía 2.5 mL de gel Q Sepharose FF (Amersham Biosciences) equilibrado en tampón B-80 mM NaCl. Habitualmente la cantidad de proteína que se aplicó estaba comprendida entre 10 y 30 unidades de absorbancia. La columna se lavó con 10 volúmenes de tampón B-80 mM NaCl, y las proteínas retenidas se eluyeron mediante un gradiente lineal de sal

que se generó en un formador de gradientes de vasos comunicantes. Los gradientes comprendían unas concentraciones de NaCl de 80-400 u 80-500 mM en 70 mL. Se recogieron fracciones de 1.8 mL y se midió la A_{280} de cada fracción con un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A en una cubeta de cuarzo. La actividad HAT de las fracciones se determinó como se describe en los apartados 3.2.8.1 y 3.2.8.2. Este tipo de columna se pudo reutilizar hasta tres veces tras su lavado con tampón B-2 M en NaCl y su posterior equilibrado en tampón B-80 mM NaCl.

En otros casos el dializado clarificado obtenido en el apartado 3.2.7.1 se resolvió en un sistema de cromatografía líquida automatizado *ÄKTA prime* (Amersham Biosciences) para el que todos los tampones y disoluciones fueron desgasificados y filtrados con filtros de tamaño de poro de 0.22 μm . Este sistema se acopló a columnas Resource Q (intercambio aniónico) o Resource S (intercambio catiónico), ambas de 1 mL (Amersham Biosciences). La columna Resource Q se equilibró en tampón B-80 mM NaCl previamente a cada uso. El volumen de muestra aplicado fue equivalente a 15 unidades de absorbancia. La columna se lavó con tampón B-80 mM NaCl hasta que la A_{280} del eluido fue cercana a cero. Se utilizó un gradiente de NaCl lineal de 80 a 500 mM de un volumen total de 42 mL y fracciones de 1.1 mL. El lavado final fue realizado con 15 mL de tampón B-500 mM NaCl. Tras su uso la columna se lavó con 10 mL de tampón B-2 M NaCl, 10 volúmenes de agua destilada y 10 mL de etanol 20 % (v/v). La columna se almacenó en esta última disolución a 4°C hasta su siguiente uso.

La columna Resource S se equilibró en tampón C (MES 15 mM pH 7.5, EDTA 0.25 mM, 5 mM 2-mercaptoetanol, 10 % glicerol) antes de cada cromatografía. En este caso el volumen de muestra aplicado fue equivalente a 5 unidades de absorbancia. La columna se lavó hasta que la absorbancia alcanzó un valor de prácticamente cero, y a continuación las proteínas retenidas se eluyeron mediante un gradiente de NaCl lineal de 0 a 1 M en tampón C. El gradiente constó de 25 mL y se recogieron fracciones de 1 mL. El lavado final se efectuó con 10 mL de tampón C-1 M NaCl. Para conservar la columna ésta se lavó con 10 mL de tampón C-1 M NaCl, 10 mL de agua destilada y se guardó tras un último lavado con 10 mL de acetato sódico 1 % en 20 % de etanol.

3.2.7.3. Cromatografías de exclusión molecular

Con el fin de determinar la masa molecular de los complejos HAT que eluían en determinadas regiones de los gradientes, se realizaron cromatografías de exclusión molecular empleando dos tipos de matriz (Sephacryl S-400 HR y Superose 6 10/300GL Tricorn™ de Amersham Biosciences) con capacidad de resolver complejos de proteínas globulares de alta masa molecular. La columna Sephacryl S-400 tiene un rango de separación de proteínas globulares entre 20 kDa y 8 MDa, mientras que la Superose 6 permite una separación entre 5 kDa y 5 MDa.

Las fracciones cromatográficas correspondientes a los complejos que se deseaban aplicar a la columna Sephacryl S-400 (525×10 mm, 50 mL volumen de lecho) fueron reunidas y concentradas mediante ultracentrifugación. La cromatografía se efectuó a 4°C para mantener la actividad HAT de las fracciones eluidas. Se aplicaron 500 μ L de muestra a la columna equilibrada en un tampón B0-80 mM NaCl (que no contenía glicerol a diferencia del tampón B básico). Tras la aplicación, una bomba peristáltica (Pharmacia) fue conectada para asegurar un flujo constante de 0.2 mL/min. Se determinó la A_{280} de las fracciones de 0.5 mL recogidas. Se realizó un ensayo de actividad HAT (ver apartado 3.2.8.1) en fibra de vidrio para determinar con precisión la localización del complejo HAT en las fracciones recogidas. La masa molecular de los complejos fue determinada usando como patrones citocromo *c* (14 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa) y tiroglobulina (669 kDa).

También se empleó la columna Superose 6 (310×10 mm, 24 mL volumen de lecho), a una temperatura de 4°C para determinar la masa molecular de los complejos objeto de nuestro estudio. Para ello, se inyectaron en el sistema de FPLC *ÅKTA Prime* 400 μ L de las fracciones concentradas del complejo, empleando un *loop* de 500 μ L. El tampón empleado fue el mismo que para la columna Sephacryl S-400 y el flujo se fijó a 0.3 mL/min. Se recogieron fracciones de 0.5 mL de las que se determinó la A_{280} y la actividad HAT. Parte de las fracciones recuperadas de la exclusión molecular fueron analizadas mediante *western-blotting* (pág. 91) para comprobar la zona de elución de la subunidad etiquetada. Los patrones usados en esta columna fueron los mismos que para la anterior.

3.2.8. Ensayos de actividad HAT

3.2.8.1. Ensayos en fibra de vidrio

Los ensayos de actividad HAT se llevaron a cabo según el método descrito previamente en nuestro laboratorio [169], con algunas modificaciones. Se tomaron 85 μL de la fracción enzimática a ensayar a los que se añadieron 72 μg de histonas internas de eritrocito de pollo disueltos en 9 μL de agua (ver apartado 3.2.8.3). La reacción comenzó al añadir 0.01 μCi de $[1-^{14}\text{C}]$ acetil CoA (55 mCi/mmol) en 10 μL de agua. La reacción se dejó desarrollar durante 20 min a 30°C, tras lo cual se depositó sobre un filtro de fibra de vidrio circular (Whatman GF/F) que fue sumergido en un baño de ácido tricloroacético al 25 % (p/v) frío durante 20 min con el fin de detener la reacción y eliminar el exceso de acetil CoA radiactivo. Este lavado se repitió dos veces más. Finalmente los filtros se lavaron sucesivamente con etanol, etanol:éter dietílico (1:1) y éter dietílico durante 10 min a temperatura ambiente. Los filtros se secaron en una estufa a 70°C durante 10 min y se introdujeron en viales que contenían 5 mL de cocktail de centelleo (Biogreen 101 de Scharlau o Sigma Fluor LSC para muestras no acuosas). La radiactividad presente en los filtros se detectó con un contador de centelleo líquido (Wallac 1409).

3.2.8.2. Ensayos mediante fluorografía

Cuando se deseó determinar la radiactividad que se incorporó a cada una de las histonas, los ensayos realizados fueron similares pero se tomaron únicamente 20 μL de la fracción enzimática correspondiente y se mezclaron con 12 μg de histonas internas de eritrocito de pollo. Del mismo modo, la reacción dió comienzo al añadir 0.011 μCi de $[1-^{14}\text{C}]$ acetil CoA para obtener un volumen final de 26 μL , y se detuvo tras 20 min a 30°C mediante la adición de 13 μL de disolvente de muestras SDS 3 \times (180 mM Tris-HCl pH 6.8, 9 % SDS, 30 % glicerol, 12 % 2-mercaptoetanol, 0.06 % azul bromofenol). La muestra fue calentada durante 5 min a 95°C y centrifugada 5 min a 12000 rpm. De la muestra obtenida se in-

yectaron 10 μ L en geles del 16 % de poliacrilamida-SDS [208] en los que las histonas, y el resto de proteínas, fueron resueltas (ver apartado siguiente). Los geles fueron teñidos con disolución de Coomassie R-250 (46 % (v/v) metanol, 8 % (v/v) ácido acético, 0.1 % (p/v) Brilliant Blue R-250 (Sigma)) durante 40 min y desteñidos mediante varios lavados de decolorante (30 % metanol y 5 % ácido acético). Se incubaron al menos durante 1 h en metanol 50 % (v/v), y fueron secados a 80°C sobre papel Whatman 3MM (Slab Gel Dryer SGDB5040, Thermosavant). Los geles secados se expusieron en un casete con una pantalla BAS-IP SR2025 durante 72 h. La incorporación de radiactividad a las histonas se detectó mediante la lectura de la pantalla con un *PhosphorImager* FLA-3000 (Fujifilm) y el programa Image Reader FLA-3000 (Fujifilm). Ésto nos permitió obtener imágenes de la fluorografía que fueron densitometradas utilizando el programa informático Image Gauge 4.0 (Fujifilm).

3.2.8.3. Obtención de histonas de eritrocito de pollo

Se obtuvieron histonas de eritrocito de pollo sin H1 ni H5, bien sea en forma de histonas libres, bien sea en forma de oligonucleosomas. Para ello se recogió sangre de pollo inmediatamente después de su muerte sobre un tampón isotónico (10 mM Tris-HCl pH 7.1, 25 mM citrato sódico, 140 mM NaCl) y se aislaron los núcleos de las células sanguíneas según el método descrito por Weintraub *et al.* [209]. Brevemente, tras la recolección sobre el tampón, la sangre se centrifugó a 500 \times g durante 10 min para recoger las células sanguíneas. A continuación las células se lavaron dos veces más con este mismo tampón, se resuspendieron en cuatro volúmenes de tampón de lisis celular (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 % (v/v) Triton X-100), y se agitaron suavemente durante 90 min a 4°C. Los núcleos se recogieron por centrifugación a 1000 \times g 10 min, y se lavaron con tampón de lisis hasta conseguir un sobrenadante claro. Las histonas libres fueron obtenidas a partir de los núcleos de eritrocitos lisados [170], eliminando en primer lugar las histonas externas H1 y H5 mediante su extracción con ácido perclórico. En concreto, los núcleos se resuspendieron en 4 volúmenes de tampón de lavado (1 mM EDTA pH 7, 1 mM PMSF) y tras 1

h de agitación suave a 4°C se recogieron por centrifugación a 10000×g durante 15 min. Tras un lavado en el mismo medio, el sedimento se resuspendió en 4 volúmenes de ácido perclórico 0.74 M y la suspensión se agitó enérgicamente durante 30 min. El sobrenadante donde se encuentran las histonas H1 y H5 se descartó, y el sedimento se reextrajo en las mismas condiciones con 2 volúmenes de ácido perclórico 0.74 M. El sedimento final se sometió a extracción con 0.25 M de HCl para obtener las histonas internas. La adición de ocho volúmenes de acetona y la incubación durante una noche a -20°C, consiguió precipitar las histonas, que fueron recuperadas por centrifugación durante 15 min a 20000×g, dos lavados con acetona anhidra y secado en bomba Speed Vac.

Los oligonucleosomas se obtuvieron por digestión de los núcleos de eritrocito de pollo con nucleasa de micrococo y eliminación de las histonas H1 y H5 con resina CM-Sephadex C-25 según Ruiz-García *et al.* [177].

3.2.9. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (*SDS-PAGE*)

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturalizantes se efectuó según el procedimiento de Laemmli, 1970 [208], en geles de una concentración variable de acrilamida en presencia de SDS. En el caso de los geles para la separación de histonas, se emplearon geles del 16 % (p/v) de acrilamida, mientras que en el caso de proteínas de mayor tamaño, se utilizaron concentraciones del 8, 10 y 12 % dependiendo del tamaño de la proteína de interés. Las muestras fueron disueltas o diluidas con el disolvente de muestras apropiado para conseguir una concentración final de 60 mM de Tris-HCl pH 6.8, 3 % SDS, 10 % glicerol, 4 % 2-mercaptoetanol y 0.02 % azul de bromofenol. Los geles fueron preparados con un gel separador que contenía la concentración deseada de acrilamida:bisacrilamida (30:0.8), 0.1 % (p/v) SDS, 0.07 % (v/v) TEMED y 380 mM Tris-HCl pH 8.8. Por otro lado el gel concentrador contenía en todos los casos 5 % (p/v) de acrilamida:bisacrilamida (30:0.8), 0.1 % SDS, 0.2 % TEMED y 125 mM Tris-HCl pH 6.8. Las electroforesis fueron desarrolladas con fuentes de alimentación PowerPac 300 o PowerPac Basic (Bio-Rad), a una intensidad inicial de 14 mA y un voltaje máximo de 110 V para minigeles (10×7 cm), y a 24 mA y 160 V para los de mayor tamaño (15×15 cm). El tampón de electroforesis contenía 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicina y 0.1 % SDS. Una vez finalizada la electroforesis, el gel podía ser teñido con Coomassie R-250 y desteñido, o bien ser transferido a una membrana para su posterior análisis por *immunoblot* (ver apartado siguiente).

3.2.10. Análisis mediante *western-blotting*

Tras la separación de las muestras proteicas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Protran 0.2 μ m, Schleider&Schuell) por electrotransferencia del tipo *semidry* o en líquido.

La mayor parte de las detecciones de proteínas eluidas en las cromatografías (ver apartado 3.2.7 en pág. 83) se realizaron por transferencia *semidry*. En este caso, la membrana, los papeles de *blotting* (gel blotting papers, Schleicher&Schuell) y el gel se sumergieron brevemente en el tampón de transferencia (39 mM glicina, 48 mM Tris pH 8.8, 20 % metanol, 0.037 % SDS) previamente a su colocación en el aparato de transferencia (Trans Blot SD *semidry* Transfer Cell de Bio-Rad). Las condiciones de transferencia fueron de 3 mA/cm² de membrana y un voltaje máximo de 25 V.

La transferencia en líquido se llevó a cabo mediante un método basado en el trabajo de Thiriet y Albert, 1995 [210]. El tampón de transferencia que se usó fue tampón de electroforesis (ver pág. 90) con un contenido del 20 % (v/v) en metanol. La transferencia se efectuó con un voltaje de 100 V durante 10 min y 60 V durante 20 min, y fue comprobada mediante tinción con 1 % (p/v) Ponceau S en 1 % (v/v) ácido acético durante 1 min. A continuación el exceso de colorante fue eliminado mediante varios lavados con 1 % de ácido acético. La membrana fue escaneada y su imagen se guardó en formato electrónico para la comparación de la cantidad de proteína por carrera con la señal obtenida por quimioluminiscencia. Tras la tinción, la membrana fue lavada con agua destilada o PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) para que el pH de la membrana no permaneciera acidificado.

Cuando la proteína que se deseaba identificar contenía epítomos HA, la membrana fue incubada 1 h a temperatura ambiente en PBS que contenía 1 % de leche desnatada en polvo (disolución de bloqueo). La membrana fue incubada toda la noche a 4°C, con una concentración del anticuerpo monoclonal de ratón α -HA 12CA5 (Roche) de 133 ng/mL en solución de bloqueo. Tras la incubación con el

anticuerpo primario la membrana es sometida a dos lavados rápidos con PBS-T 0.5 % (PBS con 0.5 % de Tween-20) a temperatura ambiente, y a continuación se lavó durante 10 min 3 veces con el mismo tampón. Se llevó a cabo un último lavado con PBS durante 10 min para eliminar el Tween-20. La incubación con el anticuerpo de oveja α -ratón etiquetado con peroxidasa (Amersham Biosciences) y diluido 1/5000 en PBS 1 % de leche, se realizó durante 1 h 30 min. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, la membrana se lavó con PBS-T 0.5 % del mismo modo que anteriormente. La detección de las proteínas por quimioluminiscencia se llevó a cabo con el sistema ECL Western Blotting (Amersham Biosciences) según las instrucciones del fabricante.

Las proteínas etiquetadas con epítomos c-MYC fueron detectadas de manera muy similar a las etiquetadas con HA, pero con las diferencias que se detallan a continuación. El bloqueo se realizó durante 1 h a temperatura ambiente en PBS-T 0.1 % con 2.5 % de leche, y 1 h a 4°C. La membrana se incubó toda la noche a 4°C en una disolución con 1.33 ng/mL de anticuerpo monoclonal α -c-MYC 9E10 (Roche) en disolución de bloqueo. Los lavados se efectuaron del mismo modo, pero a 4°C, con PBS-T 0.1 % y sin el lavado final sin Tween-20. La incubación con anticuerpo secundario también fue idéntica excepto porque fue a 4°C y el anticuerpo estaba diluido en PBS-T 0.1 %. El resto del protocolo se desarrolló en las mismas condiciones.

Las membranas con muestras procedentes del proceso de extracción de TAP se incubaron al menos 1 h a temperatura ambiente en PBS que contenía 5 % (p/v) de leche desnatada en polvo y 0.1 % (v/v) de Tween-20 (disolución de bloqueo). A continuación se incubó 1 h 30 min en una dilución 1/2000 en disolución de bloqueo del anticuerpo policlonal de conejo α -PAP, el cual reconoce la proteína A. A continuación se realizaron dos lavados de 5 min y cuatro de 10 min con PBS 0.1 % Tween-20. Por último se realizó un lavado con PBS de 10 min y se empleó el sistema ECL Western Blotting (Amersham Biosciences) para la detección de las proteínas con fusión TAP.

Por otro lado, las membranas con muestras del proceso de purificación por TAP se incubaron un mínimo de 1 h a temperatura ambiente en una disolución al

2 % (p/v) de agente bloqueante del kit ECL Advanced Western Blotting (Amersham Biosciences) en TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl) 0.1 % (v/v) Tween-20. A continuación la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C en una dilución 1/20000 de anticuerpo policlonal de conejo α -TAP en disolución de bloqueo. Este anticuerpo, a diferencia del α -PAP, es capaz de reconocer el péptido de unión a calmodulina (CBP), y por tanto la proteína de fusión tras su corte con la proteasa TEV. Al día siguiente se realizaron dos lavados rápidos, uno de 15 min y por último tres de 5 min con TBS Tween-20 0.1 % (p/v) a 4°C. A continuación se incubó la membrana durante 1 h con una dilución 1/30000 de anticuerpo α -conejo conjugado con la peroxidasa del rábano picante (Amersham Biosciences) en TBS 2 % (p/v) de agente bloqueante 0.1 % (p/v) Tween-20. Se repitieron la serie de lavados y la detección se realizó con los reactivos del sistema ECL Advanced Western Blotting (Amersham Biosciences).

***Stripping* o lavado de membranas**

Para incubar una membrana con dos anticuerpos distintos sucesivamente, ésta se lavó dos veces con agua destilada y se incubó 1 h a 37°C con agitación en tampón de *Stripping* (5 % (v/v) ácido acético, 0.5 M NaCl, 4 M urea, 2 % 2-mercaptoetanol). Tras esto se lavó cuatro veces durante 5 min con agua destilada, y dos veces con PBS-T 0.01 % o TBS-T 0.01 % también durante 5 min cada lavado. Finalmente se bloqueó de nuevo la membrana y se prosiguió como normalmente.

3.2.11. Análisis de complejos proteicos mediante TAP

Estimación del nivel de expresión de proteínas fusionadas a etiqueta TAP

Para determinar la cantidad aproximada de proteína con etiqueta TAP que se produce en las cepas construidas, se tomó una cantidad suficiente de células de una placa de YPDA y se resuspendió en 500 μL de agua destilada estéril. De este volumen se tomaron 50 μL de la suspensión celular y se diluyó 1/20 con agua para medir la DO_{600} . A los 450 μL restantes se les añadió 18 μL de NaOH 5 M para obtener una concentración final de 200 mM. La mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente, tras lo cual se tomaron 3 unidades de DO_{600} que se centrifugaron a 14000 rpm en una microfuga. El sedimento se resuspendió en 100 μL de disolvente de muestras 2X (ver composición en pág. 87), se hirvió durante 10 min, y se aplicaron 10 μL (0.3 DO/muestra) en un gel SDS-PAGE del 8, 10 o 12 % de acrilamida, dependiendo del tamaño de la proteína etiquetada. El resto del procedimiento de *western-blotting* con el anticuerpo α -PAP para la detección de las proteínas fusionadas a TAP se encuentra en el apartado 3.2.10 pág. 91.

Disrupción criogénica de células de levadura

En esta etapa y las posteriores la contaminación por queratinas se evitó en lo posible empleando guantes para la manipulación de todo el material.

Las células congeladas obtenidas como se describe en el apartado 3.2.4, pág. 78, se introdujeron en los contenedores de acero del molino de bola Retsch MM301, previamente enfriados en nitrógeno líquido. La disrupción se efectuó mediante 6 pulsos de 3 min de duración cada uno, a una velocidad de 29 vibraciones/s. Tras cada pulso los contenedores se introdujeron de nuevo en nitrógeno líquido para mantenerlos durante toda la disrupción a una temperatura adecuada. Las células rotas se pesaron y conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparación de extractos celulares para TAP

A las células rotas descongeladas en hielo se les adicionaron 2 mL de tampón de extracción por cada g de células. Se empleó el tampón de extracción B1 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 % glicerol, 0.1 % Nonidet P-40, 1 mM PMSF, 2 mM benzamidina, 1 μ M leupeptina, 2 μ M pepstatina A, 4 μ M quimostatina, 2.6 μ M aprotinina) o el B2 (40 mM HEPES pH 7.9, 350 mM NaCl, 10 % glicerol, 0.1 % Nonidet P-40, 1 mM PMSF, 2 mM benzamidina, 1 μ M leupeptina, 2 μ M pepstatina A, 4 μ M quimostatina, 2.6 μ M aprotinina) dependiendo de la proteína etiquetada. La lisis se finalizó mediante agitación magnética moderada durante 20 min a 4°C. El lisado se ultracentrifugó durante 30 min a 4°C a 35000 \times g y el sobrenadante (S1) se obtuvo por decantación. Este sobrenadante fue sometido a una segunda ultracentrifugación durante 90 min a 92500 \times g 4°C. Si el tampón utilizado fue el B1, el extracto obtenido (S2) fue congelado en nitrógeno líquido y mantenido a -80°C hasta su posterior procesamiento. En el caso del B2, el sobrenadante se sometió a diálisis frente a tampón D (20 mM HEPES pH 7.9, 50 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 20 % glicerol, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2 mM benzamidina) durante 3 horas, previamente a la congelación del extracto.

La extracción para cada proteína fue monitorizada mediante *western-blot* con anticuerpo anti-PAP policlonal de conejo. Este anticuerpo reconoce la proteína A del epítipo TAP. De este modo se siguió el contenido en proteína con etiqueta TAP en la suspensión celular, el lisado, los sobrenadantes de las ultracentrifugaciones y el extracto final (ver procedimiento en apartado 3.2.10).

Purificación en tándem por cromatografías de afinidad (TAP)

Se siguió básicamente el protocolo descrito en los trabajos de 1999 de Rigaut *et al.* [190] y de 2001 de Puig *et al.* [191]. Los extractos se descongelaron rápidamente y en caso de haber sido sometidos a diálisis, se les adicionó NaCl y Nonidet P-40 para que alcanzaran una concentración final de 100 mM y 0.1 % respectivamente. Se utilizaron 250 μ L de suspensión de resina IgG-Sepharose 6

Fast Flow (Amersham Biosciences) para el extracto procedente de aproximadamente 10 g de células. Esta resina fue equilibrada en una columna de BioRad (PolyPrep Chromatography Column) con 10 mL de tampón IPP150 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1 % Nonidet P-40) estéril. El extracto se incubó con la resina IgG-Sepharose durante 2 h en un agitador orbital a 4°C. La resina fue lavada tres veces con tampón IPP150 y una vez con 10 mL de tampón de digestión IPP150 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1 % Nonidet P-40, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT) estéril, y se resuspendió en 1 mL de este tampón. La reacción de digestión de la zona de reconocimiento de la proteasa TEV se llevó a cabo mediante la adición de 3-4 μg de proteasa TEV (cedida por A. Dziembowski) por cada g de células de partida. Esta digestión produce la liberación del epítipo proteína A de la etiqueta TAP. La reacción se consideró completa tras una incubación de 2 h con agitación a 16°C. Transcurrido este tiempo, el volumen de reacción fue recuperado, y se añadió 3 mL de tampón de unión a la calmodulina (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1 % Nonidet P-40, 1 mM acetato de magnesio, 1 mM imidazol, 2 mM CaCl_2 , 9.7 mM β -mercaptoetanol) para terminar la elución de la columna. A estos 4 mL de digerido se le adicionó CaCl_2 hasta una concentración final de 2.75 mM para mejorar la unión de la parte CBP (*Calmodulin Binding-Protein*) de la etiqueta TAP a la resina de calmodulina-agarosa (Calmodulin Affinity Resin de Stratagene). Se utilizaron 250 μL de suspensión de la resina, lavada con 10 mL de tampón de unión a la calmodulina. La incubación de la resina con el digerido se efectuó durante 1 hora a 4°C con agitación orbital. Después de la incubación, la resina fue lavada tres veces con 10 mL de tampón de unión a la calmodulina. A continuación las proteínas retenidas se colectaron en 5 fracciones consecutivas de 200 μL de tampón de elución (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1 % Nonidet P-40, 1 mM acetato de magnesio, 1 mM imidazol, 2 mM EGTA, 9.7 mM β -mercaptoetanol) cada una. La segunda elución fue incubada durante 5 min para incrementar la cantidad de proteína eluida en este paso. Por último la resina se incubó durante 15 min a 65°C en 200 μL de SDS 1 % para eluir proteínas que se unen fuertemente. Generalmente el segundo y el tercer eluido fueron analizados por espectrometría de masas, aunque en algunas ocasiones lo fue el eluido en condiciones desnaturalizantes (15 min a 65°C con 1 % SDS). Las muestras se

congelaron a -80°C hasta su análisis.

En cada una de las etapas de purificación se separaron alícuotas que fueron analizadas por *western-blot* con anticuerpo anti-TAP. Las alícuotas tomadas en cada etapa de la extracción y la purificación fueron aplicadas en geles de SDS-poliacrilamida del 10 %, o del 8 % si las muestras contenían la proteína Sas3-TAP (de un tamaño mucho mayor que las otras dos). Tras la electroforesis se llevó a cabo la electrotransferencia tal y como se describe en el apartado 3.2.10 en la pág. 91.

3.2.11.1. Análisis electroforético en geles de poli(acrilamida) tricina/SDS

La visualización de las proteínas componentes de los complejos purificados se realizó mediante análisis electroforético en geles de tricina-SDS [211]. Las muestras se evaporaron en Speed Vac y se resuspendieron en solvente de muestras $1\times$ (100 mM Tris pH 6.8, 15 % glicerol, 4 % SDS, 100 mM DTT, 0.04 % Coomassie Blue G250). Los geles de tricina de 20x20 cm y 0.75 mm de grosor fueron preparados siguiendo básicamente el protocolo descrito en 1987 por Schagger y von Jagow [211]. El gel separativo contenía una concentración de 10 o 12 % acrilamida (disolución de partida de acrilamida 30 %, bisacrilamida 0.8 %, 37.5:1, Pronadisa), 990 mM Trizma®-HCl pH 8.4, 10 % glicerol y 0.1 % SDS. El gel concentrador tenía una composición de 3.9 % de acrilamida, 744 mM de Trizma®-HCl pH 8.4, 0.1 % SDS. El tampón del ánodo contenía 200 mM Trizma® pH 8.9, y el del cátodo 100 mM Trizma-base® pH 8.25, 100 mM Tricina y 0.1 % SDS. La electroforesis en gel de tricina-SDS consigue una resolución superior de proteínas de baja masa molecular (5-20 kDa) sin necesidad de urea. Además se eliminan los efectos de sobrecarga cuando se inyectan grandes cantidades de proteína. Las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta Protean II xi Cell (BioRad) a temperatura ambiente con circulación de agua. La intensidad aplicada fue de 60 mA por gel durante 7-8 h y nunca se sobrepasaron los 250 V.

El gel se lavó con agua milliQ en abundancia inmediatamente tras la elec-

troforesis. Las proteínas se fijaron con una disolución de 25 % (v/v) isopropanol y 10 % (v/v) ácido acético durante 15 min para prevenir la difusión de pequeñas proteínas del gel y acelerar la eliminación de SDS del gel. A continuación, el gel se lavó tres veces con agua milliQ, y se tiñó con Pageblue (Fermentas) durante toda una noche. Al día siguiente el gel se lavó con agua milliQ durante 5 min y fue escaneado.

3.2.11.2. Identificación de proteínas por espectrometría de masas

El Servicio de Proteómica perteneciente a ProteoRed del CIPF (Centro de Investigación Príncipe Felipe, València) realizó los análisis de identificación de proteínas purificadas por TAP mediante MALDI-TOF y LC-MS/MS, según la complejidad de la muestra.

En cualquier caso, previamente a la identificación por espectrometría de masas todas las muestras fueron digeridas con tripsina empleando un protocolo idéntico. Brevemente, las bandas fueron escindidas y se realizaron dos incubaciones de 15 min con agua:acetonitrilo 1:1 (v/v), otra con acetonitrilo y finalmente se eliminó el líquido del gel deshidratado. Se rehidrató con 0.1 M de NH_4HCO_3 durante 5 min y se incubó 15 min con acetonitrilo. La muestra se redujo con un tratamiento de 30 min a 60°C con 10 mM DTT en 0.1 M de NH_4HCO_3 . A continuación se alquiló en una incubación durante 30 min en oscuridad con 55 mM de yodoacetamida en 0.1 M NH_4HCO_3 . Se volvió a tratar con agua:acetonitrilo durante 2 min, después 5 min con acetonitrilo, y finalmente la muestra se secó en Speed Vac. La digestión con tripsina de una banda visualizada con Coomassie requirió de 100-150 ng de enzima. En ambos casos el volumen final es de 10 μL . Tras una incubación de 30 min en hielo, el sobrenadante fue eliminado y se incubó toda la noche a 37°C tras la adición de 20 μL de 50 mM NH_4HCO_3 .

Para los análisis LC-MS/MS, la muestra se resuspendió finalmente en 6 μL de 0.1 % ácido trifluoroacético y se aplicó en una precolumna desaladora en línea de la que se retroeluyó a la columna analítica capilar. En esta columna se realizó la

etapa de separación en un gradiente en tres fases de 0 a 95 % en acetonitrilo y 0.1 % en ácido fórmico. Tras la columna, la muestra pasó directamente a la fuente nanospray del Espectrómetro de Masas QSTAR XL (Applied Biosystems) donde se realizó un análisis IDA (*Information Depending Acquisition*) con ciclos de adquisición en modo MS y MS/MS a lo largo de todo el cromatograma. Los espectros de MS/MS obtenidos se enviaron de forma automatizada al algoritmo de búsqueda MASCOT a través del programa Mascot Daemon (Matrix Science) [212].

En el caso de los análisis MALDI-TOF/TOF, las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas 4700 Proteomic Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems). Las muestras se desalaron y se eluyeron directamente con 5 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 70 % acetonitrilo:0.1 % ácido trifluoroacético. La información combinada de MS y MS/MS se envió a Mascot Daemon (Matrix Science) [212] a través del programa GPS (Applied Biosystems).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1. Detección de una nueva actividad HAT con especificidad sobre la histona H3

El sistema para separar complejos HAT en *S. cerevisiae* desarrollado en nuestro laboratorio había demostrado ser altamente reproducible y fiable. Sin embargo, al constar de una única etapa cromatográfica, las fracciones obtenidas poseían un elevado contenido proteico. Con objeto de obtener fracciones más purificadas de los complejos HAT, e intentar identificar algunas de las proteínas que forman parte de ellos, se añadió un nuevo paso cromatográfico. Este paso consistió en aplicar la fracción soluble del extracto crudo a una resina de tipo Ni-NTA agarosa, de modo que la mayor parte de la actividad HAT quedó retenida. La elución se efectuó con un tampón que contiene 300 mM de imidazol. Este protocolo es una modificación del que se describe en [171].

Para comprobar que las actividades HAT descritas en nuestro laboratorio eran recuperadas tras la introducción de la nueva etapa cromatográfica, se diseñó una estrategia que analizó las actividades retenidas y no retenidas por la resina de Ni-NTA (fig. 3.4). Las fracciones no retenidas y las eluidas a alta concentración de imidazol fueron aplicadas a una columna Q Sepharose FF, y eluidas mediante un gradiente de NaCl de las características que habitualmente se habían utilizado en nuestro laboratorio. La actividad eluida de la columna de intercambio aniónico procedente de las fracciones no retenidas en Ni-NTA se analiza en la fig. 3.5A. La actividad HAT total (ensayo HAT) y la especificidad de histona (fluorografía) de cada una de las fracciones de la cromatografía de Q Sepharose muestran que la actividad total es muy baja, en contraste con la elevada presencia de proteínas (A_{280}). La fluorografía detectó la presencia de los complejos HAT previamente obtenidos en nuestro laboratorio mediante el sistema que constaba de una cromatografía, si bien predominan los dependientes de Hat1p (HAT

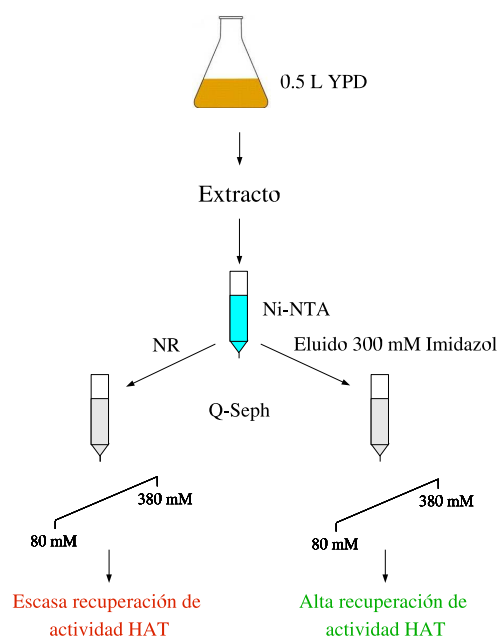


Figura 3.4. Esquema de purificación de actividades HAT de levadura empleando una cromatografía de ión metálico inmovilizado y una de intercambio iónico.

A3 y HAT B). En el caso del análisis de las fracciones retenidas en la columna de Ni-NTA y eluidas con 300 mM de imidazol (fig. 3.5B), la cantidad de proteína es mucho menor, en contraste con una elevada actividad total (expresada en DPM). Además, el ensayo fluorográfico permitió detectar todas las actividades HAT descritas en nuestro laboratorio, aunque, obviamente las actividades HAT A3 y B son menos abundantes. En base a estos resultados decidimos incorporar a nuestro sistema de purificación la cromatografía Ni-NTA siempre y cuando no tuviéramos como objetivo purificar los complejos HAT A3 o B. Un hecho relevante se descubre en la fig. 3.5A y en la B, esto es la aparición de dos picos diferenciados de actividad HAT sobre las histonas H3, y quizás H4, en las últimas fracciones del gradiente. Así pues, donde en estudios precedentes se había detectado un único complejo (HAT A4 en la fig. 3.1 pág. 67), en este sistema modificado se han detectado dos, que hemos denominado HAT A4-I y HAT A4-II, por su orden de elución.

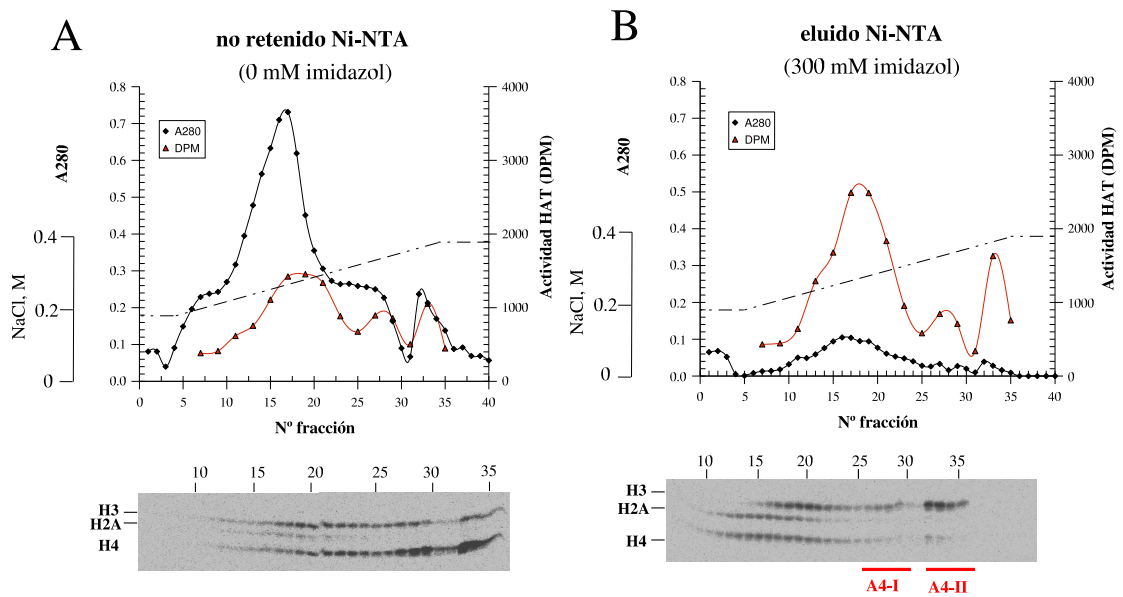


Figura 3.5. Purificación de actividades HAT en un extracto de *S.cerevisiae* silvestre (BY4742) tras cromatografía de Ni-NTA y recromatografía en Q Sepharose de la fracción no retenida y la eluida. Fraccionamiento en Q Sepharose de la fracción no retenida a la resina Ni-NTA (A) y de la eluida a 300 mM de imidazol (B) procedente de un extracto de una cepa de levadura silvestre. Las proteínas retenidas en Q Sepharose se eluyeron mediante un gradiente lineal de 80 a 380 mM NaCl. Se representa la A₂₈₀ de las fracciones recogidas y la actividad HAT de las fracciones tras ensayarlas con histonas libres de eritrocito de pollo y [1-¹⁴C]acetil CoA. Se muestran las fluorografías con histonas internas de eritrocito de pollo, tras el ensayo y su separación por electroforesis en gel del 16% de poliacrilamida en presencia de SDS. La posición de tres de las histonas internas se encuentra indicada.

3.3.1 Detección de una nueva actividad HAT con especificidad sobre la histona H3

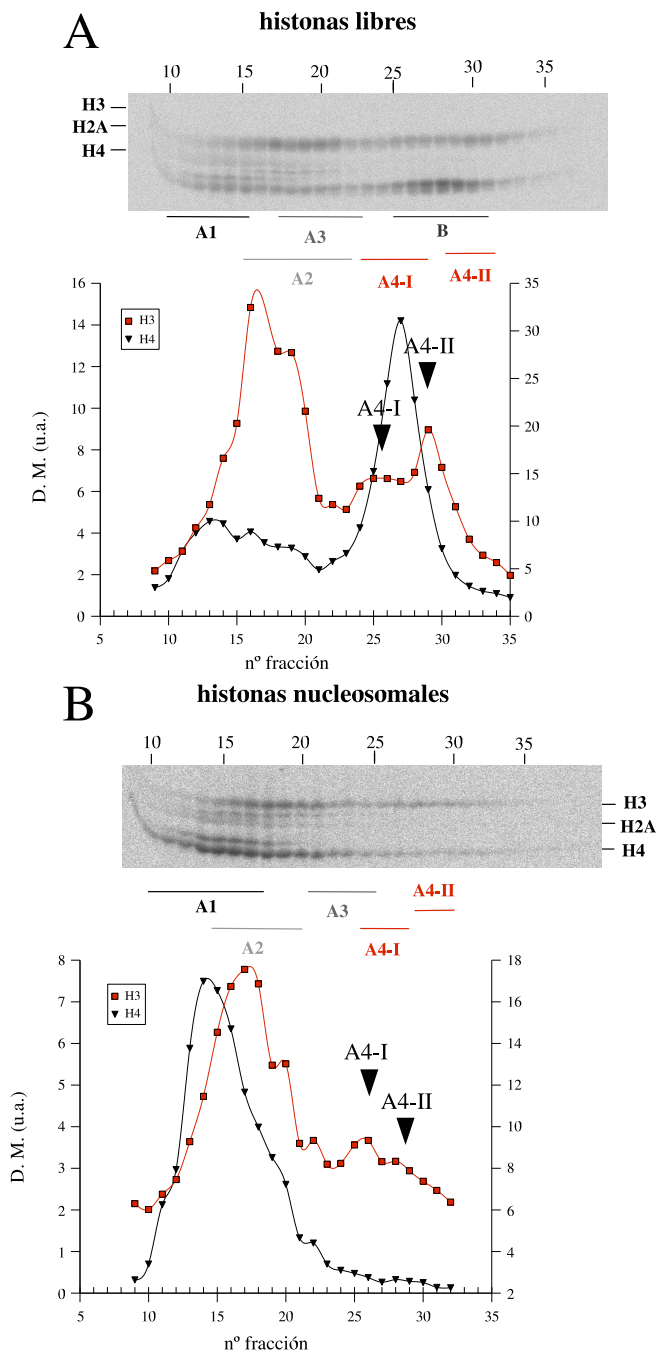


Figura 3.6. Análisis de las actividades HAT A4-I y HAT A4-II en una cepa silvestre (BY4742) tras cromatografía de Ni-NTA y posterior cromatografía en Q Sepharose con gradiente salino de 80 a 500 mM. Ensayo HAT con histonas libres (A) o histonas nucleosomales (B) de fracciones de la Q Sepharose, separación por electroforesis en un gel del 16% de poliacrilamida en presencia de SDS y fluorografía del mismo. En los paneles inferiores se cuantifica la densidad de marca en unidades arbitrarias (u.a.) mediante el densitometrado de las bandas de las histonas H3 y H4 del fluorograma correspondiente. Se indica la posición de tres de las histonas internas, y la de los complejos presentes en ambas cromatografías.

Para comprobar que efectivamente se trataba de dos complejos, y no de perturbaciones en el gradiente en el tramo final de alta fuerza iónica, se realizaron dos experimentos, poniendo especial cuidado en la separación de actividades en la región de mayor concentración salina. En primer lugar comprobamos que la ampliación del gradiente hasta 500 mM NaCl, manteniendo la misma pendiente, no afecta al aislamiento de ambas actividades que acetilan H3, tanto libre como nucleosomal. Así, en la fig. 3.6 se observa la presencia de ambos complejos, especialmente utilizando histonas libres como sustrato (fig. 3.6A). El complejo A4-I eluye un poco antes que HAT B (fácilmente identificable por la señal sobre H4 centrada en la fracción 28), y el A4-II un poco después. En segundo lugar se efectuaron experimentos similares a los descritos, pero utilizando una cepa mutante *hat1Δ*. *Hat1p* es la subunidad catalítica de HAT B, que posee una intensa actividad HAT sobre la histona H4 libre. Puesto que las actividades HAT A4-I y II parecen acetilar también a H4, la ausencia de los complejos dependientes de *HAT1* permitiría determinar con mayor claridad, tanto la posición, como la capacidad de acetilar H4 de A4-I y II. En este caso se separaron los dos picos con actividad HAT específica sobre la histona H3 principalmente, y la histona H4 (fig. 3.7). Los resultados mostrados demuestran la existencia de dos complejos identificables, con especificidad sobre H3, y en menor medida por H4.

En conclusión, utilizando un sistema de purificación basado en la obtención de extractos con el método de disociación con NaCl y ultracentrifugación, combinado con una cromatografía de Ni-NTA y otra de intercambio iónico, se han detectado una serie de actividades HAT, algunas de las cuales eran desconocidas. De los complejos detectados, A2 [169, 170, 176], A3 y B [56] ya han sido estudiados con profundidad en nuestro laboratorio. Los complejos cuyas subunidades catalíticas no se han determinado hasta la fecha, son HAT A1 y A4. La eliminación de gran cantidad de proteínas en la cromatografía de Ni-NTA, y el incremento del rango de los gradientes han permitido conseguir una resolución adecuada para separar lo que en un principio pensábamos era un único complejo A4, en dos: A4-I y A4-II. Ambos complejos acetilan H3 libre y nucleosomal, y en menor grado H4 libre, poseyendo A4-I una actividad HAT más intensa hacia H3 nucleosomal. La capacidad de acetilar nucleosomas apoya el carácter nuclear

3.3.1 Detección de una nueva actividad HAT con especificidad sobre la histona H3 105

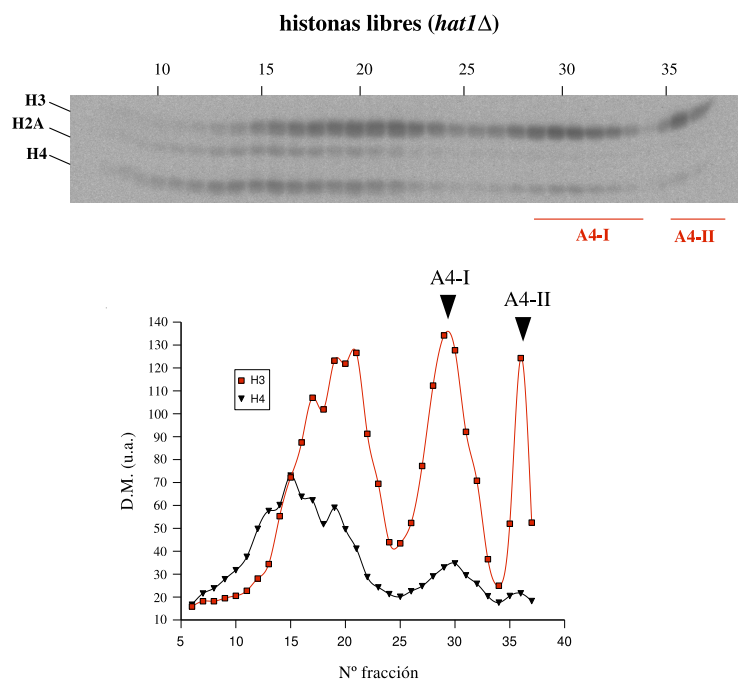


Figura 3.7. Análisis de las actividades HAT A4-I y HAT A4-II en una cepa *hat1Δ* (BQS1178) tras cromatografía de Ni-NTA y recromatografía en Q Sepharose con gradiente salino de 80 a 400 mM. Las fracciones fueron ensayadas con histonas libres, la mezcla de reacción fue separada por electroforesis en gel del 16 % de poliacrilamida, con el subsiguiente análisis por fluorografía. La densidad de marca (u.a.) radiactiva incorporada en las histonas H3 y H4 fue cuantificada mediante densitometrado. Se indica la posición de tres de las histonas internas.

de ambos, y por tanto, su clasificación como complejos HAT de tipo A. Además, nuestros resultados muestran que la actividad HAT de estos complejos es independiente de Hat1p.

3.3.2. Análisis de las actividades HAT A4-I y A4-II

3.3.2.1. HAT A4-I y A4-II poseen masas moleculares distintas

Para corroborar que los picos de actividad de los complejos A4-I y A4-II constituirían dos entidades diferentes, las fracciones correspondientes a ambos picos procedentes de un fraccionamiento de extracto de cepa silvestre (9 L de BY4742) se reunieron y se concentraron. Una alícuota de 500 μ L del concentrado de cada pico fue aplicada a una columna de exclusión molecular Sephacryl S-400. Según el perfil de elución del complejo HAT A4-I (fig. 3.8A), éste posee un tamaño de aproximadamente 0.2 MDa (fracción 44) mientras que HAT A4-II (fig. 3.8B) tendría aproximadamente 2 MDa (fracción 37).

Teniendo en cuenta la escasa separación que hay entre los complejos A4-I y A4-II en la cromatografía sobre Q Sepharose, no es de extrañar que se produzca una pequeña contaminación cruzada en las cromatografías de exclusión

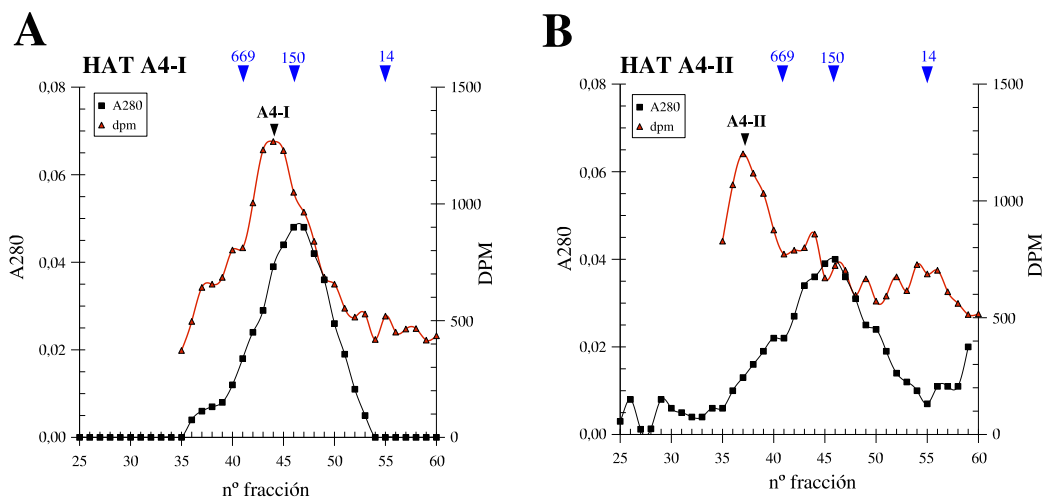


Figura 3.8. **Determinación de la masa molecular de los complejos A4-I y II mediante cromatografía de exclusión molecular.** Las fracciones correspondientes al pico A4-I (A) y II (B) de una cromatografía Q Sepharose se reunieron por separado, fueron concentradas y aplicadas a una columna Sephacryl S-400 (ver apartado 3.2.7.3). El tamaño de los patrones de masa molecular (tiroglobulina, alcohol deshidrogenasa, y citocromo c) se halla indicado en azul en la parte superior del gráfico.

molecular. Así en la fig. 3.8A se observa un pequeño hombro en la fracción 37, correspondiente a un tamaño de 2 MDa, mientras que en la fig. 3.8B se percibe un pico de actividad HAT en la fracción 44, correspondiente al tamaño de A4-I (200 kDa). Por otro lado, no se puede descartar que otros complejos coeluyan con A4-I o II en la exclusión molecular, pero éstos se encuentran en forma minoritaria, o bien poseen una escasa actividad HAT en las condiciones de ensayo empleadas. Tanto por su lugar de elución en el gradiente de la cromatografía en Q Sepharose, como por su especificidad por la histona H3, el complejo HAT A4-I posee una clara similitud con el complejo NuA3 identificado por otros autores [74]. Sin embargo, el complejo NuA3, del que se conoce su subunidad catalítica (Sas3p, de 97.6 kDa), así como otras subunidades (Taf14p, de 27.4 kDa e Yng1p, de 25.3 kDa) [74], posee una masa molecular de 400-500 kDa [74], claramente por encima de la obtenida para el complejo A4-I (200 kDa). Existen dos diferencias fundamentales entre nuestra forma de aislar los complejos HAT y la del trabajo sobre NuA3 [74]. La primera es el método de extracción empleado, que consiste en rotura de las células con perlas de vidrio en su caso [74] o la lisis de protoplastos, disociación con NaCl de proteínas asociadas a cromatina y ultracentrifugación, en nuestro caso [169]. La segunda diferencia es la concentración proteica final de las fracciones cromatográficas. La concentración proteica final es mucho menor (14 veces) en las fracciones obtenidas usando nuestro método de separación de actividades HAT. Los complejos eluidos tienen una composición dependiente de la manipulación durante la extracción y purificación, por lo que estas diferencias podrían dar cuenta de la diferencia de tamaños entre A4-I y NuA3. En todo caso, es evidente que el complejo A4-I, con una masa molecular de tan sólo 200 kDa conserva su capacidad de acetilar la histona H3 libre y nucleosomal. Esto último podría indicar que no todas las subunidades del complejo NuA3 son necesarias para la actividad HAT.

En lo que respecta a la actividad HAT A4-II, por su elución en el gradiente sobre Q Sepharose, así como por su especificidad por la histona H3, se puede identificar como homólogo al complejo SAGA descrito por otros autores [60]. Además, en este caso la masa molecular descrita para SAGA [60] y HAT A4-II son coincidentes (2 MDa). La única diferencia importante entre ambos com-

plejos sería la escasa capacidad de acetilar H3 nucleosomal mostrada por HAT A4-II, que contrasta con la descrita para SAGA [60]

3.3.2.2. Los complejos A4-I y II poseen una especificidad por las lisinas de H3 parecida pero no idéntica

Para caracterizar la especificidad de los complejos A4-I y II frente a varios residuos de la histona H3, se realizó un ensayo HAT con los concentrados de ambos picos (ver sección 3.3.2.1) empleando histonas libres como sustrato. Las histonas así acetiladas fueron resueltas mediante electroforesis y se usaron los anticuerpos específicos contra lisinas acetiladas de la histona H3 (α -H3K9ac, α -H3K14ac y α -H3K9acK18ac) para determinar qué posiciones acetilaban principalmente ambos complejos. Como se observa en la fig. 3.9, la histona H3 extraída de eritrocito de pollo contiene un nivel de acetilación significativo en las posiciones analizadas, incluso cuando no se ha incubado en presencia de complejos HAT. No obstante, la incubación de este sustrato con los complejos A4-I o II incrementa sensiblemente, y de forma parecida, la acetilación de las lisinas 9 y 14 de H3. En cuanto al anticuerpo α -K9acK18acH3, éste permitió detectar una diferencia notable en la señal de los sustratos acetilados por los dos complejos, indicando que el complejo A4-II acetila con mayor intensidad la posición 18 de H3 que el complejo A4-I.

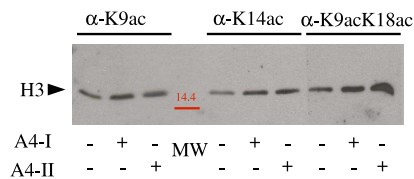


Figura 3.9. Especificidad de los picos de actividad HAT A4-I y A4-II frente a diversas posiciones acetilables de H3. Las mismas fracciones concentradas de los picos A4-I y A4-II empleadas en la fig. 3.8 fueron ensayadas frente a histonas libres y Acetil CoA. El producto de la reacción fue resuelto por electroforesis en un gel del 16% de poliacrilamida, transferido a nitrocelulosa y sometido a *western-blotting* con el uso de α -H3K9ac, α -H3K14ac y α -H3K9acK18ac de Upstate según las instrucciones suministradas por el fabricante.

En resumen, A4-I y II son capaces de acetilar la histona H3 libre en las posiciones 9 y 14 con la misma intensidad, y A4-II puede acetilar la lisina 18 más fuertemente que A4-I. Este último dato corrobora la diferente identidad de ambos complejos. Se ha descrito que el complejo SAGA purificado acetila preferentemente las lisinas 14 y 18, y en menor medida las lisinas 9 y 23, de la histona H3 [179]. Asimismo, Gcn5p, la subunidad catalítica de SAGA y SALSAL/SLIK, muestra preferencia por las lisinas 14, 9 y 18 *in vitro* [213], y probablemente por la 9, 14 y 27 de H3 *in vivo* [189]. Todo ello, junto a lo descrito en el apartado anterior apoya la hipótesis de que A4-II pueda ser identificado como SAGA, o quizás SALSAL/SLIK. Por otro lado, el complejo NuA3 ha sido caracterizado por su preferencia por la lisina 14 de H3 [79]. Aunque estos datos sugieran que A4-I pueda corresponder a NuA3, los resultados sobre masa molecular del apartado anterior no permiten establecer esta equivalencia.

3.3.3. Actividades HAT dependientes de SAS3

De los resultados descritos en cuanto a masa molecular, especificidad de sustrato y elución en cromatografía de intercambio aniónico, se desprende que los complejos A4-I y A4-II poseen homología con complejos descritos por otros autores dependientes de Sas3p y Gcn5p. Con el fin de averiguar si el complejo A4-I o el II, poseen como subunidad catalítica a la proteína Sas3, se analizó el contenido en actividad HAT de mutantes *sas3Δ* y *sas3Δhat1Δ*.

Los perfiles cromatográficos y de actividad HAT con histonas libres o ensambladas en nucleosomas (de eritrocito de pollo en ambos casos) fueron obtenidos para las cepas mutantes *sas3Δ* y *sas3Δhat1Δ*. El análisis en las fluorografías de la incorporación de grupos acetilo en cada una de las histonas, permite detectar una disminución sensible de la intensidad de la acetilación sobre H3 libre (fig. 3.10A), respecto a una cepa silvestre (fig. 3.6A) en la zona de elución de A4-I. Esto sugiere que el pico A4-I está formado por al menos una HAT más, que junto con Sas3p, contribuye a la actividad acetilante sobre H3 libre. Este mismo complejo parece depender absolutamente de Sas3p para su capacidad de

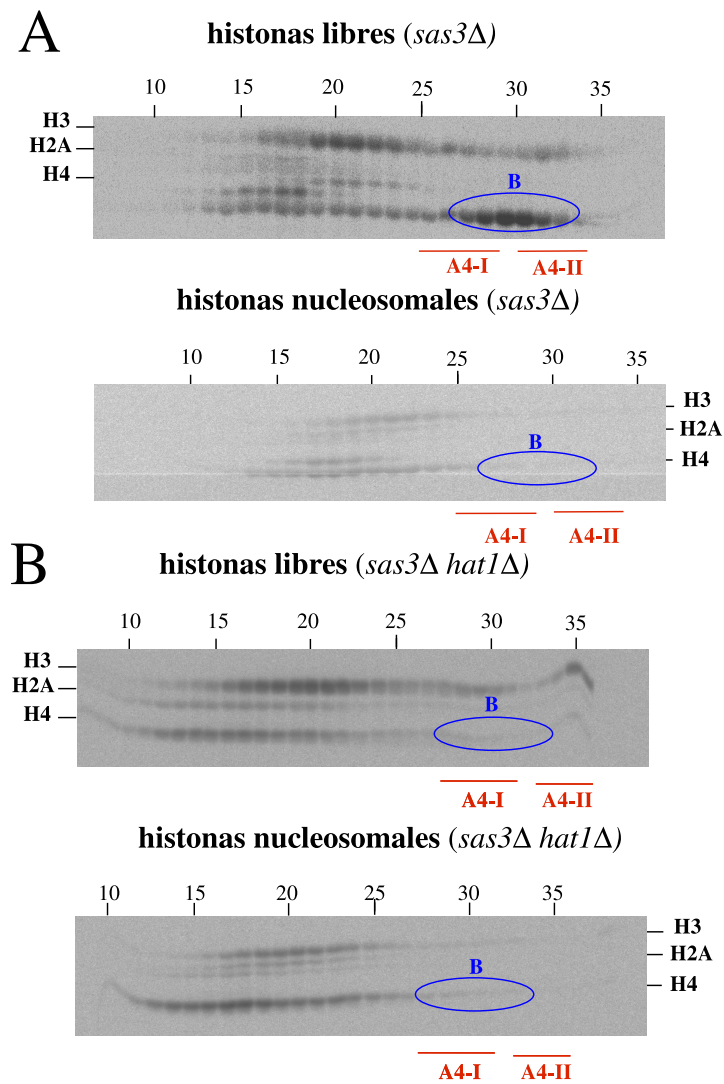


Figura 3.10. Análisis de las actividades HAT en cepas mutantes *sas3Δ* (BQS1033) y *sas3Δ hat1Δ* (BQS1176). Los extractos de las cepas mutantes fueron fraccionados mediante una cromatografía sobre Q Sepharose. Se muestran los fluorogramas obtenidos tras resolver mediante electroforesis las histonas marcadas en el ensayo y se indica el número de la fracción, las posiciones de las histonas H3, H2A y H4 y el lugar de la elución de los complejos B, A4-I y A4-II. (A) Fluorogramas del ensayo HAT con histonas libres y oligonucleosomas de las fracciones de Q Sepharose (gradiente salino de 80 a 500 mM) para una cepa *sas3Δ*. (B) Fluorogramas del ensayo HAT con histonas libres y oligonucleosomas de las fracciones de Q Sepharose (gradiente salino de 80 a 400 mM) para una cepa *sas3Δ hat1Δ*.

acetilar H3 nucleosomal, ya que tanto en el simple mutante *sas3Δ* como en el doble *sas3Δhat1Δ* no aparece señal alguna en su zona de elución cuando se utiliza este tipo de sustrato. Estos resultados indican que A4-I debe estar compuesto por más de una actividad, siendo Sas3p la subunidad catalítica de una de ellas. Así, Sas3p formaría parte de una de las actividades que eluyen en la zona de A4-I, capacitada para acetilar H3 libre y nucleosomal. La otra (u otras) actividad no sería dependiente de SAS3 y en nuestras condiciones de ensayo acetilaría H3 (y probablemente H4) libre.

Por otro lado la caracterización del complejo A4-II respecto a su actividad hacia nucleosomas en ausencia de Sas3p es ambigua. La pérdida de Sas3p no afecta a su capacidad de acetilar histona libre, pero sí a la nucleosomal (fig. 3.10). Esto podría estar causado por una posible labilidad de la actividad de este complejo sobre nucleosomas, o bien por la intervención de Sas3p en esta actividad nucleosomal. En todo caso, dada la escasa actividad que ejerce el complejo A4-II sobre histonas nucleosomales no podemos concluir que Sas3p forme parte de este complejo.

Con objeto de confirmar que Sas3p forma parte de la actividad HAT presente en A4-I, se construyó una cepa con la proteína Sas3 etiquetada en su extremo carboxilo terminal con 6 epítomos HA consecutivos y además en esta ocasión se delecionó el *locus* cromosómico de *GCN5*. Previamente se había demostrado que el etiquetado de la proteína Sas3 no producía ningún fenotipo detectable. En la fig. 3.11C se observa la presencia de Sas3p en las mismas fracciones en las que eluye el complejo A4-I (fig. 3.11B). Por otro lado, cabe resaltar la escasa actividad HAT sobre H3 libre que se observa en la zona donde normalmente eluye el complejo A4-II en la cepa *SAS3-HA6 gcn5Δ*. Ésto parece indicar que Gcn5p pueda participar en este complejo (véase apartado 3.3.4).

Nuestros resultados muestran, pues, que Sas3p forma parte del complejo HAT A4-I. Esto se ha probado tanto por la disminución de la actividad HAT sobre H3 libre y nucleosomal en mutantes *sas3Δ*, como por la detección de Sas3p en la región del gradiente de Q Sepharose donde eluye A4-I. Sin embargo, la actividad A4-I parece solapar con otra actividad que también actuaría sobre his-

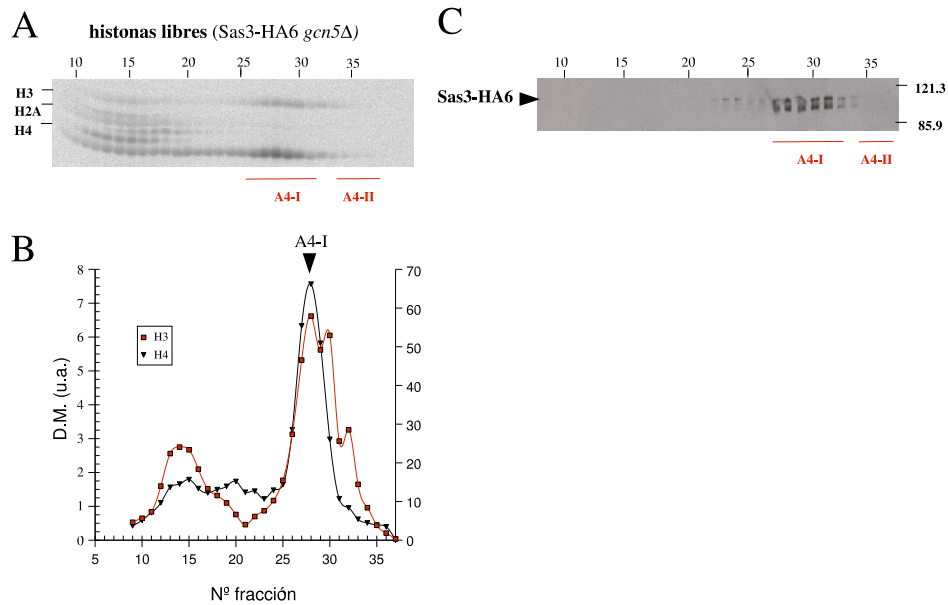


Figura 3.11. **Sas3p** coeluye con el pico de actividad HAT A4-I en ausencia de **Gcn5p**. Se preparó el extracto a partir de la cepa *SAS3-HA6 gcn5Δ* (BQS1339), y se fraccionó como en la fig. 3.10 con un gradiente salino de 80 a 500 mM. (A) Fluorograma del ensayo HAT con histonas libres de las fracciones de Q Sepharose de BQS1339 y (B) el correspondiente densitometrado de la señal sobre la histona H3 y H4. (C) Se aplicaron 8 μ L de fracciones de Q Sepharose procedentes de BQS1339 en un gel del 8 % de poliacrilamida, las proteínas se separaron por SDS-PAGE y tras transferencia a membrana de nitrocelulosa la presencia de Sas3-HA6 fue determinada mediante *western-blotting* con α -HA 12CA5.

tonas libres, aunque no sobre nucleosomas (fig. 3.10A y B), al menos en las condiciones utilizadas.

3.3.3.1. Estudio de componentes del complejo dependiente de Sas3p mediante TAP

Con el objetivo de identificar nuevos componentes del complejo dependiente de Sas3p HAT A4-I, aplicamos la técnica TAP. Dado que otros autores habían identificado como componentes del complejo NuA3 (ver pág. 64) las proteínas Sas3, Yng1 y Taf14 [74, 79], purificamos las tres proteínas mediante cromato-

grafías de afinidad en tándem.

En primer lugar se comprobó por *western-blotting* la expresión de cada una de ellas con la fusión TAP. La proteína Taf14 resultó ser la más abundante, seguida de Yng1 y Sas3 (fig. 3.12A y B).

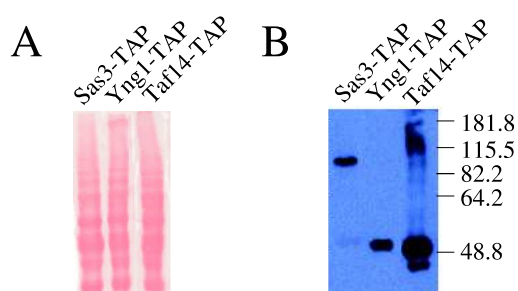


Figura 3.12. Niveles de expresión de Sas3-TAP, Yng1-TAP y Taf14-TAP. Análisis por *western-blotting* de la expresión de proteínas fusionadas a TAP utilizando α -PAP a partir de extractos totales de las cepas indicadas. (A) Tinción con Ponceau tras la electrotransferencia. (B) Revelado quimioluminiscente.

Taf14p copurifica con componentes del complejo TFIIF

La proteína Taf14 es componente de cinco complejos distintos en *S. cerevisiae*: los factores generales TFIID y TFIIF, los complejos remodeladores RSC e INO80 y por último NuA3 [214]. Debido a su abundancia, la purificación TAP de Taf14p fue realizada a partir de sólo 14 g de células (2 L cultivo, DO₆₀₀ 2.5), siendo cada una de las etapas analizada mediante *western-blotting* para detectar la cantidad de proteína etiquetada recuperada en cada una de ellas (fig. 3.13). Taf14p es detectada en los eluidos en condiciones nativas, aunque la elución con SDS muestra que parte de ella quedó retenida en la resina (fig. 3.13, carrera 11). También fue llevada a cabo una purificación TAP de la cepa silvestre, que no expresa ninguna proteína con fusión TAP, como control negativo.

Tras la elución de la resina de calmodulina, las muestras fueron aplicadas a un gel de tricina-SDS y sometidas a electroforesis. El gel teñido con Cooma-

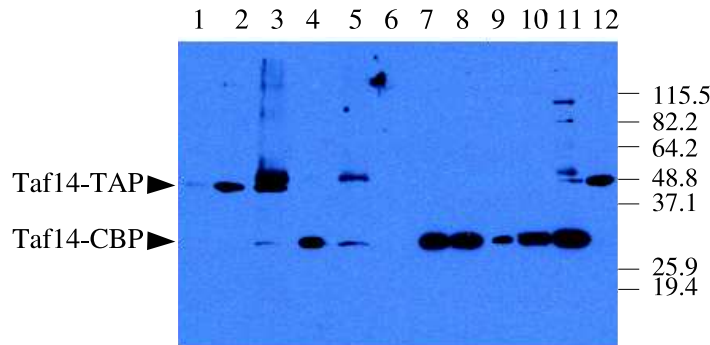


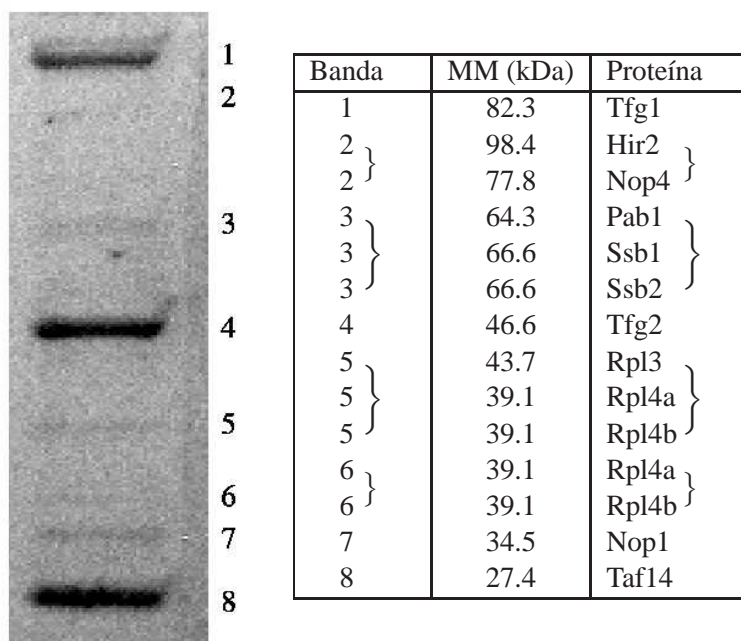
Figura 3.13. Seguimiento de la purificación TAP de Taf14p por *western-blotting* con α -TAP. El extracto sometido a purificación se preparó con tampón B1. Las carreras mostradas corresponden a: 1, extracto; 2, no retenido de IgG-Sepharose; 3, eluido con SDS de resina IgG-Sepharose; 4, digerido con proteasa TEV; 5, no retenido de CaM-agarosa; 6-11, los 5 eluidos con EGTA y el último con SDS, y 12, extracto total de Taf14-TAP.

sie únicamente revela una tenue banda correspondiente a Taf14p en los eluidos nativos (con EGTA). Sin embargo en la carrera correspondiente al eluido desnaturalizado (con SDS) se observan 3 bandas mayoritarias, que junto con otras 5 bandas minoritarias fueron recortadas, sometidas a digestión con tripsina y analizadas por espectrometría de masas (véase figura en tabla 3.5).

Las condiciones de extracción estándar permiten identificar las tres proteínas de las bandas mayoritarias como Tfg1, Tfg2 y Taf14/Tfg3 (tabla 3.5). Estas proteínas son los componentes del complejo TFIIF [215]. Este factor general de la transcripción permite el reclutamiento de la RNA polimerasa II al complejo DNA-TBP-TFIIB unido al promotor, de modo que disminuye su afinidad por DNA no específico, promueve el posterior reclutamiento de TFIIE y TFIIH, y además facilita la elongación por la RNA polimerasa [216]. También se identifican Nop1 y Nop4, que son proteínas nucleolares implicadas en el procesamiento del pre-RNA.

La detección de Hir2p como proteína asociada a Taf14p resulta de especial relevancia puesto que no se ha hallado asociada a ninguno de los cinco com-

Tabla 3.5. Resultados de MALDI-TOF para el eluido final en presencia de SDS de la purificación de Taf14-TAP. Se muestran las bandas del gel de tricina-SDS teñido con Coomassie del que se escindieron las bandas para el análisis MALDI-TOF. Las proteínas identificadas a partir de una única banda se señalan entre llaves con el número de la banda correspondiente.



plejos con los que interacciona Taf14p previamente descritos [214]. Hir2 es un corepresor transcripcional que regula la transcripción de las histonas e interacciona con las histonas H3 y H4, además de con el complejo remodelador SWI/SNF [217, 218]. Asimismo recientemente se ha descrito que Hir2p participa en el complejo corepresor HIR, junto con Hir1p, Hir3p y Hpc2p [219].

Las proteínas ribosomales Rpl4a, Rpl4b y Rpl3, así como las carabinas moleculares Ssb1 y Ssb2 (miembros de la subfamilia SSB de proteínas HSP70 citoplasmáticas), se suelen considerar contaminantes en este tipo de experimentos [192, 195]. En este sentido, cabe destacar que en el control negativo realizado con la cepa silvestre sin etiquetar también se detectan como proteínas de fondo Ssb1, Ssb2, Pab1 y alguna de las proteínas ribosomales.

Los resultados obtenidos corroboran estudios realizados previamente por

otros autores sobre la identidad estructural del complejo TFIIF, del que formarían parte Tfg1, Tfg2 y Taf14/Tfg3 [215]. A esto cabe añadir la detección de la interacción *in vivo* entre las proteínas Taf14 e Hir2, lo que sugiere que este correpressor pueda encontrarse en alguno de los complejos en los que participa Taf14p. Sin embargo, las proteínas identificadas no parecen tener una conexión clara con el complejo A4-I. Con objeto de intentar conseguir condiciones más favorables para la estabilidad de los complejos y utilizar condiciones similares a las de otros métodos de extracción específicos de HATs [171], se procedió a modificar las condiciones de extracción (fuerza iónica y concentración de glicerol).

Identificación de proteínas que interaccionan con Sas3, Taf14 e Yng1

Cuando se empleó una concentración salina de 350 mM y una concentración del 10 % en glicerol en el tampón de extracción (B2) para las purificaciones de las tres proteínas etiquetadas, se obtienen resultados distintos para la purificación TAP de Taf14p. En esta purificación se emplearon 8.7 g de células de la cepa silvestre, 30.6 g de la cepa Sas3-TAP, 5.3 g de Taf14-TAP y 22.3 g de Yng1-TAP. Las proteínas eluidas de la resina de calmodulina fueron separadas por electroforesis (fig. 3.14). El análisis por MALDI-TOF de las bandas mayoritarias correspondientes a los eluidos 2 y 3 (E2+E3) no permitió identificar las proteínas presentes en las mismas, por lo que las carreras que contenían los eluidos desnaturalizados fueron divididas en 4 regiones que se analizaron independientemente por LC-MS/MS. Esta estrategia presenta la ventaja de que no elimina proteínas en bandas poco intensas o minoritarias. Posteriormente los datos procedentes de las cuatro regiones fueron reunidos para simplificar el análisis de los resultados. De las proteínas identificadas se eliminaron las que comúnmente se consideran contaminantes en este tipo de análisis [192, 194, 195], incluidas las proteínas ribosomales y aquellas que se identificaron en la muestra control de la cepa silvestre. Los datos de espectrometría de masas permiten detectar 47 proteínas que copurifican con Sas3, 58 con Taf14 y 24 con Yng1.

En la tabla 3.6 se recogen las proteínas detectadas con sólo una de las tres proteínas etiquetadas. En lo que respecta a Taf14p, además de Tfg1 y Tfg2

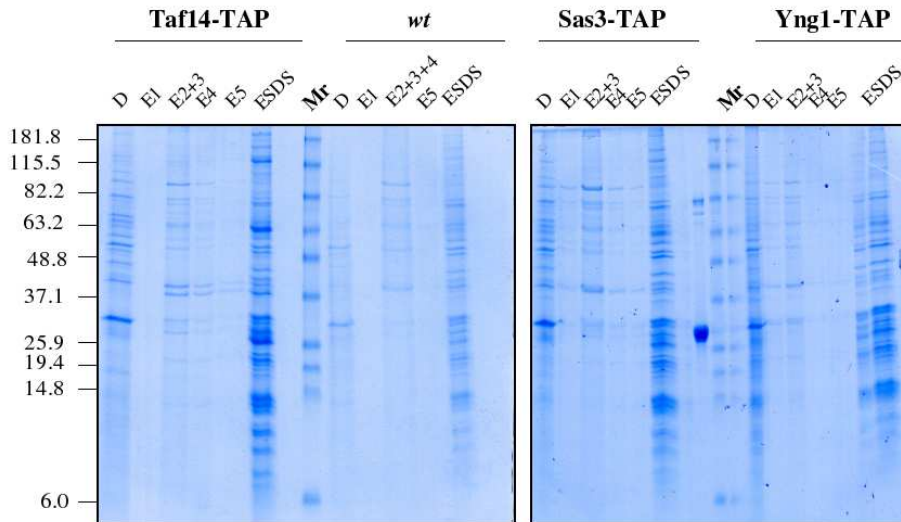


Figura 3.14. **Purificación TAP de Sas3p, Taf14p e Yng1p.** Una alícuota de digerido con TEV y todo el volumen de las eluciones de la resina de calmodulina fueron aplicados en un gel de tricina-SDS al 12 %. Las muestras corresponden a: D, digerido con proteasa TEV; E1-E5, eluidos con EGTA (nativos), y ESDS, eluido con SDS (desnaturalizado).

(TFIIF), se identificaron componentes de otros tres complejos con los que esta proteína interacciona: de la RNA polimerasa II (Rpo21, Rpb2, Rpb5, Rpb9 y Rpb11), de INO80 (Rbv1¹ y Rbv2) y de SWI/SNF (Swi1, Swi3, Swp82, Snf2, Snf5 y Snf6) (tabla 3.6). La obtención de 5 subunidades de la RNA polimerasa II copurificadas mediante TAP con Taf14p, sugiere una interacción estable entre TFIIF y la RNA polimerasa. Otro aspecto interesante es que Swp82p, asociada a Taf14-TAP según nuestros resultados (tabla 3.6), también se ha hallado asociada a las proteínas Swi1, Swi3, Snf5, Arp7 y Arp9 etiquetadas [192], lo que estaría de acuerdo con su pertenencia al complejo SWI/SNF. También es destacable la presencia de Spt5 entre las proteínas con las que interacciona Taf14 (tabla 3.6). Spt5, junto con Spt4, forma un complejo que media la activación y la inhibición de la elongación transcripcional, que se ha sugerido intervendría en la señalización de la ruta Ras/PKA transduciendo la señal para actuar a nivel de la elongación [220].

¹Eliminado por aparecer en la lista de contaminantes comunes [192].

De especial relevancia resulta la presencia de la proteína Ylr455w entre las que copurifican mediante TAP con Sas3p (tabla 3.6). Esta proteína también interacciona con Sas3p, Yng1p y Nto1p² según un estudio de las interacciones globales entre las proteínas de *S. cerevisiae* [195]. El hecho de que 13 de las proteínas descritas en ese estudio que interaccionan con Ylr455w [195] (Fun12, Nop1, Has1, Nop58, Puf6, Ebp2, Stm1, Rpa49, Sas3, Kre33, Nip1 y Nop12) también aparezcan en nuestro rastreo de componentes del complejo A4-I, sugiere que esta proteína podría formar parte del complejo, o bien de un módulo asociado (tablas 3.6, 3.7 y 3.8). Por otro lado, el dominio PWWP de tipo Tudor que contiene Ylr455w podría permitir su unión a DNA.

En la tabla 3.7 se muestran las proteínas que copurifican en TAP con dos de las proteínas etiquetadas (Sas3p, Taf14p e Yng1p). En lo que respecta a proteínas que pudieran pertenecer al complejo A4-I, destaca la presencia de Nto1p entre las proteínas copurificadas con Sas3p e Yng1p. Esta proteína fue introducida en 2003 en el portal web SGD (<http://www.yeastgenome.org>) como proteína requerida para la integridad del complejo NuA3 (L. Howe, J.L. Workman, comunicación personal), y recibe su nombre por su posible pertenencia a este complejo (*NuA Three ORF 1*). Además, uno de los trabajos globales de identificación de complejos de levadura también ha detectado la interacción entre Sas3p y Nto1p [195]. Todos estos datos respaldan la interacción estable de Nto1p con el complejo. Es interesante reseñar que Nto1p contiene un motivo Epc-N (*Enhancer of the Polycomb N-terminus*), consistente en un haz de cuatro hélices ortogonales a derechas que contiene un motivo PHD (*Plant HomeoDomain*) capaz de unir dos cationes Zn²⁺ [221]. Este dominio se halla en proteínas nucleares y se piensa que interviene en la regulación epigenética. Todos estos datos apuntan a que Nto1p sea una subunidad del complejo A4-I.

También se copurificó la subunidad A49 de la RNA polimerasa I (Rpa49) con Sas3-TAP y Taf14-TAP (tabla 3.7), lo cual sugiere algún tipo de conexión con el proceso de síntesis de rRNA. Es interesante que en el trabajo de interacciones globales mencionado anteriormente [195], también se detecte una interacción entre Rpa49p e Ylr455wp.

²Como se verá más tarde esta proteína copurifica en TAP con Sas3p e Yng1p en nuestro trabajo.

Tabla 3.6. **Proteínas que únicamente han sido purificadas con una de las tres proteínas etiquetadas.** Se incluyen las proteínas que únicamente se han identificado en una de las tres purificaciones (Sas3-TAP (BQS1345), Taf14-TAP (BQS1346) o Yng1-TAP (BQS1347)) en los eluidos desnaturalizados (SDS). Se han eliminado las proteínas que aparecen en la purificación control de la cepa silvestre (BMA64-1A), y los contaminantes frecuentes que describen los trabajos que han identificado complejos de levadura a gran escala utilizando TAP [192, 195, 194]. Las proteínas se encuentran ordenadas por la puntuación obtenida mediante el algoritmo MASCOT [212], de modo que una mayor puntuación implica mayor probabilidad de identificación correcta.

Sas3-TAP		Taf14-TAP		Yng1-TAP
Cct8	Bfr2	Swi3	Rlp7	Pbp4
Err3	Kre33	Rbv2	Adh5	Yng1
Hef3	Mkt1	Por1	Dbp1	Sec53
Drs1	Erg13	Arp7	Rpb3	Tma19
Nop12	Puf6	Mnp1	Aac1	Atp1
Pyk2	Dps1	Rpb9	Spt5	Rfs1
Tfp1	Tif35	Crh1	Nop58	Mss116
Bmh1	Atg27	Rpb11	Ecm33	Gus1
Hem15	-	Hrp1	Atp2	Urp1
Ssa3	-	Img2	Swp82	Sam1
Ses1	-	Yef3	Rpb2	-
Npl3	-	Snf6	Snf5	-
Sup45	-	Swi1	Snf2	-
Has1	-	Cit1	Pma2	-
Grs1	-	Rpb5	Tfg1	-
Kap123	-	Ebp2	Tfg2	-
Nip1	-	Snf12	Ecm1	-
Ylr455w	-	Taf14	Err1	-
Yhm2	-	Rpo21	-	-
Asc1	-	Nop1	-	-

Tabla 3.7. **Proteínas que copurifican con dos de las proteínas etiquetadas.** Se incluyen las proteínas identificadas simultáneamente en dos de las purificaciones de las tres proteínas (Sas3p (BQS1345), Taf14p (BQS1346) e Yng1 (BQS1347)). Los datos han sido filtrados como en la tabla 3.6.

Sas3-TAP/Taf14-TAP	Taf14-TAP/Yng1-TAP	Sas3-TAP/Yng1-TAP
Tma46	Cdc33	Dbp2
Nop14	Pdc6	Nto1
Nsr1	-	Pfk2
Ths1	-	Mpg1
Atp7	-	-
Tif34	-	-
Arp9	-	-
Rpa49	-	-
Pet9	-	-
Gcd11	-	-
Yhb1	-	-

Tabla 3.8. **Proteínas que copurifican con las tres proteínas etiquetadas.** Se incluyen las proteínas identificadas en los eluidos SDS de las cepas BQS1345 (Sas3-TAP), BQS1346 (Taf14-TAP) y BQS1347 (Yng1-TAP). Los datos han sido filtrados como en la tabla 3.6.

Sas3-TAP/Taf14-TAP/Yng1-TAP
Fas2
Krs1
Ded81
Sas3
Pdc5
Ens1
Fun12
Stm1 ^a

^aContaminante según [195].

Entre las proteínas identificadas en las tres purificaciones se encuentra Sas3 (ver tabla 3.8). Esto corrobora la interacción de Sas3p con las proteínas Taf14 e Yng1, como componentes de NuA3 [74, 79], y sugiere que son compañeras de Sas3 en el complejo A4-I. Que Taf14p e Yng1p no hayan sido halladas en las purificaciones de las otras proteínas no puede explicarse fácilmente. En cuanto al resto de proteínas que coeluyen con los tres componentes conocidos de NuA3 (tabla 3.8), la mayor parte están implicadas en procesos de traducción (Ded81, Ens1, Fun12 y Krs1) y dos de ellas son enzimas del metabolismo (Pdc5 y Fas2). A pesar de que Stm1 ha sido catalogada como contaminante [195], hemos considerado apropiado incluirla, dado que es una proteína que se asocia al ribosoma y a elementos subtelo méricos Y' [222], y posee una homología parcial de secuencia con la histona H1 [223]. Stm1 se caracteriza por unirse a motivos de purina en triple hélice y a cuádruplex G4 de ácidos nucleicos, lo que ha hecho que se proponga un papel para esta proteína en mitosis [224]. La asociación de Stm1 a heterocromatina telomérica podría, por tanto, relacionarse con la función silenciadora de Sas3 [68]. Por otro lado, según el estudio a gran escala de interacciones proteína-proteína realizado recientemente [195], Stm1p también interacciona con Eaf7p (componente del complejo HAT NuA4) y Hat1p (HAT B), lo que podría indicar una posible función de puente entre distintos complejos modificadores de la cromatina.

Con vistas a la optimización de la purificación del complejo HAT dependiente de Sas3p en condiciones nativas, también se han utilizado perlas magnéticas acopladas a calmodulina en la segunda cromatografía de afinidad. Este procedimiento permite la elución completa de Sas3p con EGTA. Sin embargo, los análisis de espectrometría de masas no identifican otras proteínas acompañantes de Sas3 que no se hubieran descrito previamente como contaminantes.

En resumen, el conjunto de datos obtenidos a partir de los eluidos con SDS, y de acuerdo con trabajos publicados recientemente [194, 195], sugiere la existencia de un complejo HAT formado por Sas3p, Taf14p, Yng1p, Nto1p e Ylr455wp. Según la suma de las masas moleculares de estas proteínas, el complejo formado tendría una masa global de 270 kDa, ligeramente superior a los 200 kDa determinados por filtración en gel. No obstante, debido a la inexactitud inherente a esta

técnica, el tamaño del complejo formado por las cinco proteínas podría estar dentro del rango de error de la filtración en gel. En cualquier caso, la confirmación de las proteínas identificadas (tablas 3.6, 3.7 y 3.8) como posibles componentes de nuestro complejo requeriría de estudios adicionales.

3.3.4. Actividades HAT dependientes de *GCN5*

Así como Sas3p sólo ha sido identificada como integrante del complejo NuA3, y en el presente trabajo de A4-I, Gcn5p ha sido descrita como la subunidad catalítica de cuatro complejos distintos: ADA, HAT A2, SALSA/SLIK y SAGA [60, 169, 61, 62]. Mediante el sistema de purificación empleado en nuestro laboratorio se ha identificado tan solo uno de ellos, HAT A2 [169], por lo que resulta probable que las actividades residuales de los complejos A4-I o A4-II en un mutante *sas3Δ*, puedan depender de *GCN5*. Para averiguar si la actividad de A4-I o II mostraban una dependencia respecto de *GCN5*, se analizaron las actividades HAT de cepas mutantes *gcn5Δ*. Cuando se compara la actividad HAT sobre histonas libres obtenida tras el fraccionamiento de extractos de levadura de la cepa mutante *gcn5Δ* (BQS1181) (fig. 3.15A) con la silvestre (BY4742) (fig. 3.5B en pág. 67) se observa una drástica disminución de la acetilación de la histona H3, desapareciendo por completo de la zona de elución del complejo HAT A2 (de acuerdo con resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio [169]), así como en la zona de elución del complejo A4-II.

Como era de esperar, en la zona del complejo A4-I se mantiene una actividad acetilante de H3, ejercida por Sas3p, si bien parece detectarse una pequeña disminución en la intensidad de la marca comparando con la cepa silvestre. En la fig. 3.15B se muestra el análisis fluorográfico del mismo mutante, pero utilizando en este caso nucleosomas como sustrato. Como se puede observar, el resultado es similar al obtenido con histonas libres. De nuevo se detecta una pérdida de acetilación de H3 por parte de los complejos HAT A2 y A4-II, manteniéndose la del complejo A4-I. Estos resultados indican que Gcn5p es la subunidad catalítica, no sólo del complejo HAT A2 previamente descrito [169], sino también del

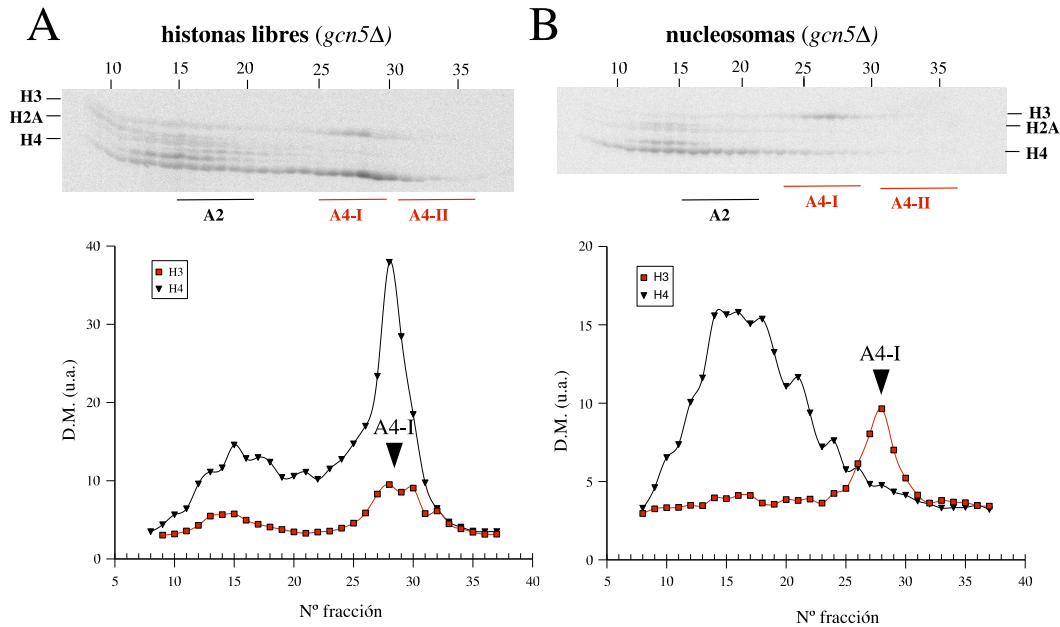


Figura 3.15. Análisis de actividades HAT en una cepa *gcn5Δ* (BQS1181).

(A) Fluorograma del ensayo HAT con fracciones de Q Sepharose del extracto de una cepa *gcn5Δ* empleando histonas libres, junto con el densitometrado de la marca radiactiva sobre las histonas H3 y H4. (B) Fluorograma del ensayo HAT con las mismas fracciones que en A, pero usando oligonucleosomas como sustrato, y el correspondiente densitometrado de H3 y H4.

HAT A4-II identificado en el presente trabajo.

Con el objeto de confirmar la presencia de Gcn5p en el complejo A-II, se realizó un fraccionamiento de una cepa con la proteína Gcn5p etiquetada en su extremo carboxilo terminal. La fig. 3.16A muestra el ensayo con histonas libres obtenido para el fraccionamiento de la cepa con esta proteína etiquetada. Se puede observar la intensa incorporación de radiactividad sobre la histona H3 producida en las zonas de elución de los complejos A2, A4-I y A4-II, lo que dificulta en esta ocasión la separación de estas actividades, sobre todo de las dos últimas. En todo caso, la también intensa señal obtenida sobre H4, centrada en la fracción 28, y producida por el complejo HAT B, puede servir de referencia para posicionar los complejos A4-I y A4-II. Esto se debe a que el complejo HAT

A4-I de forma reproducible eluye ligeramente antes que HAT B, y el A4-II ligeramente después (fig. 3.10 como ejemplo). De esta forma determinamos que la zona de elución del complejo A4-I está centrada en las fracciones 25-26, y la del complejo A4-II en las fracciones 31-32. La inmunodetección de Gcn5p (fig. 3.16B) muestra que esta proteína está presente en el complejo A2 (como era de esperar), así como en los dos complejos identificados en este trabajo: A4-I y A4-II. La elución de Gcn5p en las fracciones correspondientes al complejo A4-II confirman los datos obtenidos con la cepa mutante *gcn5Δ*, concluyéndose que esta proteína es la subunidad catalítica del complejo A4-II. La elución de Gcn5p en las fracciones donde se encuentra el complejo A4-I (fig. 3.16B) indicarían que en la zona de elución de ese complejo coexistirían dos actividades HAT diferentes, una dependiente de Sas3p (A4-I), ya analizada en apartados anteriores, y otra dependiente de Gcn5p, que pasamos a denominar A4-I-Gcn5p-dep. La presencia de este nuevo complejo explicaría que la actividad HAT de A4-I en las cepas *sas3Δ* mostrada anteriormente disminuya pero no desaparezca totalmente (figs. 3.10A y B). La presencia de Gcn5p en los dos complejos sugiere que estos podrían poseer características coincidentes con SAGA y SALSA/SLIK, compartiendo subunidades al menos parcialmente. Por tanto nos planteamos identificar mediante *western-blotting*, proteínas cuya pertenencia exclusiva a SAGA y SALSA/SLIK hubiera sido establecida previamente.

La proteína Spt7 en su forma completa ha sido descrita como componente de SAGA [60], mientras que en el complejo SALSA/SLIK [61] se ha hallado una variante de Spt7 truncada en su extremo carboxilo terminal [62]. La proteína Spt7 de longitud completa posee una masa molecular de 152.6 kDa, mientras que la proteína purificada en el complejo SALSA/SLIK tiene una masa aparente de aproximadamente 130 kDa. Por otro lado, Rtg2p únicamente se ha detectado formando parte de SALSA/SLIK [62]. En la fig. 3.17 se muestran las fluorografías obtenidas, así como la inmunodetección de las proteínas etiquetadas en las cepas de levadura BQS1209 (Spt7-HA6) y BQS1334 (Rtg2-HA6). Se puede apreciar que la proteína Spt7 completa eluye en la región del complejo A4-II (fig. 3.17A). Por otro lado, la proteína Rtg2, característica del complejo SALSA/SLIK [61], eluye de forma coincidente con el complejo A2 (fracciones 19

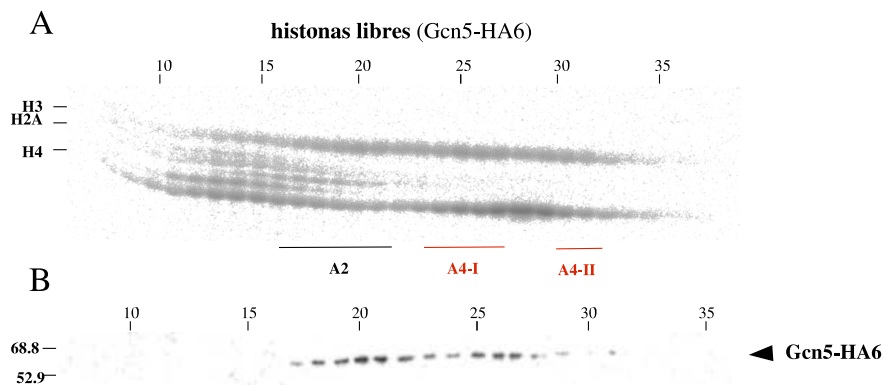


Figura 3.16. **Gcn5p coeluye con los complejos HAT A2, A4-I y A4-II.**

(A) Fluorograma del ensayo HAT con histonas libres del fraccionamiento de un extracto de *GCN5-HA6* (BQS1340) realizado de igual modo que en la fig. 3.11A. (B) Inmunodetección de Gcn5 etiquetada en las fracciones mostradas en A.

a 24), A4-I (fracciones 28 a 31) y, aunque menos visible, A4-II (fracciones 33 a 35) (fig. 3.17B). Estos resultados sugieren que el complejo denominado A4-I-Gcn5-dep podría compartir con el complejo SALS/SLIK la subunidad catalítica Gcn5p y la proteína Rtg2, y Spt7p en su versión trunca. Por su parte, el complejo A4-II coincidiría con SAGA en cuanto a subunidad catalítica (Gcn5p), y en la subunidad Spt7 completa. Ambos complejos A4-I-Gcn5-dep y A4-II presentan además la misma especificidad por la histona H3 que los complejos SAGA y SALS/SLIK [60, 61]. No obstante, según nuestros datos, la proteína Rtg2 no formaría parte de forma exclusiva del complejo SALS/SLIK, sino que también acompañaría a Gcn5p en el complejo HAT A2 y probablemente en A4-II.

En suma, nuestros datos apuntan a que el complejo A4-I estaría formado por Sas3p como subunidad catalítica, y podrían acompañarla Taf14, Yng1, Nto1 e Ylr455w. Este complejo presentaría algunas características comunes con el complejo NuA3 previamente descrito [74], si bien algunas de las proteínas identificadas mediante TAP como componentes putativos de este complejo, no habían sido identificadas anteriormente. El complejo A4-I-Gcn5-dep coeluye con el complejo A4-I, y sus características son coincidentes con las del complejo SAL-

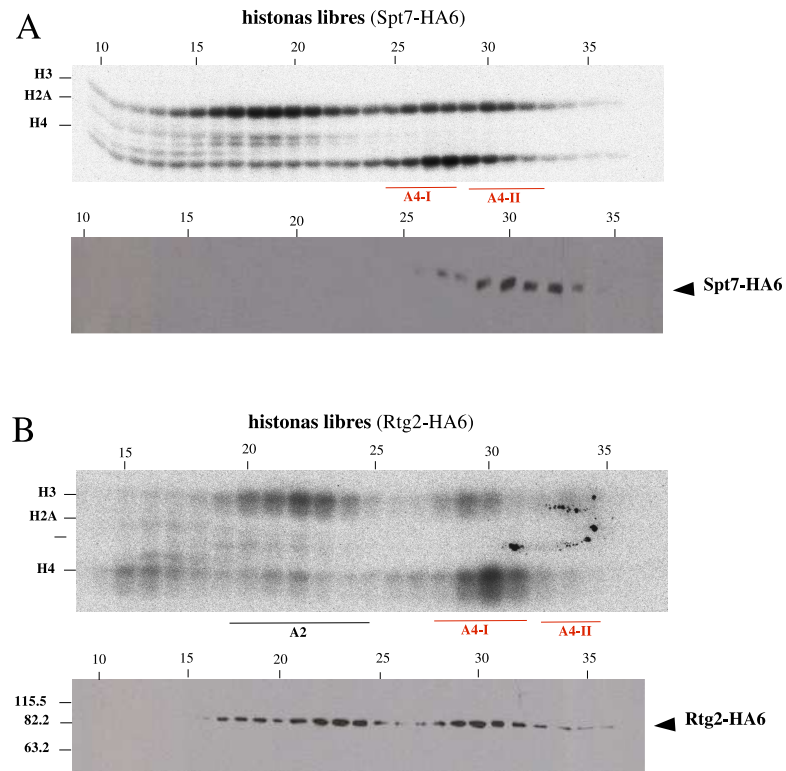


Figura 3.17. Inmunodetección de Spt7-HA6 (BQS1209) y Rtg2-HA6 (BQS1334) en el gradiente salino de una cromatografía Q Sepharose. Los extractos de las cepas correspondientes fueron fraccionados como se describe en los apartados 3.2.7.1 y 3.2.7.2 en un gradiente salino de 80-500 mM. (A) Acetilación de histonas libres por las fracciones de Q Sepharose de Spt7-HA6. El ensayo HAT fue efectuado como se describe en el apartado 3.2.8.2. Se muestra el fluorograma correspondiente. Alícuotas de las fracciones fueron separadas por electroforesis, y la presencia de Spt7 etiquetada fue determinada mediante *western-blotting* (ver apartado 3.2.10) como aparece en el panel inferior. (B) Se muestra el fluorograma y la detección de la proteína etiquetada como en A, pero para Rtg2-HA6 separada mediante Resource Q.

SA/SLIK, excepto en que A4-I-Gcn5-dep muestra muy escasa o nula capacidad de acetilar H3 en forma nucleosomal. Finalmente el complejo A4-II muestra algunas propiedades semejantes a las del complejo SAGA (masa molecular, especificidad, dependencia de Gcn5p y presencia de la proteína Spt7 completa). Sin embargo, A4-II parece incluir también a la proteína Rtg2, lo cual lo diferenciaría del complejo SAGA. En todo caso, el complejo A4-II descrito en el presente trabajo muestra una escasa actividad HAT cuando se utilizan nucleosomas como sustrato, mientras que SAGA se caracteriza por acetilar intensamente H3 en forma nucleosomal [179], por lo que parece muy probable que ambos complejos no sean idénticos.

3.3.5. Actividad HAT dependiente de *ESAI*

Los resultados obtenidos con los diferentes mutantes en actividades HAT de levadura que se han analizado en apartados anteriores, permiten descartar que HAT A1 sea dependiente de las proteínas Gcn5p, Sas3p o Hat1p (fig. 3.10 en pág. 110, fig. 3.7 en 105 y fig. 3.15 en pág. 123). El complejo HAT A1 previamente descrito [175] acetila principalmente H4 y H2A cuando se ensaya con histonas libres, y las cuatro histonas internas con diferente intensidad cuando se ensaya con nucleosomas (fig. 3.1 en pág. 67 y fig. 3.5 en pág. 102). Esa1p es la subunidad catalítica del complejo NuA4 descrito por otros autores, el cual posee una masa molecular de 1.2 MDa, y una especificidad sobre histonas libres y nucleosomales idéntica a la de A1 [174]. Además, ambos complejos, A1 y NuA4, eluyen en las primeras fracciones de un gradiente salino de una cromatografía de características similares. Estas coincidencias permiten sospechar que ambos complejos comparten la misma subunidad catalítica, Esa1p, y probablemente otras subunidades. Dado que el gen que codifica Esa1p es esencial, no se pudieron obtener mutantes nulos para realizar estudios similares a los descritos para los genes *GCN5* y *SAS3*. Por ello se utilizó una cepa termosensible que contiene una versión de Esa1p truncada para comprobar si ésta era la subunidad catalítica de A1. El alelo *esa1 Δ I-414* [188] consiste en la delección de un único nucleótido que produce una mutación de cambio de pauta de lectura en

el codón 414, lo que causa 10 aminoácidos alterados y que la proteína contenga 22 aminoácidos menos que la silvestre. Se ha descrito que la cepa que contiene este alelo expresado desde un plásmido centromérico (LPY3291) crece bien a la temperatura permisiva pero posee una actividad de NuA4 10 veces menor que la nativa, y tras 4 h a la temperatura restrictiva se produce una elevada letalidad [174].

La figura 3.18A muestra las fracciones cromatográficas donde eluye el complejo A1 de la cepa silvestre (13 a 17), que evidencian la actividad típica de este complejo sobre H4 principalmente, y en menor medida sobre H2A. Si se comparan estas mismas fracciones con las procedentes de extractos de la cepa *esa1-ts*, tanto crecida a temperatura permisiva (fig. 3.18B), como a la restrictiva (fig. 3.18C), se observa una clara disminución en cuanto al nivel de acetilación de la histona H4. Esto indica que *Esa1p* es la subunidad catalítica del complejo HAT A1, y confirma que la actividad HAT de la proteína *Esa1 Δ 1-414* se encuentra notablemente disminuida tanto a la temperatura permisiva como a la restrictiva (figs. 3.18B y C). El hecho de que este mutante sea viable a la temperatura permisiva y no a la restrictiva sugiere que la letalidad obedezca a causas diferentes a la de la pérdida de la mayor parte de la actividad HAT. No se realizó un ensayo HAT de la cepa silvestre crecida a 37°C debido precisamente al resultado mostrado en la fig. 3.18B. Si a temperatura permisiva la actividad de la cepa con el alelo *esa1 Δ 1-414* ya se encuentra dramáticamente afectada, la cepa silvestre a 37°C no proporcionaría mayor información, puesto que, o bien A1 no se vería afectada (como pensamos), o bien si se ve afectada debe ser una causa adicional a la que produce la disminución de actividad en las figs. 3.18B y C.

Con el fin de corroborar que *Esa1p* forma parte del complejo A1, nos planteamos detectar la proteína *Esa1* en las fracciones en las que eluye A1 utilizando un anticuerpo específico que la reconociera. Para ello se procedió a incluir una nueva etapa de purificación. Así, se recogieron las fracciones (15-20) correspondientes al complejo A1 de una cromatografía Q Sepharose de una cepa silvestre (fig. 3.19A). Estas fracciones fueron dializadas frente a tampón C, aplicadas a una columna de intercambio catiónico Resource S, y se eluyó mediante un gradiente de 0 a 1 M de NaCl. En la fig. 3.19B se muestra la fluorografía obtenida

para las fracciones tras este paso cromatográfico, usando histonas libres de eritrocito de pollo como sustrato. El complejo A1, caracterizado por su capacidad de acetilar las histonas H4, H2A y H3 libres, eluye en las fracciones 10-15.

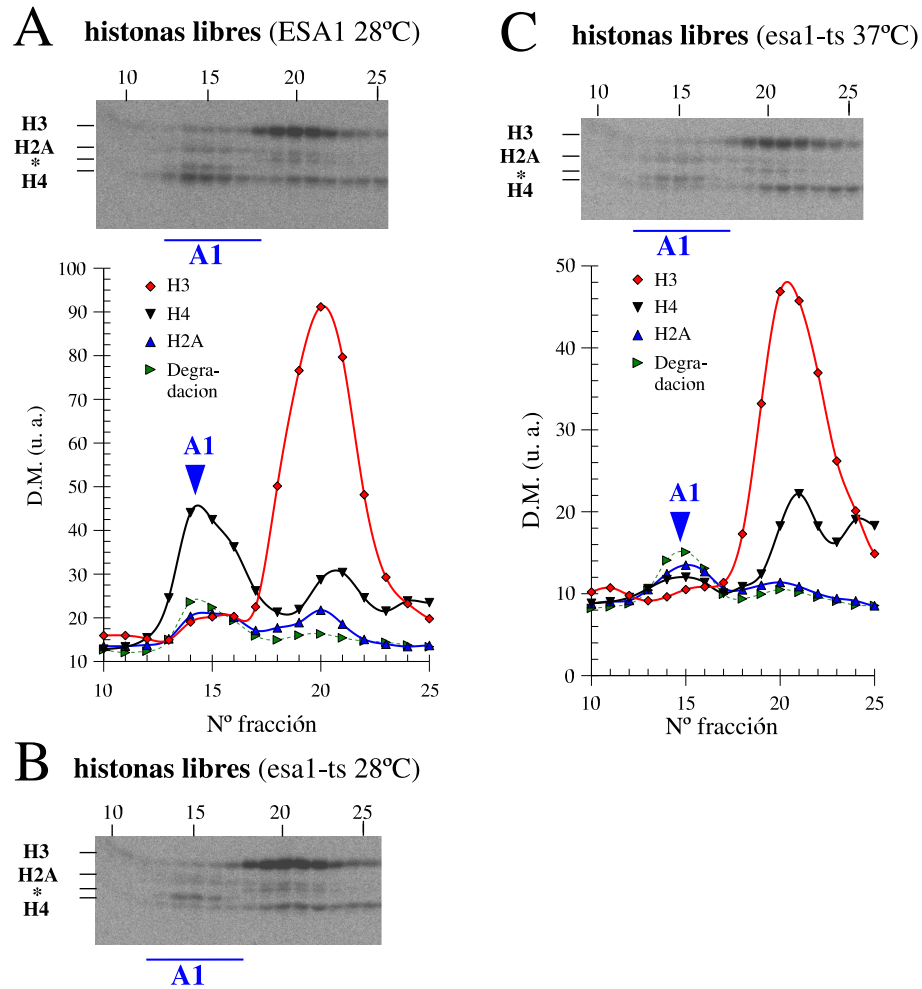


Figura 3.18. Análisis de la actividad HAT A1 en una cepa silvestre (LPY2990) y en una cepa *esa1-ts* (LPY3291) crecida a temperatura no restrictiva (28°C) y a temperatura restrictiva (37°C). Se realizó un extracto de la cepa silvestre crecida a 28°C, un extracto control de la cepa *esa1-ts* crecida a 28°C y otro extracto a partir de un cultivo que tras alcanzar una DO_{600} de 0.36 fue sometido 6h a incubación con agitación a 37°C. Fue llevada a cabo una purificación con cromatografía de Ni-NTA, y Resource Q acoplada a un sistema de FPLC *AKTA prime*. Alícuotas de las fracciones del gradiente salino de 80 a 500 mM fueron ensayadas con histonas libres y $[1-^{14}C]$ acetil CoA. La mezcla de reacción fue separada por electroforesis en gel de poliacrilamida al 16%, el gel fue teñido, decolorado y secado. Se muestran las fluorografías para los perfiles cromatográficos de la cepa silvestre (A), la cepa *esa1-ts* crecida a temperatura permisiva (B), y la cepa *esa1-ts* incubada 6h a 37°C (C). Las fluorografías de A y C fueron densitometradas para determinar la cantidad de marca radiactiva incorporada a cada histona. La posición de tres de las histonas internas y de una banda de degradación (*) se muestra en la figura.

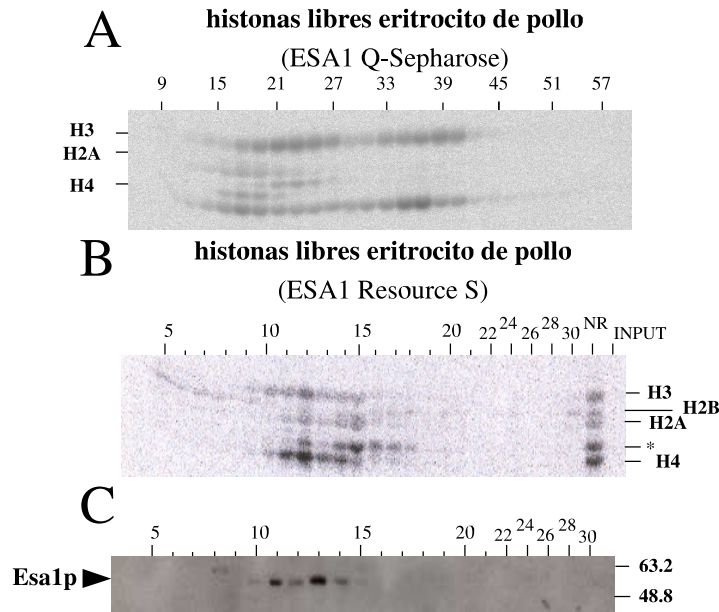


Figura 3.19. **Detección de Esa1p en fracciones con actividad HAT A1.** (A) Fluorografía de un gradiente salino 80-500 mM generado en una Q-sepharose en la que se aplicó el eluido a 300 mM de imidazol de una resina Ni-NTA, que procedía del extracto de 9 L de cultivo de BQS1216. Se seleccionaron las fracciones 15-21 para continuar la purificación de A1. (B) Las fracciones mencionadas se aplicaron en una Resource S, en la que se realizó una separación en gradiente de 0 a 1 M de NaCl. Las fracciones obtenidas fueron ensayadas frente a histonas libres de pollo y $[1-^{14}\text{C}]$ acetil CoA, sometidas a SDS-PAGE 16 % y posterior fluorografía. Se indica la posición de las histonas H3, H2A y H4, y de una banda de degradación procedente de H3, H2B o H2A. (C) Un volumen de $8 \mu\text{L}$ de fracciones de la Resource S fueron separadas en un gel de poliacrilamida del 10 %, tras lo que las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La detección mediante *western-blotting* se efectuó con un anticuerpo policlonal de cabra específico contra Esa1 (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

La detección de Esa1p en esas mismas fracciones mediante análisis por *western-blotting* confirma que esta proteína forma parte de A1 (fig. 3.19C). En cuanto a la acetilación incorporada en una banda de degradación (* en la fig. 3.19B), se puede comprobar como la cromatografía sobre Resource Q retrasa a la enzima responsable de su acetilación con respecto al complejo A1. Del mismo modo, la incorporación de radiactividad sobre la histona H2A parece seguir un perfil de elución similar a la de la banda de degradación. Por lo tanto, cabe concluir que el complejo A1 acetilaría preferentemente las histonas H4 y H3, y en menor medida H2A y H2B libres. Además de este complejo, en las fracciones iniciales de las cromatografías tipo Q Sepharose eluiría otra actividad HAT no descrita hasta la fecha. Esta actividad es específica por un sustrato procedente de la degradación de una histona (H3, H2B o H2A), así como por la histona H2A. El hecho de que la intensidad de marca sobre este producto de acetilación no se vea apenas disminuido en los ensayos realizados con la cepa *esa1-ts* (figs. 3.18B y C), parecen confirmar la presencia de esta nueva actividad.

Se ha realizado un estudio centrado en el complejo A1 para determinar si la proteína con actividad catalítica HAT Esa1 es un componente del mismo. Se ha demostrado que la proteína Esa1 truncada disminuye notoriamente la actividad HAT A1, y que las fracciones en las que eluye A1 contienen Esa1p. Todo ello confirma que Esa1p es la subunidad catalítica de A1. Ya que NuA4 es un complejo dependiente de Esa1 descrito previamente [174], no es descartable que A1 y NuA4 compartan otras subunidades. Por otra parte, también ha sido detectada una nueva actividad HAT que eluiría muy próxima a A1, específica por la histona H2A libre, y probablemente por otros sustratos.

3.3.6. Actividades HAT dependientes de *ELP3*, *HPA2*, *SAS2* y *NUT1*

Como se ha mencionado anteriormente, los genes *NUT1*, *ELP3*, *HPA2* y *SAS2* codifican proteínas con actividad HAT que no han sido relacionadas hasta el momento con los diferentes complejos obtenidos, tanto mediante el método de

3.3.6 Actividades HAT dependientes de *ELP3*, *HPA2*, *SAS2* y *NUT1* 133

purificación a partir de extractos de levadura empleado por nosotros, como por el utilizado por otros autores (ver sección 3.3.1). Sin embargo, es conocido que estas proteínas forman parte de complejos, algunos de ellos implicados en importantes procesos biológicos. Así, Nut1p forma parte del Mediador, un complejo multiproteico requerido para la activación transcripcional dependiente de la RNA polimerasa II, la estimulación de la transcripción basal y una mayor eficiencia de la fosforilación del dominio carboxilo terminal por TFIIF [225]. Se ha descrito que Nut1p posee actividad HAT *in vitro* [59]. Por otro lado, Elp3p se considera una HAT de tipo A y es un constituyente del complejo Elongador, que colabora en la elongación de la transcripción por parte de la RNA pol II [226, 227]. El complejo Elongador se une al dominio carboxilo terminal hiperfosforilado de la RNA polimerasa II, participando en la formación de un holoenzima competente para la elongación. Este complejo es capaz de acetilar las histonas H3 y H4 libres o ensambladas en nucleosomas [59, 83, 49]. Hpa2, una proteína de sólo 18.3 kDa, se ha descrito como una HAT capaz de formar un tetrámero al unirse a acetil-CoA, con actividad preferente sobre la lisina 14 de la histona H3 y potencial autoacetilante [228]. Por último, Sas2p forma parte del complejo SAS (relacionado con funciones de silenciamiento), junto con las proteínas Sas4p y Sas5p. Este complejo acetila la lisina 14 de H3 y la lisina 16 de H4 *in vitro* [229], y únicamente la lisina 16 de H4 *in vivo* [198].

Con objeto de determinar si alguna de estas proteínas estaba relacionada con alguno de los complejos obtenidos se utilizó el sistema cromatográfico de separación de complejos mencionado en el apartado 3.1.2. Para ello se emplearon cepas con la delección cromosómica de alguno de los genes que se habían identificado como actividades HAT.

En la fig. 3.20 se muestra el análisis de las actividades HAT sobre histonas libres empleando las cepas mutantes *nut1Δ* y *hpa2Δ*. El análisis comparativo entre los resultados obtenidos con estas cepas mutantes y los mostrados en la fig. 3.6A (pág. 103) de la cepa salvaje ponen de manifiesto que ninguna de las proteínas codificadas por estos genes constituye la subunidad catalítica de los complejos identificados en nuestro laboratorio, especialmente de HAT A1, HAT A4-I o A4-II. También se realizaron cromatografías semejantes empleando cepas con las

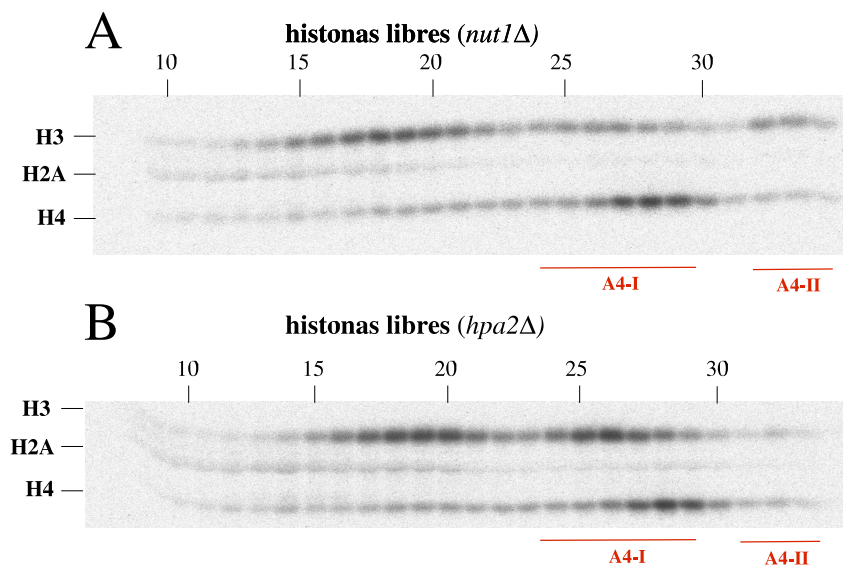


Figura 3.20. Análisis de las actividades HAT dependientes de Nut1p y Hpa2p en *S. cerevisiae*. Se ensayó la actividad HAT de extractos fraccionados por elución de la resina de Ni-NTA y fraccionamiento por gradiente en Q Sepharose de las cepas de levadura *nut1Δ* (BQS1206) y *hpa2Δ* (BQS1204). En las fluorografías se han indicado las posiciones de las histonas H3, H2A y H4. Los resultados para el análisis de la dependencia de las actividades HAT respecto de *NUT1* se muestran en el panel (A), y respecto de *HPA2* en el (B).

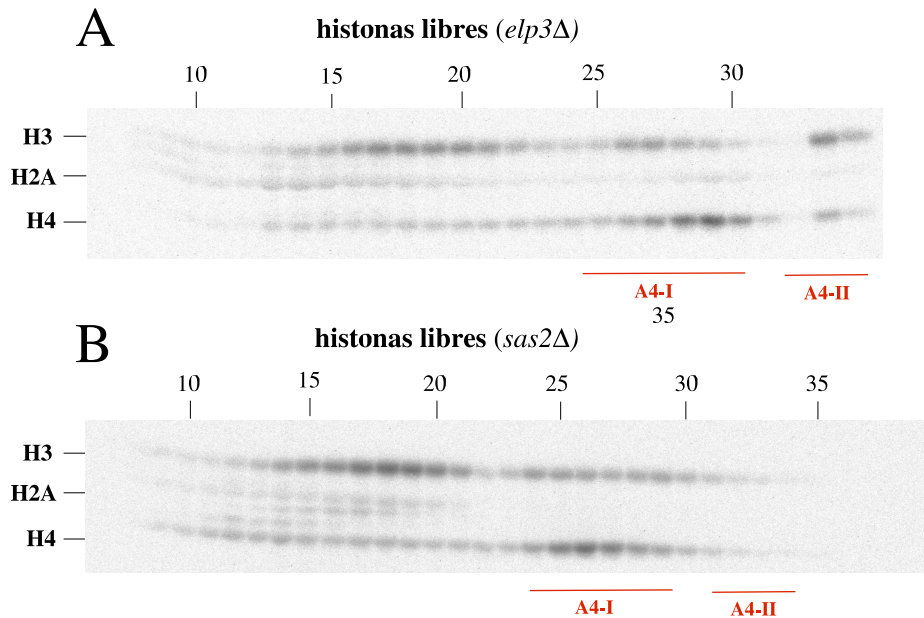


Figura 3.21. Análisis de las actividades HAT presentes en cepas de levadura delecionadas en *ELP3* y *SAS2*. Se ensayó la actividad HAT de extractos de las cepas de levadura *elp3Δ* (BQS1212) y *sas2Δ* (BQS1314) después de su elución del gel de agarosa Ni-NTA, y su fraccionamiento en Q Sepharose. En las fluorografías se han indicado las posiciones de las histonas H3, H2A y H4.

proteínas correspondientes etiquetadas, Nut1-HA6 y Hpa2-HA6. Los resultados obtenidos apuntarían hacia la presencia de Nut1-HA6 en toda la segunda mitad del gradiente, desde la fracción 23 a la 33, mientras que la proteína Hpa2-HA6 no se detectó en ninguna zona del gradiente.

Cuando se analizó el efecto de las mutaciones de *ELP3* y *SAS2*, no se observó la reducción detectable de la actividad HAT de ninguno de los seis picos descritos en los gradientes de intercambio aniónico (fig. 3.21). Por tanto, las proteínas Elp3 y Sas2 tampoco parecen formar parte de ningún complejo de los analizados en nuestro laboratorio, o bien su contribución a la actividad de éstos es minoritaria y no detectable.

Parte 4

Localización genómica de HATs y de marcas epigenéticas mediante ChIP-chip

“Un ser humano debe ser capaz de cambiar un pañal, planear una invasión, sacrificar un cerdo, pilotar una nave, diseñar un edificio, escribir un soneto, cuadrar una cuenta, construir un muro, colocar un hueso, confortar a los moribundos, aceptar órdenes, dar órdenes, cooperar, actuar solo, resolver ecuaciones, analizar un problema nuevo, esparcer estiércol, programar un ordenador, cocinar un plato sabroso, luchar con eficacia y morir con gallardía. La especialización es para los insectos.”

Robert A. Heinlein, extractos de los cuadernos de Lazarus Long en **Tiempo para amar**.

4.1 Antecedentes

4.1.1. Chips de DNA

La secuenciación de los genomas de un gran número de especies ha permitido el desarrollo de tecnologías a gran escala que han ayudado al rápido avance de la genómica. Una de estas tecnologías es la de los chips (*arrays*) de DNA, consistentes en un soporte sólido al que se une una serie de sondas de DNA en una posición determinada distribuidos según un patrón regular de puntos (*spots*). El principio en el que se fundamentan los chips de DNA es el apareamiento entre bases. Este apareamiento se produce durante el proceso de hibridación, el cual transcurre entre la muestra, que contiene un ácido nucleico libre (diana) cuya identidad o abundancia queremos determinar, y las sondas del chip que están constituidas por ácidos nucleicos de secuencia conocida inmovilizados en algún medio físico.

Los chips de DNA se clasifican en microchips o macrochips en virtud de varias características. Generalmente los microchips se suelen fabricar sobre soporte de cristal con grupos reactivos, y los macrochips se fabrican sobre nailon con cargas positivas. Las sondas de los macrochips se encuentran depositadas en puntos de aproximadamente 300 μm de diámetro, consiguiendo una densidad de 100 sondas/cm². Por su parte, los microchips poseen puntos de 10 a 200 μm , lo que les permite contener del orden de 3000 sondas/cm² si se elaboran con productos de PCR, o 60000 sondas/cm², si se confeccionan mediante síntesis de oligonucleótidos. Las sondas de los macrochips se obtienen habitualmente a partir de cDNA o DNA genómico mediante una reacción de PCR con oligos universales o específicos. A diferencia de los macrochips, las sondas de los microchips también pueden estar constituidas por oligonucleótidos de hebra simple que se pueden sintetizar directamente sobre el soporte (*in situ*) obteniendo productos de tamaños de 25 a 60 nucleótidos, o se unen al soporte tras su síntesis (40-70 nucleótidos).

Los primeros chips de DNA utilizados fueron los microchips en soporte de vidrio que el laboratorio de Patrick O. Brown empleó en un trabajo publicado en 1995 [230]. En este trabajo se describió el uso de un microchip con 45 cDNAs de genes de *Arabidopsis thaliana* para el análisis de la expresión diferencial de los mismos. A partir de ese momento, este tipo de tecnología ha incrementado su número de aplicaciones, en consonancia con las mejoras que ha sufrido en resolución y sensibilidad.

Concretamente los chips de DNA que se han empleado en este trabajo son macrochips realizados en un soporte de nailon cargado positivamente (tabla 4.1). Cada uno de los macrochips utilizados contienen 6052 pautas de lectura abierta (ORFs) de la levadura *S. cerevisiae* (obtenidos del Servicio de Chips de DNA del S.C.S.I.E., Universitat de València). El número de ORFs por macrochip puede variar según la versión. Las sondas depositadas en la membrana fueron obtenidas generalmente por amplificación con oligos universales a partir del cDNA insertado en la colección de plásmidos Research Genetics Exclone [231]. Esta estrategia consiguió obtener sondas de DNA bicatenario que en el 93 % de los casos cubrían la ORF completa.

Tabla 4.1. **Propiedades de los chips de DNA empleados en este trabajo [232].**

Características macrochips de ORFs de levadura
tamaño de la membrana 7×11 cm
100 spots/cm ²
40 ng sonda/spot
10^9 moléculas sonda/spot
<u>sensibilidad</u> 10^8 moléculas diana
<u>selectividad</u> de una molécula diana entre
2×10^4 a una entre 3×10^5 moléculas

Para este tipo de chips (nailon), el marcaje dual con fluoróforos que se puede utilizar en microchips (vidrio) no es posible, y se emplea un marcaje radiactivo. Un mismo macrochip puede ser hibridado hasta 10 veces sucesivas, eliminando el material unido de la anterior hibridación, sin una disminución significativa de la calidad de la hibridación. Esto permitió estudiar diversos aspectos de la modificación de la cromatina en el mismo juego de macrochips, lo que eliminó varia-

bilidad debida al uso de distintos chips. De acuerdo con esto, se había sugerido anteriormente que el uso de tres tipos de experimentos con chips de DNA puede ayudar a describir la función de reguladores de la cromatina [233, 234]. El primer tipo de experimento es el más habitual y consiste en un chip de expresión de la cepa mutante en el regulador de la cromatina, por ejemplo una HAT. Éste nos proporciona información sobre la variación de la expresión de los genes regulados de manera directa o indirecta por la HAT delecionada. El segundo es, junto con el tercero, la estrategia empleada en nuestro trabajo para el estudio de la función de diversas HATs. Consiste en la detección de la unión física de la HAT al genoma, utilizando para ello una combinación de inmunoprecipitación de la cromatina e hibridación del material inmunoprecipitado en un chip de DNA (ChIP-chip). Por último la tercera estrategia implica también ChIP-chip, pero en esta ocasión el objetivo es inmunoprecipitar las regiones del genoma enriquecidas en alguna modificación de la cromatina catalizada por el regulador de interés (por ejemplo acetilación, metilación, ...). De este modo se realiza un mapa diferencial del patrón de acetilación de la cepa mutante en la HAT respecto a la silvestre. Esto permite correlacionar la unión física y el efecto sobre el patrón de acetilación en un mutante, en secuencias específicas del genoma. Esta combinación de información permite decidir si el efecto de la deleción de una proteína sobre la expresión de un gen particular es directo, o se produce como consecuencia de la alteración de una posible ruta de transducción de señales en la que participaba la proteína estudiada. Los tres tipos de estudio habían sido realizados anteriormente en chips que contienen distintos tipos de sondas. Los chips de ORFs se han empleado para realizar chips de expresión, y los chips cuyas sondas contienen regiones intergénicas (IGRs) han sido empleadas para los estudios mediante ChIP-chip.

4.1.2. Análisis de localización genómica (ChIP-chip)

La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se ha utilizado para analizar la distribución de proteínas específicas, o para el caso de las histonas, de sus isoformas modificadas, en dominios de DNA definidos [235, 40, 236]. La principal

limitación del método se debe a los sistemas empleados para la detección de la región de DNA a la que se une la proteína problema. El enriquecimiento de los fragmentos de DNA inmunoprecipitado en determinadas regiones de la cromatina puede ser analizado por varios métodos. En primer lugar, los sitios de unión se pueden identificar por hibridación en *slot-blot* convencional, aplicando el DNA inmunoprecipitado a una membrana que contiene las regiones de interés [237]. Otra posibilidad es el análisis por *southern-blot*, que permite identificar sitios de unión en grandes regiones genómicas sin múltiples hibridaciones, ni reacciones de PCR [238]. Por último, las estrategias basadas en PCR son las más utilizadas, ya sea la PCR cuantitativa [239], la PCR en tiempo real cuantitativa [240], o la PCR semicuantitativa [241]. El número de dianas detectables se encuentra restringido al número de pares de oligonucleótidos empleados, y no permite identificar dianas cuya existencia desconozcamos. La aparición de la técnica de mapeo de interacciones DNA-proteína (ChIP-chip), permitió detectar la unión de una proteína a todas las regiones genómicas depositadas en un chip de DNA en un único experimento. Este método (fig. 4.1) aprovecha el entrecruzamiento entre las proteínas y el DNA a través de enlaces covalentes producidos por la acción del formaldehído, lo que asegura el mantenimiento de las interacciones que se habían establecido *in vivo*. La fragmentación del DNA por sonicación permite obtener unos tamaños adecuados para la inmunoprecipitación de los complejos proteína-DNA y la correcta identificación de los fragmentos. Las proteínas de unión a DNA son inmunoprecipitadas con anticuerpos policlonales generados contra la proteína en cuestión, o bien, con un anticuerpo comercial frente a los epítomos HA o c-MYC si la proteína se ha etiquetado en su locus cromosómico. También se han empleado extensivamente anticuerpos contra distintas formas modificadas de las histonas (posiciones acetiladas o metiladas de las histonas) en la confección de mapas genómicos de este tipo de modificaciones postraduccionales (estudios epigenéticos). El DNA unido a la proteína inmunoprecipitada se purifica y es amplificado para conseguir una cantidad de DNA adecuada para la hibridación. Los dos sistemas de amplificación más empleados habían sido desarrollados con anterioridad para otros fines. Éstos son la amplificación al azar de DNA o *Round A/B/C* [242] (utilizado por el grupo de P.O. Brown) y el basado en PCR mediada por ligación (LM-PCR) [243] (utilizado por el grupo de

R.A. Young). Ambos sistemas han sido empleados en estrategias de hibridación con fluorescencia de dos colores. El sistema *Round A/B/C* implica un ciclo de replicación del DNA, usando secuencia y un oligonucleótido que contiene un segmento conocido y otro segmento formado por una mezcla al azar de los 4 dNTPs (60 % de A+T y 40 % de G+C). En el siguiente paso se utiliza un oligonucleótido que contiene la secuencia del segmento conocido, para efectuar 15-35 ciclos de PCR, e introducir en los últimos ciclos los fluoróforos cy5-dCTP y cy3-dCTP. El sistema de LM-PCR (*Ligation-Mediated PCR*) se basa en ligar al DNA inmunoprecipitado un adaptador (*linker*) que permite utilizar un oligo de secuencia conocida para la amplificación y el marcaje.

Para ambos tipos de marcaje (fluorescente y radiactivo) se emplean dos muestras que serán comparadas entre sí para obtener valores relativos de intensidad de los puntos de las sondas (en nuestro macrochip cada punto o *spot* representa una ORF). Una muestra la constituye el DNA inmunoprecipitado específicamente, que o bien se marca con uno de los colorantes fluorescentes, o con un dNTP radiactivo. La muestra referencia puede ser un DNA genómico amplificado en paralelo, o bien DNA derivado de una inmunoprecipitación control. Esta inmunoprecipitación se realiza con una cepa que no posea el epítipo reconocido por el anticuerpo (silvestre), con un anticuerpo irrelevante para el estudio, o sin anticuerpo. En DNAs inmunoprecipitados de cepas silvestres, o sin anticuerpo, se suele asumir que ese control probablemente represente DNA genómico en gran parte. Sin embargo no es aconsejable tomar esta aproximación como real y se deben realizar hibridaciones de los chips con distintas muestras control.

Después de que las muestras hayan sido hibridadas en los chips, bien sea la de referencia y la problema simultáneamente cuando se trata de fluoróforos, ya sea sucesivamente en el caso del marcaje radiactivo, se calculan las *ratios* entre las señales de la muestra problema y las de la muestra control. La *ratio* de la señal obtenida para un elemento del chip es proporcional al enriquecimiento de ese *locus* en la muestra inmunoprecipitada. Por tanto, la *ratio* es indicativa de la intensidad de la unión de la proteína a ese *locus*. En algunos casos se puede producir empobrecimiento de la proteína o de la isoforma que estamos estudiando. Por ejemplo, en un mutante HAT se asume que la cantidad de histona acetilada

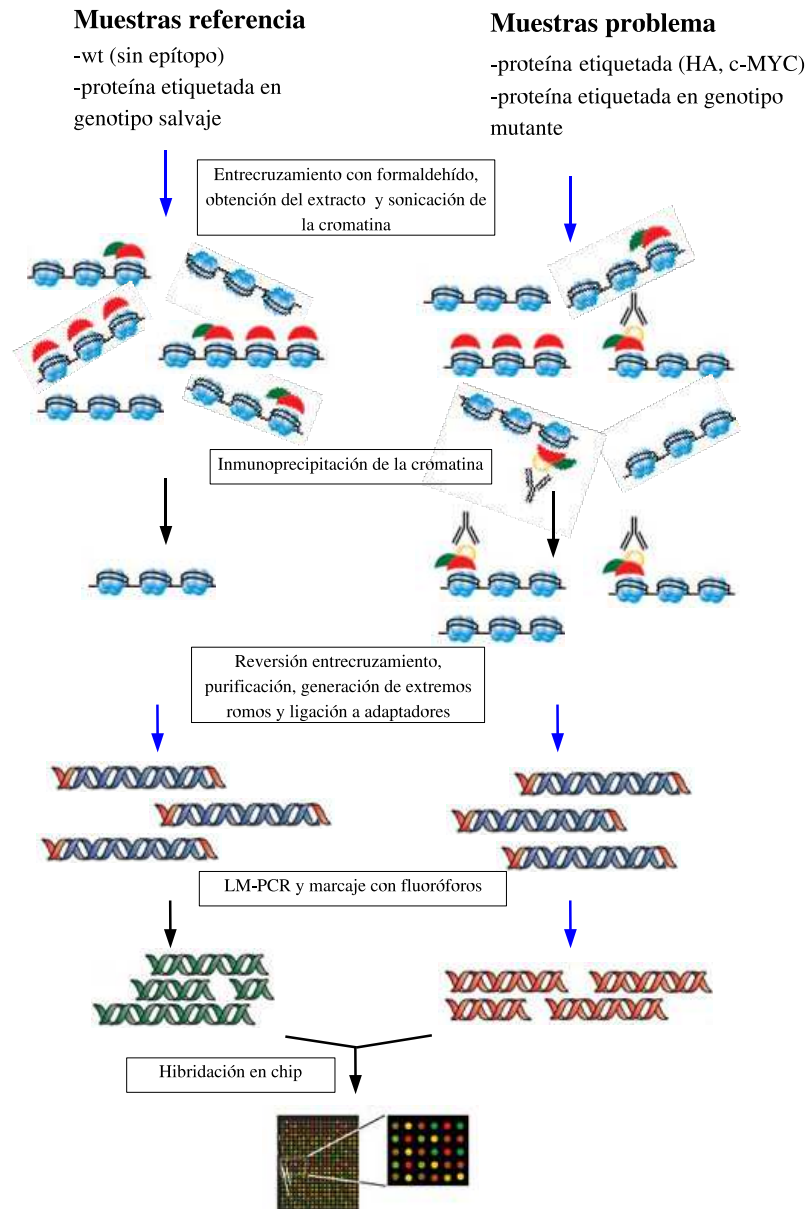


Figura 4.1. Esquema de protocolo general para ChIP-chip utilizando LM-PCR como sistema de amplificación y marcaje con fluoróforos cy3-dCTP y cy5-dCTP.

debe disminuir respecto de la silvestre en las regiones diana de la HAT.

4.1.2.1. Aplicaciones de la técnica de localización genómica

Los dos primeros trabajos que utilizaron esta metodología se llevaron a cabo en levadura en los laboratorios de R.A. Young [244] y P.O. Brown [245]. El primero de ellos, publicado en el año 2000 por el grupo de Young [244], estudió los sitios de unión en promotores de los factores transcripcionales Gal4 y Ste12. El año siguiente el grupo de Brown analizó la asociación a regiones intergénicas de los complejos activadores SBF (Swi4p-Swi6p) y MBF (Mbp1p-Swi6p), para relacionar sus genes diana con distintas funciones celulares [245].

Desde su desarrollo, el análisis de localización genómica ha sido utilizado en múltiples experimentos encaminados a la identificación de sitios de unión de un gran número de factores transcripcionales individuales en el genoma de levadura. Un importante trabajo del grupo de Young [246] determinó la ocupación de 203 factores transcripcionales de *S. cerevisiae* crecida en medio rico. Debido a que la ocupación de los elementos reguladores por los factores transcripcionales puede depender de las condiciones ambientales, la ocupación de 84 de ellos fue estudiada en al menos 12 condiciones ambientales distintas. La información obtenida permitió definir la arquitectura de promotores, predecir secuencias consenso de unión de factores específicos, y elaborar un mapa de la regulación transcripcional de la levadura. Por otro lado, la localización genómica de reguladores de la cromatina, como las HATs Esa1 y Gcn5 y las HDACs Rpd3 y Hst1, proporcionó una nueva visión del comportamiento de este tipo de coactivadores [247]. Se determinó que ambas HATs se unen generalmente a los promotores de genes activos transcripcionalmente, lo que ayuda a explicar la largamente observada correlación entre acetilación de histonas y expresión génica [113]. Las HDACs por su lado, se asocian únicamente a conjuntos específicos de genes; Hst1 a genes de esporulación y de la ruta de la quinureina, y Rpd3 a genes de ciclo celular. Otro estudio ha establecido los sitios de unión de otro regulador de la cromatina, el complejo remodelador RSC [248]. La localización genómica de 5 de las proteínas componentes de este complejo informó que las isoformas Rsc1 y Rsc2

de éste poseen básicamente un patrón de unión similar y se unen a unas 700 dianas cuando el crecimiento se efectúa en medio rico. Este trabajo concluyó que RSC puede mostrar tres mecanismos de acción: uniéndose de manera global al genoma, dirigido a promotores específicos, o siendo reclutado de forma general a los genes transcritos por la RNA polimerasa III. Por otro lado, esta técnica también se ha empleado para la detección de los lugares de unión de reguladores de eucariotas superiores, como las proteínas Polycomb, Polyhomeotic y GAF de la mosca de la fruta [249].

Otro nivel de la regulación transcripcional que también ha sido investigado con esta metodología son los elementos reguladores *cis*. Gracias a esta técnica se ha conseguido establecer mapas globales de elementos reguladores *cis*. En mamíferos existe una fina regulación de la expresión génica (la expresión es específica de tejido y del momento del desarrollo). Un gran número de elementos reguladores (promotores, potenciadores, represores, aisladores, ...) colaboran en esta función. Por ejemplo en humanos se han mapeado promotores activos, identificándolos gracias a la unión del componente del complejo de preiniciación Taf1p [250, 251].

No obstante, la mayor parte de la investigación que ha empleado esta técnica se ha centrado en el estudio de la epigenética, especialmente en la modificación de histonas. Uno de los hallazgos que ha permitido este método ha sido la distribución de las distintas formas metiladas de la histona H3 en las regiones codificantes. Gracias al uso de microchips de alta resolución se ha determinado que la lisina 4 de la histona H3 trimetilada se encuentra enriquecida en el extremo 5', la dimetilada en la parte central y la monometilada en el extremo 3' de los genes activos transcripcionalmente [252]. La evaluación de las modificaciones de las histonas en los cromosomas 21 y 22 de humanos, ha mostrado que la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 también se correlaciona con el extremo 5' de los genes que se transcriben activamente [253]. Por otro lado, también se han detectado diferencias fundamentales entre distintos organismos, como la dimetilación de la lisina 79 de H3 que se correlaciona con la transcripción en moscas [254], pero no en levadura [255].

4.2 Materiales y métodos

4.2.1. Cepas de levadura empleadas

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas para los análisis de localización genómica se muestran en la tabla 4.2. Los genes que codifican proteínas con actividad HAT fueron etiquetadas en su extremo carboxilo terminal con etiquetas de epítopos HA y c-MYC, o bien fueron delecionadas introduciendo un gen marcador de resistencia a antibiótico o de auxotrofia. Para más detalles consultar sección 3.2.5 en pág. 79.

Tabla 4.2. Cepas utilizadas en experimentos de ChIP-Chip.

Cepa	Genotipo	Procedencia
YPH250	<i>MATa</i> , <i>ura2-52</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1Δ1</i> , <i>his3Δ200</i> , <i>leu2Δ1</i>	Parthun <i>et al.</i> , 1996 [256]
MW671	YPH250 <i>rpc160Δ1::HIS3</i> , <i>pC160-240</i> (<i>TRP1 CEN4 HA3-RPC160</i>)	Dieci <i>et al.</i> , 1995 [257]
BY4742	<i>MATα</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i>	EUROSCARF Brachmann <i>et al.</i> , 1998 [204]
BQS1181	BY4742 <i>gcn5Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
BQS1197	BY4742 <i>NUT1-HA6-HIS3</i>	Este trabajo
BQS1204	BY4742 <i>hpa2Δ::natMX4</i>	Este trabajo
BQS1206	BY4742 <i>nut1Δ::natMX4</i>	Este trabajo
BQS1212	BY4742 <i>elp3Δ::natMX4</i>	Este trabajo
BQS1217	BY4742 <i>SAS3-HA6-HIS3</i>	Este trabajo
BQS1218	BY4742 <i>HPA2-HA6-HIS3</i>	Este trabajo
BQS1314	BY4742 <i>sas2Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
BQS1343	BY4742 <i>ELP3-HA6-HIS3</i>	Este trabajo
BQS1350	BY4742 <i>GCN5-MYC13-KanMX6</i>	Este trabajo
BQS1389	BY4742 <i>sas3Δ1::kanMX4</i>	Este trabajo
BQS1451	BY4742 <i>SAS2-HA6-HIS3</i>	Este trabajo

4.2.2. Inmunoprecipitación de cromatina

Para identificar las dianas del aparato de transcripción de la RNA polimerasa III y de distintas subunidades catalíticas HAT, así como mapear las regiones que sufren modificaciones en su estado de acetilación por mutaciones en subunidades catalíticas HAT, se combinó la inmunoprecipitación de cromatina y la hibridación de macrochips de ORFs. Diseñamos un protocolo específico para chips de ORFs de levadura basado en un método previamente descrito [244] para chips de regiones intergénicas¹.

Entrecruzamiento y lisis celular

Se crecieron 3 cultivos independientes en YPD para cada cepa, y otros 3 para las cepas control (por ejemplo con proteína no etiquetada). Se tomó un volumen de 40 mL de cultivo ($DO_{600} \simeq 0.5-0.8$), y las proteínas fueron entrecruzadas a sus sitios diana *in vivo* añadiendo formaldehído hasta una concentración final del 1 % (16 % formaldehyde solution, Electron Microscopy Sciences). Las células se incubaron 30 min a temperatura ambiente con inversión ocasional. El entrecruzamiento se detuvo con la adición de glicina para conseguir una concentración final de 125 mM e incubación durante 15 min. Las células se lavaron 3 veces con 30 mL de tampón PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) enfriado en hielo. Las células sedimentadas se congelaron tras este paso. Cuando se reemprendió el protocolo, las células se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 300 μ L de tampón de lisis (50 mM HEPES-KOH pH7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0.1 % desoxicolato sódico, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina y una pastilla de Cocktail de inhibidores de proteasas Complete™ de Roche por cada 25 mL de tampón). Se añadió a la suspensión celular el equivalente a un volumen de 0.2 mL de perlas de vidrio a $-20^\circ C$ (425-600 mm, Sigma). La lisis se llevó a cabo durante 25 min a $4^\circ C$, en un vórtex Genie 2 con Turbomix a la máxima potencia. Se añadieron 400 μ L más de tampón de lisis, y se traspasó el extracto a un nuevo tubo.

¹http://jura.wi.mit.edu/young_public/chromatin_regulators/Location_analysis_protocol.pdf

Sonicación e inmunoprecipitación de la cromatina

La cromatina del extracto fue sonicada en hielo (3 secuencias de 10 s de pulsos intermitentes de 1 s a 38 % de amplitud en un sonicador Vibracell VCX500 de Sonics&Materials) para obtener fragmentos de 400-3000 pb de tamaño, con un tamaño promedio de 800 pb. Los residuos celulares fueron eliminados por centrifugación a 13000 rpm a 4°C durante 10 min. Una alícuota de 50 μ L de extracto total (*Whole Cell Extract*, WCE) se guardó en hielo para comprobar la calidad y el tamaño de la cromatina. Los anticuerpos empleados fueron 2 μ g de α -HA 3F10 de rata (Roche), 20 μ g de α -MYC de ratón (Roche), 15 μ L de α -K14acH3 grado CHIP de conejo (Upstate) o 10 μ g de α -H3Ct de conejo (Abcam).

Los anticuerpos se incubaron durante la noche anterior en agitación rotatoria a 4°C para permitir su acoplamiento con una suspensión que contenía la resina o el tipo de matriz magnéticas correspondiente. Los anticuerpos de rata y ratón se incubaron con una suspensión de 100 μ L 50 % (v/v) de Proteína G Sepharose 4FF (Amersham Biosciences) equilibrada en tampón de lisis 5 mg/mL de BSA y los de conejo en 50 μ L de matriz magnética *dynabeads* M-280 (Dynal) equilibradas en el tampón ya mencionado, y resuspendidas en un volumen final de 120 μ L.

Los fragmentos de DNA que fueron entrecruzados a las proteínas de interés fueron purificados mediante inmunoprecipitación con los anticuerpos mencionados durante 4 h en un agitador rotatorio a 4°C. Se incluyeron inmunoprecipitaciones control de extractos (WCE) de la cepa silvestre (BY4742) con α -HA o α -MYC, o bien con anticuerpo de conejo contra la región carboxilo terminal de la histona H3, según el tipo de experimento.

Tras eliminar la fracción no retenida, la resina o la matriz magnética fue lavada dos veces con 1 mL de tampón de lisis. En el caso de resina de proteína G Sepharose el lavado incluye un período de agitación de 5 min. A continuación se efectuaron dos lavados más con tampón de lisis conteniendo una concentración de 500 mM en NaCl. Los dos siguientes lavados se realizaron con 1 mL de disolución de litio (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM LiCl, 0.5 % Nonidet P-40, 0.5 % Desoxicolato sódico, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM PMSF, 1 mM Benzami-

dina, una pastilla Cocktail de inhibidores de proteasas de Roche Complete™ por cada 25 mL de tampón). Se realizó un último lavado con 1 mL de TE (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA) 1 mM en PMSF. Las proteínas retenidas fueron liberadas mediante dos eluciones consecutivas a 65°C que se reunieron posteriormente. Éstas se efectuaron con 100 μ L y con 150 μ L de tampón de elución (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 1 % SDS).

Reversión del entrecruzamiento y purificación del DNA

El entrecruzamiento de las proteínas al DNA, se revertió mediante una incubación a 65°C durante toda la noche. Para el WCE, se adicionaron 200 μ L de tampón de elución previamente a la reversión del entrecruzamiento. Las proteínas se degradaron mediante incubación durante 1 h a 37°C en presencia de 50 μ g de proteinasa K y 2.5 % de SDS. El DNA se purificó mediante extracción con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1).

En el caso del WCE, la fase acuosa fue directamente precipitada con etanol y el DNA disuelto en 15 μ L de agua milliQ. El DNA recuperado se trató 30 min a 37°C con 10 μ g de RNasa A. La cromatina del WCE fue visualizada mediante electroforesis en agarosa al 1.2 % para comprobar la cantidad recuperada en la muestra y el tamaño obtenido para los fragmentos.

El DNA inmunoprecipitado, en cambio, fue sometido a más procesos de purificación. La fase acuosa se purificó mediante columnas Montage PCR (Millipore), de las que el DNA se eluyó en dos etapas sucesivas con 25 y 15 μ L de agua milliQ. El volumen recuperado se trató con 10 μ g de RNasa A durante 30 min a 37°C tras lo que se efectuó una precipitación con etanol en presencia de 20 μ g de glucógeno.

4.2.3. Amplificación del DNA e hibridación en macrochip

Rellenado con DNA polimerasa del fago T4 y ligación con oligonucleótidos adaptadores

El DNA inmunoprecipitado fue finalmente resuspendido en 100 μL de agua milliQ y se obtuvieron extremos romos mediante una reacción catalizada por la DNA polimerasa del fago T4. Para ello, a los 100 μL que contienen el DNA se les añadió 22 μL de tampón DNA pol T4 5 \times , 0.5 μL BSA 10 mg/mL, 0.4 μL dNTPs 25 mM y 0.6 μL de DNA pol T4 1 U/ μL (Roche). La reacción se dejó desarrollar durante 20 min a 12°C. Tras la extracción con fenol:cloroformo:isoamílico, el DNA se precipitó con etanol en presencia de 11 μg de glucógeno, y fue resuspendido en 25 μL de agua milliQ.

Todo el DNA se ligó con los adaptadores (*linkers*) apareados² oJW102 (5'-GCG GTG ACC CGG GAG ATC TGA ATT C-3') y oJW103 (5'-GAA TTC AGA TC-3') (15 μM cada uno) en un volumen final de 50 μL , (0.2 mM dATP, 0.4 unidades de ligasa T4 de Roche) a 16°C durante un mínimo de 12 h. A continuación se efectuó una precipitación con etanol, y el DNA ligado se resuspendió en un volumen final de 25 μL de agua milliQ.

PCR mediada por ligación (LM-PCR) y cuantificación del DNA obtenido

Para amplificar el DNA inmunoprecipitado y ligado se utilizó la técnica de LM-PCR [244], en la que uno de los adaptadores se emplea como cebador. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 40 μL (1 \times tampón Bionline, 2 mM MgCl_2 , 0.25 mM dNTPs, 1.25 μM oJW102) y se calentó a 55°C durante 2 min. La reacción se detuvo para añadir 10 μL de mezcla (1 \times tampón Bionline, 2 mM MgCl_2 , 5 U BioTaq de Bionline) y se continuó el programa con 5 min a 72°C, 2 min a 95°C y 33 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C y 2 min a 72°C.

²Ver [255] para información sobre la forma de preparación de los adaptadores apareados.

Una alícuota de 5 μL del producto de reacción fue comprobada en un gel del 1.2 % de agarosa (habitualmente se observa una amplia banda difusa de 200 a 2500 pb, con un tamaño promedio de 600 pb), y el resto fue purificado mediante una columna Montage PCR (dos eluciones de 20 μL). El DNA fue precipitado con etanol durante toda una noche y se resuspendió en 25 μL de agua milliQ. La concentración fue determinada fotométricamente (Biophotometer 8.5 mm, Eppendorf).

Marcaje radiactivo, hibridación y lectura de los macrochips

La reacción de marcaje radiactivo básicamente consistió en un ciclo de amplificación de DNA, en el cual se utiliza una mezcla de $\alpha\text{-}^{33}\text{P}\text{-dCTP}$ y dCTP frío con una proporción tal que se consiguen productos de DNA marcados de tamaño grande y con una cantidad de marca incorporada adecuada. La mezcla de reacción se preparó con 1.5 μg de DNA y un exceso de oligonucleótido (1 \times tampón BioTaq Bioline, 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM dATP, dTTP y dGTP, 25 μM dCTP, 1 μM oJW102, 0.8 μCi $\alpha\text{-}^{33}\text{P}\text{-dCTP}$ ³ Redivue de Amersham Biosciences, 5 U BioTaq de Bioline) en un volumen final de 50 μL . El ciclo se inició calentando la mezcla a 95°C durante 5 min, después se realizó una incubación de 5 min a 50°C, y finalizó con una extensión larga de 35 min a 72°C. El producto se purificó mediante una cromatografía de exclusión molecular con columnas comerciales (ProbeQuant G-50, Amersham Biosciences), tras lo cual se cuantificó la radiactividad incorporada con un contador de centelleo líquido (Wallac).

Los macrochips [232] empleados contienen como sondas productos de PCR que representan marcos de lectura abiertos para genes de *S. cerevisiae* (Servicio de Chips de DNA, Universitat de València)⁴. En primer lugar los macrochips fueron prehibridados durante al menos 1 h en un horno rotatorio a 65°C con 5 mL de disolución de hibridación (5 \times SSC, 5 \times Denhart's⁵, 0.5 % SDS, 100

³Equivalente a 310 nM de $^{33}\text{P}\text{-dCTP}$.

⁴Se puede descargar un esquema con los 6144 spots del macrochip empleado en <http://scsie.uv.es/chipsdna/esquema-chips-61.ppt>.

⁵El stock de Denhart's 100 \times contiene 2 % (p/v) BSA, 2 % (p/v) Ficoll y 2 % (p/v) Polivinilpirrolidona.

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DNA espermato de salmón). Las hibridaciones fueron ejecutadas utilizando 5 mL de la misma disolución, pero fresca, a la que se le añadió el DNA marcado desnaturalizado ($3 \cdot 10^6$ DPM/mL). Las hibridaciones duraron 16-18 h, tras lo cual los chips fueron lavados una vez con $2 \times \text{SSC}$, 0.1 % SDS, durante 20 min, y dos veces con $0.2 \times \text{SSC}$, 0.1 % SDS durante 30 min. Los chips fueron sellados y expuestos en un casete de imagen (BAS-MP, Fujifilm) típicamente 48-72 h y leídos en un *PhosphorImager* FLA-3000 (Fujifilm) a $50 \mu\text{m}$ de resolución. Tras la lectura, los macrochips fueron tratados mediante 3 lavados consecutivos de 20, 10 y 10 min, con 100 mL de disolución de *stripping* (5 mM fosfato sódico, 0.1 % SDS) hirviendo en agitación para eliminar el material hibridado.

Análisis de las señales de hibridación y normalización entre los filtros

El tratamiento de las imágenes obtenidas en el *PhosphorImager* fue llevado a cabo por el Servicio de Chips de DNA de la Universitat de València. Los archivos del escaneado de los filtros fueron analizados con el programa de software Arrayvision 7.0 (Imaging Research Inc.) de modo que se cuantificó la intensidad de la hibridación de cada uno de los puntos que representan una pauta de lectura abierta. La normalización de los datos, y la medida del nivel de significancia para cada ORF se realizó con el programa ArrayStat (Imaging Research Inc.). Los datos se normalizaron entre las tres réplicas dentro de una misma condición, y entre las dos condiciones (por ejemplo cepa con HAT etiquetada y cepa silvestre). La normalización entre réplicas se realizó obteniendo una mediana iterativa, y se corrigió con la prueba de *False Discovery Rate* para evaluar los errores estadísticos asociados a cada gen. Así se obtuvieron los valores de densidad sARM (*subtracted Artifact Removed Median*), a los que se ha eliminado la señal de ruido de fondo correspondiente. Para los experimentos de localización de HATs, la *ratio* de unión para cada ORF o *spot*, se definió como el cociente entre la intensidad de un spot en el experimento en que se inmunoprecipitó la HAT, y en el control de la cepa silvestre. Para los experimentos de mapeo de regiones acetiladas en H3K14 (lisina 14 de histona H3), las *ratios* se calcularon dividiendo la intensidad obtenida para cada ORF en el experimento en que se inmunopre-

citó la H3K14ac (lisina 14 de H3 acetilada) en la cepa mutante HAT, entre la correspondiente a la inmunoprecipitación en la cepa silvestre.

Anotación funcional

GO (<http://www.geneontology.org/index.shtml>) es un proyecto que estructura tres vocabularios controlados (ontologías) para describir los productos génicos en función de sus procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares asociadas. Las categorías de GO están dentro de los tres campos mencionados, y pueden ayudar a definir grupos de genes que se regulan de manera común a nivel transcripcional. Para realizar la anotación funcional de los genes que se unieron a distintas HATs en los experimentos de ChIP-chip, se empleó la herramienta web FuncAssociate (<http://llama.med.harvard.edu/cgi/func/funcassociate>) [258]. Esta herramienta determina qué categorías GO de genes se encuentran sobrerrepresentadas en el listado de ORFs que se le proporciona como entrada.

Determinación de la significancia estadística del solapamiento de regiones a las que se asocian dos HATs

Para evaluar si las HATs analizadas comparten un número de dianas superior al que se podría esperar al azar, analizamos la probabilidad de que se produjeran al azar el número de coincidencias observado entre los conjuntos de ORFs a los que se asociaron las distintas HATs con una *ratio* de unión igual o superior a 1.5. La distribución hipergeométrica [259] se empleó para calcular la probabilidad de observar al menos k ORFs a las que se unen ambos reguladores:

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{k-1} \frac{\binom{f}{i} \binom{g-f}{n-i}}{\binom{g}{n}}$$

donde k se define como el número de coincidencias entre dos conjuntos de ORFs, uno de talla f y otro de talla n , siendo g el número total de ORFs en el caso de estudio (aproximamos a 6000 ORFs).

4.3 Resultados y discusión

4.3.1. Diseño de un nuevo método de análisis de localización genómica en *S. cerevisiae*

En este estudio se ha desarrollado una nueva metodología de análisis de localización genómica, la cual se ha basado en el sistema original diseñado para la detección de factores transcripcionales con microchips de regiones no codificantes en levadura descrito en 2000 por Ren *et al.* [244]. El primer objetivo fue utilizar macrochips de regiones codificantes (ORFs) de levadura para la detección de proteínas asociadas no sólo a las ORFs sino también a regiones intergénicas (IGRs). En segundo lugar se planteó determinar la distancia máxima a una ORF a la que se puede unir una proteína en una región intergénica y ser detectada mediante una ORF del macrochip empleado. Por último se analizó la probabilidad de detección de esta proteína en función de la distancia a esa ORF.

El uso de chips con sondas de ORFs para la detección de la unión de proteínas al DNA viene avalado por los resultados de diversos trabajos anteriores. Por un lado las regiones intergénicas en *S. cerevisiae* tienen un tamaño promedio de 500 pb [261] (fig. 4.3, pág. 158), y las sondas depositadas en el macrochip proporcionado por el Servicio de Chips de DNA de la Universitat de València consisten principalmente en ORFs completas de levadura. Por tanto, si los fragmentos de DNA tras la sonicación poseen un tamaño promedio de 800 pb, y estos contienen por azar extremos solapantes con las regiones codificantes y no codificantes, la mayor parte de los fragmentos de DNA inmunoprecipitados que contienen parte de un promotor serán capaces de hibridar con la sonda correspondiente. Apoyando esta suposición, en el trabajo de Gerton *et al.* [262] se determinaron las zonas con niveles altos de recombinación meiótica (*hotspots*) a las que se une Spo11p y que se encuentran mayoritariamente en regiones intergénicas. Para ello se usaron microchips de ORFs de levadura, basándose en

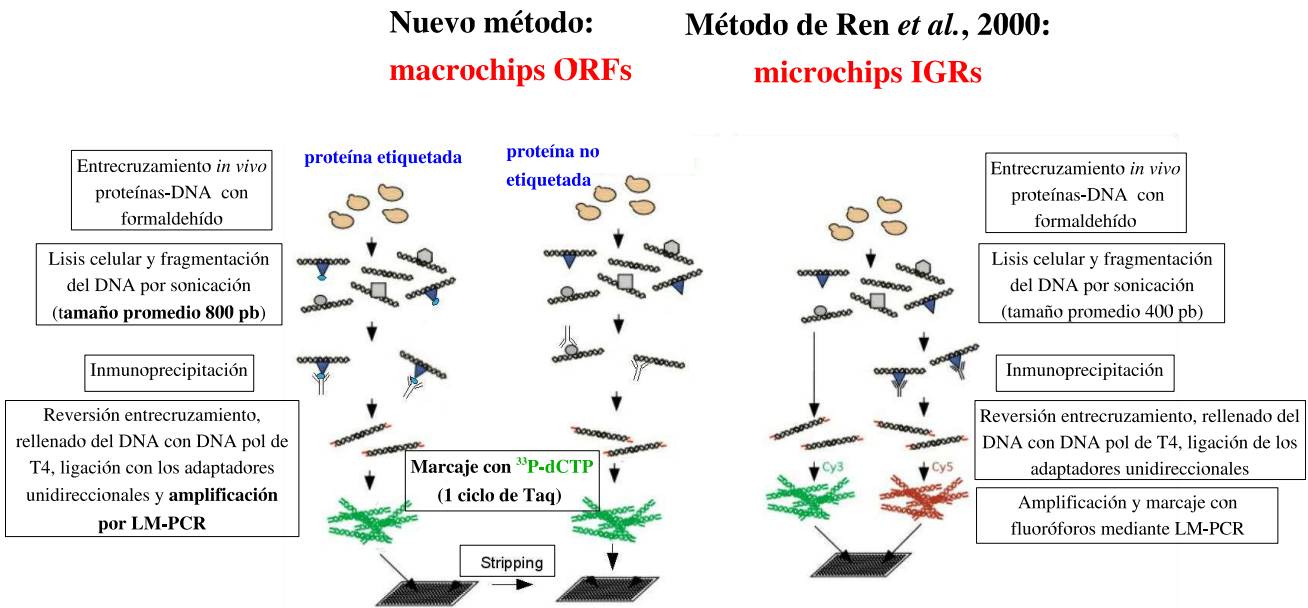


Figura 4.2. **Esquema del nuevo protocolo de ChIP-chip comparado con el estándar.** El texto en **negrita** indica los pasos específicos que permiten que durante el proceso se obtengan fragmentos de DNA marcado más largos capaces de hibridar con los *spots* de cDNA de nuestro macrochip. Adaptada de [260].

que las muestras de DNA marcado se derivan de fragmentos de un tamaño de 2-3 kb, y debían hibridar con porciones de las ORFs que se encuentran depositadas en el chip. También se han usado microchips con regiones intergénicas de levadura para detectar unión a ORFs, como es el caso de la detección de las dianas de los activadores transcripcionales MBF y SBF [245]. En este trabajo se demuestra que, cuando se detectó una ORF con un rango percentil alto, la región intergénica contigua también mostraba un rango alto al comparar los resultados obtenidos con microchips de ambas clases (de regiones codificantes y de regiones intergénicas).

Así pues, realizamos unas adaptaciones al protocolo estándar original del trabajo de Ren *et al.* [244], con el objeto de identificar proteínas asociadas a regiones codificantes y no codificantes con macrochips de ORFs (fig. 4.2). Las modificaciones consistieron en la optimización del sonicado para obtener fragmentos de cromatina de un rango adecuado, con un tamaño promedio de 800 pb, y utilizar como sistema de marcaje un único ciclo de amplificación con polimerasa Taq y el radioisótopo ^{33}P -dCTP.

4.3.1.1. Validación del método: Detección de la RNA pol III

El método de ChIP-chip modificado fue aplicado a un problema sencillo que permite estimar a qué distancia de una ORF se une una proteína asociada a la IGR próxima, y la probabilidad con la que se produce esta detección. La localización genómica de Rpea160p, una subunidad de la RNA polimerasa III, fue el experimento escogido. Las ventajas del estudio concreto de esta proteína son diversas. En primer lugar los genes de clase III en levadura son bien conocidos y han sido descritos por tres estudios independientes que utilizaron ChIP-chip [263, 264, 265]. La RNA polimerasa III transcribe un gran conjunto de genes que codifican pequeños RNAs no traducidos, entre ellos 275 tRNAs. Consideramos que 275 era un número suficiente de casos para producir resultados con significancia estadística. En segundo lugar, los promotores de los tRNAs son generalmente intragénicos, y el tamaño promedio completo de estos genes es de únicamente 80 pb. Esto permite que las estimaciones hechas sobre la localiza-

ción de la subunidad Rpc160 sean más resolutivas. Finalmente, se investigó *in silico* el posicionamiento de los 275 genes de tRNAs respecto a la ORF más próxima. La distancia entre cada gen de tRNA y la ORF más próxima fue determinada (fig. 4.3) teniendo en cuenta la direccionalidad de la ORF (si era el extremo 5' o el 3' de la ORF el más cercano). Adicionalmente, se comprobó que no había preferencia por un extremo u otro de las ORFs por situarse próximas al gen de tRNA (datos no mostrados). Al observarse que el tamaño de las IGRs de levadura y las distancias entre ORFs y genes de tRNAs muestran una misma tendencia (fig. 4.3), es razonable suponer que la detección de la unión de la RNA polimerasa III a los genes de tRNAs es similar a la detección de la unión de cualquier proteína asociada a IGRs, como era nuestro objetivo.

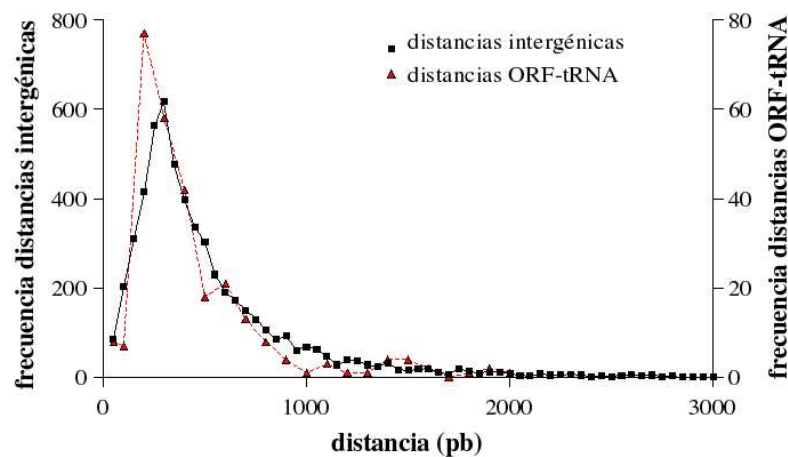


Figura 4.3. Comparación de la distribución de las regiones intergénicas (IGRs) en el genoma de levadura en función de su tamaño y de las distancias entre ORFs y genes de tRNAs. Los datos para la confección de la gráfica fueron obtenidos de <http://www.yeastgenome.org> y [266].

El experimento se planteó con el fin de detectar las ORFs más próximas a los genes de tRNAs, asignando a cada ORF detectada un gen de tRNA que se encuentre a una distancia máxima de 500 pb. El límite de 500 pb obedece a que, teóricamente, las secuencias inmunoprecipitadas que se encontraran a una distancia mayor no pueden ser detectadas por las características de la fragmentación del DNA. Así, se podrían detectar hasta un máximo de 195 tRNAs. Para

simplificar, asignamos en todos los casos el gen de tRNA más próximo a la ORF detectada. El escaneo de los macrochips muestra, tras la normalización y el análisis estadístico, que 112 ORFs se encuentran significativamente enriquecidas en la muestra inmunoprecipitada. De esas 112 ORFs, 90 detectan 83 tRNAs. Esto implica un 80 % de confianza de los datos. Para investigar el porcentaje de éxito dependiendo de la distancia entre ORF y gen de tRNA, calculamos el porcentaje de genes de tRNAs detectados a intervalos de 100 pb (tabla 4.3). Como era de esperar se observa que cuanto más cercano se encuentra la ORF al gen de tRNA, mayor es el porcentaje de éxito en la detección.

Tabla 4.3. **Porcentaje de genes de tRNAs identificados en los distintos rangos de distancias a ORFs.** El porcentaje acumulado muestra que la identificación de ORFs cercanas a un tRNA disminuye conforme nos alejamos de la región codificante presente en la sonda del macrochip.

Distancia ORF-tRNA	Nº total de tRNAs	Nº de tRNAs detectados	% de tRNAs detectados	% acumulado de tRNAs detectados
0	8	8	100	-
1-100	7	6	86	86
101-200	72	43	60	64
201-300	53	17	32	50
301-400	39	9	23	44

Como la detección de una ORF que, por ejemplo, se encuentre a 100 pb de un gen de tRNA implica que ese tRNA no tiene otra ORF más próxima en el otro sentido, si suponemos que el tRNA detectado es puntual, se puede asumir que se encuentra en el centro de una IGR de al menos 200 pb. Si se aplica esta asunción es posible calcular para este tipo de macrochips cuáles son las probabilidades de detección de los tRNAs (% acumulado de tRNAs detectados en la tabla 4.3), o en general de proteínas asociadas a IGRs.

Se debe tener en cuenta que las IGRs en levadura presentan una distribución de tamaños con un sesgo hacia longitudes de 150 a 800 pb (fig. 4.3). Esto implica que la mayor parte de las regiones intergénicas tendrán su punto central a una distancia menor de 400 pb de una ORF. De los datos mostrados en la tabla 4.3 se concluye que con el método que se ha diseñado se han detectado el 100 % de los

tRNAs que solapan con una ORF, y el 86 %, 64 %, 50 % y 44 % de los tRNAs que se encuentran a una distancia igual o menor de 100 pb (equivalente a una IGR de 200 pb), 200 pb (IGR de 400 pb), 300 pb (IGR de 600 pb) y 400 pb (IGR de 800 pb), de una ORF, respectivamente. Por otro lado, en levadura los sitios de unión de los reguladores transcripcionales no se encuentran uniformemente distribuidos en las regiones intergénicas. La distribución presenta un pico afilado alrededor de 180 pb *upstream* del sitio de comienzo de la transcripción [246], estando la mayoría de los sitios de unión concentrados entre 100 y 500 pb *upstream* de la ORF. Estos hechos apuntan a un elevado porcentaje de éxito en la detección de esos sitios con nuestro método.

En conclusión, nuestro experimento modelo ha permitido establecer que el método desarrollado con macrochips de ORFs de levadura puede utilizarse para detectar proteínas unidas a IGRs. Además hemos calculado el porcentaje de proteínas detectadas en IGRs en función de la distancia a la sonda depositada en el chip, lo que permite conocer la probabilidad de detección en futuros experimentos. Es esperable que porcentajes de detección similares sean aplicables a otros experimentos de ChIP-chip en los que las dianas no sean conocidas.

4.3.2. Sitios de unión de HATs en el genoma de levadura

Con el fin de determinar los sitios de unión de reguladores de la cromatina no esenciales de *S. cerevisiae*, efectuamos una serie de experimentos de ChIP-chip con el método desarrollado. Se analizó la localización genómica de las HATs que poseen actividad *in vivo* o *in vitro* sobre la histona H3, es decir, Gcn5, Elp3, Hpa2, Sas3, Sas2 y Nut1. Para ello se emplearon versiones de estas proteínas fusionadas a epítomos HA o c-MYC.

Para estudiar si existen grupos de genes con patrones similares de asociación de HATs se empleó SOTA (*Self Organizing Tree Algorithm*), un algoritmo no supervisado basado en redes neuronales que actúa como un método divisivo ejecutado de mayor a menor complejidad. El algoritmo calculó las distancias entre genes usando el coeficiente de correlación lineal y se restringió a nueve el núme-

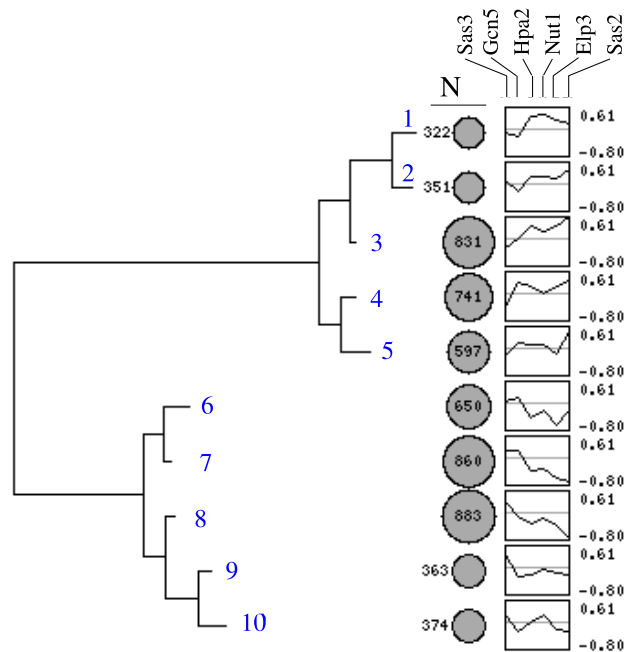


Figura 4.4. **Árbol de las agrupaciones de genes según su asociación a seis HATs.** El programa Sotatree muestra los diez grupos en los que se distribuyeron los genes tras el uso de Sotarray para aplicar el algoritmo SOTA (paquete GEPAS [267]). Se indica el número de genes en cada grupo (N) y los perfiles de asociación de las HATs Sas3, Gcn5, Hpa2, Nut1, Elp3 y Sas2.

ro de ciclos de entrenamiento de modo que se obtienen diez agrupamientos de genes, cada uno de distinta talla, según su asociación a las seis HATs (fig. 4.4).

Para evaluar si alguno de los diferentes patrones de asociación de las HATs (1-10 en fig. 4.4) se relacionan con funciones, procesos celulares o componentes de la célula, se analizó cada grupo con la herramienta web FuncAssociate. Esta herramienta permite detectar categorías funcionales sobrerrepresentadas en un grupo de genes. Efectivamente, a pesar de que los grupos 1, 5, 6 y 10 no mostraron sobrerrepresentados ningún atributo perteneciente a la clasificación GO (*Gene Ontology*), sí lo hicieron el resto de grupos. El grupo 2 de genes, que presenta un patrón de asociación alto para Hpa2, Nut1 y un poco más elevado para Sas2, se vincula a actividad helicasa y actividad ATPasa. Por su lado, el grupo 3, con un patrón elevado de asociación a Elp3, se vincula a actividades

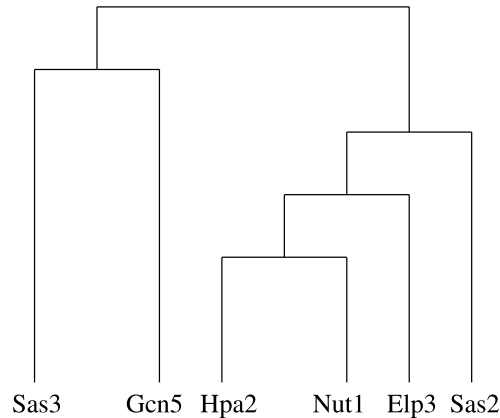


Figura 4.5. **Relación entre las seis HATs en cuanto a la unión a regiones del genoma de levadura.** El programa Sotarray utilizó un sistema secuencial jerárquico aglomerativo (UPGMA) para el agrupamiento de las HATs según su unión a los genes.

acopladas a ATPasas, helicasas y relacionadas con el núcleo. Los genes que se asocian más fuertemente a Gcn5 y Sas2 (grupo 4), se relacionan con genes del complejo sinaptonema¹ y nucleolo, mientras que los que se asocian más débilmente a estas HATs (grupo 9) sólo se relacionan con actividad enzimática en general. Los grupos 7 y 8, aunque similares en cuanto a que agrupan genes a los que Sas3 y Gcn5 son las más fuertemente asociadas, muestran enriquecimiento en genes de distintas categorías. Cuando la intensidad de la unión de ambas es similar (grupo 7), las ORFs se vinculan especialmente con funciones ribosomales, y cuando la asociación a Gcn5 es menor (grupo 8), a actividad redox y de metabolismo de nucleótidos.

Al mismo tiempo que realizó los agrupamientos de los genes en función del patrón de asociación de las HATs, el programa Sotarray también proporcionó información sobre las seis HATs en función de su asociación al genoma (fig. 4.5). Las HATs se separan en dos grandes grupos según su asociación a DNA; por un lado Sas3p y Gcn5p, y por otro lado el resto. En el segundo grupo Nut1p y Hpa2p exhiben un comportamiento similar, y Sas2p el comportamiento más alejado.

¹Complejo proteico que se forma entre dos cromosomas homólogos durante la meiosis para mediar el emparejamiento, la sinapsis y la recombinación.

Otra forma de estudiar las similitudes binarias en cuanto a las regiones a las que se asocian las HATs fue el estudio del solapamiento de las zonas de unión de las HATs. Para ello se comparó el conjunto de ORFs a los que se unió una HAT concreta con el resto de conjuntos y se determinó el número de coincidencias entre cada pareja de enzimas (tabla 4.4).

Tabla 4.4. **Solapamiento entre las regiones de unión de las distintas HATs ensayadas por ChIP-chip.** Se detalla el número de ORFs asociadas a las subunidades catalíticas con una *ratio* de unión igual o superior a 1.50 que solapan entre dos HATs, y abajo, la probabilidad de que se produzca al azar ese número de coincidencias o superior cuando se encuentra en negro, o de que se produzca ese número de coincidencias o menor si se encuentra en rojo. La proteína Gcn5 se unió con una *ratio* mayor de 1.50 a 225 ORFs, Elp3 a 255, Hpa2 a 464, Sas2 a 915, Sas3 a 335 y Nut1 a 309.

	Gcn5	Elp3	Hpa2	Sas2	Sas3
Nut1	30 5.8×10^{-7}	107 $<10^{-20}$	191 $<10^{-20}$	204 $<10^{-20}$	26 0.015
Sas3	47 1.8×10^{-16}	0 5.0×10^{-7}	1 2.3×10^{-12}	22 1.4×10^{-12}	
Sas2	64 5.4×10^{-8}	188 $<10^{-20}$	362 $<10^{-20}$		
Hpa2	44 1.7×10^{-9}	160 $<10^{-20}$			
Elp3	28 1.1×10^{-7}				

Se evaluó la probabilidad de que se produjera al azar un número de coincidencias igual o superior al observado utilizando la distribución hipergeométrica. También se estudió el solapamiento de dianas de las HATs a nivel de tres HATs (ver fig. 4.6 a nivel ilustrativo), aunque las intersecciones observadas no indican un solapamiento mayor de lo esperado al azar. En cuanto a las coincidencias binarias, aunque el solapamiento entre los conjuntos de las ORFs a las que se unen Sas3p y Elp3p y Hpa2p son excluyentes, y tampoco se produce un solapamiento significativo entre las dianas de Nut1p y Sas3p, el resto de parejas de HATs comparten un número de dianas lo suficientemente alto como para ser significativo estadísticamente. Esto apunta a una redundancia parcial en cuanto a las regiones ocupadas por las HATs de levadura, lo que podría indicar que estas actividades ocupan regiones comunes. No obstante, la ocupación en el genoma por Sas3p

parece excluir a las HATs de la familia GNAT Hpa2p y Elp3p, pero no a Gcn5p.

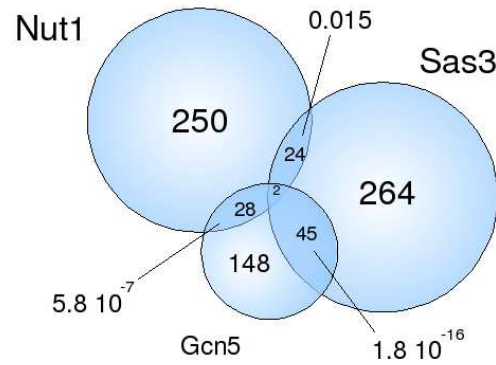


Figura 4.6. **Solapamiento entre las regiones codificantes asociadas a Gcn5p Sas3p y Nut1p.** Se muestran el número de ORFs asociadas a Sas3p, Gcn5p y Nut1p, y la probabilidad de cada solapamiento en un diagrama en el que las áreas son proporcionales al número de elementos.

Relación de las HATs con categorías funcionales de sus genes diana

Se sabe que los genes diana de algunas HDACs están altamente asociados a categorías funcionales concretas (Hst1p a genes de esporulación y de la ruta de la quinureína [247]), por lo que es interesante averiguar si en los conjuntos de ORFs asociadas a HATs se detectaban categorías funcionales sobrerrepresentadas. Esto podría indicar un papel de la actividad enzimática HAT en la regulación de esas funciones. Por tanto se determinaron las categorías funcionales en las que se encuentran enriquecidas las ORFs asociadas a cada HAT analizada (tabla 4.5). Como el número de ORFs diana compartidas por las distintas HATs generalmente es más alto de lo esperable al azar (tabla 4.4), esto podría indicar que diversas HATs se asocian a las mismas categorías. Sin embargo, únicamente Sas3p y Gcn5p comparten la mayor parte de las categorías sobrerrepresentadas en sus genes diana, mientras que el resto de HATs se asocian a diversas categorías (tabla 4.4). Por otro lado, Hpa2p se asocia a ORFs relacionadas con la actividad GTPasa, como factores de intercambio de nucleótidos y proteínas activadoras de GTPasas. Por ejemplo, de los 31 genes de *S. cerevisiae* que han

Tabla 4.5. Atributos de GO en los que se encuentran enriquecidos los conjuntos de genes unidos por las distintas HATs. Se han listado las categorías en las que se encuentran enriquecidos los genes a los que se une cada HAT con una *ratio* de unión mayor de 1.50. Estas categorías se obtuvieron utilizando la herramienta web FuncAssociate (<http://llama.med.harvard.edu/cgi/func/funcassociate>). Sólo se han mostrado las tres categorías con los valores *P* más significativos para cada HAT.

HAT	Atributos GO (<i>P</i>)
Gcn5	ribosoma citosólico (3.6×10^{-26}) ribosoma (1.1×10^{-23}) constituyentes estructurales del ribosoma/proteínas estructurales (1.7×10^{-21})
Elp3	-
Hpa2	actividad reguladora, o de interacción, con pequeña GTPasa (3.7×10^{-8}) actividad reguladora GTPasa (1.1×10^{-7}) actividad activadora GTPasa (5.9×10^{-6})
Sas3	ribosoma citosólico (3.2×10^{-29}) ribosoma (8.6×10^{-28}) constituyentes estructurales del ribosoma/proteínas estructurales (1.1×10^{-24})
Sas2	reparación no recombinatoria de DNA (2.5×10^{-5}) actividad proteasa específica de ubiquitina (2.8×10^{-5}) reparación de doble hebra via unión de extremos no homólogos (5.8×10^{-5})
Nut1	-

sido asignados por el proyecto GO a la función activadora de GTPasas, 11 se encuentran en el conjunto de los 464 genes asociados a Hpa2p. Esta es la primera vez que se sugiere una función de este tipo para Hpa2p. Sas2p, por su parte se relaciona con las funciones de reparación de DNA y de actividad proteasa específica de ubiquitina. La proteína Sas2p había sido descrita como una actividad que acetila la lisina 16 de la histona H4 en regiones proximales a los telómeros silenciados para prevenir la asociación de la proteína Sir3, y por tanto, la expansión del silenciamiento desde los telómeros [70]. Su vínculo con la reparación del DNA y con la actividad proteasa específica de ubiquitina tampoco había sido

identificado previamente.

Por último, ni Elp3p ni Nut1p se encuentran asociadas a categorías funcionales de GO (tabla 4.5). Esto estaría de acuerdo con un estudio anterior sobre Elp3p [268], en el que no se consiguió localizar varios componentes del complejo Elongador, entre ellos Elp3p, mediante experimentos de ChIP individuales, ni tampoco detectar enriquecimiento de genes mediante ChIP-chip de Elp1p (compañera de Elp3p en Elongador). Sorprendentemente ese mismo trabajo detecta la presencia de tres de los componentes del complejo Elongador (Elp1p, Elp2p y Elp3p) en citoplasma mediante microscopía de fluorescencia. Por otro lado, la proteína Nut1 forma parte del complejo Mediador, que consta de 21 subunidades y al menos de tres módulos estructurales [269]. El gran tamaño del complejo Mediador, y el hecho de que la subunidad Nut1/Med5 no interaccione directamente con el DNA, podría haber dificultado la inmunoprecipitación. Por ejemplo en el caso del complejo HDAC que contiene Rpd3p, se ha demostrado un problema similar [50]. Tampoco se encuentra ninguna relación entre los genes infraexpresados en células *nut1Δ* [269], y aquellos genes a los que Nut1p se asocia según nuestros datos.

4.3.2.1. Sas3p y Gcn5p son funcionalmente equivalentes

El elevado número de genes diana comunes (tabla 4.4), y el hecho de que los genes a los que se asocian tanto Sas3p como Gcn5p se encuentran enriquecidos en categorías funcionales virtualmente idénticas (tabla 4.5), sugiere que ambas HATs podrían asociarse a regiones similares. También las 47 ORFs coincidentes observadas entre Sas3p y Gcn5p muestran un enriquecimiento en categorías similares (ribosoma (6.8×10^{-17}), ribosoma citosólico (9.4×10^{-16}) y complejo de ribonucleoproteína (8.4×10^{-14})). Efectivamente, cuando se analizó la correlación entre los lugares de unión de Gcn5p y de Sas3p se observa una fuerte correlación positiva (fig. 4.7), indicando que existe una tendencia de ambas proteínas hacia ocupar las mismas regiones del genoma en levadura.

Como ambas HATs se asocian a genes relacionados con el ribosoma, que

son activamente transcritos en la célula [270], es posible que exista una vinculación entre la unión de Sas3p y Gcn5p, y la transcripción. De hecho, Gcn5p se ha hallado asociada a genes codificantes de proteínas activos transcripcionalmente en un trabajo previo que analizó la localización genómica de Gcn5p mediante ChIP-chip [247]. Adicionalmente, el grupo 7 de los genes que se asocian preferentemente con ambas HATs, también muestra un fuerte vínculo con la subunidad ribosomal grande.

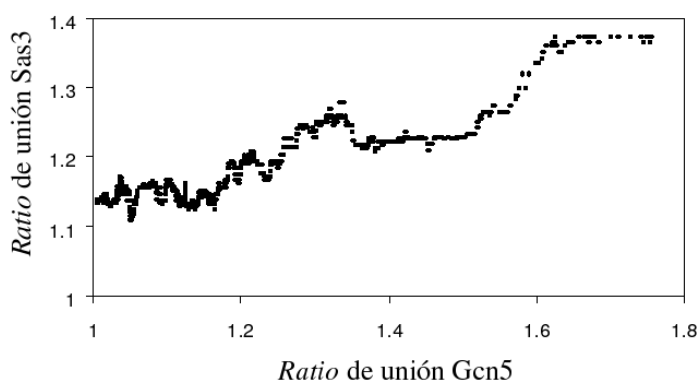


Figura 4.7. **Correlación entre las ocupaciones de las HATs Sas3p y Gcn5p.** La ocupación de ambas HATs fue calculada computando la mediana móvil de la *ratio* de unión sobre una ventana deslizante de 100 genes a lo largo del conjunto de todos los genes ordenados por *ratio*. Sólo se tuvieron en cuenta para la representación las ORFs que mostraron una *ratio* de unión superior a 1.50. La ocupación de Sas3p fue representada en función de la de Gcn5p, obteniéndose un coeficiente de correlación (r) de 0.91.

Se ha postulado que cuando un regulador de la cromatina está asociado a la mayoría, o a todos los genes transcripcionalmente activos [247, 248], es lógico suponer que la ocupación de estos genes por el regulador se correlacionará con las tasas transcripcionales. Una correlación de este tipo se ha descrito para los casos de Gcn5p y Esa1p [247] y de la histona metiltransferasa Set1p [134]. Los reguladores que actúan de manera que su unión a cromatina se correlaciona con la tasa de transcripción se han denominado generales, mientras que aquellos en los que no ocurre esto se clasifican como específicos de genes (como el complejo remodelador RSC [248]). Para averiguar si estas correlaciones se daban en el caso de nuestras actividades HAT, se realizó una representación de la tendencia

de unión de cada HAT frente a la tasa de transcripción. Los resultados indican que la asociación de Sas3p y Gcn5p a genes codificantes de proteínas, está claramente correlacionada con las tasas de transcripción obtenidas a partir del trabajo de Holstege *et al.* [270] (fig. 4.8)². Estos resultados (fig. 4.8) son la primera evidencia de que Sas3p podría comportarse como un activador general, al igual que Gcn5p. La relevancia de este descubrimiento se debe a que Sas3p, que es la subunidad catalítica del complejo NuA3, había sido vinculada con el silenciamiento transcripcional [68].

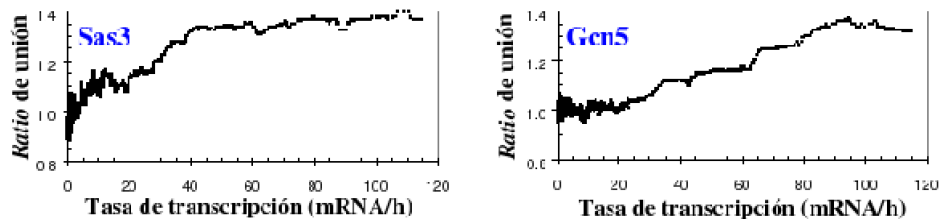


Figura 4.8. **Correlaciones entre la ocupación de Gcn5p y Sas3p y las tasas de transcripción.** La ocupación fue obtenida computando la mediana móvil de la *ratio* de unión sobre una ventana deslizante de 100 genes a lo largo del conjunto de todos los genes ordenados por tasa de transcripción. La tasa de transcripción según el trabajo de Holstege *et al.* [270], fue también transformada como una mediana móvil de los valores para cada gen sobre una ventana móvil de 100 genes a lo largo de ellos.

Por otra parte, el resultado obtenido con Gcn5p confirma las conclusiones obtenidas empleando una metodología de ChIP-chip con microchips de IGRs [247], y por tanto valida nuestro método con macrochips de ORFs para investigar la localización de reguladores de la cromatina.

Se conocía previamente que la delección conjunta de *SAS3* y *GCN5* es sintética letal debido a la pérdida de la actividad HAT de estas proteínas [79]. Este hecho y los datos mostrados en este trabajo, sugieren que Gcn5p y Sas3p ejercen funciones solapantes en la acetilación de histonas que son esenciales para el ciclo celular. Los datos aquí mostrados apoyan un modelo en el que Gcn5p y Sas3p actúan como activadores generales de un conjunto de genes intensamente transcritos, siendo muchos de ellos coincidentes.

²Y también cuando se usaron las tasas de transcripción obtenidas de experimentos de *genomic run on* [271].

4.3.3. Asociación de Sas3p y Gcn5p a cromatina acetilada en la lisina 14 de la histona H3 *in vivo*

Dado que tanto Gcn5p [272, 47, 179] como Sas3p [79], han sido descritas como HATs cuya actividad *in vitro* se dirige fundamentalmente hacia la lisina 14 de H3 (H3K14), centramos nuestro estudio en la relación de ambas HATs con la acetilación de esta posición. Se realizó el mapeo de las regiones acetiladas empleando un anticuerpo específico contra H3K14 acetilada (H3K14ac), observándose que la ocupación de Sas3p y Gcn5p y la acetilación de esta posición se encuentran fuertemente correlacionadas (fig. 4.9).

La acetilación de H3K14 ha sido correlacionada con la tasa de transcripción en dos trabajos recientes [255, 252], a pesar de que en un trabajo anterior a estos no se hallara esta correlación [168]. Cuando se representa la fracción de histona H3 acetilada en función de la tasa de transcripción, se observa una correlación positiva (fig. 4.10), que no se produce cuando se utiliza un control de DNA procedente de una inmunoprecipitación sin anticuerpo equivalente al control empleado por [168]. Las *ratios* se calcularon como el cociente entre el nivel de acetilación en H3K14 obtenido con α -H3K14ac, y la cantidad absoluta de histona H3 obtenida con un anticuerpo que reconoce el extremo carboxilo terminal de la histona H3, independientemente de su estado de modificación (α -H3-Ct). Este resultado confirma de nuevo la calidad del método, y su capacidad para realizar mapeos genómicos de modificaciones postraduccionales de las histonas. Además, también relaciona la acetilación de H3K14, de la que Sas3p y Gcn5p son presumiblemente responsables, con la actividad transcripcional.

De hecho, resultados similares habían mostrado anteriormente una correlación positiva entre la localización genómica de Gcn5p, la acetilación de H3K14 y la actividad transcripcional [255]. La clara correlación entre la localización de ambas HATs y la acetilación de H3K14 sugiere que Gcn5p y Sas3p puedan ser las principales responsables de esta modificación *in vivo*. Sas3p es la subunidad catalítica de NuA3, que acetila H3K14, y en menor medida H3K23 [79]. Gcn5p recombinante acetila fundamentalmente H3K14 *in vitro* [272, 47], y cuando for-

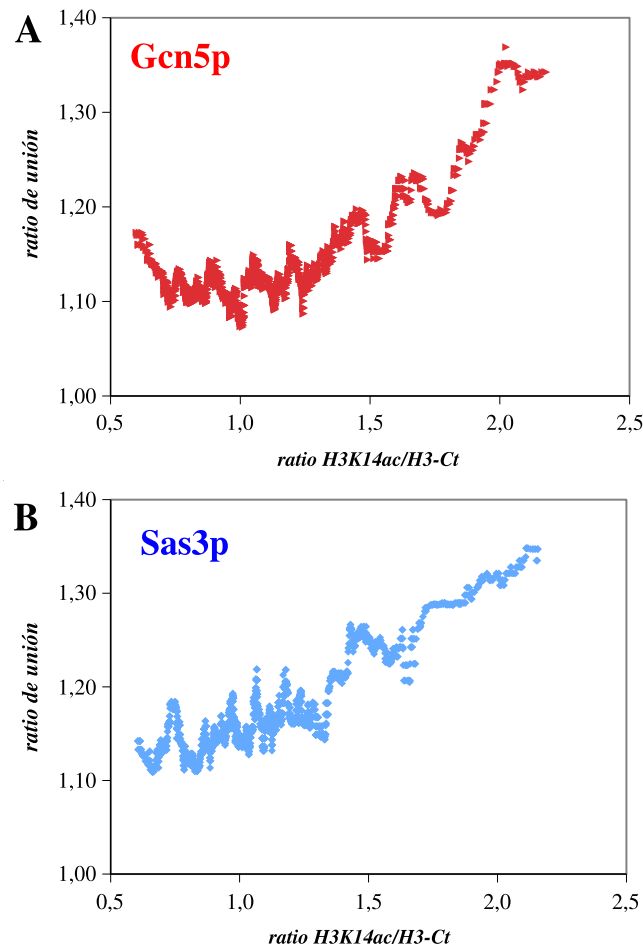


Figura 4.9. Correlación entre la acetilación de la posición H3K14 y la localización genómica de Gcn5p (A) y Sas3p (B). La ocupación por Gcn5p (A) y Sas3p (B) fue calculada como en la fig. 4.8, y sólo se tuvieron en cuenta aquellas ORFs con una *ratio* mayor de 1 para representar la tendencia de las asociadas a las HATs. La acetilación en H3K14 fue obtenida como la *ratio* de dos experimentos de CHIP-chip. En el primero se inmunoprecipitó el extracto con α -H3K14ac, y en el segundo con un anticuerpo que reconoce el extremo carboxilo terminal de H3. Las *ratios* fueron calculadas para cada ORF, y su mediana móvil fue obtenida para una ventana deslizante de 100 ORFs ordenadas por ocupación de Gcn5p (A) o de Sas3p (B).

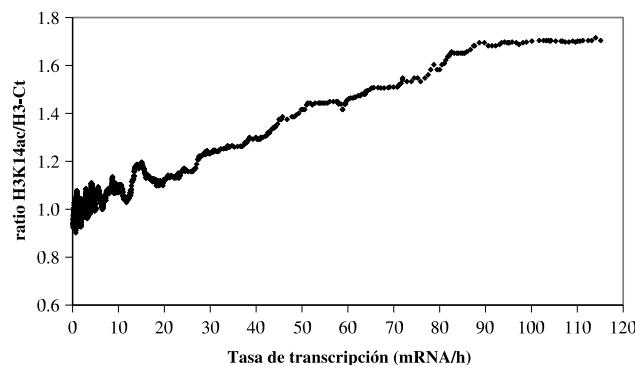


Figura 4.10. **Correlación positiva entre la tasa transcripcional y la acetilación de la lisina 14 de la histona H3.** Las *ratios* para cada ORF fueron calculadas a partir de experimentos de ChIP-chip que inmunoprecipitaron H3K14 acetilada (α -H3K14ac) y H3 total (α -H3 carboxilo terminal) de una cepa silvestre (BY4742), y la tasa de transcripción fue computada como en la fig. 4.8.

ma parte de los complejos ADA y SAGA acetila H3K14 más que H3K18, y a su vez más que H3K9 y H3K23 en nucleosomas *in vitro* [179]. Sin embargo, en trabajos de otros autores no se ha encontrado dependencia entre la acetilación de H3K14 y la delección de *GCN5* en determinadas regiones del genoma [273, 274]. El no hallar una fuerte disminución de la acetilación en esta posición en determinados genes puede deberse, por un lado a que es posible que no todos los genes posean una acetilación importante de H3K14, o bien, precisamente, a la redundancia funcional entre Sas3p y Gcn5p. Si esta modificación es importante para el establecimiento de un estado transcripcional activo, resulta lógico que exista una HAT que pueda suplir la función de la otra. De hecho, de las HATs cuyo sustrato es la histona H3, únicamente la combinación de la mutación de estos dos genes, *SAS3* y *GCN5*, es letal sintética debida a la pérdida de la actividad HAT [79]. También se ha descrito que la mutación de H3K14 en una cepa *gcn5* Δ produce un defecto de crecimiento severo y una acumulación de células en la transición G2/M [275], lo que sugiere que la acetilación de esta posición es importante para la viabilidad.

Para investigar el efecto de la delección de estas HATs en el nivel de acetilación genómico de H3K14, se inmunoprecipitaron las regiones acetiladas en esa posición en las cepas mutantes. Esto permite realizar una representación del

cambio de acetilación de H3K14 de las cepas mutantes frente a la unión de la proteína etiquetada (fig. 4.11). La fig. 4.11 muestra una clara correlación entre el descenso de la acetilación de la H3K14 y la localización genómica de Gcn5p. En una cepa mutante *gcn5* Δ las regiones que se encuentran en general enriquecidas en la modificación H3K14ac, son aquellas en las que la proteína Gcn5p se asociaba con menor intensidad en la cepa silvestre. Los datos representados en la fig. 4.11 constituyen una prueba importante de que Gcn5p es capaz de acetilar *in vivo* esta posición, aunque evidentemente también puede estar implicada en la acetilación de otras posiciones.

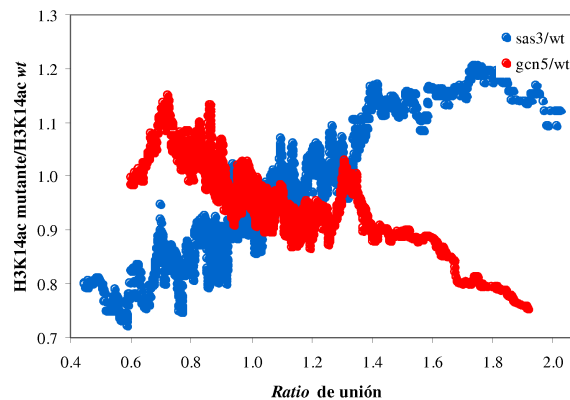


Figura 4.11. **Correlación entre la localización genómica de Gcn5p y Sas3p y el cambio de acetilación en H3K14 en sus correspondientes mutantes.** La ocupación de ambas HATs fue calculada como en la fig. 4.8, y la tasa de variación del nivel de acetilación en H3K14 fue calculada como la *ratio* de la señal obtenida para el enriquecimiento en la cepa mutante y la silvestre. Estas *ratios* fueron ordenadas en función de la localización genómica de las HATs, y la mediana móvil de 100 ORFs fue computada de modo similar a las de figuras anteriores.

Sorprendentemente los resultados obtenidos muestran que la acetilación de H3K14 en el mutante *sas3* Δ varía en el sentido contrario al observado con *gcn5* Δ (fig. 4.11). En este caso, a mayor intensidad de la unión de Sas3p al DNA (mayor *ratio*), mayor nivel de acetilación de H3K14 en la cepa *sas3* Δ respecto a la silvestre. Esto implica que las regiones a las que Sas3p se une en las condiciones normales de nuestro estudio, son aquellas que muestran un incremento

en la *ratio* de acetilación de H3K14 en la cepa *sas3Δ*. Explicar estos resultados es complejo, pero una interpretación posible es que las regiones que habitualmente son acetiladas por Sas3p, en ausencia de ésta son acetiladas por otra HAT más activa, con una especificidad similar, posiblemente Gcn5p. Esto estaría de acuerdo con la redundancia funcional previamente comentada. Una explicación a estos hechos sería que la presencia de Sas3p evita la asociación de Gcn5p a sus dianas potenciales, “inhibiendo” su actividad. Sas3p podría acetilar las posiciones H3K14 y H3K23 en la cepa silvestre, y en su ausencia Gcn5p acetilaría fuertemente H3K14, pero no H3K23.

Los resultados sobre la variación del nivel de acetilación en H3K14 en el mutante *sas3Δ* respecto de la cepa silvestre también se analizaron midiendo el nivel de significancia mediante un test Z para datos independientes. Este análisis determinó que 434 genes poseen un nivel de acetilación significativamente menor en la cepa mutante. Al examinar las categorías funcionales en las que este grupo de genes se encuentra enriquecido, se observa una marcada tendencia a estar relacionadas con procesos de división celular (tabla 4.6). Este hecho sugiere que Sas3p se encuentra vinculada *in vivo* a la regulación de procesos relacionados con la progresión en el ciclo celular, posiblemente a través de la acetilación de H3K14. Efectivamente Sas3p, una HAT implicada en múltiples procesos de regulación de la cromatina, como el silenciamiento transcripcional [68], también se había visto involucrada en la regulación del ciclo celular junto a Gcn5p [79].

Tabla 4.6. Categorías funcionales GO enriquecidas en los genes que disminuyeron significativamente su nivel de H3K14 en el mutante *sas3Δ*. Se muestran las seis categorías con los valores *P* más significativos obtenidas en la herramienta web FuncAssociate, el número de genes total de cada categoría, y los hallados dentro de la lista de 474 genes hipoacetilados.

Atributo GO	Número total de genes	Número de genes	Valor <i>P</i>
Ciclo celular/Ciclo división celular	397	54	2.8×10^{-7}
Ciclo celular mitótico	233	37	5.8×10^{-7}
Gemación	77	18	2.2×10^{-6}
Desarrollo	365	48	3.7×10^{-6}
Reproducción	251	36	9.5×10^{-6}
Membrana plasmática	232	34	1.1×10^{-6}

Tabla 4.7. Categorías funcionales GO enriquecidas en los genes que disminuyeron en 1.50 veces su nivel de acetilación en H3K14 en el mutante *gcn5Δ*. Se muestran las seis categorías con los valores *P* más significativos obtenidas en la herramienta web FuncAssociate, el número de genes total de cada categoría, y los hallados dentro de la lista de 441 genes hipoacetilados.

Atributo GO	Número total de genes	Número de genes	Valor <i>P</i>
Exportación nuclear	83	19	1.8×10^{-6}
Transporte nuclear	99	21	2.0×10^{-6}
Transporte nucleocitoplásmico	105	21	5.4×10^{-6}
Localización RNA	81	18	5.4×10^{-6}
Posicionamiento RNA	70	16	1.2×10^{-5}
Transporte ácido nucleico	70	16	1.2×10^{-5}

Cuando se examinaron del mismo modo los genes que disminuyen al menos 1.5 veces su acetilación en H3K14 en la cepa mutante *gcn5Δ*, se observaron categorías GO distintas (tabla 4.7). En este caso, la exportación nuclear es el proceso que predomina en todas las categorías sobrerrepresentadas en los genes hipoacetilados. Esto resulta interesante si se tiene en cuenta que se ha encontrado un vínculo físico entre la exportación de mRNA y el complejo SAGA [185]. Según este hallazgo, la proteína Sus1, que forma parte de la maquinaria de exportación nuclear asociada al poro, también se ha encontrado formando parte de SAGA.

Podemos concluir que tanto Gcn5p como Sas3p son HATs cuya unión al genoma se asocia con la acetilación de H3K14 y con la actividad transcripcional. Se ha descrito que la acetilación de esta posición está incrementada en la región codificante central de los genes [252]. Además, la fuerte correlación entre la asociación a Gcn5p y la disminución de la acetilación de H3K14 en la cepa *gcn5Δ* sugiere que esta HAT es responsable de esta acetilación, junto con Sas3p, que posiblemente no posee una actividad tan intensa como la de la primera. De hecho, un estudio muy reciente no ha detectado cambios significativos en los niveles de expresión globales de una cepa mutante *sas3Δ* [189], lo que estaría de acuerdo con un menor impacto sobre el nivel de acetilación por la pérdida de SAS3. Sas3 (subunidad catalítica de NuA3 [74]) fue implicada originalmente en silenciamiento transcripcional [68]. *In vitro* acetila preferencialmente la lisina 14 y en

menor medida la lisina 23 de la histona H3 nucleosomal [74]. La letalidad sintética de *gcn5Δsas3Δ* por la pérdida de actividad HAT de ambas proteínas [79], hace pensar que la modificación producida por estas HAT es importante para la viabilidad celular. Por último, se ha visto que los genes más afectados por la mutación de *SAS3* en cuanto a disminución de sus niveles de acetilación son aquellos relacionados con la división y el ciclo celular, mientras que los más afectados por la de *GCN5* estaban vinculados con transporte de mRNA.

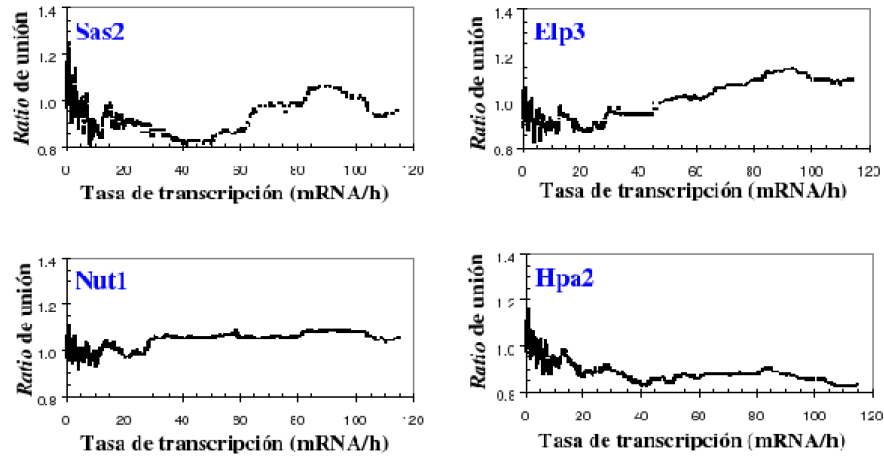


Figura 4.12. Correlación entre la ocupación de Sas2p, Elp3p, Hpa2p y Nut1p, y la tasa de transcripción. Las *ratios* de unión y las tasas de transcripción fueron obtenidas de manera análoga a las de la fig. 4.8.

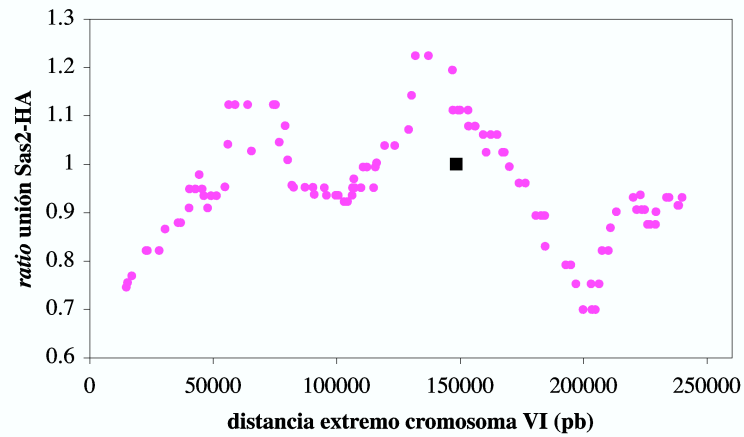


Figura 4.13. Análisis mediante ChIP-chip de la asociación de Sas2p a los marcos de lectura abiertos del cromosoma VI. Se ha representado la *ratio* de unión para cada ORF en función de su posición en el cromosoma. Se tomó la mediana de una ventana móvil de 10 ORFs para suavizar la representación. Un cuadrado negro marca la posición del centrómero.

4.3.4. Asociación de Hpa2p, Elp3p, Nut1p y Sas2p a cromatina, activación transcripcional y acetilación en la lisina 14 de H3

Con el fin de averiguar si alguna de las otras HATs con especificidad sobre la histona H3 posee una distribución genómica vinculada a la tasa de transcripción, como en el caso de Sas3p y Gcn5p (fig. 4.3.4), se ha hecho un estudio similar de las HATs Hpa2p, Elp3p, Nut1p y Sas2p. En este caso, Hpa2p, Nut1p y Sas2p no muestran correlación, lo cual indica que ninguna de ellas es un activador transcripcional general. Efectivamente, las ORFs dianas de estas HATs no se encuentran entre los genes con una mayor actividad transcripcional celular.

Sin embargo, Elp3p muestra una modesta tendencia a unirse a regiones con mayor tasa de transcripción, como podría esperarse de su condición de componente de la RNA polimerasa elongante [226], aunque la correlación es menor que la mostrada por Gcn5p y Sas3p (fig. 4.8).

La falta de correlación de la unión de Nut1p con la actividad transcripcional resulta sorprendente para una proteína con actividad HAT que forma parte del Mediador. No obstante un trabajo muy reciente obtuvo un resultado similar empleando diversas subunidades del complejo para su localización genómica [276]. Este trabajo ha descubierto que la asociación del Mediador se produce tanto en regiones *upstream* de genes activos, como de genes inactivos transcripcionalmente, y también a regiones codificantes de ciertos genes. Se ha propuesto que el Mediador podría estar actuando como plataforma para la unión de la RNA polimerasa II inactiva en fase estacionaria, o bien el Mediador pre-reclutado podría facilitar la rápida inducción de genes en respuesta a cambios ambientales, lo cual daría cuenta de la nula correlación con la tasa transcripcional encontrada.

Sas2p, por su lado, es una HAT cuya función ha sido relacionada con el bloqueo de la propagación de las regiones heterocromatínicas, a través de la acetilación de la posición 16 de la histona H4, la cual sería desacetilada por Sir2p [70]. La posición H4K16 acetilada impide la unión de la proteína silenciadora Sir3, y

protege las regiones próximas a los telómeros de la represión mediada por la asociación de proteínas Sir. Una posible razón que explicaría la falta de correlación entre la asociación de Sas2p y la activación transcripcional a nivel genómico (fig. 4.3.4), es que Sas2p actúa principalmente a nivel de las regiones subteloméricas, lo que impide observar una tendencia genómica general. Sin embargo tampoco se detecta un enriquecimiento específico de esta proteína en regiones subteloméricas (fig. 4.13), indicando que tal vez la asociación es transitoria, o que las sondas del macrochip no son adecuadas para investigar regiones cercanas a los telómeros.

Por tanto nuestros datos no permiten correlacionar a Sas2p, Nut1p o Hpa2p con la actividad génica, aunque sí se observa una correlación entre la unión al genoma de Elp3p y la tasa de transcripción. Para determinar si la función de alguna de estas HATs estuviera vinculada a la acetilación de la posición H3K14, se representó la *ratio* de la unión de éstas en función del nivel de acetilación en aquella posición (fig.4.14).

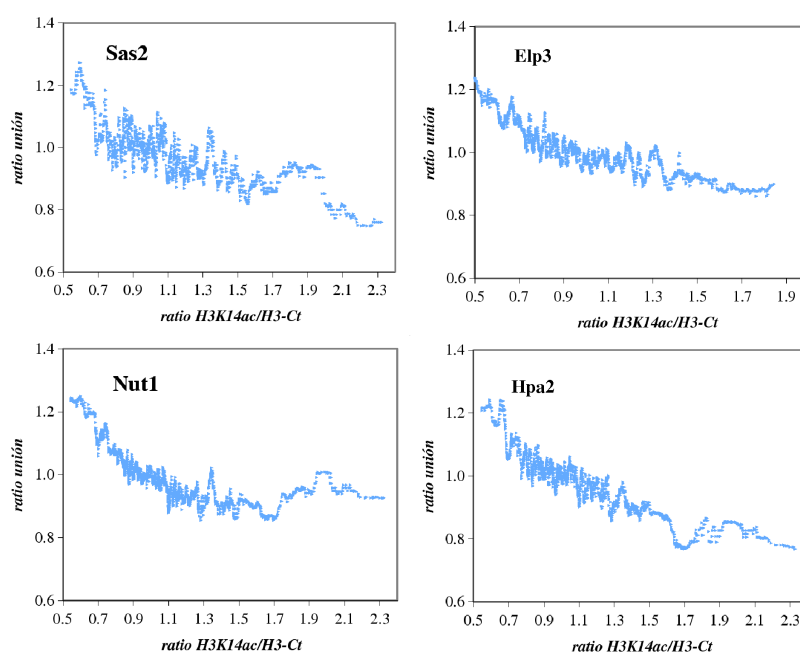


Figura 4.14. Niveles de acetilación de H3K14 y asociación de Sas2p, Nut1p, Elp3p y Hpa2p. Se han representado las *ratios* de unión de las distintas HATs y el nivel de acetilación de H3K14 de igual modo que en la fig. 4.9.

Se observa que ninguna de las HATs se asocia a regiones especialmente acetiladas en H3K14, e incluso se detecta una correlación negativa, un poco más acusada en el caso de Hpa2p. Este resultado indica que las regiones del genoma a las que se unen poseen niveles de acetilación en H3K14 menores que los del resto de la cromatina.

A pesar de que no se hallara una asociación física entre las regiones acetiladas en H3K14 y las cuatro HATs estudiadas, se llevó a cabo un análisis ChIP-chip en cepas mutantes en estas HATs para examinar el posible cambio de acetilación, en el caso hubiera alguna relación indirecta.

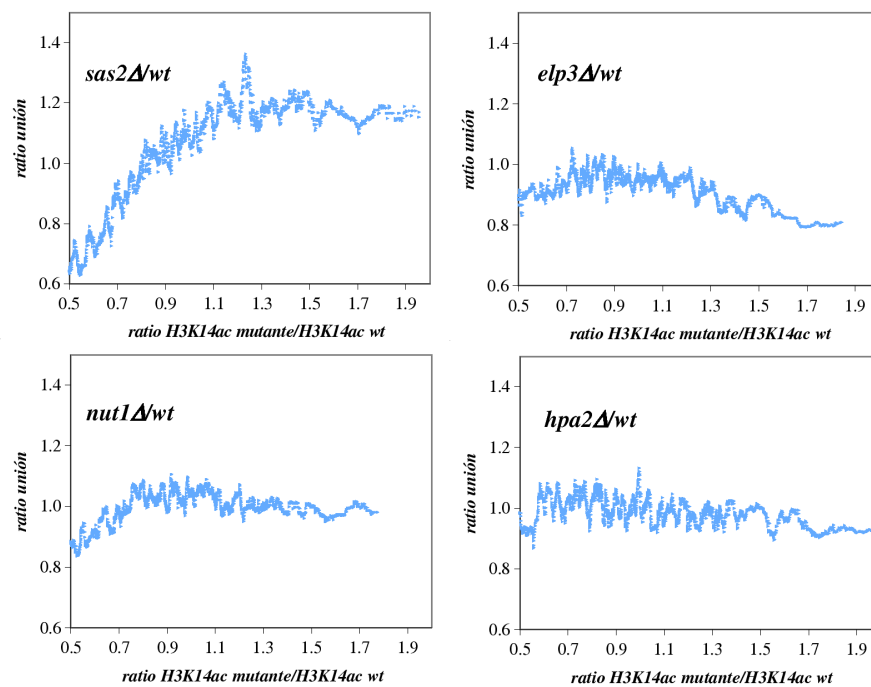


Figura 4.15. Variación en los niveles de acetilación en H3K14 de mutantes *sas2Δ*, *nut1Δ*, *elp3Δ* y *hpa2Δ* en las ORFs a las que se asocian estas HATs. La extensión de la unión al genoma de las HATs fue calculada como en la fig. 4.8, y la *ratio* de la señal obtenida para la acetilación en H3K14 en la cepa mutante y la silvestre fueron calculadas, para posteriormente representar las medianas de ventanas móviles de 100 ORFs. Las *ratios* de unión fueron ordenadas en función de la variación de la acetilación, y también fue calculada la mediana móvil de 100 ORFs.

En la fig. 4.15 se representa la *ratio* de unión de cada HAT en función de la *ratio* de acetilación mutante/salvaje. Los resultados obtenidos demuestran que en Nut1p, Sas2p y Hpa2p, la variación de la acetilación no muestra correlación con la intensidad de la unión. Sin embargo, regiones que se asocian débilmente a Sas2p muestran incrementos de acetilación en la cepa *sas2Δ* respecto de la silvestre. Se ha descrito que cepas que han sufrido una mutación en H4K16R, que produce un fenotipo similar a la mutación de *SAS2*, muestran una acetilación de H3K14 disminuida en regiones cercanas al telómero [69]. No obstante, nuestros resultados indicarían lo contrario, si bien es cierto que un efecto local en las regiones teloméricas puede diluirse cuando se analizan los datos del genoma completo de *S. cerevisiae*.

Se puede concluir que no hay indicios de que las HATs Sas2p, Nut1p y Hpa2p se encuentren relacionadas con la acetilación de H3K14. Aunque la mutación de *SAS2* produce un incremento de la acetilación en las regiones a las que se asocia esta HAT es probable que se trate de un efecto indirecto. Hpa2p sigue siendo la HAT de la que menor información se posee y, a pesar de que una de las posiciones que acetila *in vitro* sea H3K14 [228], no se ha logrado correlacionar su presencia con esta modificación, ni su ausencia con una disminución en el nivel de acetilación de las regiones ocupadas por ella. Nut1p se encuentra en un gran complejo, el Mediador, que posee múltiples funciones y se asocia al holoenzima de la RNA polimerasa II, aunque no parece seguir un modelo típico de activación transcripcional por reclutamiento según los resultados aquí obtenidos y los de otros [276]. Elp3p podría acompañar a la RNA polimerasa II en la etapa de elongación de regiones codificantes, como apuntan nuestros resultados. Elp3p posee la capacidad de acetilar H3K14 *in vitro* [277], aunque también puede acetilar H4K8, modificación que se ha descrito recientemente como dependiente de la transcripción [189]. Este descubrimiento podría resultar interesante, puesto que la acetilación de esa posición podría depender de la metilación de H3K4, y vincularía otra HAT a la metilación, como ya se ha visto que ocurre en el caso de otras HATs [138, 139, 136]. Por ejemplo NuA4 es una HAT que produce la acetilación de H4K8, la cual es dependiente de componentes de complejos HMTs como Spp1p, Set1p y Set2p, responsables de la di- y trimetilación de las lisinas 4 y 36 de la histona H3 [139].

Parte 5

Efectos sobre la longevidad y el perfil transcriptómico de la delección de los genes *HAT1* y *HAT2* del complejo HAT B de levadura

“Millions long for immortality who do not know what to do with themselves on a rainy Sunday afternoon.”

Susan Ertz

5.1 Antecedentes

5.1.1. El envejecimiento en levadura y la cromatina

Tras los espectaculares avances de la medicina en las últimas décadas y la mejora de la calidad de vida, la mediana de la edad de los habitantes de los países más desarrollados ha pasado de 29 años en 1950, a 37 en el 2000, y se calcula que será de 45 en el 2050 [278]. Así, los estudios sobre los mecanismos subyacentes del envejecimiento cobran cada vez mayor importancia en nuestra sociedad. Dado que se han descubierto rutas conservadas en todos los eucariotas que regulan la velocidad del envejecimiento [279], *S. cerevisiae* ha sido muy empleada como modelo en estudios de envejecimiento y regulación de la longevidad. En levadura se han definido dos modos de medir la senescencia: la vida media replicativa y la vida media cronológica. La vida media replicativa es el número de divisiones que una célula individual sufre antes de morir. Una característica que distingue a *S. cerevisiae* de otros eucariotas simples es que la célula progenitora, o madre, es fácilmente diferenciable de sus descendientes a causa de la división celular asimétrica. La célula hija recién formada es habitualmente más pequeña que la célula que la ha producido, lo que permite su separación en ensayos de esperanza de vida. La vida media cronológica, por su lado, es el período de tiempo que una población de células de levadura permanece viable tras la privación de nutrientes sin sufrir divisiones celulares.

La inestabilidad genómica ha sido identificada como una de las mayores causas del envejecimiento o senescencia, y se han descrito al menos una docena de genes de longevidad que la suprimen en levadura [279]. De hecho, una de las primeras observaciones sobre mutantes de levadura longevos reveló que, además de ser resistentes a diversos estreses, un gran número de ellos muestran afectados procesos relacionados con la formación de la heterocromatina [280]. Es por tanto relevante que Sir2p, la HDAC dependiente de NAD⁺ clave en el silenciamiento, también sea importante para el mantenimiento de la vida media silvestre [281].

La relación entre la acetilación de histonas y la senescencia ha sido sugerida por la observación de varias mutaciones en HDACs que afectan a la vida media. Por ejemplo, la delección de *SIR2* acorta la vida media [282], mientras que la sobre-expresión de *SIR2* [283, 282] y la delección de *RPD3* la alarga [283].

Se cree que la función de Sir2p en el silenciamiento del rDNA es crucial para promover la longevidad de la levadura [284]. Sir2p reprime la recombinación homóloga de las 100-200 copias en tándem de rDNA del cromosoma XII [285], que de otro modo dan lugar a la formación de círculos de rDNA extracromosómicos. Estos círculos de rDNA se segregan preferentemente en las células madre y contienen ARS (*A*utonomously *R*eplicating *S*equences) que les permiten replicarse durante la fase S [286]. Los círculos de rDNA se acumulan en las células madres conforme envejecen, y se piensa que desencadenan la muerte porque, debido a su abundancia, secuestran factores de transcripción o replicación vitales [287].

La restricción calórica, definida como la limitación en la cantidad de glucosa disponible en el medio de cultivo de la levadura, también produce un alargamiento de la vida media [288]. Se ha sugerido que la restricción calórica activa la enzima Sir2p. En esta ruta, la restricción calórica produce que *S. cerevisiae* abandone la fermentación, e incremente el consumo de oxígeno y la respiración, de modo que obtiene 16 moléculas de ATP, en lugar de 2 [289] por cada molécula de glucosa. El cambio a respiración desencadena una disminución de NADH [290], que es un inhibidor competitivo de Sir2p, lo cual incrementa la actividad de la enzima y produciría el incremento de esperanza de vida observado. Un modelo distinto ha subrayado el papel de la ruta de recuperación de NAD⁺ en la restricción calórica [291]. La enzima Pnc1p que cataliza la formación de NAD⁺ a partir de los productos de su rotura (nicotinamida y ADP-ribosa), se activa en condiciones de limitación calórica y la mutación *PNC1* elimina la capacidad de la restricción calórica de aumentar la esperanza de vida [292]. Más recientemente otro estudio ha descrito que el alargamiento de la esperanza de vida por restricción calórica es independiente de *SIR2* [293]. La conclusión que se extrae de los modelos propuestos, es que el mecanismo por el que la restricción calórica regula la longevidad puede no ser único, y depender de varias rutas

independientes.

5.1.2. El silenciamiento y la acetilación de histonas

En *S. cerevisiae* tres dominios cromosómicos se encuentran sujetos a silenciamiento. Estos son el rDNA, los *loci* HM y las regiones teloméricas [294, 295, 296]. El silenciamiento transcripcional en levadura se considera un modelo de formación y mantenimiento de heterocromatina, caracterizado por una falta de actividad transcripcional, herencia epigenética de los estados transcripcionales y replicación tardía. Además, el DNA silenciado forma estructuras más cerradas, y una cromatina inaccesible a nucleasas y otras enzimas [297, 295]. Uno de los factores reguladores del silenciamiento más estudiados es la HDAC dependiente de NAD⁺ Sir2p [298, 281]. Esta proteína filogenéticamente conservada, funciona junto con la proteína nucleolar Net1 para silenciar el rDNA [299], y en un complejo con Sir3p y Sir4p para silenciar los *loci* de determinación sexual silenciados y los télómeros. Se cree que el establecimiento del silenciamiento y, por tanto, el ensamblamiento de la heterocromatina, se produce en dos pasos [300]. En el primero, la nucleación requiere el reclutamiento de las proteínas SIR (*Silent Information Regulator*) Sir3p y Sir4p hacia las regiones silenciadas. Se sabe que los silenciadores, los télómeros y algunas proteínas asociadas tienen un papel en formar el núcleo a partir del que se extiende la heterocromatina. El segundo paso implica la propagación de la estructura heterocromatínica lo largo de la región.

El uso de la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina ha revelado que las histonas se hallan hipoacetiladas en los dominios heterocromatínicos [273]. Además, el silenciamiento requiere de lisinas particulares en los extremos amino terminales de las histonas H3 y H4. La vinculación entre el silenciamiento y la acetilación de histonas ha sido demostrada ampliamente mediante la identificación de diversas actividades HATs y HDACs implicadas en este fenómeno. Entre ellas se encuentran dos HDACs inhibitoras del silenciamiento; Rpd3p, que desacetila *in vitro* las posiciones H4K5 y H4K12 [301], y Hda1p, que es capaz de

desacetilar las cuatro histonas internas [302]. La HAT Sas2p [68] es otra de las actividades que juega un papel importante en el silenciamiento. Su función fue definida como específica de *locus*, puesto que Sas2p, y sus compañeras Sas4 y Sas5p en el complejo silenciador SAS [303], contribuyen al silenciamiento en el telómero y en el *locus HML*, pero se comportan como reguladores negativos del silenciamiento en el *locus HMR* [304]. Más recientemente, se ha relacionado a Sas2p con el establecimiento de un gradiente de acetilación en la posición H4K16, que protegería la eucromatina del silenciamiento causado por la desacetilación de esta lisina por Sir2p [70]. El complejo HAT B también ha sido relacionado con el silenciamiento telomérico. La subunidad catalítica de HAT B, Hat1p, acetila las posiciones H4K5 y H4K12 cuando se expresa en bacterias, pero la enzima nativa únicamente acetila la posición H4K12 [256]. La especificidad de la enzima recombinante ha hecho que se relacione su actividad con el patrón de acetilación de las histonas sintetizadas en el citoplasma, que se ensamblan en la cromatina tras la replicación. Sin embargo se ha demostrado que HAT B se localiza fundamentalmente en el núcleo, y que está compuesto por las proteínas Hat1p, Hat2p e Hif1p [56, 57]. Precisamente la delección de *HAT1* o *HAT2*, combinada con sustituciones de al menos dos lisinas del extremo amino terminal de H3 por argininas, produce importantes defectos en el silenciamiento telomérico, pero no en el de los *loci HM* [305]. El ensayo de silenciamiento empleado consistió en monitorizar la expresión de *URA3* insertado en el telómero del brazo izquierdo del cromosoma VI en un medio que resulta tóxico para las células cuando se desreprime el silenciamiento telomérico, es decir, cuando se expresa el producto del gen *URA3*. Este ensayo permitió encontrar el primer fenotipo característico para mutaciones de *HAT1* o *HAT2*. No se encontraron efectos sinérgicos en la combinación de las mutaciones *hat1Δhat2Δ* con sustituciones de lisinas de la histona H3, lo que indica que, al menos en su papel en el silenciamiento telomérico, ambas proteínas funcionan juntas [305].

5.2 Materiales y métodos

5.2.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de levadura que se han utilizado para la determinación de la esperanza de vida, los estudios de expresión y los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, se encuentran contenidos en la siguiente tabla y han sido obtenidas de acuerdo con los métodos descrito en el apartado 3.2.5.

Tabla 5.1. Cepas de levadura utilizadas en la parte V de este trabajo.

Nombre	Genotipo	Procedencia
YPH250	<i>MATa, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1-Δ1, his3Δ200, leu2Δ1</i>	M.R. Parthun [256]
BQS1200	YPH250 <i>hat1Δ::KanMX3</i>	O. Antúnez
BQS1205	YPH250 <i>hat2Δ::KanMX3</i>	O. Antúnez
BQS1341	BQS1205 <i>hat1Δ::natMX4</i>	O. Antúnez
BQS1431	YPH250 <i>sir2Δ::natMX4</i>	L. Coloma
BQS1433	BQS1205 <i>sir2Δ::natMX4</i>	L. Coloma
W303-1a	<i>MATa, ade2-1, his3-11,15, leu2-3,112, trp1-Δ1, ura3, can1-100</i>	G. Ammerer
BQS1154	W303-1a <i>HAT1-HA6-TRP1</i>	Ch. Vaughan
BQS1172	BQS1154 <i>hat2Δ::KanMX4</i>	A. Poveda
BQS1184	BQS1154 <i>hif1Δ::natMX4</i>	Este trabajo
BQS1164	W303-1a <i>SIR2-HA6-TRP1</i>	Ch. Vaughan
BQS1173	BQS1164 <i>hat1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1435	BQS1164 <i>hat2Δ::KanMX4</i>	L. Coloma
JRY4470	W303-1a <i>sir2::LEU2</i>	J. Rine [306]
BQS1175	JRY4470 <i>hat1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo

Nombre	Genotipo	Procedencia
UCC1111	<i>MATα</i> , <i>ade2::his3-Δ200</i> , <i>leu2-Δ</i> , <i>lys2-Δ0</i> , <i>met15-Δ0</i> , <i>trp1-Δ63</i> , <i>adh4::URA3-TEL (VII-L)</i> , <i>hhf2-hht2::MET15</i> , <i>hhf1-hht1::LEU2</i> , <i>pRS412(ADE2 CEN ARS)-HHF2-HHT2</i>	M.R. Parthun [305]
UCC1111 pMP14	UCC1111 con plásmido pMP14 (<i>pRS314(TRP)-HHT2-HHF2(K12R)</i>)	M.R. Parthun [305]

5.2.2. Determinación de esperanza de vida

La determinación de la esperanza de vida se llevó a cabo según Kennedy *et al.* [280] y Kim *et al.* [283]. Se empleó un microscopio Nikon provisto de un objetivo 40 \times y un dispositivo micromanipulador incorporado. Se emplearon placas de YPD agar (extracto de levadura 1 %, D-glucosa 2 %, peptona 2 % y agar 1.5 %) para el crecimiento en condiciones normales, y de YPD agar 0.5 % en D-glucosa para las condiciones de restricción calórica. A partir de cultivos en crecimiento logarítmico exponencial (correspondiente a una DO₆₀₀ entre 0.2 y 0.3) se inocularon 100 μ L del cultivo en un extremo de cada placa, y se extendieron para acelerar su secado. Gracias a la división asimétrica de la levadura se pueden tomar las yemas maduras de células en gemación, que se depositan en posiciones aisladas con la ayuda del micromanipulador. Estas células, que no han experimentado ninguna división anteriormente, son las células vírgenes que se utilizaron para iniciar el experimento. Éstas se dispusieron en cinco columnas, cada una de ellas con tres a 4 células, por placa. La posición de cada una de ellas se anotó para el seguimiento de sus divisiones. Las células vírgenes fueron observadas periódicamente para eliminar las subsiguientes células hijas, que representaron el número de replicaciones que sufrió cada célula hasta que cesaron sus divisiones. Las células desechadas fueron depositadas al menos a 0.5 cm de la célula madre original. Las placas fueron comprobadas cada 40 min durante los primeros 3-4 días y cada 70 min posteriormente. Las placas se incubaron a

30°C entre comprobaciones, requiriendo cada comprobación 10 min. El tiempo durante el cual se manipuló cada placa a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) no supone más del 15 % del total del tiempo de generación, lo cual no llega a suponer una diferencia del 2 % en el tiempo de generación medido [307]. El conteo de replicaciones se detuvo durante la noche colocando las placas en contacto con hielo durante 10 min y guardándolas a continuación a 5°C para ralentizar el crecimiento. Estudios previos han demostrado que este tratamiento no produce efectos sobre la esperanza de vida en *S. cerevisiae* [308]. Previamente a la reanudación las mediciones, las placas se atemperaron durante 15 min. Cada experimento se llevó a cabo con un mínimo de 60 células, realizándose al menos dos experimentos independientes por cada cepa estudiada. Las curvas de supervivencia fueron consideradas significativamente diferentes cuando fueron positivas en el test de Wilcoxon (Gehan) implementado en SPSS (SPSS 9.0 para Windows).

5.2.3. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina

Los cultivos de las cepas a estudiar fueron reticulados con formaldehído del mismo modo que se describe en el apartado Entrecruzamiento y lisis celular (pág. 148), salvo que los tiempos de entrecruzamiento fueron de 15 min, y los de incubación con glicina de 5 min. El resto del proceso de inmunoprecipitación fue idéntico al expuesto en el apartado Sonicación e inmunoprecipitación de la cromatina (pág. 149), excepto que el extracto no se clarificó previamente a la inmunoprecipitación. Se emplearon 15 μg de anticuerpo monoclonal α -HA 12CA5 de ratón (Roche), con perlas magnéticas del tipo pan mouse IgG M-450 (Dyna), o bien 12 μg de anticuerpo policlonal de conejo α -H4K12ac (Upstate Biotech), o de anticuerpo de conejo α -H3H14ac (Upstate Biotech) grado ChIP con proteína A Sepharose CL-4B (Amersham Biosciences). Las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo durante 1 h en agitador rotatorio a 4°C. En estos ensayos se tomaron 20 μL del extracto previo a la inmunoprecipitación como extracto celular completo (*WCE*). El material inmunoprecipitado fue liberado en una única elución con 50 μL de tampón de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8.0,

Tabla 5.2. Secuencias de oligonucleótidos empleados en la detección de regiones de cromatina específicas.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tamaño producto (pb)
Ty5-s	GGT ATC GAG ACC GCT GCT GAA TAT G	225
Ty5-a	CAG AGA CCC TTC CAA GCG AAT CAT G	
FUS1-s	CAT GTG GAC CCT TTC AAA AC	280
FUS1-a	TGA TGG CTT ATA TCC TGC TC	
CLB2-s	GGA AAT AGC CGC CAA AAG AC	255
CLB2-a	CTG AAA CTC TAT GCC CAT GC	

EDTA 1 mM, SDS 1 %). El desentrecruzamiento se realizó en este caso adicionando otros 50 μL de tampón de elución e incubando 8 h a 65°C. La purificación del DNA coimmunoprecipitado comenzó con un tratamiento de 1 h a 37°C con 150 μg de proteinasa K para las muestras inmunoprecipitadas, y 100 μg para las muestras de *WCE*. Durante este tiempo se adicionó 30 o 20 μg de glucógeno a las muestras inmunoprecipitadas o al extracto total, respectivamente. Se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo (1:1), una con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Seguidamente se precipitó el DNA durante 15 min con etanol y 0.04 volúmenes de NaCl 5 M. El DNA se resuspendió finalmente en 30 μL de 0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNasa libre de DNasas en TE para su incubación durante 30 min a 37°C. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 1-3 μL de muestra, en volúmenes finales de 25 μL con Taq polimerasa (TaKaRa) y su sistema de tampón correspondiente. Los oligonucleótidos se diseñaron para obtener productos de 140-420 pb (tabla 5.2). Las mezclas de oligonucleótidos se ajustaron empíricamente para obtener señales equilibradas de todos los productos.

El programa de PCR utilizado constó de un ciclo de 4 min a 94°C, 1 min a 53°C y 2 min a 72°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 53°C y 2 min a 72°C, y fue finalizado con una extensión de 7 min a 72°C.

5.2.4. Extracción de RNA total, marcaje radiactivo de muestras e hibridación de macrochips

Las células fueron crecidas una noche a 30°C en 50 mL de medio YPD hasta fase de crecimiento exponencial ($DO_{600}=0.5$). La extracción de RNA se llevó a cabo como se describe por Sherman *et al.* [309], pero empleando un dispositivo multi-muestras automático (Fast Prep TM, BIO 101) para la rotura de las células. El cDNA de levadura se marcó e hibridó en macrochips fabricados en membranas de nailon, como se ha descrito en la literatura anteriormente [232].

5.2.5. Cuantificación de las señales de hibridación y procedimientos de normalización

La adquisición de imágenes se realizó en un *PhosphorImager* FLA-3000 (Fujifilm), y se cuantificó la señal empleando el programa ArrayVision 7.0 (Imaging Research Inc.). Para ello se tomó la densidad de *subtracted Artifact Removed Median* o sARM (a la que se le ha sustraído la señal de fondo correspondiente) como señal. Los niveles de transcritos superiores 1.45 veces al fondo se consideraron datos válidos y se normalizaron. El proceso de normalización y la medida del nivel de significancia para cada marco de lectura abierto lo efectuó el programa ArrayStat (Imaging Research Inc.). Las hibridaciones del cDNA se sometieron a una normalización doble: entre dos condiciones (mutante *vs.* silvestre) y entre réplicas. La reproducibilidad de las réplicas fue comprobada considerando los datos como independientes y permitiendo al programa tomar un número mínimo de réplicas válidas de dos para calcular los valores promedio de cada gen. La prueba estadística test Z para normalizar los datos entre condiciones y el coeficiente de correlación fueron calculados por mediana iterativa y corregidos por la prueba estadística de la tasa de descubrimientos falsos (*False Discovery Rate*), para estimar los errores estadísticos asociados a cada gen. La búsqueda de la Ontología Génica (*Gene Ontology*, *GO*) se realizó en la interfaz web de la Base de Datos de *Saccharomyces* (SGD) (<http://db.yeastgenome.org/cgi->

bin/GO/goTermFinder). Sólo se consideraron categorías significativas aquellas cuyos valores P son inferiores a 10^{-4} . El número de acceso GEO para la serie de quince hibridaciones individuales de macrochips es GSE2434.

5.3 Resultados y discusión¹

5.3.1. La delección del gen *HAT2* produce un incremento en la esperanza de vida

Uno de los objetivos del presente trabajo fue la búsqueda de una función para las proteínas participantes del complejo HAT B. La delección de genes codificantes de componentes de diferentes complejos HAT produce distintos fenotipos y en algunos casos la letalidad (por ejemplo *ESA1*). Sin embargo, en el caso de los genes *HAT1* o *HAT2* no se ha descrito ningún fenotipo directo causado por su mutación. Tan sólo se ha descrito un defecto de silenciamiento telomérico en mutantes *hat1Δ* o *hat2Δ* combinados con determinadas sustituciones de lisinas por argininas en el extremo amino terminal de la histona H3. Dado que existe un claro vínculo entre el silenciamiento transcripcional y la longevidad en *S. cerevisiae*, y teniendo en cuenta los precedentes conocidos de algunas HDACs y su influencia sobre la esperanza de vida [283], procedimos a analizar el efecto de las mutaciones de los genes *HAT1* y *HAT2* sobre la vida media de este organismo. Para ello, se deleccionaron los genes mencionados en un fondo genético S288c (YPH250), y se determinó la vida media tanto de la cepa silvestre como de las cepas mutantes resultantes. En la fig. 5.1 se muestran los resultados obtenidos. Se observa un incremento del 30 % en la vida media del mutante *hat2Δ* (de 13 a 17 generaciones) en comparación con la cepa silvestre, mientras que el mutante *hat1Δ* no muestra cambios significativos en su vida media. El análisis de la vida media del doble mutante *hat1Δhat2Δ* presenta una extensión en la esperanza de vida de 4 generaciones (fig. 5.1B), es decir, un fenotipo similar al del mutante *hat2Δ*. En nuestro laboratorio, también se ha analizado el efecto de la

¹Los resultados obtenidos en el presente apartado son el producto de la colaboración con O. Antúnez y J.E. Pérez-Ortín. En particular, los experimentos sobre el transcriptoma de cepas mutantes fueron realizados por dichos investigadores. Su inclusión en este trabajo obedece a que los experimentos de vida media y de transcriptoma fueron realizados coordinadamente, y en busca de una función alternativa para la proteína Hat2.

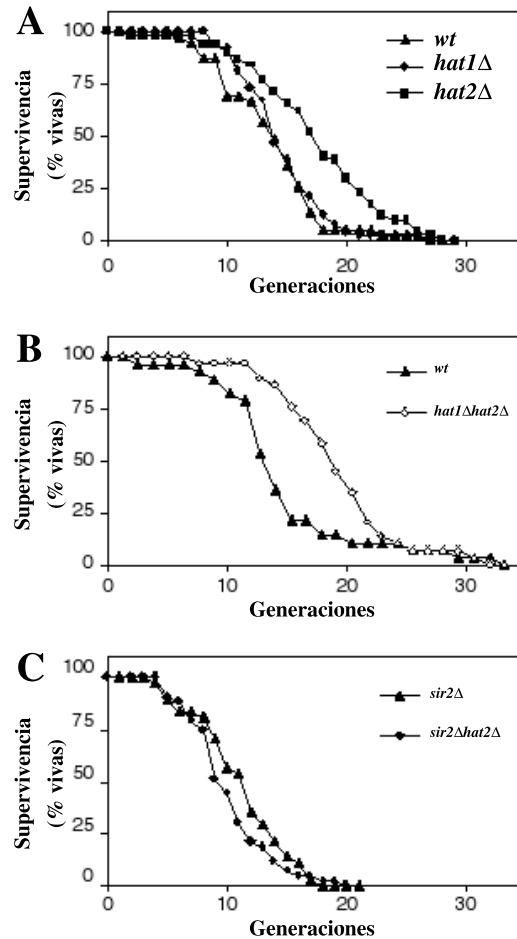


Figura 5.1. Efecto de la delección de genes *HAT* sobre la vida media de la levadura *S. cerevisiae*. La vida media replicativa de los mutantes simples *hat1Δ* (BQS1200) y *hat2Δ* (BQS1205) (A), y de los dobles mutantes *hat1Δhat2Δ* (BQS1341) (B) y *sir2Δhat2Δ* (BQS1433) (C) fue analizada y comparada con la cepa parental silvestre (YPH250) o la cepa *sir2Δ* (BQS1431). El número total de células hijas producidas por 60 células vírgenes fue evaluado para el análisis de cada cepa. El porcentaje de células vivas se representa en función de la edad expresada en generaciones. No hubo diferencias significativas entre las vidas medias de las cepas silvestre y su derivada *hat1Δ*, o entre *sir2Δ* y *sir2Δhat2Δ*. Las diferencias entre la cepa silvestre y *hat2Δ* y entre la silvestre y *hat1Δhat2Δ* fueron significativas ($P < 0.001$).

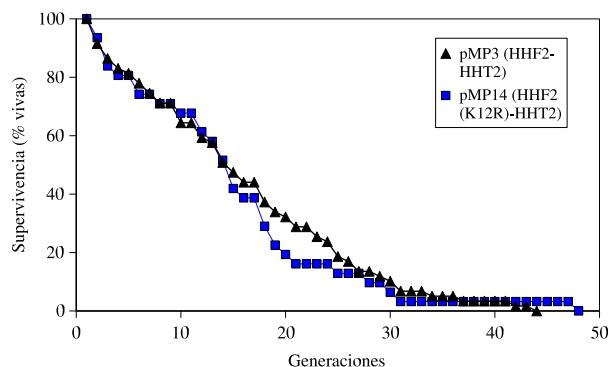


Figura 5.2. La sustitución de la lisina 12 de la histona H4 por una arginina no afecta a la esperanza de vida de *S. cerevisiae*. La vida media de la cepa silvestre UCC1111, y la que contiene la versión de la histona H4 no acetilable en la lisina 12 (UCC1111 pMP14) han sido analizadas por A.B. Ruiz-García.

delección de *HIF1*, otro componente del complejo HAT B, sobre la esperanza de vida de la levadura, no encontrándose en este caso diferencias respecto de la cepa silvestre [310]. Para descartar que las diferencias en la velocidad de división celular afectaran a la determinación de la vida media de las cepas mutantes, se realizaron estudios sobre sus velocidades de crecimiento, sin hallar diferencias significativas respecto de la cepa silvestre.

Dado que el complejo HAT B acetila preferentemente la lisina 12 de H4, a continuación se analizó la vida media de una cepa con un versión de la histona H4 que posee la lisina 12 sustituida por arginina, aminoácido básico pero no acetilable. Los resultados (fig. 5.2) no revelan diferencias entre esta cepa y la cepa silvestre, indicando que el incremento de la vida media observado en las cepas *hat2Δ* o *hat1Δhat2Δ* no se debe a la incapacidad de acetilar la lisina 12 de H4. Este resultado está de acuerdo con que el mutante *hat1Δ*, que afecta a la subunidad catalítica del complejo HAT B, no posea una esperanza de vida alterada. Todos estos datos sugieren que Hat2p pueda desempeñar alguna función en la célula independiente de la actividad HAT del complejo HAT B. Esta es la primera vez que se demuestra la existencia de un fenotipo diferencial directo para una subunidad del complejo HAT B.

Por otro lado, Sir2p previene el envejecimiento prematuro en levadura y se

ha definido como un factor limitante que promueve el silenciamiento en regiones teloméricas y rDNA [90]. Se cree que la cantidad de Sir2p en el nucleolo se incrementa con la edad para compensar parcialmente los elevados niveles de círculos de rDNA extracromosómicos, existiendo una competencia entre el telómero y el nucleolo por Sir2p [311, 312]. Tanto la mutación *sir2Δ* como *hat2Δ* acompañada de sustituciones en el extremo amino terminal de H3, producen efectos similares sobre el silenciamiento telomérico [305]. Sin embargo, sus fenotipos relacionados con el envejecimiento son contrarios, puesto que *sir2Δ* muestra una fuerte disminución de su vida media replicativa [283, 282]. Con el objetivo de estudiar si las funciones que realizan Hat2p y Sir2p implicadas en el mantenimiento de la esperanza de vida, se encontraban relacionadas entre sí, analizamos la vida media replicativa de un doble mutante *sir2Δhat2Δ* en comparación con un simple mutante *sir2Δ*. En este caso observamos que el doble mutante presentó el mismo fenotipo que el mutante *sir2Δ* (fig. 5.1C), demostrando que *SIR2* tiene un efecto epistático dominante sobre *HAT2*.

5.3.2. Análisis de la función de HAT B en la retención de Sir2p en telómero

Sir2p es requerida para la formación de heterocromatina en las regiones silenciadas en levadura (telómero, *loci* HM y rDNA) [90]. Se cree que Sir2p previene el envejecimiento prematuro gracias a su capacidad de establecer estructuras heterocromatínicas, especialmente en el nucleolo, lo que impediría la recombinación homóloga del *locus* altamente repetitivo de rDNA, y por tanto la formación de círculos de rDNA extracromosómicos [279]. Puesto que se ha descrito una redistribución de proteínas SIR del telómero al nucleolo relacionada con la extensión de la esperanza de vida [312], se exploró la posibilidad de que alguna de las proteínas del complejo HAT B participara en este proceso. Aunque la heterocromatina está generalmente hipoacetilada [273], formalmente alguna de las proteínas del complejo HAT B podría tener un papel en la retención de Sir2p en el telómero. Sir2p desacetila específicamente H3K9, H3K14 y H4K16 [281],

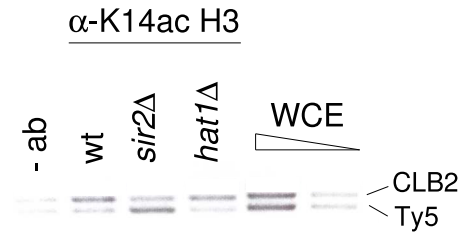


Figura 5.3. **La desacetilación de H3K14 en el telómero es dependiente de Sir2p.** Se muestran los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina con un anticuerpo contra H3K14 acetilada de la cepa silvestre (W303-1a) y las cepas mutantes *sir2Δ* (JRY4470) y *hat1Δ* (BQS1173). El retrotransposón de levadura Ty5 se encuentra en el brazo izquierdo del subtélomero del cromosoma III, y *CLB2* es un control de región no silenciada. Como control, se realizaron PCRs con muestras procedentes de extractos inmunoprecipitados sin anticuerpo (-Ab), o extractos totales de células (WCE).

pero también se ha demostrado que puede desacetilar histonas acetiladas por Esa1p o Hat1p *in vitro* [298]. Para determinar si las lisinas sustrato de Sir2p y Hat1p se encontraban relacionadas, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina utilizando anticuerpos contra H4K12 acetilada (la principal diana de HAT B) y contra H3K14 (la principal diana de Sir2p). Para comprobar el estado de acetilación de las posiciones H3K14 y H4K12 se amplificó el DNA correspondiente a una región telomérica (retrotransposón Ty5 integrado en una localización subtelmérica) y a regiones control de promotores de genes no telomérico que no sufren silenciamiento heterocromatínico (*CLB2* y *FUS1*).

La fig. 5.3 muestra los resultados de la inmunoprecipitación con un anticuerpo contra H3K14 acetilada. Como era de esperar, la delección de *SIR2* produce un incremento de la acetilación de H3K14 en los telómeros, indicando que esta desacetilasa está implicada en la desacetilación de esta posición *in vivo*. En la misma fig. 5.3 se puede observar que la delección de *HAT1* no parece afectar al estado de acetilación de H3K14. Por otro lado, la inmunoprecipitación con un anticuerpo contra la H4K12 acetilada en una cepa con el gen *SIR2* deleccionado (fig. 5.4A y B) demuestra que Sir2p participa en el mantenimiento del estado hipocetilado de este residuo en el telómero *in vivo*. La capacidad de Sir2p para desacetilar esta posición *in vivo* no había sido descrita previamente. Además,

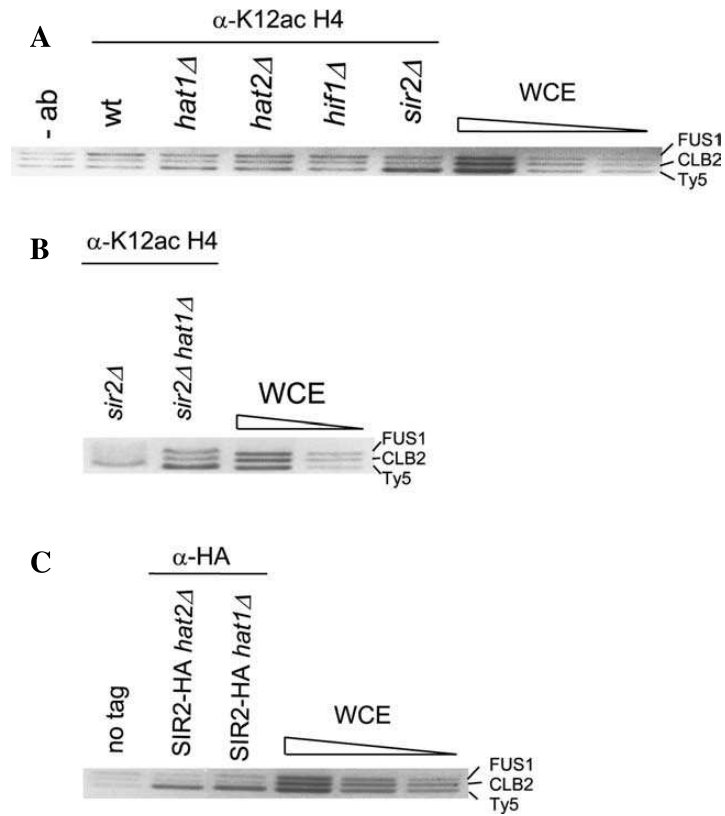


Figura 5.4. **Sir2p** está implicada en la hipoacetilación de H4K12 en telómeros. (A) y (B) Se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina de las cepas silvestre (W303-1a), y mutantes *hat1* Δ (BQS1173), *hat2* Δ (BQS1172), *hif1* Δ (BQS1184), *sir2* Δ (JRY4470) y *sir2* Δ *hat1* Δ (BQS298), empleando un anticuerpo contra la H4K12 acetilada. Los controles son los mismos que los empleados en la fig. 5.3, junto con *FUS1*. (C) Extractos de cepas con Sir2p etiquetada con epítomos HA en mutantes *hat1* Δ (BQS1173) y *hat2* Δ (BQS1439), fueron inmunoprecipitados con anticuerpo α -HA. Como control se realizaron PCRs de inmunoprecipitados de extractos de cepas sin etiqueta, o de extractos totales de células (WCE)

la delección de los genes codificantes de las proteínas que forman el complejo HAT B (*HAT1*, *HAT2* e *HIF1*) no produce ningún efecto en el estado de acetilación de H4K12 en regiones teloméricas (fig. 5.4A). Asimismo, el doble mutante *sir2Δhat1Δ* muestra niveles de acetilación en H4K12 en el telómero idénticos a los del simple mutante *sir2Δ* (fig. 5.4B), indicando que no es HAT B la responsable de esta acetilación. Formalmente restaba la posibilidad de que el complejo HAT B retuviera a Sir2p en *loci* teloméricos a través de un mecanismo no relacionado con su actividad HAT. Por ello se analizó la localización de Sir2p en regiones subtelo méricas en cepas con delecciones de varios de los genes que codifican para componentes del complejo HAT B. Los resultados muestran que ni la ausencia de Hat1p ni la de Hat2p producen una disminución de la unión de Sir2p al telómero (fig. 5.4C). Todos estos datos apuntan a que no existe solapamiento en los lugares de actuación de HAT B y Sir2p en los telómeros, ni la unión de Sir2p a regiones subtelo méricas es mediada por Hat2p, lo que descarta que el incremento de esperanza de vida de la cepa *hat2Δ* esté causado por una mayor disponibilidad de Sir2p en el nucleolo en este mutante. En todo caso, el incremento de la esperanza de vida de la cepa *hat2Δ* representa el primer fenotipo directo puesto en evidencia para un componente del complejo HAT B, así como la única característica diferencial entre Hat1p y Hat2p.

5.3.3. Efectos de la delección de los genes *HAT1* y *HAT2* en el perfil transcripcional

Con objeto de analizar las posibles funciones que pudiera ejercer Hat2p de forma independiente a Hat1p se procedió a realizar un análisis de expresión de los mutantes *hat1Δ*, *hat2Δ* y del doble mutante *hat1Δhat2Δ*, con la esperanza de que las diferencias funcionales se reflejaran en el perfil transcripcional.

Los transcriptomas se obtuvieron para cada cepa a partir de 3 cultivos en YPD en fase de crecimiento exponencial, y se comprobó que diferentes colonias de los mutantes de delección generan los mismos resultados.

En una primera observación los niveles de mRNA de los mutantes *hat1Δ* o *hat2Δ* no resultan muy distintos de los niveles de la cepa silvestre, ya que sólo se sobreexpresan o infraexpresan del orden de menos del 2 % de los genes (fig. 5.5 A y B). Sin embargo, se detecta una diferencia mayor entre ambos mutantes simples cuando se representa *hat2Δ* frente a *hat1Δ*, con un número de genes con expresión diferencial entre ambas cepas unas cuatro veces superior a la comparación de los simples mutantes con su silvestre, lo cual indica que éstos se diferencian más entre ellos que cada uno frente a la cepa silvestre (fig. 5.5 C).

Con el fin de determinar si las diferencias entre los perfiles transcripcionales de ambos mutantes eran el reflejo de la regulación de genes implicados en procesos celulares específicos, se realizó una búsqueda GO. Muchos de los genes expresados diferencialmente en los mutantes *hat1Δ* y *hat2Δ* (*hat2Δ/hat1Δ*) corresponden a categorías GO enriquecidas específicamente (tabla 5.3).

Es importante reseñar que, en una comparación entre dos condiciones de crecimiento o entre dos cepas de genotipo distinto, las categorías GO dan información sobre la cantidad de genes de una categoría o grupo funcional que se ven afectados de forma diferencial. Los genes de un grupo que se define como sobreexpresado o enriquecido, contienen niveles de mRNA superiores a los de la condición control o genotipo de referencia (generalmente silvestre) y los genes de un grupo que presenten niveles de mRNA inferiores a los de la condición control o genotipo de referencia se engloban en el término de grupo o categoría reprimida o enriquecida. Esto implica que cuanto mayor sea el número de genes pertenecientes a una categoría que se comporten del mismo modo frente a la condición control o genotipo de referencia, mayor será la seguridad (expresada en *P*) de que estos genes se estén viendo afectados en su conjunto por la mutación o condición de nuestro experimento, y por tanto serán los correspondientes a la categoría que la Ontología Génica determinará que estadísticamente se ha visto más alterada. Sin embargo, una inspección detallada de los niveles de expresión de los genes que muestran cambios significativos entre ambos mutantes (*hat2Δ/hat1Δ*) revela que muchos de ellos se comportan de manera similar en una comparación con la cepa silvestre (*hat1Δ/wt* o *hat2Δ/wt*)². El hecho de

²<http://scisie.uv.es/chipsdna>

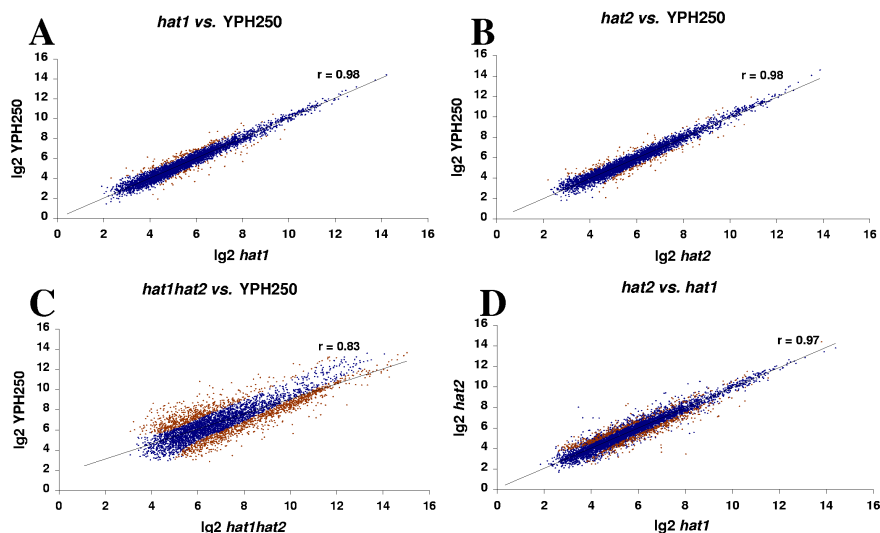


Figura 5.5. **Comparación de los transcriptomas de los mutantes *hat*.** Los transcriptomas de los mutantes (A) *hat1* Δ (BQS1200), (B) *hat2* Δ (BQS1205) y (D) *hat1* Δ *hat2* Δ (BQS1341) fueron analizados y comparados respecto del transcriptoma de la cepa silvestre (YPH250). Cada panel contiene la representación de los datos significativos de expresión de los genes de las dos cepas de levadura. Las gráficas están en escala logarítmica y la correlación de Pearson de la regresión lineal se muestra en cada una. Los genes en rojo son aquellos expresados diferencialmente entre ambas cepas. Los números en ambos lados de la nube de puntos representan los genes sobrerregulados (bajo la nube) o infrarregulados (sobre la nube) en la cepa representada en abscisas respecto de la cepa representada en ordenadas.

que los niveles de expresión de ambos mutantes simples frente a los de la cepa silvestre (*hat1* Δ /*wt* o *hat2* Δ /*wt*) presenten una variación menor que la de uno frente a otro, causa que no se detecten muchas categorías GO estadísticamente enriquecidas para el mutante *hat1* Δ (*hat2* Δ /*wt*), y ninguna para el mutante *hat2* Δ (*hat2* Δ /*wt*).

No obstante, en el caso del doble mutante *hat2* Δ *hat1* Δ , éste presenta grandes cambios en el transcriptoma respecto del de la cepa silvestre. Hasta un 30 % de los genes se expresan diferencialmente según el análisis estadístico. Las categorías GO de los genes sobreexpresados e infraexpresados en el doble mutante guardan mayor parecido a los del mutante *hat1* Δ que a los del mutante *hat2* Δ , pero las variaciones en el nivel de expresión son más acusadas y el número de

Tabla 5.3. **Resumen de perfiles transcriptómicos comparativos.** Sólo se muestran las categorías GO significativas ($P < 10^{-4}$) y el número de genes para cada categoría. La comparación de *hat2Δ* frente a la cepa silvestre (YPH250) no mostró categorías significativas.

Genes sobrerregulados			Genes infrarregulados		
Categoría GO	<i>P</i>	#genes	Categoría GO	<i>P</i>	#genes
<i>hat1Δ</i> /YPH250					
Plegamiento de proteína	9.46×10^{-6}	6	Biogénesis de ribosomas	6.39×10^{-15}	27
Transporte de poliamina	7.18×10^{-5}	3			
<i>hat1Δhat2Δ</i> /YPH250					
Metabolismo de aminoácidos	2.93×10^{-10}	64	Biogénesis de ribosomas	1.37×10^{-20}	80
Metabolismo de alcoholes	5.27×10^{-7}	35	Crecimiento celular	9.61×10^{-9}	300
Glicolisis	1.12×10^{-6}	14			
Transporte	2.79×10^{-6}	179			
<i>hat2Δ/hat1Δ</i>					
Biogénesis de ribosomas	2.92×10^{-49}	93	Plegamiento de proteínas	2.1×10^{-8}	15
Crecimiento celular	3.25×10^{-8}	181	Rutas energéticas	7.1×10^{-8}	31

genes afectados es mayor en el doble mutante. Es decir, la delección *hat2Δ* en una cepa *hat1Δ* potencia aún más el fenotipo transcripcional del simple mutante *hat1Δ*.

En resumen, los mutantes *hat1Δ* y *hat2Δ* presentan un fenotipo transcripcional claramente distinto cuando se encuentran en condiciones de crecimiento exponencial en medio rico. Esto sugiere que ambas subunidades del complejo HAT B no se encuentran comprometidas en la ejecución de idénticas funciones.

5.3.4. Funciones de Hat2p independientes del complejo HAT B

La única función conocida de Hat2p antes de la realización de este trabajo, consiste en potenciar la actividad HAT de Hat1p. Sin embargo, los resultados obtenidos en cuanto a esperanza de vida o transcriptomas en mutantes apuntan hacia la posibilidad de que Hat2p esté implicada en procesos adicionales independientes de Hat1p. Hat2p debe poseer funciones adicionales porque si únicamente facilitara la acetilación por Hat1p, primero, los transcriptomas de ambos mutantes simples *hat1Δ* y *hat2Δ* serían similares, y en segundo lugar, la muta-

ción de *hat2Δ* no modificaría el transcriptoma de *hat1Δ* en el doble mutante. Por otro lado, las diferencias observadas entre los transcriptomas de *hat2Δ* y el doble mutante *hat1Δhat2Δ*, entre las que se advierte que los genes de rutas energéticas están infrarreguladas en el mutante *hat2Δ* y sobrerregulados en el doble mutante *hat1Δhat2Δ* (tabla 5.3), sugieren que Hat2p podría actuar regulando negativamente la actividad de Hat1p (fig 5.6). La comparación entre transcriptomas de los simples mutantes apoyaría esta última hipótesis. Que sólo Hat2p afecte a la vida media indicaría que la función de Hat2p independiente de Hat1p no requiere de la actividad HAT del complejo HAT B.

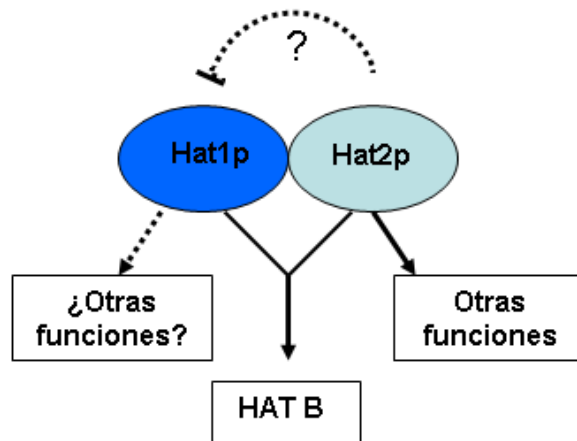


Figura 5.6. **Modelo propuesto para las relaciones funcionales entre Hat1p y Hat2p.** Las proteínas Hat1, Hat2 e Hif1 interactúan físicamente y funcionalmente, formando el complejo HAT B. El hecho de que Hat2p, pero no Hat1p, module la longevidad sugiere que Hat2p puede tener funciones adicionales en la célula. Por otro lado, los análisis del transcriptoma de los mutantes *hat* también sugieren un efecto regulador negativo de Hat2p sobre Hat1p.

Otra posibilidad es que el incremento de esperanza de vida de la cepa *hat2Δ* se deba a efectos sobre el silenciamiento heterocromatínico. Sin embargo, las mutaciones de *HAT1* y *HAT2* combinadas con mutaciones de residuos específicos de lisina en histona H3 producen el mismo defecto de silenciamiento, por lo que no existe un comportamiento diferencial entre Hat1p y Hat2p que explique el aumento de la esperanza de vida.

Anteriormente se ha sugerido que la redistribución de Sir2p entre telómeros y rDNA ha sido considerada como posible causa de la mayor esperanza de vida del mutante *hat2Δ* pero, como se ha visto, no se ha encontrado ninguna relación. Al no existir tampoco una vinculación entre los genes cuya expresión es afectada por las mutaciones *HAT* y la localización subteloamérica de Sir2p, resulta poco probable que la función específica de Hat2p esté implicada directamente con el silenciamiento de la cromatina. Sin embargo, el efecto epistático de *SIR2* sobre *HAT2* sugiere que Hat2p afecta a la esperanza de vida dentro de la misma ruta, pero en una etapa posterior a la que afecta Sir2p.

Un mecanismo alternativo en el que podría participar Hat2p en el envejecimiento es en restricción calórica. Se sabe que el transcriptoma de un mutante *sir2Δ* es el opuesto al de restricción calórica [287]. Aunque la forma exacta en la que Sir2p promueve la extensión de la esperanza de vida en condiciones de restricción calórica es controvertida [281, 287, 292], se cree que la restricción calórica produce cambios en la actividad de Sir2p, que a su vez afectan a la vida media. Si la mutación *hat2Δ* causara un fenotipo transcriptómico opuesto al de *sir2Δ*, es decir, un fenotipo de restricción calórica, esto indicaría la implicación de Hat2p en esta ruta molecular. Sin embargo, no se ha encontrado similitud alguna entre el transcriptoma de *hat2Δ* y el fenotipo de restricción calórica. Otra posibilidad sería que la mutación *hat2Δ* cause un estrés suave endógeno que es detectado por Sir2p.

En conclusión, a pesar de que las proteínas Hat1 y Hat2 participan en procesos comunes como la acetilación de H4K12 en histonas libres, nuestros resultados sugieren que podrían desempeñar otros papeles en la fisiología celular. Esto representaría un ejemplo más de complejos HAT compuestos por subunidades que participan en distintas funciones. Es el caso, por ejemplo, de la proteína Taf14p de NuA3. Como ya se ha comentado, esta proteína participa en otros cuatro complejos con distintas funciones: los complejos remodeladores de la cromatina (INO80 y SWI/SNF), y los factores transcripcionales basales TFIID y TFIIF. Así, HAT B también sería un complejo formado por subunidades implicadas en diversas funciones.

Parte 6

Conclusiones finales

1- La introducción de una etapa cromatográfica adicional, y la ampliación del rango del gradiente salino en la cromatografía de intercambio aniónico, permite detectar con el sistema desarrollado en nuestro laboratorio, dos actividades HATs específicas principalmente por la histona H3 libre y nucleosomal en la región de alta fuerza iónica: HAT A4-I y HAT A4-II.

2- El complejo HAT A4-I mayoritario posee una masa molecular aproximada de 200 kDa y es capaz de acetilar las lisinas 9, 14 y 18 de la histona H3. El complejo HAT A4-II posee una masa molecular aproximada de 2 MDa y su especificidad es idéntica a la de A4-I, salvo en que acetila con mayor intensidad la lisina 18 que la 9 o la 14 de H3.

3- La acetilación de la histona libre H3 en la región de elución de HAT A4-I depende de Sas3p, y de otra actividad que coeluye con este complejo (A4-I-Gcn5-dep), mientras que la acetilación sobre H3 nucleosomal por A4-I parece depender exclusivamente de Sas3p.

4- La purificación de las proteínas que presumiblemente forman el complejo HAT A4-I (Sas3p, Taf14p e Yng1p) mediante TAP, apunta a que este complejo está formado por Sas3p, Taf14p, Yng1p, Nto1p e Ylr455wp.

5- La acetilación de H3 libre y nucleosomal por parte de HAT A4-II depende absolutamente de Gcn5p. También depende de Gcn5p el complejo A4-I-Gcn5-dep, que coeluye con A4-I, y es responsable de la acetilación sobre H3 libre en cepas *sas3Δ*.

6- El complejo HAT A4-I-Gcn5-dep comparte características con el complejo SALSA/SLIK (Gcn5p como subunidad catalítica, Spt7p truncada y presencia de Rtg2p), mientras que el complejo A4-II comparte algunas con SAGA, pero difiere en aspectos importantes, como no poseer una actividad robusta sobre la histona H3 nucleosomal y contener Rtg2p.

7- El complejo HAT A1 muestra una actividad preferencial sobre H4 y H3, y en menor medida por H2A y H2B libres, que depende de la presencia de la proteína Esa1 funcional. Además, una actividad no caracterizada coeluye con

A1 y posee actividad específica por un producto de degradación de histonas.

8- Los genes *ELP3*, *HPA2*, *SAS2* y *NUT1* no parecen codificar subunidades catalíticas HAT de los complejos identificados en *S. cerevisiae* en nuestro laboratorio.

9- Se ha desarrollado un método de ChIP-chip basado en la hibridación del material inmunoprecipitado en macrochips de ORFs de *S. cerevisiae*, que permite la detección de proteínas que se asocian a regiones codificantes e intergénicas, si bien en este último caso la probabilidad de detección disminuye al aumentar la distancia entre el lugar de asociación de la proteína y la ORF próxima.

10- Cuando las HATs Gcn5p, Elp3p, Hpa2p, Sas3p, Sas2p y Nut1p, se agrupan según las regiones genómicas a las que se unen, se observa que Gcn5p y Sas3p son las más próximas, existiendo una correlación entre la asociación de Sas3p y Gcn5p al genoma de levadura.

11- Las principales dianas de Sas3p y Gcn5p son genes activamente transcritos, como los ribosomales, lo que indica que ambas HATs se comportan de manera similar en cuanto a su asociación a cromatina. Además tanto Sas3p, como Gcn5p, presentan una tendencia a unirse con mayor intensidad a genes de mayor tasa de transcripción, lo que los clasifica como reguladores transcripcionales generales.

12- Las regiones del genoma a las que se unen Sas3p y Gcn5p se hallan correlacionadas positivamente con el nivel de acetilación de la lisina 14 de la histona H3. La delección de *GCN5* provoca que la acetilación de esa posición disminuya especialmente en las regiones en las que Gcn5p se asocia en la cepa silvestre, indicando que Gcn5p es directamente responsable de esa acetilación. Por el contrario, la delección de *SAS3* incrementa el nivel de acetilación en la lisina 14 de H3 de las regiones a las que se asocia en la cepa silvestre.

13- Sas2p, Nut1p y Hpa2p no muestran características propias de los reguladores transcripcionales generales. Estas tres proteínas se asocian a regiones del genoma empobrecidas en lisina 14 de la histona H3 acetilada. La modesta corre-

lación positiva de la asociación de Elp3p con la actividad génica indica que Elp3 se comporta como un regulador general débil, aunque su asociación tampoco está relacionada con la acetilación de la lisina 14 de la histona H3.

14- La proteína Hat2, perteneciente al complejo HAT B, está relacionada con el mantenimiento de la longevidad de *S. cerevisiae*. La delección de *HAT2* provoca un alargamiento de la vida media de la célula respecto de la cepa silvestre. Esta mutación no puede compensar la disminución de la esperanza de vida causada por la mutación de *SIR2*. Sin embargo, la delección de *HAT1*, subunidad catalítica de Hat2p, no afecta a la longevidad de *S. cerevisiae*.

15- Las proteínas del complejo HAT B (Hat1p, Hat2p e Hifp) no son responsables de la acetilación de la lisina 12 de la histona H4 de las regiones teloméricas asociadas a Sir2p. La unión de la HDAC Sir2p al telómero tampoco depende de Hat1p o Hat2p.

16- La proteína Hat2p desempeña funciones adicionales a las del complejo HAT B. Estas funciones implican al menos la regulación de la longevidad en *S. cerevisiae*, y también podría regular negativamente la función de Hat1p, según los datos transcriptómicos de los mutantes *hat1Δ*, *hat2Δ* y *hat1Δhat2Δ*.

Bibliografía

- [1] K. Luger, T. J. Rechsteiner, A. J. Flaus, M. M. Waye, y T. J. Richmond. 1997. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J. Mol. Biol.* **272**:301–311.
- [2] Y. Tsunaka, N. Kajimura, S.-I. Tate, y K. Morikawa. 2005. Alteration of the nucleosomal DNA path in the crystal structure of a human nucleosome core particle. *Nucleic Acids Res.* **33**:3424–3434.
- [3] A. Vaquero, A. Loyola, y D. Reinberg. 2003. The constantly changing face of chromatin. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **2003**:RE4–RE4.
- [4] F. Thoma, T. Koller, y A. Klug. 1979. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell. Biol.* **83**:403–427.
- [5] C. L. Woodcock, S. A. Grigoryev, R. A. Horowitz, y N. Whitaker. 1993. A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:9021–9025.
- [6] H. Tagami, D. Ray-Gallet, G. Almouzni, y Y. Nakatani. 2004. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**:51–61.

- [7] J. Recht, B. Dunn, A. Raff, y M. A. Osley. 1996. Functional analysis of histones H2A and H2B in transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:2545–2553.
- [8] M. Harata, Y. Oma, S. Mizuno, Y. W. Jiang, D. J. Stillman, y U. Wintersberger. 1999. The nuclear actin-related protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Act3p/Arp4, interacts with core histones. *Mol. Biol. Cell.* **10**:2595–2605.
- [9] G. Leroy, G. Orphanides, W. S. Lane, y D. Reinberg. 1998. Requirement of RSF and FACT for transcription of chromatin templates in vitro. *Science* **282**:1900–1904.
- [10] A. Loyola, G. Leroy, Y. H. Wang, y D. Reinberg. 2001. Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes Dev.* **15**:2837–2851.
- [11] J. C. Vary, V. K. Gangaraju, J. Qin, C. C. Landel, C. Kooperberg, B. Bartholomew, y T. Tsukiyama. 2003. Yeast Isw1p forms two separable complexes in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **23**:80–91.
- [12] G. Mizuguchi, X. Shen, J. Landry, W.-H. Wu, S. Sen, y C. Wu. 2004. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**:343–348.
- [13] G. J. Narlikar, H.-Y. Fan, y R. E. Kingston. 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**:475–487.
- [14] D. F. V. Corona y J. W. Tamkun. 2004. Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta* **1677**:113–119.
- [15] T. G. Fazio, C. Kooperberg, J. P. Goldmark, C. Neal, R. Basom, J. Dellow, y T. Tsukiyama. 2001. Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-

- Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **21**:6450–6460.
- [16] Z. Zhang y J. C. Reese. 2004. Ssn6-Tup1 requires the ISW2 complex to position nucleosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* **23**:2246–2257.
- [17] J.-L. Moreau, M. Lee, N. Mahachi, J. Vary, J. Mellor, T. Tsukiyama, y C. R. Goding. 2003. Regulated displacement of TBP from the PHO8 promoter in vivo requires Cbf1 and the Isw1 chromatin remodeling complex. *Mol. Cell* **11**:1609–1620.
- [18] C. Costanzi y J. R. Pehrson. 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**:599–601.
- [19] R. T. Kamakaka y S. Biggins. 2005. Histone variants: deviants?. *Genes Dev.* **19**:295–310.
- [20] K. Ahmad y S. Henikoff. 2002. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* **9**:1191–1200.
- [21] M. D. Meneghini, M. Wu, y H. D. Madhani. 2003. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* **112**:725–736.
- [22] N. J. Krogan, M.-C. Keogh, N. Datta, C. Sawa, O. W. Ryan, H. Ding, R. A. Haw, J. Pootoolal, A. Tong, V. Canadien, D. P. Richards, X. Wu, A. Emili, T. R. Hughes, S. Buratowski, y J. F. Greenblatt. 2003. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol. Cell* **12**:1565–1576.
- [23] M. S. Kobor, S. Venkatasubrahmanyam, M. D. Meneghini, J. W. Gin, J. L. Jennings, A. J. Link, H. D. Madhani, y J. Rine. 2004. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS. Biol.* **2**:E131–E131.

- [24] S. A. Brown, A. N. Imbalzano, y R. E. Kingston. 1996. Activator-dependent regulation of transcriptional pausing on nucleosomal templates. *Genes Dev.* **10**:1479–1490.
- [25] C. Alén, N. A. Kent, H. S. Jones, J. O'sullivan, A. Aranda, y N. J. Proudfoot. 2002. A role for chromatin remodeling in transcriptional termination by RNA polymerase II. *Mol. Cell* **10**:1441–1452.
- [26] L. L. Corey, C. S. Weirich, I. J. Benjamin, y R. E. Kingston. 2003. Localized recruitment of a chromatin-remodeling activity by an activator in vivo drives transcriptional elongation. *Genes Dev.* **17**:1392–1401.
- [27] A. Morillon, N. Karabetsou, J. O'sullivan, N. Kent, N. Proudfoot, y J. Mellor. 2003. Isw1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II. *Cell* **115**:425–435.
- [28] B. R. Cairns. 2005. Chromatin remodeling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**:185–190.
- [29] J. A. Downs, S. Allard, O. Jobin-Robitaille, A. Javaheri, A. Auger, N. Bouchard, S. J. Kron, S. P. Jackson, y J. Côté. 2004. Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol. Cell* **16**:979–990.
- [30] A. J. Morrison, J. Highland, N. J. Krogan, A. Arbel-Eden, J. F. Greenblatt, J. E. Haber, y X. Shen. 2004. INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* **119**:767–775.
- [31] H. Van Attikum, O. Fritsch, B. Hohn, y S. M. Gasser. 2004. Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* **119**:777–788.

- [32] E. Y. Shim, J.-L. Ma, J.-H. Oum, Y. Yanez, y S. E. Lee. 2005. The yeast chromatin remodeler RSC complex facilitates end joining repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* **25**:3934–3944.
- [33] M.-A. Hakimi, D. A. Bochar, J. A. Schmiesing, Y. Dong, O. G. Barak, D. W. Speicher, K. Yokomori, y R. Shiekhattar. 2002. A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes. *Nature* **418**:994–998.
- [34] K. K. Baetz, N. J. Krogan, A. Emili, J. Greenblatt, y P. Hieter. 2004. The ctf13-30/CTF13 genomic haploinsufficiency modifier screen identifies the yeast chromatin remodeling complex RSC, which is required for the establishment of sister chromatid cohesion. *Mol. Cell. Biol.* **24**:1232–1244.
- [35] J. Huang, J.-M. Hsu, y B. C. Laurent. 2004. The RSC nucleosome-remodeling complex is required for Cohesin's association with chromosome arms. *Mol. Cell* **13**:739–750.
- [36] C. L. Peterson y M.-A. Laniel. 2004. Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* **14**:R546–R551.
- [37] M. S. Cosgrove, J. D. Boeke, y C. Wolberger. 2004. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:1037–1043.
- [38] M. Lachner, D. O'carroll, S. Rea, K. Mechtler, y T. Jenuwein. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**:116–120.
- [39] A. J. Bannister, P. Zegerman, J. F. Partridge, E. A. Miska, J. O. Thomas, R. C. Allshire, y T. Kouzarides. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**:120–124.
- [40] M. Braunstein, A. B. Rose, S. G. Holmes, C. D. Allis, y J. R. Broach. 1993. Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.* **7**:592–604.

- [41] M. Braunstein, R. E. Sobel, C. D. Allis, B. M. Turner, y J. R. Broach. 1996. Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol. Cell. Biol.* **16**:4349–4356.
- [42] B. D. Strahl y C. D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**:41–45.
- [43] B. M. Turner. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**:285–291.
- [44] G. Legube y D. Trouche. 2003. Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO Rep.* **4**:944–947.
- [45] T. A. Volpe, C. Kidner, I. M. Hall, G. Teng, S. I. S. Grewal, y R. A. Martienssen. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**:1833–1837.
- [46] D. Y. Lee, J. J. Hayes, D. Pruss, y A. P. Wolffe. 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**:73–84.
- [47] C. Tse, T. Sera, A. P. Wolffe, y J. C. Hansen. 1998. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* **18**:4629–4638.
- [48] P. A. Wade. 2001. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum. Mol. Genet.* **10**:693–698.
- [49] M. J. Carrozza, R. T. Utley, J. L. Workman, y J. Côté. 2003. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* **19**:321–329.
- [50] S. K. Kurdistani y M. Grunstein. 2003. In vivo protein-protein and protein-DNA crosslinking for genomewide binding microarray. *Methods* **31**:90–95.

- [51] D. Kadosh y K. Struhl. 1998. Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **18**:5121–5127.
- [52] M. H. Kuo, E. Vom Baur, K. Struhl, y C. D. Allis. 2000. Gcn4 activator targets Gcn5 histone acetyltransferase to specific promoters independently of transcription. *Mol. Cell* **6**:1309–1320.
- [53] M. Vogelauer, J. Wu, N. Suka, y M. Grunstein. 2000. Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* **408**:495–498.
- [54] J. H. Waterborg. 2002. Dynamics of histone acetylation in vivo. A function for acetylation turnover?. *Biochem. Cell. Biol.* **80**:363–378.
- [55] G. López-Rodas, V. Tordera, M. M. Sánchez Del Pino, y L. Franco. 1989. Yeast contains multiple forms of histone acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **264**:19028–19033.
- [56] A. Poveda, M. Pamblanco, S. Tafrov, V. Tordera, R. Sternglanz, y R. Sendra. 2004. Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus. *J. Biol. Chem.* **279**:16033–16043.
- [57] X. Ai y M. R. Parthun. 2004. The nuclear Hat1p/Hat2p complex: a molecular link between type B histone acetyltransferases and chromatin assembly. *Mol. Cell* **14**:195–205.
- [58] A. R. Sklenar y M. R. Parthun. 2004. Characterization of yeast histone H3-specific type B histone acetyltransferases identifies an ADA2-independent Gcn5p activity. *BMC Biochem.* **5**:11–11.
- [59] S. Y. Roth, J. M. Denu, y C. D. Allis. 2001. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:81–120.
- [60] P. A. Grant, L. Duggan, J. Côté, S. M. Roberts, J. E. Brownell, R. Candau, R. Ohba, T. Owen-Hughes, C. D. Allis, F. Winston, S. L. Berger, y J. L. Workman. 1997. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to

- acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* **11**:1640–1650.
- [61] D. E. Sterner, R. Belotserkovskaya, y S. L. Berger. 2002. SALSA, a variant of yeast SAGA, contains truncated Spt7, which correlates with activated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:11622–11627.
- [62] M. G. Pray-Grant, D. Schieltz, S. J. McMahon, J. M. Wood, E. L. Kennedy, R. G. Cook, J. L. Workman, J. R. Yates, y P. A. Grant. 2002. The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway. *Mol. Cell. Biol.* **22**:8774–8786.
- [63] R. T. Utley, K. Ikeda, P. A. Grant, J. Côté, D. J. Steger, A. Eberharter, S. John, y J. L. Workman. 1998. Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* **394**:498–502.
- [64] A. R. Ricci, J. Genereaux, y C. J. Brandl. 2002. Components of the SAGA histone acetyltransferase complex are required for repressed transcription of ARG1 in rich medium. *Mol. Cell. Biol.* **22**:4033–4042.
- [65] E. Martinez, V. B. Palhan, A. Tjernberg, E. S. Lymar, A. M. Gamper, T. K. Kundu, B. T. Chait, y R. G. Roeder. 2001. Human STAGA complex is a chromatin-acetylation transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **21**:6782–6795.
- [66] M. Brand, J. G. Moggs, M. Oulad-Abdelghani, F. Lejeune, F. J. Dilworth, J. Stevenin, G. Almouzni, y L. Tora. 2001. UV-damaged DNA-binding protein in the TFTC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation. *Embo J.* **20**:3187–3196.
- [67] S. Qin y M. R. Parthun. 2006. Recruitment of the type B histone acetyltransferase Hat1p to chromatin is linked to DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* **26**:3649–3658.

- [68] C. Reifsnyder, J. Lowell, A. Clarke, y L. Pillus. 1996. Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases. *Nat. Genet.* **14**:42–49.
- [69] N. Suka, K. Luo, y M. Grunstein. 2002. Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat. Genet.* **32**:378–383.
- [70] A. Kimura, T. Umehara, y M. Horikoshi. 2002. Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing. *Nat. Genet.* **32**:370–377.
- [71] A. Grienenberger, B. Miotto, T. Sagnier, G. Cavalli, V. Schramke, V. Geli, M. C. Mariol, H. Berenger, Y. Graba, y J. Pradel. 2002. The MYST domain acetyltransferase Chameau functions in epigenetic mechanisms of transcriptional repression. *Curr. Biol.* **12**:762–766.
- [72] C. E. Brown, L. Howe, K. Sousa, S. C. Alley, M. J. Carrozza, S. Tan, y J. L. Workman. 2001. Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science* **292**:2333–2337.
- [73] J. L. Reid, V. R. Iyer, P. O. Brown, y K. Struhl. 2000. Coordinate regulation of yeast ribosomal protein genes is associated with targeted recruitment of Esa1 histone acetylase. *Mol. Cell* **6**:1297–1307.
- [74] S. John, L. Howe, S. T. Tafrov, P. A. Grant, R. Sternglanz, y J. L. Workman. 2000. The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a yTAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex. *Genes Dev.* **14**:1196–1208.
- [75] I. Kitabayashi, Y. Aikawa, A. Yokoyama, F. Hosoda, M. Nagai, N. Kakazu, T. Abe, y M. Ohki. 2001. Fusion of MOZ and p300 histone acetyltransferases in acute monocytic leukemia with a t(8;22)(p11;q13) chromosome translocation. *Leukemia* **15**:89–94.

- [76] S. B. McMahon, M. A. Wood, y M. D. Cole. 2000. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol. Cell. Biol.* **20**:556–562.
- [77] S. E. Lang, S. B. McMahon, M. D. Cole, y P. Hearing. 2001. E2F transcriptional activation requires TRRAP and GCN5 cofactors. *J. Biol. Chem.* **276**:32627–32634.
- [78] L. Deleu, S. Shellard, K. Alevizopoulos, B. Amati, y H. Land. 2001. Recruitment of TRRAP required for oncogenic transformation by E1A. *Oncogene* **20**:8270–8275.
- [79] L. Howe, D. Auston, P. Grant, S. John, R. G. Cook, J. L. Workman, y L. Pillus. 2001. Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression. *Genes Dev.* **15**:3144–3154.
- [80] A. Nourani, Y. Doyon, R. T. Utley, S. Allard, W. S. Lane, y J. Côté. 2001. Role of an ING1 growth regulator in transcriptional activation and targeted histone acetylation by the NuA4 complex. *Mol. Cell. Biol.* **21**:7629–7640.
- [81] J. S. Choy y S. J. Kron. 2002. NuA4 subunit Yng2 function in intra-S-phase DNA damage response. *Mol. Cell. Biol.* **22**:8215–8225.
- [82] T. Ikura, V. V. Ogryzko, M. Grigoriev, R. Groisman, J. Wang, M. Hori-koshi, R. Scully, J. Qin, y Y. Nakatani. 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* **102**:463–473.
- [83] D. E. Sterner y S. L. Berger. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:435–459.
- [84] C. A. Mizzen, X. J. Yang, T. Kokubo, J. E. Brownell, A. J. Bannister, T. Owen-Hughes, J. Workman, L. Wang, S. L. Berger, T. Kouzarides, Y. Nakatani, y C. D. Allis. 1996. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**:1261–1270.

- [85] O. Matangasombut, R. M. Buratowski, N. W. Swilling, y S. Buratowski. 2000. Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID. *Genes Dev.* **14**:951–962.
- [86] M. Pamblanco, A. Poveda, R. Sendra, S. Rodríguez-Navarro, J. E. Pérez-Ortín, y V. Tordera. 2001. Bromodomain factor 1 (Bdf1) protein interacts with histones. *FEBS Lett.* **496**:31–35.
- [87] R. Marmorstein y S. Y. Roth. 2001. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**:155–161.
- [88] S. Thiagalingam, K.-H. Cheng, H. J. Lee, N. Mineva, A. Thiagalingam, y J. F. Ponte. 2003. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **983**:84–100.
- [89] M. Yoshida, M. Kijima, M. Akita, y T. Beppu. 1990. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**:17174–17179.
- [90] D. Moazed. 2001. Enzymatic activities of Sir2 and chromatin silencing. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **13**:232–238.
- [91] Y. Xue, J. Wong, G. T. Moreno, M. K. Young, J. Côté, y W. Wang. 1998. NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell* **2**:851–861.
- [92] S. E. Harper, Y. Qiu, y P. A. Sharp. 1996. Sin3 corepressor function in Myc-induced transcription and transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:8536–8540.
- [93] A. P. Wolffe, F. D. Urnov, y D. Guschin. 2000. Co-repressor complexes and remodelling chromatin for repression. *Biochem. Soc. Trans.* **28**:379–386.
- [94] D. Kadosh y K. Struhl. 1997. Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* **89**:365–371.

- [95] F. Fuks, W. A. Burgers, N. Godin, M. Kasai, y T. Kouzarides. 2001. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *Embo J.* **20**:2536–2544.
- [96] B. Czermin, G. Schotta, B. B. Hülsmann, A. Brehm, P. B. Becker, G. Reuter, y A. Imhof. 2001. Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep.* **2**:915–919.
- [97] F. Tie, T. Furuyama, J. Prasad-Sinha, E. Jane, y P. J. Harte. 2001. The *Drosophila* Polycomb Group proteins ESC and E(Z) are present in a complex containing the histone-binding protein p55 and the histone deacetylase RPD3. *Development* **128**:275–286.
- [98] A. Kuzmichev, Y. Zhang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, y D. Reinberg. 2002. Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol. Cell. Biol.* **22**:835–848.
- [99] J. Lu, T. A. McKinsey, C. L. Zhang, y E. N. Olson. 2000. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol. Cell* **6**:233–244.
- [100] H. Y. Kao, M. Downes, P. Ordentlich, y R. M. Evans. 2000. Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev.* **14**:55–66.
- [101] K. D. Huynh, W. Fischle, E. Verdin, y V. J. Bardwell. 2000. BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev.* **14**:1810–1823.
- [102] S. Timmermann, H. Lehrmann, A. Polesskaya, y A. Harel-Bellan. 2001. Histone acetylation and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**:728–736.
- [103] B. E. Linggi, S. J. Brandt, Z.-W. Sun, y S. W. Hiebert. 2005. Translating the histone code into leukemia. *J. Cell. Biochem.* **96**:938–950.
- [104] C. Hauser, B. Schuettengruber, S. Bartl, G. Lagger, y C. Seiser. 2002. Activation of the mouse histone deacetylase 1 gene by cooperative histone phosphorylation and acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **22**:7820–7830.

- [105] S. Bartl, J. Taplick, G. Lagger, H. Khier, K. Kuchler, y C. Seiser. 1997. Identification of mouse histone deacetylase 1 as a growth factor-inducible gene. *Mol. Cell. Biol.* **17**:5033–5043.
- [106] S. Ait-Si-Ali, S. Ramirez, F. X. Barre, F. Dkhissi, L. Magnaghi-Jaulin, J. A. Girault, P. Robin, M. Knibiehler, L. L. Pritchard, B. Ducommun, D. Trouche, y A. Harel-Bellan. 1998. Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* **396**:184–186.
- [107] O. Kirsh, J.-S. Seeler, A. Pichler, A. Gast, S. Müller, E. Miska, M. Mathieu, A. Harel-Bellan, T. Kouzarides, F. Melchior, y A. Dejean. 2002. The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J.* **21**:2682–2691.
- [108] E. Soutoglou, B. Viollet, M. Vaxillaire, M. Yaniv, M. Pontoglio, y I. Talianidis. 2001. Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. *Embo J.* **20**:1984–1992.
- [109] Q.-J. Li, S.-H. Yang, Y. Maeda, F. M. Sladek, A. D. Sharrocks, y M. Martins-Green. 2003. MAP kinase phosphorylation-dependent activation of Elk-1 leads to activation of the co-activator p300. *Embo J.* **22**:281–291.
- [110] J. M. Denu. 2003. Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases. *Trends Biochem. Sci.* **28**:41–48.
- [111] T. A. McKinsey, C. L. Zhang, y E. N. Olson. 2001. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**:497–504.
- [112] W. Xu, H. Chen, K. Du, H. Asahara, M. Tini, B. M. Emerson, M. Montminy, y R. M. Evans. 2001. A transcriptional switch mediated by cofactor methylation. *Science* **294**:2507–2511.

- [113] V. G. Allfrey, R. Faulkner, y A. E. Mirsky. 1964. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **51**:786–794.
- [114] K. Murray. 1964. The occurrence of epsilon-n-methyl lysine in histones. *Biochemistry* **3**:10–15.
- [115] J. Min, Q. Feng, Z. Li, Y. Zhang, y R.-M. Xu. 2003. Structure of the catalytic domain of human DOT1L, a non-SET domain nucleosomal histone methyltransferase. *Cell* **112**:711–723.
- [116] K. Sawada, Z. Yang, J. R. Horton, R. E. Collins, X. Zhang, y X. Cheng. 2004. Structure of the conserved core of the yeast Dot1p, a nucleosomal histone H3 lysine 79 methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **279**:43296–43306.
- [117] Y. Wang, J. Wysocka, J. Sayegh, Y.-H. Lee, J. R. Perlin, L. Leonelli, L. S. Sonbuchner, C. H. McDonald, R. G. Cook, Y. Dou, R. G. Roeder, S. Clarke, M. R. Stallcup, C. D. Allis, y S. A. Coonrod. 2004. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. *Science* **306**:279–283.
- [118] G. L. Cuthbert, S. Daujat, A. W. Snowden, H. Erdjument-Bromage, T. Hagiwara, M. Yamada, R. Schneider, P. D. Gregory, P. Tempst, A. J. Bannister, y T. Kouzarides. 2004. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**:545–553.
- [119] Y. Shi, F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstine, P. A. Cole, R. A. Casero, y Y. Shi. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**:941–953.
- [120] H. Santos-Rosa, R. Schneider, A. J. Bannister, J. Sherriff, B. E. Bernstein, N. C. T. Emre, S. L. Schreiber, J. Mellor, y T. Kouzarides. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**:407–411.
- [121] N. J. Krogan, M. Kim, A. Tong, A. Golshani, G. Cagney, V. Canadien, D. P. Richards, B. K. Beattie, A. Emili, C. Boone, A. Shilatifard, S. Buratowski, y J. Greenblatt. 2003. Methylation of histone H3 by Set2 in

- Saccharomyces cerevisiae is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* **23**:4207–4218.
- [122] A. H. F. M. Peters y D. Schübeler. 2005. Methylation of histones: playing memory with DNA. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **17**:230–238.
- [123] S. D. Briggs, T. Xiao, Z.-W. Sun, J. A. Caldwell, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, C. D. Allis, y B. D. Strahl. 2002. Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature* **418**:498–498.
- [124] N. J. Krogan, J. Dover, A. Wood, J. Schneider, J. Heidt, M. A. Boateng, K. Dean, O. W. Ryan, A. Golshani, M. Johnston, J. F. Greenblatt, y A. Shilatifard. 2003. The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol. Cell* **11**:721–729.
- [125] P.-M. Dehé, M. Pamblanco, P. Luciano, R. Lebrun, D. Moinier, R. Sendra, A. Verreault, V. Tordera, y V. Géli. 2005. Histone H3 lysine 4 mono-methylation does not require ubiquitination of histone H2B. *J. Mol. Biol.* **353**:477–484.
- [126] K. W. Henry, A. Wyce, W.-S. Lo, L. J. Duggan, N. C. T. Emre, C.-F. Kao, L. Pillus, A. Shilatifard, M. A. Osley, y S. L. Berger. 2003. Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev.* **17**:2648–2663.
- [127] K. N. Byrd y A. Shearn. 2003. ASH1, a Drosophila trithorax group protein, is required for methylation of lysine 4 residues on histone H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:11535–11540.
- [128] G. I. Dellino, Y. B. Schwartz, G. Farkas, D. McCabe, S. C. R. Elgin, y V. Pirrotta. 2004. Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol. Cell* **13**:887–893.
- [129] C. Fournier, Y. Goto, E. Ballestar, K. Delaval, A. M. Hever, M. Esteller, y R. Feil. 2002. Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *Embo J.* **21**:6560–6570.

- [130] J. Mager, N. D. Montgomery, F. P.-M. De Villena, y T. Magnuson. 2003. Genome imprinting regulated by the mouse Polycomb group protein Eed. *Nat. Genet.* **33**:502–507.
- [131] F. Van Leeuwen, P. R. Gafken, y D. E. Gottschling. 2002. Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* **109**:745–756.
- [132] H. H. Ng, Q. Feng, H. Wang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, Y. Zhang, y K. Struhl. 2002. Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev.* **16**:1518–1527.
- [133] J.-H. Park, M. S. Cosgrove, E. Youngman, C. Wolberger, y J. D. Boeke. 2002. A core nucleosome surface crucial for transcriptional silencing. *Nat. Genet.* **32**:273–279.
- [134] H. H. Ng, D. N. Ciccone, K. B. Morshead, M. A. Oettinger, y K. Struhl. 2003. Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:1820–1825.
- [135] F. Van Leeuwen y D. E. Gottschling. 2002. Genome-wide histone modifications: gaining specificity by preventing promiscuity. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14**:756–762.
- [136] D. G. E. Martin, D. E. Grimes, K. Baetz, y L. Howe. 2006. Methylation of histone H3 mediates the association of the NuA3 histone acetyltransferase with chromatin. *Mol. Cell. Biol.* **26**:3018–3028.
- [137] J. A. Daniel, M. S. Torok, Z.-W. Sun, D. Schieltz, C. D. Allis, J. R. Yates, y P. A. Grant. 2004. Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. *J. Biol. Chem.* **279**:1867–1871.
- [138] M. G. Pray-Grant, J. A. Daniel, D. Schieltz, J. R. Yates, y P. A. Grant. 2005. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* **433**:434–438.

- [139] A. Morillon, N. Karabetsov, A. Nair, y J. Mellor. 2005. Dynamic lysine methylation on histone H3 defines the regulatory phase of gene transcription. *Mol. Cell* **18**:723–734.
- [140] A. H. Y. Tong, G. Lesage, G. D. Bader, H. Ding, H. Xu, X. Xin, J. Young, G. F. Berriz, R. L. Brost, M. Chang, Y. Chen, X. Cheng, G. Chua, H. Friesen, D. S. Goldberg, J. Haynes, C. Humphries, G. He, S. Hussein, L. Ke, N. Krogan, Z. Li, J. N. Levinson, H. Lu, P. Ménard, C. Munyana, A. B. Parsons, O. Ryan, R. Tonikian, T. Roberts, A.-M. Sdicu, J. Shapiro, B. Sheikh, B. Suter, S. L. Wong, L. V. Zhang, H. Zhu, C. G. Burd, S. Munro, C. Sander, J. Rine, J. Greenblatt, M. Peter, A. Bretscher, G. Bell, F. P. Roth, G. W. Brown, B. Andrews, H. Bussey, y C. Boone. 2004. Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* **303**:808–813.
- [141] M. J. Carrozza, B. Li, L. Florens, T. Sukanuma, S. K. Swanson, K. K. Lee, W.-J. Shia, S. Anderson, J. Yates, M. P. Washburn, y J. L. Workman. 2005. Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* **123**:581–592.
- [142] M.-C. Keogh, S. K. Kurdستاني, S. A. Morris, S. H. Ahn, V. Podolny, S. R. Collins, M. Schuldiner, K. Chin, T. Punna, N. J. Thompson, C. Boone, A. Emili, J. S. Weissman, T. R. Hughes, B. D. Strahl, M. Grunstein, J. F. Greenblatt, S. Buratowski, y N. J. Krogan. 2005. Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* **123**:593–605.
- [143] C. M. Barber, F. B. Turner, Y. Wang, K. Hagstrom, S. D. Taverna, S. Mollah, B. Ueberheide, B. J. Meyer, D. F. Hunt, P. Cheung, y C. D. Allis. 2004. The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved. *Chromosoma* **112**:360–371.
- [144] Y. Zhang y D. Reinberg. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* **15**:2343–2360.

- [145] S. L. Berger. 2002. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**:142–148.
- [146] R. Enomoto, Y. Yoshida, T. Komai, C. Sugahara, Y. Yasuoka, y E. Lee. 2003. Involvement of the change in chromatin structure in thymocyte apoptosis induced by phosphorylation of histones. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1010**:218–220.
- [147] S. C. Galasinski, D. F. Louie, K. K. Gloor, K. A. Resing, y N. G. Ahn. 2002. Global regulation of post-translational modifications on core histones. *J. Biol. Chem.* **277**:2579–2588.
- [148] W. S. Lo, L. Duggan, N. C. Emre, R. Belotserkovskya, W. S. Lane, R. Shiekhattar, y S. L. Berger. 2001. Snf1—a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science* **293**:1142–1146.
- [149] W. S. Lo, R. C. Trievel, J. R. Rojas, L. Duggan, J. Y. Hsu, C. D. Allis, R. Marmorstein, y S. L. Berger. 2000. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol. Cell* **5**:917–926.
- [150] H. Goto, Y. Tomono, K. Ajiro, H. Kosako, M. Fujita, M. Sakurai, K. Okawa, A. Iwamatsu, T. Okigaki, T. Takahashi, y M. Inagaki. 1999. Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J. Biol. Chem.* **274**:25543–25549.
- [151] E. Kaszás y W. Z. Cande. 2000. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J. Cell. Sci.* **113**:3217–3226.
- [152] R. C. Conaway, C. S. Brower, y J. W. Conaway. 2002. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**:1254–1258.
- [153] C. M. Pickart. 2001. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol. Cell* **8**:499–504.

- [154] Y. Shiio y R. N. Eisenman. 2003. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:13225–13230.
- [155] A. Verger, J. Perdomo, y M. Crossley. 2003. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep.* **4**:137–142.
- [156] D. Nathan, D. E. Sterner, y S. L. Berger. 2003. Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:13118–13120.
- [157] V. Tordera, R. Sendra, y J. E. Pérez-Ortín. 1993. The role of histones and their modifications in the informative content of chromatin. *Experientia* **49**:780–788.
- [158] B. M. Turner. 2000. Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* **22**:836–845.
- [159] T. Jenuwein y C. D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science* **293**:1074–1080.
- [160] P. Cheung, C. D. Allis, y P. Sassone-Corsi. 2000. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* **103**:263–271.
- [161] R. R. Cocklin y M. Wang. 2003. Identification of methylation and acetylation sites on mouse histone H3 using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Protein Chem.* **22**:327–334.
- [162] K. Zhang, H. Tang, L. Huang, J. W. Blankenship, P. R. Jones, F. Xiang, P. M. Yau, y A. L. Burlingame. 2002. Identification of acetylation and methylation sites of histone H3 from chicken erythrocytes by high-accuracy matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight, matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay, and nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **306**:259–269.

- [163] L. Zhang, E. E. Eugeni, M. R. Parthun, y M. A. Freitas. 2003. Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma* **112**:77–86.
- [164] M. A. Freitas, A. R. Sklenar, y M. R. Parthun. 2004. Application of mass spectrometry to the identification and quantification of histone post-translational modifications. *J. Cell. Biochem.* **92**:691–700.
- [165] R. Festenstein, S. N. Pagakis, K. Hiragami, D. Lyon, A. Verreault, B. Sekkali, y D. Kioussis. 2003. Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells. *Science* **299**:719–721.
- [166] T. Cheutin, A. J. McNairn, T. Jenuwein, D. M. Gilbert, P. B. Singh, y T. Misteli. 2003. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* **299**:721–725.
- [167] W. Fischle, Y. Wang, y C. D. Allis. 2003. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* **425**:475–479.
- [168] S. K. Kurdistani, S. Tavazoie, y M. Grunstein. 2004. Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* **117**:721–733.
- [169] A. B. Ruiz-García, R. Sendra, M. Pamblanco, y V. Tordera. 1997. Gcn5p is involved in the acetylation of histone H3 in nucleosomes. *FEBS Lett.* **403**:186–190.
- [170] A. B. Ruiz-García, R. Sendra, M. Galiana, M. Pamblanco, J. E. Pérez-Ortín, y V. Tordera. 1998. HAT1 and HAT2 proteins are components of a yeast nuclear histone acetyltransferase enzyme specific for free histone H4. *J. Biol. Chem.* **273**:12599–12605.
- [171] A. Eberharter, S. John, P. A. Grant, R. T. Utley, y J. L. Workman. 1998. Identification and analysis of yeast nucleosomal histone acetyltransferase complexes. *Methods* **15**:315–321.
- [172] A. A. Boudreault, D. Cronier, W. Selleck, N. Lacoste, R. T. Utley, S. Allard, J. Savard, W. S. Lane, S. Tan, y J. Côté. 2003. Yeast enhancer of

- polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. *Genes Dev.* **17**:1415–1428.
- [173] J. Horiuchi, N. Silverman, G. A. Marcus, y L. Guarente. 1995. ADA3, a putative transcriptional adaptor, consists of two separable domains and interacts with ADA2 and GCN5 in a trimeric complex. *Mol. Cell. Biol.* **15**:1203–1209.
- [174] S. Allard, R. T. Utley, J. Savard, A. Clarke, P. Grant, C. J. Brandl, L. Pillus, J. L. Workman, y J. Côté. 1999. NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *Embo J.* **18**:5108–5119.
- [175] G. López-Rodas, V. Tordera, M. M. Sánchez Del Pino, y L. Franco. 1991. Subcellular localization and nucleosome specificity of yeast histone acetyltransferases. *Biochemistry* **30**:3728–3732.
- [176] R. Sendra, C. Tse, y J. C. Hansen. 2000. The yeast histone acetyltransferase A2 complex, but not free Gcn5p, binds stably to nucleosomal arrays. *J. Biol. Chem.* **275**:24928–24934.
- [177] A. B. Ruiz-García. *Caracterización de complejos enzimáticos histona acetiltransferasa en Saccharomyces cerevisiae mediante el uso de mutantes en genes implicados en la acetilación de histonas*. Universitat de València, 1999.
- [178] G. A. Marcus, N. Silverman, S. L. Berger, J. Horiuchi, y L. Guarente. 1994. Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *Embo J.* **13**:4807–4815.
- [179] P. A. Grant, A. Eberharter, S. John, R. G. Cook, B. M. Turner, y J. L. Workman. 1999. Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J. Biol. Chem.* **274**:5895–5900.
- [180] A. Saleh, V. Lang, R. Cook, y C. J. Brandl. 1997. Identification of native complexes containing the yeast coactivator/repressor proteins NGG1/ADA3 and ADA2. *J. Biol. Chem.* **272**:5571–5578.

- [181] A. Eberharter, D. E. Sterner, D. Schieltz, A. Hassan, J. R. Yates, S. L. Berger, y J. L. Workman. 1999. The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**:6621–6631.
- [182] A. Köhler, P. Pascual-García, A. Llopis, M. Zapater, F. Posas, E. Hurt, y S. Rodríguez-Navarro. 2006. The mRNA export factor Sus1 is involved in Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase-mediated H2B deubiquitinylation through its interaction with Ubp8 and Sgf11. *Mol. Biol. Cell* **17**:4228–36.
- [183] D. W. Powell, C. M. Weaver, J. L. Jennings, K. J. McAfee, Y. He, P. A. Weil, y A. J. Link. 2004. Cluster analysis of mass spectrometry data reveals a novel component of SAGA. *Mol. Cell. Biol.* **24**:7249–7259.
- [184] K. Ingvarsdottir, N. J. Krogan, N. C. T. Emre, A. Wyce, N. J. Thompson, A. Emili, T. R. Hughes, J. F. Greenblatt, y S. L. Berger. 2005. H2B ubiquitin protease Ubp8 and Sgf11 constitute a discrete functional module within the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA complex. *Mol. Cell. Biol.* **25**:1162–1172.
- [185] S. Rodríguez-Navarro, T. Fischer, M.-J. Luo, O. Antúnez, S. Brettschneider, J. Lechner, J. E. Pérez-Ortín, R. Reed, y E. Hurt. 2004. Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* **116**:75–86.
- [186] M.-C. Keogh, T. A. Mennella, C. Sawa, S. Berthelet, N. J. Krogan, A. Wolek, V. Podolny, L. R. Carpenter, J. F. Greenblatt, K. Baetz, y S. Buratowski. 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A variant Htz1 is acetylated by NuA4. *Genes Dev.* **20**:660–665.
- [187] J. E. Babiarez, J. E. Halley, y J. Rine. 2006. Telomeric heterochromatin boundaries require NuA4-dependent acetylation of histone variant H2A.Z in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **20**:700–710.
- [188] A. S. Clarke, J. E. Lowell, S. J. Jacobson, y L. Pillus. 1999. Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* **19**:2515–2526.

- [189] M. Durant y B. F. Pugh. 2006. Genome-wide relationships between TAF1 and histone acetyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **26**:2791–2802.
- [190] G. Rigaut, A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann, y B. Séraphin. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* **17**:1030–1032.
- [191] O. Puig, F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm, y B. Séraphin. 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**:218–229.
- [192] A.-C. Gavin, M. Bösche, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J. M. Rick, A.-M. Michon, C.-M. Cruciat, M. Remor, C. Höfert, M. Schelder, M. Brajenovic, H. Ruffner, A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M.-A. Heurtier, R. R. Copley, A. Edlmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P. Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer, y G. Superti-Furga. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**:141–147.
- [193] Y. Ho, A. Gruhler, A. Heilbut, G. D. Bader, L. Moore, S.-L. Adams, A. Millar, P. Taylor, K. Bennett, K. Boutilier, L. Yang, C. Wolting, I. Donaldson, S. Schandorff, J. Shewnarane, M. Vo, J. Taggart, M. Goudreault, B. Muskat, C. Alfarano, D. Dewar, Z. Lin, K. Michalickova, A. R. Willems, H. Sassi, P. A. Nielsen, K. J. Rasmussen, J. R. Andersen, L. E. Johansen, L. H. Hansen, H. Jespersen, A. Podtelejnikov, E. Nielsen, J. Crawford, V. Poulsen, B. D. Sørensen, J. Matthiesen, R. C. Hendrickson, F. Gleeson, T. Pawson, M. F. Moran, D. Durocher, M. Mann, C. W. V. Hogue, D. Figgeys, y M. Tyers. 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**:180–183.
- [194] A.-C. Gavin, P. Aloy, P. Grandi, R. Krause, M. Boesche, M. Marzioch, C. Rau, L. J. Jensen, S. Bastuck, B. Dimpelfeld, A. Edlmann, M.-

- A. Heurtier, V. Hoffman, C. Hoefert, K. Klein, M. Hudak, A.-M. Michon, M. Schelder, M. Schirle, M. Remor, T. Rudi, S. Hooper, A. Bauer, T. Bouwmeester, G. Casari, G. Drewes, G. Neubauer, J. M. Rick, B. Kuster, P. Bork, R. B. Russell, y G. Superti-Furga. 2006. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**:631–636.
- [195] N. J. Krogan, G. Cagney, H. Yu, G. Zhong, X. Guo, A. Ignatchenko, J. Li, S. Pu, N. Datta, A. P. Tikuisis, T. Punna, J. M. Peregrín-Alvarez, M. Shales, X. Zhang, M. Davey, M. D. Robinson, A. Paccanaro, J. E. Bray, A. Sheung, B. Beattie, D. P. Richards, V. Canadien, A. Lalev, F. Mena, P. Wong, A. Starostine, M. M. Canete, J. Vlasblom, S. Wu, C. Orsi, S. R. Collins, S. Chandran, R. Haw, J. J. Rilstone, K. Gandi, N. J. Thompson, G. Musso, P. St Onge, S. Ghanny, M. H. Y. Lam, G. Butland, A. M. Altaf-Ul, S. Kanaya, A. Shilatifard, E. O'shea, J. S. Weissman, C. J. Ingles, T. R. Hughes, J. Parkinson, M. Gerstein, S. J. Wodak, A. Emili, y J. F. Greenblatt. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**:637–643.
- [196] N. J. Krogan y J. F. Greenblatt. 2001. Characterization of a six-subunit holo-elongator complex required for the regulated expression of a group of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**:8203–8212.
- [197] S. L. Sanders, J. Jennings, A. Canutescu, A. J. Link, y P. A. Weil. 2002. Proteomics of the eukaryotic transcription machinery: identification of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry. *Mol. Cell. Biol.* **22**:4723–4738.
- [198] W.-J. Shia, S. Osada, L. Florens, S. K. Swanson, M. P. Washburn, y J. L. Workman. 2005. Characterization of the yeast trimeric-SAS acetyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* **280**:11987–11994.
- [199] A. Wach, A. Brachat, R. Pöhlmann, y P. Philippsen. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**:1793–1808.

- [200] A. L. Goldstein y J. H. Mccusker. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**:1541–1553.
- [201] M. S. Longtine, A. Mckenzie, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, y J. R. Pringle. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**:953–961.
- [202] M. Knop, K. Siegers, G. Pereira, W. Zachariae, B. Winsor, K. Nasmyth, y E. Schiebel. 1999. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**:963–972.
- [203] D. Hanahan. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557–580.
- [204] C. B. Brachmann, A. Davies, G. J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, y J. D. Boeke. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**:115–132.
- [205] A. Baudin, O. Ozier-Kalogeropoulos, A. Denouel, F. Lacroute, y C. Cullin. 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids. Res.* **21**:3329–3330.
- [206] R. D. Gietz, R. H. Schiestl, A. R. Willems, y R. A. Woods. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**:355–360.
- [207] C. S. Hoffman y F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**:267–272.
- [208] U. K. Laemmli. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
- [209] H. Weintraub, K. Palter, y F. Van Lente. 1975. Histones H2A, H2A, H3, and H4 form a tetrameric complex in solutions of high salt. *Cell* **6**:85–110.

- [210] C. Thiriet y P. Albert. 1995. Rapid and effective western blotting of histones from acid-urea-Triton and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels: two different approaches depending on the subsequent qualitative or quantitative analysis. *Electrophoresis* **16**:357–361.
- [211] H. Schägger y G. Von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**:368–379.
- [212] D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy, y J. S. Cottrell. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**:3551–3567.
- [213] C. Tse, E. I. Georgieva, A. B. Ruiz-García, R. Sendra, y J. C. Hansen. 1998. Gcn5p, a transcription-related histone acetyltransferase, acetylates nucleosomes and folded nucleosomal arrays in the absence of other protein subunits. *J. Biol. Chem.* **273**:32388–32392.
- [214] M. Kabani, K. Michot, C. Boschiero, y M. Werner. 2005. Anc1 interacts with the catalytic subunits of the general transcription factors TFIID and TFIIF, the chromatin remodeling complexes RSC and INO80, and the histone acetyltransferase complex NuA3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**:398–403.
- [215] P. G. Rani, J. A. Ranish, y S. Hahn. 2004. RNA polymerase II (Pol II)-TFIIF and Pol II-mediator complexes: the major stable Pol II complexes and their activity in transcription initiation and reinitiation. *Mol. Cell. Biol.* **24**:1709–1720.
- [216] M. Hampsey. 1998. Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:465–503.
- [217] D. Dimova, Z. Nackerdien, S. Furgeson, S. Eguchi, y M. A. Osley. 1999. A role for transcriptional repressors in targeting the yeast Swi/Snf complex. *Mol. Cell* **4**:75–83.

- [218] A. Gunjan y A. Verreault. 2003. A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell* **115**:537–549.
- [219] P. Prochasson, L. Florens, S. K. Swanson, M. P. Washburn, y J. L. Workman. 2005. The HIR corepressor complex binds to nucleosomes generating a distinct protein/DNA complex resistant to remodeling by SWI/SNF. *Genes Dev.* **19**:2534–2539.
- [220] S. C. Howard, A. Hester, y P. K. Herman. 2003. The Ras/PKA signaling pathway may control RNA polymerase II elongation via the Spt4p/Spt5p complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **165**:1059–1070.
- [221] J. Perry. 2006. The Epc-N domain: a predicted protein-protein interaction domain found in select chromatin associated proteins. *BMC Genomics* **7**:6–6.
- [222] M. W. Van Dyke, L. D. Nelson, R. G. Weilbaeher, y D. V. Mehta. 2004. Stm1p, a G4 quadruplex and purine motif triplex nucleic acid-binding protein, interacts with ribosomes and subtelomeric Y' DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**:24323–24333.
- [223] T. Utsugi, A. Toh-E, y Y. Kikuchi. 1995. A high dose of the STM1 gene suppresses the temperature sensitivity of the *tom1* and *htr1* mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1263**:285–288.
- [224] L. D. Nelson, M. Musso, y M. W. Van Dyke. 2000. The yeast STM1 gene encodes a purine motif triple helical DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **275**:5573–5581.
- [225] S. Björklund y Y. J. Kim. 1996. Mediator of transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* **21**:335–337.
- [226] G. Otero, J. Fellows, Y. Li, T. De Bizemont, A. M. Dirac, C. M. Gustafsson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, y J. Q. Svejstrup. 1999. Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol. Cell* **3**:109–118.

- [227] B. O. Wittschieben, G. Otero, T. De Bizemont, J. Fellows, H. Erdjument-Bromage, R. Ohba, Y. Li, C. D. Allis, P. Tempst, y J. Q. Svejstrup. 1999. A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell* **4**:123–128.
- [228] M. L. Angus-Hill, R. N. Dutnall, S. T. Tafrov, R. Sternglanz, y V. Ramakrishnan. 1999. Crystal structure of the histone acetyltransferase Hpa2: A tetrameric member of the Gcn5-related N-acetyltransferase superfamily. *J. Mol. Biol.* **294**:1311–1325.
- [229] A. Sutton, W.-J. Shia, D. Band, P. D. Kaufman, S. Osada, J. L. Workman, y R. Sternglanz. 2003. Sas4 and Sas5 are required for the histone acetyltransferase activity of Sas2 in the SAS complex. *J. Biol. Chem.* **278**:16887–16892.
- [230] M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, y P. O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**:467–470.
- [231] M. R. Martzen, S. M. McCraith, S. L. Spinelli, F. M. Torres, S. Fields, E. J. Grayhack, y E. M. Phizicky. 1999. A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* **286**:1153–1155.
- [232] T. M. Alberola, J. García-Martínez, O. Antúnez, L. Viladevall, A. Barceló, J. Ariño, y J. E. Pérez-Ortín. 2004. A new set of DNA macrochips for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: features and uses. *Int. Microbiol.* **7**:199–206.
- [233] D. Robyr, Y. Suka, I. Xenarios, S. K. Kurdistani, A. Wang, N. Suka, y M. Grunstein. 2002. Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* **109**:437–446.
- [234] D. Robyr y M. Grunstein. 2003. Genomewide histone acetylation microarrays. *Methods* **31**:83–89.

- [235] M. H. Kuo y C. D. Allis. 1999. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* **19**:425–433.
- [236] S. Strahl-Bolsinger, A. Hecht, K. Luo, y M. Grunstein. 1997. SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev.* **11**:83–93.
- [237] P. C. Dedon, J. A. Soultz, C. D. Allis, y M. A. Gorovsky. 1991. Formaldehyde cross-linking and immunoprecipitation demonstrate developmental changes in H1 association with transcriptionally active genes. *Mol. Cell. Biol.* **11**:1729–1733.
- [238] V. Orlando y R. Paro. 1993. Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* **75**:1187–1198.
- [239] A. Hecht, S. Strahl-Bolsinger, y M. Grunstein. 1996. Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin. *Nature* **383**:92–96.
- [240] M. D. Litt, M. Simpson, M. Gaszner, C. D. Allis, y G. Felsenfeld. 2001. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science* **293**:2453–2455.
- [241] A. Breiling, B. M. Turner, M. E. Bianchi, y V. Orlando. 2001. General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins. *Nature* **412**:651–655.
- [242] S. K. Bohlander, R. Espinosa, M. M. Le Beau, J. D. Rowley, y M. O. Díaz. 1992. A method for the rapid sequence-independent amplification of microdissected chromosomal material. *Genomics* **13**:1322–1324.
- [243] G. P. Pfeifer, S. D. Steigerwald, P. R. Mueller, B. Wold, y A. D. Riggs. 1989. Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science* **246**:810–813.

- [244] B. Ren, F. Robert, J. J. Wyrick, O. Aparicio, E. G. Jennings, I. Simon, J. Zeitlinger, J. Schreiber, N. Hannett, E. Kanin, T. L. Volkert, C. J. Wilson, S. P. Bell, y R. A. Young. 2000. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* **290**:2306–2309.
- [245] V. R. Iyer, C. E. Horak, C. S. Scafe, D. Botstein, M. Snyder, y P. O. Brown. 2001. Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature* **409**:533–538.
- [246] C. T. Harbison, D. B. Gordon, T. I. Lee, N. J. Rinaldi, K. D. Macisaac, T. W. Danford, N. M. Hannett, J.-B. Tagne, D. B. Reynolds, J. Yoo, E. G. Jennings, J. Zeitlinger, D. K. Pokholok, M. Kellis, P. A. Rolfe, K. T. Takusagawa, E. S. Lander, D. K. Gifford, E. Fraenkel, y R. A. Young. 2004. Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**:99–104.
- [247] F. Robert, D. K. Pokholok, N. M. Hannett, N. J. Rinaldi, M. Chandy, A. Rolfe, J. L. Workman, D. K. Gifford, y R. A. Young. 2004. Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome. *Mol. Cell* **16**:199–209.
- [248] H. H. Ng, F. Robert, R. A. Young, y K. Struhl. 2002. Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev.* **16**:806–819.
- [249] N. Nègre, J. Hennetin, L. V. Sun, S. Lavrov, M. Bellis, K. P. White, y G. Cavalli. 2006. Chromosomal distribution of PcG proteins during *Drosophila* development. *PLoS Biol.* **4**:e170–e170.
- [250] T. H. Kim, L. O. Barrera, C. Qu, S. Van Calcar, N. D. Trinklein, S. J. Cooper, R. M. Luna, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, R. M. Myers, y B. Ren. 2005. Direct isolation and identification of promoters in the human genome. *Genome Res.* **15**:830–839.
- [251] T. H. Kim, L. O. Barrera, M. Zheng, C. Qu, M. A. Singer, T. A. Richmond, Y. Wu, R. D. Green, y B. Ren. 2005. A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* **436**:876–880.

- [252] C. L. Liu, T. Kaplan, M. Kim, S. Buratowski, S. L. Schreiber, N. Friedman, y O. J. Rando. 2005. Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol.* **3**:e328–e328.
- [253] B. E. Bernstein, M. Kamal, K. Lindblad-Toh, S. Bekiranov, D. K. Bailey, D. J. Huebert, S. McMahon, E. K. Karlsson, E. J. Kulbokas, T. R. Gingeras, S. L. Schreiber, y E. S. Lander. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**:169–181.
- [254] D. Schübeler, D. M. Macalpine, D. Scalzo, C. Wirbelauer, C. Kooperberg, F. Van Leeuwen, D. E. Gottschling, L. P. O’neill, B. M. Turner, J. Delrow, S. P. Bell, y M. Groudine. 2004. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* **18**:1263–1271.
- [255] D. K. Pokholok, C. T. Harbison, S. Levine, M. Cole, N. M. Hannett, T. I. Lee, G. W. Bell, K. Walker, P. A. Rolfe, E. Herbolsheimer, J. Zeitlinger, F. Lewitter, D. K. Gifford, y R. A. Young. 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* **122**:517–527.
- [256] M. R. Parthun, J. Widom, y D. E. Gottschling. 1996. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **87**:85–94.
- [257] G. Dieci, S. Hermann-Le Denmat, E. Lukhtanov, P. Thuriaux, M. Werner, y A. Sentenac. 1995. A universally conserved region of the largest subunit participates in the active site of RNA polymerase III. *Embo J.* **14**:3766–3776.
- [258] G. F. Berriz, O. D. King, B. Bryant, C. Sander, y F. P. Roth. 2003. Characterizing gene sets with FuncAssociate. *Bioinformatics* **19**:2502–2504.
- [259] S. Tavazoie, J. D. Hughes, M. J. Campbell, R. J. Cho, y G. M. Church. 1999. Systematic determination of genetic network architecture. *Nat. Genet.* **22**:281–285.

- [260] I. Simon, J. Barnett, N. Hannett, C. T. Harbison, N. J. Rinaldi, T. L. Volkert, J. J. Wyrick, J. Zeitlinger, D. K. Gifford, T. S. Jaakkola, y R. A. Young. 2001. Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell* **106**:697–708.
- [261] B. Dujon. 1996. The yeast genome project: what did we learn?. *Trends Genet.* **12**:263–270.
- [262] J. L. Gerton, J. Derisi, R. Shroff, M. Lichten, P. O. Brown, y T. D. Petes. 2000. Inaugural article: global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:11383–11390.
- [263] D. N. Roberts, A. J. Stewart, J. T. Huff, y B. R. Cairns. 2003. The RNA polymerase III transcriptome revealed by genome-wide localization and activity-occupancy relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:14695–14700.
- [264] O. Harismendy, C.-G. Gendrel, P. Soularue, X. Gidrol, A. Sentenac, M. Werner, y O. Lefebvre. 2003. Genome-wide location of yeast RNA polymerase III transcription machinery. *Embo J.* **22**:4738–4747.
- [265] Z. Moqtaderi y K. Struhl. 2004. Genome-wide occupancy profile of the RNA polymerase III machinery in *Saccharomyces cerevisiae* reveals loci with incomplete transcription complexes. *Mol. Cell. Biol.* **24**:4118–4127.
- [266] U. Güldener, M. Münsterkötter, G. Kastenmüller, N. Strack, J. Van Helden, C. Lemer, J. Richelles, S. J. Wodak, J. García-Martínez, J. E. Pérez-Ortín, H. Michael, A. Kaps, E. Talla, B. Dujon, B. André, J. L. Souciet, J. De Montigny, E. Bon, C. Gaillardin, y H. W. Mewes. 2005. CYGD: the Comprehensive Yeast Genome Database. *Nucleic Acids Res.* **33**:D364–D368.
- [267] D. Montaner, J. Tárraga, J. Huerta-Cepas, J. Burguet, J. M. Vaquerizas, L. Conde, P. Mínguez, J. Vera, S. Mukherjee, J. Valls, M. A. G. Pujana, E. Alloza, J. Herrero, F. Al-Shahrour, y J. Dopazo. 2006. Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res.* **34**:W486–W491.

- [268] D. K. Pokholok, N. M. Hannett, y R. A. Young. 2002. Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo. *Mol. Cell* **9**:799–809.
- [269] J. Béve, G.-Z. Hu, L. C. Myers, D. Balciunas, O. Werngren, K. Hultenby, R. Wibom, H. Ronne, y C. M. Gustafsson. 2005. The structural and functional role of Med5 in the yeast Mediator tail module. *J. Biol. Chem.* **280**:41366–41372.
- [270] F. C. Holstege, E. G. Jennings, J. J. Wyrick, T. I. Lee, C. J. Hengartner, M. R. Green, T. R. Golub, E. S. Lander, y R. A. Young. 1998. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* **95**:717–728.
- [271] J. García-Martínez, A. Aranda, y J. E. Pérez-Ortín. 2004. Genomic run-on evaluates transcription rates for all yeast genes and identifies gene regulatory mechanisms. *Mol. Cell* **15**:303–313.
- [272] M. H. Kuo, J. E. Brownell, R. E. Sobel, T. A. Ranalli, R. G. Cook, D. G. Edmondson, S. Y. Roth, y C. D. Allis. 1996. Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* **383**:269–272.
- [273] N. Suka, Y. Suka, A. A. Carmen, J. Wu, y M. Grunstein. 2001. Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Mol. Cell* **8**:473–479.
- [274] A. Kristjuhan, J. Walker, N. Suka, M. Grunstein, D. Roberts, B. R. Cairns, y J. Q. Svejstrup. 2002. Transcriptional inhibition of genes with severe histone H3 hypoacetylation in the coding region. *Mol. Cell* **10**:925–933.
- [275] W. Zhang, J. R. Bone, D. G. Edmondson, B. M. Turner, y S. Y. Roth. 1998. Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *Embo J.* **17**:3155–3167.
- [276] J.-C. Andrau, L. Van De Pasch, P. Lijnzaad, T. Bijma, M. G. Koerkamp, J. Van De Peppel, M. Werner, y F. C. P. Holstege. 2006. Genome-wide

- location of the coactivator mediator: Binding without activation and transient Cdk8 interaction on DNA. *Mol. Cell* **22**:179–192.
- [277] G. S. Winkler, A. Kristjuhan, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, y J. Q. Svejstrup. 2002. Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:3517–3522.
- [278] D. N. Weil. *Population Aging (New Palgrave Encyclopedia of Economics)*. second edition.
- [279] K. J. Bitterman, O. Medvedik, y D. A. Sinclair. 2003. Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:376–399.
- [280] B. K. Kennedy, N. R. Austriaco, J. Zhang, y L. Guarente. 1995. Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell* **80**:485–496.
- [281] S. Imai, C. M. Armstrong, M. Kaeberlein, y L. Guarente. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**:795–800.
- [282] M. Kaeberlein, M. Mcvey, y L. Guarente. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* **13**:2570–2580.
- [283] S. Kim, A. Benguria, C. Y. Lai, y S. M. Jazwinski. 1999. Modulation of life-span by histone deacetylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **10**:3125–3136.
- [284] L. Guarente. 2000. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev.* **14**:1021–1026.
- [285] S. Gottlieb y R. E. Esposito. 1989. A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* **56**:771–776.

- [286] D. A. Sinclair y L. Guarente. 1997. Extrachromosomal rDNA circles—a cause of aging in yeast. *Cell* **91**:1033–1042.
- [287] D. A. Sinclair, K. Mills, y L. Guarente. 1998. Molecular mechanisms of yeast aging. *Trends Biochem. Sci.* **23**:131–4.
- [288] L. Guarente y F. Picard. 2005. Calorie restriction—the SIR2 connection. *Cell* **120**:473–482.
- [289] S.-J. Lin, M. Kaeberlein, A. A. Andalis, L. A. Sturtz, P.-A. Defossez, V. C. Culotta, G. R. Fink, y L. Guarente. 2002. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* **418**:344–348.
- [290] S.-J. Lin, E. Ford, M. Haigis, G. Liszt, y L. Guarente. 2004. Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev.* **18**:12–16.
- [291] R. M. Anderson, K. J. Bitterman, J. G. Wood, O. Medvedik, H. Cohen, S. S. Lin, J. K. Manchester, J. I. Gordon, y D. A. Sinclair. 2002. Manipulation of a nuclear NAD⁺ salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD⁺ levels. *J. Biol. Chem.* **277**:18881–18890.
- [292] R. M. Anderson, M. Latorre-Esteves, A. R. Neves, S. Lavu, O. Medvedik, C. Taylor, K. T. Howitz, H. Santos, y D. A. Sinclair. 2003. Yeast life-span extension by calorie restriction is independent of NAD fluctuation. *Science* **302**:2124–2126.
- [293] M. Kaeberlein, K. T. Kirkland, S. Fields, y B. K. Kennedy. 2004. Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *PLoS Biol.* **2**:E296–E296.
- [294] D. E. Gottschling, O. M. Aparicio, B. L. Billington, y V. A. Zakian. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**:751–762.
- [295] S. Loo y J. Rine. 1994. Silencers and domains of generalized repression. *Science* **264**:1768–1771.

- [296] J. S. Smith y J. D. Boeke. 1997. An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev.* **11**:241–254.
- [297] J. Singh y A. J. Klar. 1992. Active genes in budding yeast display enhanced in vivo accessibility to foreign DNA methylases: a novel in vivo probe for chromatin structure of yeast. *Genes Dev.* **6**:186–196.
- [298] J. Landry, A. Sutton, S. T. Tafrov, R. C. Heller, J. Stebbins, L. Pillus, y R. Sternglanz. 2000. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:5807–5811.
- [299] A. F. Straight, W. Shou, G. J. Dowd, C. W. Turck, R. J. Deshaies, A. D. Johnson, y D. Moazed. 1999. Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* **97**:245–256.
- [300] A. J. Lustig. 1998. Mechanisms of silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**:233–239.
- [301] Z. W. Sun y M. Hampsey. 1999. A general requirement for the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex in regulating silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**:921–932.
- [302] S. E. Rundlett, A. A. Carmen, R. Kobayashi, S. Bavykin, B. M. Turner, y M. Grunstein. 1996. HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:14503–14508.
- [303] S. H. Meijnsing y A. E. Ehrenhofer-Murray. 2001. The silencing complex SAS-I links histone acetylation to the assembly of repressed chromatin by CAF-I and Asf1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **15**:3169–3182.
- [304] E. Y. Xu, S. Kim, y D. H. Rivier. 1999. SAS4 and SAS5 are locus-specific regulators of silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **153**:25–33.
- [305] T. J. Kelly, S. Qin, D. E. Gottschling, y M. R. Parthun. 2000. Type B histone acetyltransferase Hat1p participates in telomeric silencing. *Mol. Cell. Biol.* **20**:7051–7058.

- [306] C. A. Fox, A. E. Ehrenhofer-Murray, S. Loo, y J. Rine. 1997. The origin recognition complex, SIR1, and the S phase requirement for silencing. *Science* **276**:1547–1551.
- [307] N. K. Egilmez y S. M. Jazwinski. 1989. Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **171**:37–42.
- [308] I. Müller, M. Zimmermann, D. Becker, y M. Flömer. 1980. Calendar life span versus budding life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mech. Ageing. Dev.* **12**:47–52.
- [309] F. Sherman, G. R. Fink, y J. B. Hicks. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor, New York, 1986.
- [310] A. M. Poveda Gabaldón. *El complejo histona acetiltransferasa B de la levadura *Saccharomyces cerevisiae**. Universitat de València, 2005.
- [311] J. S. Smith, C. B. Brachmann, L. Pillus, y J. D. Boeke. 1998. Distribution of a limited Sir2 protein pool regulates the strength of yeast rDNA silencing and is modulated by Sir4p. *Genetics* **149**:1205–1219.
- [312] B. K. Kennedy, M. Gotta, D. A. Sinclair, K. Mills, D. S. McNabb, M. Murthy, S. M. Pak, T. Laroche, S. M. Gasser, y L. Guarente. 1997. Redistribution of silencing proteins from telomeres to the nucleolus is associated with extension of life span in *S. cerevisiae*. *Cell* **89**:381–391.