





# **TESI DOCTORAL**

**Anàlisi funcional de la proteïna Scp160 de *Saccharomyces cerevisiae*.**

**Francesc Xavier Marsellach Castellví  
Barcelona, setembre de 2004**





Programa de Doctorat de Genètica  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona  
Bienni 1998-2000

**Anàlisi funcional de la proteïna Scp160 de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Memòria presentada per

**Francesc Xavier Marsellach Castellví**

Per optar al grau de

Doctor en Biologia

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció del Dr. Ferran Azorín al Departament de Biologia Molecular i Cel·lular de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC).

El Director,

La Tutora,

Ferran Azorín

Sílvia Atrian

L'Autor,

Francesc Xavier Marsellach Castellví

Barcelona, setembre de 2004



## **Agraïments:**

Doncs ja està!!, havia de passar, tard o d'hora a tots ens arriba l'hora de passar per l'escorxador. Abans, però, i després d'anys i panys de treballar com a estudiant, escrius una tesi, i el més important de tot, els agraïments, de tot el munt de paraules que hi poses en una tesi les que més fama tindran i les que seran més llegides.

Aquest agraïments volen fer el que el seu nom per si sol ja diu, donar les gràcies a tothom que d'alguna manera o altra ha contribuït durant tots aquest anys a què això de fer una tesi hagi estat no només possible, sinó una cosa de la qual no te'n penedeixes. Suposo que, arribat a aquest punt, tothom es troba amb la mateixa situació: en el moment en què tu escrius aquestes línies ja ets dels més vells del *lab*, i molta gent amb qui has compartit aquests anys ja no són al laboratori. La gent que està ara al lab, la gent que ja no hi és i aquells que ara comencen són tots part del *lab* on tu has fet la tesi i a tots ells els he d'agrair el fet d'estar aquí.

En aquests agraïments hi sortiran números com ara 514, 516, 519..., números que ja han deixat de voler dir quelcom, però que són part d'aquesta tesi.

Comencem pel principi que és com ha de ser: a la Dori voldria agrair-li tota l'ajuda que m'ha donat aquests anys, per alguna cosa sóc qui sóc i hi ha gent que no sap com em dic realment. Ella ha compartit amb mi més que ningú això d'enfrontar-nos durant tots aquest anys a les vigilines, la seva ajuda i el seu suport han estat vitals perquè aquesta tesi hagi pogut tirar endavant.

A tota la gent que en algun moment o altre han habitat en el 514 voldria agrair les bones estones que hi hem passat junts: Eva, Olga, Lorena, Silvia V, Silvia M, Sylvia, Marc, Marta, Anna i Josep.

A la gent del 516 amb qui he compartit molts moments "a la vora del foc" quan encara hi havia allí la flama: Montse, Àlex, Ana, Joan, Xavi, David i Jordi. Ells han hagut de suportar que en ple estiu vingués algú que no només els apagava l'aire condicionat, sinó que a més els encenia la flama.

A la gent del 519 voldria agrair l'ajuda que sempre he rebut per part de tothom: Alfred, Carles, Ariadna, Sílvia C, Lluïsa, Ivan, Sara, Gemma, Mònica, Sílvia P,

Marta i Ferran. Al Ferran vull agrair-li l'haver-me donat la possibilitat de realitzar una tesi i donar-me la motivació suficient per començar un projecte de recerca amb tot el que això comporta.

Al David, que va estar amb mi un estiu fent les seves pràctiques de carrera, vull agrair-li tot el que va fer per mi; part de la feina que aquí s'explica és seva.

Al Benjamí voldria agrair-li tota l'ajuda que ens ha donat en això de submergir-nos en el món dels llevats, la seva ajuda ha estat vital a l'hora d'enfrontar-nos amb aquest petits dimoniets.

A tota la gent del Departament de Biologia Molecular i Cel·lular i als Cristal·lògrafs per fer de la cinquena i sisena planta un lloc agradable on treballar: Maite, Jenny, Xavi F, Marc, Marta, Carol, Gemma, Veronique, Oliver, Nico, Jordi C, David, Natàlia, Laia, Rosa, Eva, Sònia T, Joaquim, Nacho, Javi, Sergi A, Gerardo, Ester, Sara, Marian, Raquel T, Mar, Sergi G, Iria, Jordi C, Elisa, Núria, Flora, Nicolai, Dominic, Enrique, Fatima, Maribel, Xavi C, Cristina, Rosa, Ignasi, Miquel, Raquel A, Raquel G, Dani, Àlex i Goretti.

Al Robin Allshire i a tota la gent del seu *lab*, per ser collonuts i acollir-me durant el meu "exili" edimburguès amb els braços oberts: Halim, Elaine, Diego, Yorgos, Sarah, Vera, Manu, Ricardo, Sharon, George i Thomas.

A la "catalan connection" d'Edimburg per tota l'ajuda que m'han donat i per fer més agradable la feixuga feina d'acabar una tesi a l'exili: Sònia, Carles, Àlex, Quim i Laura.

Al meu germà per ser-hi quan el necessitava i suportar un germanet que perd el temps amb aquestes històries de fer una tesi.

A la memòria del meu pare.

A la Marta, per massa coses, massa maques com per posar-les en uns agraïments d'una tesi. Si només ens fixem en la tesi, li he d'agrair la paciència de suportar els meus estats d'ànim en escriure-la (sort que em tenia a un colló de quilòmetres!!!!), la paciència de perdre una setmana de vacances esperant a què acabi d'una punyetera



vegada d'escriure la tesi i l'ajuda en la correcció de les faltes, que no en són pas poques!!! (aquests de ciències....).

Finalment, aquesta tesi està dedicada a la persona sense la qual aquest treball no hagués pogut ser mai ni tan sols un projecte. Ella és, sense cap mena de dubte, la persona que més ha treballat i més esforços ha hagut de fer perquè aquesta tesi hagi pogut ser una realitat...



**A la meva Mare...per tot.**



## **I. ÍNDEX**



# ÍNDIX DE MATÈRIES

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. ÍNDEX</b>   | <b>13</b> |
| <b>ÍNDIX DE MATÈRIES</b>  | <b>15</b> |
| <b>ÍNDIX DE FIGURES</b>   | <b>19</b> |
| <b>ÍNDIX DE TAULES</b>  | <b>23</b> |
| <b>ABREVIATURES</b>   | <b>25</b> |
| <b>II. INTRODUCCIÓ</b>  | <b>27</b> |
| <b>1.- Les vigilines i el domini KH</b>   | <b>29</b> |
| 1.1.- El domini KH  | 29        |
| 1.1.1.- Estructura i definició del domini KH  | 29        |
| 1.1.2.- Proteïnes amb dominis KH  | 32        |
| 1.1.3.- Funcions del domini KH  | 34        |
| 1.2.- Les vigilines   | 36        |
| 1.2.1.- Característiques generals de les vigilines  | 36        |
| 1.2.2.- Funcions de les vigilines   | 39        |
| 1.2.3.- DDP1 la vigilina de <i>Drosophila melanogaster</i>                                  | 43        |
| 1.2.4.- Scp160 la vigilina de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                               | 46        |
| <b>2.- L'heterocromatina i les seqüències telomèriques</b>                                  | <b>51</b> |
| 2.1.- Característiques generals de l'heterocromatina  | 51        |
| 2.1.1.- Composició Molecular de l'heterocromatina   | 52        |
| 2.1.2.- Funcions de l'heterocromatina   | 59        |
| 2.2.- Model general de formació de l'heterocromatina  | 60        |
| 2.3.- L'heterocromatina a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                                   | 65        |
| 2.3.1.- Silenciament a les seqüències telomèriques i al <i>locus</i> del <i>mating type</i> | 66        |
| 2.3.2.- Silenciament al <i>locus</i> del rDNA   | 69        |
| 2.4.- Els telòmers de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                                       | 70        |
| <b>III. OBJECTIUS</b>   | <b>75</b> |
| <b>IV. MATERIALS I MÈTODES</b>  | <b>79</b> |
| <b>1.- Tècniques de treball amb el llevat <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>               | <b>83</b> |
| 1.1.- Característiques generals de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com a organisme model    | 83        |
| 1.2.- Creixement i manteniment de soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                 | 84        |
| 1.2.1.- Composició dels medis utilitzats per créixer llevats                                | 84        |
| 1.2.2.- Creixement i manteniment rutinari de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                | 85        |

|   |            |
|---|------------|
| 1.2.3.- Anàlisi de creixement en placa de diferents soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>   | 86         |
| 1.3. Esporulació i microdissecció de tètades  | 87         |
| 1.3.1. Esporulació de soques diploides de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>   | 87         |
| 1.3.2.- Microdissecció de tètades   | 89         |
| 1.4.- Determinació del nivell de ploidia cel·lular mitjançant citometria de flux  | 89         |
| 1.5.- Transformació de DNA a cèl·lules de llevat  | 91         |
| 1.5.1.- Protocol de transformació de llevats mitjançant LiAc:   | 92         |
| 1.6. Tècniques de manipulació gènica a <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | 94         |
| 1.6.1.- Tècniques utilitzades per a l'obtenció dels <i>cassettes</i> de manipulació gènica  | 95         |
| 1.6.2.- Manipulacions gèniques realitzades en aquest treball  | 97         |
| 1.6.3.- Tècniques analítiques utilitzades per verificar la correcta integració dels <i>cassettes</i> de manipulació gènica en el genoma | 99         |
| 1.7.- Soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilitzades en aquest treball   | 100        |
| <b>2.- Mètodes de manipulació del DNA</b>   | <b>103</b> |
| 2.1.- Tècniques de DNA recombinant  | 103        |
| 2.1.1.- Minipreparacions de DNA plasmídic   | 103        |
| 2.1.2.- Maxipreparacions de DNA plasmídic   | 103        |
| 2.1.3.- Transformació del DNA a bacteris  | 103        |
| 2.1.4.- DNAs plasmídics utilitzats en aquest treball  | 104        |
| 2.1.5.- Soques bacterianes utilitzades per a la preparació de DNA plasmídic   | 107        |
| 2.2.- Obtenció de DNA genòmic a llevats   | 108        |
| 2.3.- <i>Southern Blot</i> de DNA genòmic de llevat.  | 108        |
| 2.3.1.- <i>Southern Blot</i> i hibridació de la membrana amb sondes marcades radioactivament.   | 109        |
| 2.3.2.- Obtenció de les sondes utilitzades per als estudis de longitud telomèrica   | 111        |
| 2.4.- Reacció en cadena de la polimerasa. PCR   | 112        |
| <b>3.- Mètodes generals per a l'estudi de proteïnes</b>   | <b>115</b> |
| 3.1.- Electroforesi de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)  | 115        |
| 3.2.- Expressió i purificació de proteïnes recombinants   | 117        |
| 3.2.1.- Obtenció de Scp160 fusionada a una cua d'histidines   | 117        |
| 3.2.2.- Expressió de proteïnes recombinants en soques d' <i>Escherichia coli</i>  | 117        |
| 3.2.3.- Purificació de Scp160 fusionada a la cua d'histidines   | 120        |
| 3.2.4.- Soques utilitzades per a la producció de proteïnes recombinants   | 121        |
| 3.3.- Protocol d'obtenció de proteïnes a llevat   | 121        |
| <b>4.- Tècniques Immunològiques</b>   | <b>123</b> |
| 4.1.- Obtenció i purificació d'anticossos específics  | 123        |
| 4.1.1.- Obtenció d'anticossos policlonals $\Delta$ -Scp160  | 123        |
| 4.1.2.- Purificació per afinitat de l'anticòs $\Delta$ -Scp160  | 124        |
| 4.2.- Transferència de proteïnes ( <i>Western blot</i> ) i immunodetecció   | 125        |
| 4.2.1.- Transferència de proteïnes  | 125        |
| 4.2.2.- Immunodetecció  | 126        |
| 4.3.- <i>Chromatin immunoprecipitation</i> (CHIP)   | 127        |
| 4.4.- Immunolocalitzacions  | 132        |



|   |            |
|---|------------|
| <b>V. RESULTATS I DISCUSSIÓ</b>   | <b>135</b> |
| <b>1.- Les cèl·lules <i>scp160</i> presenten problemes de segregació cromosòmica</b>  | <b>137</b> |
| 1.1.- Les cèl·lules <i>scp160</i> presenten un FACS aberrant  | 137        |
| 1.2.- L'expressió de la proteïna DDP1 complementa la deleció del gen <i>SCP160</i>  | 141        |
| 1.3.- Les cèl·lules <i>scp160</i> són hipersensibles al benomyl, una droga desestabilitzadora dels microtubuls  | 144        |
| 1.4.- En les cèl·lules <i>scp160</i> no es detecta un major defecte de segregació de plasmidis centromèrics   | 147        |
| <b>2.- Les cèl·lules <i>scp160</i> presenten un fenotip ts</b>  | <b>149</b> |
| <b>3.- Les cèl·lules <i>scp160</i> manifesten una desrepressió dels marcadors situats en regions telomèriques i en el locus del mating type.</b>  | <b>151</b> |
| <b>4.- Les cèl·lules <i>scp160</i> presenten un menor enriquiment de Sir3 en les seqüències telomèriques</b>  | <b>157</b> |
| <b>5.-Efectes que reforcen el silenciament telomèric són capaços de recuperar el defecte de silenciament ocasionat per la manca del gen <i>SCP160</i></b>   | <b>161</b> |
| 5.1.- La mutació del gen <i>RPD3</i> és capaç de recuperar el defecte de TPE ocasionat per la manca del gen <i>SCP160</i>   | 161        |
| 5.2.- La sobreexpressió de Sir3 és capaç de recuperar el defecte de silenciament ocasionat per la manca del gen <i>SCP160</i>   | 163        |
| <b>6.- Telòmers amb “enhanced TPE” presenten una major dificultat en l'establiment dels fenotips associats a la deleció del gen <i>SCP160</i></b>   | <b>165</b> |
| 6.1.- Les cèl·lules <i>RPD3</i> no manifesten defectes de TPE en delecionar el gen <i>SCP160</i> i estableixen amb una major dificultat el fenotip de ploidia observat en les cèl·lules <i>scp160</i> | 165        |
| 6.2.- En cèl·lules que sobreexpressen Sir3 la deleció de <i>SCP160</i> no té cap efecte significatiu sobre el silenciament telomèric  | 167        |
| 6.3.- Efecte de la deleció del gen <i>SCP160</i> en els fons mutants <i>rif1</i> , <i>rif2</i> i en el doble mutant <i>rif1 rif2</i>  | 168        |
| <b>7.- Les cèl·lules <i>scp160</i> presenten una desregulació de la llargada de les seqüències telomèriques</b>   | <b>173</b> |
| <b>8.- La sobreexpressió de <i>Scp160</i> no és capaç de recuperar el defecte de TPE</b>  | <b>177</b> |
| <b>9. Localització subcel·lular de la proteïna <i>Scp160</i></b>  | <b>181</b> |
| 9.1.- Immunolocalitzacions de la proteïna <i>Scp160</i>   | 182        |
| 9.2.- <i>Scp160</i> no pot ser detectada en les seqüències telomèriques mitjançant CHIP   | 183        |
| <b>VI. DISCUSSIÓ GENERAL</b>  | <b>187</b> |
| <b>Conservació funcional de les vigilines al llarg de l'evolució</b>  | <b>189</b> |
| <b>Contribució de les vigilines a l'estructura de l'heterocromatina</b>   | <b>191</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Contribució de les vigilines a la segregació cromosòmica</b> | <b>198</b> |
| <b>VII. CONCLUSIONS</b>   | <b>203</b> |
| <b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>                                       | <b>207</b> |
| <b>IX. APÈNDIX DE SEQÜÈNCIES</b>                                | <b>241</b> |
| <b>SCP160</b>   | <b>245</b> |
| <b>RPD3</b>   | <b>247</b> |
| <b>RIF1</b>   | <b>249</b> |
| <b>RIF2</b>   | <b>253</b> |

## ÍNDIX DE FIGURES

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura I.1.-</b> Comparació estructural dels diferents tipus de dominis KH.   | 31  |
| <b>Figura I.2.-</b> Representació estructural dels dos complexos presents en el cristall resolt del domini KH3 de la proteïna NOVA-2 unit a RNA.                         | 35  |
| <b>Figura I.3.-</b> Seqüència aminoacídica de la vigilina de pollastre.  | 38  |
| <b>Figura I.4.-</b> Immunolocalitzacions de DDP1 a cromosomes politènics.  | 46  |
| <b>Figura I.5.-</b> Esquema de la distribució dels dominis KH en diferents vigilines   | 48  |
| <b>Figura I.6.-</b> Modificacions posttraduccionals a les cues de les histones.  | 54  |
| <b>Figura I.7.-</b> Model general de formació de l'heterocromatina.  | 60  |
| <b>Figura I.8.-</b> Models de formació de l'heterocromatina a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .  | 62  |
| <b>Figura I.9.-</b> Esquema del <i>locus del mating type</i> en el cromosoma III de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .  | 67  |
| <b>Figura I.10.-</b> Esquema de diferents telòmers on es representen alineats pel "core X".  | 72  |
| <b>Figura M.1-</b> Esquema del cicle vital de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .  | 87  |
| <b>Figura M.2-</b> Imatge de contrast de fase de l'aspecte d'un asc.   | 88  |
| <b>Figura M.3.-</b> Estratègia utilitzada per a verificar la correcta integració dels <i>cassettes</i> de manipulació gènica   | 100 |
| <b>Figura M.4.-</b> Esquema de l'aparell de transferència utilitzat per a la transferència del DNA a la membrana de <i>nylon</i> .                                       | 110 |
| <b>Figura M.5.-</b> Gel de SDS-PAGE tenyit amb Coomassie de l'extracte proteic de les cèl·lules d' <i>Escherichia coli</i> que expressen la proteïna Scp160 recombinant. | 119 |
| <b>Figura M.6.-</b> Purificació de Scp160 fusionada a la cua d'histidines.   | 121 |
| <b>Figura M.7.-</b> <i>Western blot</i> realitzat sobre extractes de llevat amb l'anticòs $\Delta$ Scp160.   | 125 |
| <b>Figura M.8.-</b> Esquema de l'aparell utilitzat per realitzar la transferència <i>western blot</i> .  | 126 |
| <b>Figura M.9.-</b> Esquema de la tècnica de <i>Chromatin immunoprecipitation</i> .  | 128 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura R.1.-</b> FACS de les cèl·lules obtingudes a partir de l' esporulació d'un diploide heterozigot per <i>SCP160</i>  | 138 |
| <b>Figura R.2.-</b> FACS de diferents clons <i>scp160</i> obtinguts mitjançant tècniques de manipulació gènica directament sobre cèl·lules haploides   | 141 |
| <b>Figura R.3.-</b> FACS de cèl·lules que expressen de forma ectòpica la proteïna DDP1 de <i>Drosophila melanogaster</i> .   | 143 |
| <b>Figura R.4.-</b> Anàlisi de la capacitat de creixement que presenten les cèl·lules <i>scp160</i> en presència de diferents concentracions de benomyl.   | 145 |
| <b>Figura R.5.-</b> Regressió lineal entre la proporció de cèl·lules capaces de créixer en plaques que contenen 10 µg/ml de benomyl i el percentatge de cèl·lules de la població amb continguts de DNA Δ 2N. | 146 |
| <b>Figura R.6.-</b> Anàlisi de la capacitat de creixement de les soques <i>scp160</i> a temperatures elevades en comparació amb la capacitat de créixer de les soques <i>SCP160</i> .                        | 149 |
| <b>Figura R.7.-</b> Efecte de la disrupció del gen <i>SCP160</i> sobre el silenciament telomèric.  | 152 |
| <b>Figura R.8.-</b> Anàlisi en paral·lel dels fenotips de TPE i ploidia.   | 153 |
| <b>Figura R.9.-</b> Anàlisi en paral·lel de la presentació dels fenotips de TPE, <i>ts</i> i hipersensibilitat al benomyl observada en els mutants <i>scp160</i> .   | 154 |
| <b>Figura R.10.-</b> Efecte de la disrupció del gen <i>SCP160</i> sobre el silenciament del locus del <i>mating type</i> .   | 155 |
| <b>Figura R.11.-</b> Efecte de la disrupció de <i>SCP160</i> sobre el silenciament en el locus del rDNA.   | 156 |
| <b>Figura R.12.-</b> Anàlisi mitjançant CHIP de la presència de la proteïna Sir3 en les regions telomèriques.  | 158 |
| <b>Figura R.13.-</b> Anàlisi en paral·lel dels nivells de silenciament observats en plaques de FOA en la soca AYH2.45 i en els derivats <i>scp160</i> .  | 159 |
| <b>Figura R.14.-</b> Anàlisi mitjançant plaques de FOA dels nivells de silenciament de les soques <i>rpd3</i> generades a partir de les cèl·lules <i>scp160</i> .  | 162 |
| <b>Figura R.15.-</b> Efecte sobre el silenciament de la sobreexpressió de Sir3 en cèl·lules <i>scp160</i> .  | 164 |
| <b>Figura R.16.-</b> Anàlisi mitjançant plaques de FOA de l'establiment en un fons <i>rpd3</i> del fenotip de TPE en les cèl·lules <i>scp160</i> .   | 166 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura R.17.-</b> Anàlisi mitjançant plaques de FOA dels nivells de silenciament de les soques que sobreexpressen Sir3 i dels derivats d'aquestes soques que han perdut el plasmidi pSIR3.                     | 168 |
| <b>Figura R.18.-</b> Anàlisi mitjançant citometria de flux dels nivells de ploidia cèl·lules d'una cèl·lula <i>wild type</i> transformades amb el plasmidi pSIR3 i d'un derivat <i>scp160</i> d'aquesta.          | 168 |
| <b>Figura R.19.-</b> Anàlisi mitjançant plaques de FOA de l'establiment del fenotip de TPE en les cèl·lules <i>scp160</i> obtingudes a partir de cèl·lules mutants <i>rif1</i> , <i>rif2</i> i <i>rif1 rif2</i> . | 170 |
| <b>Figura R.20.-</b> Anàlisi per FACS de les cèl·lules <i>scp160</i> derivades en els fons <i>rif1</i> , <i>rif2</i> i <i>rif1 rif2</i> .   | 171 |
| <b>Figura R.21.-</b> Efecte de la disrupció del gen <i>SCP160</i> en la llargada de les seqüències telomèriques.  | 174 |
| <b>Figura R.22.-</b> Efecte de la disrupció del gen <i>SCP160</i> en la llargada de les seqüències telomèriques en els fons mutants <i>rif1</i> , <i>rif2</i> i <i>rif1 rif2</i> .                                | 175 |
| <b>Figura R.23.-</b> Sobreexpressió de la proteïna Scp160 en les cèl·lules transformades amb el plasmidi pSCP160.   | 178 |
| <b>Figura R.24.-</b> Efecte sobre el silenciament de la sobreexpressió de Scp160.   | 179 |
| <b>Figura R.25.-</b> Anàlisi per <i>Western blot</i> realitzat a partir d'extractes proteics de les soques on s'ha taguejat l'ORF de <i>SCP160</i> amb 3 còpies de l'epítot HA.                                   | 182 |
| <b>Figura R.26.-</b> Immunolocalització de la proteïna Scp160-3HA amb l'anticòs $\Delta$ HA.  | 183 |
| <b>Figura R.27.-</b> Anàlisi mitjançant CHIP de la presència de Scp160 a les regions telomèriques.  | 185 |



## **ÍNDEX DE TAULES**

|  |     |
|--|-----|
| <b>Taula M.1.-</b> Genotip de les soques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> emprades en aquest estudi.   | 102 |
| <b>Taula M.2.-</b> Soques bacterianes utilitzades per a la preparació de DNA plasmídic.  | 107 |
| <b>Taula M.3.-</b> Llistat d'oligonucleòtids utilitzats com a encebadors.  | 113 |
| <b>Taula M.4.-</b> Soques utilitzades per a la producció de proteïnes recombinants.  | 121 |
| <b>Taula R.1.-</b> Mitjana i error estàndard del percentatge de cèl·lules i del valor mitjà de la fluorescència de les cèl·lules <i>scp160</i> en comparació amb les cèl·lules <i>SCP160</i> . | 139 |
| <b>Taula R.2.-</b> Taula de contingència per comprovar la dependència entre la deleció del gen <i>SCP160</i> i la hipersensibilitat al benomyl.  | 146 |
| <b>Taula R.3.-</b> Taxa de pèrdua dels plasmidis centromèrics pRS303 i pRS304 en cèl·lules <i>SCP160</i> i <i>scp160</i> .   | 148 |
| <b>Taula R.4.-</b> Taula de contingència per comprovar la dependència entre la deleció del gen <i>SCP160</i> i el fenotip <i>ts</i> .  | 150 |
| <b>Taula R.5.-</b> Mitjana i desviació estàndard de la proporció de cèl·lules que presenten continguts de DNA $\Delta 2N$ .  | 150 |





## ABREVIATURES

|                |   |
|----------------|---|
| <b>3'- UTR</b> | <i>3' untranslated region</i>             |
| <b>DMSO</b>    | Dimetilsulfòxid                           |
| <b>DNA</b>     | Àcid desoxiribonucleic                    |
| <b>DNAsa</b>   | Desoxiribonucleasa                        |
| <b>DNMT</b>    | DNA metilasa                              |
| <b>dsRNA</b>   | <i>double stranded RNA</i>                |
| <b>EDTA</b>    | Àcid etilen-diamo-tetracètic              |
| <b>GFP</b>     | <i>Green fluorescent protein</i>          |
| <b>HAT</b>     | Acetil transferasa de histona             |
| <b>HDAC</b>    | Histona desacetilasa                      |
| <b>HDL</b>     | Lipoproteïna d'alta densitat              |
| <b>kDa</b>     | 10 <sup>3</sup> Daltons                   |
| <b>kpb</b>     | 10 <sup>3</sup> parells de bases          |
| <b>MCS</b>     | <i>Multi cloning site</i>                 |
| <b>mRNA</b>    | RNA missatger                             |
| <b>NES</b>     | <i>Nuclear export signal</i>              |
| <b>NLS</b>     | <i>Nuclear localisation signal</i>        |
| <b>OD</b>      | Densitat òptica                           |
| <b>ORF</b>     | <i>Open reading frame</i>                 |
| <b>pb</b>      | Parells de bases                          |
| <b>PCR</b>     | Reacció en cadena de la polimerasa        |
| <b>PEV</b>     | <i>Position effect variegation</i>        |
| <b>PGTS</b>    | <i>Posttranscriptional gene silencing</i> |
| <b>RMN</b>     | Ressonància magnètica nuclear             |
| <b>RNA</b>     | Àcid ribonucleic                          |
| <b>RNAi</b>    | RNA de interferència                      |
| <b>RNAsa</b>   | Desoxiribonucleasa                        |
| <b>rpm</b>     | Revolucions per minut                     |
| <b>siRNA</b>   | <i>small interference RNA</i>             |
| <b>SPB</b>     | <i>Spindle pole body</i>                  |
| <b>ssDNA</b>   | <i>single stranded DNA</i>                |
| <b>TGS</b>     | <i>Transcriptional gene silencing</i>     |
| <b>TPE</b>     | <i>Telomere position effect</i>           |
| <b>tRNA</b>    | RNA de transferència                      |
| <b>UV</b>      | Ultraviolat                               |



## **II. INTRODUCCIÓ**



## **1.- Les vigilines i el domini KH**

Les vigilines són proteïnes que es caracteritzen per estar formades gairebé exclusivament per 14 o 15 dominis KH disposats en tàndem (Henkel *et al.* 1992; Plenz *et al.* 1994; Weber *et al.* 1997). El domini KH no és un domini exclusiu de les vigilines, sinó que es troba present en moltes altres proteïnes, tant a organismes procariotes com a cèl·lules eucariotes, indicant un origen ancestral d'aquest domini en l'evolució.

En la possible funcionalitat d'aquestes proteïnes l'estructura del domini KH juga un paper clau. Les característiques d'aquest, juntament amb les peculiaritats de les vigilines, seran revisats en aquest apartat.

### **1.1.- El domini KH**

El domini KH rep el seu nom de la identificació com a un motiu conservat present en la proteïna hnRNP-K (per "K Homology") (Siomi *et al.* 1993) i ja prèviament, de forma independent, havia estat identificat com una repetició present en 14 còpies en la vigilina de pollastre (Henkel *et al.* 1992).

La identificació del domini en la proteïna hnRNP-K, una proteïna que s'havia vist que podia unir RNA (Matunis *et al.* 1992) i la presència d'aquest domini en altres proteïnes relacionades amb el metabolisme del RNA va portar a suggerir que es tractava d'un domini implicat en la unió de RNA (Siomi *et al.* 1993). Posteriorment, també es va associar aquest domini a la unió de DNA de cadena senzilla (Takimoto *et al.* 1993; Dejgaard and Leffers 1996), essent, per tant, definit com un domini capaç d'unir àcids nucleics de cadena senzilla.

#### **1.1.1.- Estructura i definició del domini KH**

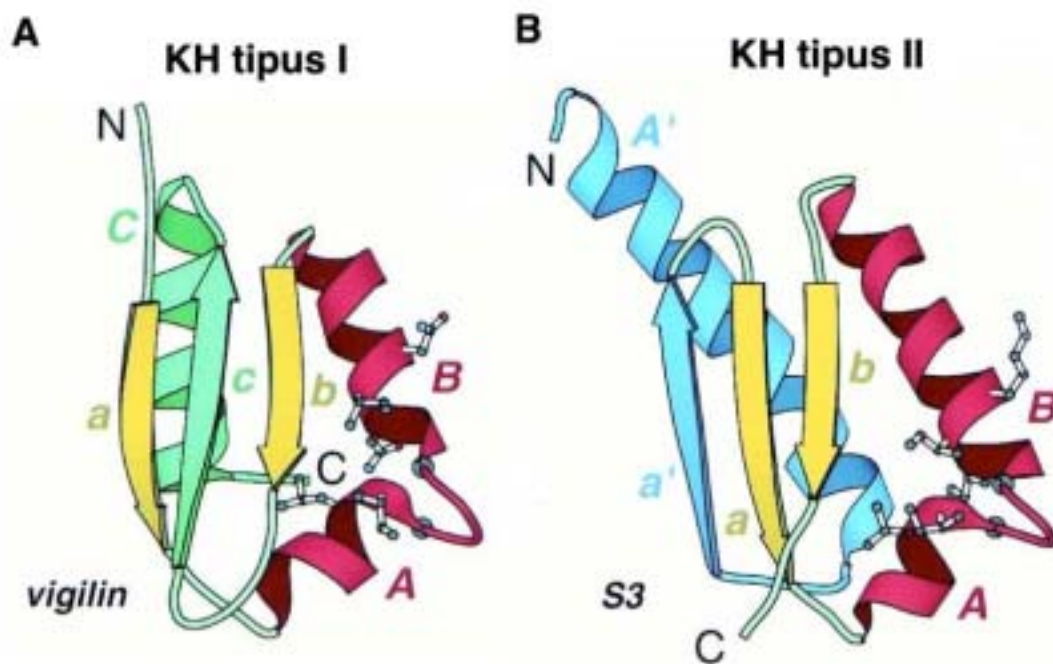
L'estructura tridimensional d'alguns dominis KH ha estat resolta mitjançant RMN (Ressonància Magnètica Nuclear) i cristal·lografia de raigs X, tant de diferents dominis aïllats com de dominis units als seus substrats, RNA i ssDNA (Castiglione

Morelli *et al.* 1995; Musco *et al.* 1996; Musco *et al.* 1997; Baber *et al.* 1999; Chen *et al.* 1999; Lewis *et al.* 1999; Jensen *et al.* 2000; Worbs *et al.* 2001; Braddock *et al.* 2002a; Braddock *et al.* 2002b; Huang *et al.* 2003). La resolució de l'estructura tridimensional d'aquest domini ha portat a diferents revisions de la definició del domini en si.

Actualment s'ha proposat la classificació dels dominis KH en dos tipus diferents segons els seu plegament: els dominis KH de tipus I o de tipus II, com s'han anomenat, es diferencien en el seu plegament i malgrat que presenten una arquitectura molt similar, la disposició topològica de les diferents cadenes és completament diferent en ambdós tipus (Grishin 2001). L'arquitectura que presenten aquests dominis en l'espai consta de tres cadenes  $\Delta$  disposades en forma de fulla  $\Delta$ , que formen una estructura bastant plana sobre la qual s'empaqueten tres hèlix  $\Delta$ , quedant totes elles en el mateix canto de la fulla  $\Delta$ . Els residus hidrofòbics de la fulla  $\Delta$  queden tots en la mateixa cara de la fulla  $\Delta$  empaquetats contra els residus hidrofòbics de les tres hèlix  $\Delta$ , formant el nucli central hidrofòbic del domini (Castiglione Morelli *et al.* 1995; Musco *et al.* 1996; Musco *et al.* 1997; Grishin 2001) (figura I.1)

Els diferents tipus de domini KH comparteixen els motius estructurals  $\Delta\Delta\Delta$  i es diferencien per la presència d'una extensió C-terminal  $\Delta\Delta$  en els dominis de tipus I i per la presència d'una extensió N-terminal  $\Delta\Delta$  en els dominis de tipus II, ambdós necessaris per al plegament de la proteïna. Inicialment el domini KH havia estat descrit en funció de l'alineament de seqüència per les regions que componen les estructures  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  del domini KH tipus I (Siomi *et al.* 1993), però l'observació que el domini descrit originalment no era capaç de plegar-se correctament sense la presència d'una regió C-terminal, que tenia propensió a formar estructures del tipus hèlix  $\Delta$ , i que la presència d'aquest domini C-terminal era comú a la majoria de dominis KH, va portar a la redefinició del domini anomenant com a dominis maxi-KH aquells que presentaven l'extensió C-terminal i com a dominis mini-KH aquells que no la presentaven, assumint que el paper crucial que tenia l'extensió C-terminal en els dominis maxi-KH per al seu plegament era adoptat per altres regions de la proteïna en els dominis mini-KH (Musco *et al.* 1996; Musco *et al.* 1997).

Posteriorment, la resolució de l'estructura tridimensional de la proteïna ERA (Chen *et al.* 1999) i de la proteïna ribosomal S3 (Wimberly *et al.* 2000), que presentaven dominis KH del tipus II en ambdós casos (vegeu l'apartat 1.1.2), va puntualitzar que els dominis mini-KH no només no presentaven l'hèlix  $\Delta$  més C-terminal, sinó que tampoc formava part de la seva estructura la cadena  $\Delta$  més C-terminal del domini que donava lloc a la cadena  $\Delta$  central dels dominis maxi-KH (figura I.1A cadena *c*), i que aquests motius estructurals eren substituïts en aquestes proteïnes per la presència d'una hèlix  $\Delta$  i d'una cadena  $\Delta$  addicionals situats a la part N-terminal del domini. Els dominis inicialment definits com a maxi-KH i mini-KH han estat anomenats posteriorment com a dominis de tipus I i dominis de tipus II, donat que entre ells no hi ha cap diferència de mida que justifiqui els prefixos maxi i mini.



**Figura I.1.-** Comparació estructural dels diferents tipus de dominis KH. (A) Els dominis de tipus I presenten un plegament del tipus  $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$  amb les cadenes  $\Delta$  en disposició antiparal·lela amb l'ordre  $\Delta 1(a)$ - $\Delta 3(c)$ - $\Delta 2(b)$  a l'espai. (B) Els dominis de tipus II presenten un plegament del tipus  $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$  amb una fulla  $\Delta$  mixta amb l'ordre  $\Delta 1(a')$ - $\Delta 2(a)$ - $\Delta 3(b)$  a l'espai. L'extrem N- i C-terminal de les proteïnes es mostra a la figura. Els elements estructuralment comuns als dos dominis es mostren amb el mateix color; les cadenes  $\Delta 1(a)$  i  $\Delta 2(b)$  del domini de tipus I que es corresponen amb les cadenes  $\Delta 2(a)$  i  $\Delta 3(b)$  del domini de tipus II es mostren en groc i les hèlixs  $\Delta 1(A)$  i  $\Delta 2(B)$  del domini de tipus I que es corresponen amb l'hèlix  $\Delta 2(A)$  i  $\Delta 3(B)$  del domini de tipus II es mostren en vermell. Els elements diferencials entre ambdós es mostren en verd en el domini de tipus I,  $\Delta 3(c)$  i  $\Delta 3(c')$  i en blau en el domini de tipus II,  $\Delta 1(A')$  i  $\Delta 1(a')$ . Adaptat de (Grishin 2001).

En ambdós casos es troben conservades les estructures al voltant del consensu VIGXXGXXI, localitzat en les hèlix  $\Delta 1$  i  $\Delta 2$  en els dominis de tipus I ( $\Delta 2$  i  $\Delta 3$  en els

dominis de tipus II; hèlix A i B en la figura I.1), aquesta seqüència es troba altament conservada en els dominis KH, essent X qualsevol aminoàcid, però amb preferència per als residus carregats positivament. El tetrapèptid GXXG, dins d'aquest motiu, es troba situat en el loop que connecta les dues hèlix  $\Delta$  essent, per tant, un motiu la conservació del qual no es pot explicar per criteris estructurals. Donada aquesta conservació, així com l'alta presència de residus carregats positivament en aquesta regió, es va proposar que aquesta regió participava en la interacció amb els àcids nucleics tal com ha estat confirmat per la resolució de l'estructura d'aquest dominis units a RNA i ssDNA (vegeu l'apartat 1.1.3). Una excepció a aquest alt grau de conservació del tetrapèptid GXXG es troba en la proteïna Rbfa procariota on aquest motiu es troba substituït pel motiu AXG molt conservat entre diferents espècies en aquestes proteïnes (Huang *et al.* 2003).

Els dominis de tipus I presenten un *loop* flexible que connecta la cadena  $\Delta 2$  amb la cadena  $\Delta 3$ ; les seqüències d'aquests *loops* no es troben conservades en els diferents dominis KH, presentant llargues insercions de fins a mes de 50 residus, essent aquesta la regió que presenta una major variabilitat en els dominis de tipus I. En la família de proteïnes STAR/GSG en aquest *loop* presenten insercions amb residus conservats entre els diferents membres de la família, indicant un possible paper funcional d'aquesta regió en aquesta família de proteïnes (Musco *et al.* 1996). Aquesta regió del domini KH de tipus I és sovint referida com el *loop* variable.

### **1.1.2.- Proteïnes amb dominis KH**

Encara que només es coneix el plegament exacte d'aquelles proteïnes de les quals s'ha determinat l'estructura tridimensional, fins a la data només s'han descrit proteïnes que presentin el plegament de tipus I en proteïnes d'organismes eucariotes i proteïnes amb el plegament de tipus II en proteïnes d'organismes procariotes (Huang *et al.* 2003). Així doncs, podem parlar del domini KH de tipus I com el domini KH eucariota i del domini KH de tipus II com el domini KH procariota, no obstant aquesta correlació encara resta per acabar d'establir a mesura que es resolen més estructures.



Entre les proteïnes procariotes amb dominis KH dels quals s'ha resolt l'estructura i s'ha comprovat que presenten un plegament del tipus II hi ha la proteïna ribosomal S3 que forma part de la subunitat 30S del ribosoma (Wimberly *et al.* 2000), la GTPasa ERA (Chen *et al.* 1999), el factor de transcripció NusA (Gopal *et al.* 2001; Worbs *et al.* 2001) i la proteïna RbfA (Ribosome-binding Factor A) (Huang *et al.* 2003). En altres proteïnes procariotes que presenten dominis KH, com per exemple la ribonucleasa PNP, encara resta per determinar quin és el plegament que adopta la proteïna.

Entre les proteïnes eucariotes amb domini KH on s'ha determinat l'estructura tridimensional d'algun dels seus dominis KH hi ha les vigilines, de les quals s'ha determinat l'estructura tridimensional d'un dels 15 dominis presents en la vigilina humana (Musco *et al.* 1996); la proteïna FMR1 (Musco *et al.* 1997), la manca o mutacions de la qual són responsables del Síndrome de Fràgil X, una de les malalties de retard mental més comuna en humans; les proteïnes NOVA-1 i NOVA-2 (Lewis *et al.* 1999), proteïnes que estan implicades en el desenvolupament de la malaltia POMA ocasionada per l'aparició en aquests pacients d'antígens contra les pròpies proteïnes NOVA-1 i NOVA-2; la proteïna hnRNP-K, ribonucleoproteïna on va ser per primera vegada descrit el domini KH, de la qual s'ha descrit l'estructura del domini KH3 aïllat (Baber *et al.* 1999) i unit a ssDNA (Braddock *et al.* 2002a); i la proteïna FBP (FUSE Binding protein) de la qual s'ha resolt l'estructura unida al element FUSE que es troba en forma de DNA de cadena senzilla en el promotor del gen *c-myc* (Musco *et al.* 1996).

S'han descrit moltes més proteïnes eucariotes amb dominis KH que pels seus alineaments de seqüències són compatibles amb el fet de presentar un plegament del tipus  $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$  característic dels dominis de tipus I, com ara la proteïna Mer1 de *Saccharomyces cerevisiae*, proteïna implicada en la regulació del *splicing* (Nandabalan *et al.* 1993); la proteïna PSI també implicada en la regulació del *splicing* a *Drosophila* (Siebel *et al.* 1995); les proteïnes  $\Delta$ CP-1 i  $\Delta$ CP-2, implicades en l'estabilització del mRNA de la  $\Delta$ -globina (Kiledjian *et al.* 1995); i les proteïnes de la família STAR/GSG, caracteritzades per presentar un domini d'unió a RNA d'aproximadament 200 aminoàcids anomenat STAR que inclou entre altres elements estructurals un domini KH (Vernet and Artzt 1997). Són membres de la família de

proteïnes STAR/GSG, entre d'altres, la proteïna gld-1 de *Caenorhabditis elegans*, una proteïna supressora de tumors (Jones and Schedl 1995); la proteïna Sam68, una proteïna associada a RNA (Lock *et al.* 1996); i la proteïna Who/How, una proteïna d'unió a RNA implicada en el control de l'activitat muscular (Zaffran *et al.* 1997).

Malgrat que no s'ha descrit cap proteïna d'organismes eucariotes que presenti el plegament de tipus II aquest fet no es pot descartar ja que existeixen homòlegs a organismes eucariotes de les proteïnes ERA i S3, les quals adopten una estructura de tipus II en les proteïnes procariotes.

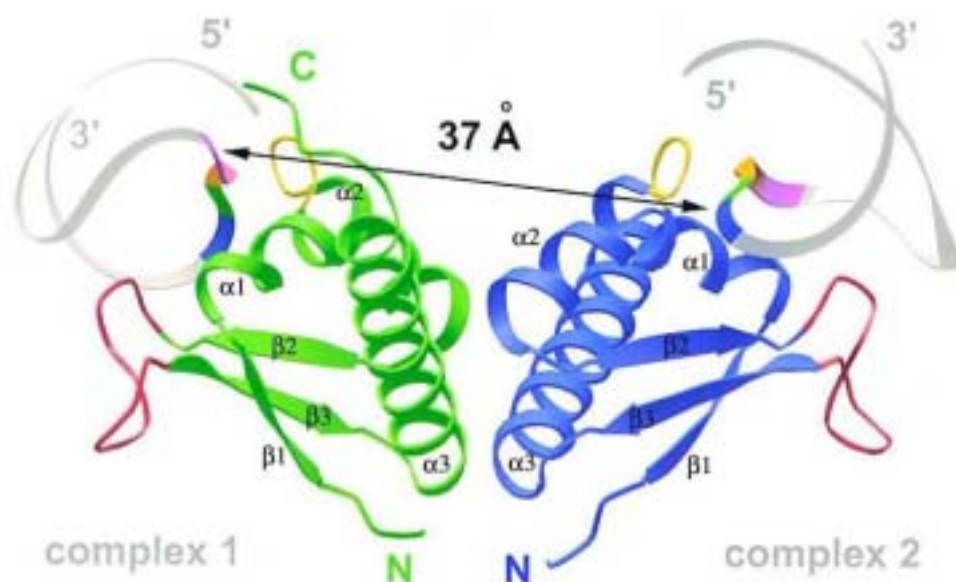
### **1.1.3.- Funcions del domini KH**

Els dominis KH han estat relacionats amb la unió a àcids nucleics de cadena senzilla tant RNA com ssDNA, així com també amb la capacitat de les proteïnes amb dominis KH de formar dímers.

Les proves de la unió a RNA van des de l'entrecruament de molècules de RNA a la proteïna ribosomal S3 (Urlaub *et al.* 1995), fins a estudis de l'associació *in vivo* de les proteïna  $\Delta$ CP amb mRNAs (Ji *et al.* 2003), així com moltes altres evidències que associen aquests dominis a la unió de RNAs de diferents tipus (Leffers *et al.* 1995; Dejgaard and Leffers 1996; Kruse *et al.* 1996; Dodson and Shapiro 1997; Kanamori *et al.* 1998; Lang and Fridovich-Keil 2000; Lee and Schedl 2001; Git and Standart 2002; Irie *et al.* 2002; Li *et al.* 2003). També hi ha diferents evidències de l'associació d'aquests dominis a regions de ssDNA (Duncan *et al.* 1994; Michelotti *et al.* 1996; Tomonaga and Levens 1996; Cortes *et al.* 1999; Cortes and Azorin 2000; Liu *et al.* 2000).

Fins a la data s'han resolt estructures de dominis KH units als seus substrats, tant RNA com ssDNA, només amb proteïnes que presenten un domini amb un plegament de tipus I, no havent-se descrit l'estructura de cap proteïna amb el domini de tipus II associada als seus substrats. S'han resolt: l'estructura del domini KH3 de la proteïna NOVA-2 unit a RNA (Lewis *et al.* 2000) i l'estructura dels dominis KH3 i KH4 de la proteïna FBP (Braddock *et al.* 2002b) i el domini KH3 de la proteïna hnRNP-K units a ssDNA (Braddock *et al.* 2002a). Les dades observades en aquestes estructures revelen que la superfície d'unió a àcids nucleics no està formada solament per la

fulla  $\Delta$  o les cadenes  $\Delta$  tal com havia estat proposat (Castiglione Morelli *et al.* 1995; Musco *et al.* 1996; Musco *et al.* 1997; Baber *et al.* 1999; Lewis *et al.* 1999), sinó que està formada per una plataforma hidrofòbica constituïda per les hèlix  $\Delta 1$  i  $\Delta 2$  i l'extrem més C-terminal de la cadena  $\Delta 2$  (Lewis *et al.* 2000); els àcids nucleics quedarien situats en el solc que formen aquestes estructures flanquejats pels dos *loops* presents en aquesta estructura, el *loop* format pel motiu conservat GXXG entre les hèlix  $\Delta 1$  i  $\Delta 2$  i el *loop* variable entre les cadenes  $\Delta 2$  i  $\Delta 3$  (figura I.2). En el centre del solc quedarien situats residus hidrofòbics i en els extrems d'aquest residus carregats positivament. Comparant les estructures resoltes de dominis units a RNA i a ssDNA s'observa que la superfície encarregada d'interaccionar amb els àcids nucleics és la mateixa en ambdós casos, però amb algunes diferències significatives: en el complex de la proteïna FBP amb ssDNA s'observen contactes dels àcids nucleics amb l'hèlix  $\Delta 2$  i l'extrem més amino terminal de la cadena  $\Delta 2$  que no s'observen en el complex entre NOVA-2 i el RNA, on, per contra, sí que s'observen contactes entre el RNA i el *loop* variable no observats en els complexos amb ssDNA (Braddock *et al.* 2002b).



**Figura I.2.-** Representació estructural dels dos complexos presents en el cristall resolt del domini KH3 de la proteïna NOVA-2 unit a RNA. Les cadenes proteïques dels diferents complexos presents en el cristall es mostren en verd i blau respectivament amb el *loop* GXXG en groc i el *loop* variable en vermell en les dues cadenes. La cadena de RNA es representa en gris amb els nucleòtids implicats en la formació dels contactes amb la proteïna acolorits amb diferents colors. Extret de (Lewis *et al.* 2000)

Entre els dominis KH de tipus II s'ha proposat l'existència de dos classes diferents de dominis segons la seva unió a RNA: per una banda el domini de la proteïna ERA presenta una distribució de càrrega superficial similar a l'observada en els dominis de tipus I en les regions equivalents a la zona d'unió a àcids nucleics, amb residus bàsics situats en la primera hèlix  $\Delta$  i la segona cadena  $\Delta$  dels motius estructurals  $\Delta\Delta\Delta$  comuns entre els dominis de tipus I i els dominis de tipus II (hèlix *A* i cadena *b* en la figura I.1), indicant que probablement aquest domini reconeix els àcids nucleics utilitzant la mateixa superfície que la utilitzada pels dominis de tipus I; però per altra banda els dominis de les proteïnes S3, NusA i RbfA presenten una distribució de càrrega superficial negativa en la mateixa regió, presenten superfícies carregades positivament al voltant de la segona hèlix  $\Delta$  i la segona cadena  $\Delta$  de l'element estructuralment comú  $\Delta\Delta\Delta$  (hèlix *B* i cadena *b* en la figura I.1), indicant que hi podria haver dos tipus de dominis KH de tipus II en funció de la regió utilitzada per interaccionar amb els àcids nucleics (Huang *et al.* 2003).

El domini KH també sembla estar implicat en l'establiment d'interaccions proteïna-proteïna; entre les proteïnes amb domini KH cada vegada es veuen més exemples de proteïnes que formen dímers (Chen *et al.* 1997; Kim *et al.* 2000), havent-se observat que els dominis KH són capaços de formar dímers tant en solució, observat mitjançant estudis de RMN (Ramos *et al.* 2002), com en les estructures cristal·lines on s'han observat com a dímers (Lewis *et al.* 1999; Lewis *et al.* 2000) (figura I.2) i que en ambdós casos utilitzen la mateixa superfície per a les interaccions entre els diferents dominis KH (Ramos *et al.* 2002). Aquest fet pot jugar un paper clau en la unió dels àcids nucleics per les proteïnes que presenten més d'un domini KH on la dimerització pot ésser un factor determinant en la regulació de l'especificat d'unió de la proteïna a àcids nucleics concrets.

## **1.2.- Les vigilines**

### **1.2.1.- Característiques generals de les vigilines**

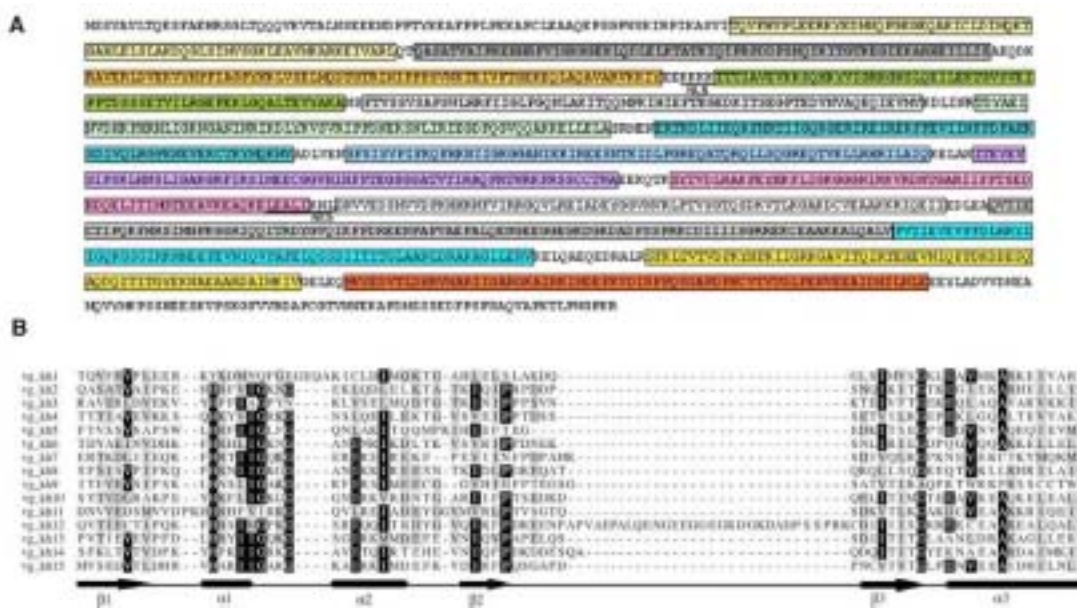
El domini KH és un domini altament conservat que es troba present en moltes proteïnes diferents d'organismes que cobreixen tot el ventall evolutiu existent, essent

el segon motiu d'unió a RNA més abundant després del domini RRM (RNA Recognition Motif) (Burd and Dreyfuss 1994). Entre les proteïnes que contenen el domini KH destaca la presència d'un nombre important de proteïnes que contenen més d'un domini KH en la seva seqüència, com per exemple les proteïnes NOVA-1 i NOVA-2 que presenten 3 còpies cadascuna (Lewis *et al.* 1999) o la proteïna Bicardal C que presenta 5 dominis diferents (Mahone *et al.* 1995); alhora, la majoria de les proteïnes que presenten dominis KH presenten també altres motius d'unió a RNA com ara els motius RGG i RNP (Rohwedel *et al.* 2003). Entre aquestes proteïnes amb més d'un domini KH destaca la presència d'un grup de proteïnes, les vigilines, que estan formades gairebé exclusivament per un nombre alt (de 14 a 15) de dominis KH del tipus I disposats l'un al darrera de l'altre de forma consecutiva quedant només regions curtes als extrems N-terminal i C-terminal que no estan formant part de cap dominis KH (figura I.3). Homòlegs per a les vigilines han estat descrits en humans, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Schizosaccharomyces pombe* i *Saccharomyces cerevisiae* entre d'altres organismes dels mateixos grups evolutius, però no han pogut ser trobats en el genoma d'*Arabidopsis thaliana* (Lorkovic and Barta 2002), essent, per tant, les vigilines un grup de proteïnes que sembla estar conservat en els grups dels fongs i els metazous.

Les vigilines dels metazous presenten una elevada homologia entre elles amb la majoria dels dominis KH conservats en totes elles i amb la presència d'un *loop* variable molt més llarg en el domini 12 que en la resta de dominis, essent aquests d'entre 6 a 8 aminoàcids en la majoria de dominis. Per contra, els dominis KH de les vigilines de *Saccharomyces cerevisiae* i de *Schizosaccharomyces pombe* són molt més heterogenis quant a mida, i en el cas particular de la vigilina de *Saccharomyces cerevisiae*, la proteïna Scp160, un nombre elevat de dominis estan degenerats (vegeu l'apartat 1.2.4). Les vigilines deuen el seu nom al motiu VIG conservat que es localitza en els dominis KH1 i KH3 de la vigilina de pollastre (Schmidt *et al.* 1992).

Inicialment es van detectar només la presència de 14 còpies del domini KH mitjançant l'alineament de seqüència, però la resolució de l'estructura tridimensional dels dominis KH ha permès identificar la presència d'un quinzè domini degenerat a l'extrem més N-terminal de la proteïna, present en la majoria de membres de la

família (Musco *et al.* 1996; Lewis *et al.* 1999). Aquesta observació, a més a més, coincidia amb l'organització genòmica del gen; en la vigilina humana i de pollastre s'havia observat que gairebé tots els dominis KH estan codificats per dos exons cadascun, un que codifica per a la major part del domini i un altre que codifica per a l'última hèlix  $\Delta$  del domini (Henkel *et al.* 1992), aquesta organització genòmica es manté en aquest domini addicional (Kruse *et al.* 1998b).



**Figura I.3.-** (A) Seqüència aminoacídica de la vigilina de pollastre amb cadascun dels diferents dominis KH representats en un color diferent. Es mostren subratllats el senyal de localització nuclear (NLS) i el senyal d'export nuclear (NES). (B) Alineament de seqüència dels diferents dominis de la vigilina de pollastre amb la corresponent predicció d'estructura secundària a la base. Es mostren en negre els residus que són idèntics i en gris els que són similars; en ambdós casos es considera que els residus són idèntics o similars quan aquest fet es manifesta en el 50% o més de les seqüències presents. Alineament adaptat de (Lewis *et al.* 1999).

Altres motius conservats en totes les vigilines són la presència de senyals de localització nuclear (NLS) i d'export nuclear (NES) en totes les vigilines descrites, senyals que, no obstant, no es troben molt conservades entre les diferents vigilines; en les vigilines de ratolí, rata, home i pollastre hi ha una senyal de localització nuclear entre els dominis KH3 i KH4 que s'ha demostrat que és funcional (Kugler *et al.* 1996) (figura I.3), mentre que en d'altres vigilines s'ha descrit la localització de senyals de localització nuclear a d'altres regions de la proteïna (Rohwedel *et al.* 2003). També s'ha detectat la presència en totes les vigilines de senyals d'export nuclear que de la mateixa manera que les NLS no es troben en la mateixa posició a totes les vigilines descrites, malgrat que en la majoria es localitzen entre el domini KH10 i KH11 (figura I.3), excepte en la proteïna Scp160 on es localitza a l'extrem

N-terminal de la proteïna (Weber *et al.* 1997); tot i que s'han trobat senyals d'export nuclear en totes les vigilines descrites encara no hi ha cap prova experimental que aquestes seqüències siguin funcionals (Rohwedel *et al.* 2003).

### **1.2.2.- Funcions de les vigilines**

La conservació en un ampli ventall evolutiu d'espècies d'aquesta peculiar estructura que presenten les vigilines planteja el dubte sobre si la repetitivitat que presenten aquestes proteïnes és un factor determinat per la seva funcionalitat, cosa que ha forçat al manteniment de proteïnes amb aquesta estructura al llarg de l'evolució dels grups d'organismes on es troben presents les vigilines, o de si simplement aquesta peculiar estructura li confereix a aquestes proteïnes una elevada flexibilitat funcional permetent que l'acumulació de successives mutacions en els diferents dominis KH provoqui canvis en la funcionalitat de la proteïna a causa de canvis en l'especificitat d'unió a diferents substrats. El fet és que la funció o funcions que aquestes proteïnes puguin estar realitzant a la cèl·lula es desconeixen, havent-se proposat diferents funcions molt disperses a causa d'haver estat identificada de forma independent, en diferents organismes, per grups treballant en processos molt diferents. Els tres principals processos a què s'han associat aquestes proteïnes són: regulador de la síntesi proteica com a regulador de la traducció de forma general a tota la cèl·lula (Kruse *et al.* 1996; Kruse *et al.* 1998a; Kruse *et al.* 1998b; Kruse *et al.* 2000; Hilgendorf *et al.* 2001; Hilgendorf *et al.* 2003; Schuh *et al.* 2003), regulador de mRNAs específics (Dodson and Shapiro 1997; Kanamori *et al.* 1998; Cunningham *et al.* 2000; Dodson and Shapiro 2002; Goolsby and Shapiro 2003; Li *et al.* 2003; Mendelsohn *et al.* 2003) i contribucions a la segregació dels cromosomes en mitosi (Wintersberger *et al.* 1995; Cortes *et al.* 1999; Cortes *et al.* 2003).

Tal com ja s'ha comentat, les vigilines van ser inicialment aïllades en processos molt disperses; la vigilina de pollastre va ser aïllada en un *screening* per a trobar gens que fossin expressats de forma diferencial en condrocits, un tipus cel·lular que forma part del teixit cartilaginós (Schmidt *et al.* 1992); la vigilina humana es va clonar en intentar caracteritzar una proteïna amb capacitat d'unió a HDLs, lipoproteïnes d'alta densitat, fet pel qual se la va anomenar HBP (HDL Binding Protein) (McKnight *et al.* 1992); Scp160 va ser clonada de forma fortuïta en provar un anticòs que havia

estat realitzat contra una fracció protèica del llevat (Wintersberger *et al.* 1995), i ja prèviament s'havia descrit un clon parcial que codificava per part de la proteïna, també aïllat per la seva capacitat de reaccionar amb un anticòs, en aquest cas fet contra una proteïna que copurificava amb la cromatina (Delahodde *et al.* 1986); la vigilina de *Xenopus laevis* va ser aïllada com una proteïna que s'unia al mRNA de la vitel·logenina i l'estabilitzava (Dodson and Shapiro 1997); i la vigilina de *Drosophila melanogaster*, la proteïna DDP1, va ser clonada per la seva capacitat d'unir-se a la cadena rica en pirimidines del dodeca-satèl·lit, un satèl·lit centromèric de *Drosophila melanogaster* (Cortes *et al.* 1999) (vegeu l'apartat 1.2.3).

A part dels tres processos principals als quals s'han associat aquestes proteïnes, esmentats anteriorment, l'aïllament com a proteïna amb capacitat d'unió a HDL va portar a proposar que aquesta proteïna podia funcionar com a receptor de HDLs (McKnight *et al.* 1992). Aquesta hipòtesi se sustenta, segons els autors, pel fet que tant la capacitat d'unir HDLs com l'expressió de la vigilina incrementen en presència de colesterol en el medi, així com per observacions posteriors que anticòsos contra la vigilina eren capaços d'inhibir parcialment la unió de HDLs (Nazih-Sanderson *et al.* 1997). No obstant això, l'estructura de la proteïna, formada únicament per dominis d'unió a àcids nucleics sense cap domini transmembrana ni d'altres característiques típiques d'un receptor de membrana, és un fort argument en contra d'aquesta hipòtesi. Tot i que els estudis inicials situaven aquestes proteïnes a la membrana citoplasmàtica, estudis posteriors semblen indicar que les vigilines no es localitzen en aquest compartiment cel·lular (Neu-Yilik *et al.* 1993; Wintersberger *et al.* 1995). El fet d'estar regulat pels nivells de colesterol, així com que es trobi sobreexpressat en plaques arterioscleròtiques porten a implicar les vigilines en el metabolisme dels esterols (Chiu *et al.* 1997), no obstant això, tot i que els nivells de mRNA de la vigilina incrementen amb el colesterol els nivells de proteïna no semblen estar afectats (Marcil *et al.* 1999). Donada la manca d'evidències que impliquin les vigilines en aquests processos i la implicació d'aquestes de forma més clara en altres aspectes cel·lulars, aquesta hipòtesi sembla estar descartada i avui dia ningú relaciona les vigilines amb aquests processos.



**Les vigilines com a reguladors generals de la síntesi protèica:** Les dades que recolzen aquesta hipòtesi es fonamenten en què s'observa una major expressió de les vigilines en cèl·lules que produeixen un gran quantitat de proteïnes, en què anticossos contra la vigilina són capaços d'inhibir la síntesi de proteïnes en experiments de traducció *in vitro*, i en què les vigilines es troben formant part de complexos que contenen tRNA tant en el nucli com en el citoplasma (Kruse *et al.* 1996; Kruse *et al.* 1998b). Segons aquests autors, aquests complexos, contenen una composició protèica diferencial en els dos compartiments, a jutjar per l'aspecte dels gels de SDS tenyits en plata dels complexos aïllats a partir d'extractes nuclears o d'extractes citoplasmàtics. En ambdós casos forma part del complex el factor d'elongació 1Δ, i en els complexos nuclears es troba, a més a més, la proteïna exportin-t, identificada com un factor implicat en el transport dels tRNAs del nucli al citoplasma (Kutay *et al.* 1998). Segons aquesta hipòtesi el paper de les vigilines seria formar part del complexos implicats en l'exportació i processament dels tRNAs contribuint d'aquesta manera a la síntesi protèica general de la cèl·lula (Kruse *et al.* 2000). Aspectes que corroborarien aquesta hipòtesi serien la capacitat d'unir tRNAs de les vigilines, el fet que la injecció de vigilines estimula l'exportació de tRNA, que la injecció d'anticossos contra les vigilines inhibeix aquesta estimulació, i que, segons aquests autors, la injecció de DNA *antisense* contra les vigilines és capaç de provocar la disminució de la síntesi d'altres proteïnes, mesurat com a la producció d'enzims digestius en les cèl·lules pancreàtiques o la producció de proteïnes estructurals com les citoqueratines en cèl·lules en cultiu (Schuh *et al.* 2003).

Altres autors, no obstant, han descrit que les vigilines presenten una baixa afinitat pel tRNA (Weber *et al.* 1997; Kanamori *et al.* 1998) i que la disminució dels nivells de vigilina de la cèl·lula mitjançant RNAi (RNA d'interferència) no provoca cap canvi a curt termini en els nivells de síntesi protèica mesurats per la incorporació de <sup>35</sup>S.

**Les vigilines com a reguladors de mRNAs específics:** Aquesta hipòtesi neix de la identificació de la vigilina de *Xenopus* com una proteïna que s'uneix al mRNA de la vitel·logenina estabilitzant-lo (Dodson and Shapiro 1997). La producció de vitel·logenina necessària per a la formació de l'òcit es produeix en el fetge d'una forma induïda per estrògens; s'ha observat l'acumulació d'una proteïna de forma

induïda per estrògens que s'uneix de forma específica a una seqüència present a la regió 3'-UTR del mRNA de la vitel·logenina havent-se proposat que aquest fet estabilitza aquest mRNA perquè es degradi amb més dificultat i d'aquesta manera permet una major expressió de la vitel·logenina. Un cop caracteritzada aquesta proteïna, va resultar ser l'homòleg de les vigilines a *Xenopus*. Estudis posteriors han permès comprovar aquesta hipòtesi *in vitro* observant-se una protecció específica del mRNA de la vitel·logenina a ser degradat per la ribonucleasa PMR-1 (Cunningham *et al.* 2000). Estudis *in vitro* d'unió a mRNAs han permès trobar la seqüència a què s'uneixen preferentment les vigilines i predir que es podrien unir amb alta afinitat al mRNA de la distrofina humana cosa que s'ha comprovat *in vitro*, puntualitzant que les vigilines podrien unir-se a altres seqüències específiques i no només al mRNA de la vitel·logenina, no obstant això encara no hi ha cap evidència que les vigilines s'uneixin *in vivo* al mRNA de la distrofina (Kanamori *et al.* 1998).

L'associació a mRNAs específics també s'ha descrit en el cas de Scp160, on s'ha identificat aquesta proteïna com un dels components que formen part del complexos que es localitzen als poliribosomes (Lang and Fridovich-Keil 2000); s'han aïllat de forma global els mRNAs que queden retinguts en una columna amb afinitat per Scp160 i s'han hibridat contra un *microarray* que conté tots els ORFs de llevat on s'han obtingut enriquiments reproduïbles per aproximadament un 1% de tots els mRNAs presents en el llevat, indicant que la unió amb aquests mRNAs és específica (Li *et al.* 2003). L'associació a mRNAs específics en aquest cas no s'associa a un paper d'estabilització, sinó més aviat a un paper en el posicionament i en la regulació de la traducció d'aquests mRNAs específics (Frey *et al.* 2001; Li *et al.* 2003); a favor de la implicació d'aquestes proteïnes en la regulació de la traducció, cal destacar que Scp160 s'ha trobat formant part de complexos en els poliribosomes que contenen mRNAs i el factor pab1 (polyA binding protein) (vegeu l'apartat 1.2.4), també cal destacar que tant Scp160 com les vigilines de mamífers s'han trobat associades al factor d'elongació 1A (Kruse *et al.* 1998b; Kruse *et al.* 2000; Baum *et al.* 2004) així com el fet que en un *screening* per trobar gens mutants que siguin letals en combinació amb la deleció de *SCP160* s'ha trobat el gen *EAP1* que codifica per una proteïna que, entre altres processos, s'ha vist associada a la regulació de la traducció per la seva capacitat d'unir-se al factor d'elongació 4E (Mendelsohn *et al.* 2003).

En cèl·lules de mamífer la depleció de la vigilina per RNAi és letal de forma ràpida en cèl·lules que no estan en un procés de divisió activa, cosa que s'ha suggerit que és per efectes indirectes que afecten la regulació d'altres mRNAs, demostrant una funció de les vigilines en el metabolisme de mRNAs específics (Goolsby and Shapiro 2003).

**Contribució de les vigilines a la segregació de cromosomes en mitosi:** El mutant de *SCP160* presenta un major contingut de DNA per cèl·lula i no és capaç de mantenir la ploidia correcta, cosa que porta al suggeriment que aquesta proteïna està implicada en la segregació dels cromosomes durant la mitosi (Wintersberger *et al.* 1995), aquest fet està recolzat també per la caracterització de la proteïna DDP1 com a la vigilina de *Drosophila*. La proteïna DDP1 s'associa a l'heterocromatina pericentromèrica de *Drosophila* (vegeu l'apartat 1.2.3) indicant que part de les funcions de les vigilines poden tenir lloc com a element estructural de l'heterocromatina contribuint a la segregació cromosòmica (Cortes *et al.* 1999).

Les vigilines també s'han trobat associades amb l'heterocromatina en estudis ultraestructurals on s'han vist localitzades a la cara interna de la membrana nuclear associades a les regions heterocromàtiques (Klinger and Kruse 1996).

### **1.2.3.- DDP1 la vigilina de *Drosophila melanogaster***

La proteïna DDP1 va ser aïllada per la seva capacitat d'unir-se a la cadena rica en pirimidines del dodeca-satèl·lit, un satèl·lit centromèric de *Drosophila melanogaster*. El dodeca-satèl·lit mostra una marcada asimetria en la distribució de purines i pirimidines entre les dues cadenes, essent una cadena rica en purines i l'altra en pirimidines. Aquests tipus de seqüències repetitives recorden a les seqüències telomèriques i per això reben el nom de "telomere-like", seqüències amb aquesta distribució asimètrica de purines i pirimidines es troben presents en els centròmers de la majoria d'espècies, des de *Schizosaccharomyces pombe* fins a plantes, insectes i cordats (Fry and Salser 1977; Richards *et al.* 1991; Abad *et al.* 1992; Grady *et al.* 1992; Alfenito and Birchler 1993), la conservació d'aquest tipus d'estructura pot reflectir que aquesta asimetria és necessària per al correcte funcionament de les seqüències centromèriques.

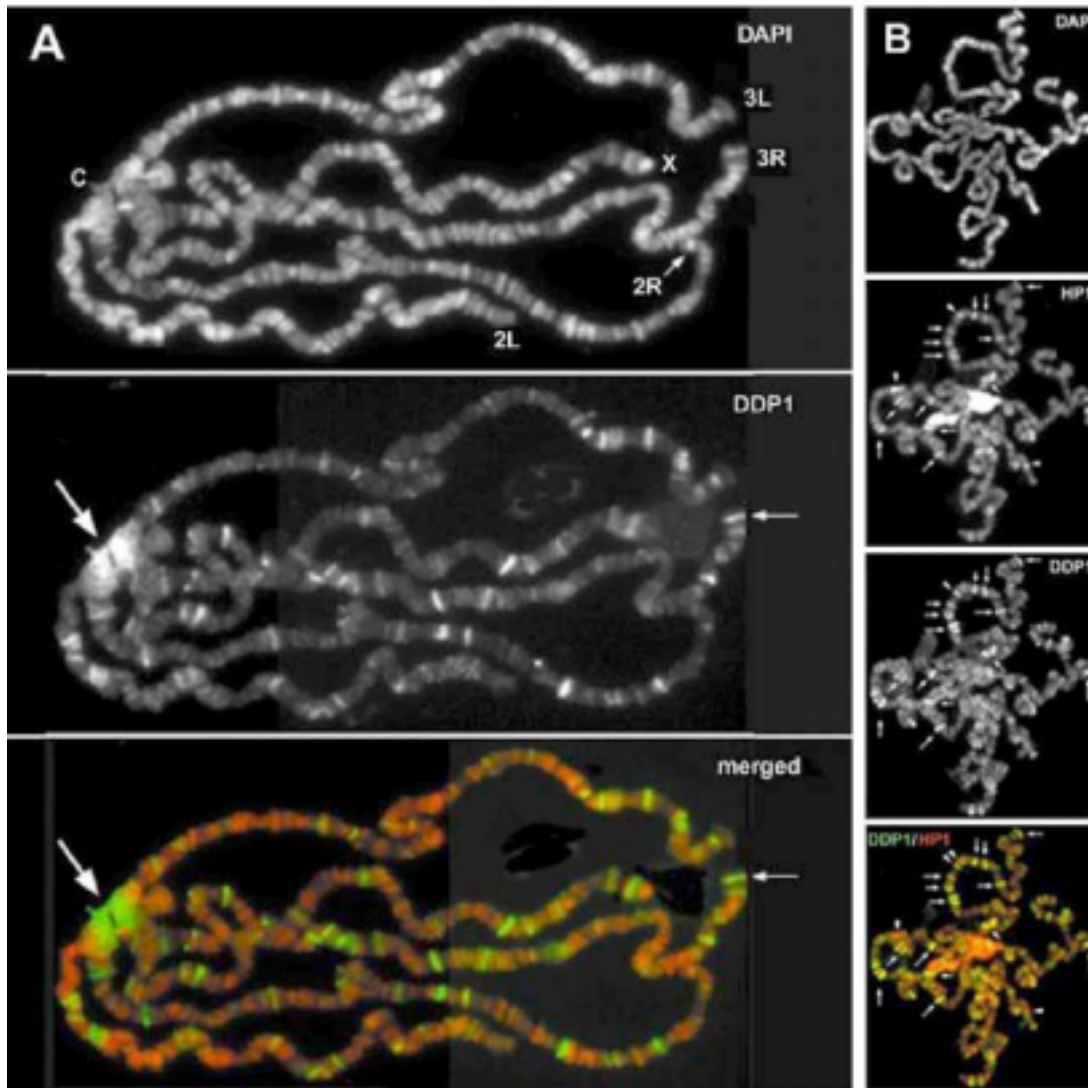
El dodeca-satèl·lit, igual que altres seqüències repetitives riques en guanina, és capaç de formar estructures alterades *in vitro*; s'ha observat que la cadena rica en purines és capaç de formar estructures intramoleculares molt estables del tipus forqueta (*hairpin*), mentre que la cadena rica en pirimidines queda en forma desestructurada (Ferrer *et al.* 1995; Ortiz-Lombardia *et al.* 1998). No obstant això, l'existència d'aquestes estructures *in vivo* seria molt desfavorable sense l'existència de factors que les estabilitzessin, el manteniment de la cadena rica en pirimidines de forma desestructurada seria energèticament molt desfavorable a la formació del dúplex de DNA. L'estabilització d'aquests tipus d'estructures es podria produir per la presència de proteïnes que reconeguessin de forma específica, o bé els *hairpins* formats per la cadena rica en purines, o bé la cadena rica en pirimidines de forma desestructurada; en aquest sentit es va aïllar en extractes nuclears de cèl·lules SL2 la presència d'una proteïna capaç d'unir la cadena rica en pirimidines (Ferrer *et al.* 1995), que un cop caracteritzada es va veure que corresponia a l'homòleg de les vigilines a *Drosophila* i que ha estat anomenat com a DDP1 (*Drosophila* Dodeca-satellite binding Protein 1) per la seva capacitat d'unir el dodeca-satèl·lit (Cortes *et al.* 1999). La proteïna DDP1 no només presenta capacitat d'unió *in vitro* al dodeca-satèl·lit, sinó que també s'ha vist que és capaç d'unir-se amb alta afinitat i especificitat a la cadena rica en pirimidines del satèl·lit centromèric AAGAG (Cortes and Azorin 2000).

L'estructura de DDP1 correspon al descrit per una vigilina típica dels metazous: amb la majoria de dominis KH conservats, els dominis KH força homogenis, amb excepció del domini KH12 on es presenta un *loop* variable molt més llarg que en la resta de dominis; DDP1 presenta tres possibles senyals de localització nuclear (Cortes *et al.* 1999), així com una putativa senyal d'export nuclear (Rohwedel *et al.* 2003). La proteïna DDP1 presenta un 46% d'identitat d'aminoàcids amb la vigilina de pollastre i un 47% amb la humana.

La proteïna DDP1 s'ha trobat associada en cromosomes politènics en el cromocentre (lloc on es localitza l'heterocromatina dels quatre cromosomes de *Drosophila*), així com en llocs discrets en els braços eucromàtics on s'ha trobat colocalitzant amb la proteïna heterocromàtica HP1 (Heterochromatin Protein 1) (figura I.4) (Cortes *et al.* 1999) (vegeu l'apartat 2.2). En cromosomes politènics separats s'observa que DDP1 es localitza tant a la regió centromèrica del cromosoma 3, on es poden detectar

seqüències de dodeca-satèl·lit mitjançant hibridació *in situ*, com a la regió centromèrica del cromosoma 2, on no es detecta senyal de dodeca-satèl·lit, suggerint que DDP1 no es localitza únicament a les regions on hi ha dodeca-satèl·lit, sinó que podria estar associada a altres DNAs heterocromàtics. A més, consistent amb la localització a cromosomes politènics a l'heterocromatina, la senyal de DDP1 esdevé nuclear durant l'embrogènesi de *Drosophila* al voltant del cicle 13 moment en què l'heterocromatina es fa evident i en què s'organitza el cromocentre; en estadis posteriors DDP1 es localitza associada amb els cromosomes (Cortes *et al.* 1999).

La proteïna DDP1 no només s'ha vist associada mitjançant estudis citològics a l'heterocromatina, sinó que a més a més s'ha observat que contribueix a les propietats estructurals i funcionals de l'heterocromatina. Estudis funcionals de la proteïna DDP1 han mostrat que mutants hipomorfs per DDP1 es comporten com un supressor de PEV (vegeu l'apartat 2.1.1), així com que en cromosomes politènics de larves mutants per DDP1 s'observen menors nivells de HP1 i de metilació de la histona H3 en el residu K9, que són marcadors de les seqüències heterocromàtiques (Huertas *et al.* resultats no publicats). Aquests resultats reforcen una possible relació funcional entre DDP1 i HP1 tal com ja suggerien la colocalització en cromosomes politènics. Alhora, els mutants per DDP1 presenten problemes en la condensació i en la segregació dels cromosomes reforçant la idea que les vigilines poden tenir un paper en la segregació cromosòmica.



**Figura 1.4.-** Immunolocalitzacions de DDP1 a cromosomes politènics. (A) La proteïna DDP1 es localitza al cromocentre (fletxa grossa) i a altres localitzacions discretes en els braços eucromàtics (fletxa petita). (B) Colocalització de DDP1 i HP1. Adaptat de (Cortés *et al.* 2003).

#### 1.2.4.- Scp160 la vigilina de *Saccharomyces cerevisiae*

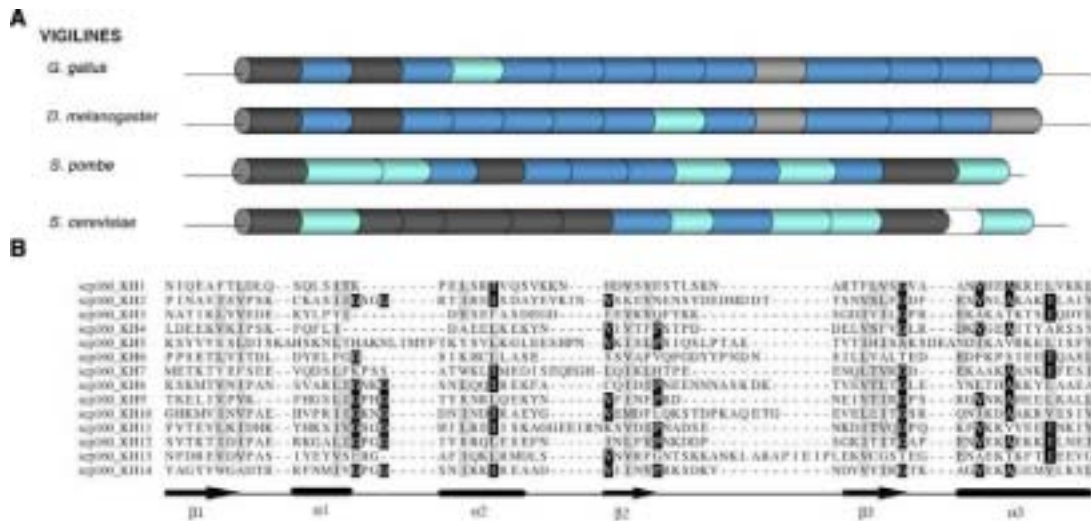
La vigilina de *Saccharomyces cerevisiae* és la proteïna Scp160 que rep el seu nom per la identificació com una proteïna de 160 kDa implicada en el manteniment de la ploidia cel·lular (*Saccharomyces cerevisiae* protein Controlling the Ploidy) (Wintersberger *et al.* 1995), posteriorment es va veure que corresponia a l'homòleg de les vigilines de *Saccharomyces cerevisiae* format gairebé únicament per dominis KH (Weber *et al.* 1997). A diferència de les vigilines dels metazous, els dominis KH que formen part de Scp160 són més heterogenis quant a la seva mida i n'hi ha un nombre molt més ampli que estan degenerats, havent-hi només 7 dominis amb el motiu GXXG conservat i d'aquests només 2 contenen algun residu bàsic (arginina o

lisina) en la part central, cosa que en els dominis KH de les vigilines d'eucariotes superiors es compleix en la majoria dels casos (figura I.5)

Inicialment Scp160 es va considerar com a formada únicament per a 14 dominis KH, considerant que el domini KH13 contenia una inserció de 61 aminoàcids en el *loop* variable (Weber *et al.* 1997), però mitjançant predicció d'estructura secundària es pot veure que aquest domini és més curt i que en els aminoàcids que hi ha des d'aquest fins a l'últim domini podria tractar-se d'un altre domini KH però molt degenerat (en blanc en la figura I.5), essent, per tant, 15 el nombre total de dominis KH presents en Scp160.

La vigilina de *Schizosaccharomyces pombe* de la mateixa manera que Scp160 presenta una gran heterogeneïtat entre els diferents dominis KH, no obstant això, presenta un grau de conservació molt més alt dels dominis KH que no pas Scp160. En cap de les vigilines hi ha cap prova experimental de la diferent capacitat d'unió a àcids nucleics entre els diferents dominis KH, però, almenys a priori per l'alineament de seqüència, Scp160 mostra una major degeneració dels motius d'unió a àcids nucleics i un menor nombre de dominis efectius, si això té o no alguna incidència en la seva funció es desconeix, ja que com s'ha esmentat amb anterioritat no es coneix si aquesta peculiar estructura de les vigilines és determinant per a la seva funció.

Scp160 ha estat localitzada mitjançant immunolocalitzacions i fusions amb GFP amb una localització perinuclear i amb un patró similar al de proteïnes que es troben en el reticle endoplasmàtic (Wintersberger *et al.* 1995; Frey *et al.* 2001; Lang *et al.* 2001); a nivell bioquímic s'ha trobat formant complexos amb altres proteïnes en els poliribosomes (Lang and Fridovich-Keil 2000; Frey *et al.* 2001; Lang *et al.* 2001), i amb Gpa1 la subunitat  $\Delta$  d'una proteïna G associada a receptors de membrana de la que s'ha proposat que Scp160 actuaria com a efector de senyal (Guo *et al.* 2003).



**Figura I.5.-** (A) Esquema de la distribuci3 dels dominis KH en diferents vigilines; cadascun dels cilindres representa un domini KH diferent fet amb una mida proporcional a la seva llargada en amino3cids. En diferents colors es mostra el grau de conservaci3 dels elements GXXG, en blau fort aquells que presenten les dues glicines amb almenys un amino3cid b3sic en posici3 central, en blau m3s fluix aquells als quals els manquen els amino3cids b3sics, en gris fluix aquells a que els falta alguna de les dues glicines, en gris fort aquells que presenten els motius totalment degenerats i en blanc un possible domini addicional a Scp160. (B) Alineament de seq3i3ncia dels 14 dominis KH de Scp160, sense considerar el possible domini addicional, el codi de colors es correspon a l'utilitzat en la figura I.3. Alineament adaptat de (Lewis *et al.* 1999).

Estudis funcionals amb mutants *scp160* han mostrat que aquestes c3l·lules contenen nivells de DNA per c3l·lula m3s elevat que el de les c3l·lules *wild type* de forma que es comporten com a pseudohaploides. En creuar les c3l·lules mutants amb altres soques i dissecionar-ne les t3trades resultants no s'obté la relaci3 2:2 esperada, fet que suggereix que les c3l·lules mutants no contenen un genoma haploide perfecte, sin3 que contenen m3s cromosomes que els que pertocaria a una c3l·lula haploide; aquest fet ha estat comprovat mitjançant an3lisi qu3mica on s'observa que el contingut de DNA per c3l·lula 3s superior al de les c3l·lules *wild type*. En experiments de micromanipulaci3 de c3l·lules s'observa que hi ha una proporci3 de mutants que no s3n capa3os de formar col3nies, fet que semblaria correlacionar amb l'observaci3 microsc3pica que en algunes divisions una de les c3l·lules de la parella mare-filla no cont3 DNA (Wintersberger *et al.* 1995).

Formant part dels poliribosomes s'ha trobat associada amb les prote3nes Pab1, Bfr1, Asc1 i amb el factor d'elongaci3 1Δ. La prote3na Pab1 (PolyA binding protein) 3s un component conegut del poliribosomes (Sachs 1990); la prote3na Bfr1 (Brefeldin-A resistance) va ser identificada en un *screening* de supressors de la letalitat indu3da per la droga Brefeldin-A, aquesta prote3na ha estat associada amb Bbp1, un component del SPB (Spindle Pole Body) (Xue *et al.* 1996); Asc1 3s una prote3na que



també ha estat implicada en processos de regulació de mRNAs específics (Shor *et al.* 2003). Asc1 s'ha proposat que forma part integral dels ribosomes actuant com una plataforma d'unió de Scp160 a aquests (Baum *et al.* 2004). Simultàniament, estudis genètics han permès identificar una relació funcional de Scp160 amb Eap1 la qual, a més a més d'estar associat al factor d'elongació 4E (vegeu l'apartat 1.2.2), també s'ha relacionat genèticament amb *NDC1*, gen requerit per a la duplicació del SPB (Chial *et al.* 2000).

Finalment, a Scp160 se li ha proposat una nova funció totalment diferent a la resta de funcions proposades per a les vigilines, la d'efector de la senyal de la proteïna Gpa1, la subunitat  $\Delta$  d'una proteïna G associada a receptors de membrana, aquesta hipòtesi es basa en la capacitat d'aquestes dues proteïnes d'interaccionar així com en la manca de transducció de senyal induït per Gpa1 en un fons *scp160* i en la capacitat de Scp160 de recuperar aquest defecte (Guo *et al.* 2003).



## **2.- L'heterocromatina i les seqüències telomèriques**

### **2.1.- Característiques generals de l'heterocromatina**

Com a heterocromatina clàssicament es consideren aquelles regions que es mantenen condensades al llarg de tot el cicle cel·lular, a diferència de l'eucromatina que pateix cicles de condensació i descondensació a mesura que les cèl·lules entren o surten de la mitosi respectivament. Les regions heterocromàtiques van ser descrites inicialment en els eucariotes superiors mitjançant criteris citològics ja en els anys 20; no obstant això, el descobriment que les regions heterocromàtiques estan associades a la inactivació dels gens situats en aquestes regions, i que regions silenciades que no són visibles citològicament presents en organismes com ara *Saccharomyces cerevisiae* requereixen una estructura especial de la cromatina (Kayne *et al.* 1988) va posar en evidència que aquestes regions malgrat que no mostren indicis citològics de condensació podrien ser considerades funcionalment equivalents a l'heterocromatina dels eucariotes superiors (Hecht *et al.* 1995), ampliant així el concepte de l'heterocromatina.

Convé destacar la diferència que clàssicament hi ha entre els conceptes de repressió i silenciament. Per repressió gènica s'entenen normalment processos que actuen a nivell d'una seqüència o d'un promotor concrets actuant només de forma local, per contra, el silenciament s'associa a grans regions de DNA actuant de forma regional. Una altra propietat de les regions silenciades envers la repressió és la seva persistència a través de la mitosi i de la meiosi donant lloc al fenomen de l'epigènesi. No obstant això, a mesura que es coneixen més els mecanismes moleculars implicats en la formació del silenciament és més evident que ambdós processos, silenciament i repressió, estan més íntimament relacionats del que inicialment es creia, amb exemples de gens eucromàtics reprimits mitjançant la formació de petites illes d'heterocromatina (Fahrner and Baylin 2003; Schramke and Allshire 2003) o amb processos de repressió a llarga distància que actuen per mecanismes similars als implicats en la formació de l'heterocromatina (Courey and Jia 2001).

El coneixement dels mecanismes implicats en la formació de l'heterocromatina ha avançat molt en els darrers anys. Un fet a destacar és que tot i la manca de conservació de les proteïnes implicades en la formació de l'heterocromatina en les diverses espècies estudiades, els mecanismes moleculars subjacents en tots els casos semblen ser molt similars (Moazed 2001) (vegeu l'apartat 2.2); de la mateixa manera, treballs recents en aquest camp han obert tot un nou món de possibilitats com destaca el fet que la implicació dels siRNAs (small interfering RNAs) en la formació de l'heterocromatina hagi estat qualificat per la revista Science com el "Breakdown of the year" de l'any 2002 (Couzin 2002).

### **2.1.1.- Composició Molecular de l'heterocromatina**

No es coneix amb exactitud la composició molecular de l'heterocromatina, però avanços recents en aquest camp han permès entreveure un panorama en què les modificacions covalents de les histones jugarien un paper essencial en la formació de l'heterocromatina.

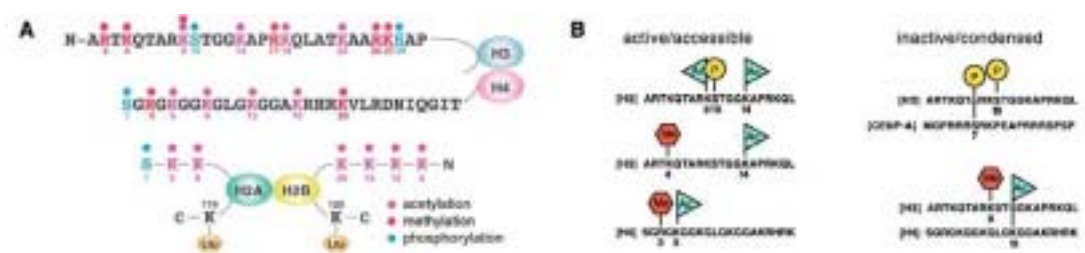
**Modificacions posttraduccionals de les histones:** A les cèl·lules eucariotes el DNA no es troba aïllat sinó que juntament amb les histones i d'altres proteïnes cromosomals es troba formant part de la cromatina, la unitat repetitiva bàsica de la qual n'és el nucleosoma (Kornberg 1974). El nucleosoma està format per dues còpies de cadascuna de les histones que en formen part: H2A, H2B, H3 i H4 disposades en forma d'un tetràmer central format per dues còpies de les histones H3 i H4 flanquejats per dos heterodímers formats per H2A i H2B; enrotllats al voltant d'aquest octàmer d'histones hi ha 146 pb de DNA. Els nucleosomes estan disposats en la fibra de cromatina deixant seqüències de DNA entre un nucleosoma i el següent que reben el nom de DNA *linker*. A la vegada, la fibra de cromatina està empaquetada en estructures d'ordre superior com ara la fibra de 30 nm de diàmetre que es forma amb la participació de la histona H1 o histona *linker*. Les histones que formen part del "core del nucleosoma", com s'anomena al complex entre l'octàmer d'histones i el DNA al voltant seu, presenten cadascuna d'elles un domini globular amb un plegament similar, el *histone fold* (que està implicat en la interacció del DNA amb les histones així com en la dimerització de les histones), i de 15 a 30 residus en

els extrems amino terminal que estan deestructurats que formen el que s'anomena com a les "cues amino terminals de les histones" (Kornberg and Lorch 1999). Les cues de les histones no són necessàries per a la formació del nucleosoma, però sí per les interaccions entre nucleosomes (Luger *et al.* 1997) i per a la formació de l'heterocromatina (Kayne *et al.* 1988).

Les regions heterocromàtiques presenten una estructura peculiar de la cromatina tal com demostra el seu alt grau de compactació: les regions heterocromàtiques presenten inaccessibilitat als enzims de restricció (Wallrath and Elgin 1995), a altres nucleases com la DNAsa I (Kerem *et al.* 1984), i a altres enzims com ara metiltransferases de DNA procariotes (Singh and Klar 1992). Aquestes dades suggereixen que les seqüències heterocromàtiques presenten nucleosomes amb un espaiament regular en grans regions de DNA, amb una major proporció de DNA que està formant part del *core* nucleosomal que no pas del DNA *linker*, a diferència de les regions eucromàtiques on hi ha una disposició més irregular dels nucleosomes amb llocs sensibles a la DNAsa I.

Les cues de les histones són objectes d'una gran varietat de modificacions posttraduccionals alguna de les quals, com ara l'acetilació, ja se sap des de fa temps que afecten a l'estat transcripcional de les seqüències on es localitzen (Allfrey 1977; Brownell *et al.* 1996). Recentment el descobriment del paper jugat per a les diferents modificacions posttraduccionals en l'establiment d'un estat transcripcionalment actiu o inactiu (silenciat) de la cromatina, així com el paper de moltes proteïnes implicades en la regulació transcripcional o en la formació de l'heterocromatina en la catàlisi o en el reconeixement d'aquestes modificacions posttraduccionals, ha portat a proposar l'existència d'un codi de modificacions posttraduccionals a les cues de les histones, el "histone code" (figura I.6). Aquesta hipòtesi postula que les diferents modificacions a les cues de les histones generen una combinació que serveix com a marca per al reclutament de diferents proteïnes o complexos proteics que intervenen en la regulació transcripcional o en la formació de l'heterocromatina, així com en d'altres funcions on està implicada la cromatina (Strahl and Allis 2000; Jenuwein and Allis 2001). Segons aquesta hipòtesi, les diferents modificacions són interdependents de manera que les modificacions preexistents afecten les subseqüents modificacions ajudant a formar la combinació de modificacions que

defineix un estat transcripcional concret. S'han descrit diferents dominis proteics capaços de reconèixer modificacions posttraduccionalment concretes, entre els quals hi ha el *bromodomain* que reconeix específicament lisines acetilades (Dhalluin *et al.* 1999; Winston and Allis 1999; Owen *et al.* 2000), i el *cromodomain* que és un domini proteic que ha estat implicat tant en el reconeixement de la lisina 9 metilada de la histona H3 (MeK9-H3) (Bannister *et al.* 2001; Lachner *et al.* 2001), fet que només s'ha demostrat per al cromodomini de la proteïna HP1, com en la interacció amb RNA (Akhtar *et al.* 2000).



**Figura I.6.-** Modificacions posttraduccionalment a les cues de les histones; (A) Residus de les histones H2A, H2B, H3 i H4 susceptibles de ser modificats per acetilació (rosa), metilació (vermell) i fosforilació (blau). (B) Diferents combinacions de modificacions posttraduccionalment presents en regions actives o inactives del genoma. A destacar que la lisina 9 de la histona H3 pot ser modificada tant per metilació com per acetilació i que aquesta es troba modificada de forma diferencial en diferents estats transcripcionalment actius de la cromatina. Adaptat de (Jenuwein and Allis 2001; Zhang and Reinberg 2001).

En la formació de l'heterocromatina les modificacions que han estat més estudiades són l'acetilació i la metilació. La cromatina acetilada correlaciona amb estats transcripcionalment actius, mentre que estats inactius correlacionen amb cromatina hipoacetilada, així doncs, en la majoria d'organismes l'heterocromatina està associada a histones hipoacetilades (Moazed 2001). A *Saccharomyces cerevisiae* la hipoacetilació de les histones s'ha proposat com un element clau per a la nucleació del complex de les proteïnes SIR, complex implicat en la formació de la cromatina silenciada a aquest organisme (vegeu l'apartat 2.3). En altres organismes com ara *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila* i mamífers, a part de la desacetilació de les histones, la metilació de la lisina 9 de la histona H3 (K9-H3) és essencial per a la formació de l'heterocromatina (vegeu l'apartat 2.2).

**Seqüències de DNA que formen part de l'heterocromatina:** En la majoria d'espècies les seqüències heterocromàtiques estan associades a seqüències de DNA repetitiu, no obstant això, una excepció important és *Saccharomyces cerevisiae*, on la

implicació de seqüències específiques conegudes com a “silenciadors” en l’inici de la nucleació de l’heterocromatina és ben coneguda (Brand *et al.* 1985; Fourel *et al.* 2002).

Una característica peculiar d’aquests DNAs repetitius és que les seves seqüències estan molt poc conservades al llarg de l’evolució essent molt diferents fins i tot entre espècies molt properes, puntualitzant que blocs de seqüència que aparentment no tenen res en comú són tots capaços de portar a la formació d’heterocromatina. Una hipòtesi per explicar aquesta observació seria que la repetitivitat en si és la responsable de la formació de l’heterocromatina (Wolffe 1998). Aquesta hipòtesi es basa en què la sola presència de diverses repeticions d’un transgen és suficient per a la formació d’heterocromatina en aquestes regions, tal com s’ha vist en treballs fets en diferents espècies. S’ha proposat que el mecanisme pel qual les seqüències repetitives formen l’heterocromatina pot implicar aparellaments entre aquestes seqüències (Dorer and Henikoff 1994), així com interaccions DNA-RNA i/o RNA/RNA (Selker 1999).

Altres hipòtesis proposades per explicar la relació entre les seqüències repetitives i l’heterocromatina es basen en el model de *Saccharomyces cerevisiae* on, a part de les seqüències silenciadores, se sap que existeixen altres seqüències anomenades protosilenciadors que, a diferència de les seqüències silenciadores, per si soles no són capaces de nuclear la formació de l’heterocromatina, però que cooperen amb les seqüències silenciadores per a estendre la formació de l’heterocromatina (Boscheron *et al.* 1996; Fourel *et al.* 1999; Lebrun *et al.* 2001). En aquest context es proposa que múltiples seqüències capaces d’actuar com a protosilenciadors són capaces d’actuar induint la formació d’heterocromatina fins i tot en l’absència d’un element silenciador, la repetició successiva d’un element protosilenciador pot induir a la formació d’estructures de cromatina d’ordre superior que permeten a aquests elements actuar de forma cooperativa en la formació de l’heterocromatina, sense que sigui necessària la presència d’un element silenciador (Fourel *et al.* 2002).

Finalment, però, la implicació del RNA en la nucleació de l’heterocromatina és una hipòtesi que ha pres força darrerament pel descobriment que a *Schizosaccharomyces pombe* la maquinària del RNAi és necessària per a la iniciació de la nucleació de l’heterocromatina (Hall *et al.* 2002; Volpe *et al.* 2002), fet que també s’ha demostrat

important a *Drosophila* (Pal-Bhadra *et al.* 2004). En tot aquest procés les seqüències repetitives hi juguen un paper fonamental. La implicació dels RNAs no codificants en processos relacionats amb la cromatina no és un fet nou. Es coneixen diferents exemples on se sap de la participació del RNA en processos relacionats amb la cromatina, com els mecanismes de compensació de dosi que, tant a mamífers com a *Drosophila*, necessiten de la participació de RNAs no codificants, tot i que els mecanismes a què donen lloc aquests RNAs són molt diferents en cadascun d'aquests dos casos (Park and Kuroda 2001); la implicació de RNAs no codificants en el procés d'*imprinting* a mamífers (Sleutels *et al.* 2002); i el paper del RNA en el silenciament en plantes, tant a nivell del silenciament transcripcional (TGS, transcriptional gene silencing), com a nivell del silenciament posttranscripcional (PTGS, posttranscriptional gene silencing) (Matzke *et al.* 2001). A *Schizosaccharomyces pombe* s'ha observat que dsRNAs derivats a partir de la transcripció de les repeticions centromèriques són processats per la maquinària del RNAi donant lloc a siRNAs que s'han proposat com els responsables de guiar la formació de l'heterocromatina a aquestes regions (Volpe *et al.* 2002) (vegeu l'apartat 2.2). En aquest model el paper de les seqüències repetitives seria el d'actuar com a focus de generació de siRNAs de forma que es nuclearien regions heterocromàtiques preferentment en aquestes seqüències donada la relativa abundància de siRNAs generats a partir d'aquestes regions (Jenuwein 2002). Aquesta hipòtesi es veu reforçada per experiments recents on un dsRNA sintètic és capaç de dirigir la nucleació d'heterocromatina a una seqüència concreta (Schramke and Allshire 2003), així com l'aïllament del complex RITS (RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing) que conté siRNA i es localitza a les regions heterocromàtiques (Ekwall 2004; Verdell *et al.* 2004) (vegeu l'apartat 2.2). A més a més, hi ha altres observacions que impliquen el RNA en la formació de l'heterocromatina mostrant que aquest és requerit per a la localització subnuclear de proteïnes heterocromàtiques com HP1 (Maison *et al.* 2002; Muchardt *et al.* 2002).

Una altra característica distintiva de les seqüències de DNA que formen l'heterocromatina en moltes espècies és la metilació de les citosines, no obstant, aquest no sembla ser un element decisiu per a la formació de l'heterocromatina com indica el fet que algunes espècies com ara *Saccharomyces cerevisiae*,



*Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila* i *Caenorhabditis elegans* careixen completament de metilació en el DNA. Més que un factor necessari per a la formació de l'heterocromatina es creu que la metilació del DNA és un factor important en l'estabilització d'aquestes seqüències. S'ha proposat l'existència d'una interdependència entre la metilació del DNA i el "histone code" (Jenuwein and Allis 2001). Recentment s'ha identificat l'existència de "cromo-metilases" que combinen un cromodomini amb l'activitat responsable de metilar el DNA (Henikoff and Comai 1998; Bartee *et al.* 2001; Lindroth *et al.* 2001), així com de proteïnes capaces d'unir CpG metilat que contenen alhora un domini SET, implicat en la metilació de les cues de les histones (Hendrich and Bird 1998; Jenuwein 2001); aquestes proteïnes permeten explicar la capacitat d'aquestes senyals de reforçar-se mútuament. Alhora, també s'han descobert connexions entre la metilació del DNA i la desacetilació de les histones; per una banda s'han descrit complexos de proteïnes amb capacitat d'unir DNA metilat amb proteïnes amb activitat HDAC (histone deacetylase), que actuarien reduint el nivell d'acetilació de les histones allí on hi ha CpG metilat (Dobosy and Selker 2001); així com també s'han descrit interaccions entre DNMT1 i HDAC, DNMT1 actua en la forqueta de replicació mantenint la metilació a les citosines durant el procés de replicació del DNA, aquest procés reforçaria la desacetilació de les histones a mesura que es replica el DNA en aquelles seqüències on el DNA està metilat (Robertson *et al.* 2000; Rountree *et al.* 2000).

**Proteïnes implicades en la formació de l'heterocromatina:** A part de les histones, que, com ja s'ha explicat amb anterioritat, són un dels elements clau que amb les modificacions posttraduccionals que presenten regulen la formació de l'heterocromatina, hi ha tota una sèrie de proteïnes que s'han caracteritzat formant part o implicades en l'establiment de les regions heterocromàtiques, moltes de les quals com ja s'ha comentat amb anterioritat són, o bé proteïnes que catalitzen les modificacions de les histones, o bé proteïnes que reconeixen específicament aquestes modificacions.

Actualment es coneixen amb un major grau dos processos diferents implicats en la formació de l'heterocromatina en organismes models diferents: la formació de regions silenciades a *Saccharomyces cerevisiae* amb un paper molt important dels

complexos de proteïnes SIR i el mecanisme basat en HP1/Swi6 i SuVar3-9/Clr4 que s'han implicat en la formació de l'heterocromatina a *Drosophila*, *Schizosaccharomyces pombe* i mamífers. Tal com ja s'ha comentat anteriorment, aquests dos models, malgrat basar-se en grups de proteïnes molt diferents, utilitzen mecanismes similars per a la formació de l'heterocromatina (veure apartat 2.2). La caracterització d'aquestes proteïnes com a elements necessaris per a la formació de l'heterocromatina ha estat possible gràcies als estudis del silenciament induït per la presència de regions heterocromàtiques, els estudis clàssics de PEV (position effect variegation) a *Drosophila* i mamífers, i els estudis de silenciament en diferents locus del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe*.

El fenomen de PEV va ser identificat a *Drosophila* per la capacitat de l'heterocromatina de reprimir l'expressió de gens eucromàtics quan aquests accidentalment queden situats a les proximitats de les regions heterocromàtiques (Muller 1930); en aquests casos l'estructura de l'heterocromatina es propaga cap a les regions eucromàtiques i provoca una repressió de l'expressió del gen. Aquest fenomen es manifesta amb una expressió variegada del gen donat que l'expansió de l'heterocromatina no es produeix de la mateixa manera en totes les cèl·lules sinó que varia de forma aleatòria. Un cop establerta, no obstant, aquesta es transmet de forma epigenètica a les seves descendents, fet que produeix que hi hagi grups de cèl·lules que expressen el gen i d'altres en què està completament reprimat. Els estudis de PEV permeten detectar mutacions que afecten a la formació de l'heterocromatina, bé siguin mutacions que disminueixen el grau de silenciament (*supressors* of PEV), que corresponen a mutacions de gens que codifiquen per proteïnes implicades en l'establiment de l'heterocromatina, o mutacions que augmenten el grau de silenciament (*enhancers* of PEV) que codifiquen per a proteïnes que actuen disminuint el grau d'heterocromatització.

A *Saccharomyces cerevisiae* es poden observar fenòmens similars als *locus* silenciats del *mating type* (Brand *et al.* 1985; Schnell and Rine 1986; Mahoney and Broach 1989), als telòmers (Gottschling *et al.* 1990) i al locus del rDNA (Smith and Boeke 1997) (vegeu l'apartat 2.3); i a *Schizosaccharomyces pombe* als *locus* centromèrics (Allshire *et al.* 1994), als telòmers (Nimmo *et al.* 1994), al *locus* del *mating type* (Lorentz *et al.* 1992) i al *locus* del rDNA (Thon and Verhein-Hansen 2000). En tots

aquests casos s'observa, igual que en el fenomen de PEV, una expressió variegada dels gens silenciats i que aquesta pot ser alterada per la mutació de factors en *trans* que regulen el silenciament en aquestes regions.

Aquests estudis han permès identificar moltes proteïnes implicades en aquests processos, per algunes de les quals es coneix el seu mecanisme d'acció donant lloc als dos models esmentats anteriorment. Malgrat això encara avui en dia resten moltes proteïnes identificades per aquests mètodes de les quals se'n desconeix el mecanisme d'acció.

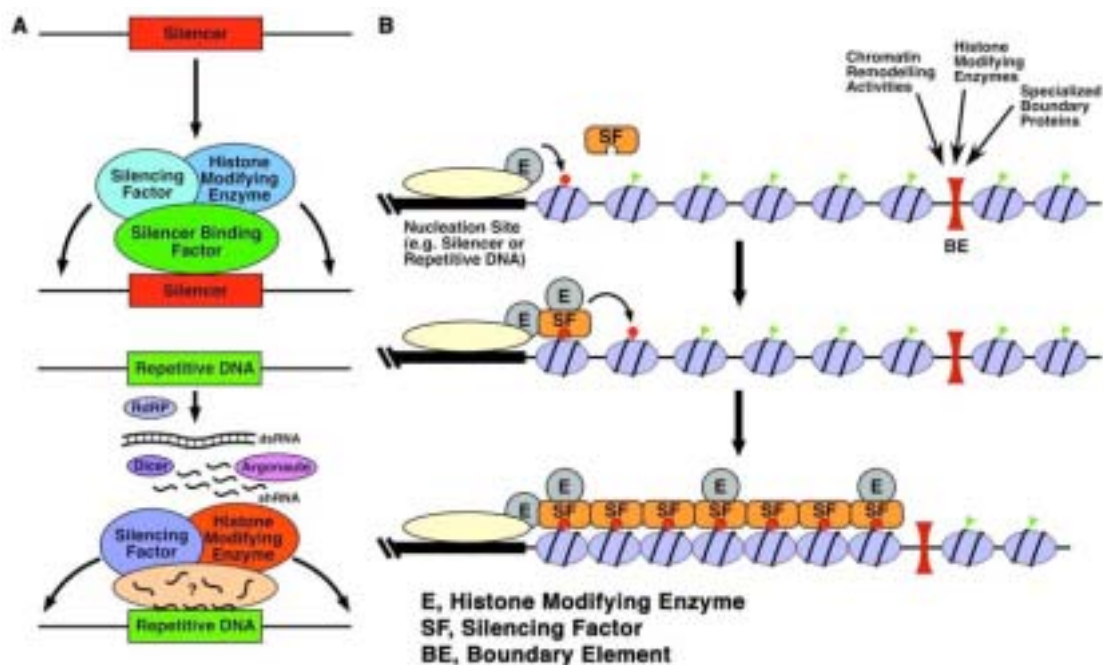
### **2.1.2.- Funcions de l'heterocromatina**

La natura repetitiva de les regions heterocromàtiques, així com el fet que la inserció de diferents elements repetitius en el genoma provoqui la formació d'heterocromatina ha portat a suggerir que l'heterocromatització podria actuar com un mecanisme de defensa de la cèl·lula contra DNAs paràsits; les cèl·lules semblen haver desenvolupat estratègies per silenciar aquests elements repetitius i impedir així una invasió del genoma (Henikoff 2000; Avramova 2002). L'establiment de les seqüències repetitives en forma d'heterocromatina també sembla tenir un paper en l'estabilització del genoma impedit la recombinació entre les diferents seqüències repetitives localitzades en el genoma (Grewal and Klar 1997; Guarente 2000), no obstant això, les regions heterocromàtiques no només semblen tenir funcions de protecció en el genoma, sinó que desenvolupen funcions específiques.

Les seqüències heterocromàtiques, tal com suggereix la seva localització majoritària a les regions centromèriques i telomèriques, tenen un paper essencial en la funció d'aquests dos elements estructurals del cromosoma (Palladino *et al.* 1993b; Bernard *et al.* 2001; Peters *et al.* 2001; Hall *et al.* 2003). Al mateix temps, proteïnes que intervenen en la formació de l'heterocromatina no només estan implicades en funcions estructurals, sinó que també intervenen en la regulació de l'expressió de gens eucromàtics (Hwang *et al.* 2001).

## 2.2.- Model general de formació de l'heterocromatina

En els dos models de formació de l'heterocromatina que es coneixen, les modificacions posttraduccional de les histones hi juguen un paper fonamental, tal com ja s'ha esmentat amb anterioritat. En ambdós casos l'heterocromatina comença a formar-se a partir de llocs reguladors concrets, bé siguin les regions silenciadores a *Saccharomyces cerevisiae* o seqüències de DNA repetitiu a *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila* i mamífers (figura I.7A). Un cop iniciada la nucleació de l'heterocromatina en aquestes regions aquesta s'estén a regions properes per l'acció dels complexos silenciadors.



**Figura I.7.-** Model general de formació de l'heterocromatina. (A) Mecanismes de nucleació de l'heterocromatina. A la part superior es presenta el model de *Saccharomyces cerevisiae* on l'heterocromatina s'inicia a partir de seqüències silenciadores concretes, i a la part inferior es presenta el model de *Schizosaccharomyces pombe* i la resta d'eucariotes estudiats on les seqüències de DNA repetitiu són el lloc d'inici de nucleació de l'heterocromatina. (B) Procés seqüencial d'extensió de l'heterocromatina. Amb una marca vermella es representen els nucleosomes que han estat modificats per ser reconeguts pels complexos silenciadors, i amb una marca verda aquells nucleosomes que tenen les modificacions pròpies de les seqüències eucromàtiques. Adaptat de (Grewal and Moazed 2003).

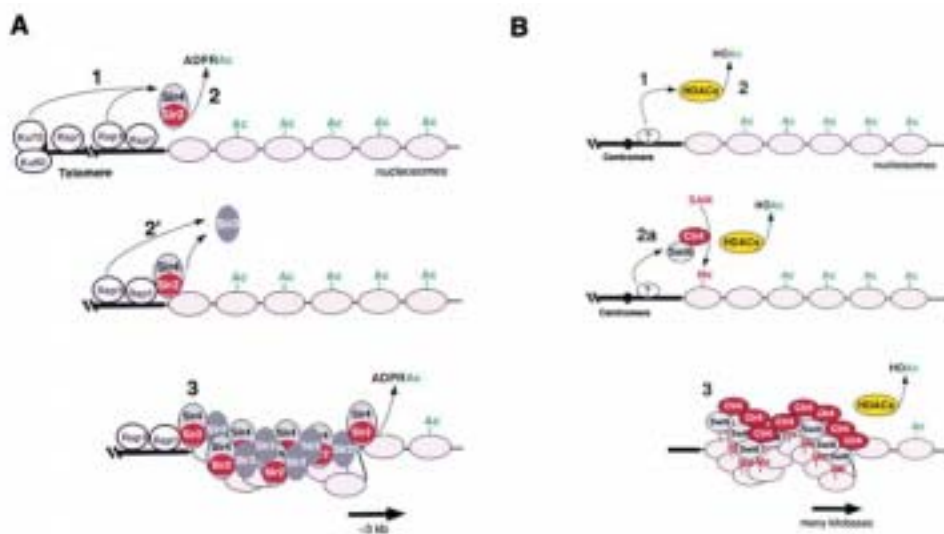
L'heterocromatina s'inicia en les seqüències silenciadores o els elements de DNA repetitiu pel reclutament d'enzims amb activitats capaces de modificar les cues amino terminals de les histones en aquestes regions; aquests enzims mitjançant la seva activitat generen llocs d'unió que són reconeguts pels complexos silenciadors. L'expansió de l'heterocromatina es produeix gràcies a la presència en els complexos

silenciadors de proteïnes capaces de reconèixer histones modificades covalentment juntament amb enzims capaços de catalitzar de nou aquestes modificacions. Aquest fet permet que es produeixi una expansió de l'heterocromatina mitjançant un procés cíclic iniciat per la unió dels complexos silenciadors a les histones modificades, i la subsegüent generació de nous llocs d'unió per aquest complexos amb la modificació de les histones properes (figura I.7B).

A *Saccharomyces cerevisiae* la nucleació de l'heterocromatina s'inicia als elements silenciadors mitjançant la unió de proteïnes específiques com ara Rap1 que són les responsables de reclutar els complexos formats per Sir2/Sir4. Sir2 és un enzim amb activitat histona desacetilasa capaç de generar regions de cromatina amb histones hipoacetilades, que són reconegudes específicament per les proteïnes Sir3 i Sir4, aquestes oligomeritzen i recluten nous complexos Sir2/Sir4 que creen noves regions d'histones desacetilades permetent l'extensió de l'heterocromatina (figura I.8A).

A *Schizosaccharomyces pombe* el procés de nucleació de l'heterocromatina s'inicia a partir de seqüències de DNA repetitiu. En aquestes regions la nucleació de l'heterocromatina és produïda mitjançant el mecanisme de RNAi, responsable de produir siRNAs que s'ha postulat que són els responsables de dirigir la formació de l'heterocromatina en aquestes regions. Aquesta hipòtesi s'ha vist reforçada per l'aïllament del complex RITS (Verdel *et al.* 2004) que permet lligar els siRNAs produïts pel mecanisme del RNAi amb la formació de l'heterocromatina, ja que conte una proteïna prèviament coneguda amb cromodomini, Chp1 de la qual se sap que s'uneix a les seqüències centromèriques (Partridge *et al.* 2002), així com Ago1, l'homòleg de la proteïna Argonauta a *Schizosaccharomyces pombe*, proteïna responsable d'unir els siRNAs i dirigir la seva especificitat a mRNAs concrets en el complex RISC (RNA- induced silencing complex) en el mecanisme de silenciament posttranscripcional (PTGS) (Hannon 2002). Es postula que el complex RITS realitzaria una funció anàloga a la realitzada pel complex RISC en el PTGS utilitzant els siRNAs per reconèixer i unir les regions concretes on s'inicia la formació de l'heterocromatina.

La presència en el complex RITS de Chp1 que conté un cromodomini s'ha proposat que estabilitza la unió del complex a les regions heterocromàtiques. No es coneix però encara com la metilació del residu K9-H3 mitjançant la proteïna Clr4 és dirigida a les regions heterocromàtiques. La pròpia proteïna Clr4 podria jugar un paper molt important en guiar la formació de l'heterocromatina (Jenuwein 2002), Clr4 conté un cromodomini i un domini SET (domini responsable de catalitzar l'addició del grup metil al residu K9-H3). El seu cromodomini és indispensable per a la metilació del residu K9-H3 en el procés de nucleació de l'heterocromatina (Nakayama *et al.* 2001). Aquest fet permet proposar un model en què els siRNA interaccionarien amb aquesta proteïna a través del seu cromodomini (que com s'ha esmentat anteriorment s'ha vist que és capaç d'unir RNA a més a més de reconèixer el residu MeK9-H3), portant-la als llocs de nucleació de l'heterocromatina, on Clr4 iniciaria la metilació del residu K9-H3 mitjançant el seu domini SET.



**Figura I.8.-** Models de formació de l'heterocromatina a *Saccharomyces cerevisiae* (A) i *Schizosaccharomyces pombe* (B). En ambdós casos el procés és molt similar amb l'extensió de l'heterocromatina gràcies a l'acoblament de proteïnes d'unió a histones modificades (Sir4 i Swi6 respectivament) amb els enzims responsables de la catàlisi d'aquestes modificacions posttraduccionals de les histones (Sir2 i Clr4 respectivament). En aquesta figura també s'aprecien els diferents mètodes de nucleació de l'heterocromatina esmentats en la figura I.7. Extret de (Moazed 2001).

Aquest reclutament inicial pels siRNAs genera el codi de modificacions posttraduccionals de les histones que és reconegut pels complexos silenciadors responsables de l'extensió de l'heterocromatina (Hall *et al.* 2002). Concretament la metilació del residu K9-H3 és capaç de crear un lloc d'unió de HP1/Swi6 (Bannister *et al.* 2001; Lachner *et al.* 2001), un cop aquest s'ha unit a la cromatina és capaç de

crear nous llocs d'unió dels complexos de silenciament mitjançant la seva interacció amb enzims responsables de les modificacions posttraduccionals. HP1 s'ha vist que és capaç de formar complexos amb Suvar3-9, l'homòleg de Ctr4 en mamífers (Aagaard *et al.* 1999), aquesta interacció implicaria la creació de noves regions amb el residu K9-H3 metilat generant nous llocs d'unió per HP1/Swi6, d'aquesta manera es pot explicar l'extensió de l'heterocromatina mitjançant cicles successius de modificació-unió a histones modificades (figura I.8B).

Segons aquest model, les regions heterocromàtiques serien nucleades a partir de llocs concrets i un cop nucleades serien capaces d'estendre cap a les regions properes produint un silenciament dels gens situats en aquestes regions. Aquest model requereix que hi hagi elements que protegeixin les regions eucromàtiques d'aquesta expansió de l'heterocromatina; en aquest sentit s'han aïllat regions anomenades "boundary elements" que són els encarregats d'establir els límits entre les regions heterocromàtiques i les regions eucromàtiques (figura I.7). S'han descrit regions concretes que actuen com a "boundary elements" en els *locus* del *mating type* de *Saccharomyces cerevisiae* i de *Schizosaccharomyces pombe* (Noma *et al.* 2001; Dhillon and Kamakaka 2002). Aquestes regions separen diferents dominis de cromatina amb diferents modificacions posttraduccionals de les histones impedit així l'extensió de l'heterocromatina. En aquest elements hi estarien implicats: complexos amb activitat remodeladora de la cromatina que amb la seva activitat impedirien la unió dels complexos silenciadors impedit l'avanç de l'heterocromatina; llocs d'unió de factors que modifiquen covalentment les histones que amb la seva activitat impedirien la modificació de les histones d'aquella regió amb les marques pròpies de l'heterocromatina afegint altres marques antagonistes que impedirien la unió dels complexos silenciadors; i alhora també s'ha vist que hi podria haver proteïnes que actuessin com a barreres per si soles, per exemple a *Saccharomyces cerevisiae* s'ha descrit la presència en les regions *boundary* de nucleosomes amb una variant d'histona concreta, la H2A.Z, que actuaria impedit l'avanç de l'heterocromatina (Meneghini *et al.* 2003). Una altra idea és que els diferents "boundary elements" podrien interaccionar entre ells o amb elements de l'estructura nuclear definint diferents compartiments en el nucli (Labrador and Corces 2002).

A *Schizosaccharomyces pombe*, a part de la metilació de la lisina 9 de la histona H3, la desacetilació de les histones és també un factor important en la formació de l'heterocromatina. Mutacions en HDACs, o l'ús d'inhibidors d'aquestes, provoca pèrdues en els nivells de silenciament. Sir2, una proteïna amb activitat histona desacetilasa (vegeu l'apartat 2.3), és l'únic membre dels complexos de proteïnes SIR de *Saccharomyces cerevisiae* que té un homòleg a la resta d'eucariotes estudiats. No es coneix, però, si en aquests organismes hi ha un grup de proteïnes que actui com el complex de proteïnes SIR reconeixent específicament les histones hipoacetilades en el procés de nucleació de l'heterocromatina, o de si la pèrdua del grup acetil és només un pas necessari per a què pugui tenir lloc la metilació del residu K9-H3 (Shankaranarayana *et al.* 2003).

A *Saccharomyces cerevisiae*, a part del paper central de la desacetilació de les histones com a marca que és reconeguda per les proteïnes SIR per establir l'estat silenciament, la metilació també sembla jugar un paper en aquest procés; la histona metiltransferasa Set1 és capaç de metilar la lisina 4 de la histona H3 (K4-H3), la deleció d'aquest gen dóna lloc a defectes de silenciament en el *locus* del rDNA, el *locus* del *mating type* i en els telòmers (Nislow *et al.* 1997; Briggs *et al.* 2001; Krogan *et al.* 2002) suggerint que la metilació del residu K4-H3 és necessària per al silenciament. No obstant això l'observació que regions heterocromàtiques estan hipometilades en el residu K4-H3 a *Saccharomyces cerevisiae* (Bernstein *et al.* 2002), així com que regions transcripcionalment actives presenten metilació en aquest residu, tant a *Saccharomyces cerevisiae* (Santos-Rosa *et al.* 2002) com a d'altres organismes models (Litt *et al.* 2001; Noma *et al.* 2001), permet explicar aquest efecte de la mutació de Set1 com un efecte indirecte ocasionat per la mobilització de les proteïnes SIR a altres regions genoma. Les proteïnes SIR s'uneixen preferentment a regions hipometilades i, per tant, la mutació de Set1 provocaria la unió de les proteïnes SIR a llocs inespecífics disminuint el seu efecte en les seqüències heterocromàtiques. A part de la metilació de la lisina 4, la metilació de la lisina 79 de la histona H3 també sembla jugar un paper similar al de la metilació de la lisina 4, en aquest cas també es proposa que les regions heterocromàtiques estarien hipometilades en la lisina 79 (Lacoste *et al.* 2002; Ng *et*



*al.* 2002; van Leeuwen *et al.* 2002). Aquest residu, no obstant, no es troba situat en les cues de les histones sinó en el domini globular.

### **2.3.- L'heterocromatina a *Saccharomyces cerevisiae***

L'heterocromatina de *Saccharomyces cerevisiae*, com ja s'ha anat explicant al llarg del capítol, presenta una sèrie de diferències força significatives amb l'heterocromatina de la resta d'eucariotes estudiats. Les regions heterocromàtiques en aquest organisme han estat les primeres de les quals s'ha pogut disposar d'un model molecular de la formació de l'heterocromatina (Grunstein 1997), donat el fet de ser un organisme unicel·lular menys complex i de disposar d'un ampli ventall d'eines que permeten estudiar aquests processos.

*Saccharomyces cerevisiae* presenta heterocromatina als *locus* silenciats del mating type, al *locus* del rDNA i a les regions telomèriques, definit com a la presència en aquestes regions d'una estructura cromàtica especial caracteritzada per una menor accessibilitat de diferents agents a aquestes seqüències i per la seva capacitat de silenciar gens marcadors situats en aquesta regió. En aquest organisme les estructures heterocromàtiques no són visibles citogenèticament donada la seva reduïda mida, però, igual que en eucariotes superiors, aquestes regions es localitzen a les regions perifèriques del nucli.

En aquest organisme model l'heterocromatina presenta diferències tant a nivell de les seqüències de DNA que formen aquestes regions com a nivell de les proteïnes implicades en la seva formació. De igual forma que en la resta d'eucariotes estudiats, en aquest procés hi juguen un paper clau les modificacions posttraduccionals de les histones, però en aquest cas la metilació de la lisina 9 de la histona H3 no té un paper essencial com ocorre en la resta d'eucariotes. A nivell de les seqüències de DNA implicades en la nucleació de l'heterocromatina es coneix l'existència de regions reguladores concretes, els silenciadors, que juguen un paper en el silenciament al *locus* del mating type i en els telòmers, però no en el *locus* del rDNA. Aquestes seqüències actuen iniciant la nucleació de l'heterocromatina reclutant factors específics. Aquest sistema és completament diferent al de la resta d'eucariotes on s'ha proposat la participació dels mecanismes de RNAi en el procés de la nucleació

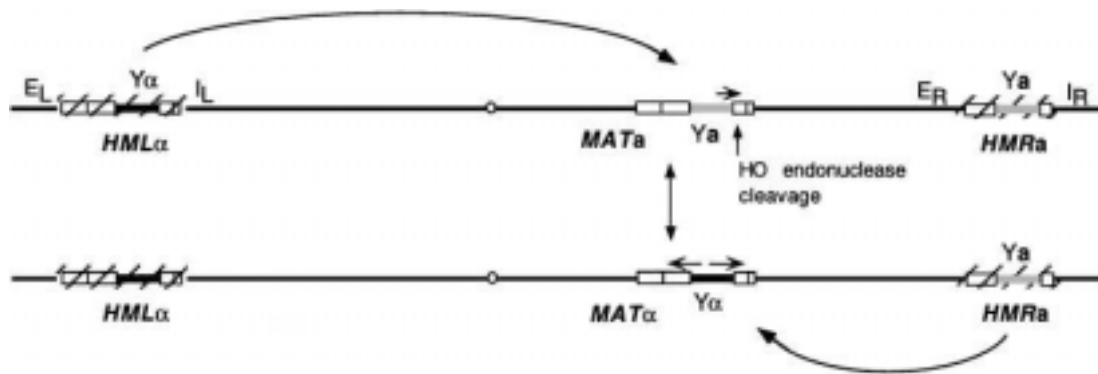
(vegeu els apartats 2.1 i 2.2). Convé destacar que *Saccharomyces cerevisiae* no sembla tenir cap homòleg de les proteïnes implicades en la via del RNAi en altres organismes.

De les diferents regions silenciades presents al genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, el silenciament a les regions telomèriques i al *locus* del *mating type* comparteixen moltes característiques comunes, mentre que el silenciament al *locus* del rDNA sembla funcionar mitjançant un mecanisme diferent als dos esmentat anteriorment. Així com el mecanisme de silenciament als telòmers i al *locus* del *mating type* és força conegut, el mecanisme de silenciament del *locus* del rDNA encara no es coneix totalment.

### **2.3.1.- Silenciament a les seqüències telomèriques i al *locus* del *mating type***

Gens inserits en les proximitats de les regions telomèriques es veuen subjectes a un silenciament per la formació de regions heterocromàtiques presents en aquestes regions, fenomen conegut com a “Telomer Position Effect” (TPE). S’observa un fenomen similar en els *locus* silenciats del *mating type*.

A *Saccharomyces cerevisiae* les cèl·lules haploides només expressen un dels dos tipus d’aparellament existents, el tipus *a* o el tipus  $\Delta$ . Aquest fet és determinat per l’al·lel que es troba en el *locus* *MAT*; els diferents al·lells possibles *MATa* o *MAT $\Delta$*  codifiquen per a proteïnes reguladores que controlen l’expressió d’altres gens responsables de les diferències entre els dos tipus d’aparellament. A part del *locus* *MAT* totes les soques tenen còpies silenciades de cadascun dels dos tipus d’aparellament en els *locus* *HML* i *HMR* situats prop dels telòmers del mateix cromosoma on es localitza el *locus* *MAT*. En la majoria de les soques *HML* conté una còpia críptica del gen *MAT $\Delta$*  i *HMR* una còpia críptica del gen *MATa*. Les soques homotàliques són capaces de canviar el tipus d’aparellament per un mecanisme similar a la conversió gènica, no obstant la majoria de soques de laboratori no tenen aquesta capacitat, però encara retenen les còpies silenciades dels diferents tipus d’aparellament (figura I.9)



**Figura I.9.-** Esquema del locus del mating type en el cromosoma III de *Saccharomyces cerevisiae*. A part del locus *MAT* en el cromosoma III de llevat es troben les còpies *HML* i *HMR* que estan en mantingudes en forma heterocromàtica per la presència en cadascuna d'aquestes regions de dos elements silenciadors flanquejants: *HML-E* ( $E_L$ ) i *HML-I* ( $I_L$ ) en el cas del locus *HML* i *HMR-E* ( $E_R$ ) i *HMR-I* ( $I_R$ ) en el locus *HMR*. L'expressió de l'endonucleasa HO genera un trencament de la cadena de DNA que permet el canvi del tipus d'aparellament mitjançant conversió gènica. Adaptat de (Haber 1998).

En aquestes dues regions s'ha caracteritzat les seqüències silenciadores que actuen reclutant els factors que inicien la nucleació de l'heterocromatina, així com les proteïnes que s'hi uneixen. Cadascun dels dos locus del *mating type* estan flanquejats per dos elements silenciadors coneguts com els elements E i I (figura I.9). En aquestes seqüències hi ha llocs d'unió per a les proteïnes ORC (Origin Recognition Complex), Rap1 i Abf1. Les proteïnes Rap1 i Abf1 havien estat caracteritzades prèviament com a factors de transcripció (Planta *et al.* 1995) i ORC es localitza als orígens de replicació i és essencial per a la iniciació de la replicació del DNA (Bell and Dutta 2002). A les regions telomèriques les repeticions telomèrics funcionen com a silenciadors reclutant Rap1 (Cockell *et al.* 1995; Hecht *et al.* 1996), en la nucleació de l'heterocromatina en aquestes regions actuen també altres proteïnes com l'heterodímer Ku (figura I.8A) caracteritzat anteriorment per la seva implicació en el procés de reparació de trencaments de doble cadena en el DNA (Milne *et al.* 1996).

Les proteïnes SIR (Silent Information Regulator) van ser identificades per mutacions que activaven l'expressió dels locus *HMR* i *HML* (Ivy *et al.* 1986; Rine and Herskowitz 1987):

- Sir1: És una proteïna necessària per l'establiment del silenciament, però no sembla ser necessària en el manteniment d'aquest tal com demostra el fet que en els mutants *sir1* hi hagi cèl·lules que es mantenen reprimides mentre que d'altres estan desreprimides (Pillus and Rine 1989). Sir1 sembla estar implicat en promoure l'establiment de l'heterocromatina; aquesta proteïna és

reclutada als elements silenciadors mitjançant interaccions amb Rap1 i allí intervé en el reclutament d'altres proteïnes com ara el complex Sir2/Sir4. Sir1 inicialment es creia que només era necessari en els *locus HMR* i *HML* i no en els telòmers, però la majoria d'estudis de silenciament telomèric són fets utilitzant telòmers artificials que no tenen seqüències subtelomèriques, i Sir1 sí que sembla ser necessari en l'establiment del silenciament a telòmers naturals de *Saccharomyces cerevisiae* (Pryde and Louis 1999).

- Sir2: Sir2 és una proteïna amb activitat histona desacetilasa (Imai *et al.* 2000). S'ha vist que està formant un complex amb Sir4 que és l'encarregada de portar-la a les regions heterocromàtiques (Moazed *et al.* 1997). Sir2 desacetila preferentment la lisina 16 de la histona H4 *in vivo*, que s'ha vist com el residu més important per l'establiment de l'heterocromatina a *Saccharomyces cerevisiae* (veure més endavant).
- Sir3: La proteïna Sir3 no sembla tenir cap activitat enzimàtica, però juga un paper estructural essencial en l'establiment de l'heterocromatina. Sir3, igual que Sir4, s'uneix als nucleosomes amb molta més afinitat quan aquests estan hipocetilats. Aquesta proteïna a part d'interaccionar amb les cues de les histones és capaç d'interaccionar amb Rap1, Abf1 i Sir4.
- Sir4: Igual que Sir3, Sir4 no té cap activitat enzimàtica i exerceix la seva funció com a element estructural de l'heterocromatina. Tal com ja s'ha comentat és la responsable de portar Sir2 a les regions heterocromàtiques. Sir4 a més a més de ser requerida per a la localització de Sir2 també sembla ser necessària per a la localització de Sir3 (Luo *et al.* 2002).

Sir2 desacetila preferentment la lisina 16 de la histona H4, no obstant això, s'ha observat que la unió de les proteïnes SIR és més eficient si totes les lisines estan desacetilades; *in vivo* però la lisina 16 de la histona H4 és la que presenta els majors nivells d'acetilació al conjunt de nucleosomes de la cèl·lula (Clarke *et al.* 1993; Smith *et al.* 2002). Aquesta observació concorda amb el paper que s'ha proposat per a la proteïna Sas2 com a barrera a l'expansió de l'heterocromatina. Sas2 és un enzim amb activitat acetiltransferasa que acetila preferentment la lisina 16 de la histona H4 (Kimura *et al.* 2002; Suka *et al.* 2002). Un altre factor important per a la unió de les

proteïnes SIR, com ja s'ha esmentat anteriorment, és la manca de residus metilats en les histones que formen aquests nucleosomes (vegeu l'apartat 2.2).

En les regions telomèriques Rap1, a més d'unir les proteïnes SIR responsables de la nucleació de l'heterocromatina, s'uneix a les proteïnes Rif1 i Rif2 (Rap1-interacting factor). Aquestes proteïnes han estat identificades per la seva capacitat d'interaccionar amb l'extrem C-terminal de Rap1 en assaigs de dos híbrids (Hardy *et al.* 1992; Wotton and Shore 1997). La deleció del gens *RIF1* i *RIF2* dóna lloc a un allargament de les seqüències telomèriques, fenotip que es veu molt agreujat en la doble mutació *rif1 rif2* (Wotton and Shore 1997). Segons el model proposat les molècules de Rap1 unides a la part més centròmer proximal de les seqüències telomèriques, on comencen a trobar-se els primers nucleosomes, interaccionen principalment amb les proteïnes SIR en el procés de nucleació de l'heterocromatina, mentre que les molècules de Rap1 més telòmer proximal estarien principalment implicades en el procés de regulació de la llargada de les seqüències telomèriques mitjançant la seva interacció amb Rif1 i Rif2 (Marcand *et al.* 1997). Les proteïnes Rif1 i Rif2 a més d'estar implicades en el manteniment de la llargada de les seqüències telomèriques afecten al procés de nucleació de l'heterocromatina per la seva capacitat de competir amb les proteïnes SIR per la unió a Rap1.

### **2.3.2.- Silenciament al *locus* del rDNA**

Els gens que codifiquen per als rDNAs es troben disposats en tàndem repetits entre unes 100 i 200 vegades (Petes and Botstein 1977). Aquests gens són activament expressats per la RNA polimerasa I, no obstant quan gens transcrits per la RNA polimerasa II són inserits en aquestes regions aquests s'expressen en un menor grau. El silenciament a aquests *locus* requereix de l'acció de Sir2, però no de cap altre de les proteïnes SIR implicades en la formació de l'heterocromatina en les regions telomèriques i en el *locus* del *mating type*.

Sir2 s'ha trobat formant part d'un complex en aquestes regions, el complex RENT (regulator of nucleolar silencing and telophase exit) (Straight *et al.* 1999). Altres membres d'aquest complex també implicats en l'establiment del silenciament són les proteïnes Net1 i Cdc14 (Shou *et al.* 1999; Visintin *et al.* 1999). Fins a la data tampoc

s'ha detectat en aquesta regió cap element que actui com a silenciador nucleant la formació de l'heterocromatina.

La repressió dels gens transcrits per la RNA polimerasa II en aquesta regió és, però, un fet artificial, ja que en *in vivo* aquest fet no es produeix. La formació d'estructures semblants a l'heterocromatina podria servir en aquestes regions per disminuir la recombinació i alhora com un mecanisme per afavorir la transcripció dels gens regulats per la RNA polimerasa I envers els gens regulats per la RNA polimerasa II.

## **2.4.- Els telòmers de *Saccharomyces cerevisiae***

Les seqüències telomèriques de *Saccharomyces cerevisiae* consisteixen en repeticions TG<sub>1-3</sub>/C<sub>1-3</sub>A, d'una longitud de 350±75 pb essent una de les dues cadenes rica en guanines (cadena G) i l'altra rica en citosines (cadena C). La cadena G forma en l'extrem del telòmer un fragment de DNA de cadena senzilla amb l'extrem 3' protuberant. La replicació d'aquestes seqüències és realitzada per un complex ribonucleoproteic específic, la telomerasa, que utilitza un motlle de RNA per a la síntesi de la cadena G, d'aquesta forma evita el problema de la pèrdua progressiva de seqüències telomèriques donada la naturalesa del mecanisme de replicació del DNA. En els telòmers de la majoria d'organismes s'ha trobat que la cadena rica en guanines s'estén més enllà del final del dúplex de DNA formant una extensió en forma de ssDNA (Wright *et al.* 1992; Wellinger *et al.* 1993; Makarov *et al.* 1997; McElligott and Wellinger 1997; Wright *et al.* 1997) a la que s'ha proposat que s'uneixen proteïnes específiques com ara Cdc13 en el cas de *Saccharomyces cerevisiae* (Bourns *et al.* 1998).

Adjacents a aquestes seqüències telomèriques hi ha dos grans tipus de seqüències subtelomèriques, les repeticions del tipus Y' i les repeticions del tipus X (Louis 1995). Aquests elements són molt heterogenis amb una elevada variabilitat entre els diferents telòmers i entre els mateixos telòmers en soques diferents. Les seqüències de tipus X es troben presents en tots els telòmers de *Saccharomyces cerevisiae*. Aquestes presenten diferents elements (STR A, B, C i D; Small Telomere Repeat) i un element, el "core X", que és l'únic que es troba present en tots els telòmers i que presenta una gran homologia entre els diferents telòmers. Les seqüències de tipus Y',

per contra, només es troben en dos terços dels telòmers aproximadament, havent-hi, per tant, telòmers que només tenen seqüències subtelomèriques del tipus X (Telòmers X). Aquestes seqüències es poden trobar en dos formes diferents, els elements Y' de 6.7 Kb i els elements Y' de 5.2 Kb. En aquells telòmers on hi ha elements Y' aquests es poden trobar en més d'una còpia i sempre es localitzen en una posició més telomèrica que les seqüències X del mateix telòmer (figura I.10). En aquells telòmers que tenen seqüències Y' poden haver-hi regions de repeticions TG<sub>1-3</sub> entre les diferents seqüències Y' o entre les seqüències Y' i les seqüències de tipus X.

El "core X" presenta llocs d'unió per al complex ORC i en la majoria dels casos per Abf1, elements que també es troben presents en els elements silenciadors dels *locus HML* i *HMR*. En les seqüències de tipus Y' també hi ha llocs d'unió per ORC així com dues ORFs internes que s'expressen durant la meiosi (Burns *et al.* 1994; Louis 1995). Estudis de silenciament en aquestes seqüències demostren que alguns dels elements STRs i l'extrem més pròxim al telòmer de les seqüències Y' són capaços de funcionar com a "boundary elements" impeding la propagació del silenciament, aquests elements reben el nom de seqüències STAR (SubTelomeric Anti-silencing Region). No obstant això, el silenciament en telòmers que contenen aquestes seqüències també ocorre i és capaç d'estendre's més enllà d'aquestes regions gràcies a la presència de les seqüències "core X" i de la part més pròxima al centròmer dels elements Y' (on hi ha els llocs d'unió a ORC) que són capaços d'actuar com a protosilenciadors. Aquests elements, com ja s'ha explicat anteriorment, no són capaços d'induir per si sols el silenciament, però ajuden als elements silenciadors a propagar l'heterocromatina (Fourel *et al.* 1999; Pryde and Louis 1999). Les seqüències subtelomèriques a part de la seva funció en el procés de formació de l'heterocromatina també s'han implicat en el manteniment de la llargada dels telòmers en aquelles soques amb defectes en el manteniment mediat per la telomerasa (Kass-Eisler and Greider 2000; Lundblad 2002).



**Figura 1.10.-** Esquema de diferents telòmers on es representen alineats pel “core X”. Els diferents elements subtelomèrics es mostren a la part més terminal en diferents colors; en vermell el “core X”, en verd els elements STR de les seqüències X, en groc els elements Y i en blau les repeticions TG<sub>1.3</sub>. Les ORFs presents en les regions més subtelomèriques a aquestes regions es mostren en la figura. Extret de la pàgina web del Dr. Ed J. Louis (<http://www.le.ac.uk/genetics/ejl12/index.html>).

Els telòmers juguen papers fonamentals en la funcionalitat de la cèl·lula, amb l'establiment d'estructures específiques que eviten que es produeixi fusions entre diferents cromosomes que portarien a conseqüències catastròfiques per la cèl·lula amb la formació de cromosomes dicèntrics. Convé destacar la implicació en el metabolisme dels telòmers de proteïnes com l'heterodímer Ku implicat també en la reparació dels trencaments de doble cadena (DSB), així com el fet que molts dels constituents que formen la cromatina silenciada en les telòmers són mobilitzats als punts de trencament quan es produeix un DSB on sembla que exerceixen un paper en el procés de reparació del DNA (Martin *et al.* 1999; Gasser 2000). Els telòmers són tractats per la cèl·lula com una forma especialitzada de DSB on s'ha d'evitar que es posin en marxa els mecanismes de reparació per evitar que es produeixin fusions entre diferents telòmers. L'heterodímer Ku com ja s'ha explicat anteriorment a part de regular diferents aspectes del metabolisme telomèric com és el manteniment de la llargada dels telòmers també està implicat en el procés de nucleació de l'heterocromatina.



Els telòmers també semblen jugar un paper essencial en l'arquitectura nuclear localitzant-se en la perifèria del nucli formant diferents focus discrets en la membrana nuclear. La mutació d'algunes de les proteïnes implicades en la formació dels telòmers, com l'heterodímer Ku, porta a una deslocalització d'aquests focus, indicant que una de les funcions dels telòmers seria la participació en l'organització funcional del nucli.



### **III. OBJECTIUS**



En el nostre laboratori s'ha aïllat la proteïna DDP1, l'homòleg de les vigilines a *Drosophila melanogaster*, com una proteïna associada a l'heterocromatina pericentromèrica d'aquest organisme. Donada la conservació d'aquestes proteïnes entre els metazous i els fongs ens hem plantejat la caracterització funcional d'aquestes proteïnes utilitzant com a organisme model el llevat de gemmació *Saccharomyces cerevisiae*.

L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat, doncs, estudiar la possible contribució de la vigilina de *Saccharomyces cerevisiae*, la proteïna Scp160, en la formació i/o manteniment de l'heterocromatina en aquest organisme.



## **IV. MATERIALS I MÈTODES**





En aquest apartat s'inclouen intercalades en el text les receptes de les solucions emprades en aquest treball. Les diferents solucions emprades en aquest treball es detallen només la primera vegada que apareixen en el text.



## **1.- Tècniques de treball amb el llevat *Saccharomyces cerevisiae***

### **1.1.- Característiques generals de *Saccharomyces cerevisiae* com a organisme model**

*Saccharomyces cerevisiae*, o el llevat de gemmació com també és conegut pel fet de presentar una divisió asimètrica en què la cèl·lula filla es produeix a partir de la cèl·lula mare mitjançant un procés de gemmació, és un dels principals organismes models utilitzats avui dia en Biologia Molecular. *Saccharomyces cerevisiae* és una espècie ubiqua que ha estat utilitzat per l'home en diferents processos de fermentació des de l'antiguitat, la seva utilització en investigació es remunta a mitjan dècada dels 30 i des de llavors ha estat utilitzat cada cop més donades les seves característiques que el fan molt adient per a la recerca: és un organisme unicel·lular molt fàcilment manipulable que pot ser crescut en un medi definit permetent un control acurat dels paràmetres experimentals; és un organisme molt fàcilment tractable per tècniques de genètica clàssica; permet l'estudi de la funció de moltes proteïnes mitjançant tècniques bioquímiques, i és un organisme àmpliament utilitzat en els estudis de genètica reversa donada la facilitat de manipulació genètica que permeten les tècniques de reemplaçament gènic a llevat.

*Saccharomyces cerevisiae* és el primer organisme eucariota del qual es va aconseguir sequenciar el genoma complet. Ja en el començament del projecte genoma es coneixien uns 1200 gens d'aquesta espècie, un cop obtinguda la seqüència genòmica el nombre total d'ORFs descrites és d'unes 6000 que representen el 70% de tot el genoma (Dujon 1996). El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* conté 12.8 Mb i està dividit en 16 cromosomes amb mides compreses entre les 250 Kb i les 2.5 Mb. A part de les seqüències genòmiques hi ha els gens codificats en el genoma mitocondrial d'unes 75 Kb i elements no cromosomals presents en algunes soques com ara el plasmidi 2 $\mu$ .

## **1.2.- Creixement i manteniment de soques de *Saccharomyces cerevisiae***

Les cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae* poden ser crescudes en medi ric de composició desconeguda, el YEP, o en un medi sintètic, de composició coneguda, medi SD (*Synthetic Dropout*) que ens permet créixer selectivament soques auxotròfiques a les quals hem complementat amb el gen necessari per eliminar l'auxotrofia .

Les cèl·lules de llevat poden ser crescudes tant en medi líquid com en medi sòlid, preparats ambdós amb els mateixos components afegint agar en els medis sòlids per a la seva solidificació.

### **1.2.1.- Composició dels medis utilitzats per créixer llevats**

**Medi ric (YEP):** Extracte de llevat 10 g/L, peptona Bacteriològica 20 g/L, agar (només per a plaques) 20 g/L.

**Medi mínim (SD):** YNB-AA (Difco) 1.7 g/L, sulfat amònic 5 g/L, agar (només per a plaques) 20 g/L.

Ambdós tipus de medis es preparen autoclavant aquests components en el recipient adequat (erlenmeyers o ampolles de vidre segons les necessitats). L'autoclau es realitza a 121°C durant 20 minuts. Un cop autoclavats s'afegeixen la resta de components adients en cada cas:

- A. Font de Carboni : glucosa (50 ml de glucosa al 40%/L) o galactosa (75 ml de galactosa al 30%/L)
- B. Aminoàcids o nucleòtids necessaris per a complementar el medi en cas necessari:
  - a) Al medi SD s'afegeixen diferents combinacions d'aminoàcids i nucleòtids amb alguns components omesos per tal d'obtenir un medi selectiu per la presència dels gens marcadors capaços de recuperar les auxotrofies que presenta una determinada soca. Les diferents

combinacions d'aminoàcids i/o nucleòtids es preparen en forma de *dropout* 10X amb les següents concentracions finals: adenina 200 mg/L, triptòfan 200 mg/L, histidina 200 mg/L, leucina 1000 mg/L, lisina 300 mg/L, uracil 200 mg/L.

b) Al medi ric es pot afegir Adenina a la concentració indicada anteriorment per tal de suplementar el medi (YEP-Adenina)

C. Components addicionals: Àcid 5-Fluororòtic (FOA) (50-90 mg/100 ml), G418 (300 mg/L) o benomyl (2,5-20 mg/L).

### **Consideracions addicionals:**

1. Tots els components utilitzats en els medis de llevat han de ser esterilitzats bé mitjançant l'autoclau o mitjançant filtració amb filtres Millex de 0,22 µm (Millipore). S'esterilitzen mitjançant filtració aquells components que són susceptibles de ser fer-se malbé en ser autoclavats: galactosa, adenina, triptòfan, FOA, G418 i benomyl.
2. Els aminoàcids o nucleòtids es preparen en forma d'estocs esterilitzats a partir del que es preparen el suplement a afegir al medi concret a preparar. Els diferents estocs es preparen a les següents concentracions:
  - a) Els aminoàcids leucina, histidina, lisina i triptòfan i el nucleòtid uracil es preparen a l'1%. L'aminoàcid triptòfan es conserva protegit de la llum embolicat amb paper d'alumini.
  - b) El nucleòtid adenina es prepara al 0.5%.

### **1.2.2.- Creixement i manteniment rutinari de *Saccharomyces cerevisiae***

La temperatura òptima de creixement de *Saccharomyces cerevisiae* és de 30°C, creixent-se els cultius líquids en agitació per tal d'afavorir l'intercanvi gasós i per evitar la formació de grumolls, i els cultius sòlids en plaques de Petri amb medi solidificat per l'agar. Les plaques de medi sòlid se segellen amb *parafilm* per tal d'evitar que s'assequin excessivament.

**Manteniment de les soques de *Saccharomyces cerevisiae*:** Les soques de *Saccharomyces cerevisiae* poden mantenir-se indefinidament en medi YDP amb 25% de glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Si s'ha de mantenir la pressió selectiva per alguna auxotrofia (contenen plasmidis que confereixen capacitat de créixer en medi selectiu per aquestes auxotrofies) és millor conservar-les en el medi selectiu adient amb 25% de glicerol. Els estocs congelats reben el nom de glicerinats.

**Descongelació dels estocs:** Per recuperar cèl·lules de llevat a partir de glicerinats s'agafa una petita porció del glicerinat rasant amb un escuradents estèril i es fa una estria en el medi adient. Aquestes plaques s'incuben a  $30^{\circ}\text{C}$  fins a l'aparició de colònies (aproximadament de 3 a 5 dies) i es guarden segellades amb *parafilm* a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Treball rutinari amb *Saccharomyces cerevisiae*:** Les cèl·lules amb què s'ha de treballar rutinàriament es mantenen en estocs crescuts en plaques de medi sòlid, descongelant-se noves cèl·lules a mesura que aquestes envelleixen, generalment es preparen noves plaques cada 2 mesos a partir de les cèl·lules congelades. Per al creixement de cultius líquids a partir de cèl·lules crescudes en plaques s'agafa amb un escuradents una colònia gran (o un conjunt de colònies segons el cas) i es dissol en 5 ml de medi líquid (minicultius) barrejant bé per dispersar les cèl·lules. Si es requereix créixer cultius de volum més gran primer es creixen minicultius fins que aquests arriben a la fase estacionària (aproximadament  $\text{OD}_{600}$  1,5) i a partir d'aquests s'inoculen els cultius de major volum.

**Preparació de glicerinats a partir de nous transformants:** Per a guardar una soca com un estoc congelat es creixen minicultius d'aquesta i es barreja 1 ml de cultiu amb 1 ml de YPD (YEP-glucosa) (o el medi adient) que conté un 50 % de glicerol en criotubs (Corning), aquests es congelen amb neu carbònica i s'emmagatzemen a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **1.2.3.- Anàlisi de creixement en placa de diferents soques de *Saccharomyces cerevisiae***

En aquest treball a l'hora d'estudiar la capacitat de créixer de les diferents soques de llevat estudiades en plaques que contenen diferents compostos químics (FOA o

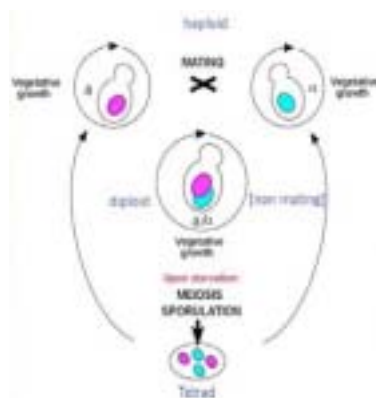
benomyl) s'han plaquejat dilucions seriades de cultius de llevat en creixement exponencial en les diferents plaques utilitzades en cada anàlisi. Els minicultius líquids de cèl·lules de llevat es dilueixen de manera que en tots ells hi ha una concentració de cèl·lules corresponent a  $20 \times 10^6$  cèl·lules ( $1 \text{ OD}_{600}$ ), en el primer carril de l'assaig es plaquegen  $20 \mu\text{l}$  d'aquests cultius i en els següents carrils es plaquegen  $20 \mu\text{l}$  de les dilucions 1:10, 1:100, 1:1000 i 1:10000 respectivament.

### 1.3. Esporulació i microdissecció de tètredes

#### 1.3.1. Esporulació de soques diploides de *Saccharomyces cerevisiae*

##### Cicle vital del llevat *Saccharomyces cerevisiae*:

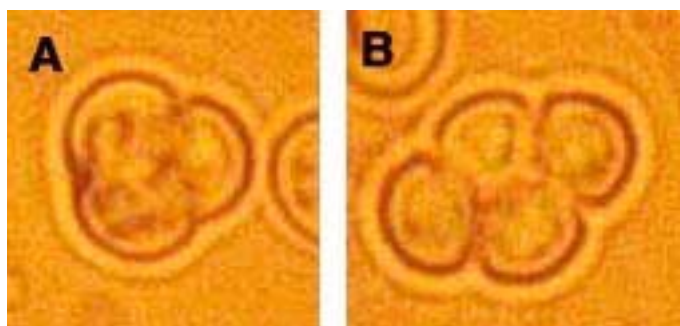
El cicle vital de *Saccharomyces cerevisiae* alterna entre estats haploides i diploides; ambdós tipus de cèl·lules poden existir com a cultius estables i ser mantinguts de forma vegetativa mitjançant divisions mitòtiques. Les cèl·lules de llevat són fàcilment manipulables per obtenir cèl·lules haploides a partir de les cèl·lules diploides (esporulació) i viceversa (conjugació) (figura M-1). Les cèl·lules haploides, tal com ja s'ha explicat en la Introducció, poden ser de dos tipus d'aparellament diferents, el tipus d'aparellament *a* o el tipus d'aparellament  $\Delta$ ; l'aparellament entre dues cèl·lules de diferents tipus d'aparellament dóna lloc a la formació de diploides *a/\Delta* que són incapaços de creuar-se de nou, però que poden entrar en meiosi donant lloc a quatre espores haploides.



**Figura M.1-** Esquema del cicle vital de *Saccharomyces cerevisiae*. Extret de la pàgina web del Dr. Horst Feldmann ([http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/feldmann/yeast\\_genome/Yeast\\_1.htm](http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/feldmann/yeast_genome/Yeast_1.htm))

Les cèl·lules diploides de *Saccharomyces cerevisiae* normalment creixen de forma vegetativa mantenint-se com a cèl·lules diploides, però quan són sotmeses a *stress* per manca de nutrients (especialment la manca de nitrogen) inicien la divisió meiótica seguida de la formació d'espores. Les quatre cèl·lules haploides que es deriven d'aquesta divisió es mantenen inicialment dins de les restes de la paret cel·lular de la cèl·lula de què s'originen, formant l'estructura coneguda com a asc (figura M-2). La formació d'asc, característica dels ascomycets (o fongs formadors d'asc), fa que aquests organismes siguin molt adients per a l'anàlisi genètic, ja que es poden obtenir de forma aïllada les quatre cèl·lules haploides procedents d'una mateixa divisió meiótica mitjançant un procés de microdissecció.

Per a l'obtenció d'espores en aquest treball es varen realitzar indistintament esporulacions en medi sòlid o esporulacions en medi líquid; en ambdós casos es comprova mitjançant microscopia l'aparició dels asc com a senyal que les cèl·lules han entrat en el procés de formació d'espores.



**Figura M.2-** Imatge de contrast de fases de l'aspecte d'un asc amb les 4 espores abans (A) i després (B) del trencament de la paret cel·lular mitjançant micromanipulació.

### 1.3.1.1.- Esporulació en medi sòlid

Les cèl·lules diploides són crescudes inicialment en plaques adients per a cada soca i posteriorment són transferides a plaques específiques per a induir l'esporulació (acetat potàsic 10 g/L, agar 20 g/L), a aquesta barreja s'hi afegixen els requeriments nutricionals adients per a cada soca al 25% de la concentració que s'utilitza per a la producció de plaques SD (vegeu l'apartat 1.2.1 dels Materials i Mètodes).

Les cèl·lules són aplicades en aquestes plaques en forma de "pilots" de cèl·lules per tal d'afavorir la formació de les espores i s'incuben a 30°C fins a observar-se la formació d'asc al microscopi.



### **1.3.1.2.- Esporulació en medi líquid**

Inicialment es creixen les cèl·lules en medi de preesporulació PSP2 (phatalat potàsic 50 mM a pH 5, YNB-AA 6,6 g/L, extracte de llevat 1 g/L, acetat potàsic 10 g/L, s'hi afegeixen els requeriments nutricionals necessaris per al creixement de la soca a la mateixa concentració de la usada en el medi SD, vegeu l'aparat 1.2.1 dels Materials i Mètodes), deixant-les créixer fins que aquestes estan entre 0,4 i 0,6 OD<sub>600</sub>. Es renten les cèl·lules amb aigua estèril i es resuspenen en medi d'espurulació SPM (acetat potàsic 3 g/L) deixant-les a 30°C en agitació fins a observar la formació d'ascos al microscopi.

### **1.3.2.- Microdissecció de tètredes**

Un cop s'ha observat la formació d'ascos al microscopi s'han de tractar les cèl·lules de forma que es digereixi suaument la paret cel·lular però sense que aquesta arribi a trencar-se, d'aquesta forma s'aconsegueix, mitjançant micromanipulació, separar en una zona aïllada de la placa l'asc sencer sense que aquest es trenqui i posteriorment s'aconsegueix trencar la paret cel·lular mitjançant micromanipulació mecànica (figura M-2) per tal d'obtenir les quatre espores procedents d'un mateix asc de forma aïllada. Si la paret cel·lular està digerida en excés no es poden separar les quatre espores d'un mateix asc en una zona aïllada de la placa i si no es realitza una digestió suau de la paret cel·lular aquesta no pot ser trencada posteriorment mitjançant micromanipulació mecànica.

En aquest treball la digestió es va realitzar inicialment amb diferents concentracions de Liticasa (Sigma) i veient que aquest produïa una digestió molt forta fins i tot a baixes concentracions, es va optar per utilitzar l'enzim  $\Delta$ -glucoronidasa (Sigma). La microdissecció de tètredes es va realitzar utilitzant el microscopi de dissecció (Micro Video Instruments, Inc., Avon, MA) per a la micromanipulació mecànica.

## **1.4.- Determinació del nivell de ploidia cel·lular mitjançant citometria de flux**

La citometria de flux és una tècnica que permet quantificar components o característiques estructurals de les cèl·lules mitjançant mètodes òptics. El citòmetre

de flux mesura una única cèl·lula cada vegada, essent capaç de processar moltes cèl·lules per segon de forma que permet una anàlisi individualitzada de cadascuna de les cèl·lules que hi ha en una població cel·lular.

El citòmetre és capaç de mesurar diferents paràmetres de les mostres: la llum dispersada per cadascuna de les cèl·lules en diferents angles (el *Forward Scatter* i el *Side Scatter*) i la fluorescència emesa per la mostra a diferents longituds d'ona. El *Forward Scatter* (FS) mesura la llum dispersada en la mateixa direcció d'incidència que la llum làser incident, aquest paràmetre normalment és més sensible al tipus de superfície que presenten les partícules analitzades; el *Side Scatter* (SS) mesura la llum dispersada en la direcció perpendicular a l'eix d'incidència de la llum, aquest paràmetre normalment està condicionat per la forma i mida de les partícules analitzades. La fluorescència emesa per les mostres a diferents longituds d'ona generalment és el resultat de la tinció amb un fluorocrom concret que reconeix estructures cel·lulars específiques.

En aquest treball s'ha utilitzat com a fluorocrom el Iodur de Propidi (IP), que s'uneix específicament als àcids nucleics. En utilitzar-lo després de sotmetre les cèl·lules a un tractament amb RNasa aquesta tècnica ens permet quantificar la quantitat de DNA que hi ha a cada cèl·lula, o el que és el mateix, el seu nivell de ploidia cel·lular.

Les cèl·lules analitzades per citometria de flux o FACS (Fluorescent Assisted Cell Sorter) es creixen en medi líquid de forma que estiguin en fase exponencial i es fixen amb etanol 70% on poden ser mantingudes indefinidament fins a ser tenyides i portades al FACS.

### **Protocol de fixació de les cèl·lules:**

Es creixen les cèl·lules *over-night* (ON) en medi SD o YEP líquid segons sigui adient, s'agafen aproximadament 0,5 ml de cultiu en un eppendorf de 2 ml i es centrifuguen durant 3 minuts a 15000g, el precipitat de cèl·lules obtingut es renta amb 1,5 ml d'aigua estèril i es resuspèn de nou les cèl·lules amb 1,5 ml d'etanol al 70% fred vortexant al mateix moment per tal d'evitar la formació de grumolls cel·lulars. Finalment, les cèl·lules en etanol es deixen un mínim de 30 minuts a  $-20^{\circ}$  C i es guarden indefinidament a  $4^{\circ}$  C.

És convenient mesurar la D.O. del cultiu utilitzat per tal d'agafar més o menys cèl·lules fixades per a la tinció per a portar al FACS.

#### **Preparació i tinció de les cèl·lules:**

S'agafen aproximadament  $2 \times 10^6$  cèl·lules fixades en un eppendorf de 2 ml i se centrifuguen 2 minuts a 15.000g, s'elimina el sobrenedant, es renta el *pellet* de cèl·lules amb 0,5 ml de citrat sòdic 50 mM i se centrifuguen de nou. Es resuspèn el *pellet* en 0,5 ml de citrat sòdic 50 mM que conté 50 µg de RNAsa A (afegir 5 µl d'un estoc de RNAsa A a 10 mg/ml) i s'incuba a 37°C durant 2 hores. Finalment s'afegeix a les cèl·lules 0,5 ml de citrat sòdic 50 mM que conté 5µg de Iodur de Propidi (IP) (afegir 10 µl d'un estoc de IP a 1mg/ml) de forma que la concentració final de IP a la barreja és de 5µg/ml, i s'incuba un mínim de 30 minuts a temperatura ambient després dels quals les mostres es poden processar immediatament o bé es guarden ON a 4°C en un lloc fosc per a processar-les l'endemà.

Les mostres així tenyides poden guardar-se fins a un màxim d'una setmana, però s'han de mantenir sempre a 4°C i a les fosques. Les mostres van ser processades utilitzant el Citòmetre Coulter XL dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. Per a l'anàlisi dels resultats s'han emprat els programes WinMDI i FlowExplorer.

### **1.5.- Transformació de DNA a cèl·lules de llevat**

El terme transformació s'utilitza per descriure la captació de DNA extern per la cèl·lula i els consegüents canvis fenotípics que aquest fenomen produeix a les cèl·lules. La transformació a cèl·lules de *Saccharomyces cerevisiae* va ser descrita per primera vegada l'any 1960 (Oppenoorth 1960) i és utilitzada de forma rutinària en els laboratoris on es treballa amb llevat des del desenvolupament del primer protocol de transformació gènica a llevat (Hinnen *et al.* 1978). Des d'aleshores s'han desenvolupat diferents mètodes de transformació a llevats que inclouen, entre els més utilitzats, la formació d'esferoplast, la utilització de cations monovalents i l'electroporació (Gietz and Woods 2001). En aquest treball s'ha emprat el protocol

de transformació amb acetat de liti donat que és un mètode simple i que proporciona una elevada eficiència de transformació.

### **1.5.1.- Protocol de transformació de llevats mitjançant LiAc:**

#### **Obtenció de les cèl·lules competents:**

A partir de l'estoc de cèl·lules crescudes en placa sobre les què es vol realitzar la transformació de DNA es creix un minicultiu en medi SD o YEP segons sigui convenient i es deixa créixer ON a 30°C en agitació, a partir d'aquest l'endemà s'inocula un cultiu de 50 ml i es deixa créixer fins que aquest arriba a estar entre 0,4 i 0,6 OD<sub>600</sub>. Es transfereixen les cèl·lules a un tub Falcon de 50 ml i se centrifuga a 1000g durant 5 minuts per tal de baixar les cèl·lules, s'elimina el sobrenedant i es renten les cèl·lules amb 25-50 ml d'aigua mQ estèril tornant a centrifugar les cèl·lules igual que anteriorment, finalment es resuspenen les cèl·lules en 250 µl de TE/LiAc (TE: Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM pH 8; LiAc: 100 mM LiAc a pH 7,5) per tal de tenir una concentració de cèl·lules de 2x10<sup>9</sup>. Un cop obtingudes les cèl·lules competents, aquestes han estat utilitzades a l'instant.

#### **Transformació de DNA plasmídic:**

En un eppendorf de 1,5 ml es barregen 0,1 µg de DNA plasmídic a transformar amb 100 µg de DNA *carrier* (DNA d'esperma de salmó) sobre els quals s'hi afegeixen 100 µl de cèl·lules competents recent obtingudes. Els tubs es barregen bé mitjançant el vòrtex, s'afegeixen 600 µl de TE/LiAc/PEG (TE/LiAc que conté un 40% de PEG) i es barreja durant 10 segons amb el vòrtex. Les cèl·lules s'incuben 30 minuts a 30°C, s'hi afegeix 70 µl de dimetilsulfòxid (DMSO) i es barreja per inversió (és important no vortexar les cèl·lules en aquest punt del protocol). Posteriorment les cèl·lules se sotmeten a un xoc tèrmic, per aixó s'incuben les cèl·lules durant 15 minuts a 42°C i es deixen posteriorment 2 minuts en gel. Finalment, se centrifugen les cèl·lules a 14.000 rpm, s'elimina el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules en 500 µl de TE estèril de les quals se'n plaquegen 100 µl en plaques selectives per al marcador utilitzat en la transformació.

### **Transformació de DNA lineal:**

Per tal d'integrar un fragment al genoma per recombinació homòloga s'utilitza aproximadament 1 µg de DNA linealitzat (bé sigui obtingut mitjançant reaccions de PCR o mitjançant digestió dels plasmidis de disrupció que contenen el *cassette* de disrupció; vegeu l'apartat 1.6 dels Materials i Mètodes) i es realitza la transformació mitjançant el mateix procediment descrit per a la transformació de DNA plasmídic, però resuspenent les cèl·lules en un volum final de 150 µl de TE estèril que es plaquegen en la seva totalitat a les plaques selectives.

### **Utilització de la resistència a G418 com a gen marcador:**

El gen KanMX és un gen híbrid que expressa l'enzim bacterià aminoglicòsid fosfotransferasa sota el control d'un promotor fort de llevat (Wach *et al.* 1994; Steiner *et al.* 1995). L'expressió d'aquest enzim bacterià a *Saccharomyces cerevisiae*, així com a d'altres llevats, confereix a aquests microorganismes resistència a la geneticina o G418 (Jimenez and Davies 1980; Hadfield *et al.* 1990). La utilització d'aquest marcador com a selecció confereix una sèrie d'avantatges sobre la utilització dels marcadors auxotròfics clàssics: s'elimina la dependència de la presència dels marcadors auxotròfics en la soca hoste i la manca d'homologia del marcador KanMX amb el DNA del llevat elimina l'alt percentatge de *background* que es produeix en utilitzar marcadors auxotròfics propis del llevat per la recombinació entre aquests i les seqüències pròpies del llevat.

Com a procediment suplementari quan s'utilitza el gen KanMX com a gen marcador, les cèl·lules transformades no es plaquegen directament, sinó que s'utilitzen per inocular un cultiu de 50 ml que es deixa créixer ON, l'endemà es precipiten les cèl·lules a 3000 rpm durant 5 minuts i es resuspenen en 1 ml de TE estèril del quals es plaquegen 250 µl en plaques que contenen 300 mg/L de G418. Un cop incubades les plaques durant 3-4 dies apareixen en elles colònies grans (3-4 mm de diàmetre) i colònies petites (0,2-2 mm de diàmetre). Les colònies petites corresponen a falsos positius que són deguts, en la majoria dels casos, a cèl·lules que porten còpies del gen KanMX però no l'han integrat en el genoma i han produït suficient quantitat de l'enzim aminoglicòsid fosfotransferasa per tal d'inactivar l'acció del G418 durant algunes poques divisions cel·lulars.

### **Preparació de les solucions emprades en aquest protocol:**

Les diferents solucions emprades en aquest protocol TE/LiAc i TE/LiAc/PEG es preparen al moment de realitzar l'experiment a partir de solucions estoc de PEG al 50%, TE 10X (Tris-HCl 0,1 M, EDTA 10 mM pH 8) i LiAc 10X (LiAc 1 M ajustat a pH 7,5 mitjançant àcid acètic diluït). L'esperma de salmó s'ha de desnaturalitzar abans d'utilitzar-lo fent-lo bullir en aigua durant 20 minuts i deixant-lo posteriorment en gel.

## **1.6. Tècniques de manipulació gènica a *Saccharomyces cerevisiae***

Una de les característiques principals de *Saccharomyces cerevisiae* que el fan un organisme model molt adient per estudis de Biologia Molecular és la facilitat amb què es poden realitzar experiments de manipulació gènica en aquest microorganisme. A diferència de molts altres organismes, a *Saccharomyces cerevisiae* la recombinació dels fragments de DNA transformats que contenen seqüències parcialment homòlogues al genoma del llevat ocorre principalment a través de recombinació homòloga, permetent que els fragments de DNA introduïts a la cèl·lula de llevat puguin ser dirigits a localitzacions específiques del genoma. Aquest fet permet que la còpia *wild type* d'un gen sigui reemplaçada per una forma alterada d'aquest. Les aplicacions concretes d'aquestes tècniques inclouen, entre d'altres, la generació d'al·lels nuls en què l'ORF ha estat substituïda per un gen marcador, la generació de proteïnes de fusió amb diferents epítops que substitueixen la còpia *wild type* pròpia del genoma, o la substitució del promotor endogen d'un gen per un promotor regulable; aquestes aplicacions han permès un gran avenç en l'estudi de les funcions *in vivo* de les proteïnes. El fet que *Saccharomyces cerevisiae* creixi com a cèl·lula haploide facilita la creació de soques mutants d'un gen determinat modificant l'única còpia que presenten aquests microorganismes.

Bàsicament, per a les tècniques de manipulació gènica a *Saccharomyces cerevisiae* i d'altres organismes models amb característiques similars s'utilitzen dos grans tipus de metodologies per a aconseguir disposar de *cassettes* específics que permeten la

manipulació d'un gen determinat: les tècniques clàssiques de clonatge i la manipulació gènica basada en tècniques de PCR.

### **1.6.1.- Tècniques utilitzades per a l'obtenció dels *cassettes* de manipulació gènica**

#### **1.6.1.1.- Manipulació gènica mitjançant tècniques clàssiques de clonatge**

Les tècniques clàssiques de clonatge s'utilitzen principalment per a l'obtenció de *cassettes* de disrupció que permeten la truncació o eliminació parcial o total de l'ORF, donant lloc a al·lels mutants per a un gen concret. Per tal d'aconseguir disposar del *cassette* de disrupció per a un gen determinat se subclona el gen diana més les seqüències adjacents en un plasmidi i posteriorment se substitueix un fragment intern del gen diana per un marcador que ens permeti seleccionar aquelles cèl·lules que han incorporat el *cassette* de disrupció en el seu genoma. Un cop es disposa de la construcció que conté el gen marcador flanquejat per les seqüències homòlogues al gen diana, es digereix el plasmidi de forma que s'allibera en forma de DNA lineal aquesta construcció que s'introdueix a les cèl·lules mitjançant les tècniques de transformació del DNA, per tal que pugui recombinar amb les seqüències pròpies del llevat (vegeu l'apartat 1.5 dels Materials i Mètodes).

Aquesta tècnica té l'avantatge que permet obtenir regions d'homologia molt més llargues a les obtingudes amb les tècniques basades en PCR (veure més endavant), fet que permet obtenir una major freqüència relativa de la recombinació homòloga envers la recombinació no homòloga, donat que aquesta freqüència és més elevada com més llargues són les regions d'homologia utilitzades. Aquesta tècnica, però, presenta una sèrie de desavantatges importants respecte a les tècniques basades en PCR: requereix de diferents passos successius de clonatge que poden fer que tot el procés sigui llarg i feixuc i requereix de la presència de dianes de restricció adjacents que permetin el subclonatge del marcador utilitzat en les seqüències pròpies del gen diana, aquest fet fa que moltes vegades no es pugui realitzar fàcilment la deleció completa de tota l'ORF d'un gen.

### 1.6.1.2.- Manipulació gènica basada en tècniques de PCR

Aquestes tècniques permeten l'obtenció del *cassette* utilitzat per a la recombinació homòloga mitjançant l'amplificació per PCR dels marcadors selectius amb oligonucleòtids que contenen cues amb regions d'homologia flanquejants a la regió genòmica que es vol modificar. Aquestes tècniques permeten, amb molta facilitat, la generació de delecions exactes de l'ORF d'un gen concret, així com manipulacions de les seqüències pròpies del llevat com ara la formació de proteïnes de fusió amb epítops determinats o canvis en els promotors endògens, entre d'altres manipulacions.

La manipulació gènica basada en tècniques de PCR ofereix un ventall d'avantatges sobre les tècniques clàssiques de clonatge: elimina la necessitat de clonar el gen que es vol manipular, permet obtenir diferents *cassettes* de manipulació gènica per un mateix gen amb marcadors selectius diferents utilitzant un mateix *set* d'oligonucleòtids gràcies al fet de disposar d'un conjunt de plasmidis que contenen diferents marcadors clonats en seqüències plasmídiques comunes (Wach *et al.* 1994), i permet l'eliminació completa de tota l'ORF. En aquesta tècnica la regió que s'elimina no depèn de la presència de dianes de restricció concretes que permetin eliminar una seqüència determinada, sinó que simplement depèn de les seqüències afegides als oligonucleòtids utilitzats per a l'amplificació.

Una limitació important d'aquesta tècnica és la llargada dels oligonucleòtids que es poden sintetitzar. A la pràctica es poden generar oligonucleòtids de fins a 125 pb dels quals, per norma general, 25 s'utilitzen per a l'amplificació dels marcadors selectius i els 100 restants poden utilitzar-se com a regions flanquejant d'homologia. Donat que, com s'ha comentat abans, la freqüència relativa de la recombinació homòloga respecte a la recombinació no homòloga depèn de la llargada de les regions d'homologia utilitzades, aquesta tècnica només es pot usar en cas que la freqüència de recombinació homòloga sigui elevada. A *Saccharomyces cerevisiae* això generalment no és un problema donat que en aquest organisme la recombinació homòloga és el principal fenomen responsable de la integració del DNA; en aquest organisme es poden aconseguir delecions de gens utilitzant regions d'homologia de només 35 pb a cada oligonucleòtid (Wach *et al.* 1994).



## **1.6.2.- Manipulacions gèniques realitzades en aquest treball**

En aquest treball experimental hem utilitzat les dues estratègies explicades anteriorment per a l'obtenció de mutants per deleció o disrupció gènica dels gens *SCP160*, *RPD3*, *RIF1* i *RIF2* i per a la generació d'una còpia modificada del gen *SCP160* que codifica per a la proteïna de fusió Scp160-3HA.

### **1.6.2.1.- Deleccions gèniques realitzades al gen *SCP160***

Per a l'obtenció de mutants per deleció del gen *SCP160* hem utilitzat les dues estratègies explicades anteriorment:

1. Hem utilitzat el plasmidi p $\Delta$ SCP160::HIS3 que conté el marcador *HIS3* flanquejat per regions d'homologia de les regions *upstream* i *downstream* a l'ORF del gen *SCP160* (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes). Per tal d'obtenir el fragment lineal utilitzat com a *cassette* de deleció es digereix aquest plasmidi amb l'enzim de restricció NotI.
2. Mitjançant els oligonucleòtids  $\Delta$ SCP160-UP i  $\Delta$ SCP160-LO (vegeu l'apartat 2.4 dels Materials i Mètodes) podem amplificar els marcadors clonats en els plasmidis YDp (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes) per tal d'obtenir el *cassette* de deleció adequat. Per a la deleció del gen *SCP160* hem utilitzat els oligonucleòtids esmentats sobre el plasmidi YDp-L que conté clonat el marcador *LEU2*; un cop obtinguts els productes de l'amplificació per PCR s'ajunten 2 o 3 reaccions de PCR i es carreguen en un gel d'agarosa per tal de purificar en gel la banda que conté el *cassette* de deleció, posteriorment es precipita el DNA resuspenent-lo en un volum final de 10  $\mu$ l que s'utilitzen directament per transformar les cèl·lules de llevat.

### **1.6.2.2.- Disrupcions del gen *RPD3*:**

Per a l'obtenció de mutants del gen *RPD3* hem generat soques que contenen la còpia *wild type* del gen *RPD3* disrompuda per a l'inserció dels marcadors *LEU2* o *TRP1*. Per realitzar aquestes disrupcions hem utilitzat els plasmidis p $\Delta$ RPD3::LEU2 i p $\Delta$ RPD3::TRP1, que contenen clonat el gen *RPD3* disromput per la inserció d'aquests marcadors (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes). Per tal

d'obtenir el fragment lineal utilitzat com a *cassette* de disrupció s'han amplificat per PCR les seqüències clonades en aquests plasmidis utilitzant els oligonucleòtids RPD3-U1 i RPD3-L1 (vegeu l'apartat 2.4 dels Materials i Mètodes i l'Apèndix de Seqüències). Els fragments de PCR obtinguts es processen tal com s'ha esmentat anteriorment per tal de concentrar el fragment de DNA lineal que posteriorment s'utilitza per transformar els llevats.

### **1.6.2.3.- Deleció del gen *RIF1***

Per a l'obtenció de mutants de deleció del gen *RIF1* hem utilitzat els plasmidi p $\Delta$ RIF1::TRP1 que conté els marcadors *TRP1* flanquejat per seqüències de la regió 5' del gen *RIF1 upstream* al marcador i seqüències de la regió 3' del gen *RIF1 downstream* al marcador. Les seqüències flanquejants presents en aquest plasmidi inclouen part de l'ORF del gen *RIF1*, de manera que en aquest cas no es realitza una deleció completa de l'ORF del gen *RIF1* sinó que se substitueix un fragment intern a l'ORF del gen *RIF1* pel marcador utilitzat (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes). Per tal d'obtenir el fragment lineal utilitzat com a *cassette* de deleció es digereix el plasmidi p $\Delta$ RIF1::TRP1 amb l'enzim de restricció NotI.

### **1.6.2.4.- Deleció del gen *RIF2***

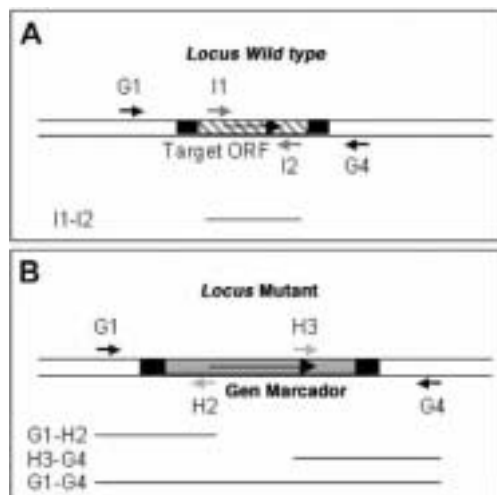
Per a l'obtenció de mutants de deleció del gen *RIF2* inicialment hem intentat utilitzar el *cassette* de deleció obtingut mitjançant tècniques de PCR, per això s'han amplificat els marcadors presents en els plasmidis YDp mitjançant els oligonucleòtids  $\Delta$ RIF2-UP i  $\Delta$ RIF2-LO (vegeu l'apartat 2.4 dels Materials i Mètodes); no obstant, utilitzant aquest *cassette* de deleció no hem estat capaços de generar soques mutants per deleció del gen *RIF2*, donat que en tots els clons obtinguts s'havien produït fenòmens de recombinació no homòloga. Posteriorment hem utilitzat el plasmidi p $\Delta$ RIF2::LEU2 que conte clonat el gen *RIF2* on bona part de l'ORF que codifica per la proteïna Rif2 ha estat substituïda pel marcador *LEU2* (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes); utilitzant aquest plasmidi es genera un mutant que presenta una deleció interna de l'ORF de *RIF2* que inclou la majoria de les seqüències codificants del gen *RIF2*. Per tal d'obtenir el fragment lineal utilitzat com a *cassette* de deleció es digereix aquest plasmidi amb l'enzim de restricció NotI.

#### **1.6.2.5.- Generació de la proteïna de fusió Scp160-3HA**

Per a l'obtenció del *cassette* de modificació gènica que ens permet generar una còpia modificada del gen *SCP160* que codifica per a la proteïna de fusió Scp160-3HA s'han utilitzat els oligonucleòtids F2-SCP160 i R1-SCP160 (vegeu l'apartat 2.4 dels Materials i Mètodes) per amplificar les seqüències presents en el plasmidi PFA6a-3HA-kanMX6 (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes) de forma que obtenim un *cassette* de modificació que en integrar-se en el genoma afegeix, en pauta a les seqüències pròpies de l'ORF del gen *SCP160*, les seqüències que codifiquen per tres còpies de l'epítot de l'hemaglutinina del virus *influenza* (epítot HA). Un cop obtingudes per PCR diferents reaccions que contenen el fragment desitjat aquestes es processen tal com s'ha esmentat anteriorment, per tal de concentrar el fragment de DNA lineal que posteriorment s'utilitza per a transformar els llevats.

#### **1.6.3.- Tècniques analítiques utilitzades per verificar la correcta integració dels *cassettes* de manipulació gènica en el genoma**

Per a verificar la correcta integració dels fragments utilitzats en els experiments de manipulació gènica i poder d'aquesta manera discernir en quins clons s'han incorporat aquests fragments per recombinació homòloga donant lloc a les manipulacions gèniques desitjades envers a aquells en què la integració ha tingut lloc per recombinació no homòloga, s'utilitzen tècniques de PCR analítica que permeten un ràpid *screening* dels clons obtinguts. En general, en els llevats ascomycets rarament la incorporació de DNA extern en el genoma ocorre en més d'un *locus* a la vegada (Cannon *et al.* 1992; Wendland 2003), podent confiar en les tècniques de PCR com una forma ràpida i precisa d'analitzar un llarg nombre de clons obtinguts en els experiments de transformació gènica realitzats amb els *cassettes* de manipulació gènica.



**Figura M.3-** Els primers G1 i G4 es localitzen en regions externes a les regions d'homologia utilitzades per a dirigir les modificacions genètiques realitzades (en negre). (A) En el *locus wild type* s'obté una banda d'una mida determinada amb els oligonucleòtids G1 i G4 que és modificada per la inserció del gen marcador (B). Addicionalment es pot analitzar la manca d'amplificació gènica en les cèl·lules mutants amb una parella d'oligonucleòtids interns a la regió modificada (oligonucleòtids I1-I2) o utilitzant els oligonucleòtids G1 i G4 amb oligonucleòtids específics per al marcador utilitzat, els oligonucleòtids H2 i H3 (B). Adaptat de (Wendland 2003).

En aquest treball, per tal d'analitzar la incorporació d'aquests fragments en el *locus* correcte s'han dissenyat oligonucleòtids externs a la regió utilitzada com a regions d'homologia (figura M.3; vegeu l'apèndix de seqüències), d'aquesta manera es poden analitzar les modificacions que s'han produït en un *locus* concret analitzant el canvi de mida de les bandes obtingudes mitjançant l'amplificació per PCR dels DNAs genòmics obtinguts a partir dels diferents clons generats (sempre que el marcador no generi un insert de la mateixa mida que la regió substituïda).

## 1.7.- Soques de *Saccharomyces cerevisiae* utilitzades en aquest treball

En aquest estudi a l'hora d'analitzar els fenotips que presenta la mutació del gen *SCP160* s'han generat cèl·lules *scp160* mitjançant l'obtenció d'espores a partir de cèl·lules diploides heterozigotes per la mutació en el gen *SCP160* (vegeu l'apartat 1.3 dels Materials i Mètodes) o mitjançant tècniques de manipulació gènica a partir de cèl·lules haploides (vegeu l'apartat 1.6.2.1 dels Materials i Mètodes). En cadascun dels experiments realitzats on s'han obtingut cèl·lules *scp160* s'han generat i analitzat per separat diferents clons de cèl·lules *scp160* donada la variabilitat observada en l'establiment dels fenotips estudiats en aquestes soques. Tenint en compte la naturalesa de la mutació *scp160* (les cèl·lules *scp160* presenten aberracions

en el nivell de ploidia cel·lular; vegeu l'apartat 1.1 dels Resultats i Discussió) és impossible conèixer la composició genotípica exacta d'aquestes soques (no es coneix el nombre de còpies que presenten les cèl·lules *scp160* de cadascun dels marcadors gènics esmentat en aquesta taula, així com si n'han perdut algun d'ells). En la taula M.1 es recullen els diferents clons obtinguts sota unes mateixes condicions experimentals amb una mateixa denominació, si bé en les cèl·lules *scp160* cadascun dels diferents clons individuals inclosos sota una mateixa denominació presenta unes característiques fenotípiques pròpies.

| <i>Soca/Soques</i> | <i>Genotip</i>  | <i>Comentari</i>                                    |
|--------------------|---|---|
| <b>AK300</b>       | <i>MATa/MATΔ ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 can1-100/can1-100 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 ura3/ura3</i>                      | Soca donada per la Dra. Ulrike Wintersberger        |
| <b>AK303</b>       | <i>MATa/MATΔ ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 can1-100/can1-100 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 ura3/ura3 SCP160/scp160Δ::LEU2</i> | Soca donada per la Dra. Ulrike Wintersberger        |
| <b>YXM1</b>        | <i>MAT? ade2-1 trp-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3</i>  | 80 clons generats a partir de la soca AK300 i AK303 |
| <b>YXM2</b>        | <i>MAT? ade2-1 trp-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 scp160Δ::LEU2</i>  | 83 clons generats a partir de la soca AK303         |
| <b>UCC506</b>      | <i>MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1 lys2-801 trp1-Δ1 ura3-52 URA3::TELV-R</i>  | (Renauld <i>et al.</i> 1993)                        |
| <b>YXM3</b>        | <i>UCC506 scp160Δ::HIS3</i>   | 30 clons diferents                                  |
| <b>YDS21U</b>      | <i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 URA3::TELV-R</i>   | (Rundlett <i>et al.</i> 1996)                       |
| <b>YXM4</b>        | <i>YDS21U scp160Δ::HIS3</i>   | 5 clons diferents                                   |
| <b>AYH2.45</b>     | <i>MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-801 trp1-Δ901 ura3-52 adh4::URA3-TELVII-L sir3::SIR3HA/HIS3</i>                                | (Strahl-Bolsinger <i>et al.</i> 1997)               |
| <b>YXM5</b>        | <i>AYH2.45 scp160Δ::LEU2</i>  | 5 clons diferents                                   |
| <b>YLS409</b>      | <i>MATΔ ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hmrΔ77-144::SUP4-o HMR::ADE2</i>  | (Sussel <i>et al.</i> 1993)                         |
| <b>YXM6</b>        | <i>YLS409 scp160::HIS3</i>  |   |
| <b>YLP19</b>       | <i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 hmrΔA::ADE2</i>   | (Pemberton and Blobel 1997)                         |
| <b>YXM7</b>        | <i>YLP19 scp160Δ::HIS3</i>  | 5 clons diferents                                   |
| <b>JS125</b>       | <i>MATΔ his3Δ200 leu2Δ1 ura3-167 RDN1::Ty1-mURA3</i>  | * (Smith and Boeke 1997)                            |
| <b>JS128</b>       | <i>MATΔ his3Δ200 leu2Δ1 ura3-167 RDN1::Ty1-mURA3</i>  | * (Smith and Boeke 1997)                            |
| <b>YXM8</b>        | <i>JS125 scp160Δ::HIS3</i>  | 6 clons diferents                                   |
| <b>YXM9</b>        | <i>JS128 scp160Δ::HIS3</i>  | 6 clons diferents                                   |
| <b>YXM10</b>       | <i>UCC506 rpd3::LEU2</i>  |   |
| <b>YXM11</b>       | <i>YXM3 RPD3/rpd3::LEU2</i>   |   |
| <b>YXM12</b>       | <i>YXM3 rpd3::LEU2/rpd3::TRP1</i>   |   |
| <b>YXM13</b>       | <i>YXM10 scp160Δ::HIS3</i>  | 18 clons diferents                                  |
| <b>YXM14</b>       | <i>UCC506 rif1Δ::TRP1</i>   |   |
| <b>YXM15</b>       | <i>UCC506 rif2Δ::LEU2</i>   |   |
| <b>YXM16</b>       | <i>YXM14 rif2Δ::LEU2</i>  |   |
| <b>YXM17</b>       | <i>YXM14 scp160Δ::HIS3</i>  | 16 clons diferents                                  |
| <b>YXM18</b>       | <i>YXM15 scp160Δ::HIS3</i>  | 8 clons diferents                                   |
| <b>YXM19</b>       | <i>YXM16 scp160Δ::HIS3</i>  | 11 clons diferents                                  |
| <b>AYH2.16</b>     | <i>MATa ade2-101 his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-801 trp-Δ901 ura3-52 thr- tyr-adh4::URA3-TEL-VII-L</i>   | Soca donada pel Dr. Michael Grunstein               |
| <b>YXM20</b>       | <i>AYH2.16 scp160::SCP160HA/KanMX</i>   |   |

**Taula M.1.-** Genotip de les soques de *Saccharomyces cerevisiae* emprades en aquest estudi.

\*Les soques JS125 i JS128 contenen el transposó Ty1-mURA3 inserit a diferents localitzacions dins del locus del rDNA (figura R.11).

## **2.- Mètodes de manipulació del DNA**

### **2.1.- Tècniques de DNA recombinant**

Per a l'obtenció i manipulació de DNAs plasmídics s'han utilitzat les tècniques bàsiques de Biologia Molecular (Sambrook *et al.* 1989).

#### **2.1.1.- Minipreparacions de DNA plasmídic**

Per a l'obtenció de petites quantitats de DNA plasmídic a partir de colònies bacterianes s'ha emprat el mètode de minipreparació per lisi alcalina (Sambrook *et al.* 1989). El DNA obtingut es resuspèn en 50 µl de TE que conté 1 µg de RNAsa A i es deixa incubar 30 minuts a 37°C per tal d'eliminar el RNA.

#### **2.1.2.- Maxipreparacions de DNA plasmídic**

Per tal d'aconseguir major quantitat de DNA plasmídic i d'una major puresa s'han utilitzat columnes comercials de Quiagen i de Clontech, utilitzant en cada cas el protocol recomanat pel fabricant. El DNA obtingut és resuspès en 400 µl de TE.

#### **2.1.3.- Transformació del DNA a bacteris**

Les cèl·lules competents són prèviament preparades, alicuotades i congelades a -80°C (Sambrook *et al.* 1989). La transformació de DNA a soques bacterianes s'ha realitzat mitjançant xoc tèrmic o electroporació.

##### **Transformació de DNA a bactèries mitjançant xoc tèrmic**

En un tub eppendorf es barregen 100 µl de cèl·lules competents amb el DNA a transformar i es deixa la barreja durant 30 minuts en gel. Posteriorment les cèl·lules se sotmeten a un xoc tèrmic de 2 minuts i 30 segons a 42°C, s'afegeixen 400 µl de medi LB (Triptona bacteriològica 10 g/L, extracte de llevat 5 g/L, NaCl 10 g/L, NaOH 1 mM) als bacteris i es deixen 20 minuts a 37°C per tal de permetre que les cèl·lules es recuperin del xoc tèrmic. Finalment, els bacteris es plaquegen en plaques

de medi LB que contenen l'antibiòtic utilitzat per a la selecció i es deixen incubar ON a 37°C.

### **Transformació de DNA a bacteris mitjançant electroporació**

Es preparen en un eppendorf 1-5 µl del DNA que es vol transformar en H<sub>2</sub>O destil·lada, s'hi afegeixen 40 µl de cèl·lules competents i es deixa incubar en gel durant almenys 1 minut. Posteriorment es traspasa la barreja a una cubeta d'electroporació neta i es comprova que la mostra està en el fons de la cubeta. S'aplica a la mostra un corrent de 2,5 kV, es comprova que la constant de temps resultant és d'aproximadament 5.2-5.8 ns, s'afegeixen 400 µl de medi LB i es deixen incubar les cèl·lules durant 30 minuts a 37°C. Finalment, els bacteris es plaquegen en plaques de medi LB que contenen l'antibiòtic utilitzat per a la selecció i es deixen incubar ON a 37°C.

#### **2.1.4.- DNAs plasmídics utilitzats en aquest treball**

**pYES2:** Invitrogen. Plasmidi comercial que permet l'expressió induïble de proteïnes recombinants a *Saccharomyces cerevisiae*. Aquest plasmidi conté el marcador *URA3* com a marcador selectiu.

**pYES2-PACA:** Plasmidi generat a partir del clonatge en el plasmidi pYES2 de l'ORF que codifica per la proteïna de *Drosophila* DDP1. Aquest plasmidi fou construït per la Doctora Adoración Huertas Ruz.

**pRS303:** Plasmidi centromèric de llevat que conté el marcador *HIS3* com a marcador selectiu (Sikorski and Hieter 1989).

**pRS304:** Plasmidi centromèric de llevat que conté el marcador *TRP1* com a marcador selectiu (Sikorski and Hieter 1989).

**pGEM-T Easy:** Promega. Plasmidi comercial que permet el clonatge amb facilitat dels fragments amplificats mitjançant PCR amb enzims que com la Taq polimerasa afegeixen en els extrems 3' dels fragments generats una única deoxyadenina protuberant (Clark 1988).



**YDp:** Yeast Disruption Plasmid. Conjunt de plasmidis d'Integració de llevats (YIp) que contenen clonats diferents marcadors auxotròfics (Berben *et al.* 1991). En aquest treball hem emprat els plasmidis que contenen els marcadors *HIS3* (YDp-H), *LEU2* (YDp-L), *URA3* (YDp-U) i *TRP1* (YDp-W).

**pGTSCP160:** Plasmidi obtingut a partir del clonatge en el plasmidi pGEM-T Easy de l'ORF i seqüències adjacents del gen *SCP160*. Per construir aquest plasmidi s'ha clonat el producte de PCR obtingut de l'amplificació de DNA genòmic de llevat amb els oligonucleòtids U183 i L4459 (vegeu l'apartat 2.4 dels Materials i Mètodes i l'Apèndix de Seqüències).

**pGTSCP160-llarg:** Plasmidi obtingut a partir del clonatge en el plasmidi pGEM-T Easy de l'ORF i seqüències adjacents del gen *SCP160* entre les quals s'inclouen les seqüències que presumiblement actuen com a promotor del gen *SCP160*. Per construir aquest plasmidi s'ha clonat el producte de PCR obtingut de l'amplificació de DNA genòmic de llevat amb els oligonucleòtids U40 i L4585 (vegeu l'apartat 2.4 dels Materials i Mètodes i l'Apèndix de Seqüències).

**pβSCP160::HIS3:** Plasmidi generat mitjançant el clonatge del marcador *HIS3* entre les dianes NruI i KpnI presents en el gen *SCP160* (vegeu l'Apèndix de Seqüències). Per construir aquest plasmidi el fragment de 1200 pb obtingut de la digestió amb els enzims SmaI i SalI del plasmidi YDp-H, sobre el qual s'han generat extrems rombs a partir dels extrems 5' protuberant generats per la digestió amb SalI, s'ha clonat en el fragment de 3400 pb obtingut de la digestió del plasmidi pGTSCP160 amb els enzims NruI i KpnI i sobre el qual s'han generat extrems rombs a partir dels extrems 3' protuberants produïts per la digestió amb l'enzim KpnI.

**pGTRPD3:** Plasmidi obtingut a partir del clonatge en el plasmidi pGEM-T Easy de l'ORF i seqüències adjacents del gen *RPD3*. Per construir aquest plasmidi s'ha clonat el producte de PCR obtingut de l'amplificació de DNA genòmic de llevat amb els oligonucleòtids RPD3-U1 i RPD3-L1 (vegeu l'apartat 2.4 dels Materials i Mètodes i l'Apèndix de Seqüències). Plasmidi generat per la Doctora Maria Lluïsa Espinàs.

**pβRPD3::LEU2:** Plasmidi generat mitjançant el clonatge del marcador *LEU2* en la diana BamHI present en l'ORF del gen *RPD3* (vegeu l'Apèndix de Seqüències). Per a construir aquest plasmidi el fragment de 1600 pb obtingut de la digestió amb

l'enzim BamHI del plasmidi YDp-L s'ha clonat en el plasmidi pGTRPD3 obert amb la diana BamHI. Plasmidi generat per la Doctora Maria Lluïsa Espinàs.

**pβRPD3::TRP1:** Plasmidi generat mitjançant el clonatge del marcador *TRP1* en la diana BamHI present en l'ORF del gen *RPD3* (vegeu l'Apèndix de Seqüències). Per a construir aquest plasmidi el fragment de 800 pb obtingut de la digestió amb l'enzim BamHI del plasmidi YDp-W s'ha substituït pel fragment que conté el marcador *LEU2* en el plasmidi pΔRPD3::LEU2.

**pGTRIF1:** Plasmidi obtingut a partir del clonatge en el plasmidi pGEM-T Easy de l'ORF i seqüències adjacents del gen *RIF1*. Per construir aquest plasmidi s'ha clonat el producte de PCR obtingut de l'amplificació de DNA genòmic de llevat amb els oligonucleòtids RIF1-U1 i RIF1-L1 (vegeu l'apartat 2.4 dels Materials i Mètodes i l'Apèndix de Seqüències).

**pβRIF1::TRP1:** Plasmidi generat mitjançant el clonatge del marcador *TRP1* entre les dianes NheI i AvaI presents en el gen *RIF1* (vegeu l'Apèndix de Seqüències). Per construir aquest plasmidi el fragment de 800 pb obtingut de la digestió amb els enzims NheI i AvaI del plasmidi YDp-W s'ha clonat en el fragment de 5200 pb obtingut mitjançant la digestió del plasmidi pGTRIF1 amb els enzims NheI i AvaI.

**pGTRIF2:** Plasmidi obtingut a partir del clonatge en el plasmidi pGEM-T Easy de l'ORF i seqüències adjacents del gen *RIF2*. Per construir aquest plasmidi s'ha clonat el producte de PCR obtingut de l'amplificació de DNA genòmic de llevat amb els oligonucleòtids RIF2-U1 i RIF2-L1 (vegeu l'apartat 2.4 dels Materials i Mètodes i l'Apèndix de Seqüències).

**pβRIF2::LEU2:** Plasmidi generat mitjançant el clonatge del marcador *LEU2* entre les dues dianes BspTI presents en el gen *RIF2* (vegeu l'Apèndix de Seqüències). Per construir aquest plasmidi el fragment de 1600 pb obtingut de la digestió amb l'enzim BamHI del plasmidi YDp-L, sobre el qual s'han generat extrems rombs a partir dels extrems 5' protuberants generats en la digestió amb BamHI, s'ha clonat en el fragment de 3500 pb obtingut de la digestió del plasmidi pGTRIF2 amb l'enzim BspTI i sobre el qual s'han generat extrems rombs a partir dels extrems 5' protuberants generats per la digestió amb l'enzim BspTI.

**pRS425:** Plasmidi episomal de llevat (YE-p) que conté el marcador selectiu *LEU2* (Christianson *et al.* 1992).

**pSIR3 (pHR67-23):** Plasmidi episomal de llevat (YE-p) que conté clonat el promotor i l'ORF del gen *SIR3* (Christianson *et al.* 1992; Hecht *et al.* 1995). Plasmidi cedit pel Dr. Sergio Pimpinelli.

**pSCP160:** Plasmidi episomal de llevat (YE-p) que conté clonat el promotor i l'ORF del gen *SCP160*. Per obtenir aquest plasmidi el fragment de 4500 pb obtingut mitjançant la digestió del plasmidi pGTSCP160-llarg amb l'enzim NotI s'ha clonat en el plasmidi pRS425 obert amb l'enzim NotI.

**pEL42:** Plasmidi basat en el pGEM 3zf que conté clonades les seqüències subtelmèriques Y' (Louis and Borts 1995). Plasmidi cedit pel Dr. Ed Louis.

**pFA6a-3HA-kanMX6:** Plasmidi que conté clonat el *cassette* que permet obtenir mitjançant amplificació per PCR amb oligonucleòtids específics el *cassette* de manipulació gènica que permet construir proteïnes de fusió que continguin l'epítop HA (Longtine *et al.* 1998).

**pET-29a-c:** Novagen. Plasmidi comercial que permet la formació de proteïnes de fusió que contenen el S-Tag en posició N-terminal i opcionalment el His-tag en posició C-terminal.

**pET-29-SCP160:** Plasmidi d'expressió de la proteïna de fusió S-Tag-Scp160-His-Tag. Per obtenir aquest plasmidi el producte de PCR obtingut de l'amplificació realitzada amb els oligonucleòtids SCP160-5M i SCP160-3M sobre el plasmidi pGTSCP160 (vegeu l'apartat 2.1.4, l'apartat 3.2.1 i l'Apèndix de Seqüències), s'ha digerit amb els enzims NcoI i XhoI i s'ha clonat en el plasmidi pET-29a-c obert amb aquests dos enzims.

### 2.1.5.- Soques bacterianes utilitzades per a la preparació de DNA plasmídic

| Soca                         | Genotip  |
|------------------------------|--|
| <b>HB101</b>                 | supE44hsdS20( $r_B^- m_B^-$ ) <i>recA13 ara14 proA2 lacY1 galk2 rpsL20 mtl-1</i>   |
| <b>DH5<math>\beta</math></b> | <i>deoR endA1 gyrA96 hsdR17 (r_K^+ m_K^+)</i> <i>recA1 relA1 supE44 thi-1</i><br>F' [ <i>traD36 proAB+ lac1q lacZ</i> $\beta$ M15] |

Taula M.2.

## 2.2.- Obtenció de DNA genòmic a llevats

El procediment utilitzat per a l'obtenció de DNA genòmic a partir de cèl·lules de llevat es basa en la preparació d'esferoplast, la lisi de la membrana cel·lular i el posterior aïllament del DNA que contenen les cèl·lules.

### Protocol d'obtenció de DNA genòmic a llevat:

A partir de l'estoc de cèl·lules crescudes en placa sobre les quals es vol realitzar l'obtenció de DNA es creix un minicultiu en medi SD o YEP segons sigui convenient i es deixa créixer ON a 30°C en agitació, l'endemà se centrifugen les cèl·lules a 3000 rpm durant 5 minuts i es resuspén el *pellet* de cèl·lules en 0,5 ml de Solució A (Sorbitol 1M, EDTA 0,5 M; pH ajustat a 7,5). La suspensió de cèl·lules es transfereix a un eppendorf de 1,5 ml al qual s'afegeix 1 mg de liticasa i 3 µl de β-mercaptoetanol, s'incuben de 60 a 90 minuts a 30°C i es comprova al microscopi la formació d'esferoplast (els esferoplasts es poden reconèixer per la pèrdua de la refringència en observar-los amb contrast de fases). Es deixa la digestió amb liticasa fins a obtenir un mínim del 90% d'esferoplasts, se centrifugen els esferoplasts i es resuspenen en 0,5 ml de Solució B (Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,5 M; pH ajustat a 7,4) a la qual s'hi afegeixen 50 µl de 10% SDS. Aquesta barreja s'incuba durant 30 minuts a 65° C i posteriorment s'hi afegeixen 200 µl d'acetat potàsic 5 M i es deixen durant 30 minuts en gel. Posteriorment, se centrifuga la mostra a 15000 rpm durant 5 minuts i es transfereix el sobrenedant a un tub nou. Aquest procediment es repeteix si la mostra no ha quedat prou neta. Finalment, s'hi afegeix 1 µg de RNAsa A i s'incuba la mostra a 37°C durant 30 minuts per tal d'eliminar el RNA. El DNA així obtingut és purificat mitjançant fenol/cloroform, precipitat utilitzant isopropanol i resuspès en un volum final de 50-150 µl de TE.

## 2.3.- Southern Blot de DNA genòmic de llevat.

Aquesta tècnica consisteix en la transferència de les molècules de DNA prèviament separades en un gel d'electroforesi a un suport sòlid (membrana de *nylon*) i a la posterior hibridació amb una sonda de DNA específica, fet que permet la detecció de seqüències específiques de DNA (Southern 1975).

Aquesta tècnica és emprada en aquest treball per tal de detectar específicament les seqüències telomèriques i poder així detectar variacions en la llargada d'aquestes (vegeu l'apartat 7 dels Resultats i Discussió).

### **2.3.1.- Southern Blot i hibridació de la membrana amb sondes marcades radioactivament.**

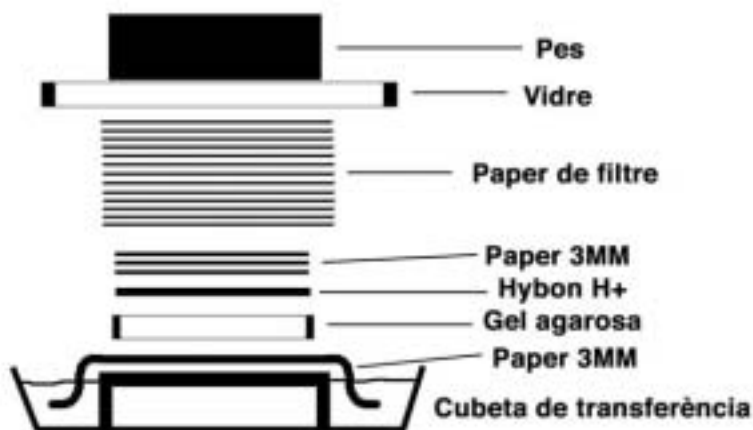
#### **Transferència del DNA a la membrana de nylon**

Els DNAs genòmics de les soques de llevat analitzades es digereixen ON amb l'enzim de restricció adequat en cada cas (figura R.11A) i posteriorment se separen els fragments de DNA en un gel d'agarosa de l'1% (Sambrook *et al.* 1989) que conté Bromur d'Etidi. Un cop corregut el gel, aquest es visualitza utilitzant una font de llum UV i es fotografia amb una regla com a marcador de distàncies per tal de poder determinar amb posterioritat la llargada dels fragments observats en l'autoradiografia, comparant la seva posició en el gel amb la distància a què es localitzen els diferents marcadors de pesos moleculars coneguts.

Prèviament a la transferència el gel és sotmès a una sèrie de tractaments; entre cadascun dels diferents tractaments el gel es renta durant 5 minuts amb aigua destil·lada. El gel se sotmet inicialment a un procés de depurinització submergint el gel en una solució al 0,125 M de HCl durant 10 minuts; aquest tractament permet un trencament dels fragments de DNA més grans que d'aquesta manera són transferits amb major facilitat durant el procés de transferència. Posteriorment se sotmet el gel a un procés de desnaturalització submergint el gel en Solució de Desnaturalització (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) durant 30 minuts, i finalment es tracta el gel durant 30 minuts amb Solució de Neutralització (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M; pH ajustat a 7,5) i es procedeix a realitzar la transferència per capil·laritat.

Per realitzar la transferència per capil·laritat es col·loca el gel sobre una plataforma elevada en una cubeta que conté la Solució de Transferència 20X SSC (NaCl 3M, citrat sòdic 0,3M; pH ajustat a 7); la plataforma es cobreix amb una tira de paper de cromatografia 3MM mullat en 20X SSC amb els extrems submergits en la cubeta. Sobre del gel es col·loca un fragment de membrana (Hybond H+; Amersham farmacia biotech) de la mateixa mida del gel assegurant-se que no quedin

bombolles d'aire entre aquesta i el gel. Sobre la membrana es col·loquen 3-4 peces de paper 3MM de la mateixa mida del gel i a sobre d'aquest una pila de papers de filtre d'uns 5 cm de gruix aproximadament. Els voltants de la cubeta se segellen amb film transparent per tal d'evitar l'evaporació de la solució de transferència i assegurar-se que la transferència de líquid ocorrerà principalment per capil·laritat a través del gel. Finalment es col·loca en la part superior un pes per tal d'aplicar pressió al sistema i es deixa ON per tal que es produeixi la transferència del DNA a la membrana (figura M.4).



**Figura M.4.-** Esquema de l'aparell de transferència utilitzat per a la transferència del DNA a la membrana de nylon.

L'endemà es desmunta l'aparell de transferència, es renta la membrana en 2X SSC i es guarda seca entre dues fulles de paper 3MM. Per tal de fixar el DNA a la membrana es deixa la membrana a 80°C durant 2 hores.

#### **Marcatge radioactiu de la sonda amb $[\beta\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ .**

El marcatge de fragments específics de DNA amb deoxiribonucleòtids radioactius permet l'obtenció de sondes específiques a partir de fragments concrets de DNA. L'obtenció de les sondes marcades radioactivament es va fer mitjançant el procés de *random primer* (Feinberg and Vogelstein 1983; Feinberg and Vogelstein 1984) utilitzant el *Kit* de marcatge *Ready To Go* (Amersham farmacia biotech) segons les instruccions proporcionades pel fabricant. Un cop finalitzada la reacció de marcatge, aquesta es va passar per una columna per tal de separar els nucleòtids radioactius no incorporats en la reacció de marcatge (NICK columns, Amersham farmacia biotech).

### **Protocol d'hibridació de la membrana amb la sonda marcada radioactivament**

La hibridació de la membrana es realitza en tubs d'hibridació a 65°C utilitzant com a solució d'hibridació la Solució d'hibridació de Denhardt (5X SSC, 5X Solució Denhardt's, 0,5% SDS) (100X Solució Denhardt's: 2% BSA, 2% Ficoll 400, 2% olyvinylpyrrolidone). Prèviament a la hibridació la membrana s'incuba en solució d'hibridació a 65°C durant 2 hores (prehibridació). Posteriorment, la sonda marcada radioactivament s'incuba a 100°C durant 5 minuts per tal de dissociar les cadenes de dsDNA, s'afegeix immediatament als tubs d'hibridació que contenen la membrana i es deixa incubar a 65°C ON en un forn d'hibridació.

L'endemà es realitzen els rentats per eliminar la sonda no unida a la membrana: es realitza un rentat amb 2X SSC de 5 minuts i 2 rentats amb 0,1X SSC 0,1% SDS de 20 minuts cadascun. Amb un comptador Geiger es comprova en cada pas la radioactivitat present en la membrana. Finalment, la membrana s'exposa a una pel·lícula fotogràfica dins d'un *cassette* de revelat el temps suficient fins a obtenir un senyal òptim.

### **2.3.2.- Obtenció de les sondes utilitzades per als estudis de longitud telomèrica**

En aquest treball, s'han utilitzat dues sondes diferents per a la determinació de la llargada de les seqüències telomèriques: les seqüències del marcador *URA3* (inserir en posicions telomèriques en algunes de les soques utilitzades en aquest estudi; taula M.1) i les seqüències subtelomèriques del tipus Y' (vegeu l'apartat 2.4 de la Introducció).

**Sonda *URA3*:** Per obtenir el fragment utilitzat per al marcatge de la seqüència del marcador *URA3* s'ha purificat la banda de 1100 pb obtinguda de la digestió amb l'enzim BamHI del plasmidi YDp-H (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes).

**Sonda Y':** Per obtenir el fragment utilitzat per al marcatge de la seqüència subtelomèrica Y' es va purificar la banda de 340 pb obtinguda de la digestió amb els enzims XhoI i KpnI del plasmidi pEL42 (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes).

## 2.4.- Reacció en cadena de la polimerasa. PCR

La reacció en cadena de la polimerasa és una tècnica que permet l'amplificació exponencial de petites quantitats de DNA *in vitro* utilitzant dos oligonucleòtids flanquejants a la regió que es vol amplificar i que hibriden en les cadenes oposades d'aquesta regió de DNA. Per a la reacció d'amplificació s'utilitza una DNA polimerasa termoestable que permet realitzar un procés cíclic de desnaturalització, hibridació dels oligonucleòtids i extensió dels oligonucleòtids per l'acció de la DNA polimerasa (Saiki *et al.* 1988).

En aquest treball, per a l'amplificació de fragments de DNA utilitzant la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa s'han utilitzat diferents polimerases comercials, utilitzant per aconseguir una amplificació òptima dels fragments desitjats o bé el tampó proporcionat pel fabricant, o bé tampons preparats amb diferents combinacions de força iònica i/o concentració de  $Mg^{2+}$  per a optimitzar de forma empírica la reacció d'amplificació.

### **Enzims comercials utilitzats:**

**Taq DNA Polimerasa:** Amersham Pharmacia Biotech. Polimerasa termoestable derivada de *Thermus aquaticus*.

**Biotools DNA polimerasa:** Biotools. Polimerasa termoestable derivada de *Thermus thermophilus*.

**Vent DNA polimerasa:** New England Biolabs. Polimerasa termoestable derivada de *Thermococcus litoralis*.

**Expand High Fidelity PCR System:** Roche. Format per una barreja de *Taq* polimerasa i *Tgo* polimerasa.

Per a les amplificacions rutinàries s'ha utilitzat indistintament la *Taq* DNA polimerasa o la polimerasa de Biotools. En aquelles amplificacions que requerien una major fidelitat en l'amplificació o que requerien de l'amplificació de grans fragments de DNA s'ha utilitzat la Vent polimerasa o l'Expand polimerasa segons les necessitats.



## Oligonucleòtids utilitzats com a encebadors en aquest treball:

| Nom        | Seqüència (5'--->3')   | Comentari  |
|------------|--|--|
| U40        | TCTTCATTGTTTTACGAGGATT   | <i>SCP160</i>                                      |
| U183       | CCCATCAGGTATTCATCCACTC   | <i>SCP160</i>                                      |
| U3037      | GACAATATCAACGACATCAGAG   | <i>SCP160</i>                                      |
| L4459      | CTCGCTGTTTCTTATGTTCGTG   | <i>SCP160</i>                                      |
| L4585      | AAAGCAGCATTGGACATAGTT  | <i>SCP160</i>                                      |
| SCP160-5M  | AACTAC <sub>c</sub> ATG <sub>g</sub> CTGAAGAACAACCGCTATTG        | Scp160 a pET-29a-c *                               |
| SCP160-3M  | AGTTCGTCT <sub>cgag</sub> TCTTAAGGATTTCAAAC                      | Scp160 a pET-29a-c *                               |
| RPD3-U1    | GGCTACAACCTCGATATCCG   | <i>RPD3</i>  |
| RPD3-U2    | CCATTTAATTACACCGGGCAGAT  | <i>RPD3</i>  |
| RPD3-L1    | ATTTCGTATATACTTCCAACCTC  | <i>RPD3</i>  |
| RPD3-L2    | TATGGGACGCGGTTGATGTATGAA   | <i>RPD3</i>  |
| RIF1-U1    | AAGTGCATTTTGTGTTGTGAGG   | <i>RIF1</i>  |
| RIF1-U2    | CTAGATGACAACGGCAAAGA   | <i>RIF1</i>  |
| RIF1-L1    | TTGTGCGAATTATTGGGTTATG   | <i>RIF1</i>  |
| RIF1-L2    | TAGCGGAACAGGTATGACACAA   | <i>RIF1</i>  |
| RIF1-L3    | TGCGGTAATCGGTGATG  | <i>RIF1</i>  |
| RIF1-L4    | CCTTTAAGCGGTCCCT   | <i>RIF1</i>  |
| RIF2-U1    | ACCCGGCTTAGTTATCTTGA   | <i>RIF2</i>  |
| RIF2-U2    | AGCGGCTATTTTCTTTTGTCC  | <i>RIF2</i>  |
| RIF2-L1    | AGTTCCTATCTCTTTGTATTGT   | <i>RIF2</i>  |
| RIF2 L2    | CGTCCATTTTTATCCACCATCTT  | <i>RIF2</i>  |
| 1-LO       | ATGCCTGCCATTTGACTAACC  | URA3-Tel' (figura R.25A)                           |
| 1-UP       | CAAAGCCAACAGTATGTCAGT  | URA3-Tel' (figura R.25A)                           |
| U3T-U5     | GAGAAGCATTGTTGAAAGCCATAC   | URA3-Tel (figures R.13A i R.25A)                   |
| U3T-L3     | ATATACCAATCTAAGTCTGTGCTC   | URA3-Tel (figures R.13A i R.25A)                   |
| Y'-UP      | CTGTTTTGATTTAGTGTGTTGTC  | Tel Y' (figura R.25A)                              |
| Y'-LO      | CTACTCTCGCTGTCATACCTTAC  | Tel Y' (figura R.25A)                              |
| HIS3-ORF   | GAGGCAGAAGCAGTAGCAGAAC   | <i>HIS3</i>  |
| TRP1-ORF   | AGAGCAGAGGCCGCAGAATG   | <i>TRP1</i>  |
| LEU2-ORF   | TCAACCCTATCGCCACTATCTT   | <i>LEU2</i>  |
| LEU2-ORF-2 | TATCGCCACTATCTTGTCTGCT   | <i>LEU2</i>  |
| URA3-U1    | GTCAACAGTATAGAACCGTGGATG   | ura3-52 (figures R.13A i R.25A)                    |
| URA3-L1    | CCTGTCTTATTGTTCTTGATTGT  | ura3-52 (figures R.13A i R.25A)                    |
| βSCP160-UP | ATGTCTGAAGAACAACCGCTATTGACTCTCC<br>CCCTTCCAGGCACCCCAGGCTTTACT    | 5' Homologia <i>SCP160</i> **                      |
| βSCP160-LO | TCGACACCAGCTTTGGTACCTCTAATGTAGAC<br>AACATCATCGGGCCTCTTCGCTATTACG | 3' Homologia <i>SCP160</i> **                      |
| βRIF2-UP   | ATGGAGCATGTAGATTCCGATTTTGCACCTAT<br>AAGGAGATGGCACCCCAGGCTTTACT   | 5' Homologia <i>RIF2</i> **                        |
| βRIF2-LO   | TCTATCATGTACTTTTCGAGTTAACTTAAGTGG<br>AAGACGCCGGCCTCTTCGCTATTACG  | 3' Homologia <i>RIF2</i> **                        |
| R1-SCP160  | GGTTTCAAAGAGTTCGTCTATCTTCTTAAGGA<br>TTTCAAAGAATTTCGAGCTCGTTAAAC  | TAG Scp160-3HA **<br>(Longtine <i>et al.</i> 1998) |
| F2-SCP160  | CGAAAAGGCCGGTGAATGGTTTGAATCCT<br>TAAGAAGACGGATCCCCGGGTTAATTAA    | TAG Scp160-3HA **<br>(Longtine <i>et al.</i> 1998) |

**Taula M.3.-** Llistat d'oligonucleòtids utilitzats com a encebadors. La localització relativa respecte a la corresponent ORF de la majoria d'oligonucleòtids llistats en aquesta taula es pot consultar a l'Apèndix de Seqüències.

\* En els oligonucleòtids utilitzats per al clonatge de Scp160 al plasmidi pET-29a-c es representen en minúscula les bases mutades respecte a la seqüència pròpia del gen *SCP160*, i es subratllen les dianes generades (vegeu l'apartat 3.2.1 dels Materials i Mètodes)

\*\* Els oligonucleòtids utilitzats en els experiments de manipulació gènica inclouen en posició més 5' les regions d'homologia utilitzades per a la recombinació gènica (vegeu l'Apèndix de Seqüències) i en posició més 3' (en cursiva) la seqüència homòloga als plasmidis que contenen els *cassettes* amplificats.



### **3.- Mètodes generals per a l'estudi de proteïnes**

#### **3.1.- Electroforesi de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Per a la separació de les proteïnes segons els seus pesos moleculars s'utilitzen els gels de poliactilamida que contenen SDS (SDS-PAGE). El SDS és un detergent aniònic que s'utilitza per desnaturalitzar les proteïnes i per evitar que interaccionin entre si durant l'electroforesi; el SDS revesteix les proteïnes destruint l'estructura tridimensional de la proteïna i els hi confereix una càrrega neta negativa, de forma que les proteïnes migren cap el pol positiu del camp elèctric. La poliactilamida, formada per l'entrecruament de llargues cadenes de monòmers d'actilamida amb NN-metilé-bisactilamida, forma un suport més o menys dens segons la concentració d'actilamida utilitzada permetent la separació de les proteïnes; les proteïnes revestides de SDS migren en un gel de poliactilamida de forma inversament proporcional al seu pes molecular.

El sistema utilitzat per a la preparació dels gels de poliactilamida es basa en un sistema discontinu de gels que consta d'una petita part del gel amb un baix percentatge d'actilamida i de pH acídic (gel concentrador o *stacking*: barreja actilamida-bisactilamida 29:1 5%, Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1%, persulfat amònic 0,1%, Temed 1 ml/L) seguida d'una altra part que conté una major proporció d'actilamida i un pH més bàsic (gel separador o *resolving*: barreja actilamida-bisactilamida 29:1 6-25%, Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, SDS 0,1%, persulfat amònic 0,1%, Temed 0,8 ml/L) (Laemmli 1970). En les condicions del gel concentrador les proteïnes formen una única banda sense separar-se pel seu pes molecular de manera que les proteïnes es concentren a l'inici del front mentre que les condicions del gel separador permeten la separació de les proteïnes pel seu pes molecular.

#### **Muntatge i preparació del gel**

Els gels de poliactilamida de proteïnes se solen córrer en placa en posició vertical. Per obtenir el gel s'utilitzen dos vidres entre els quals es col·loquen uns separadors d'un gruix definit; el sistema se segella mitjançant una goma en la part inferior i es manté unit mitjançant la utilització de diverses pinces. Posteriorment, es preparen les

barreges d'acrilamida a partir de les solucions estoc (estocs utilitzats: barreja acrilamida-bisacrilamida 29:1 30%; SDS 10%; Tris-HCl pH 8,8 1,5 M; Tris-HCl pH 6,8 1 M; persulfat amònic 10%) i s'aboca entre els dos vidres, en primer lloc, el gel separador deixant suficient espai a la part superior per abocar posteriorment el gel concentrador. S'afegeix una fina capa d'isopropanol per tal d'evitar el contacte de l'oxigen amb l'acrilamida (l'oxigen és un inhibidor de la polimerització de la poliacrilamida) i per aconseguir que la superfície del gel quedi perfectament plana. Un cop s'ha polimeritzat el gel separador s'elimina l'isopropanol, es renta amb aigua destil·lada, s'asseca bé amb un paper de filtre, s'aboca el gel concentrador i es col·loca la pinta a la part superior.

Els gels de proteïnes es corren en cubetes que contenen Tampó Laemmli (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%), aquestes cubetes consten de dos reservoris, un a la part superior i un altre a la part inferior que contenen cadascun d'ells un electrode de platí que permet la formació d'un camp elèctric uniforme.

### **Preparació de les mostres**

Les mostres es preparen barrejant-les amb el Tampó de Carrega de Proteïnes (Estoc 5X: Tris-HCl pH 6,8 250 mM, glicerol 50%, SDS 10%, bromofenol-blue 0,05%,  $\Delta$ -mercaptoetanol 1 mM). Aquest conté el  $\Delta$ -mercaptoetanol com a agent reductor per desfer els ponts disofre presents en les proteïnes de la mostra. Per tal de permetre una bona unió del SDS a les proteïnes es bull la mostra durant 5 minuts abans de carregar-la en el gel.

### **Tinció del gel amb blau de Coomassie**

Per a visualitzar les proteïnes un cop han estat corregudes en un gel de poliacrilamida aquest es tenyeix submergint el gel en una solució que conté el colorant Blau de Coomassie (Metanol 45 %, àcid acètic 10%, Blau de Coomassie 0,25%) i es manté en agitació entre 30 i 60 minuts. Un cop tenyit el gel queda d'un color blau intens, aquest es destenyeix incubant-lo ON en agitació amb una solució d'àcid acètic del 10%.

## **3.2.- Expressió i purificació de proteïnes recombinants**

En aquest treball s'ha expressat en soques d'*Escherichia coli* la proteïna Scp160 de llevat amb l'objectiu utilitzar-la per a generar anticossos policlonals que siguin capaços de reconèixer específicament aquesta proteïna (vegeu l'apartat 4.1 dels Materials i Mètodes). Per tal d'obtenir la proteïna Scp160 de llevat de forma recombinant s'ha expressat aquesta proteïna fusionada a una cua d'histidines en posició C-terminal que posteriorment s'ha purificat mitjançant cromatografia d'afinitat utilitzant una columna de níquel que és capaç de retenir de forma específica les proteïnes que presenten aquest tag.

### **3.2.1.- Obtenció de Scp160 fusionada a una cua d'histidines**

Per a la producció de la proteïna Scp160 fusionada a una cua d'histidines es va utilitzar el plasmidi pET-29a-c (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes). Per tal de poder clonar la proteïna Scp160 al plasmidi pET-29a-c i que aquesta s'expressi en fase amb els tags per als que codifica aquest plasmidi, la seqüència del gen *SCP160* es va amplificar amb els oligonucleòtids SCP160-5M i SCP160-3M que incorporen diverses mutacions respecte a la seqüència pròpia del gen *SCP160* de manera que es generen les dianes NcoI en posició 5' del gen i XhoI en posició 3' del gen que permeten el clonatge de la proteïna en fase (vegeu l'apartat 2.4 dels Materials i Mètodes).

El plasmidi pET-29a-c permet el clonatge dels gens diana sota el control del promotor de la RNA polimerasa del bacteriòfag T7, d'aquesta manera l'expressió basal de les proteïnes clonades en soques d'*Escherichia coli* que no contenen la RNA polimerasa del fag T7 és pràcticament nul·la. L'expressió a partir d'aquest plasmidi s'aconsegueix proporcionant una font externa de RNA polimerasa del fag T7.

### **3.2.2.- Expressió de proteïnes recombinants en soques d'*Escherichia coli***

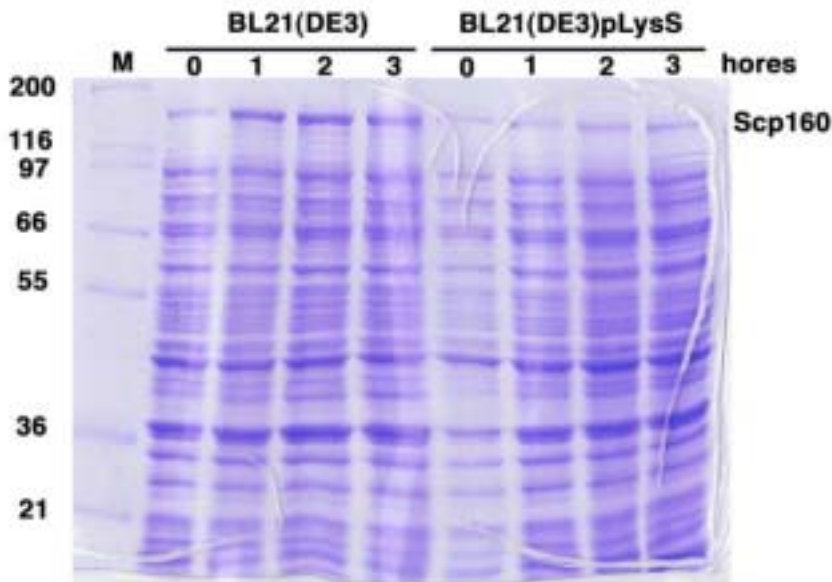
*Escherichia coli* és el microorganisme procariota més emprat per a l'expressió heteròloga de proteïnes, és un sistema senzill, econòmic i del qual se'n coneix amb

força detall la seva fisiologia i genètica. En aquest estudi hem emprat per a la producció de la proteïna Scp160 recombinant les soques BL21 (DE3) i BL21 (DE3)pLysS (Novagen; vegeu l'apartat 3.2.4). Aquestes soques són lisògens del bacteriòfag DE3, un derivat del fag lambda que conté el gen de la RNA polimerasa del fag T7 sota el control del promotor *lacUV5* (promotor de l'operó *lac*) i el gen *lacI* que codifica per al repressor de l'operó *lac* (Studier and Moffatt 1986). El promotor *lacUV5* és induïble per la presència en el medi d'IPTG (isopropyl- $\Delta$ -D-thiogalactopyranoside), l'addició d'aquest compost al medi indueix l'expressió de la RNA polimerasa del fag T7, cosa que permet l'expressió de la proteïna Scp160 clonada en el plasmidi pET-29a-c. La soca BL21 (DE3)pLysS porta un plasmidi resistent a cloranfenicol que codifica per a la lisozyima del fag T7, una proteïna que té activitat específica com a repressor de la polimerasa del fag T7 (Studier 1991; Zhang and Studier 1997), d'aquesta manera aquestes soques aconseguixen reduir al mínim l'expressió basal produïda en absència d'IPTG, fet que permet evitar possibles efectes tòxics en les cèl·lules d'*Escherichia coli* ocasionats per l'expressió de la proteïna recombinant.

### **Proves d'expressió de la proteïna Scp160 recombinant**

Inicialment vàrem realitzar proves expressió de la proteïna Scp160 recombinant utilitzant ambdues soques descrites anteriorment, per això s'inoculen tres colònies diferents que contenen el plasmidi pET-29-SCP160 (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes) (la utilització de tres colònies diferents permet obtenir una mitjana de l'expressió de diferents colònies) en un minicultiu de medi LB que conté els antibiòtics adequats; aquest es deixa créixer fins a arribar a 0,6-0,8 OD<sub>600</sub> i un cop crescudes les cèl·lules s'indueix l'expressió de la proteïna recombinant afegint IPTG al cultiu a una concentració final de 1 mM. S'agafen mostres (400  $\mu$ l de cultiu) a les 0, 1, 2 i 3 hores de l'inici de la inducció que es carregen en un gel de SDS-PAGE per comprovar l'expressió de la proteïna recombinant (es resuspèn el *pellet* de cèl·lules directament en Tampó de Càrrega de Proteïnes i es soniquen les mostres per tal de trencar el DNA genòmic).

Tal com es pot observar en la figura M.5 la proteïna Scp160 recombinant s'expressa sense problemes en les soques BL21 (DE3) i BL21 (DE3)pLysS, s'obté però, una major expressió amb la soca BL21 (DE3).



**Figura M.5.-** Gel de SDS-PAGE tenyit amb Coomassie de l'extracte proteic de les cèl·lules d'*Escherichia coli* que expressen la proteïna Scp160 recombinant.

### **Expressió a gran escala de la proteïna Scp160 recombinant**

Per a l'obtenció de grans quantitats de la proteïna Scp160 recombinant s'inoculen 500 ml de medi LB que conté 20 µg/ml de kanamicina amb tres colònies de la soca BL21 (DE3) transformades amb el plasmidi pET-29-SCP160. Aquest cultiu es deixa créixer fins a arribar a 0,6-0,8 OD<sub>600</sub>, s'indueix amb l'addició d'IPTG fins a una concentració final de 1 mM i es deixa créixer a 37°C durant 3 hores més. Posteriorment, les cèl·lules se centrifuguen a 6000g en un rotor GSA (Sorvall) i es resuspenen en 100 ml de Solució SPE (NaCl 0,1 M, Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA 1 mM), tornant-se a centrifugar de nou a 6000g en GSA; el *pellet* de cèl·lules obtingut es deixa ON a -80°C per facilitar la lisi cel·lular. L'endemà les cèl·lules es resuspenen en 10 ml de Solució de Lisi (NaCl 0,5 M, Hepes pH 7,9 20 mM, EDTA 1 mM, Δ-mercaptoetanol 20 mM, glicerol 20%, NP-40 0,1%, PMSF 1mM) i se soniquen fins a observar que la mostra adquireix una consistència més líquida i un color més fosc. La mostra sonicada se centrifuga en una ultracentrífuga a 35000 rpm durant 1 hora. El sobrenedant obtingut es congela a -80°C (fracció soluble) i es resuspèn el *pellet* obtingut (fracció insoluble) en 10 ml d'una solució de Clorur de

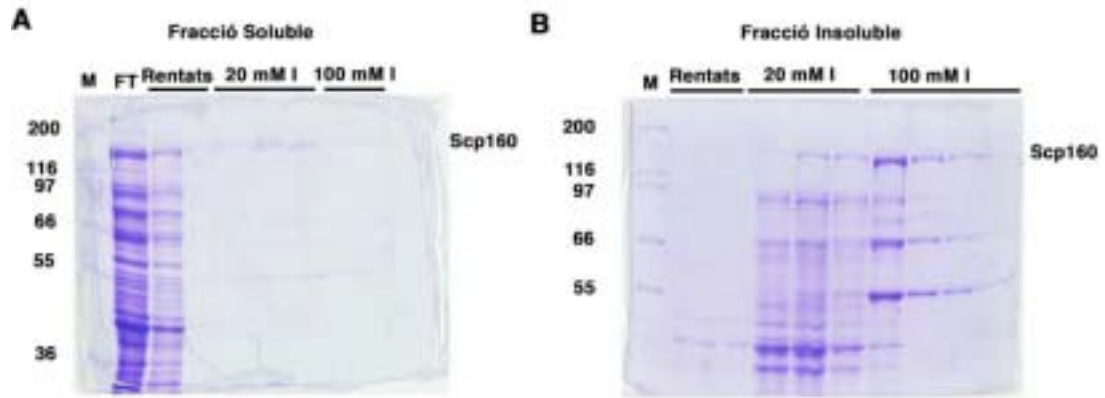
Guanidini (Clorur de Guanidini 6M, NaCl 100 mM, Hepes pH 7,9 20 mM;  $\Delta$ -mercaptoetanol 10 mM) que es deixa ON a temperatura ambient en agitació.

### **3.2.3.- Purificació de Scp160 fusionada a la cua d'histidines**

La expressió de proteïnes recombinants a *E. coli* com a proteïnes de fusió és una estratègia àmpliament utilitzada per a facilitar la purificació de les proteïnes recombinants. La utilització del tag d'histidines permet la purificació de la proteïna de fusió mitjançant cromatografia d'afinitat amb una columna que conté ions  $\text{Ni}^{2+}$ ; la histidina és capaç de formar complexos amb els metalls de transició com ara  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ , d'aquesta manera en una columna que conté ions  $\text{Ni}^{2+}$  immobilitzats es retenen amb alta afinitat i especificitat les proteïnes que presenten una cua d'histidines.

Per a la purificació cromatogràfica de la proteïna Scp160 fusionada a la cua d'histidines es van utilitzar per a cada purificació 0,5 ml de la reïna *Chelating Sepharose Fast Flow* (Amersham Pharmacia Biotech) a la qual es va immobilitzar ions de  $\text{Ni}^{2+}$  segons les instruccions proporcionades pel fabricant. Un cop la columna conté els ions immobilitzats aquesta s'equilibra amb la solució d'inici corresponent en què es tenen les proteïnes (Solució de Lisi per la fracció soluble i Solució de Clorur de Guanidini per a la fracció Insoluble) (2 vegades el volum de reïna utilitzat); la mostra de proteïnes obtinguda de l'expressió a gran escala es fa passar fins a tres vegades per la columna i es guarda al final com el *Flow Trough* (FT). Posteriorment es realitzen dos rentats successius de la columna: un primer rentat amb la Solució d'Inici utilitzada (10 ml de Solució) i un segon rentat amb el Tampó D (KCl 0,1 M, Hepes pH 7,9 20 mM, EDTA 0,2 mM, PMSF 0,1 M, DTT 0,5 M, glicerol 20%) per a la mostra soluble i el Tampó Urea (Urea 8 M, KCl 100 mM, Hepes pH 7,9 20 mM,  $\Delta$ -mercaptoetanol 10 mM) per a la mostra insoluble. L'elució de les proteïnes unides a la columna es realitza utilitzant Imidazol com a competidor de la unió de la proteïna a la reïna; l'elució es va realitzar en tres passos successius amb 20 mM, 100 mM i 500 mM d'Imidazol respectivament (en la solució corresponent: Tampó D o Tampó Urea). Finalment es comprova la purificació utilitzant gels de SDS-PAGE; la proteïna Scp160 recombinant s'acumula tant a la fracció soluble com a la fracció insoluble (figura M.6).





**Figura M.6.-** Gels de SDS-PAGE tenyits amb Coomassie de les diferents fraccions obtingudes en el procés de purificació de Scp160 fusionada a la cua d'histidines. A la figura es mostren les fraccions obtingudes en la purificació realitzada a partir de la fracció soluble (A) i de la fracció insoluble (B) obtingudes en el procés d'expressió a gran escala de la proteïna Scp160 recombinant.

### 3.2.4.- Soques utilitzades per a la producció de proteïnes recombinants

| Soca            | Genotip  |
|-----------------|--|
| BL21 (DE3)      | F – <i>ompT hsdSB (rB– mB–) gal dcm</i> (DE3)            |
| BL21 (DE3)pLysS | F – <i>ompT hsdSB (rB– mB–) gal dcm</i> (DE3)pLysS (CmR) |

Taula M.4.-

### 3.3.- Protocol d'obtenció de proteïnes a llevat

En aquest treball experimental per a l'obtenció d'extractes proteic a partir de cèl·lules de llevat s'ha utilitzat un protocol basat en la lisi cel·lular i la precipitació de les proteïnes mitjançant àcid tricloracètic (TCA).

#### Protocol d'extracció de proteïnes a llevat mitjançant TCA

A partir de l'estoc de cèl·lules crescudes en placa sobre les quals es vol realitzar l'obtenció de l'extracte proteic es creix un minicultiu en medi SD o YEP segons sigui convenient i es deixa créixer ON a 30°C en agitació, aquest s'utilitza l'endemà per a inocular un maxicultiu de 50 ml que es deixa créixer fins a arribar a 0,4-0,6 OD<sub>600</sub>. Les cèl·lules així obtingudes se centrifuguen a 4°C, es renten amb 25 ml d'aigua freda, se centrifuguen de nou a 4°C i s'asequen bé eliminant completament el *pellet* en l'última centrifugació; el *pellet* de cèl·lules es congela en neu carbònica i es deixa a –80°C un mínim d'un ON. L'endemà es descongela el *pellet* en gel i es resuspenen les cèl·lules en tampó TCA (Tris-HCl pH 8 20 mM, acetat amònic 50

mM) (100 µl de tampó TCA/7,5 OD<sub>600</sub>) al qual s'ha afegit al moment PMSF a una concentració final de 1 mM i 10 µl d'inhibidors de proteases (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma). Es transfereix la barreja a un Falcon de 15 ml i s'hi afegix 100 µl TCA 20%/7,5 OD<sub>600</sub> (TCA100%: 500 g TCA/227 ml d'H<sub>2</sub>O) i 2 vegades el volum total de Glass Beads (Sigma). Es trenquen les cèl·lules mitjançant n cicles de vòrtex d'1 minut (deixant reposar un mínim d'1 minut en gel entre cada cicle) fins a obtenir el 90% de les cèl·lules trencades. Se separa el sobrenedant obtingut així com el Primer Extracte cel·lular i es renten les restes de Glass Beads afegint-hi 500 µl d'una solució freda 1:1 de 20% TCA i Tampó TCA, aplicant 2 cicles addicionals de vòrtex-gel. El sobrenedant obtingut així (Segon Extracte Cel·lular) es barreja amb el Primer Extracte Cel·lular obtingut anteriorment obtenint-se l'Extracte Cel·lular Total. Les proteïnes presents en l'Extracte Cel·lular Total es precipiten centrifugant la mostra a 14.000 rpm durant 10 minuts a 4°C i es resuspèn el *pellet* (eliminant completament el sobrenedant) en 10 µl de Tampó de Càrrega TCA-Laemmli/1 OD<sub>600</sub> (SDS 3,5%, glicerol 14%, Tris-base 120 mM, EDTA 8 mM, Δ-mercaptoetanol 1 mM, PMSF 2mM, bromofenol-blue 0,01%) preparat a l'instant.

## **4.- Tècniques Immunològiques**

### **4.1.- Obtenció i purificació d'anticossos específics**

En aquest treball s'han obtingut anticossos policlonals específics contra la proteïna de llevat Scp160 utilitzant la forma recombinant d'aquesta proteïna per immunitzar conills contra aquesta proteïna.

#### **4.1.1.- Obtenció d'anticossos policlonals $\beta$ -Scp160**

##### **Preparació de la mostra utilitzada com a antígen per a la immunització**

Els antígens utilitzats per a la immunització es preparen directament a partir d'un gel de SDS-PAGE al 8%. El gel es tenyeix en una solució de Blau de Coomassie al 0,05% en aigua durant 10 minuts i es retalla la banda observada corresponent a la proteïna d'interès. Per tal de trinxar el fragment de gel retallat es passa la mostra per una xeringa de 2 ml i es diposita en un eppendorf de 1,5 ml al qual s'han practicat forats a la base amb una agulla, es col·loca el tub eppendorf dins d'un altre tub i es centrifuga a màxima velocitat durant 2 minuts per tal que el gel, en passar pel forat de la base del tub, quedi com una pasta trinxada; aquest procediment es repeteix fins a tres vegades successives disminuint progressivament el diàmetre del forat practicat a la base del tub. Finalment, la mostra es resuspèn en un volum igual de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) i se li afegeix un volum de l'adjuvant de Freund (Freund 1956).

##### **Immunització**

Les immunitzacions van ser realitzades per la Dra. Josefina Casas a l'estabulari del IBMB-CSIC (Barcelona). La immunització va ser realitzada en conills als quals se'ls va aplicar l'antígen de forma subcutània. Es fa una primera immunització amb l'antígen i l'adjuvant complet, i a intervals de 15 dies dos recordatoris amb l'antígen i l'adjuvant incomplet. L'adjuvant de Freund porta substàncies estimulants de la resposta immune, l'adjuvant complet es diferencia de l'adjuvant incomplet per la

presència del muramil dipèptid del bacteri *Mycobacterium tuberculosis*, l'adjuvant complet genera una resposta immune primària més forta que l'adjuvant incomplet.

### **Processament de la Sang**

La sang extreta dels conills immunitzats es deixa reposar durant un parell d'hores a temperatura ambient i posteriorment es va centrifugar a 3000 rpm separant el sobrenedant obtingut (sèrum) com a l'anticòs policlonal específic contra la proteïna Scp160.

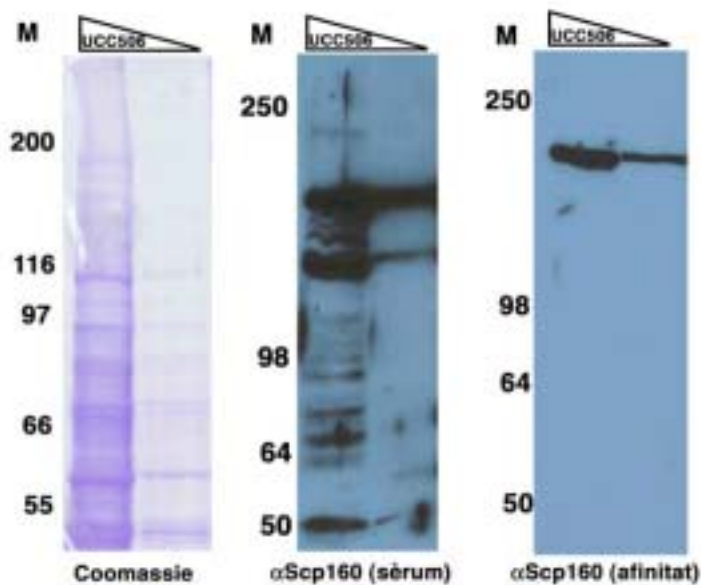
#### **4.1.2.- Purificació per afinitat de l'anticòs $\beta$ -Scp160**

Per a aconseguir anticossos específics contra la proteïna Scp160 s'ha purificat mitjançant immunoafinitat el sèrum obtingut a partir dels conills immunitzats amb la proteïna Scp160. En aquest procediment l'antígen utilitzat per a generar anticòs policlonal s'uneix a un suport sòlid sobre el qual s'aplica el sèrum obtingut dels conills de manera que només els anticossos específics contra l'antígen d'interès són retinguts en la columna, posteriorment aquests anticossos són eluïts de la columna.

#### **Protocol de purificació per afinitat de l'anticòs $\beta$ -Scp160**

Per a purificar per afinitat l'anticòs  $\beta$ -Scp160 s'uneix la proteïna Scp160 recombinant que conté la cua d'histidines a una columna que conté la reïna *Chelating Sepharose Fast Flow* (Sigma) amb ions de  $\text{Ni}^{2+}$  immobilitzats (vegeu l'apartat 3.2.3). Es renta la columna amb 10 ml de Tampó B (NaCl 150 mM, Tris-HCl pH 7,4 50 mM) i es fan passar per la columna 2 ml del sèrum obtingut de la immunització dels conills amb la proteïna Scp160. Posteriorment, es renta la columna dues vegades amb 10 ml de Tampó B i una vegada amb 10 ml del Tampó C (NaCl 2 M, Tris-HCl pH 7,4 50 mM) i s'elueix els anticossos amb una solució de  $\text{MgCl}_2$  4 M.

La purificació per afinitat de l'anticòs realitzada es va testar mitjançant la tècnica de *Western blot* (vegeu l'apartat 4.2 dels Materials i Mètodes) sobre extractes proteics de llevat. Tal com es pot observar en la figura M.7 els anticossos  $\beta$ -Scp160 purificats per afinitat reconeixen una única banda en un extracte proteic de llevat.



**Figura M.7-** *Western blot* sobre extractes de la soca UCC506 hibridat amb el sèrum obtingut de la immunització de conills i amb l'anticòs purificat per afinitat.

## 4.2.- Transferència de proteïnes (*Western blot*) i immunodetecció

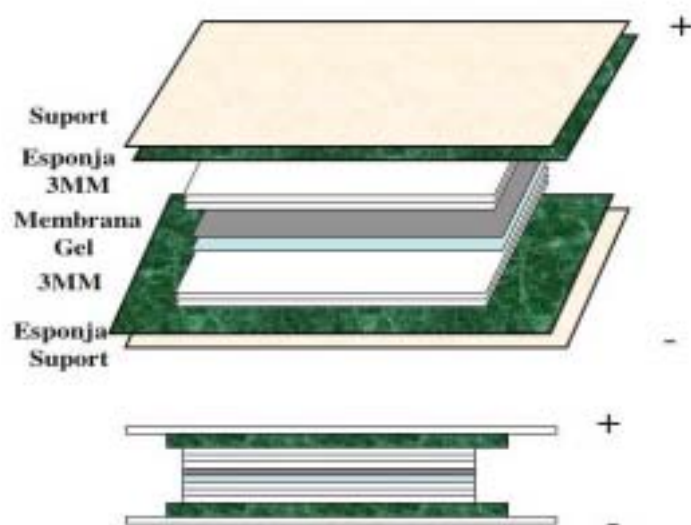
Aquesta tècnica consisteix en la transferència dels antígens des d'un gel de SDS-PAGE cap a un suport sòlid (membrana) i en la reacció posterior amb un anticòs primari específic per l'antígen que es vol estudiar. Aquest anticòs és reconegut posteriorment mitjançant un anticòs secundari marcat enzimàticament que ens permetrà reconèixer-lo específicament mitjançant un senyal colorimètric.

### 4.2.1.- Transferència de proteïnes

La transferència de molècules separades mitjançant una electroforesi cap a una membrana va ser utilitzada per primera vegada en la tècnica de *Southern blot* per a la transferència de molècules de DNA (Southern 1975), posteriorment aquesta tècnica es va aplicar a molècules de RNA (*Norther blot*) i a proteïnes (*Western blot*) (Towbin *et al.* 1979).

Per a realitzar aquesta tècnica inicialment es corren les proteïnes que es volen testar mitjançant un gel de SDS-PAGE, convé córrer dos gels idèntics, un per a transferir-lo (sense tenyir) i l'altre per a tenyir-lo amb Coomassie. La transferència es realitza mitjançant electrotransferència, transferint les proteïnes presents en el gel a una

membrana de nitrocel·lulosa (Schleister & Schuell), aquest procediment es realitza emprant una cubeta de transferència plena de Solució de Transferència de Proteïnes (Tris-base 25 mM, glicina 40 mM, SDS 0,05 %, metanol 20 %). Els diferents components utilitzats en la transferència es col·loquen formant un sandvitx tal com s'esquematitza en la figura M.8 i se submergeixen completament en Solució de Transferència de Proteïnes.



**Figura M.8.-** Esquema de l'aparell utilitzat per realitzar la transferència *western blot*

La transferència es realitza aplicant un voltatge de 80 Volts durant 3 hores a 4°C per evitar el sobreescalfament i mantenint la solució en agitació constant per tal d'assegurar l'homogeneïtat del tampó. Un cop finalitzada la transferència i, per comprovar que les proteïnes han quedat unides a la membrana es pot tenyir la membrana amb una solució de Roig de Ponceau al 0,02% durant 1-2 minuts deixant-la destenyir posteriorment en aigua.

#### 4.2.2.- Immunodetecció

Prèviament a la immunodetecció de les proteïnes presents en la membrana de nitrocel·lulosa, aquesta es bloqueja mitjançant una Solució de Bloqueig (*blotto*) (PBS 1X, llet en pols 5%, Tween20 0,1%; acida sòdica 0,20%) per tal d'evitar la unió inespecífica dels anticossos a la membrana; la membrana s'incuba en agitació amb *blotto* des d'una hora fins a un ON. Posteriorment, es renta la membrana tres vegades en rentats de 5 minuts cada vegada en PBS-Tween (PBS 1X, Tween20 0,1%) i es

deixa incubant 1 hora amb l'anticòs primari (dissolt en PBS-Tween a la dilució adequada en cada cas). Un cop finalitzada la incubació amb l'anticòs primari es renta la membrana amb tres rentats de 5 minuts en PBS-Tween i s'incuba durant 1 hora amb l'anticòs secundari (dissolt en PBS-Tween a la dilució adequada en cada cas). Finalment, es renta de nou la membrana amb cinc rentats de 5 minuts en PBS-Tween i es procedeix a la detecció dels antígens mitjançant quimioluminiscència.

L'anticòs secundari és l'encarregat de reconèixer les IgGs de l'anticòs primari que estan a la seva vegada unides a l'antigen. Per tal de poder visualitzar la localització d'aquestes molècules l'anticòs secundari utilitzat està conjugat a la peroxidasa de rave (HRP) que és un enzim capaç de donar lloc a una reacció quimioluminiscent en interaccionar amb el seu substrat.

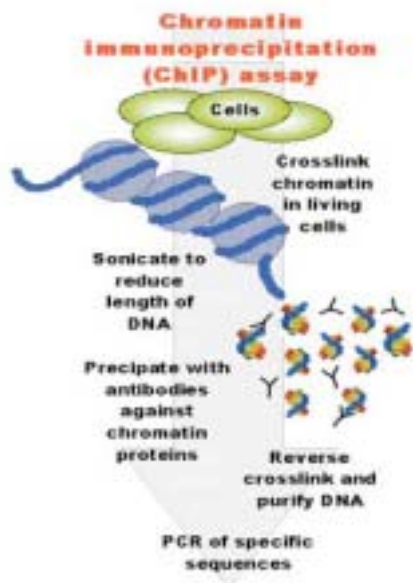
Per a la detecció de l'anticòs secundari conjugat a HRP es barregen 10 ml d'una Solució de Luminol (Tris-HCl pH 8,6 0,1 M, luminol sòdic 1,25 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,7 mM) amb 10 µl de Solució Enhancer (àcid p-hidroxicumàric 0,1% en DMSO) i s'aplica durant 1 minut sobre la membrana. Posteriorment s'asseca la membrana i s'exposa amb una pel·lícula fotogràfica el temps adient per obtenir un senyal òptim.

### **4.3.- *Chromatin immunoprecipitation (CHIP)***

La tècnica de *Chromatin immunoprecipitation* permet la determinació directa de la unió *in vivo* de qualsevol proteïna al seu lloc d'unió al DNA, aquesta tècnica permet no només estudiar aquelles proteïnes que s'uneixen directament al DNA sinó que també permet detectar aquelles proteïnes que estan lligades al DNA per la seva interacció amb altres proteïnes, que són les que s'uneixen directament al DNA. La tècnica es basa en la fixació *in vivo* de les proteïnes al DNA mitjançant el formaldehid com a agent reactiu i en la posterior utilització de la cromatina purificada a partir de les cèl·lules entrecruades com a substrat per a la immunoprecipitació utilitzant anticossos específics contra la proteïna d'interès (figura M.9).

La utilització del formaldehid com a agent reactiu permet que l'entrecruament sigui realitzat directament sobre les cèl·lules intactes donat que aquest és capaç de penetrar

amb facilitat les membranes biològiques, evitant així el risc de la redistribució de les proteïnes durant el procés de preparació dels extractes cel·lulars. El formaldehid és capaç d'entrecruar tant les proteïnes amb el DNA com les proteïnes entre si i presenta el gran avantatge de permetre una reversió completa de l'entrecruament (tractant les cèl·lules a 65°C per revertir les unions DNA-proteïna i a 100°C per les unions proteïna-proteïna). Aquest fet permet que un cop s'ha realitzat la immunoprecipitació es puguin aïllar les seqüències de DNA unides a la proteïna d'interès i que aquestes puguin ser estudiades per mètodes convencionals de *Southern blot* o PCR.



**Figura M.9.-** Esquema de la tècnica de *Chromatin immunoprecipitation*, extret de la pàgina web del Prof. Philip Avner (<http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Gmm/xinactiv.html>).

### Entrecruament i obtenció de l'Extracte Cel·lular Total

Malgrat la capacitat del formaldehid d'entrecruar tant el DNA amb les proteïnes com les proteïnes entre si, s'ha vist que aquest és un agent d'entrecruament insuficient per a detectar la unió al DNA d'algunes proteïnes que no estan directament unides al DNA. En aquest casos s'ha observat que la utilització addicional en la reacció d'entrecruament del compost dimetil-adipimidate (DMA; Sigma), que és un agent capaç d'entrecruar específicament les proteïnes entre si, millora la detecció de la unió d'aquestes proteïnes al DNA (Kurdistani *et al.* 2002; Kurdistani and Grunstein 2003).



En aquest treball, per tal d'intentar detectar la presència de la proteïna Scp160 a les regions telomèriques de llevat es va utilitzar la tècnica de CHIP utilitzant com a agent d'entrecreuament el formaldehid sol o amb combinació amb el DMA (vegeu l'apartat 9.2 dels Resultats i Discussió).

A partir de l'estoc de cèl·lules crescudes en placa sobre les quals es vol realitzar l'experiment de CHIP es creix un minicultiu en medi SD o YEP segons sigui convenient i es deixa créixer ON a 30°C en agitació, aquest s'utilitza l'endemà per a inocular un maxicultiu de 40 ml que es deixarà créixer fins a arribar a 1,5 OD<sub>600</sub>. Per tal de realitzar la reacció d'entrecreuament les cèl·lules es transfereixen a un Falcon de 50 ml i es tracten a temperatura ambient amb els agents d'entrecreuament corresponents. Aquelles cèl·lules tractades amb DMA i formaldehid s'incuben primer durant 45 minuts amb DMA a una concentració final de 10 mM afegint a la reacció DMSO a una concentració final del 0,25% (el DMSO facilita l'entrada del DMA a la cèl·lula) i posteriorment durant 15 minuts amb formaldehid a una concentració final de l'1% rentant les cèl·lules amb PBS fred entre cadascun dels dos tractaments. Aquelles cèl·lules tractades únicament amb formaldehid es tracten directament amb formaldehid a una concentració final de l'1% durant 15 minuts. S'afegeix a la reacció un excés de glicina per tal d'aturar la reacció d'entrecreuament (concentració final 125 mM a partir d'una solució estoc de 2,5 M) i es renten les cèl·lules dues vegades amb 10 ml de PBS fred i s'elimina completament el sobrenedant en el darrer rentat. En aquest punt les cèl·lules es poden congelar a -80°C per a prosseguir amb la lisi cel·lular l'endemà o processar immediatament.

La lisi de les cèl·lules entrecreuades es realitza resuspenent el *pellet* de cèl·lules en 500 µl de Solució Lisi CHIP (Hepes pH 7,5 50 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Tritó X-100 1%, sodium deochycolate 0,1%), s'afegeix a la mostra 20 µl d'inhibidor de proteases (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma). Es transfereixen les cèl·lules a un Falcon de 15 ml i s'afegeixen 2 volums de Glass Beads (Sigma) i es realitzen n cicles d'1 minut vòrtex-gel fins a aconseguir tenir un 90% de cèl·lules trencades. Per tal de separar l'extracte cel·lular de les Glass Beads es forada el Falcon per la part inferior amb una agulla (21G) escalfada a la flama i es posa dins d'un altre Falcon per recollir el líquid després. Se centrifuguen durant 1 minut els dos falcons per a fer baixar totes les restes de líquid present en al mostra. Les mostres se soniquen en 5-10

cicles de 10 segons cadascun a 50% *output* (Bransom 250 Sonifier), entre cadascun dels cicles de sonicació es deixen refredar les cèl·lules en gel. Finalment, es transfereixen les mostres a un eppendorf de 1,5 ml, se centrifugen a 14.000 rpm dues vegades (5 minuts la primera vegada i 15 minuts la segona). El sobrenedant obtingut al final d'aquest procediment es guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$  com a Extracte Cel·lular Total.

### **Protocol d'Immunoprecipitació de les proteïnes a partir d'extractes entrecreuats**

La immunoprecipitació es realitza barrejant en un tub eppendorf de 1,5 ml 500  $\mu\text{l}$  de la Solució de Lisi del CHIP, 200  $\mu\text{l}$  d'Extracte Cel·lular Total, 30  $\mu\text{l}$  de Proteïna A Sepharosa (Amersham farmacia biotech) (equilibrada en Solució de Lisi del CHIP) i  $n$   $\mu\text{l}$  de l'anticòs específic amb el quals es van realitzar les immunoprecipitacions. En aquest treball s'han utilitzat per a realitzar les immunoprecipitacions 10  $\mu\text{l}$  (d'una solució a 0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de l'anticòs contra l'epítot HA (12CA5 Boehringer). La incubació amb l'anticòs es realitza ON a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitació; l'endemà es precipita la proteïna A centrifugant la mostra a 14.000 rpm 30 segons guardant-se el sobrenedant obtingut a  $-80^{\circ}\text{C}$  per analitzar-lo posteriorment. El precipitat de proteïna A és rentat diverses vegades per tal d'eliminar les unions inespecífiques, els diferents rentats es realitzen afegint al precipitat de proteïna A 1 ml de Solució de rentat i incubant-lo durant 5 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitació després dels quals es precipita de nou la proteïna A. En total es varen realitzar cinc rentats successius: dos rentats inicials amb la Solució de Lisi del CHIP, un rentat amb la Solució de Rentat 1 (Hepes pH 7,5 50 mM, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, Tritó X-100 1%, sodium deoxycolate 0,1%), un rentat amb la Solució de Rentat 2 (Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA 1 mM, LiCl 0,25 M, NP-40 0,5%, sodium deoxycolate 0,5%) i un últim rentat en TE, després del qual s'elimina completament el sobrenedant. L'elució dels anticòssos de la proteïna A es realitza afegint 60  $\mu\text{l}$  de Tampó d'Elució (Tris-HCl pH 8 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%) al precipitat de proteïna A i incubant-ho durant 10 minuts a  $65^{\circ}\text{C}$ . Finalment, se centrifugen les mostres a 14.000 rpm durant 2 minuts i es guarda el sobrenedant obtingut a  $-80^{\circ}\text{C}$  com a Precipitat per analitzar-lo posteriorment.

### **Obtenció de DNA a partir de l'Extracte Cel·lular total o dels immunoprecipitats**

Un cop obtinguts els precipitats de les diferents mostres processades es reverteix l'entrecreuament i s'aïllen les seqüències de DNA presents en el precipitats i en l'Extracte Cel·lular Total (*Input*), per tal de poder observar l'enriquiment específic d'una seqüència concreta de DNA en comparar l'abundància relativa de la seqüència d'interès estudiada en el precipitat amb comparació amb l'abundància present en l'*input*. Per revertir l'entrecreuament s'afegeixen a  $n$   $\mu$ l de les mostres 100  $\mu$ l de TE amb 1% de SDS (10  $\mu$ l per a l'Extracte Cel·lular Total i 30  $\mu$ l per als Precipitats) i s'incuben a 65°C ON. L'endemà es digereixen les proteïnes presents en la mostra afegint a aquesta 120  $\mu$ l de TE que conté 100  $\mu$ g de Proteinasa K incubant-ho a 37°C durant 1 hora. S'afegeix a les mostres 25  $\mu$ l d'una solució de LiCl (Tris-HCl pH 8 50 mM, LiCl 5 M) i es purifiquen els àcids nucleics de la mostra mitjançant fenol:cloroform:alcohol isoamílic (250  $\mu$ l) i precipitació amb etanol. El *pellet* obtingut és resuspès en 50  $\mu$ l de TE que conté 1  $\mu$ g de RNAsa A i incubat a 37°C durant 30 minuts.

### **Anàlisi per PCR de la immunoprecipitació**

La presència d'una regió concreta de DNA en els precipitats es determina mitjançant l'amplificació per PCR utilitzant oligonucleòtids específics d'aquesta regió i oligonucleòtids d'una regió control; la determinació de l'enriquiment que presenten aquestes seqüències en el precipitat es realitza comparant els valors de la relació entre els productes de PCR de la regió d'interès i de la regió control obtinguts a partir del precipitat respecte als obtinguts a partir de l'*input*.

Donat que la determinació de l'enriquiment es realitza a partir de la comparació de la relativa abundància dels productes de PCR d'una regió concreta en relació a una regió control és important que les reaccions de PCR es realitzin en condicions quantitatives. A l'inici de la reacció de PCR tots els reactius necessaris per a la reacció estan en excés i la reacció té lloc de forma exponencial, però a mesura que la reacció de PCR avança algun dels components de la reacció esdevé limitant i la PCR entra en una fase estacionària, per això és important que la quantificació dels productes de PCR es faci a partir de productes de PCR obtinguts de reaccions que estan en fase exponencial. Per tal de determinar aquest aspecte s'inclouen en la

reacció de PCR diferents dilucions de l'*input* de forma que es pot testar que la quantitat de producte obtingut és proporcional a la quantitat de DNA motlle afegit. Alhora també millora molt la fiabilitat dels resultats quantitius obtinguts si les reaccions de PCR utilitzades per amplificar la regió d'interès i la regió control a partir dels diferents substrats es realitzen com a reaccions de PCR *multiplex*, de forma que els diferents productes són amplificats en una mateixa reacció de PCR.

En aquest treball s'ha utilitzat la tècnica de CHIP per a determinar la unió de les proteïnes estudiades a les regions telomèriques, per això s'han emprat com a encebadors en la regió de PCR oligonucleòtids específics d'aquestes regions: les parelles d'oligonucleòtids U3T-UP i U3T-LO (fragment URA3-Tel; figures R.13A i R.25A), 1-UP i 1-LO (fragment URA3-Tel'; figura R.25A) i Y'-UP i Y'-LO (fragment Tel Y'; figura R.25A). S'ha utilitzat com a regió control la seqüència genòmica del marcador *URA3* (fragment *ura3-52*; figures R.13A i R.25A). Les seqüències d'aquests oligonucleòtids es poden consultar a la taula M.3 (vegeu l'apartat 2.4 dels Materials i Mètodes.)

#### **4.4.- Immunolocalitzacions**

En aquest treball s'han realitzat immunolocalitzacions de la proteïna Scp160 utilitzant l'anticòs 12CA5 (Boehringer) contra l'epítip HA en la soca YXM20 que conté la proteïna de fusió Scp160-3HA (vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes).

##### **Protocol general d'immunolocalitzacions a llevat**

A partir de l'estoc de cèl·lules crescudes en placa sobre les quals es vol realitzar la immunolocalització es creix un minicultiu en medi SD o YEP segons sigui convenient i es deixa créixer ON a 30°C en agitació, aquest s'utilitza l'endemà per a inocular un maxicultiu de 20 ml que es deixa créixer fins a arribar a 0,5 OD<sub>600</sub>. Un cop les cèl·lules han arribat a la densitat òptica adequada es fixen afegint al cultiu 2,5 ml de formaldehid al 37% (la concentració final de formaldehid al cultiu pot estar entre 3,5% i 5%) i 2,5 ml d'una solució 1 M tampó fosfat a pH 6,5 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 466 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 534 mM) i es deixen a temperatura ambient durant 2 hores en agitació.

Posteriorment, se centrifugen les cèl·lules a 700g durant 2 minuts, es renten dues vegades en tampó SP (Sorbitol 1,2 M, tampó fosfat a pH 6,5 0,1 M) i es resuspenen en 1 ml de tampó SP que conté 0,4 µg/µl de Zymoliasa 100T (ICN Biomedicals) (afegint-hi 1,4 µl de Δ-mercaptoetanol a la reacció) per a catalitzar la producció d'esferoplasts. Es deixen les cèl·lules a 37°C durant 30-60 minuts i es comprova a la formació dels esferoplasts al microscopi cada 10 minuts a partir dels 30 minuts de incubació. La reacció s'atura quan s'han obtingut un 90% d'esferoplasts. És important que les cèl·lules estiguin correctament digerides, si les cèl·lules no estan prou digerides posteriorment no són capaces d'enganxar-se al suport de poly-L-Lys i, per contra, si estan digerides en excés tenen tendència a col·lapsar-se.

Durant la incubació amb la zymoliasa es preparen els portaobjectes rentant-los per immersió primer en aigua destil·lada i posteriorment en etanol del 95% (es deixen assecar els portaobjectes a l'aire lliure) i s'aplica a cadascun dels pouets 15 µl d'una solució de 1mg/ml poly-L-Lys durant 5 minuts després dels quals es renten tres vegades amb aigua destil·lada cadascun dels pouets per separat. Per tal de permetre la unió dels esferoplasts a els portaobjectes tractats amb poly-L-Lys s'aplica a cadascun dels pouets 15 µl de suspensió cel·lular durant 10 minuts i s'elimina el sobrenedant mitjançant una pipeta Pasteur. Es renta cadascun dels pouets 10 vegades amb 20 µl de PBS-Tween evitant que s'assequin les plaques (es col·loquen els portaobjectes dins d'una placa de Petri que conté paper de filtre mullat en PBS). Després de l'últim rentat s'apliquen 15 µl de l'anticòs primari a cadascun dels pouets i es deixa 1 hora a temperatura ambient (realitzar diferents dilucions de prova per tal de determinar quina dilució dóna el senyal adequat; en aquest treball es va usar l'anticòs 12CA5 de Boehringer a les dilucions 1:10 i 1:100). Un cop acabada la incubació amb l'anticòs primari es renten deu vegades amb 20 µl de PBS-Tween cadascun dels pouets i s'incuba amb l'anticòs secundari lligat a un fluorocrom (en aquest treball es van utilitzar anticossos secundaris de conill conjugat a Cy5 a una dilució 1:100) durant 30 minuts a temperatura ambient mantenint el portaobjectes apartat de la llum. Es renten les cèl·lules dues vegades amb PBS-Tween i 10 vegades amb PBS i es realitza la tinció amb DAPI aplicant 15 µl d'una solució de 2 ng/µl durant 5 minuts a cadascun dels pouets. Posteriorment es renta dues vegades cada pouet amb PBS.

Finalment, les mostres es munten afegint el medi de muntatge (Mowviol, Calbiochem) i es cobreixen amb el cobreobjectes evitant la formació de bombolles.

Les mostres poden observar-se a l'instant o guardar-se a 4°C en la foscor. En aquest treball s'han emprat per a l'obtenció de les imatges d'immunofluorescència un microscopi de fluorescència Axiophot (Zeiss) amb una càmera digital Leica DC200 i un microscopi Confocal Leica SP1.

## **V. RESULTATS I DISCUSSIÓ**





## **1.- Les cèl·lules *scp160* presenten problemes de segregació cromosòmica**

Tal com ja s'ha comentat a la introducció, les cèl·lules *scp160* es comporten com a pseudohaploides en ser creuades amb d'altres soques i analitzar la segregació de diferents marcadors genètics mitjançant microdissecció de tètades (Wintersberger *et al.* 1995).

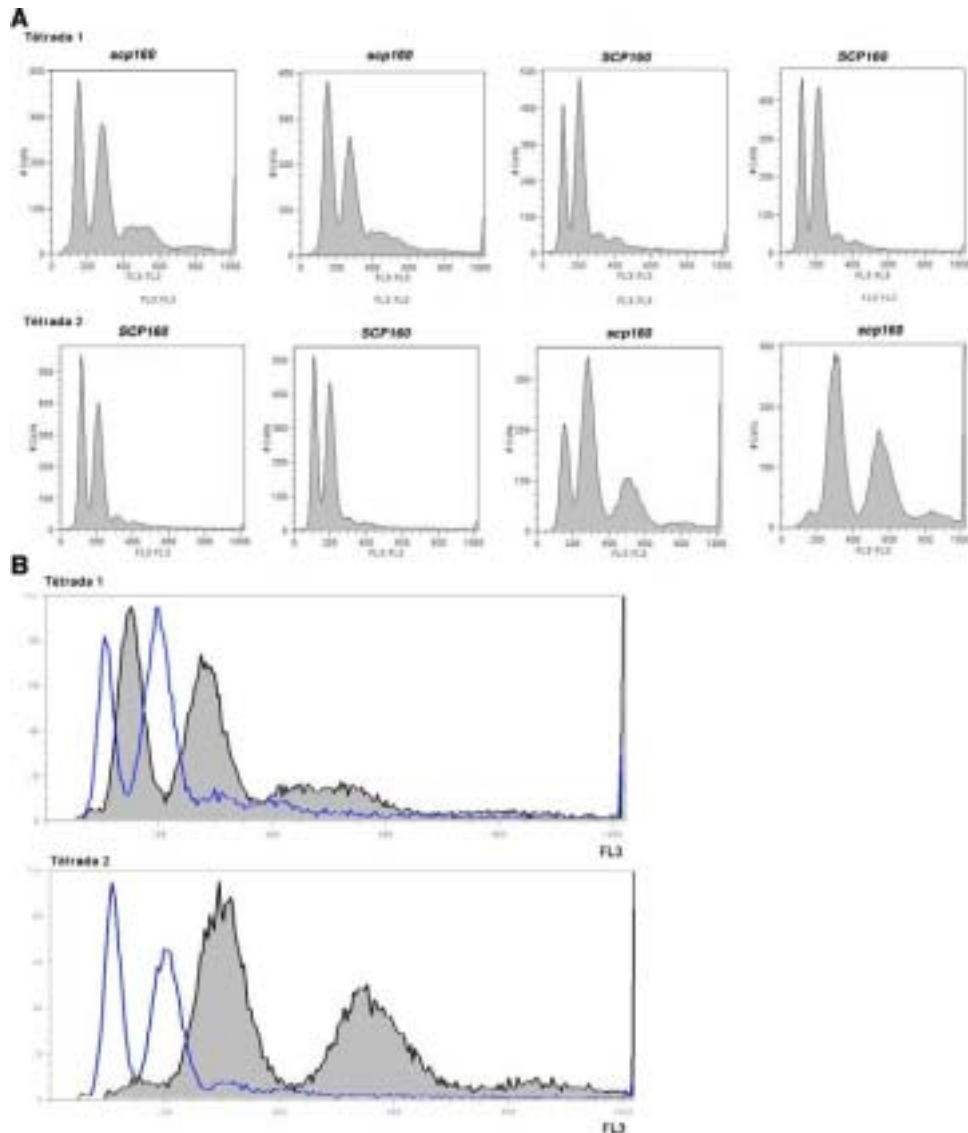
### **1.1.- Les cèl·lules *scp160* presenten un FACS aberrant**

Per tal d'estudiar la ploidia de les cèl·lules *scp160* hem obtingut espores haploides a partir de cèl·lules diploides heterozigotes per al gen *SCP160* i les hem analitzat mitjançant FACS (vegeu l'apartat 1.4 dels Materials i Mètodes). Les espores amb la deleció del gen *SCP160* (*scp160Δ::LEU2*; soques YXM2) obtingudes a partir de la soca heterozigota AK303 presenten en tots els casos estudiats un nivell de ploidia cel·lular més elevat que el de les espores *wild type* germanes obtingudes de la mateixa soca, així com de les espores obtingudes a partir de la soca diploide *wild type* AK300 (soques YXM1; vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes). Les soques diploides AK303 i AK300 s'han sotmès a un procés d'obtenció d'espores i microdissecció de tètades (vegeu l'apartat 1.3 dels Materials i Mètodes). Les espores obtingudes a partir de la soca AK303 s'han testat mitjançant rèpliques en plaques de medi mínim sense leucina per tal de determinar quines porten la deleció del gen *SCP160*.

S'han obtingut un total de 159 espores a partir de la soca AK303 entre les que s'inclouen 19 tètades senceres de les quals es disposa de les quatre espores procedents d'una mateixa meiosi. D'aquestes cèl·lules el 52% (83 espores) presenten la deleció del gen *SCP160*, observant-se d'aquesta manera la relació 2:2 esperada fet que ens indica que la deleció del gen *SCP160* no sembla afectar de manera significativa la viabilitat de les espores durant el procés de germinació d'aquestes.

En analitzar per FACS les diferents espores obtingudes es pot observar que hi ha tètades on les cèl·lules amb la deleció presenten pics corresponents al valor de 1,5 vegades el nivell de ploidia que presenten les cèl·lules *wild type* germanes de la

mateixa tètreda, i d'altres tètredes en què les cèl·lules amb la deleció presenten continguts de DNA més elevats als corresponents a 1,5 vegades el nivell de ploïdia de les seves germanes *wild type* (figura R.1).



**Figura R.1.-** (A) FACS de les cèl·lules obtingudes a partir de l'esperulació d'un diploide heterozigot per *SCP160*; es representen els dos tipus de tètredes diferents obtinguts: tètredes amb cèl·lules mutants que presenten pics corresponents a 1,5 vegades els valors observats en les cèl·lules *wild type* germanes (Tètrada 1) i tètredes on els valors dels pics de DNA de les cèl·lules mutants són superiors a 1,5 vegades els valors dels pics de les cèl·lules *wild type* germanes (Tètrada 2). (B) Comparació dels histogrames d'una cèl·lula *scp160* (en gris) amb una cèl·lula *SCP160* germana de la mateixa tètreda (en blau).

Aquest diferent comportament entre diferents tètredes sembla dependre, en part, de les condicions experimentals utilitzades en l'obtenció de les espores i el seu posterior processament per a observar-les al FACS. A l'hora d'obtenir les espores aquestes es varen germinar o bé en plaques de YPD, o bé en plaques de YEP-galactosa. S'ha observat que aquelles espores mutants obtingudes germinant-les en plaques de YPD

es comporten majoritàriament com les espores mutants del segon tipus de tètrada representada en la figura R.1, mentre que les espores mutants obtingudes després de germinar-les en plaques de YEP-galactosa es comporten majoritàriament com les espores mutants representades en el primer tipus de tètrada de la figura R.1. Un altre factor experimental que sembla afectar l'establiment del fenotip de ploidia observat és l'estat vegetatiu en què es troben les cèl·lules en el moment de créixer els cultius per analitzar les cèl·lules mitjançant FACS, aquelles espores que han estat un temps més prolongat a 4°C abans de processar-les per analitzar-les mitjançant FACS presenten amb més facilitat fenotips amb un major contingut de DNA.

Malgrat aquesta variabilitat en el grau d'afectació de la ploidia cel·lular en tots els casos observats, el contingut de DNA per cèl·lula de les cèl·lules amb la deleció és més elevat que no pas el contingut de DNA de les cèl·lules *wild type*. A més a més els pics de cèl·lules obtinguts en l'anàlisi per FACS de les cèl·lules amb la deleció són més amples que els pics obtinguts amb les cèl·lules *wild type* (figura R.1), indicant que la variabilitat quant al contingut de DNA per cèl·lula present en les poblacions de cèl·lules mutants és més elevada que la variabilitat present en les poblacions de cèl·lules *wild type*.

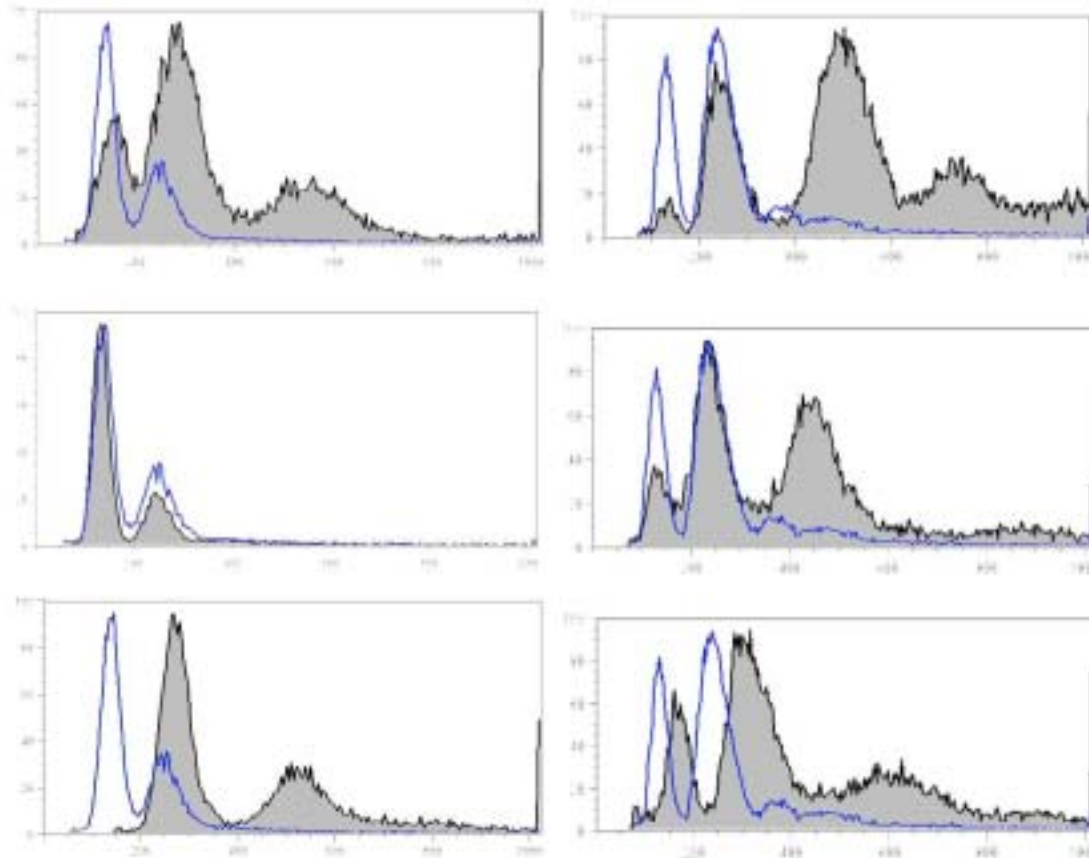
Les dades obtingudes mitjançant citometria de flux s'han analitzat amb l'ajuda del programa WinMDI, que ens permet obtenir el valor mitjà de fluorescència de cadascun dels pics observats en els histogrames obtinguts per l'anàlisi amb FACS, així com el percentatge de cèl·lules del total de la població que hi ha en cadascun dels pics. Tal com es pot observar en la taula R.1 tant els valors de fluorescència (contingut de DNA) com el percentatge de cèl·lules dins de la població que presenten continguts de DNA elevats són més alts en les poblacions de cèl·lules mutants.

|               | Percentatge de cèl·lules |           |           | Valor Mitja de la de fluorescència |          |           |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------|------------------------------------|----------|-----------|
|               | N                        | 2N        | >2N       | N                                  | 2N       | >2N       |
| <i>SCP160</i> | 48.4±4.36                | 36.8±4.41 | 13.3±4.51 | 115±7.97                           | 211±15.6 | 394±29.11 |
| <i>scp160</i> | 20.2±16.3                | 41.0±5.8  | 31.9±10.5 | 153±10.6                           | 296±13.6 | 552±33.5  |

**Taula R.1.-** Mitjana i error estàndard del percentatge de cèl·lules i del valor mitjà de la fluorescència a cadascun dels diferents pics de cèl·lules obtinguts mitjançant l'anàlisi per FACS (figura R.1). Els valor N, 2N i >2N es refereixen al nivell de ploidia atribuït a un pic en concret prenent com a valor N el pic de fluorescència que representa el valor de DNA més baix observat en cadascuna de les diferents categories de cèl·lules analitzades (*SCP160* i *scp160*).

La deleció del gen *SCP160* directament sobre soques haploides (vegeu l'apartat 1.6 dels Materials i Mètodes) també dóna lloc a cèl·lules amb un major contingut de DNA indicant que per a l'establiment del fenotip de ploidia aberrant no és necessari el pas de les cèl·lules per meiosi. Hem analitzat l'establiment del fenotip de ploidia directament sobre soques haploides en dues soques diferents (UCC506 i YDS21U; vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes) observant-se, igual que en l'experiment d'obtenció d'espores, variabilitat en l'establiment d'aquest fenotip. Malgrat que en tots els clons obtinguts en major o menor grau s'ha observat l'aparició de cèl·lules que presenten alteracions en el nivell de la ploidia, hem observat diferències quant a la facilitat de l'establiment del fenotip de ploidia en les dues soques estudiades. Mentre que en els derivats de la soca YDS21U s'observen en tots els casos analitzats nivells de DNA més elevats que la soca parental, els derivats de la soca UCC506 presenten una major variabilitat pel que fa als nivells de ploidia cel·lular, observant-se fins i tot colònies que en ser analitzades per FACS presenten un contingut de DNA similar al de les cèl·lules *wild type* (figura R.2).

Tal com ja havia estat descrit en analitzar el contingut de DNA per mètodes químics, hem observat que les cèl·lules derivades d'un mateix clon, després de ser sotmeses a un procés de congelació per tal de guardar-les com estocs i descongelar-les de nou, tenen tendència a mostrar continguts de DNA més elevats (Wintersberger *et al.* 1995). Malgrat aquesta tendència, l'increment de ploidia observat en soques mutants no sembla avançar més enllà del valor 4N de la soca parental.



**Figura R.2.-** FACS de diferents clons *scp160* obtinguts mitjançant tècniques de manipulació gènica directament sobre cèl·lules haploides, a l'esquerra es mostren tres clons derivats de la soca UCC506 i a la dreta tres clons derivats de la soca YDS21U. En gris es representa el FACS obtingut a partir de cèl·lules *scp160* i en blau es mostra el contorn corresponent al FACS d'una cèl·lula *wild type* de la mateixa soca..

## 1.2.- L'expressió de la proteïna DDP1 complementa la deleció del gen *SCP160*

En l'anàlisi de la funcionalitat gènica d'una proteïna a llevat se sol transformar la soca mutant amb una còpia intacta del gen que codifica per la proteïna d'interès, d'aquesta manera s'aconsegueix recuperar els fenotips que presenta la soca mutant. No obstant, en els mutants *scp160* la introducció d'una còpia *wild type* del gen, bé sigui mitjançant creuaments de les soques mutants amb soques *wild type* o expressant de forma ectòpica la proteïna Scp160, no dona lloc a una recuperació dels fenotips mutants observats, reflectint que un cop la cèl·lula ha perdut el seu cariotip correcte aquest esdevé irrecuperable (Wintersberger *et al.* 1995). Malgrat això, si la deleció del gen *SCP160* es fa en presència d'un plasmidi que sobreexpressa la pròpia

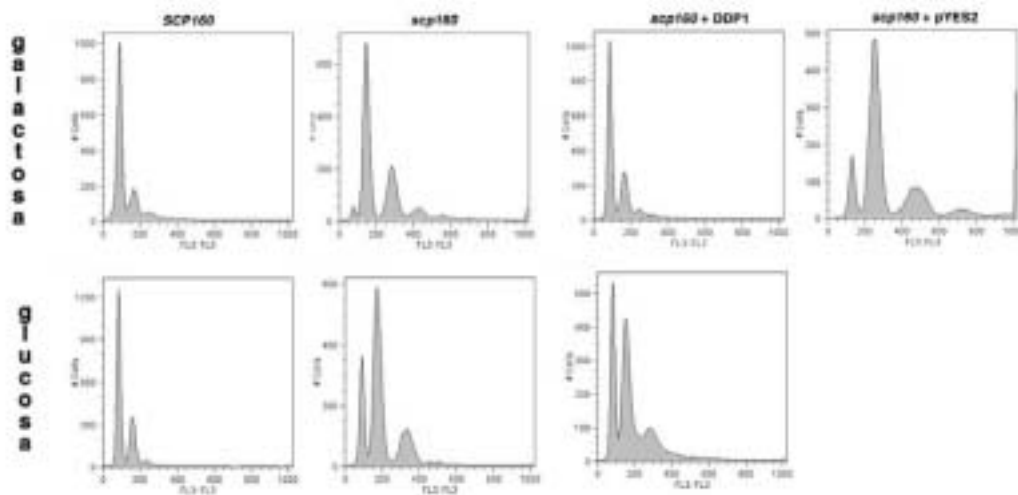
proteïna de llevat aquesta no dóna lloc a l'establiment dels fenotips mutants (Wintersberger *et al.* 1995).

La proteïna DDP1 ha estat aïllada en el nostre laboratori per la seva capacitat d'unir-se a les seqüències pericentromèriques de *Drosophila melanogaster* i és l'homòleg de les vigilines en aquest organisme (vegeu l'apartat 1.2.3 de la Introducció). Per tal de determinar si la proteïna DDP1 de *Drosophila melanogaster* i la proteïna Scp160 de *Saccharomyces cerevisiae* són homòlegs funcionals hem obtingut cèl·lules amb la deleció del gen *SCP160* en presència d'un plasmidi que sobreexpressa la proteïna DDP1 de *Drosophila melanogaster*.

Hem transformat la soca de llevat AK303 heterozigota per la mutació en el gen *SCP160* amb el plasmidi pYES2-PACA que conté clonada l'ORF que codifica per la proteïna DDP1 (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes). El plasmidi pYES2 és un plasmidi d'expressió de llevat que permet l'expressió regulada de qualsevol ORF clonada en el seu MCS. Aquest plasmidi dirigeix l'expressió dels gens clonats mitjançant el promotor GAL1 que és induïble per la presència de galactosa en el medi i reprimible per la presència de glucosa al medi (West *et al.* 1984; Giniger *et al.* 1985). Les cèl·lules derivades de la transformació del plasmidi pYES2-PACA en la soca AK303 han estat sotmeses a un procés d'obtenció d'espores i microdissecció de tètades per tal d'obtenir espores que portessin la deleció del gen *SCP160* i tinguessin el plasmidi pYES2-PACA. Les espores obtingudes s'han testat mitjançant rèpliques en plaques de medi mínim sense leucina (seleccionen per *scp160Δ::LEU2*) i sense uracil (seleccionen per al plasmidi pYES2-PACA) per tal d'aïllar les espores desitjades. Com a control s'han transformat cèl·lules de la soca AK303 amb el plasmidi pYES2. La germinació de les espores i el posterior processament d'aquestes s'ha fet sempre en plaques que contenen galactosa com a font de carboni per tal d'assegurar l'expressió de la proteïna DDP1. En analitzar per FACS aquestes espores s'observa que les espores que contenen el plasmidi pYES2-PACA mostren un contingut de DNA normal mentre que en les espores transformades amb el plasmidi pYES2 mostren un contingut de DNA aberrant (figura R.3). En presència del plasmidi pYES2-PACA el fenotip de ploidia aberrant no s'observa mai. Les cèl·lules transformades amb el plasmidi pYES2 manifesten de forma variable el fenotip de

ploidia amb un 10% de les cèl·lules analitzades que mostren un contingut de DNA superior al de les cèl·lules *wild type*.

En créixer aquestes mateixes cèl·lules en medis que contenen glucosa per tal de reprimir l'expressió induïda de la proteïna DDP1 en el plasmidi pYES2-PACA, s'observa que les cèl·lules amb la deleció que contenen el plasmidi pYES2-PACA mostren un contingut de DNA més elevat que les cèl·lules *wild type* (figura R.3) tot i que sembla haver-hi una recuperació parcial del fenotip que podria indicar que encara hi ha expressió de la proteïna DDP1.



**Figura R.3.-** FACS de cèl·lules que expressen de forma ectòpica la proteïna DDP1 de *Drosophila melanogaster*. Les diferents cèl·lules analitzades s'han crescut en medi líquid utilitzant com a font de carboni galactosa (part superior) o glucosa (part inferior) i han estat analitzades mitjançant citometria de flux (vegeu l'apartat 1.4 dels Materials i Mètodes) per tal de determinar els nivells de ploidia cel·lular.

S'han crescut les espores que contenen el plasmidi pYES2-PACA durant diverses generacions en medi no selectiu i s'han plaquejat en plaques que contenen l'àcid 5-Fluororòtic (FOA) per tal d'aïllar clons que hagin perdut el plasmidi pYES2-PACA. El FOA és un compost que afegit en el medi permet seleccionar de forma negativa per al marcador *URA3*. Les cèl·lules que expressen l'enzim orotidina-5'-fosfat descarboxilasa, codificat pel gen *URA3*, no són capaces de créixer en medi que conté FOA (Boeke *et al.* 1984) podent-se aïllar així cèl·lules que han perdut el plasmidi pYES2-PACA (el plasmidi pYES2-PACA conté com a marcador selectiu *URA3*) i, per tant, l'expressió de la proteïna DDP1. Les cèl·lules obtingudes a partir de les plaques de FOA mostraven, tal com ja s'ha mostrat anteriorment, variabilitat en

l'establiment del fenotip de ploidia aberrant. El 10 % de les cèl·lules obtingudes mostraven inicialment el fenotip de ploidia aberrant. No obstant, els mateixos clons de cèl·lules que inicialment no manifesten per FACS el fenotip de ploidia aberrant, sí que manifesten alteracions en el nivell de ploidia cel·lular en analitzar cèl·lules procedents de la descongelació dels estocs realitzats a partir d'aquests mateixos clons.

### **1.3.- Les cèl·lules *scp160* són hipersensibles al benomyl, una droga desestabilitzadora dels microtubuls**

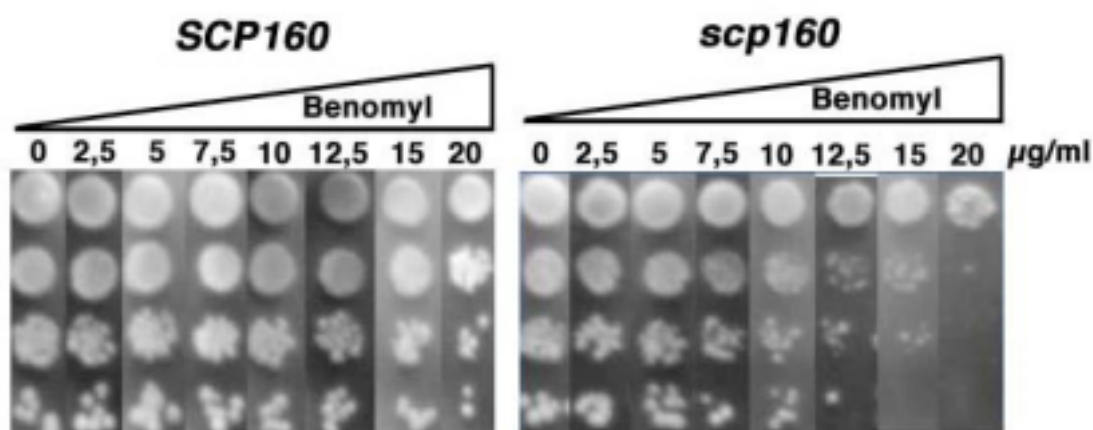
El benomyl és un dels membres de la família de compostos basats en el benzimidazol, que a concentracions adequades són capaços d'afavorir la despolimerització dels microtubuls, aquesta característica s'ha observat tant *in vitro* (Kilmartin 1981), com *in vivo* (Jacobs *et al.* 1988). Entre aquesta família de compostos hi ha un conjunt de drogues conegudes que afecten la funció dels microtubuls com ara el nocodazol, el thiabendazol (TBZ) i el methyl-benzamidazol-carbamat (MBC). Es creu que aquestes drogues actuen unint-se a les subunitat lliures de tubulina impedit la polimerització d'aquesta per formar els microtubuls. La presència de les drogues en el medi afavoreix la desestabilització dels microtubuls donant lloc a una major presència de formes lliures de tubulina.

El tractament amb aquests tipus de drogues *in vivo* provoca un mal funcionament dels processos mediat pels microtubuls en la cèl·lula entre els que destaquen els processos de divisió nuclear, migració nuclear i fusió nuclear (Quinlan *et al.* 1980; Delgado and Conde 1984; Jacobs *et al.* 1988). S'han detectat un conjunt de mutacions que afecten la capacitat de les cèl·lules de créixer en presència d'aquestes drogues, entre aquestes mutacions n'hi ha que afecten els propis gens de la tubulina i d'altres mutacions que afecten la funcionalitat dels microtubuls. La hipersensibilitat a aquestes drogues ha estat utilitzada com una eina d'estudi per a la caracterització de mutacions que afecten el procés de segregació cromosòmica. S'han descrit un nombre important de proteïnes implicades en l'estructuració de l'heterocromatina centromèrica a *Schizosaccharomyces pombe* que presenten defectes en la segregació cromosòmica i, alhora, mostren una hipersensibilitat a aquests compostos (Li and



Murray 1991; Interthal *et al.* 1995; Bernard *et al.* 1998; Hyland *et al.* 1999). La hipersensibilitat a aquests compostos s'associa a un defecte estructural en la formació del fus mitòtic o a un defecte en la regulació dels processos que afecten aquestes estructures com ara defectes en el *spindle checkpoint*.

El fenotip de ploïdia aberrant manifestat per les cèl·lules *scp160* suggereix que aquesta proteïna contribueix d'alguna manera al procés de segregació cromosòmica. Per això ens vàrem plantejar estudiar com es comporten les cèl·lules *scp160* en presència de benomyl. S'han plaquejat dilucions seriades de cèl·lules *scp160* en plaques de YPD que contenen diferents concentracions de benomyl compreses entre els valors de 2,5 fins a 20 µg/ml, observant-se que les cèl·lules *scp160* comencen a manifestar problemes de creixement a partir de 10 µg/ml de benomyl, mentre que les cèl·lules *wild type* són capaces de créixer sense problemes en plaques de fins a 20 µg/ml (figura R.4).



**Figura R.4.-** Anàlisi de la capacitat de creixement que presenten les cèl·lules *scp160* en presència de diferents concentracions de benomyl (2,5-20 µg/ml) en comparació amb la capacitat de créixer que presenten les cèl·lules *SCP160*. Dilucions seriades de cultius en creixement exponencial de les diferents soques estudiades s'han plaquejat a les diferents plaques que contenen concentracions creixents de benomyl (vegeu l'apartat 1.2.3 dels Materials i Mètodes).

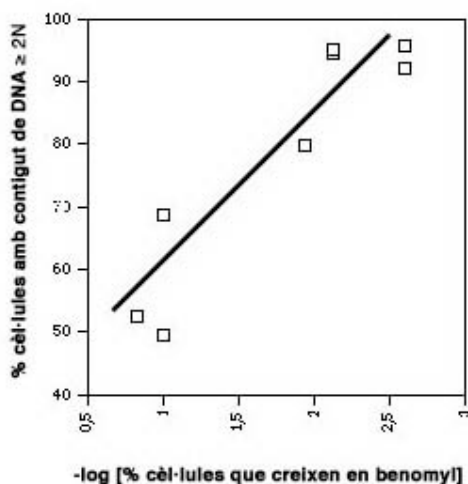
En analitzar diferents espores *scp160* obtingudes a partir de la soca heterozigota AK303 mitjançant microdissecció de tètades en les plaques que contenen benomyl s'observa, en un 50% de les cèl·lules analitzades, aquesta hipersensibilitat al benomyl. Donat que aquestes cèl·lules procedeixen de l'esperulació de la soca AK303 i que aquest fenotip no es presenta en totes les cèl·lules *scp160* analitzades podria donar-se el cas que la hipersensibilitat al benomyl fos deguda a la presència d'una altra mutació en la soca diploide AK303 que estigués segregant de forma

independent a la mutació en el gen *SCP160*. Per descartar aquesta possibilitat s'han analitzat, en plaques que contenen benomyl, totes les cèl·lules obtingudes a partir de cinc tètredes senceres obtingudes per micromanipulació. En cap de les cèl·lules *wild type* analitzades s'ha observat una hipersensibilitat al benomyl, fet que sí que es manifesta en el 70% de les cèl·lules *scp160* analitzades (taula R.2). Aquesta anàlisi ens permet concloure amb un nivell de significació del 0,001 que la mutació del gen *SCP160* i la hipersensibilitat al benomyl no segreguen de forma independent. Per corroborar aquesta idea posteriorment hem analitzat la hipersensibilitat al benomyl de soques *scp160* obtingudes directament a partir de cèl·lules haploides, observant-se també en aquest cas que les cèl·lules *scp160* presenten hipersensibilitat al benomyl amb una penetració incompleta (figura R.9).

|               | Hipersensible | No hipersensible |
|---------------|---------------|------------------|
| <i>SCP160</i> | 0             | 10               |
| <i>scp160</i> | 7             | 3                |

**Taula R.2.-** Taula de contingència per comprovar la dependència entre la deleció del gen *SCP160* i la hipersensibilitat al benomyl. Nivell de significació=0.001.

En analitzar per FACS les mateixes cèl·lules que s'han analitzat mitjançant les plaques de benomyl s'observa que les cèl·lules que presenten una major hipersensibilitat al benomyl són aquelles que mostren per FACS una major proporció de cèl·lules amb contingut de DNA aberrant (figura R.5).



**Figura R.5.-** Regressió lineal entre la proporció de cèl·lules capaces de créixer en plaques que contenen 10 µg/ml de benomyl i el percentatge de cèl·lules de la població amb continguts de DNA Δ 2N. Coeficient de Correlació=0.92.

## 1.4.- En les cèl·lules *scp160* no es detecta un major defecte de segregació de plasmidis centromèrics

Donats els fenotips relacionats amb la segregació cromosòmica que presenten els mutants del gen *SCP160* ens vàrem plantejar l'estudi de la segregació de plasmidis centromèrics en un fons mutant per tal de determinar si aquestes cèl·lules presenten una taxa més elevada de pèrdua d'aquests plasmidis.

Els plasmidis centromèrics contenen, a més a més de les seqüències ARS (Autonomous Replicating Sequences), algun dels centròmers de *Saccharomyces cerevisiae*, els elements CEN, d'aproximadament 125 pb. Les seqüències ARS actuen com a inici de la replicació permetent que el plasmidi es mantingui d'una manera episomal, però els plasmidis que només contenen seqüències de tipus ARS no segregen de forma dirigida i són altament inestables. Aquests plasmidis de replicació durant la divisió cel·lular tendeixen a mantenir-se en la cèl·lula mare i no es transmeten correctament a les cèl·lules filles, requerint el manteniment de la pressió selectiva de forma constant per a què es mantinguin en la població. Els plasmidis centromèrics, a diferència dels plasmidis de replicació, es comporten d'una forma més semblant a minicromosomes. Es mantenen de forma estable en absència de pressió selectiva (malgrat que la taxa de pèrdua d'aquest plasmidis continua essent elevada comparada amb la dels cromosomes propis de llevat), segregen durant el procés de meiosi de forma mendeliana i es mantenen com a plasmidis de baix nombre de còpia per cèl·lula.

Hem mesurat la taxa de pèrdua d'aquests plasmidis en cèl·lules *wild type* i en cèl·lules mutants per al gen *SCP160*. Cèl·lules que contenen els plasmidis pRS303 o pRS304 (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes) s'han utilitzat per a inocular 10 ml de medi YPD que s'ha deixat créixer fins a saturació. S'han extret mostres a l'inici i al final d'aquest cultiu que han estat plaquejades en plaques de YPD i de medi mínim selectiu per la presència del plasmidi per tal de determinar la proporció de cèl·lules que contenen el plasmidi. La taxa de pèrdua per generació del plasmidi s'ha calculat emprant la fórmula: taxa de pèrdua =  $1 - (F/I)^{1/N}$ , on F és la proporció de cèl·lules finals que contenen el plasmidi, I la proporció de cèl·lules inicials que contenen el plasmidi, i N és el nombre de generacions transcorreguts (Kipling and

Kearsey 1990). Els resultats obtinguts en aquest experiment (taula R.3) no ens permeten detectar diferències significatives en la taxa de pèrdua per generació entre les dues poblacions estudiades (p-valor=0,6).

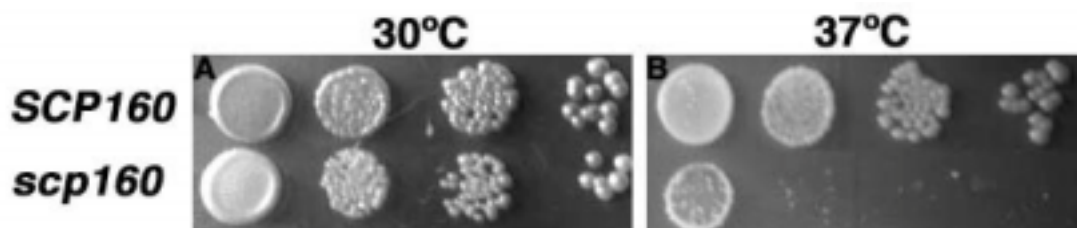
|                      | Taxa de pèrdua per generació <sup>a</sup> |
|----------------------|---|
| <b><i>SCP160</i></b> | 0,07±0,02                                 |
| <b><i>scp160</i></b> | 0,06±0,03                                 |

<sup>a</sup> Els valors corresponen a la mitjana i desviació estàndard de 6 transformants independents.

**Taula R.3.-** Taxa de pèrdua dels plasmidis centromèrics pRS303 i pRS304 en cèl·lules *SCP160* i *scp160*.

## 2.- Les cèl·lules *scp160* presenten un fenotip *ts*

Per tal de determinar si els mutants *scp160* presenten fenotips de sensibilitat a diferents temperatures es varen créixer cèl·lules *scp160* a 37°C, 17°C i 14°C. En analitzar la capacitat de créixer a 37°C de les cèl·lules *scp160* obtingudes a partir de la soca diploide AK303 per microdissecció de tètredes hem observat que en un 50% dels casos analitzats aquestes cèl·lules no eren capaces de créixer a aquesta temperatura (figura R.6). Tal com ja s'ha discutit anteriorment, aquest fenotip *ts* podria ser degut a l'existència en la soca AK303 d'una mutació independent a la mutació del gen *SCP160* que segregués de forma independent a aquesta. De la mateixa manera que hem fet en l'estudi de la hipersensibilitat al benomyl per tal d'adreçar aquesta qüestió, hem analitzat la capacitat de créixer a 37°C de totes les cèl·lules obtingudes a partir de cinc tètredes senceres. Tal com pot observar-se en la taula R.4 cap de les cèl·lules *wild type* analitzades en aquest estudi presenta problemes de creixement a 37°C, mentre un 60% de les cèl·lules *scp160* analitzades sí que presenten problemes de creixement a 37°C. D'aquest estudi podem concloure amb un nivell de significació del 0,001 que ambdues mutacions no segregen de forma independent. Per corroborar posteriorment aquesta hipòtesi hem analitzat el fenotip *ts* de cèl·lules *scp160* obtingudes a partir de cèl·lules haploides mitjançant tècniques de manipulació gènica, en aquest anàlisi hem observat de nou que les cèl·lules *scp160* presenten un fenotip *ts* que es manifesta amb una penetració incompleta (figura R.9).



**Figura R.6.-** Anàlisi de la capacitat de creixement de les soques *scp160* a 37°C en comparació amb la capacitat de créixer de les soques *SCP160*. Dilucions seriades de les diferents soques estudiades s'han plaquejat en plaques de YPD que posteriorment han estat incubades a 30°C (A) o a 37°C (B) (vegeu l'apartat 1.2.3 dels Materials i Mètodes).

|                      | <b>Fenotip <i>ts</i></b> | <b>No Fenotip <i>ts</i></b> |
|----------------------|--------------------------|-----------------------------|
| <b><i>SCP160</i></b> | 0                        | 10                          |
| <b><i>scp160</i></b> | 6                        | 4                           |

**Taula R.4.-** Taula de contingència per comprovar la dependència entre la deleció del gen *SCP160* i el fenotip *ts*.  
Nivell de significació=0.001

En analitzar per FACS les mateixes cèl·lules que s'han analitzat per al fenotip *ts* s'observa que en general les cèl·lules *ts* són aquelles que mostren per FACS una major proporció de cèl·lules amb contingut de DNA aberrant (taula R.5), tot i que també s'observen clons amb una elevada proporció de les cèl·lules amb contingut de DNA aberrant que no manifesten el fenotip *ts*. Totes les cèl·lules *scp160* analitzades en aquest estudi mostren però, en major o menor grau, nivells de DNA superiors als de les cèl·lules *wild type*.

|                             | <b>% cèl·lules en pics <math>\geq 2N</math></b> |
|-----------------------------|---|
| <b>Fenotip <i>ts</i></b>    | 80,73 $\pm$ 21,5                                |
| <b>No fenotip <i>ts</i></b> | 57,4 $\pm$ 19,1                                 |

**Taula R.5.-** Mitjana i desviació estàndard de la proporció de cèl·lules que presenten continguts de DNA  $\Delta 2N$ . S'ha quantificat mitjançant el programa WinMDI la proporció de cèl·lules presents en cadascun dels pics observats en les figures de FACS obtinguts a partir de les cèl·lules *scp160* analitzades en aquest estudi.

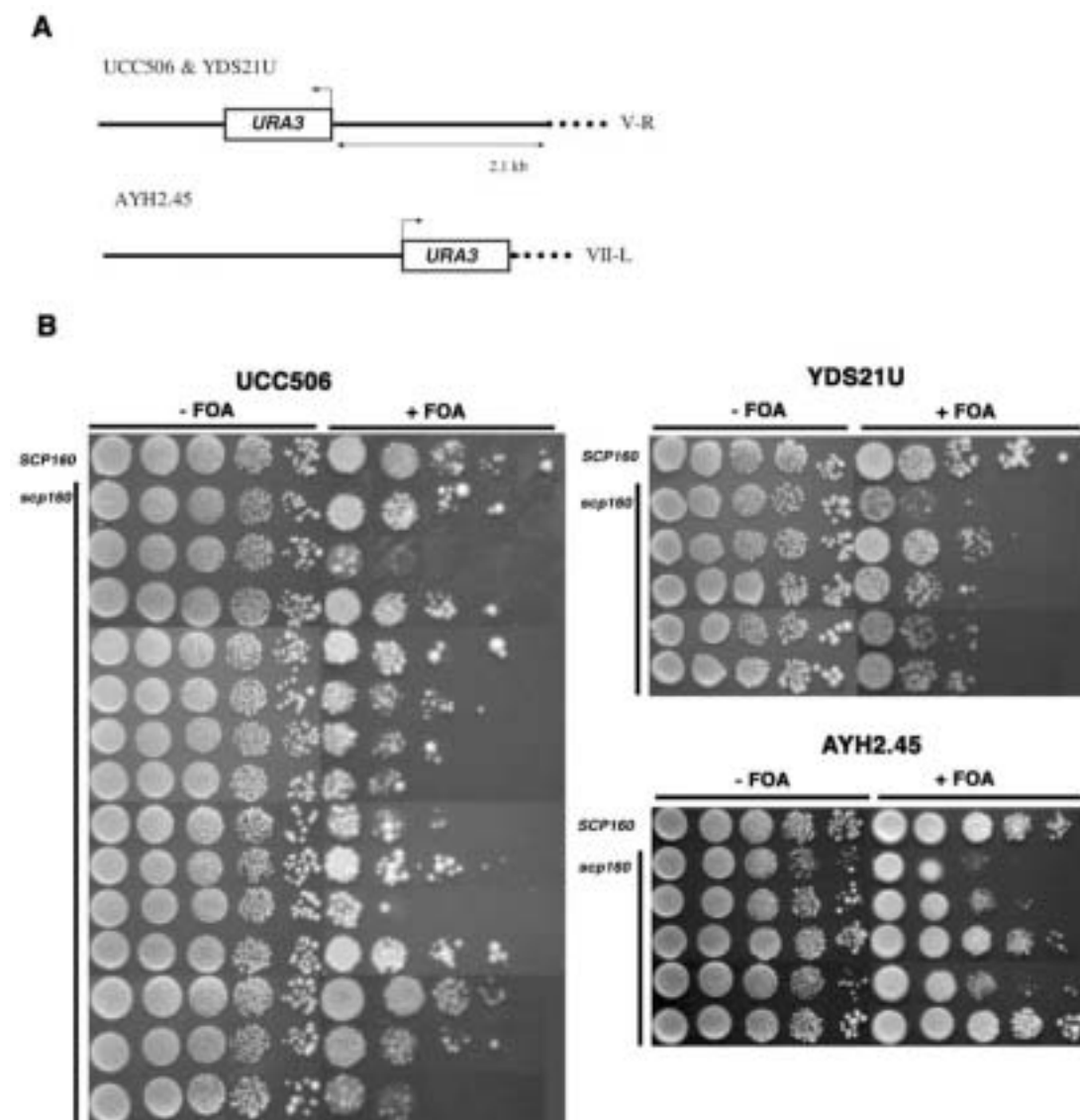
No hem detectat cap diferència de creixement entre les cèl·lules *wild type* i les cèl·lules mutants a temperatures baixes (17°C i 14°C).

### **3.- Les cèl·lules *scp160* manifesten una desrepressió dels marcadors situats en regions telomèriques i en el locus del mating type.**

En experiments realitzats al nostre laboratori la proteïna DDP1 de *Drosophila melanogaster* s'ha trobat associada estructuralment i funcionalment a regions heterocromàtiques d'aquest organisme (vegeu l'apartat 1.2.3 de la Introducció). Aquestes troballes suggereixen una implicació de les vigilines en l'estructuració de les regions heterocromàtiques. Per testar aquesta possibilitat hem examinat l'efecte de la deleció del gen *SCP160* en el silenciament gènic ocasionat per la formació de regions heterocromàtiques en diferents *loci* del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Amb aquesta finalitat vàrem realitzar la deleció del gen *SCP160* en diferents soques que porten gens marcadors integrats en les diferents regions del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* on hi ha seqüències heterocromàtiques.

Primerament hem estudiat la implicació de la proteïna Scp160 en l'estructuració de l'heterocromatina telomèrica realitzant la deleció d'aquest gen en les soques UCC506, YDS21U i AYH2.45, que porten el marcador *URA3* inserit en les regions telomèriques, obtenint les soques *scp160* derivades YXM3, YXM4 i YXM5 respectivament (vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes). En les soques UCC506 i YDS21U el marcador *URA3* està situat a 2,1 Kb de les repeticions telomèriques del telòmer V-R, ambdues soques s'han generat en fons genètics diferents a partir d'una mateixa construcció plasmídica (Renauld *et al.* 1993; Rundlett *et al.* 1996). La soca AYH2.45 conté el marcador *URA3* immediatament adjacent a les repeticions telomèriques en el telòmer VII-L (figura R.7A). Hem monitoritzat l'expressió del gen *URA3* inserit en aquestes regions plaquejant aquestes soques en plaques de medi mínim que contenen FOA que, tal com ja s'ha explicat anteriorment, impedeix el creixement de les cèl·lules que expressen el gen *URA3*, de manera que en les plaques de FOA només poden créixer aquelles cèl·lules on l'expressió del gen *URA3* està silenciada per la formació de regions heterocromàtiques. Per comparar la capacitat de creixement de les cèl·lules *scp160* amb les cèl·lules *wild type* hem plaquejat dilucions seriades de cultius en creixement exponencial en plaques de medi mínim amb i sense FOA. Com es pot veure en la

figura R.7 en els cultius de cèl·lules *scp160* hi ha una menor proporció les cèl·lules capaces de créixer en FOA (FOA<sup>R</sup>), de manera que la deleció del gen *SCP160* es comporta com un supressor de TPE. De la mateixa manera que s'ha observat amb altres fenotips associats a la deleció del gen *SCP160* aquest fenotip es manifesta amb una penetració incompleta, havent-hi clons que es comporten com les cèl·lules *wild type*. El grau de desrepressió que s'observa en les cèl·lules *scp160* en comparació amb el creixement que manifesten les cèl·lules *wild type* oscil·la entre 1 i 3 ordres de magnitud.

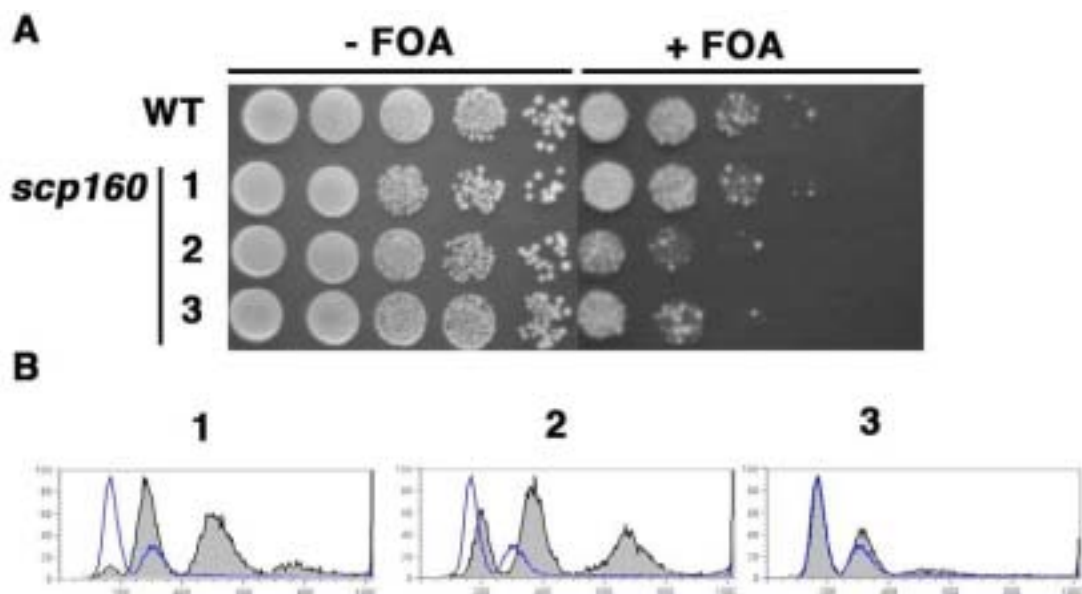


**Figura R.7.-** Efecte de la disruptió del gen *SCP160* sobre el silenciament telomèric. (A) Esquema de les construccions telomèriques presents en les diferents soques utilitzades en aquest estudi, les repeticions telomèriques es representen en aquesta figura mitjançant una línia de punts. (B) Anàlisi del creixement en placa de les diferents soques analitzades mitjançant plaques de medi mínim suplementat amb tots els marcadors auxotròfics amb i sense FOA (vegeu l'apartat 1.2.3 dels Materials i Mètodes).



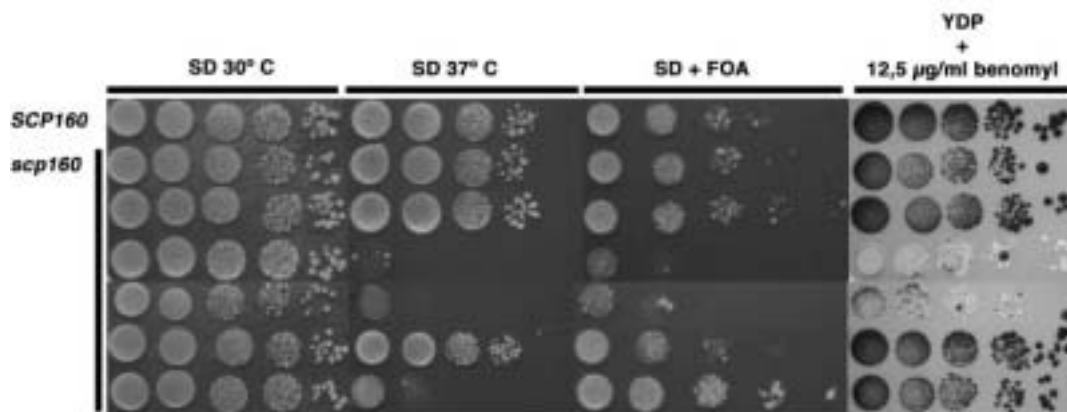
L'efecte de desrepressió de les regions telomèriques s'observa en les tres soques estudiades les quals porten dues construccions diferents en les regions telomèriques (figura R.7A), exclouent la possibilitat que aquest efecte sigui específic d'una construcció concreta i remarcant que es tracta d'un efecte general de la mutació del gen *SCP160* sobre la formació de l'heterocromatina telomèrica. La distància entre els marcadors inserits en aquestes regions i les repeticions telomèriques és un factor clau que determina el grau de silenciament d'aquests marcadors (Renauld *et al.* 1993), tal com es pot observar en la figura R.7 comparant el creixement de les soques *wild type* UCC506 i YDS21U (*URA3* més allunyat del telòmer) amb la soca AYH2.45 (*URA3* més pròxim al telòmer).

En analitzar per FACS les mateixes cèl·lules que s'han plaquejat en els assaigs de TPE no hem pogut observar una correlació evident entre els dos fenotips, si bé la majoria de cèl·lules analitzades presentaven problemes de ploidia. Cal destacar però que, en aquests anàlisis, s'han observat tant cèl·lules que presentaven el fenotip de TPE sense mostrar un increment de ploidia (figura R.8 clon 3), com cèl·lules que presenten increments de ploidia i no mostren cap efecte en el silenciament gènic (figura R.8 clon 1).



**Figura R.8.-** Anàlisi en paral·lel dels fenotips de TPE i ploidia. (A) S'han plaquejat en plaques de medi mínim amb i sense FOA dilucions seriades de cultius en creixement exponencial de les diferents soques analitzades (vegeu l'apartat 1.2.3 dels Materials i Mètodes). (B) Els mateixos cultius de cèl·lules analitzats mitjançant plaques de FOA s'han analitzat per FACS per tal de determinar els nivells de ploidia cel·lular d'aquestes cèl·lules. En gris es representa el FACS obtingut per a les diferents cèl·lules *scp160* analitzades i en blau es mostra en cadascun dels histogrames el contorn corresponent al FACS de la cèl·lula *wild type*.

Hem analitzat en paral·lel les cèl·lules *scp160* per als fenotips de TPE, *ts*, i hipersensibilitat al benomyl (figura R.9) observant que, si bé no es pot establir una correlació perfecte, hi ha una elevada correlació entre els diferents fenotips. Aquelles cèl·lules que manifesten una de les alteracions descrites tenen tendència a manifestar la resta dels fenotips estudiats.

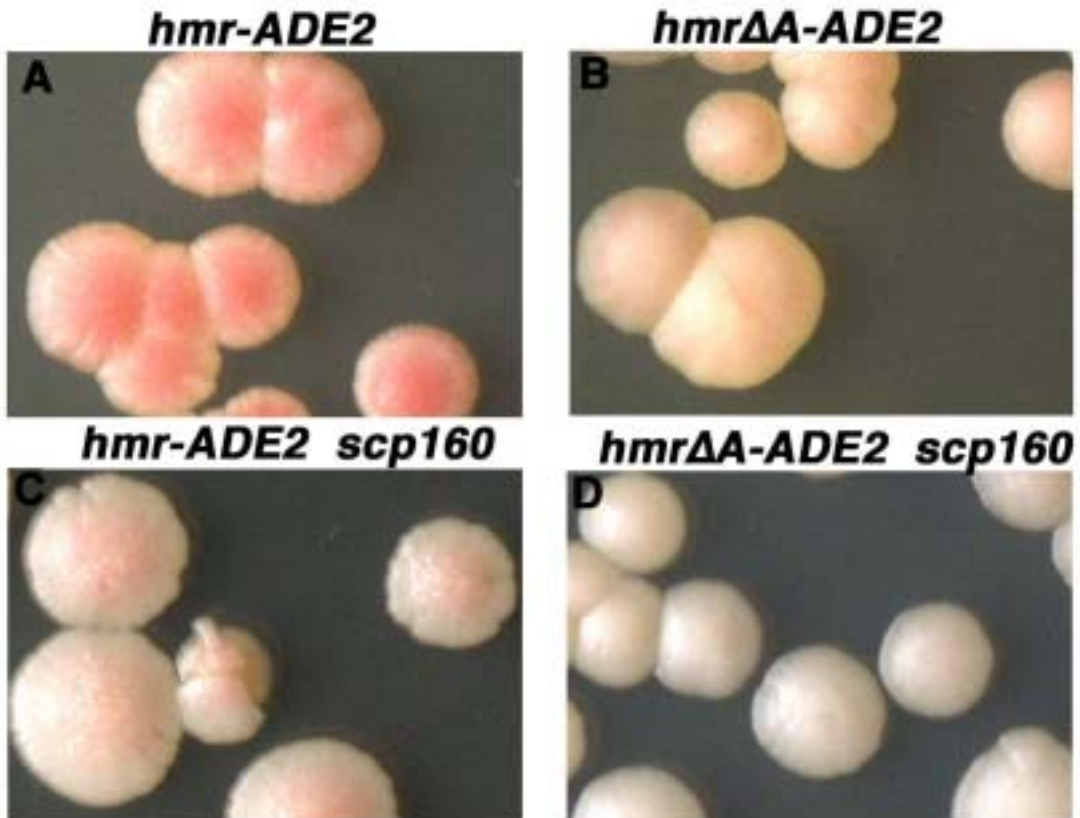


**Figura R.9.-** Anàlisi en paral·lel de la presentació dels fenotips de TPE, *ts* i hipersensibilitat al benomyl observada en els mutants *scp160* obtinguts a partir de la soca UCC506 (soca YXM3, vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes.). S'han plaquejat dilucions seriadades de cultius en creixement exponencial en les diferents plaques utilitzades per aquest estudi (vegeu l'apartat 1.2.3 dels Materials i Mètodes).

Hem estudiat l'efecte de la deleció del gen *SCP160* sobre el silenciament gènic en el *locus* del *mating type* utilitzant les soques YLS409 i YLP19, que contenen el marcador *ADE2* inserit en el *locus HMR*, obtenint les soques *scp160* derivades YXM6 i YXM7 (vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes). El gen *ADE2* codifica per l'enzim fosforibosilaminoimidazole carboxilasa implicat en la via de síntesi *de novo* de les purines, la manca d'expressió d'aquest gen provoca que les cèl·lules crescudes en un medi pobre en adenina adquireixin una coloració vermella com a resultat de l'acumulació dels precursors de la biosíntesi de l'adenina en les vacuoles de la cèl·lula (Fischer 1969). Aquesta característica permet seguir l'expressió del gen *ADE2* plaquejant les cèl·lules en plaques que no han estat suplementades amb adenina. En aquestes plaques les cèl·lules que expressen el gen *ADE2* donen lloc a una coloració blanquinosa mentre que les cèl·lules on el gen *ADE2* està silenciada donen lloc a una coloració vermella.

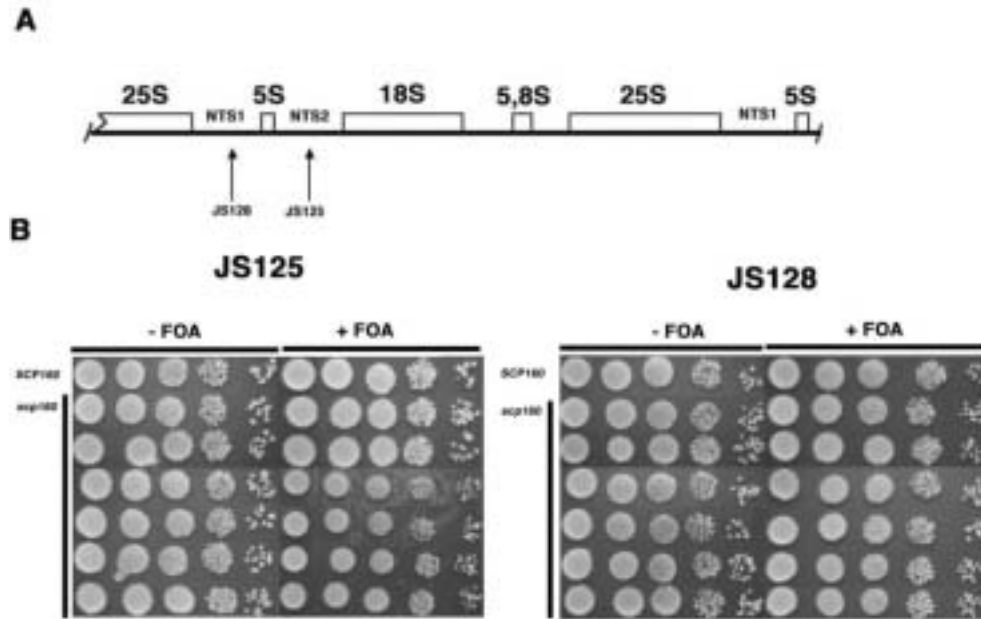
La soca YLP19 conté una mutació en la seqüència d'unió del complex ORC en l'element silenciador *HMR-E* (*hmrΔA-ADE2*) (Sussel *et al.* 1993; Pemberton and Blobel 1997) fet que provoca que presenti un menor grau de silenciament del

marcador *ADE2* en comparació amb el grau de silenciament mostrat en la soca YLS409 (*hmr-ADE2*) (figura R.10; comparar A amb B). Les cèl·lules *scp160* derivades d'aquestes dues soques mostren una disminució de la coloració vermella indicant que, tal com s'ha observat en les seqüències telomèriques, la deleció del gen *SCP160* es comporta com un supressor del silenciament en el *locus* del *mating type* (figura R.10; comparar A amb C i B amb D).



**Figura R.10.-** Imatge detallada de colònies de les soques YLS409 (*hmr-ADE2*) (A) i YLP19 (*hmrΔA-ADE2*) (B) i de les seves derivades *scp160* YXM6 (C) i YXM7 (D) respectivament..

Finalment per l'estudi de l'efecte de la deleció del gen *SCP160* sobre el silenciament en les regions del rDNA hem utilitzat les soques JS125 i JS128, que contenen el marcador *URA3* inserit en diferents regions del *locus* del rDNA (figura R.11A), obtenint les soques *scp160* derivades YXM8 i YXM9 (vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes). Hem analitzat la capacitat de silenciar aquests marcadors que presenten les diferents soques estudiades plaquejant aquestes cèl·lules en plaques de FOA (figura R.11) observant-se que la deleció del gen *SCP160* no té cap efecte sobre els nivell de silenciament dels gens situats en la regió del rDNA.



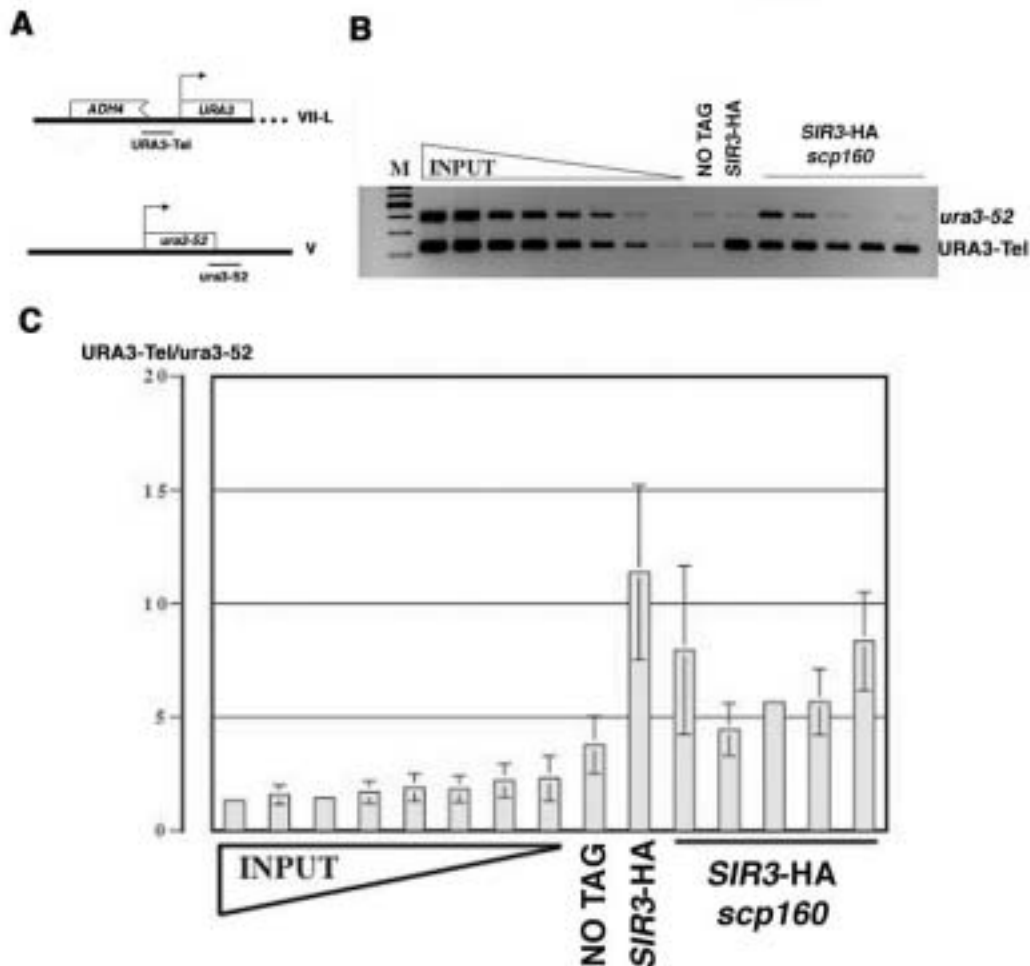
**Figura R.11.-** (A) Esquema del locus del rDNA on es mostren els llocs on està inserit el marcador *URA3* en les dues soques utilitzades en aquest estudi. (B) Anàlisi del creixement en placa de les diferents soques en plaques de medi mínim suplementat amb tots els marcadors auxotròfics corresponents amb i sense FOA (vegeu l'apartat 1.2.3 dels Materials i Mètodes).

#### **4.- Les cèl·lules *scp160* presenten un menor enriquiment de Sir3 en les seqüències telomèriques**

El silenciament telomèric a *Saccharomyces cerevisiae* en els *locus* del *mating type* i en les seqüències telomèriques depèn de l'acció de les proteïnes SIR. En especial la proteïna Sir3 juga un paper estructural essencial en l'establiment de les regions heterocromàtiques en les regions telomèriques i en el *locus* del *mating type* (vegeu l'apartat 2.3.1 de la Introducció). Per això ens vàrem plantejar analitzar mitjançant assaigs d'immunoprecipitació de cromatina (*Chromatin immunoprecipitation*, CHIP; vegeu l'apartat 4.3 dels Materials i Mètodes) la presència de la proteïna Sir3 en les regions telomèriques de les soques *scp160*. L'Extracte Cel·lular Total de cèl·lules fixades amb formaldehid de la soca AYH2.45 i els seus derivats *scp160* (Soca YXM5), que contenen la proteïna Sir3 fusionada al epítot HA (vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes), s'ha immunoprecipitat amb l'anticòs contra l'epítot HA. Per tal de determinar la presència d'aquesta proteïna en les regions telomèriques s'han analitzat els immunoprecipitats obtinguts mitjançant PCR amb els oligonucleòtids U3T-UP5 i U3T-LO3 (vegeu l'apartat 2.4 dels Materials i Mètodes) que amplifiquen específicament la còpia del gen *URA3* que presenten aquestes soques en el telòmer VII-L (figura R.12A, fragment URA3-Tel). Com a seqüència control en aquesta anàlisi s'han utilitzat els oligonucleòtids URA3-U1 i URA3-L1 (vegeu l'apartat 2.4 dels Materials Mètodes) que amplifiquen específicament el *locus* genòmic del gen *URA3* en el cromosoma V (figura R.12A, fragment *ura3-52*). Les reaccions de PCR s'han realitzat com a PCR *multiplex* de manera que els dos fragments de DNA analitzats s'amplifiquen en una sola reacció de PCR per cadascuna de les mostres estudiades. Les bandes obtingudes en analitzar les reaccions de PCR mitjançant un gel d'agarosa del 2% han estat quantificades utilitzant un aparell de captació i anàlisi d'imatges (Fluor-S MultiImager, Bio-Rad).

En aquests assaigs hem pogut observar una disminució significativa de la presència de la proteïna Sir3 en les regions telomèriques de les soques mutants (figura R.12). L'abundància relativa de les seqüències telomèriques en els immunoprecipitats obtinguts a partir de les soques mutants està disminuïda en comparació a l'observada en les cèl·lules *wild type*. Els diferents clons *scp160* analitzats mostren de mitjana en

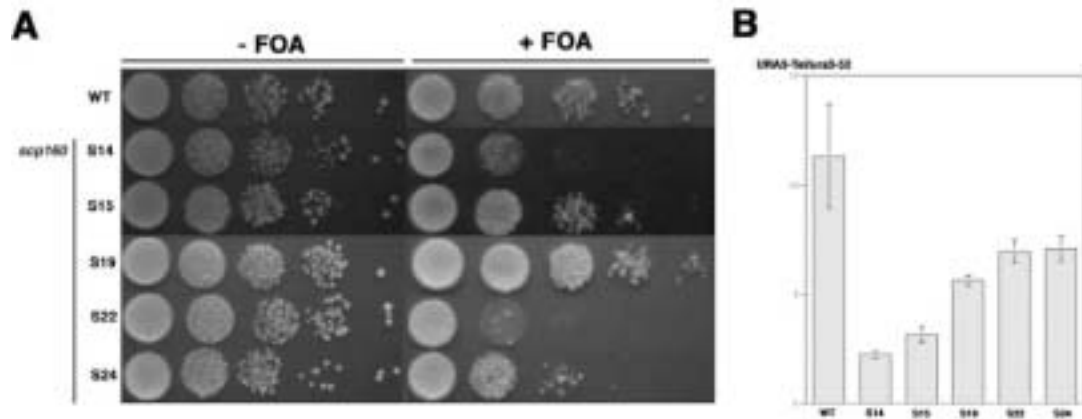
els tres experiments realitzats una disminució en els nivells de l'ocupació de la proteïna Sir3 en les regions telomèriques, si bé hi ha clons que mostren una elevada variabilitat entre els diferents experiments realitzats.



**Figura R.12.-** Anàlisi mitjançant CHIP de la presència de la proteïna Sir3 en les regions telomèriques. (A). Esquema de la localització relativa dels fragments URA3-Tel i ura3-52 utilitzats per l'anàlisi per PCR dels immunoprecipitats (B) PCR multiplex realitzada a partir dels Extractes Totals (INPUT) i dels precipitats realitzats en les diferents soques: AYH2.16 (No Tag), AYH2.45 (Sir3-HA) i YXM4 (*scp160* derivats de AYH2.45). (C) Quantificació de l'abundància relativa de les seqüències telomèriques en les diferents mostres analitzades per PCR. Els resultats presentats estan basats en tres immunoprecipitacions independents mesurades per dues reaccions de PCR independents en cada cas (es mostra la desviació estàndard a la figura).

Aquests resultats suggereixen fortament que el defecte de silenciament que presenten les soques *scp160* pot ser degut a problemes en els nivells de Sir3 presents en les regions telomèriques. En un dels experiments de CHIP realitzats hem analitzat en paral·lel el grau de silenciament en plaques de FOA que presenten aquestes mateixes soques, no havent observat cap relació directa aparent entre el grau de silenciament i els nivells de Sir3 observats en els telòmers mitjançant CHIP (figura R.13). Convé destacar, no obstant, que en aquesta anàlisi, malgrat que totes les cèl·lules *scp160*

mostren per CHIP una disminució en els nivells de Sir3 presents en les regions telomèriques, el senyal de Sir3 no es perd en cap dels casos de manera completa, podent-se explicar el silenciament observat com a resultat de la presència de nivells subòptims de Sir3 en el telòmer.



**Figura R.13.-** Anàlisi en paral·lel dels nivells de silenciament observats en plaques de FOA en la soca AYH2.45 i en els derivats *scp160* (YXM5) (**A**) i els nivells d'enriquiment de Sir3 en les regions telomèriques d'aquestes mateixes soques (**B**). Les barres d'error mostrades es corresponen a la variabilitat observada en les diferents PCRs realitzades a partir d'un mateix immunoprecipitat.





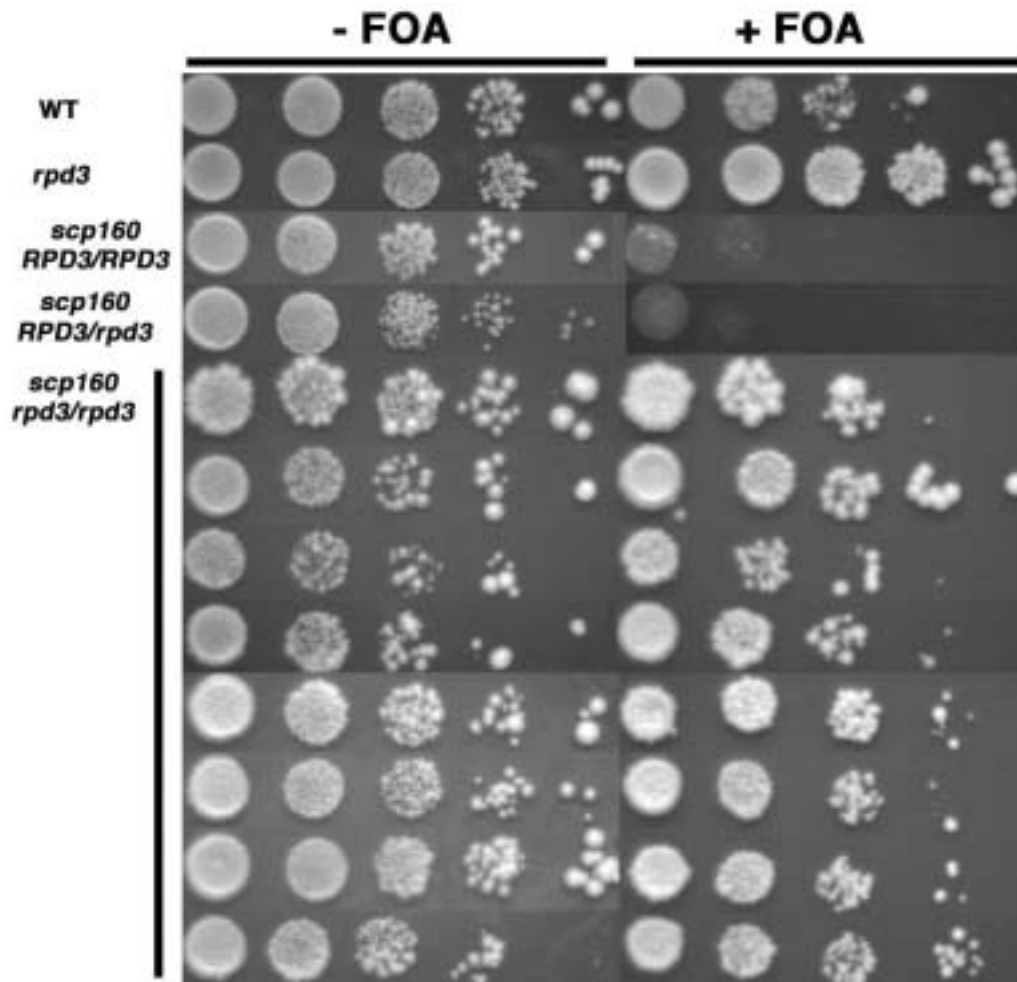
## **5.-Efectes que reforcen el silenciament telomèric són capaços de recuperar el defecte de silenciament ocasionat per la manca del gen *SCP160***

Entre les diferents hipòtesis postulades sobre les funcions que realitzen les vigilines s'ha proposat que aquestes estan implicades en la regulació de la síntesi protèica de forma general a la cèl·lula (vegeu l'apartat 1.2.2 de la Introducció). Aquesta hipòtesi permetria explicar els fenòmens observats en diferents processos cel·lulars de les cèl·lules *scp160* com a efectes pleiotròpics inespecífics ocasionats per defectes en la síntesi protèica general de la cèl·lula en els mutants *scp160*. Per tal d'estudiar si el defecte de silenciament produït per la deleció del gen *SCP160* és deguda a aquest fenomen i per aprofundir en la relació entre el defecte de TPE de les cèl·lules *scp160* i la manca de Sir3 a les regions telomèriques ens vàrem plantejar estudiar com s'afecta el silenciament telomèric de les soques *scp160* per l'efecte de dos processos que reforcen el silenciament en les regions telomèriques: la deleció del gen *RPD3* i la sobreexpressió de la proteïna Sir3.

### **5.1.- La mutació del gen *RPD3* és capaç de recuperar el defecte de TPE ocasionat per la manca del gen *SCP160***

L'observació que les regions de DNA silenciats presents en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* presenten histones hipoacetilades suposa una implicació directa de les desacetilases d'histona (HDACs) i les acetiltransferases d'histones (HATs) en la regulació del silenciament (Braunstein *et al.* 1993; Braunstein *et al.* 1996). La mutació de la histona desacetilasa Rpd3 i d'altres proteïnes associades en el complex Rpd3-Sin3 afecta al silenciament en tots els *locus* silenciats del llevat (De Rubertis *et al.* 1996; Rundlett *et al.* 1996; Vannier *et al.* 1996; Sun and Hampsey 1999). Contràriament al que podria esperar-se, la funció de Rpd3 en lloc d'estar implicada en l'establiment o manteniment del silenciament està implicada en disrompre'l, donant lloc a què la mutació del gen *RPD3* es comporti com un *enhancer* de TPE; els mutants *rpd3* presenten un major grau de silenciament en les regions heterocromàtiques (figura R.14, *rpd3*) (Rundlett *et al.* 1996) indicant que l'efecte realitzat per la proteïna Rpd3 és disminuir el grau d'heterocromatització.

Aquest efecte també s'observa a *Drosophila* on mutants de *RPD3* es comporten com a *enhancers* de PEV, indicant una possible conservació de la funció de *Rpd3* en contrarestar el silenciament (De Rubertis *et al.* 1996).



**Figura R.14.-** Anàlisi mitjançant plaques de FOA dels nivells de silenciament de les soques *rpd3* generades a partir de les cèl·lules *scp160*. S'ha disromput el gen *RPD3* en la soca *wild type* UCC506, obtenint-se la soca *rpd3* YXM10, i en les soques *scp160* derivats de la soca UCC506 (soca YXM3). En aquestes soques s'han hagut de realitzar dues disrupcions successives del gen *RPD3* fins a obtenir una cèl·lula que no conté cap còpia del gen *RPD3* (soques YXM11 i YXM12 respectivament). Les diferents cèl·lules obtingudes s'han assajat mitjançant anàlisi de creixement en plaques de medi mínim que contenen FOA per a determinar el grau de silenciament que presenten (vegeu l'apartat 1.2.3 dels Materials i Mètodes). A l'esquerra de la figura es representen els genotips rellevants de les diferents soques analitzades.

Per tal de comprovar quin és l'efecte de la mutació de *RPD3* sobre el silenciament telomèric en un fons *scp160* hem realitzat la disrupció del gen *RPD3* en soques *scp160* derivades de la soca UCC506 (Soca YXM3) (vegeu l'apartat 1.7.1 dels Materials i Mètodes). Donat el fenotip de ploidia present en aquestes soques ens vàrem trobar amb la necessitat de realitzar una doble disrupció del gen *RPD3*, ja que

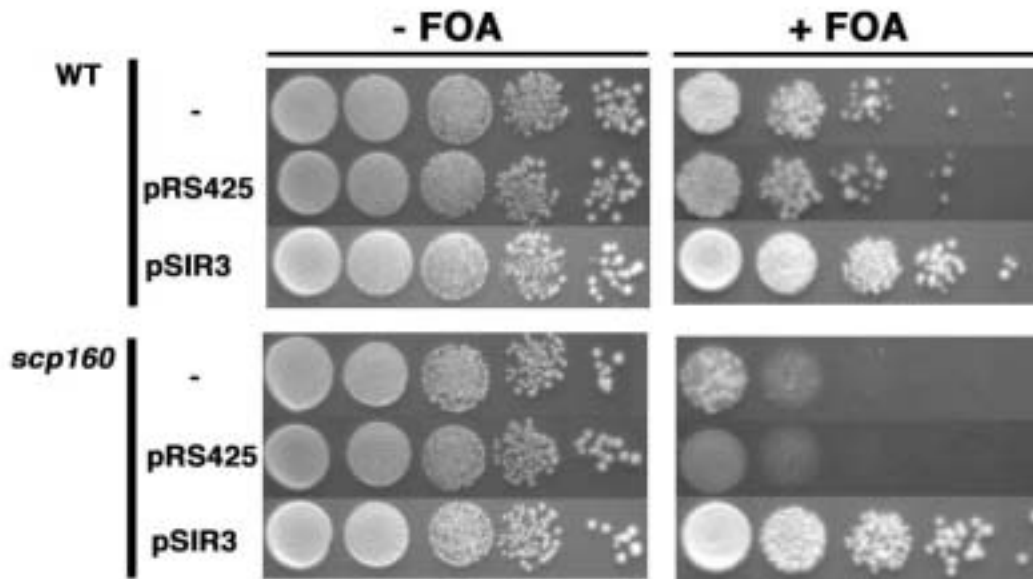
en soques on s'havia disromput una còpia del gen *RPD3* (YXM11) encara presentaven una còpia addicional del gen *RPD3 wild type*. La disrupció en les cèl·lules *scp160* de només una de les còpies del gen *RPD3* presents no dona lloc a cap efecte sobre el TPE (figura R.14, *scp160 RPD3/rpd3*), però en disrompre totes dues còpies del gen *RPD3* presents es recupera la capacitat de les cèl·lules *scp160* de créixer en plaques de FOA indicant que aquestes cèl·lules han recuperat la capacitat de silenciar els gens marcadors presents en les regions telomèriques (figura R.14, *scp160 rpd3/rpd3*). Aquest efecte demostra que el defecte de silenciament generat en les seqüències telomèriques per la manca de Scp160 és un efecte específic recuperable per d'altres mutacions que afecten les seqüències telomèriques. En el procés d'establiment del silenciament telomèric *RPD3* actua *downstream* de *SCP160*.

## **5.2.- La sobreexpressió de Sir3 és capaç de recuperar el defecte de silenciament ocasionat per la manca del gen *SCP160***

Tal com ja s'ha comentat amb anterioritat, Sir3 és un component estructural essencial de l'heterocromatina en el llevat *Saccharomyces cerevisiae* en les regions telomèriques i en el *locus* del *mating type*. En cèl·lules *wild type* Sir3 es detecta en les regions telomèriques i subtelomèriques fins a una distància d'entre 2 a 4 Kb de l'extrem del telòmer (Renauld *et al.* 1993). La sobreexpressió de Sir3 dona lloc a l'extensió de les regions ocupades per Sir3 detectant-se la presència d'aquesta proteïna en regions que disten fins a 17,5 Kb de l'extrem del telòmer (Hecht *et al.* 1996), fet que correlaciona amb una extensió del silenciament ocasionat per la presència d'heterocromatina en aquestes regions.

Els resultats obtinguts amb els CHiPs per tal de detectar Sir3 en les regions telomèriques de les soques *scp160* suggereixen fortament que la manca de Sir3 en el telòmer podria ser la causa principal del defecte de silenciament observat. A la vegada, els resultats de la deleció de *RPD3* donen peu a pensar que la sola alteració de components implicats en l'estructuració del telòmer són suficients per recuperar el defecte de silenciament observat en les cèl·lules *scp160*. Per tal de corroborar aquestes dues hipòtesis vàrem sobreexpressar Sir3 en cèl·lules *scp160* que

manifestaven defectes de TPE. Es varen transformar aquestes cèl·lules amb el plasmidi pSIR3 que conté l'ORF de *SIR3* utilitzant, com a control en aquest experiment, el plasmidi pRS425 que no conté cap ORF clonada (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes). Ambdós són plasmidis episomals donant lloc a alts nivells d'expressió dels gens que contenen clonats (*SIR3* en el cas del plasmidi pSIR3).



**Figura R.15.-** Efecte sobre el silenciament de la sobreexpressió de Sir3 en cèl·lules *scp160*. Les cèl·lules obtingudes a partir de la transformació de les soques UCC506 (*wild type*) o YXM3 (*scp160*) amb els plasmidis pRS425 (control) o pSIR3, s'han analitzat mitjançant plaques de medi mínim que contenen FOA per tal de determinar els nivells de silenciament (vegeu l'apartat 1.2.3 dels Materials i Mètodes).

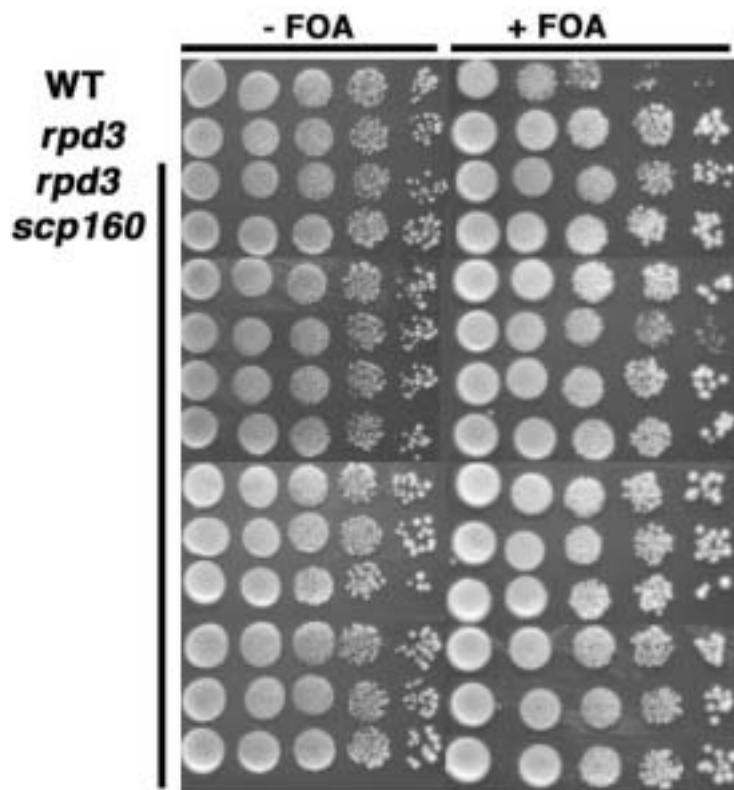
Tal com es pot observar en la figura R.15 la sobreexpressió de la proteïna Sir3 és capaç de recuperar el defecte de silenciament que presenten les cèl·lules *scp160* obtenint-se, en les cèl·lules mutants que sobreexpressen Sir3 (*scp160* pSIR3), uns nivells de repressió dels marcadors inserits en les regions telomèriques comparables als nivells que s'obtenen en les cèl·lules *wild type* que sobreexpressen Sir3 (WT pSIR3). D'altra banda no s'observa cap efecte sobre el nivell de silenciament en presència del plasmidi control pRS425 ni en cèl·lules *wild type* (WT pRS425) ni en cèl·lules *scp160* (*scp160* pRS425).

## **6.- Telòmers amb “enhanced TPE” presenten una major dificultat en l'establiment dels fenotips associats a la deleció del gen *SCP160***

Per tal d'aprofundir en l'estudi de la funció de *Scp160* en la formació de l'heterocromatina telomèrica ens vàrem plantejar l'estudi de com es manifesten els fenotips associats a la deleció del gen *SCP160* en diferents fons genètics que tenen afectades les propietats de l'heterocromatina telomèrica.

### **6.1.- Les cèl·lules *rpd3* no manifesten defectes de TPE en deleccionar el gen *SCP160* i estableixen amb una major dificultat el fenotip de ploidia observat en les cèl·lules *scp160***

Hem analitzat com s'estableixen els fenotips de ploidia aberrant i TPE en deleccionar el gen *SCP160* sobre cèl·lules *rpd3*. Mitjançant tècniques de manipulació gènica hem realitzat la deleció del gen *SCP160* sobre cèl·lules *wild type* de la soca UCC506 i sobre cèl·lules *rpd3* de la soca YXM10 (derivada a partir de la soca UCC506; vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes). Els diferents clons obtinguts s'han crescut, just després d'aïllar-los en la placa de selecció, en cultius líquids de medi YPD durant aproximadament 80 generacions; s'han pres diferents mostres a les 10, 40, i 80 generacions que han estat analitzades mitjançant FACS per determinar els nivells de ploidia cel·lular i mitjançant plaques de FOA per determinar els nivells de silenciament que presentaven aquestes soques. En aquest experiment s'han analitzat 12 clons *rpd3 scp160* independents obtinguts a partir de la soca YXM10 (soques XYM13); aquestes cèl·lules no manifesten cap canvi en els nivells de silenciament del marcador *URA3* inserit en les regions telomèriques (figura R.16). En cap de les diferents mostres preses s'han detectat canvis en els nivells de silenciament dels dobles mutants *rpd3 scp160* en comparació amb els nivells que presenta la soca *rpd3*.



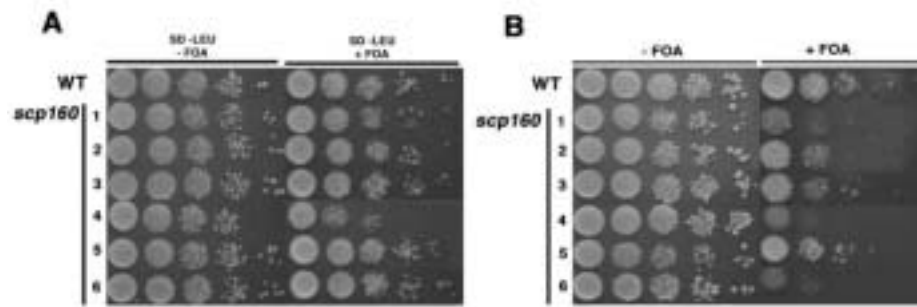
**Figura R.16.-** Anàlisi mitjançant plaques de FOA de l'establiment en un fons *rpd3* del fenotip de TPE en les cèl·lules *scp160*. S'han plaquejat en plaques de medi mínim amb i sense FOA les diferents soques generades a partir de la soca *wild type* UCC506, la soca YXM10 (*rpd3*), i els derivats *scp160* d'aquesta (soques YXM13) (vegeu l'Apartat 1.2.3 dels Materials i Mètodes). A l'esquerra de la figura es representen els genotips rellevants de les diferents soques analitzades.

Les cèl·lules analitzades per FACS mostren que en les cèl·lules *rpd3* el fenotip de ploidia aberrant observat en deleccionar el gen *SCP160* s'estableix amb una major dificultat. Mentre que les cèl·lules *scp160* derivades de la soca UCC506 (soques YXM3) manifesten en un majoria dels casos problemes en el nivell de ploidia cel·lular (64% dels clons analitzats al inici de l'experiment i 86% al cap de 80 generacions), les cèl·lules *rpd3 scp160* derivades de la soca YXM10 (soques YXM13) només presenten problemes de ploidia en un 8% dels casos estudiats l'inici de l'experiment, valor que s'incrementa fins al 33% dels casos al cap de 80 generacions.

## **6.2.- En cèl·lules que sobreexpressen Sir3 la deleció de SCP160 no té cap efecte significatiu sobre el silenciament telomèric**

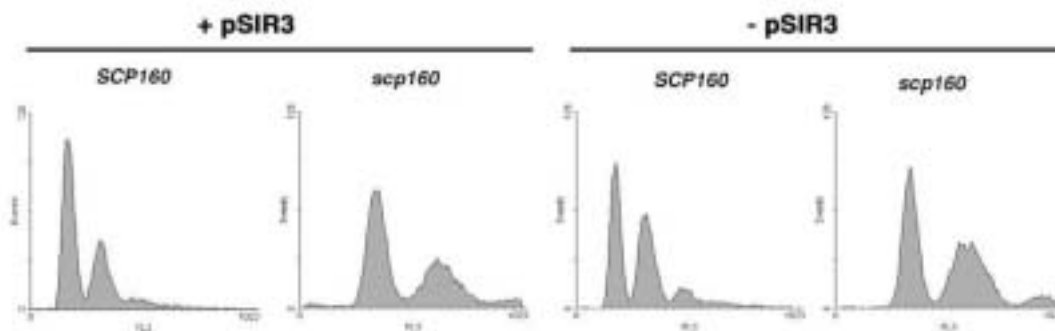
La disminució significativa de la concentració de Sir3 al telòmer en els mutants *scp160*, així com la recuperació de la manca de silenciament telomèric en aquestes cèl·lules mitjançant la sobreexpressió de Sir3 suggereixen fortament que el defecte de silenciament observat en les cèl·lules *scp160* és degut a una disminució en la deposició de Sir3 en les regions telomèriques. Per tal d'aprofundir més en aquest aspecte vàrem realitzar la deleció del gen *SCP160* en cèl·lules de la soca UCC506 que sobreexpressaven Sir3 (cèl·lules transformades amb el plasmidi pSIR3). L'obtenció i manteniment de les cèl·lules mutants s'ha fet en medi selectiu per la presència del plasmidi, posteriorment aquestes mateixes cèl·lules s'han fet créixer en medi YDP i han estat plaquejades en els medis selectius adients per a seleccionar clons que havien perdut el plasmidi pSIR3 i, per tant, la sobreexpressió de Sir3. Els diferents clons obtinguts han estat analitzats mitjançant plaques de FOA per determinar els nivells de silenciament telomèric d'aquestes soques i FACS per determinar els nivells de ploidia cel·lular. En aquest experiment s'han analitzat 6 clons independents.

La majoria de cèl·lules *scp160* obtingudes sobreexpressant Sir3 no mostren cap disminució en els nivells de silenciament respecte als nivells que mostren les cèl·lules *wild type* transformades amb el plasmidi pSIR3 (figura R.17A). Només el clon 4 manifesta una desrepressió significativa (figura 17A, clon 4). Els mateixos clons, però, en perdre el plasmidi pSIR3, mostren majoritàriament un efecte clar de desrepressió dels marcadors situats en les regions telomèriques (figura R.17B). Convé destacar el fet que el clon 4, que manifesta algun efecte de TPE al sobreexpressar Sir3, és el que posteriorment manifesta una major desrepressió dels marcadors telomèrics en perdre el plasmidi de sobreexpressió de Sir3, reflectint el fet que aquesta soca podria tenir compromesa amb un major grau que la resta de clons analitzats la capacitat de deposició de Sir3 en les regions telomèriques.



**Figura R.17.-** Anàlisi mitjançant plaques de FOA dels nivells de silenciament de soques que sobreexpressen Sir3 (A) i dels derivats d'aquestes soques que han perdut el plasmidi pSIR3 (B).

L'anàlisi d'aquestes cèl·lules mitjançant FACS indica que la sobreexpressió de Sir3 no té cap efecte en l'establiment del fenotip de ploidia; totes les cèl·lules *scp160* obtingudes sobreexpressant Sir3 presenten una continguts de DNA més elevats als corresponents a les cèl·lules haploides *wild type*, aquests fenotips no es veuen alterats per la pèrdua del plasmidi pSIR3 (figura R.18).



**Figura R.18.-** Anàlisi mitjançant citometria de flux dels nivells de ploidia de cèl·lules *wild type* transformades amb el plasmidi pSIR3 i d'un derivat *scp160* obtingut a partir d'aquesta soca mantenint la pressió selectiva per a la presència del plasmidi pSIR3 (A) i dels clons derivats d'aquests que han perdut el plasmidi pSIR3 i, per tant, la sobreexpressió de la proteïna Sir3 (B).

### 6.3.- Efecte de la deleció del gen *SCP160* en els fons mutants *rif1*, *rif2* i en el doble mutant *rif1 rif2*

Les proteïnes Rif1 i Rif2 han estat aïllades per la seva capacitat d'interaccionar amb l'extrem C-terminal de Rap1 en assaigs de dos híbrids. La deleció dels gen *RIF1* i *RIF2* dóna lloc a un increment en el silenciament observat en les regions telomèriques. Els mutants *rif1* i *rif2* es comporten com a *enhancers* de TPE havent-se proposat que amb la seva interacció amb l'extrem C-terminal de Rap1 aquestes proteïnes actuarien com un competidor de la unió de Sir3 a Rap1, afectant d'aquesta manera a la deposició de Sir3 als telòmers (Hardy *et al.* 1992; Wotton and Shore

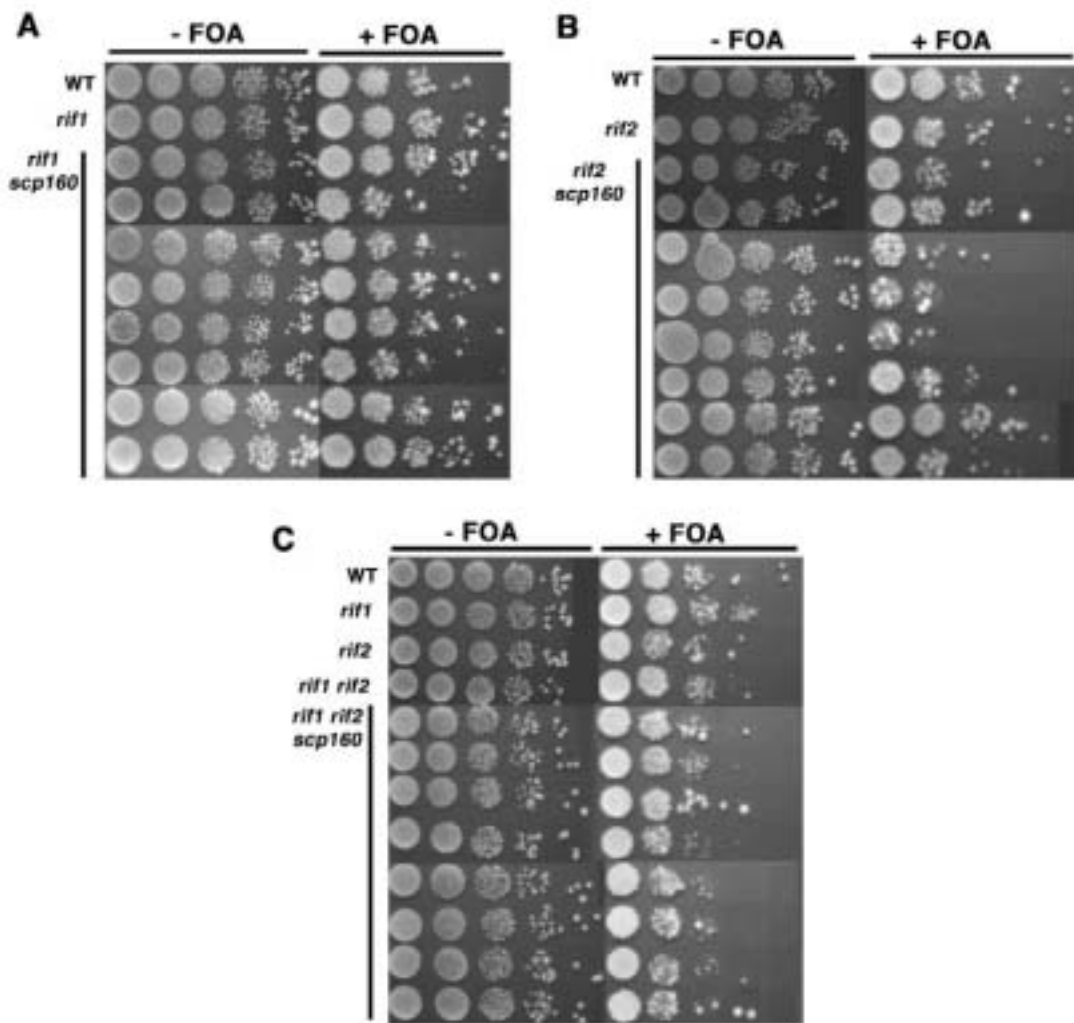


1997). Aquest fet explicaria l'increment de TPE observat en els mutants *rif1* i *rif2* com un increment en la capacitat de Sir3 d'unir-se a les seqüències telomèriques.

Donada l'afectació de la presència de Sir3 en les regions telomèriques en els mutants *scp160* ens vàrem plantejar d'estudiar com es comporten els dobles mutants *rif1 scp160*, *rif2 scp160* i el triple mutant *rif1 rif2 scp160* en relació al silenciament telomèric. Hem realitzat la mutació del gen *SCP160* en les soques YXM14, YXM15 i YXM16 totes elles derivades del la soca UCC506, que contenen respectivament les mutacions *rif1*, *rif2* i la doble mutació *rif1 rif2* obtenint les soques *scp160* derivades YXM17 (*rif1 scp160*), YXM18 (*rif2 scp160*) i YXM19 (*rif1 rif2 scp160*) (vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes). Vàrem analitzar mitjançant plaques de medi mínim amb i sense FOA la capacitat de silenciar els marcadors inserits en les regions telomèriques que presenten aquestes soques analitzant 8 clons *scp160* independents obtinguts en cadascun dels diferents fons genètics analitzats.

En deleccionar *SCP160* en el fons genètic *rif1 rif2*, si bé s'observen diferències en el grau de silenciament, el grau de desrepressió que presenten aquestes cèl·lules és menor que la desrepressió observada en l'establiment del fenotip de TPE en les cèl·lules *wild type*. Les cèl·lules de la soca YXM19 presenten una disminució del silenciament telomèric, observat en l'assaig en plaques de FOA, no major a un ordre de magnitud de diferència amb les cèl·lules originàries (figura R19C); per contra, en les cèl·lules *scp160* generades a partir de la soca UCC506 s'observen disminucions dels nivells de silenciament gènic de fins a tres ordres de magnitud (figura R.7B UCC506).

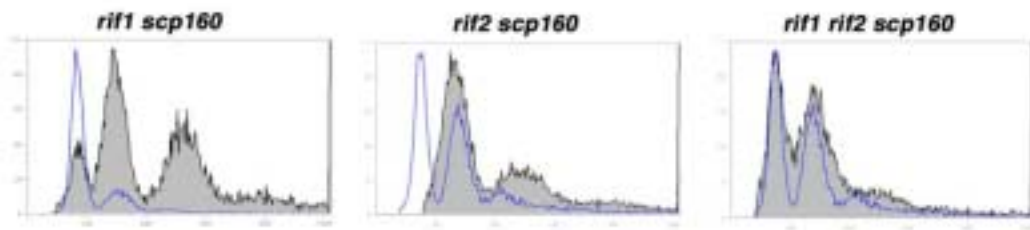
En deleccionar *SCP160* en el fons genètic *rif1* s'observa un efecte similar però menys intens. En aquest cas, en alguns clons s'observen nivells de desrepressió comparables als obtinguts en deleccionar *SCP160* en les cèl·lules *wild type*, si bé la proporció de clons que presenten efectes significatius de desrepressió telomèrica és menor en les cèl·lules obtingudes en el fons genètic *rif1* que en el fons *wild type* (comparar la figura R.19A amb la figura R.7B UCC506).



**Figura R.19.-** Anàlisi mitjançant plaques de FOA de l'establiment del fenotip de TPE en les cèl·lules *scp160* obtingudes a partir de cèl·lules mutants *rif1* (A) *rif2* (B) i *rif1 rif2* (C). Hem plaquejat els diferents clons de cèl·lules generades a partir de la soca UCC506: les soques YXM14 (*rif1*), YXM15 (*rif2*) i YXM16 (*rif1 rif2*) generades directament a partir de la soca UCC506, i les soques YXM17 (*rif1 scp160*) YXM18 (*rif2 scp160*) i YXM19 (*rif1 rif2 scp160*) generades mitjançant disrupció del gen *SCP160* en les soques YXM14, YXM15 i YXM16 respectivament. En la figura es mostren a l'esquerra de cadascuna de les imatges els genotips representatius de les diferents soques plaquejades.

En deletcionar *SCP160* en un fons *rif2* la majoria de cèl·lules presenten en major o menor grau un efecte de pèrdua de silenciament comparable a l'efecte observat en les cèl·lules *wild type* (comparar la figura R.19B amb la figura R.7B UCC506)

En analitzar mitjançant FACS aquestes cèl·lules per comprovar com s'estableix el fenotip de ploidia hem observat que les cèl·lules *scp160* obtingudes en el fons *rif1 rif2* no manifesten nivells de ploidia aberrant, fet que sí que s'observa en els fons *rif1* o *rif2* sols (figura R.20).



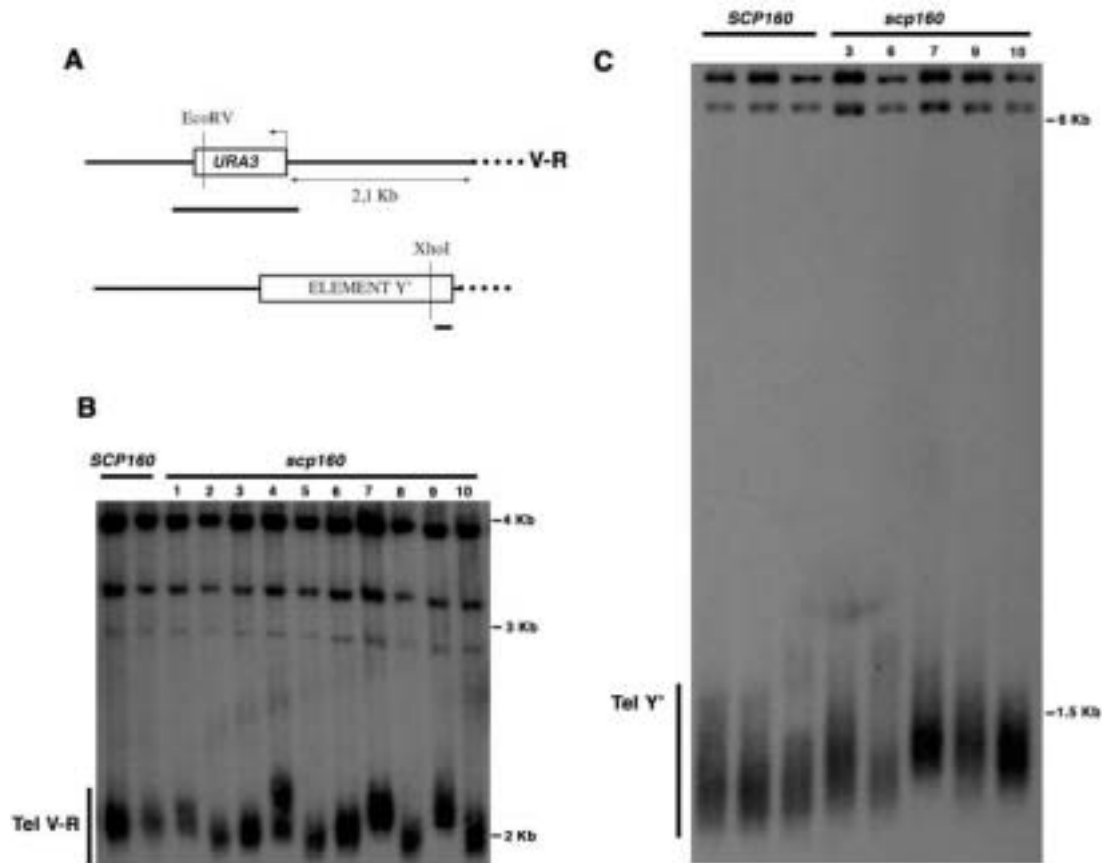
**Figura R.20.-** Anàlisi per FACS de les cèl·lules *scp160* derivades en els fons *rif1*, *rif2* i *rif1 rif2*. En gris es mostren els histogrames dels nivells de fluorescència per cèl·lula obtinguts mitjançant FACS en cadascuna de les soques analitzades i en blau es mostra el contorn dels nivells de ploidia observats en una cèl·lula *wild type* analitzada en el mateix experiment.



## **7.- Les cèl·lules *scp160* presenten una desregulació de la llargada de les seqüències telomèriques**

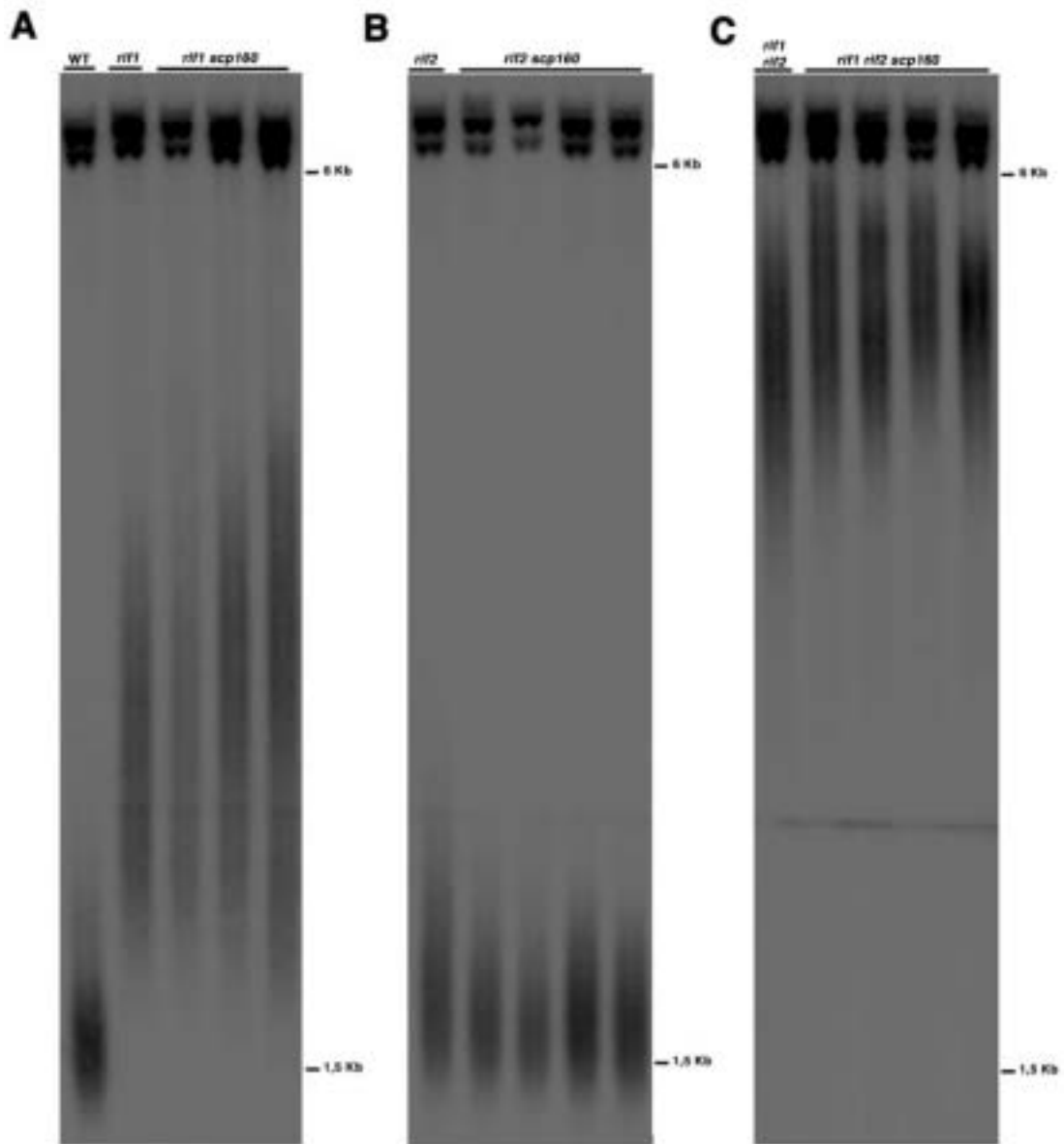
Els telòmers de *Saccharomyces cerevisiae* contenen aproximadament  $350 \pm 75$  pb de la repetició  $TG_{1-3}/C_{1-3}A$  (Shampay *et al.* 1984). Algunes de les mutacions que afecten el silenciament en les regions telomèriques també afecten la longitud de les regions telomèriques (Greider 1996; Zakian 1996; Lowell and Pillus 1998). Per això ens vàrem plantejar mesurar la llargada de les regions telomèriques en les soques *scp160*. Hem mesurat la llargada dels telòmers mitjançant *Southern blot* utilitzant com a sonda les seqüències del gen *URA3* per tal de veure la llargada del telòmers V-R en aquelles soques que porten aquest marcador inserit en aquest telòmer (UCC506, YDS21U i els derivats *scp160* corresponents, YXM3 i YXM4) i les seqüències de l'element Y' present en dos terços dels telòmers de llevat aproximadament (vegeu l'apartat 2.4 de la Introducció). Tal com es pot apreciar a la figura R.21 la deleció del gen *SCP160* provoca una desregulació en la llargada de les regions telomèriques malgrat que aquest fenotip, com els altres fenotips associats a la mutació *scp160*, mostra una certa variabilitat en diferents experiments realitzats. Hem estudiat en total la longitud telomèrica de 27 clons diferents, 13 dels quals mostraven clarament alteracions en la llargada de les seqüències telomèriques. Aquells clons que mostren algun efecte majoritàriament presenten longituds telomèriques més llargues que les corresponents als telòmers de les soques *wild type*, tot i que també hi ha algun clon individual que presenta longituds telomèriques més curtes.

L'efecte de desregulació de la longitud telomèrica s'observa tant en el telòmer V-R de les soques YXM3 i YXM4 sobre el que s'ha comprovat els efectes de desrepressió de les regions telomèriques, com en les seqüències Y' presents en un gran nombre dels telòmers de llevat indicant que aquest fenomen afecta de forma general tots els telòmers del llevat i no és específic d'un telòmer concret. No s'ha vist cap relació evident entre l'afectació de la llargada de les seqüències telomèriques i el grau de silenciament que aquestes soques mostren en plaques de FOA.



**Figura R.21.-** Efecte de la disrupció del gen *SCP160* en la llargada de les seqüències telomèriques. (A) Esquema de les regions genòmiques i les sondes (línia gruixuda) utilitzades per mesurar la llargada dels telòmers. Es representen les dianes utilitzades en el *Southern blocs* realitzats. (B) *Southern blot* realitzat digerint el DNA genòmic de llevat amb l'enzim *EcoRV* i hibridat amb la sonda de la seqüència del gen *URA3* (vegeu l'apartat 2.3.2 dels Materials i Mètodes) per a determinar la llargada de les regions telomèriques presents en el telòmer V-R de les soques UCC506 (*SCP160*) i YXM3 (*scp160*) (vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes). (C) *Southern blot* realitzat digerint el DNA genòmic de llevat amb l'enzim *XhoI* i hibridat amb la sonda obtinguda a partir de les seqüències de l'Element Y' (vegeu l'apartat 2.3.2 dels Materials i Mètodes).

Hem analitzat l'efecte de la disrupció del gen *SCP160* en els fons mutants per al gen *RIF1*, el gen *RIF2* i en el doble mutant per als gens *RIF1* i *RIF2* (vegeu l'apartat 6.3 dels Resultats i Discussió). Les proteïnes Rif són proteïnes telomèriques que estan implicades en l'establiment del silenciament telomèric i en el manteniment de la llargada dels telòmers, essent els telòmers de les cèl·lules mutants més llargs que en les cèl·lules *wild type* (Wotton and Shore 1997). En la figura R.22 es pot observar que la manca de la proteïna Scp160 també provoca variacions en la llargada de les seqüències telomèriques en aquests fons mutants, especialment en el fons mutant *rif1* (figura R.22A) i en el doble mutant *rif1 rif2* (figura R.22C).



**Figura R.22.-** Efecte de la disrupció del gen *SCP160* en la llargada de les seqüències telomèriques en els fons mutants *rif1* (A), *rif2* (B) i *rif1 rif2* (C). El *Southern blot* s'ha realitzat digerint el DNA genòmic d'aquestes soques amb XhoI i hibridant la membrana amb la sonda obtinguda a partir de les seqüències Y' (vegeu la figura R.21).

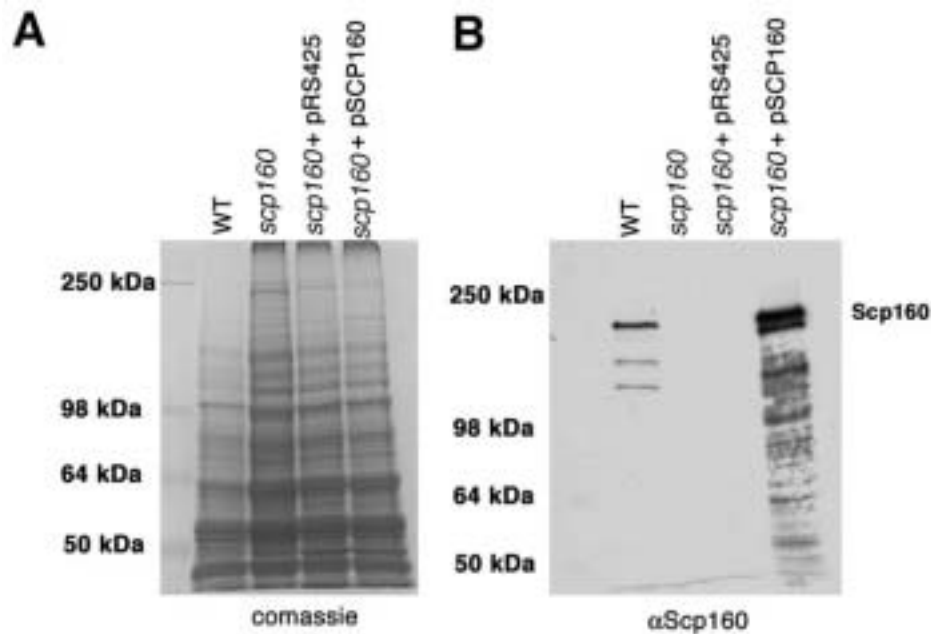




## **8.- La sobreexpressió de Scp160 no és capaç de recuperar el defecte de TPE**

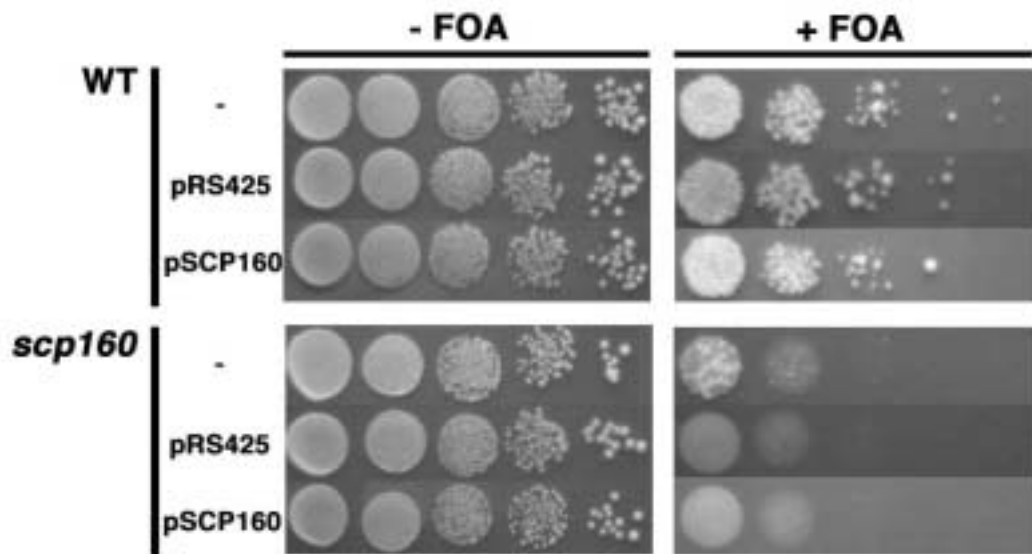
Ens vàrem plantejar estudiar quin és l'efecte en el silenciament telomèric de la sobreexpressió del gen *SCP160*, tant en cèl·lules *wild type* per tal d'observar quin efecte té un excés de la proteïna Scp160 en aquests processos, com sobre les cèl·lules *scp160* per tal de comprovar si el defecte de TPE que manifesten aquestes cèl·lules és recuperable per la sobreexpressió d'aquesta proteïna. Altres fenotips associats a la deleció del gen *SCP160* com ara l'increment de ploidia de les cèl·lules mutants i l'adquisició d'una morfologia cel·lular aberrant no són rescatats per la sobreexpressió de la proteïna Scp160 (Wintersberger *et al.* 1995).

Per tal de sobreexpressar la proteïna Scp160 hem transformat les soques analitzades amb el plasmidi pSCP160, un plasmidi episomal que conté clonada l'ORF i el promotor del gen *SCP160* (vegeu l'apartat 2.1.4 dels Materials i Mètodes). Com a control en aquest experiment hem utilitzat el plasmidi episomal pRS425 que no conté cap ORF clonada. Tal com es pot observar, en l'anàlisi per *western blot* amb l'anticòs  $\Delta$ Scp160 realitzats sobre extractes cel·lulars obtinguts a partir de les cèl·lules transformades amb aquests plasmidis, les cèl·lules transformades amb el plasmidi pSCP160 sobreexpressen la proteïna Scp160. Les cèl·lules *scp160*, en les quals no es veu cap banda en ser analitzades amb l'anticòs  $\Delta$ Scp160, mostren un senyal molt més intens de la proteïna Scp160, que el senyal observat en les cèl·lules *wild type*, en ser transformades amb el plasmidi pSCP160 (figura R.23).



**Figura R.23-** Sobreexpressió de la proteïna Scp160 en les cèl·lules transformades amb el plasmidi pSCP160. Extractes proteics de llevat han estat separats mitjançant SDS-PAGE (A) i analitzats mitjançant *Western blot* amb l'anticòs  $\Delta$ Scp160 (B). S'han analitzat mitjançant SDS-PAGE i *western blot* cèl·lules *wild type* i cèl·lules *scp160* sense transformar i cèl·lules *scp160* transformades amb el plasmidi control pRS425 i amb el plasmidi pSCP160.

Tal com es pot observar en la figura R.24, la sobreexpressió de Scp160 no té cap efecte sobre el silenciament telomèric en les cèl·lules *wild type*, on els nivells de silenciament de les soques transformades amb el plasmidi pSCP160 és idèntic al de les cèl·lules sense transformar, o al de les cèl·lules transformades amb el plasmidi control pRS425. Tampoc s'observa cap efecte en les cèl·lules *scp160* on la sobreexpressió d'aquesta proteïna és incapaç de restablir el silenciament en soques que havien perdut completament la capacitat de silenciar els marcadors presents en les regions telomèriques.



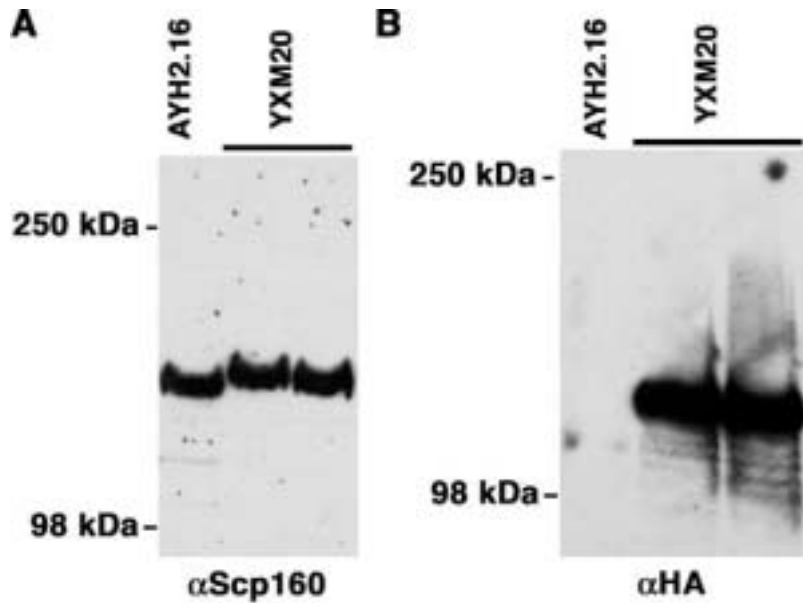
**Figura R.24.-** Efecte sobre el silenciament de la sobreexpressió de Scp160. Les cèl·lules obtingudes a partir de la transformació de les soques UCC506 (*wild type*) o YXM3 (*scp160*) amb els plasmidis pRS425 (control) o pSCP160, s'han analitzat mitjançant plaques de medi mínim que contenien FOA per tal de determinar els nivells de silenciament (vegeu l'apartat 1.2.3 dels Materials i Mètodes).



## **9. Localització subcel·lular de la proteïna Scp160**

Les vigilines dels diferents organismes estudiats han estat localitzades en diferents estructures cel·lulars. Funcionalment s'ha relacionat les vigilines en processos molt dispersos que ocorren en localitzacions diferents de la cèl·lula (vegeu l'apartat 1.2.2 de la Introducció). A *Saccharomyces cerevisiae* les imatges de localització obtingudes de la proteïna Scp160 mostren una localització de la proteïna en la regió perinuclear i en estructures membranoses dins del citoplasma, patró que recorda al de proteïnes que s'uneixen al reticle endoplasmàtic (Wintersberger *et al.* 1995; Frey *et al.* 2001). La proteïna DDP1 de *Drosophila melanogaster* contràriament s'ha vist associada a les regions heterocromàtiques d'aquest organisme suggerint que aquesta proteïna realitza una funció específica dins del nucli de la cèl·lula d'aquest organisme (Cortes *et al.* 1999). No obstant aquestes diferències, en cèl·lules de pollastre les imatges obtingudes mitjançant microscopia electrònica mostren que la vigilina es localitza tant al voltant de les estructures membranoses del reticle endoplasmàtic, com a la cara interna de la membrana nuclear en regions heterocromàtiques (Klinger and Kruse 1996), suggerint que en tots els organismes on es troben presents les vigilines podrien mostrar aquesta doble localització.

Per tal d'estudiar la localització subcel·lular de Scp160 vàrem taguejar el gen *SCP160* amb 3 còpies del tag HA (epítip de l'hemaglutinina del virus *influenza*). La soca YXM20, obtinguda en transformar la soca AYH2.16 (vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes) amb el *cassette* de modificació gènica que permet generar la proteïna de fusió Scp160-3HA (vegeu l'apartat 1.6.2.5 dels Materials i Mètodes), s'ha analitzat mitjançant *western blot* per tal de detectar la presència de la proteïna de fusió (figura R.25). En la soca YXM20 la construcció de fusió Scp160-3HA s'ha substituït en el genoma per la còpia *wild type* pròpia del llevat de manera que aquesta soca té com a única font de proteïna Scp160 en la cèl·lula la còpia taguejada. En els extractes cel·lulars obtinguts a partir de la soca YXM20 s'observa reactivitat amb l'anticòs contra l'epítip HA, amb una banda de la mida esperada per la proteïna de fusió Scp160-3HA (165 kDa; 160 kDa Scp160 + 5 kDa tag), que no s'observa en la soca AYH2.16 original (figura R.25B), així com una banda major que l'observada en la soca AYH2.16 en ser analitzats mitjançant l'anticòs  $\Delta$ Scp160 (figura R.25A).

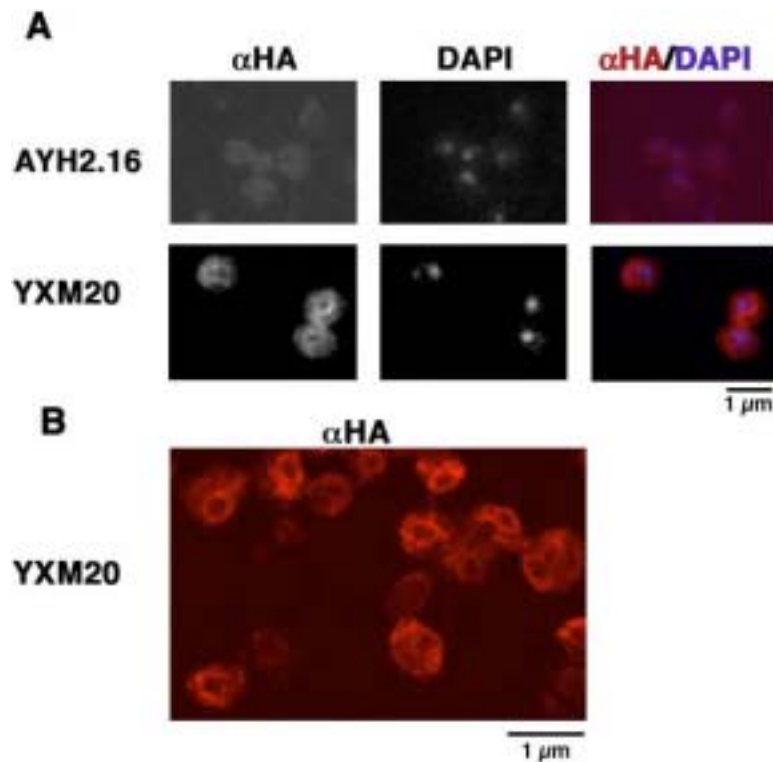


**Figura R.25.-** Anàlisi per *Western blot* realitzat a partir d'extractes proteics de les soques on s'ha taguejat l'ORF de *SCP160* amb 3 còpies de l'epítot HA. Els extractes proteics obtinguts a partir de les soques AYH2.16 i YXM20 s'han analitzat amb l'anticòs  $\Delta$ Scp160 (A) i amb l'anticòs contra l'epítot HA (B).

En aquestes soques es va analitzar mitjançant immunofluorescència la localització de Scp160 per tal de confirmar els resultats descrits prèviament. També es van utilitzar aquestes soques en experiments de CHIP per provar de localitzar la proteïna Scp160 en les regions telomèriques.

### 9.1.- Immunolocalitzacions de la proteïna Scp160

La localització cel·lular de Scp160 s'ha analitzat a les soques YXM20 (Scp160-3HA) i AYH2.16 (Control) (vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes) mitjançant immunolocalització amb l'anticòs contra l'epítot HA (figura R.26). Les imatges obtingudes ens permeten concloure que l'anticòs contra l'epítot HA és capaç de veure específicament la proteïna Scp160-3HA en la soca YXM20, no detectant-se cap senyal en la soca control, la soca AYH2.16 (figura R.26A). A la soca YXM20, Scp160-3HA mostra una localització fonamentalment perinuclear que es veu més fàcilment en les imatges obtingudes mitjançant microscopia confocal (figura R.26B). El senyal de la proteïna Scp160-3HA també es detecta en el citoplasma de les cèl·lules YXM20, però amb menor intensitat que el senyal perinuclear observat. Aquests resultats són similars als obtinguts per altres autors (Wintersberger *et al.* 1995; Frey *et al.* 2001).



**Figura R.26.-** Immunolocalització de la proteïna Scp160-3HA amb l'anticòs  $\Delta$ HA. (A) Imatges de microscopia de fluorescència sobre les soques AYH2.16 (Control) i YXM20 (Scp160-3HA). Les diferents mostres s'han tenyit amb DAPI, un colorant que tenyeix específicament el DNA. (B) Detall de la localització de Scp160 amb microscopia confocal.

## 9.2.- Scp160 no pot ser detectada en les seqüències telomèriques mitjançant CHIP

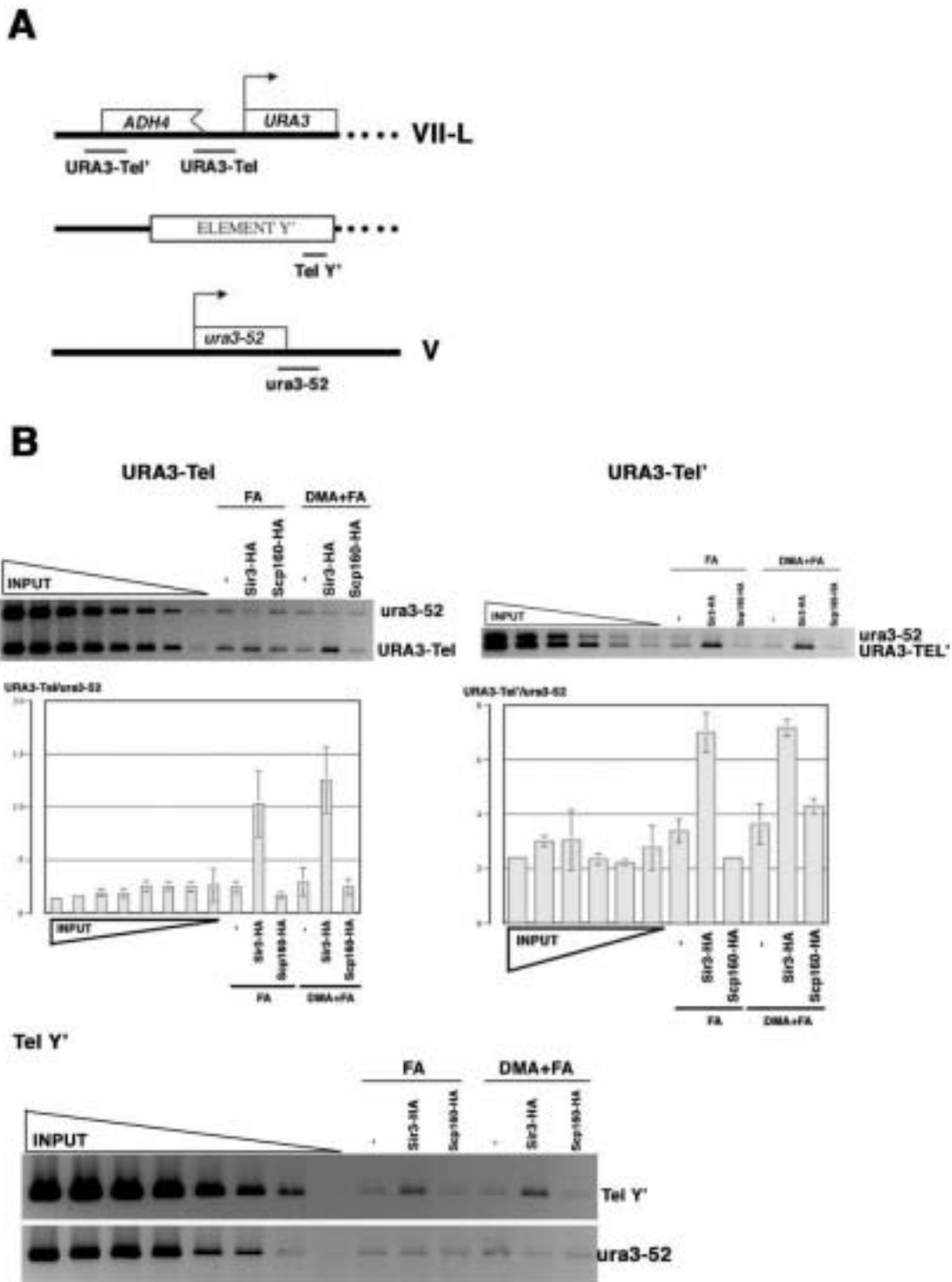
Els telòmers, així com d'altres estructures heterocromàtiques, es troben situats a la perifèria del nucli tant a *Saccharomyces cerevisiae* com a d'altres organismes models on s'ha estudiat (Gotta *et al.* 1996; Marshall *et al.* 1996) (vegeu l'apartat 2.4 de la Introducció). La localització perinuclear de Scp160 observada mitjançant immunofluorescència és, per tant, compatible amb la presència d'aquesta proteïna en les regions heterocromàtiques de *Saccharomyces cerevisiae*. Per tal d'intentar determinar la presència de Scp160 en les regions telomèriques de *Saccharomyces cerevisiae* vàrem realitzar experiments de CHIP amb la soca YXM20, que conté la proteïna de fusió Scp160-3HA amb l'anticòs contra l'epítip HA (figura R.27B).

L'Extracte Cel·lular Total obtingut de la soca YXM20, que conté la proteïna de fusió Scp160-3HA, s'ha immunoprecipitat utilitzant l'anticòs contra l'epítip HA. Per a l'entrecreuament de les cèl·lules de la soca YXM20 s'han utilitzat com a agents

d'entrecreuament formaldehid sol (FA), o amb combinació amb dimetil-adipimidate (DMA+FA), un agent que entrecreu les proteïnes entre si ajudant a detectar mitjançant CHIP la presència de proteïnes que no estan directament unides al DNA (vegeu l'apartat 4.3 dels Materials i Mètodes). Per tal de determinar la presència de la proteïna Scp160-3HA en les regions telomèriques s'han analitzat els immunoprecipitats obtinguts mitjançant PCR amb els oligonucleòtids U3T-UP5 i U3T-LO3, que amplifiquen específicament la còpia del gen *URA3* que presenta aquesta soca en el telòmer VII-L (figura R.27A, fragment URA3-Tel); els oligonucleòtids 1-UP i 1-LO, que amplifiquen específicament una regió pròxima al telòmer del cromosoma VII-L (figura R.27A, fragment URA3-Tel'); i amb els oligonucleòtids Y'-UP i Y'-LO, que amplifiquen específicament un fragment intern de les seqüències subtelomèriques de tipus Y' (figura R.27A, fragment Tel Y'). Com a seqüència control s'han utilitzat els oligonucleòtids URA3-U1 i URA3-L1 que amplifiquen específicament el *locus* genòmic del gen *URA3* en el cromosoma V (figura R.27A, fragment *ura3-52*). Els fragments URA3-Tel i URA3-Tel' s'han analitzat com a PCR *multiplex* amplificant la seqüència control *ura3-52* en la mateixa reacció de PCR, fet que no ha pogut ser realitzat amb el fragment Tel Y' donada la naturalesa repetitiva de les seqüències Y' que dificulta les reaccions de PCR *multiplex*. Les seqüències analitzades com a PCR *multiplex* s'han quantificat utilitzant un aparell de captació d'imatges (Fluor-S MultiImager, Bio-Rad).

Com a control positiu en aquests experiments s'ha determinat la presència de la proteïna Sir3-HA en les regions telomèriques realitzant l'Extracte Cel·lular Total a partir de la soca AYH2.45, que conté la proteïna de fusió Sir3-HA. Com a control negatiu en aquest experiment vàrem analitzar els extractes cel·lulars de la soca AYH2.16 que no conté cap proteïna fusionada a l'epítot HA en el seu genoma (vegeu l'apartat 1.7 dels Materials i Mètodes). Els resultats obtinguts en aquests assaigs no ens permeten detectar la presència de Scp160 en les regions telomèriques. En aquest assaigs no hem pogut detectar en els immunoprecipitats obtinguts a partir de la soca YXM20 un enriquiment de les bandes telomèriques (URA3-Tel, URA3-Tel' i Tel Y') respecte a la banda control (*ura3-52*) (figura R.27B).





**Figura R.27.-** Anàlisi mitjançant CHIP de la presència de Scp160 a les regions telomèriques. (A) Esquema de les regions genòmiques presents en aquestes soques. Es mostra la localització relativa dels fragments URA3-Tel, URA3-Tel' Tel Y' i ura3-52 utilitzats per l'anàlisi per PCR dels immunoprecipitats. (B) Anàlisi mitjançant PCR dels immunoprecipitats obtinguts a partir de les diferents soques utilitzades en aquest estudi: AYH2.16 (no tag), AYH2.45 (Sir3-HA) i YXM20 (Scp160-3HA). Els immunoprecipitats obtinguts s'han analitzat amb les regions genòmiques URA3-Tel, URA3-Tel', i Tel Y'. Les diferents soques han estat processades utilitzant com a agent d'entrecreuament el formaldehid sol (FA), o amb combinació amb dimetil-adipimidate (DMA+FA). Es mostren en la figura les quantificacions realitzades de l'abundància relativa de les diferents bandes analitzades en aquells gels on s'ha pogut realitzar la quantificació. Els resultats quantificats presentats estan basats en de 2-3 experiments de CHIP diferents.



## **VI. DISCUSSIÓ GENERAL**



## **Conservació funcional de les vigilines al llarg de l'evolució**

Les vigilines dels diferents organismes estudiats han estat relacionades amb diferents aspectes de la funcionalitat de la cèl·lula, principalment relacionats amb el metabolisme dels àcids nucleics de cadena senzilla. Els tres principals processos a què s'han associat aquestes proteïnes són: (i) regulador de la síntesi protèica, com a regulador de la traducció de forma general a tota la cèl·lula, (ii) regulador de mRNAs específics i (iii) contribucions a la segregació dels cromosomes en mitosi. La hipòtesi d'una implicació de les vigilines en el procés de traducció protèica general de la cèl·lula postula que el paper principal de les vigilines en la cèl·lula és formar part dels complexos implicats en el transport i processament dels tRNAs del nucli al citoplasma contribuint d'aquesta manera a la síntesi protèica general de la cèl·lula (Kruse *et al.* 1996; Kruse *et al.* 1998a; Kruse *et al.* 1998b; Kruse *et al.* 2000; Hilgendorf *et al.* 2001; Hilgendorf *et al.* 2003; Schuh *et al.* 2003). Les vigilines també s'han associat a un paper regulador de mRNAs específics, bé sigui estabilitzant determinats mRNAs, o com a reguladors del posicionament o de l'eficiència de traducció de mRNAs específics (Dodson and Shapiro 1997; Kanamori *et al.* 1998; Cunningham *et al.* 2000; Dodson and Shapiro 2002; Goolsby and Shapiro 2003; Li *et al.* 2003; Mendelsohn *et al.* 2003). Finalment també s'han associat les vigilines amb el procés de segregació cromosòmica donat els fenotips que presenta el mutant de la vigilina de *Saccharomyces cerevisiae*, així com l'associació d'aquestes a l'heterocromatina pericentromèrica de *Drosophila melanogaster* (Wintersberger *et al.* 1995; Cortes *et al.* 1999; Cortes *et al.* 2003).

L'anàlisi a priori de la peculiar estructura d'aquestes proteïnes indueix a pensar que la seva funcionalitat està bàsicament determinada per la seva capacitat d'unir-se als àcids nucleics de cadena senzilla; no obstant això, es desconeixen molts aspectes determinants en la possible funcionalitat que puguin estar realitzant aquestes proteïnes: (i) es desconeix si aquestes proteïnes realitzen la seva funció (o funcions) unint-se només a un sol tipus d'àcid nucleic de cadena senzilla (ssDNA, tRNA, mRNA o rRNA) o si realitzen les seves funcions unint-se als diferents tipus d'àcids nucleics presents en la cèl·lula, (ii) es desconeix si aquestes proteïnes exerceixen la seva funció via la unió de substrats específics (determinat per una especificitat de

seqüència) o si s'uneixen de forma inespecífica de seqüència a la seves dianes, (iii) no es coneix en definitiva quines són exactament les dianes d'unió *in vivo* d'aquestes proteïnes, ni quines conseqüències funcional té per a la cèl·lula aquesta unió, (iv) finalment, no només la seva capacitat d'unir àcids nucleics sembla ser determinant per al seva funció, sinó que també cal tenir en compte la seva capacitat d'interaccionar amb d'altres proteïnes, de fet s'han trobat formant complexos amb diferents proteïnes, malgrat que tampoc es coneixen les implicacions funcionals que aquestes interaccions puguin tenir.

A l'hora d'estudiar la funcionalitat d'aquestes proteïnes, la seva localització subcel·lular també és una font important de controvèrsia: diferents estudis han relacionat aquestes proteïnes amb una localització citosòlica associada al reticle endoplasmàtic (Lang and Fridovich-Keil 2000; Frey *et al.* 2001; Lang *et al.* 2001), altres estudis han relacionat aquestes proteïnes amb localització nuclear (Cortes *et al.* 1999), i d'altres estudis han localitzat aquestes proteïnes en ambdues localitzacions (Klinger and Kruse 1996; Kruse *et al.* 1998b; Kruse *et al.* 2003), obrint la possibilitat que aquesta doble localització sigui un reflex de la capacitat d'aquestes proteïnes de realitzar diferents funcions cel·lulars.

A nivell estructural, les vigilines dels metazous mostren una elevada conservació evolutiva amb la presència de dominis KH molt regulars i conservats i la presència de forma conservada d'un *loop* variable molt més llarg en el domini KH12 que en la resta de dominis (vegeu l'apartat 1.2.1 de la Introducció). Aquest és un argument a favor d'una alta conservació de la funció (o funcions) que aquestes proteïnes puguin realitzar dins d'aquest grup d'organismes. Les vigilines dels llevats *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* presenten un menor grau de conservació evolutiva amb dominis KH més heterogenis quant a la seva mida i amb un nombre més gran de dominis degenerats. No obstant, el fet de compartir la mateixa estructura, amb una presència constant d'un alt nombre (14 o 15) de dominis KH, així com la seva disposició en tàndem en tots els homòlegs descrits fa pensar que, almenys en alguna de les funcions que realitzen aquestes proteïnes, aquesta disposició és determinant per a la seva funció, fet que ha forçat la seva preservació al llarg de l'evolució.

La capacitat de la proteïna DDP1 de *Drosophila melanogaster* de complementar el fenotip de ploïdia que s'observa en els mutants *scp160* de *Saccharomyces cerevisiae* és un fort argument a favor d'una conservació funcional d'aquestes proteïnes al llarg de l'evolució. Aquests resultats doncs semblen suggerir que, si bé no es coneix com, el mecanisme d'acció a través del qual realitzen part de les seves funcions sembla estar conservat. Aquest escenari però no exclou la possibilitat d'una diversificació funcional de les vigilines en els diferents organismes. Tot i mantenir alguna de les seves funcions, les vigilines podrien haver adquirit la capacitat de realitzar funcions diferenciades en les diferents organismes al llarg de l'evolució.

### ***Contribució de les vigilines a l'estructura de l'heterocromatina***

La vigilina de *Drosophila melanogaster*, la proteïna DDP1, ha estat associada tant estructuralment com funcionalment amb les seqüències heterocromàtiques d'aquests organismes. La proteïna DDP1 s'ha trobat associada al cromocentre de cromosomes politènics, on es localitza la heterocromatina pericentromèrica dels quatre cromosomes de *Drosophila*, així com en els braços eucromàtics colocalitzant amb la proteïna HP1 (Cortes *et al.* 1999; Cortes *et al.* 2003). Mutants hipomorfs del gen DDP1 es comporten com a supressors de PEV a la vegada que presenten una disminució en les marques característiques de les regions heterocromàtiques com la metilació del residu K9 de la histona H3 en les regions heterocromàtiques (Huertas *et al.* resultats no publicats). Per tal d'estudiar una possible conservació funcional de les vigilines en aquests aspectes cel·lulars, hem estudiat la possible contribució de la vigilina de *Saccharomyces cerevisiae*, la proteïna Scp160, en l'estructuració i manteniment de l'heterocromatina en aquest organisme. Els nostres resultats són compatibles amb una implicació de les vigilines en aquests processos cel·lulars. La deleció de *SCP160* es comporta com un supressor de variegació. Les cèl·lules mutants *scp160* mostren pèrdua de silenciament de marcadors inserits en el *locus* del *mating type* i en les regions telomèriques. Aquests resultats suggereixen que una de les funcions de les vigilines podria ser contribuir a la formació i/o manteniment de la heterocromatina en aquestes regions. Aquest resultat és consistent amb les observacions realitzades a *Drosophila melanogaster* on el mutant hipomorf *ddp1*<sup>15.1</sup> es comporta també com un supressor de variegació suggerint que una de les funcions

conservades de les vigilines pot ser la seva contribució a l'organització estructural de l'heterocromatina. La deleció del gen *SCP160* de *Saccharomyces cerevisiae* afecta de forma específica al silenciament observat en aquest organisme en la regió del *mating type* i en les regions telomèriques, però no té cap efecte en el silenciament de les regions del rDNA. Aquests resultats són compatibles amb el model proposat de la formació de les regions heterocromàtiques a llevat on es coneix que un mateix grup de proteïnes estan implicades, mitjançant els mateixos mecanismes, en l'establiment del silenciament del *locus* del *mating type* i de les regions telomèriques, però no afecten al silenciament de les regions del rDNA (Aparicio *et al.* 1991; Smith and Boeke 1997). Seqüències reguladores concretes en les regions del *locus* del *mating type* i en els telòmers inicien la nucleació de la heterocromatina en aquestes regions mitjançant el reclutament de factors específics. Un mateix grup de factors reguladors està implicat en la nucleació de la heterocromatina en aquestes dues regions. Consistent amb aquest efecte específic de les vigilines en el silenciament de les regions del *mating type* i de les regions telomèriques, la desrepressió observada en les cèl·lules *scp160* en les regions telomèriques és recuperable per d'altres mutacions que contraresten la supressió del silenciament en aquestes regions: la mutació del gen *RPD3* (Rundlett *et al.* 1996) i la sobreexpressió de la proteïna Sir3 (Renauld *et al.* 1993; Hecht *et al.* 1996).

En els diferents estudis funcionals realitzats fins a la data s'han proposat diferents hipòtesis sobre la funció principal de les vigilines. L'associació d'aquestes proteïnes al reticle endoplasmàtic i, més especialment, als ribosomes dels diferents organismes on s'ha estudiat (Wintersberger *et al.* 1995; Weber *et al.* 1997; Lang and Fridovich-Keil 2000; Frey *et al.* 2001; Lang *et al.* 2001; Baum *et al.* 2004), ha portat a suggerir que la funció principal d'aquestes proteïnes es desenvolupa en aquestes estructures cel·lulars mitjançant la seva capacitat d'unir àcids nucleics de cadena senzilla (s'han relacionat les vigilines tant amb el mRNA com amb els tRNAs). S'han proposat dues hipòtesis diferents per explicar el paper desenvolupat per les vigilines en aquestes processos. D'una banda s'han relacionat les vigilines com a part activa en el procés de síntesi protèica de la cèl·lula participant en el transport de tRNAs entre el nucli i el citoplasma (Kruse *et al.* 1996; Kugler *et al.* 1996; Kruse *et al.* 1998a; Kruse *et al.* 1998b; Kruse *et al.* 2000; Hilgendorf *et al.* 2001; Hilgendorf *et al.* 2003; Kruse *et al.*



2003) i, per altra banda, s'ha associat a aquestes proteïnes un paper regulador de l'estabilitat o l'eficiència de la traducció de determinats mRNAs específics (Dodson and Shapiro 1997; Cunningham *et al.* 2000; Lang and Fridovich-Keil 2000; Frey *et al.* 2001; Lang *et al.* 2001; Li *et al.* 2003; Baum *et al.* 2004). En ambdós casos els fenotips observats en els mutants de les vigilines s'associen no a efectes directes ocasionats per l'acció de les vigilines en els diferents processos estudiats, sinó a efectes indirectes ocasionats per l'acció de les vigilines, ja sigui com a reguladors generals de la traducció o com a reguladors de mRNAs específics.

L'efecte específic observat en les cèl·lules *scp160* de desrepressió en els marcadors inserits en les regions telomèriques i en les regions del *mating type*, però no en les regions de rDNA, així com les observacions que el fenotip de desrepressió és recuperable específicament per mutants que actuen com a *enhancers* de TPE argumenten en contra d'un efecte de desregulació global de la cèl·lula, tal com seria d'esperar si les vigilines estiguessin implicades en el procés de síntesi proteica general de la cèl·lula, tal com semblarien indicar els estudis funcionals que relacionen les vigilines amb el metabolisme dels tRNAs (Kruse *et al.* 2000) i els resultats obtinguts en cèl·lules de mamífers, on la injecció de DNA antisense contra les vigilines és capaç de provocar una disminució en la síntesi proteica de la cèl·lula (Schuh *et al.* 2003). Els nostres resultats però no permeten discernir entre una implicació directa de les vigilines en aquests processos o una acció indirecta com a conseqüència de la contribució de les vigilines al metabolisme de determinats mRNAs que codifiquen per proteïnes implicades en l'establiment de l'heterocromatina.

Malgrat que el mecanisme pel qual la deleció del gen *RPD3* desencadena un increment en la repressió de les regions heterocromàtiques no es coneix, el fet que la mutació de la histona desacetilasa Rpd3 es comporti com un *enhancer* de variegació tant a *Drosophila melanogaster* com a *Saccharomyces cerevisiae* suggereix una implicació directa d'aquesta proteïna en la regulació de les seqüències heterocromàtiques que ha estat conservada al llarg de l'evolució (De Rubertis *et al.* 1996). No obstant això, a partir dels estudis realitzats a llevat, s'ha proposat que l'efecte de la mutació de *RPD3* sobre les seqüències heterocromàtiques és degut a efectes indirectes i que la proteïna Rpd3 no té un paper determinant en la modificació

de les histones presents en les regions heterocromàtiques (Bernstein *et al.* 2000; Kurdistani *et al.* 2002; Robyr *et al.* 2002). S'han proposat diferents hipòtesis per explicar l'efecte de la mutació de *RPD3* sobre el silenciament gènic com ara un increment en l'expressió de Sir3 (Rundlett *et al.* 1996) o un increment de l'expressió dels gens de les histones (Bernstein *et al.* 2000) com a resultat de l'increment general d'acetilació provocat per la deleció de *RPD3*. L'efecte de repressió gènica observat en mutar *RPD3* en les cèl·lules *scp160* que han perdut la seva capacitat de silenciar els gens presents en les regions heterocromàtiques indica que, siguin quins siguin els efectes que ambdues proteïnes realitzen sobre les seqüències telomèriques, *RPD3* actua *downstream* de *SCP160*. Consistent amb aquests resultats la pèrdua de silenciament telomèric associada a la deleció de *SCP160* no s'estableix en el fons mutant *rpd3*.

L'efecte de desrepressió observat en els mutants *scp160* sembla ser degut a una disminució de la presència de la proteïna Sir3 en les regions heterocromàtiques. En aquest sentit s'observen mitjançant CHIP uns nivells menors de Sir3 en les regions telomèriques de les cèl·lules mutants i, consistent amb aquest fet, s'observa una recuperació del silenciament telomèric al sobreexpressar Sir3. De forma similar s'observa que en realitzar la deleció de *SCP160* en cèl·lules transformades amb un plasmidi multicòpia que sobreexpressa la proteïna Sir3 (pSIR3), no s'observen canvis significatius en els nivells de desrepressió dels marcadors gènics inserits en les regions telomèriques. Les cèl·lules *scp160* no semblen tenir afectada de manera irreversible la capacitat d'unir Sir3 en les regions heterocromàtiques tal com posa de manifest el fet que en les cèl·lules *scp160* transformades amb el plasmidi pSIR3 s'observen uns nivells de repressió comparables als de les cèl·lules *wild type* transformades amb el mateix plasmidi. No obstant això, l'observació que l'únic clon en què s'observa efecte de desrepressió telomèrica en deleccionar el gen *SCP160* en presència del plasmidi pSIR3 és el que posteriorment en perdre la sobreexpressió de Sir3 manifesta un major grau de desrepressió telomèrica, pot ser una indicació que els diferents graus de desrepressió observats en les cèl·lules *scp160* poden ser el resultat de diferències en la unió de Sir3 a les regions telomèriques. S'ha proposat que les proteïnes Rif1 i Rif2, en interaccionar amb l'extrem C-terminal de la proteïna Rap1, interfereixen en la deposició de Sir3 a les seqüències telomèriques (Hardy *et*

*al.* 1992; Wotton and Shore 1997) de manera que la deleció d'aquestes proteïnes permet una unió més eficaç de Sir3 a Rap1 incrementant el silenciament. D'acord amb l'efecte observat en deleccionar *SCP160* en cèl·lules que sobreexpressen Sir3, s'observa també un menor grau de desrepressió telomèrica en realitzar la deleció de *SCP160* en un fons genètic que conté la doble mutació *rif1 rif2* en comparació amb el grau de desrepressió gènica que s'observa en realitzar la deleció en un fons *wild type*. Aquest fet pot ser explicat perquè l'efecte inhibidor de la deposició de Sir3 produït per la deleció de *SCP160* és contrarestat per l'increment en la deposició de Sir3 en les seqüències telomèriques que s'observa en els dobles mutants *rif1 rif2*.

Tots aquests resultats permeten suggerir que l'efecte de pèrdua de silenciament telomèric i del *mating type* observat en les cèl·lules *scp160* són deguts a una disminució en els nivells de Sir3 presents en aquestes regions. No obstant, els nostres resultats no permeten establir si aquests efectes són deguts a un efecte directe de Scp160 sobre la deposició de Sir3 en els regions heterocromàtiques o a efectes indirectes ocasionats o bé a l'afectació d'altres proteïnes que intervenen en la deposició de Sir3 en les regions heterocromàtiques, o bé a canvis en els nivells de Sir3 en la cèl·lula.

La hipòtesi que les vigilines, i en concret Scp160, exerceixen la seva funció principal com a reguladores d'un grup concret de mRNAs està sostinguda per l'observació que Scp160 és capaç d'unir de forma específica mRNAs concrets (Li *et al.* 2003). Entre els mRNAs concrets que queden retinguts en una cromatografia d'afinitat amb Scp160 no es troba Sir3, ni cap regulador conegut de Sir3, fet que suggereix que els efectes observats en els mutants *scp160* no són deguts a canvis en els nivells de Sir3. Els mRNAs específics identificats en aquest estudi mitjançant hibridació amb *microarrays* que contenen totes les ORFs del llevat no mostren en tots els casos un enriquiment específic en ser analitzats per RT-PCR, obtenint-se només resultats reproduïbles en menys del 50% dels mRNAs estudiats. A més, l'especificitat d'unió d'aquests mRNAs identificats com a enriquits en una columna d'afinitat de Scp160 no ha pogut ser establerta amb claredat (Li *et al.* 2003). La hipòtesi d'una acció indirecta de Scp160 sobre les seqüències heterocromàtiques requereix un estudi amb major profunditat per determinar si Scp160 és capaç d'estabilitzar els mRNAs de proteïnes que es coneix que actuen en l'establiment de l'heterocromatina; malgrat

això tampoc es pot descartar la possibilitat que Scp160 estigués afectant la formació de l'heterocromatina regulant alguna altra proteïna desconeguda que estigui implicada en aquests processos.

La localització de les vigilines a regions heterocromàtiques tant a *Drosophila melanogaster* com en cèl·lules de pollastre (Klinger and Kruse 1996; Cortes *et al.* 1999), juntament amb els fenotips de desrepressió gènica en les regions heterocromàtiques observats tant a *Drosophila melanogaster* (Huertas *et al.* resultats no publicats) com a *Saccharomyces cerevisiae*, suggereixen fortament que les vigilines podrien tenir un paper directe en els processos implicats en la formació de l'heterocromatina. Si bé a *Saccharomyces cerevisiae* no hem estat capaços de detectar mitjançant CHIP la presència de Scp160 a les regions telomèriques d'aquest organisme, aquest fet podria ser degut a problemes tècnics. En el cas de la proteïna Cdc13 de *Saccharomyces cerevisiae*, una proteïna que s'uneix a les regions de ssDNA presents en forma d'extensió en les regions telomèriques, s'ha pogut detectar la presència d'aquesta proteïna en el telòmer mitjançant assaigs d'un híbrid, si bé no ha pogut ser localitzada en aquestes regions mitjançant CHIP (Bourns *et al.* 1998). La possible localització nuclear de Scp160 està sostinguda per la presència de senyals de localització nuclear (NLS) en aquesta proteïna, que s'han comprovat mitjançant assaigs de fusió a reporters de GFP que són capaços de dirigir l'acumulació d'aquests reporters al nucli (M. Seedorf, comunicació personal). La localització perinuclear de Scp160 observada en els estudis d'immunofluorescència és compatible amb una localització en les regions heterocromàtiques, que es troben situades a la perifèria del nucli units a la membrana nuclear tant a *Saccharomyces cerevisiae* com a d'altres organisme models on s'ha estudiat (Gotta *et al.* 1996; Marshall *et al.* 1996). A més, en estudis on s'ha localitzat mitjançant microscopia electrònica la vigilina de pollastre, s'ha observat una localització nuclear associada a l'heterocromatina juntament amb una associació al reticle endoplasmàtic (Klinger and Kruse 1996). Per tal d'aclarir aquests aspectes són necessaris estudis complementaris posteriors a l'estudi realitzat per CHIP, com per exemple la localització de la proteïna Scp160 mitjançant microscopia electrònica per tal de detectar la presència de la proteïna en el nucli de la cèl·lula de llevat, així com la

mutació dels senyals de localització nuclear que presenta aquesta proteïna per tal de determinar quines conseqüències funcionals té aquesta mutació.

En els estudis realitzats sobre silenciament telomèric a *Saccharomyces cerevisiae* s'ha observat que algunes de les mutacions que afecten al TPE també tenen efectes en la longitud de les seqüències telomèriques (Greider 1996; Zakian 1996; Lowell and Pillus 1998). Aquest fet implica que els components de l'heterocromatina telomèrica a part d'estar implicats en el silenciament gènic que s'observa en aquestes regions estan implicats en el manteniment dels telòmers. La desregulació de la llargada de les seqüències telomèriques observada en els mutants del gen *SCP160* està d'acord amb una implicació de les vigilines en la regulació de l'heterocromatina telomèrica a *Saccharomyces cerevisiae*. L'efecte que s'observa en les cèl·lules *scp160* és majoritàriament un efecte d'allargament de les seqüències telomèriques. Aquest fet indica que els efectes observats en els telòmers de les cèl·lules *scp160* no poden explicar-se únicament per una manca de la proteïna Sir3 en aquestes regions, donat que en els mutants *sir3* l'efecte observat en la llargada de les regions telomèriques és d'escurçament de les mateixes (Palladino *et al.* 1993a), indicant que Scp160 afecta a la llargada de les seqüències telomèriques no només a través d'una disminució en la deposició de Sir3. Si aquests efectes són o no deguts a l'acció directa de Scp160 al telòmer resta per determinar.

Els defectes en la llargada de les regions telomèriques s'han associat als problemes en la capacitat de silenciar els gens presents en les regions telomèriques; generalment l'allargament de les seqüències telomèriques s'associa amb un increment en la capacitat de silenciar els gens marcadors. Les repeticions telomèriques contenen llocs d'unió per la proteïna Rap1 i d'altres proteïnes implicades en l'establiment del silenciament, de manera que un allargament d'aquestes regions dona lloc a una major capacitat de reclutar els complexos silenciadors i, per tant, a un increment en el silenciament (Kyrion *et al.* 1993). D'altra banda, la pèrdua de les estructures més terminals del telòmer (*uncapped telomeres*) s'ha associat a una desregulació de la llargada de les regions telomèriques. Mutants del *capping* telomèric presenten desregulació de les seqüències telomèriques, així com altres fenotips similars als que presenta la deleció de *scp160*: l'increment de ploidia cel·lular i l'adquisició d'una morfologia cel·lular aberrant (Smith and Blackburn 1999). L'efecte observat en els

telòmers de les cèl·lules *scp160* permet postular una implicació d'aquestes proteïnes en el procés de *capping* telomèric.

Donat el fenotip d'increment de ploidia que presenten les cèl·lules *scp160*, s'ha de considerar la possibilitat que els fenotips observats (i la variabilitat observada en la presentació d'aquest fenotips) siguin el resultat de la descompensació de la dosi gènica que es produeix en aquestes cèl·lules. Aquest efecte podria explicar els fenòmens de TPE i la variabilitat observada en aquest fenotip com el resultat de la descompensació en la dosi gènica dels diferents elements implicats en la formació de les estructures heterocromàtiques. Els nostres resultats però contradiuen aquesta hipòtesi, ja que en els estudis realitzats en què s'han analitzat en paral·lel els fenotips de ploidia i TPE, si bé la majoria de cèl·lules analitzades presentaven increments de ploidia, també hem observat algunes cèl·lules que manifestaven efectes de desrepressió gènica en analitzar-les mitjançant plaques de FOA, però no mostraven cap efecte en els nivells de ploidia al analitzar-les per FACS (figura R.8).

### ***Contribució de les vigilines a la segregació cromosòmica***

En els diferents organismes on s'ha estudiat, s'ha trobat un paral·lisme entre els problemes de la formació de les estructures heterocromàtiques i problemes en la segregació cromosòmica. Aquesta relació s'ha descrit tant en *Schizosaccharomyces pombe* o *Drosophila melanogaster* que presenten heterocromatina en les regions centromèriques (Wines and Henikoff 1992; Allshire *et al.* 1995; Murphy and Karpen 1995; Ekwall *et al.* 1999), com en *Saccharomyces cerevisiae* que no presenta heterocromatina en les regions centromèriques. En aquest organisme s'han descrit defectes de segregació associats a proteïnes implicades en la formació de l'heterocromatina, com ara Rap1 (Longtine *et al.* 1992) o les proteïnes Sir3 i Sir4 (Palladino *et al.* 1993a).

Les cèl·lules mutants *scp160* presenten majoritàriament un contingut de DNA més elevat que les cèl·lules *wild type* indicant un defecte en el control del manteniment de la ploidia cel·lular (Wintersberger *et al.* 1995). Aquest fenotip suggereix que les vigilines contribueixen d'alguna manera a la correcta segregació dels cromosomes. Consistent amb el fet de presentar defectes en la segregació dels cromosomes, les cèl·lules *scp160* presenten una hipersensibilitat a drogues desestabilitzadores de

microtubuls com el benomyl. Aquestes drogues han estat utilitzades com a eina d'estudi per a la caracterització de mutacions que afecten el procés de segregació cromosòmica (Li and Murray 1991; Interthal *et al.* 1995; Bernard *et al.* 1998; Hyland *et al.* 1999). La major hipersensibilitat a aquestes drogues s'associa a defectes estructurals o de regulació dels components implicats en la divisió nuclear.

Els mutants de deleció *scp160* presenten fenotip *ts* fet que indica una contribució estructural de Scp160. El fet que el fenotip *ts* s'observi en cèl·lules mutants per deleció del gen *SCP160* no permet atribuir aquest fenotip a defectes propis de la proteïna Scp160, sinó que han de ser deguts a l'afectació d'algun altre component cel·lular. Mutants d'algunes proteïnes telomèriques implicades en silenciament, com ara l'heterodímer Ku (Boulton and Jackson 1996; Barnes and Rio 1997) i la proteïna Cdc13 (Garvik *et al.* 1995) també presenten un fenotip *ts* que s'ha associat a defectes estructurals en les seqüències telomèriques que donen lloc a l'activació del *checkpoint* de dany en el DNA (Teo and Jackson 2001).

La correlació observada entre els fenotips d'hipersensibilitat al benomyl, el fenotip *ts* i la supressió TPE permeten suggerir que en aquestes cèl·lules la presentació simultània d'aquests fenotips podria ser deguda a la presència de defectes estructurals. Segons aquesta hipòtesi les cèl·lules *scp160* coexistirien en estats diferents en funció del grau d'afectació de les estructures estabilitzades per la proteïna Scp160, donant lloc a la variabilitat observada en la manifestació dels fenotips associats a la deleció de *SCP160*. La correlació observada entre els diferents fenotips argumenta en contra de la possibilitat que els diferents fenotips associats a la deleció de *SCP160*, que s'observen amb una penetració incompleta, siguin deguts a efectes indirectes com a conseqüència de problemes en la descompensació de la dosi gènica entre altres components cel·lulars. La incapacitat de recuperar els fenotips en les cèl·lules mutants *scp160* amb la pròpia proteïna Scp160 suggereix que aquesta proteïna no és capaç de recuperar els problemes estructurals ocasionats en les cèl·lules mutants un cop s'han establert.

Els nostres resultats no permeten establir una relació directa entre els problemes de silenciament observat en les cèl·lules *scp160* i els problemes de segregació cromosòmica que presenten aquestes cèl·lules, si bé sí que suggereixen que ambdós

processos poden estar relacionats. Les observacions que cèl·lules *scp160* que no presenten problemes de TPE presenten problemes de ploidia (figura R.8) i el fet que en cèl·lules que sobreexpressen Sir3 s'estableixi el fenotip de ploidia tot i que no presenten pèrdua del silenciament telomèric, indica que el defecte de TPE que s'observa en les cèl·lules *scp160* no és el factor determinant que provoca la desregulació en els nivells de ploidia d'aquestes cèl·lules. L'adquisició del contingut de DNA aberrant pot ser degut a altres defectes associats a la manca de Scp160 que es manifesten amb més facilitat. Aquest fet explicaria l'observació que la gran majoria de cèl·lules *scp160* presenten un increment en els nivells de ploidia cel·lular, mentre que els altres fenotips s'observen amb una freqüència més baixa. No obstant, les observacions que en mutar *SCP160* en les cèl·lules *rpd3* i en les cèl·lules *rif1 rif2* s'observa un menor grau d'increment en els nivells de ploidia cel·lular indica que en l'establiment de la ploidia aberrant l'afectació de les seqüències telomèriques pot ser un factor important. En les cèl·lules *rpd3* no es pot establir de forma contundent una correlació entre els efectes de la mutació del gen *RPD3* sobre les seqüències telomèriques i el menor grau d'increment en els nivells de ploidia cel·lular, donada la naturalesa pleiotròpica de la mutació *rpd3* que provoca un increment global de l'acetilació del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* afectant a la regulació de molts gens. No obstant, el fet que s'observi també aquest efecte en les cèl·lules *rif1 rif2*, que tenen afectades de forma específica les seqüències telomèriques, suggereix que el fenotip de ploidia de la mutació *scp160* pot ser degut a una alteració en les seqüències telomèriques d'aquestes cèl·lules. La implicació de l'alteració de les seqüències telomèriques en l'establiment del fenotip de ploidia aberrant també està sostingut per les observacions realitzades en *Kluyveromyces lactis*, on la mutació de les seqüències telomèriques (mutant el gen que codifica per al RNA motlle de la telomerasa) dóna lloc a uns fenotips d'increment de ploidia i d'adquisició d'una morfologia cel·lular aberrant (Smith and Blackburn 1999) molt similars als fenotips observats en els mutants *scp160* (Wintersberger *et al.* 1995).

En aquest treball no hem estat capaços de detectar problemes de segregació de plasmidis centromèrics individuals, si bé aquest fet es pot atribuir a una segregació diferencial dels plasmidis centromèrics respecte als cromosomes propis de llevat donada la diferència de mida entre els dos, o a la manca de seqüències telomèriques



en aquest plasmidis. En d'altres estudis realitzats en el nostre laboratori les vigilines han mostrat problemes de segregació de minicromosomes individuals, tant a *Drosophila melanogaster* (Huertas *et al.* resultats no publicats), com a *Schizosaccharomyces pombe* (Marsellach *et al.* resultats no publicats).

La proteïna Scp160 s'ha trobat formant complexos amb la proteïna Bfr1 (Lang and Fridovich-Keil 2000), una proteïna inicialment identificada en un *screening* com a supressor de la letalitat induïda per a droga Brefeldin-A. Els mutants d'aquesta proteïna presenten un fenotip d'increment de ploidia (Jackson and Kepes 1994) similar al observat en les cèl·lules *scp160*. De forma interessant la proteïna Bfr1 ha estat relacionada mitjançant assaigs de dos híbrids amb la proteïna Bbp1, un component del *Spindle Pole Body* (SPB), el centre organitzador de microtubuls de *Saccharomyces cerevisiae*. Alhora Scp160 ha estat relacionada genèticament amb Eap1 (Mendelsohn *et al.* 2003), una proteïna que a la seva vegada ha estat també implicada en el metabolisme del SPB (Chial *et al.* 2000). Tots aquests resultats permeten entreveure la possibilitat que el defecte de ploidia associat a Scp160 estigui relacionat amb la funcionalitat del SPB, mutants que afecten al SPB presenten fenotips d'increment de ploidia (McGrew *et al.* 1992) similars als observats en les cèl·lules *scp160*. Consistent amb aquesta hipòtesi i amb els nostres resultats, la proteïna Rif2 s'ha trobat formant complexos amb Bfr1 en experiments de dos híbrids realitzats per trobar interaccions entre totes les proteïnes del genoma de llevat (Ito *et al.* 2001). Finalment, cal indicar que en d'altres estudis de dos híbrids realitzats a gran escala amb un conjunt important de proteïnes del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, Scp160 s'ha associat amb Cdc26 (Hazbun *et al.* 2003), una subunitat del complex APC (anaphase promoter complex) (Zachariae *et al.* 1996).



## **VII. CONCLUSIONS**



1.-Les cèl·lules mutants *scp160Δ* presenten, en analitzar-les mitjançant FACS, un contingut de DNA per cèl·lula més elevat que el de les cèl·lules *wild type*, suggerint la presència en aquestes cèl·lules de problemes en la segregació cromosòmica.

2.- La proteïna DDP1 de *Drosophila melanogaster* és capaç de complementar l'increment de ploidia observat en les cèl·lules mutants *scp160Δ* de *Saccharomyces cerevisiae*, indicant que ambdues proteïnes no només són homòlegs estructurals, sinó que també són homòlegs funcionals.

3.-La mutació *scp160Δ* presenta, amb una penetració incompleta, hipersensibilitat a drogues desestabilitzadores de microtubuls. Aquest fet és consistent amb alteracions en el procés de segregació cromosòmica. Malgrat això, aquestes cèl·lules no manifesten un increment en la taxa de pèrdua dels plasmidis centromèrics.

4.- Les cèl·lules mutants *scp160Δ* presenten, amb una penetració incompleta, un fenotip de sensibilitat a temperatures elevades, no essent capaces de créixer a 37°C, suggerint que la manca de la proteïna Scp160 produeix defectes estructurals.

5.- La mutació *scp160Δ* es comporta com un supressor de silenciament en les regions telomèriques i en el *locus* del *mating type*, però no té cap efecte en el silenciament del *locus* del rDNA.

6.- Consistent amb l'efecte de desrepressió observat en les regions telomèriques, les cèl·lules mutants *scp160Δ* presenten una desregulació en la llargada de les seqüències telomèriques suggerint una implicació de Scp160 en el manteniment d'aquestes seqüències.

7.- La pèrdua de silenciament telomèric observada en les cèl·lules mutants *scp160Δ* és recuperable mitjançant la mutació de la histona desacetilasa Rpd3 i la sobreexpressió de la proteïna Sir3, indicant que l'efecte de desrepressió telomèrica té lloc per una alteració específica en les regions telomèriques i descartant un efecte indirecte com a resultat de la implicació de Scp160 en el procés de síntesi protèica com a part activa de la maquinària traduccional general de la cèl·lula.

8.- Les cèl·lules mutants *scp160Δ* presenten un menor contingut de la proteïna Sir3 en les seqüències telomèriques. Consistent amb aquest resultat, la sobreexpressió de Sir3 i la doble mutació dels gens *RIF1* i *RIF2* dificulta l'establiment del fenotip de pèrdua de silenciament telomèric associat a la deleció del gen *SCP160*. Aquests resultats permeten suggerir una contribució de la proteïna Scp160 a la deposició de Sir3 en les regions telomèriques, si bé no permeten discernir entre una contribució directa o una acció indirecta com a resultat de la regulació d'altres proteïnes implicades en aquest procés.

9.- Les mutacions *rpd3* i *rif1Δ rif2Δ*, que incrementen el silenciament telomèric, presenten una major dificultat en l'establiment de la ploidia aberrant observada en delectonar el gen *SCP160*, suggerint una relació entre l'establiment del fenotip de ploidia aberrant i les propietats de l'heterocromatina telomèrica.

10.- La sobreexpressió de la proteïna Scp160 no té cap efecte sobre el silenciament telomèric en soques *wild type*, i no és capaç de recuperar la pèrdua de silenciament observat en les cèl·lules mutants *scp160Δ* indicant que la pròpia proteïna Scp160 és incapaç de recuperar els defectes ocasionats per la seva manca un cop ja establerts.

11.- La proteïna Scp160 mostra una localització perinuclear compatible amb la presència d'aquesta proteïna en les regions telomèriques. No obstant, la presència de la proteïna Scp160 en aquestes regions no ha pogut ser determinada mitjançant experiments d'immunoprecipitació de cromatina amb anticossos específics. Són necessaris treballs posteriors per tal de determinar si Scp160 es localitza a les regions telomèriques d'aquest organisme.

## **VIII. BIBLIOGRAFIA**





Aagaard, L., G. Laible, P. Selenko, M. Schmid, R. Dorn, G. Schotta, S. Kuhfittig, A. Wolf, A. Lebersorger, P. B. Singh, G. Reuter and T. Jenuwein (1999). "Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31." *Embo J* **18**: 1923-38.

Abad, J. P., M. Carmena, S. Baars, R. D. Saunders, D. M. Glover, P. Ludena, C. Sentis, C. Tyler-Smith and A. Villasante (1992). "Dodeca satellite: a conserved G+C-rich satellite from the centromeric heterochromatin of *Drosophila melanogaster*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4663-7.

Akhtar, A., D. Zink and P. B. Becker (2000). "Chromodomains are protein-RNA interaction modules." *Nature* **407**: 405-9.

Alfenito, M. R. and J. A. Birchler (1993). "Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence." *Genetics* **135**: 589-97.

Allfrey, V. G. (1977). Post-synthetic modifications of histone structure: a mechanism for the control of chromosome structure by modulation of histone-DNA interactions. *Chromatin and chromosome structure*. L. H.R. and E. R., Academic Press. New York: 167-191.

Allshire, R. C., J. P. Javerzat, N. J. Redhead and G. Cranston (1994). "Position effect variegation at fission yeast centromeres." *Cell* **76**: 157-69.

Allshire, R. C., E. R. Nimmo, K. Ekwall, J. P. Javerzat and G. Cranston (1995). "Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation." *Genes Dev* **9**: 218-33.

Aparicio, O. M., B. L. Billington and D. E. Gottschling (1991). "Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*." *Cell* **66**: 1279-87.

Avramova, Z. V. (2002). "Heterochromatin in animals and plants. Similarities and differences." *Plant Physiol* **129**: 40-9.

Baber, J. L., D. Libutti, D. Levens and N. Tjandra (1999). "High precision solution structure of the C-terminal KH domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, a c-myc transcription factor." *J Mol Biol* **289**: 949-62.

Bannister, A. J., P. Zegerman, J. F. Partridge, E. A. Miska, J. O. Thomas, R. C. Allshire and T. Kouzarides (2001). "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain." *Nature* **410**: 120-4.

Barnes, G. and D. Rio (1997). "DNA double-strand-break sensitivity, DNA replication, and cell cycle arrest phenotypes of Ku-deficient *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 867-72.

Bartee, L., F. Malagnac and J. Bender (2001). "Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene." *Genes Dev* **15**: 1753-8.

Baum, S., M. Bittins, S. Frey and M. Seedorf (2004). "Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes." *Biochem J* **Pt**.

Bell, S. P. and A. Dutta (2002). "DNA replication in eukaryotic cells." *Annu Rev Biochem* **71**: 333-74.

Berben, G., J. Dumont, V. Gilliquet, P. A. Bolle and F. Hilger (1991). "The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **7**: 475-7.

Bernard, P., K. Hardwick and J. P. Javerzat (1998). "Fission yeast bub1 is a mitotic centromere protein essential for the spindle checkpoint and the preservation of correct ploidy through mitosis." *J Cell Biol* **143**: 1775-87.

Bernard, P., J. F. Maure, J. F. Partridge, S. Genier, J. P. Javerzat and R. C. Allshire (2001). "Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres." *Science* **294**: 2539-42.

Bernstein, B. E., E. L. Humphrey, R. L. Erlich, R. Schneider, P. Bouman, J. S. Liu, T. Kouzarides and S. L. Schreiber (2002). "Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8695-700.

Bernstein, B. E., J. K. Tong and S. L. Schreiber (2000). "Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13708-13.

Boeke, J. D., F. LaCroute and G. R. Fink (1984). "A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance." *Mol Gen Genet* **197**: 345-6.

Boscheron, C., L. Maillet, S. Marcand, M. Tsai-Pflugfelder, S. M. Gasser and E. Gilson (1996). "Cooperation at a distance between silencers and proto-silencers at the yeast HML locus." *Embo J* **15**: 2184-95.

Boulton, S. J. and S. P. Jackson (1996). "Saccharomyces cerevisiae Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways." *Embo J* **15**: 5093-103.

Bourns, B. D., M. K. Alexander, A. M. Smith and V. A. Zakian (1998). "Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind Saccharomyces telomeres in vivo." *Mol Cell Biol* **18**: 5600-8.

Braddock, D. T., J. L. Baber, D. Levens and G. M. Clore (2002a). "Molecular basis of sequence-specific single-stranded DNA recognition by KH domains: solution structure of a complex between hnRNP K KH3 and single-stranded DNA." *Embo J* **21**: 3476-85.

Braddock, D. T., J. M. Louis, J. L. Baber, D. Levens and G. M. Clore (2002b). "Structure and dynamics of KH domains from FBP bound to single-stranded DNA." *Nature* **415**: 1051-6.

Brand, A. H., L. Breeden, J. Abraham, R. Sternglanz and K. Nasmyth (1985). "Characterization of a "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer." *Cell* **41**: 41-8.

Braunstein, M., A. B. Rose, S. G. Holmes, C. D. Allis and J. R. Broach (1993). "Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation." *Genes Dev* **7**: 592-604.

Braunstein, M., R. E. Sobel, C. D. Allis, B. M. Turner and J. R. Broach (1996). "Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern." *Mol Cell Biol* **16**: 4349-56.

Briggs, S. D., M. Bryk, B. D. Strahl, W. L. Cheung, J. K. Davie, S. Y. Dent, F. Winston and C. D. Allis (2001). "Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev* **15**: 3286-95.

Brownell, J. E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D. G. Edmondson, S. Y. Roth and C. D. Allis (1996). "Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation." *Cell* **84**: 843-51.

Burd, C. G. and G. Dreyfuss (1994). "Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins." *Science* **265**: 615-21.

Burns, N., B. Grimwade, P. B. Ross-Macdonald, E. Y. Choi, K. Finberg, G. S. Roeder and M. Snyder (1994). "Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev* **8**: 1087-105.

Cannon, R. D., H. F. Jenkinson and M. G. Shepherd (1992). "Cloning and expression of *Candida albicans* ADE2 and proteinase genes on a replicative plasmid in *C. albicans* and in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet* **235**: 453-7.

Castiglione Morelli, M. A., G. Stier, T. Gibson, C. Joseph, G. Musco, A. Pastore and G. Trave (1995). "The KH module has an alpha beta fold." *FEBS Lett* **358**: 193-8.

Chen, T., B. B. Damaj, C. Herrera, P. Lasko and S. Richard (1997). "Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain." *Mol Cell Biol* **17**: 5707-18.

Chen, X., D. L. Court and X. Ji (1999). "Crystal structure of ERA: a GTPase-dependent cell cycle regulator containing an RNA binding motif." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8396-401.

Chial, H. J., A. J. Stemm-Wolf, S. McBratney and M. Winey (2000). "Yeast Eap1p, an eIF4E-associated protein, has a separate function involving genetic stability." *Curr Biol* **10**: 1519-22.

Chiu, D. S., J. F. Oram, R. C. LeBoeuf, C. E. Alpers and K. D. O'Brien (1997). "High-density lipoprotein-binding protein (HBP)/vigilin is expressed in human atherosclerotic lesions and colocalizes with apolipoprotein E." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 2350-8.

Christianson, T. W., R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero and P. Hieter (1992). "Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors." *Gene* **110**: 119-22.

Clark, J. M. (1988). "Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases." *Nucleic Acids Res* **16**: 9677-86.

Clarke, D. J., L. P. O'Neill and B. M. Turner (1993). "Selective use of H4 acetylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochem J* **294 ( Pt 2)**: 557-61.

Cockell, M., F. Palladino, T. Laroche, G. Kyrion, C. Liu, A. J. Lustig and S. M. Gasser (1995). "The carboxy termini of Sir4 and Rap1 affect Sir3 localization: evidence for a multicomponent complex required for yeast telomeric silencing." *J Cell Biol* **129**: 909-24.

Cortes, A. and F. Azorin (2000). "DDP1, a heterochromatin-associated multi-KH-domain protein of *Drosophila melanogaster*, interacts specifically with centromeric satellite DNA sequences." *Mol Cell Biol* **20**: 3860-9.

Cortes, A., D. Huertas, L. Fanti, S. Pimpinelli, F. X. Marsellach, B. Pina and F. Azorin (1999). "DDP1, a single-stranded nucleic acid-binding protein of *Drosophila*, associates with pericentric heterochromatin and is functionally homologous to the yeast Scp160p, which is involved in the control of cell ploidy." *Embo J* **18**: 3820-33.

Cortes, A., D. Huertas, F. X. Marsellach, N. Ferrer-Miralles, M. Ortiz-Lombardia, L. Fanti, S. Pimpinelli, B. Pina and F. Azorin (2003). "Analysing the contribution of nucleic acids to the structure and properties of centric heterochromatin." *Genetica* **117**: 117-25.

Courey, A. J. and S. Jia (2001). "Transcriptional repression: the long and the short of it." *Genes Dev* **15**: 2786-96.

Couzin, J. (2002). "Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash." *Science* **298**: 2296-7.

Cunningham, K. S., R. E. Dodson, M. A. Nagel, D. J. Shapiro and D. R. Schoenberg (2000). "Vigilin binding selectively inhibits cleavage of the vitellogenin mRNA 3'-untranslated region by the mRNA endonuclease polysomal ribonuclease 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12498-502.

De Rubertis, F., D. Kadosh, S. Henchoz, D. Pauli, G. Reuter, K. Struhl and P. Spierer (1996). "The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast." *Nature* **384**: 589-91.

Dejgaard, K. and H. Leffers (1996). "Characterisation of the nucleic-acid-binding activity of KH domains. Different properties of different domains." *Eur J Biochem* **241**: 425-31.

Delahodde, A., A. M. Becam, J. Perea and C. Jacq (1986). "A yeast protein HX has homologies with the histone H2AF expressed in chicken embryo." *Nucleic Acids Res* **14**: 9213-4.

Delgado, M. A. and J. Conde (1984). "Benomyl prevents nuclear fusion in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet* **193**: 188-9.

Dhalluin, C., J. E. Carlson, L. Zeng, C. He, A. K. Aggarwal and M. M. Zhou (1999). "Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain." *Nature* **399**: 491-6.

Dhillon, N. and R. T. Kamakaka (2002). "Breaking through to the other side: silencers and barriers." *Curr Opin Genet Dev* **12**: 188-92.

Dobosy, J. R. and E. U. Selker (2001). "Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation." *Cell Mol Life Sci* **58**: 721-7.

Dodson, R. E. and D. J. Shapiro (1997). "Vigilin, a ubiquitous protein with 14 K homology domains, is the estrogen-inducible vitellogenin mRNA 3'-untranslated region-binding protein." *J Biol Chem* **272**: 12249-52.

Dodson, R. E. and D. J. Shapiro (2002). "Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **72**: 129-64.

Dorer, D. R. and S. Henikoff (1994). "Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*." *Cell* **77**: 993-1002.

Dujon, B. (1996). "The yeast genome project: what did we learn?" *Trends Genet* **12**: 263-70.

Duncan, R., L. Bazar, G. Michelotti, T. Tomonaga, H. Krutzsch, M. Avigan and D. Levens (1994). "A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of c-myc and defines a new DNA-binding motif." *Genes Dev* **8**: 465-80.

Ekwall, K. (2004). "The RITS complex-A direct link between small RNA and heterochromatin." *Mol Cell* **13**: 304-5.

Ekwall, K., G. Cranston and R. C. Allshire (1999). "Fission yeast mutants that alleviate transcriptional silencing in centromeric flanking repeats and disrupt chromosome segregation." *Genetics* **153**: 1153-69.

Fahrner, J. A. and S. B. Baylin (2003). "Heterochromatin: stable and unstable invasions at home and abroad." *Genes Dev* **17**: 1805-12.

Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal Biochem* **132**: 6-13.

Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum." *Anal Biochem* **137**: 266-7.

Ferrer, N., F. Azorin, A. Villasante, C. Gutierrez and J. P. Abad (1995). "Centromeric dodeca-satellite DNA sequences form fold-back structures." *J Mol Biol* **245**: 8-21.

Fischer, C. R. (1969). "Enzymology of the pigmented adenine-requiring mutants of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces*." *Biochem Biophys Res Commun* **34**: 306-310.

Fourel, G., E. Lebrun and E. Gilson (2002). "Protosilencers as building blocks for heterochromatin." *Bioessays* **24**: 828-35.

Fourel, G., E. Revardel, C. E. Koering and E. Gilson (1999). "Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions." *Embo J* **18**: 2522-37.

Freund, J. (1956). "The mode of action of immunologic adjuvants." *Bibl Tuberc*: 130-48.

Frey, S., M. Pool and M. Seedorf (2001). "Scp160p, an RNA-binding, polysome-associated protein, localizes to the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae* in a microtubule-dependent manner." *J Biol Chem* **276**: 15905-12.

Fry, K. and W. Salser (1977). "Nucleotide sequences of HS-alpha satellite DNA from kangaroo rat *Dipodomys ordii* and characterization of similar sequences in other rodents." *Cell* **12**: 1069-84.

Garvik, B., M. Carson and L. Hartwell (1995). "Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint." *Mol Cell Biol* **15**: 6128-38.

Gasser, S. M. (2000). "A sense of the end." *Science* **288**: 1377-9.



Gietz, R. D. and R. A. Woods (2001). "Genetic transformation of yeast." *Biotechniques* **30**: 816-20, 822-6, 828 passim.

Giniger, E., S. M. Varnum and M. Ptashne (1985). "Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast." *Cell* **40**: 767-74.

Git, A. and N. Standart (2002). "The KH domains of *Xenopus* Vg1RBP mediate RNA binding and self-association." *Rna* **8**: 1319-33.

Goolsby, K. M. and D. J. Shapiro (2003). "RNAi-mediated depletion of the 15 KH domain protein, vigilin, induces death of dividing and non-dividing human cells but does not initially inhibit protein synthesis." *Nucleic Acids Res* **31**: 5644-53.

Gopal, B., L. F. Haire, S. J. Gamblin, E. J. Dodson, A. N. Lane, K. G. Papavinasasundaram, M. J. Colston and G. Dodson (2001). "Crystal structure of the transcription elongation/anti-termination factor NusA from *Mycobacterium tuberculosis* at 1.7 Å resolution." *J Mol Biol* **314**: 1087-95.

Gotta, M., T. Laroche, A. Formenton, L. Maillet, H. Scherthan and S. M. Gasser (1996). "The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* **134**: 1349-63.

Gottschling, D. E., O. M. Aparicio, B. L. Billington and V. A. Zakian (1990). "Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription." *Cell* **63**: 751-62.

Grady, D. L., R. L. Ratliff, D. L. Robinson, E. C. McCanlies, J. Meyne and R. K. Moyzis (1992). "Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 1695-9.

Greider, C. W. (1996). "Telomere length regulation." *Annu Rev Biochem* **65**: 337-65.

Grewal, S. I. and A. J. Klar (1997). "A recombinationally repressed region between *mat2* and *mat3* loci shares homology to centromeric repeats and regulates directionality of mating-type switching in fission yeast." *Genetics* **146**: 1221-38.

Grewal, S. I. and D. Moazed (2003). "Heterochromatin and epigenetic control of gene expression." *Science* **301**: 798-802.

Grishin, N. V. (2001). "KH domain: one motif, two folds." *Nucleic Acids Res* **29**: 638-43.

Grunstein, M. (1997). "Molecular model for telomeric heterochromatin in yeast." *Curr Opin Cell Biol* **9**: 383-7.

Guarente, L. (2000). "Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging." *Genes Dev* **14**: 1021-6.

Guo, M., C. Aston, S. A. Burchett, C. Dyke, S. Fields, S. J. Rajarao, P. Uetz, Y. Wang, K. Young and H. G. Dohlman (2003). "The yeast G protein alpha subunit Gpa1 transmits a signal through an RNA binding effector protein Scp160." *Mol Cell* **12**: 517-24.

Haber, J. E. (1998). "Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*." *Annu Rev Genet* **32**: 561-99.

Hadfield, C., B. E. Jordan, R. C. Mount, G. H. Pretorius and E. Burak (1990). "G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Genet* **18**: 303-13.

Hall, I. M., K. Noma and S. I. Grewal (2003). "RNA interference machinery regulates chromosome dynamics during mitosis and meiosis in fission yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 193-8.

Hall, I. M., G. D. Shankaranarayana, K. Noma, N. Ayoub, A. Cohen and S. I. Grewal (2002). "Establishment and maintenance of a heterochromatin domain." *Science* **297**: 2232-7.

Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." *Nature* **418**: 244-51.

Hardy, C. F., L. Sussel and D. Shore (1992). "A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation." *Genes Dev* **6**: 801-14.

Hazbun, T. R., L. Malmstrom, S. Anderson, B. J. Graczyk, B. Fox, M. Riffle, B. A. Sundin, J. D. Aranda, W. H. McDonald, C. H. Chiu, B. E. Snydsman, P. Bradley, E. G. Muller, S. Fields, D. Baker, J. R. Yates, 3rd and T. N. Davis (2003). "Assigning function to yeast proteins by integration of technologies." *Mol Cell* **12**: 1353-65.

Hecht, A., T. Laroche, S. Strahl-Bolsinger, S. M. Gasser and M. Grunstein (1995). "Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast." *Cell* **80**: 583-92.

Hecht, A., S. Strahl-Bolsinger and M. Grunstein (1996). "Spreading of transcriptional repressor SIR3 from telomeric heterochromatin." *Nature* **383**: 92-6.

Hendrich, B. and A. Bird (1998). "Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins." *Mol Cell Biol* **18**: 6538-47.

Henikoff, S. (2000). "Heterochromatin function in complex genomes." *Biochim Biophys Acta* **1470**: O1-8.

Henikoff, S. and L. Comai (1998). "A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in Arabidopsis." *Genetics* **149**: 307-18.

Henkel, B., C. Schmidt, H. Zorbas, E. Poschl, T. R. Gloe, W. G. Purschke and P. K. Muller (1992). "Chicken vigilin gene organization and expression pattern. The domain structure of the protein is reflected by the exon structure." *Eur J Biochem* **209**: 321-8.

Hilgendorf, I., O. Gellersen, J. Emmrich, U. Mikkat, J. Rohwedel, H. J. Krammer, P. K. Muller and C. Kruse (2001). "Estradiol has a direct impact on the exocrine pancreas as demonstrated by enzyme and vigilin expression." *Pancreatology* **1**: 24-9.

Hilgendorf, I., M. Van de Perck, J. Emmrich, H. J. Krammer and C. Kruse (2003). "Vigilin and enzyme expression in isolated pancreatic acini after mellitin and gamma-interferon treatment." *Pancreatology* **3**: 336-41.

Hinnen, A., J. B. Hicks and G. R. Fink (1978). "Transformation of yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 1929-33.

Huang, Y. J., G. V. Swapna, P. K. Rajan, H. Ke, B. Xia, K. Shukla, M. Inouye and G. T. Montelione (2003). "Solution NMR structure of ribosome-binding factor A (RbfA), a cold-shock adaptation protein from *Escherichia coli*." *J Mol Biol* **327**: 521-36.

Hwang, K. K., J. C. Eissenberg and H. J. Worman (2001). "Transcriptional repression of euchromatic genes by *Drosophila* heterochromatin protein 1 and histone modifiers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11423-7.

Hyland, K. M., J. Kingsbury, D. Koshland and P. Hieter (1999). "Ctf19p: A novel kinetochore protein in *Saccharomyces cerevisiae* and a potential link between the kinetochore and mitotic spindle." *J Cell Biol* **145**: 15-28.

Imai, S., C. M. Armstrong, M. Kaerberlein and L. Guarente (2000). "Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase." *Nature* **403**: 795-800.

Interthal, H., C. Bellocq, J. Bahler, V. I. Bashkirov, S. Edelstein and W. D. Heyer (1995). "A role of Sep1 (= Kem1, Xrn1) as a microtubule-associated protein in *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo J* **14**: 1057-66.

Irie, K., T. Tadauchi, P. A. Takizawa, R. D. Vale, K. Matsumoto and I. Herskowitz (2002). "The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast." *Embo J* **21**: 1158-67.

Ito, T., T. Chiba, R. Ozawa, M. Yoshida, M. Hattori and Y. Sakaki (2001). "A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4569-74.

Ivy, J. M., A. J. Klar and J. B. Hicks (1986). "Cloning and characterization of four SIR genes of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **6**: 688-702.

Jackson, C. L. and F. Kepes (1994). "BFR1, a multicopy suppressor of brefeldin A-induced lethality, is implicated in secretion and nuclear segregation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **137**: 423-37.

Jacobs, C. W., A. E. Adams, P. J. Szaniszlo and J. R. Pringle (1988). "Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle." *J Cell Biol* **107**: 1409-26.

Jensen, K. B., K. Musunuru, H. A. Lewis, S. K. Burley and R. B. Darnell (2000). "The tetranucleotide UCAY directs the specific recognition of RNA by the Nova K-homology 3 domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 5740-5.

Jenuwein, T. (2001). "Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases." *Trends Cell Biol* **11**: 266-73.

Jenuwein, T. (2002). "Molecular biology. An RNA-guided pathway for the epigenome." *Science* **297**: 2215-8.

Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." *Science* **293**: 1074-80.

Ji, X., J. Kong and S. A. Liebhaber (2003). "In vivo association of the stability control protein alphaCP with actively translating mRNAs." *Mol Cell Biol* **23**: 899-907.

Jimenez, A. and J. Davies (1980). "Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*." *Nature* **287**: 869-71.

Jones, A. R. and T. Schedl (1995). "Mutations in *gld-1*, a female germ cell-specific tumor suppressor gene in *Caenorhabditis elegans*, affect a conserved domain also found in Src-associated protein Sam68." *Genes Dev* **9**: 1491-504.

Kanamori, H., R. E. Dodson and D. J. Shapiro (1998). "In vitro genetic analysis of the RNA binding site of vigilin, a multi-KH-domain protein." *Mol Cell Biol* **18**: 3991-4003.

Kass-Eisler, A. and C. W. Greider (2000). "Recombination in telomere-length maintenance." *Trends Biochem Sci* **25**: 200-4.

Kayne, P. S., U. J. Kim, M. Han, J. R. Mullen, F. Yoshizaki and M. Grunstein (1988). "Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast." *Cell* **55**: 27-39.

Kerem, B. S., R. Goitein, G. Diamond, H. Cedar and M. Marcus (1984). "Mapping of DNAase I sensitive regions on mitotic chromosomes." *Cell* **38**: 493-9.

Kiledjian, M., X. Wang and S. A. Liebhaber (1995). "Identification of two KH domain proteins in the alpha-globin mRNP stability complex." *Embo J* **14**: 4357-64.

Kilmartin, J. V. (1981). "Purification of yeast tubulin by self-assembly in vitro." *Biochemistry* **20**: 3629-33.

Kim, J. H., B. Hahm, Y. K. Kim, M. Choi and S. K. Jang (2000). "Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm." *J Mol Biol* **298**: 395-405.

Kimura, A., T. Umehara and M. Horikoshi (2002). "Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing." *Nat Genet* **32**: 370-7.

Kipling, D. and S. E. Kearsey (1990). "Reversion of autonomously replicating sequence mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: creation of a eucaryotic replication origin within procaryotic vector DNA." *Mol Cell Biol* **10**: 265-72.

Klinger, M. H. and C. Kruse (1996). "Immunocytochemical localization of vigilin, a tRNA-binding protein, after cell fractionation and within the exocrine pancreatic cell of the rat." *Anat Anz* **178**: 331-5.

Kornberg, R. D. (1974). "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." *Science* **184**: 868-71.

Kornberg, R. D. and Y. Lorch (1999). "Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome." *Cell* **98**: 285-94.

Krogan, N. J., J. Dover, S. Khorrami, J. F. Greenblatt, J. Schneider, M. Johnston and A. Shilatifard (2002). "COMPASS, a histone H3 (Lysine 4) methyltransferase required for telomeric silencing of gene expression." *J Biol Chem* **277**: 10753-5.

Kruse, C., J. Emmrich, E. Rumpel, M. H. Klinger, A. Grunweller, J. Rohwedel, H. J. Krammer, W. Kuhnel and P. K. Muller (1998a). "Production of trypsin by cells of

the exocrine pancreas is paralleled by the expression of the KH protein vigilin." *Exp Cell Res* **239**: 111-8.

Kruse, C., A. Grunweller, H. Notbohm, S. Kugler, W. G. Purschke and P. K. Muller (1996). "Evidence for a novel cytoplasmic tRNA-protein complex containing the KH-multidomain protein vigilin." *Biochem J* **320 ( Pt 1)**: 247-52.

Kruse, C., A. Grunweller, D. K. Willkomm, T. Pfeiffer, R. K. Hartmann and P. K. Muller (1998b). "tRNA is entrapped in similar, but distinct, nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein complexes, both of which contain vigilin and elongation factor 1 alpha." *Biochem J* **329 ( Pt 3)**: 615-21.

Kruse, C., D. Willkomm, J. Gebken, A. Schuh, H. Stossberg, T. Vollbrandt and P. K. Muller (2003). "The multi-KH protein vigilin associates with free and membrane-bound ribosomes." *Cell Mol Life Sci* **60**: 2219-27.

Kruse, C., D. K. Willkomm, A. Grunweller, T. Vollbrandt, S. Sommer, S. Busch, T. Pfeiffer, J. Brinkmann, R. K. Hartmann and P. K. Muller (2000). "Export and transport of tRNA are coupled to a multi-protein complex." *Biochem J* **346 Pt 1**: 107-15.

Kugler, S., A. Grunweller, C. Probst, M. Klinger, P. K. Muller and C. Kruse (1996). "Vigilin contains a functional nuclear localisation sequence and is present in both the cytoplasm and the nucleus." *FEBS Lett* **382**: 330-4.

Kurdistani, S. K. and M. Grunstein (2003). "In vivo protein-protein and protein-DNA crosslinking for genomewide binding microarray." *Methods* **31**: 90-5.

Kurdistani, S. K., D. Robyr, S. Tavazoie and M. Grunstein (2002). "Genome-wide binding map of the histone deacetylase Rpd3 in yeast." *Nat Genet* **31**: 248-54.

Kutay, U., G. Lipowsky, E. Izaurralde, F. R. Bischoff, P. Schwarzmaier, E. Hartmann and D. Gorlich (1998). "Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor." *Mol Cell* **1**: 359-69.

Kyrion, G., K. Liu, C. Liu and A. J. Lustig (1993). "RAP1 and telomere structure regulate telomere position effects in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev* **7**: 1146-59.

Labrador, M. and V. G. Corces (2002). "Setting the boundaries of chromatin domains and nuclear organization." *Cell* **111**: 151-4.

Lachner, M., D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler and T. Jenuwein (2001). "Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins." *Nature* **410**: 116-20.

Lacoste, N., R. T. Utley, J. M. Hunter, G. G. Poirier and J. Cote (2002). "Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone H3 methyltransferase." *J Biol Chem* **277**: 30421-4.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-5.

Lang, B. D. and J. L. Fridovich-Keil (2000). "Scp160p, a multiple KH-domain protein, is a component of mRNP complexes in yeast." *Nucleic Acids Res* **28**: 1576-84.

Lang, B. D., A. Li, H. D. Black-Brewster and J. L. Fridovich-Keil (2001). "The brefeldin A resistance protein Bfr1p is a component of polyribosome-associated mRNP complexes in yeast." *Nucleic Acids Res* **29**: 2567-74.

Lebrun, E., E. Revardel, C. Boscheron, R. Li, E. Gilson and G. Fourel (2001). "Protosilencers in *Saccharomyces cerevisiae* subtelomeric regions." *Genetics* **158**: 167-76.

Lee, M. H. and T. Schedl (2001). "Identification of in vivo mRNA targets of GLD-1, a maxi-KH motif containing protein required for *C. elegans* germ cell development." *Genes Dev* **15**: 2408-20.

Leffers, H., K. Dejgaard and J. E. Celis (1995). "Characterisation of two major cellular poly(rC)-binding human proteins, each containing three K-homologous (KH) domains." *Eur J Biochem* **230**: 447-53.



Lewis, H. A., H. Chen, C. Edo, R. J. Buckanovich, Y. Y. Yang, K. Musunuru, R. Zhong, R. B. Darnell and S. K. Burley (1999). "Crystal structures of Nova-1 and Nova-2 K-homology RNA-binding domains." *Structure Fold Des* **7**: 191-203.

Lewis, H. A., K. Musunuru, K. B. Jensen, C. Edo, H. Chen, R. B. Darnell and S. K. Burley (2000). "Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome." *Cell* **100**: 323-32.

Li, A. M., A. Watson and J. L. Fridovich-Keil (2003). "Scp160p associates with specific mRNAs in yeast." *Nucleic Acids Res* **31**: 1830-7.

Li, R. and A. W. Murray (1991). "Feedback control of mitosis in budding yeast." *Cell* **66**: 519-31.

Lindroth, A. M., X. Cao, J. P. Jackson, D. Zilberman, C. M. McCallum, S. Henikoff and S. E. Jacobsen (2001). "Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation." *Science* **292**: 2077-80.

Litt, M. D., M. Simpson, M. Gaszner, C. D. Allis and G. Felsenfeld (2001). "Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus." *Science* **293**: 2453-5.

Liu, J., L. He, I. Collins, H. Ge, D. Libutti, J. Li, J. M. Egly and D. Levens (2000). "The FBP interacting repressor targets TFIID to inhibit activated transcription." *Mol Cell* **5**: 331-41.

Lock, P., S. Fumagalli, P. Polakis, F. McCormick and S. A. Courtneidge (1996). "The human p62 cDNA encodes Sam68 and not the RasGAP-associated p62 protein." *Cell* **84**: 23-4.

Longtine, M. S., S. Enomoto, S. L. Finstad and J. Berman (1992). "Yeast telomere repeat sequence (TRS) improves circular plasmid segregation, and TRS plasmid segregation involves the RAP1 gene product." *Mol Cell Biol* **12**: 1997-2009.

Longtine, M. S., A. McKenzie, 3rd, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen and J. R. Pringle (1998). "Additional modules for versatile

and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **14**: 953-61.

Lorentz, A., L. Heim and H. Schmidt (1992). "The switching gene *swi6* affects recombination and gene expression in the mating-type region of *Schizosaccharomyces pombe*." *Mol Gen Genet* **233**: 436-42.

Lorkovic, Z. J. and A. Barta (2002). "Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." *Nucleic Acids Res* **30**: 623-35.

Louis, E. J. (1995). "The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **11**: 1553-73.

Louis, E. J. and R. H. Borts (1995). "A complete set of marked telomeres in *Saccharomyces cerevisiae* for physical mapping and cloning." *Genetics* **139**: 125-36.

Lowell, J. E. and L. Pillus (1998). "Telomere tales: chromatin, telomerase and telomere function in *Saccharomyces cerevisiae*." *Cell Mol Life Sci* **54**: 32-49.

Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* **389**: 251-60.

Lundblad, V. (2002). "Telomere maintenance without telomerase." *Oncogene* **21**: 522-31.

Luo, K., M. A. Vega-Palas and M. Grunstein (2002). "Rap1-Sir4 binding independent of other Sir, yKu, or histone interactions initiates the assembly of telomeric heterochromatin in yeast." *Genes Dev* **16**: 1528-39.

Mahone, M., E. E. Saffman and P. F. Lasko (1995). "Localized Bicaudal-C RNA encodes a protein containing a KH domain, the RNA binding motif of FMR1." *Embo J* **14**: 2043-55.

Mahoney, D. J. and J. R. Broach (1989). "The HML mating-type cassette of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by two separate but functionally equivalent silencers." *Mol Cell Biol* **9**: 4621-30.

Maison, C., D. Bailly, A. H. Peters, J. P. Quivy, D. Roche, A. Taddei, M. Lachner, T. Jenuwein and G. Almouzni (2002). "Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component." *Nat Genet* **30**: 329-34.

Makarov, V. L., Y. Hirose and J. P. Langmore (1997). "Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening." *Cell* **88**: 657-66.

Marcand, S., E. Gilson and D. Shore (1997). "A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast." *Science* **275**: 986-90.

Marcil, M., L. Yu, L. Krimbou, B. Boucher, J. F. Oram, J. S. Cohn and J. Genest, Jr. (1999). "Cellular cholesterol transport and efflux in fibroblasts are abnormal in subjects with familial HDL deficiency." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 159-69.

Marshall, W. F., A. F. Dernburg, B. Harmon, D. A. Agard and J. W. Sedat (1996). "Specific interactions of chromatin with the nuclear envelope: positional determination within the nucleus in *Drosophila melanogaster*." *Mol Biol Cell* **7**: 825-42.

Martin, S. G., T. Laroche, N. Suka, M. Grunstein and S. M. Gasser (1999). "Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast." *Cell* **97**: 621-33.

Matunis, M. J., W. M. Michael and G. Dreyfuss (1992). "Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein." *Mol Cell Biol* **12**: 164-71.

Matzke, M., A. J. Matzke and J. M. Kooter (2001). "RNA: guiding gene silencing." *Science* **293**: 1080-3.

McElligott, R. and R. J. Wellinger (1997). "The terminal DNA structure of mammalian chromosomes." *Embo J* **16**: 3705-14.

McGrew, J. T., L. Goetsch, B. Byers and P. Baum (1992). "Requirement for ESP1 in the nuclear division of *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* **3**: 1443-54.

McKnight, G. L., J. Reasoner, T. Gilbert, K. O. Sundquist, B. Hokland, P. A. McKernan, J. Champagne, C. J. Johnson, M. C. Bailey, R. Holly and et al. (1992). "Cloning and expression of a cellular high density lipoprotein-binding protein that is up-regulated by cholesterol loading of cells." *J Biol Chem* **267**: 12131-41.

Mendelsohn, B. A., A. M. Li, C. A. Vargas, K. Riehman, A. Watson and J. L. Fridovich-Keil (2003). "Genetic and biochemical interactions between SCP160 and EAP1 in yeast." *Nucleic Acids Res* **31**: 5838-47.

Meneghini, M. D., M. Wu and H. D. Madhani (2003). "Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin." *Cell* **112**: 725-36.

Michelotti, G. A., E. F. Michelotti, A. Pullner, R. C. Duncan, D. Eick and D. Levens (1996). "Multiple single-stranded cis elements are associated with activated chromatin of the human c-myc gene in vivo." *Mol Cell Biol* **16**: 2656-69.

Milne, G. T., S. Jin, K. B. Shannon and D. T. Weaver (1996). "Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **16**: 4189-98.

Moazed, D. (2001). "Common themes in mechanisms of gene silencing." *Mol Cell* **8**: 489-98.

Moazed, D., A. Kistler, A. Axelrod, J. Rine and A. D. Johnson (1997). "Silent information regulator protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*: a SIR2/SIR4 complex and evidence for a regulatory domain in SIR4 that inhibits its interaction with SIR3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2186-91.

Muchardt, C., M. Guilleme, J. S. Seeler, D. Trouche, A. Dejean and M. Yaniv (2002). "Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha." *EMBO Rep* **3**: 975-81.

Muller, H. J. (1930). "Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*." *J Genet* **22**: 299-334.

Murphy, T. D. and G. H. Karpen (1995). "Localization of centromere function in a *Drosophila* minichromosome." *Cell* **82**: 599-609.

Musco, G., A. Kharrat, G. Stier, F. Fraternali, T. J. Gibson, M. Nilges and A. Pastore (1997). "The solution structure of the first KH domain of FMR1, the protein responsible for the fragile X syndrome." *Nat Struct Biol* **4**: 712-6.

Musco, G., G. Stier, C. Joseph, M. A. Castiglione Morelli, M. Nilges, T. J. Gibson and A. Pastore (1996). "Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome." *Cell* **85**: 237-45.

Nakayama, J., J. C. Rice, B. D. Strahl, C. D. Allis and S. I. Grewal (2001). "Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly." *Science* **292**: 110-3.

Nandabalan, K., L. Price and G. S. Roeder (1993). "Mutations in U1 snRNA bypass the requirement for a cell type-specific RNA splicing factor." *Cell* **73**: 407-15.

Nazih-Sanderson, F., S. Lestavel, S. Nion, D. Rouy, P. Deneffe, J. C. Fruchart, V. Clavey and C. Delbart (1997). "HDL3 binds to glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to activate signalling pathways." *Biochim Biophys Acta* **1358**: 103-12.

Neu-Yilik, G., H. Zorbas, T. R. Gloe, H. M. Raabe, T. A. Hopp-Christensen and P. K. Muller (1993). "Vigilin is a cytoplasmic protein. A study on its expression in primary cells and in established cell lines of different species." *Eur J Biochem* **213**: 727-36.

Ng, H. H., Q. Feng, H. Wang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, Y. Zhang and 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**: 1518-27.

Nimmo, E. R., G. Cranston and R. C. Allshire (1994). "Telomere-associated chromosome breakage in fission yeast results in variegated expression of adjacent genes." *Embo J* **13**: 3801-11.

Nislow, C., E. Ray and L. Pillus (1997). "SET1, a yeast member of the trithorax family, functions in transcriptional silencing and diverse cellular processes." *Mol Biol Cell* **8**: 2421-36.

Noma, K., C. D. Allis and S. I. Grewal (2001). "Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries." *Science* **293**: 1150-5.

Oppenoorth, W. F. (1960). "Modification of the hereditary character of yeast by ingestion of cell-free extracts." *J. Microbiol. Serol.* **26**: 129-68.

Ortiz-Lombardia, M., A. Cortes, D. Huertas, R. Eritja and F. Azorin (1998). "Tandem 5'-GA:GA-3' mismatches account for the high stability of the fold-back structures formed by the centromeric *Drosophila* dodeca-satellite." *J Mol Biol* **277**: 757-62.

Owen, D. J., P. Ornaghi, J. C. Yang, N. Lowe, P. R. Evans, P. Ballario, D. Neuhaus, P. Filetici and A. A. Travers (2000). "The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase *gcn5p*." *Embo J* **19**: 6141-9.

Pal-Bhadra, M., B. A. Leibovitch, S. G. Gandhi, M. Rao, U. Bhadra, J. A. Birchler and S. C. Elgin (2004). "Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery." *Science* **303**: 669-72.

Palladino, F., T. Laroche, E. Gilson, A. Axelrod, L. Pillus and S. M. Gasser (1993a). "SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres." *Cell* **75**: 543-55.

- Palladino, F., T. Laroche, E. Gilson, L. Pillus and S. M. Gasser (1993b). "The positioning of yeast telomeres depends on SIR3, SIR4, and the integrity of the nuclear membrane." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**: 733-46.
- Park, Y. and M. I. Kuroda (2001). "Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation." *Science* **293**: 1083-5.
- Partridge, J. F., K. S. Scott, A. J. Bannister, T. Kouzarides and R. C. Allshire (2002). "cis-acting DNA from fission yeast centromeres mediates histone H3 methylation and recruitment of silencing factors and cohesin to an ectopic site." *Curr Biol* **12**: 1652-60.
- Pemberton, L. F. and G. Blobel (1997). "Characterization of the Wtm proteins, a novel family of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional modulators with roles in meiotic regulation and silencing." *Mol Cell Biol* **17**: 4830-41.
- Peters, A. H., D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schofer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Doyle, M. Sibilia and T. Jenuwein (2001). "Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability." *Cell* **107**: 323-37.
- Petes, T. D. and D. Botstein (1977). "Simple Mendelian inheritance of the reiterated ribosomal DNA of yeast." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5091-5.
- Pillus, L. and J. Rine (1989). "Epigenetic inheritance of transcriptional states in *S. cerevisiae*." *Cell* **59**: 637-47.
- Planta, R. J., P. M. Goncalves and W. H. Mager (1995). "Global regulators of ribosome biosynthesis in yeast." *Biochem Cell Biol* **73**: 825-34.
- Plenz, G., S. Kugler, S. Schnittger, H. Rieder, C. Fonatsch and P. K. Muller (1994). "The human vigilin gene: identification, chromosomal localization and expression pattern." *Hum Genet* **93**: 575-82.
- Pryde, F. E. and E. J. Louis (1999). "Limitations of silencing at native yeast telomeres." *Embo J* **18**: 2538-50.

Quinlan, R. A., C. I. Pogson and K. Gull (1980). "The influence of the microtubule inhibitor, methyl benzimidazol-2-yl-carbamate (MBC) on nuclear division and the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Sci* **46**: 341-52.

Ramos, A., D. Hollingworth, S. A. Major, S. Adinolfi, G. Kelly, F. W. Muskett and A. Pastore (2002). "Role of dimerization in KH/RNA complexes: the example of Nova KH3." *Biochemistry* **41**: 4193-201.

Renauld, H., O. M. Aparicio, P. D. Zierath, B. L. Billington, S. K. Chhablani and D. E. Gottschling (1993). "Silent domains are assembled continuously from the telomere and are defined by promoter distance and strength, and by SIR3 dosage." *Genes Dev* **7**: 1133-45.

Richards, E. J., H. M. Goodman and F. M. Ausubel (1991). "The centromere region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 1 contains telomere-similar sequences." *Nucleic Acids Res* **19**: 3351-7.

Rine, J. and I. Herskowitz (1987). "Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **116**: 9-22.

Robertson, K. D., S. Ait-Si-Ali, T. Yokochi, P. A. Wade, P. L. Jones and A. P. Wolffe (2000). "DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters." *Nat Genet* **25**: 338-42.

Robyr, D., Y. Suka, I. Xenarios, S. K. Kurdistani, A. Wang, N. Suka and M. Grunstein (2002). "Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases." *Cell* **109**: 437-46.

Rohwedel, J., S. Kugler, T. Engebrecht, W. Purschke, P. K. Muller and C. Kruse (2003). "Evidence for posttranscriptional regulation of the multi K homology domain protein vigilin by a small peptide encoded in the 5' leader sequence." *Cell Mol Life Sci* **60**: 1705-15.

Rountree, M. R., K. E. Bachman and S. B. Baylin (2000). "DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci." *Nat Genet* **25**: 269-77.



Rundlett, S. E., A. A. Carmen, R. Kobayashi, S. Bavykin, B. M. Turner and 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**: 14503-8.

Sachs, A. (1990). "The role of poly(A) in the translation and stability of mRNA." *Curr Opin Cell Biol* **2**: 1092-8.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**: 487-91.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos-Rosa, H., R. Schneider, A. J. Bannister, J. Sherriff, B. E. Bernstein, N. C. Emre, S. L. Schreiber, J. Mellor and T. Kouzarides (2002). "Active genes are trimethylated at K4 of histone H3." *Nature* **419**: 407-11.

Schmidt, C., B. Henkel, E. Poschl, H. Zorbas, W. G. Purschke, T. R. Gloe and P. K. Muller (1992). "Complete cDNA sequence of chicken vigilin, a novel protein with amplified and evolutionary conserved domains." *Eur J Biochem* **206**: 625-34.

Schnell, R. and J. Rine (1986). "A position effect on the expression of a tRNA gene mediated by the SIR genes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **6**: 494-501.

Schramke, V. and R. Allshire (2003). "Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing." *Science* **301**: 1069-74.

Schuh, A., K. Assmuth, I. Hilgendorf, P. K. Mueller and C. Kruse (2003). "Protein synthesis of eucaryotic cells could be decreased by antisense-DNA of the multi KH domain protein vigilin." *Int J Mol Med* **12**: 35-43.

Selker, E. U. (1999). "Gene silencing: repeats that count." *Cell* **97**: 157-60.

Shampay, J., J. W. Szostak and E. H. Blackburn (1984). "DNA sequences of telomeres maintained in yeast." *Nature* **310**: 154-7.

Shankaranarayana, G. D., M. R. Motamedi, D. Moazed and S. I. Grewal (2003). "Sir2 regulates histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in fission yeast." *Curr Biol* **13**: 1240-6.

Shor, B., J. Calaycay, J. Rushbrook and M. McLeod (2003). "Cpc2/RACK1 is a ribosome-associated protein that promotes efficient translation in *Schizosaccharomyces pombe*." *J Biol Chem* **278**: 49119-28.

Shou, W., J. H. Seol, A. Shevchenko, C. Baskerville, D. Moazed, Z. W. Chen, J. Jang, H. Charbonneau and R. J. Deshaies (1999). "Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex." *Cell* **97**: 233-44.

Siebel, C. W., A. Admon and D. C. Rio (1995). "Soma-specific expression and cloning of PSI, a negative regulator of P element pre-mRNA splicing." *Genes Dev* **9**: 269-83.

Sikorski, R. S. and P. Hieter (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **122**: 19-27.

Singh, J. and 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**: 186-96.

Siomi, H., M. J. Matunis, W. M. Michael and G. Dreyfuss (1993). "The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif." *Nucleic Acids Res* **21**: 1193-8.

Sleutels, F., R. Zwart and D. P. Barlow (2002). "The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes." *Nature* **415**: 810-3.

Smith, C. D. and E. H. Blackburn (1999). "Uncapping and deregulation of telomeres lead to detrimental cellular consequences in yeast." *J Cell Biol* **145**: 203-14.

- Smith, C. M., Z. W. Haimberger, C. O. Johnson, A. J. Wolf, P. R. Gafken, Z. Zhang, M. R. Parthun and D. E. Gottschling (2002). "Heritable chromatin structure: mapping "memory" in histones H3 and H4." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99 Suppl 4**: 16454-61.
- Smith, J. S. and J. D. Boeke (1997). "An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA." *Genes Dev* **11**: 241-54.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *J Mol Biol* **98**: 503-17.
- Steiner, S., J. Wendland, M. C. Wright and P. Philippsen (1995). "Homologous recombination as the main mechanism for DNA integration and cause of rearrangements in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*." *Genetics* **140**: 973-87.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." *Nature* **403**: 41-5.
- Strahl-Bolsinger, S., A. Hecht, K. Luo and M. Grunstein (1997). "SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast." *Genes Dev* **11**: 83-93.
- Straight, A. F., W. Shou, G. J. Dowd, C. W. Turck, R. J. Deshaies, A. D. Johnson and D. Moazed (1999). "Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity." *Cell* **97**: 245-56.
- Studier, F. W. (1991). "Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system." *J Mol Biol* **219**: 37-44.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* **189**: 113-30.
- Suka, N., K. Luo and M. Grunstein (2002). "Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin." *Nat Genet* **32**: 378-83.

Sun, Z. W. and M. Hampsey (1999). "A general requirement for the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex in regulating silencing in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **152**: 921-32.

Sussel, L., D. Vannier and D. Shore (1993). "Epigenetic switching of transcriptional states: cis- and trans-acting factors affecting establishment of silencing at the HMR locus in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Cell Biol* **13**: 3919-28.

Takimoto, M., T. Tomonaga, M. Matunis, M. Avigan, H. Krutzsch, G. Dreyfuss and D. Levens (1993). "Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro." *J Biol Chem* **268**: 18249-58.

Teo, S. H. and S. P. Jackson (2001). "Telomerase subunit overexpression suppresses telomere-specific checkpoint activation in the yeast yku80 mutant." *EMBO Rep* **2**: 197-202.

Thon, G. and J. Verhein-Hansen (2000). "Four chromo-domain proteins of *Schizosaccharomyces pombe* differentially repress transcription at various chromosomal locations." *Genetics* **155**: 551-68.

Tomonaga, T. and D. Levens (1996). "Activating transcription from single stranded DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5830-5.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4.

Urlaub, H., V. Kruft, O. Bischof, E. C. Muller and B. Wittmann-Liebold (1995). "Protein-rRNA binding features and their structural and functional implications in ribosomes as determined by cross-linking studies." *Embo J* **14**: 4578-88.

van Leeuwen, F., P. R. Gafken and D. E. Gottschling (2002). "Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core." *Cell* **109**: 745-56.

Vannier, D., D. Balderes and D. Shore (1996). "Evidence that the transcriptional regulators SIN3 and RPD3, and a novel gene (*SDS3*) with similar functions, are involved in transcriptional silencing in *S. cerevisiae*." *Genetics* **144**: 1343-53.

- Verdel, A., S. Jia, S. Gerber, T. Sugiyama, S. Gygi, S. I. Grewal and D. Moazed (2004). "RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex." *Science* **303**: 672-6.
- Vernet, C. and K. Artzt (1997). "STAR, a gene family involved in signal transduction and activation of RNA." *Trends Genet* **13**: 479-84.
- Visintin, R., E. S. Hwang and A. Amon (1999). "Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus." *Nature* **398**: 818-23.
- Volpe, T. A., C. Kidner, I. M. Hall, G. Teng, S. I. Grewal and R. A. Martienssen (2002). "Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi." *Science* **297**: 1833-7.
- Wach, A., A. Brachat, R. Pohlmann and P. Philippsen (1994). "New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **10**: 1793-808.
- Wallrath, L. L. and S. C. Elgin (1995). "Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure." *Genes Dev* **9**: 1263-77.
- Weber, V., A. Wernitznig, G. Hager, M. Harata, P. Frank and U. Wintersberger (1997). "Purification and nucleic-acid-binding properties of a *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in the control of ploidy." *Eur J Biochem* **249**: 309-17.
- Wellinger, R. J., A. J. Wolf and V. A. Zakian (1993). "*Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase." *Cell* **72**: 51-60.
- Wendland, J. (2003). "PCR-based methods facilitate targeted gene manipulations and cloning procedures." *Curr Genet* **44**: 115-23.
- West, R. W., Jr., R. R. Yocum and M. Ptashne (1984). "*Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG." *Mol Cell Biol* **4**: 2467-78.

Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., R. J. Morgan-Warren, A. P. Carter, C. Vornrhein, T. Hartsch and V. Ramakrishnan (2000). "Structure of the 30S ribosomal subunit." *Nature* **407**: 327-39.

Wines, D. R. and S. Henikoff (1992). "Somatic instability of a *Drosophila* chromosome." *Genetics* **131**: 683-91.

Winston, F. and C. D. Allis (1999). "The bromodomain: a chromatin-targeting module?" *Nat Struct Biol* **6**: 601-4.

Wintersberger, U., C. Kuhne and A. Karwan (1995). "Scp160p, a new yeast protein associated with the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum, is necessary for maintenance of exact ploidy." *Yeast* **11**: 929-44.

Wolffe, A. P. (1998). "When more is less." *Nat Genet* **18**: 5-6.

Worbs, M., G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, R. Huber and M. C. Wahl (2001). "An extended RNA binding surface through arrayed S1 and KH domains in transcription factor NusA." *Mol Cell* **7**: 1177-89.

Wotton, D. and D. Shore (1997). "A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genes Dev* **11**: 748-60.

Wright, J. H., D. E. Gottschling and V. A. Zakian (1992). "*Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure." *Genes Dev* **6**: 197-210.

Wright, W. E., V. M. Tesmer, K. E. Huffman, S. D. Levene and J. W. Shay (1997). "Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end." *Genes Dev* **11**: 2801-9.

Xue, Z., X. Shan, A. Sinelnikov and T. Melese (1996). "Yeast mutants that produce a novel type of ascus containing asci instead of spores." *Genetics* **144**: 979-89.

Zachariae, W., T. H. Shin, M. Galova, B. Obermaier and K. Nasmyth (1996). "Identification of subunits of the anaphase-promoting complex of *Saccharomyces cerevisiae*." *Science* **274**: 1201-4.

Zaffran, S., M. Astier, D. Gratecos and M. Semeriva (1997). "The held out wings (how) *Drosophila* gene encodes a putative RNA-binding protein involved in the control of muscular and cardiac activity." *Development* **124**: 2087-98.

Zakian, V. A. (1996). "Structure, function, and replication of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres." *Annu Rev Genet* **30**: 141-72.

Zhang, X. and F. W. Studier (1997). "Mechanism of inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase by T7 lysozyme." *J Mol Biol* **269**: 10-27.

Zhang, Y. and D. Reinberg (2001). "Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails." *Genes Dev* **15**: 2343-60.





## **IX. APÈNDIX DE SEQÜÈNCIES**



En aquest apèndix es recullen les seqüències genòmiques dels diferents gens analitzats en aquest treball. Es mostren les seqüències de les dues cadenes de DNA amb els nucleòtids que codifiquen per l'ORF del gen estudiat ombrejats en gris. S'indica en les seqüències la localització relativa dels oligonucleòtids emprats com a encebadors en les reaccions de PCR (en vermell) així com les regions de DNA que s'han emprat com a regions d'homologia en els experiments de manipulació gènica realitzats mitjançant tècniques de PCR (en blau).



# SCP160

170  
175  
180  
185  
190  
195  
200  
205  
210  
215  
220  
225  
230  
235  
240  
245  
250  
255  
260  
265  
270  
275  
280  
285  
290  
295  
300  
305  
310  
315  
320  
325  
330  
335  
340  
345  
350  
355  
360  
365  
370  
375  
380  
385  
390  
395  
400  
405  
410  
415  
420  
425  
430  
435  
440  
445  
450  
455  
460  
465  
470  
475  
480  
485  
490  
495  
500  
505  
510  
515  
520  
525  
530  
535  
540  
545  
550  
555  
560  
565  
570  
575  
580  
585  
590  
595  
600  
605  
610  
615  
620  
625  
630  
635  
640  
645  
650  
655  
660  
665  
670  
675  
680  
685  
690  
695  
700  
705  
710  
715  
720  
725  
730  
735  
740  
745  
750  
755  
760  
765  
770  
775  
780  
785  
790  
795  
800  
805  
810  
815  
820  
825  
830  
835  
840  
845  
850  
855  
860  
865  
870  
875  
880  
885  
890  
895  
900  
905  
910  
915  
920  
925  
930  
935  
940  
945  
950  
955  
960  
965  
970  
975  
980  
985  
990  
995

```

3010
4000
KpnI
4200
4400
4590
TTAATGCG
4600
AAATAGCC

```















