



## Estudi de la contribució de CenH3CID en la funció centromèrica. Identificació i anàlisi funcional de noves proteïnes centromèriques a *Drosophila*

Sònia Medina i Giró

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Programa de Doctorat en Biomedicina  
Departament de Biologia Cel·lular  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona

**Estudi de la contribució de CenH3<sup>CID</sup> en la funció centromèrica. Identificació i anàlisi funcional de noves proteïnes centromèriques a *Drosophila***

Memòria presentada per Sònia Medina i Giró per aspirar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona. Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del Dr. Ferran Azorín Marín al Departament de Genòmica Molecular de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC).

Vist-i-plau del director

Vist-i-plau del tutor

Dr. Ferran Azorín Marín

Dr. Eduardo Soriano García

L'autora

Sònia Medina Giró



Als meus pares,

al Roger i

al Martí



## **AGRAÏMENTS**

Durant aquest anys he tingut l'oportunitat de gaudir d'un laboratori on desenvolupar-me científicament i alhora també com a persona. És per això que no puc deixar d'agrair a tots els companys i amics amb qui he compartit aquest període al laboratori.

M'agradaria agrair al Ferran haver-me donat l'oportunitat de fer la tesi en el seu laboratori. Gràcies, Ferran per haver dirigit aquesta feina i per tantes converses i discussions que m'han estat de gran ajuda.

Gràcies també a la resta de jefes del laboratori que amb els seus consells, explicacions i discussions han fet que la meua vida al lab hagi sigut una mica més fàcil.

Voldria agrair de manera especial la contribució de la Mònica i l'Olga que han estat sempre al meu costat i m'han donat el suport necessari durant tot aquest temps. Sense elles res no hagués estat possible en aquesta tesi. A nivell experimental i teòric m'ho heu ensenyat tot, i sempre amb un somriure i paraules amables. Heu sigut unes grans companyes tant per la feina com per les confidències, riures i per l'ajuda que m'heu donat en els moments difícils. La vostra motivació i vocació per la ciència em fascina i és una sort trobar gent apassionada pel que fa i que sàpiga transmetre aquestes virtuts. Un plaer!

També vull agrair a la resta de membres del laboratori PBA3, passats i presents, haver creat un ambient fantàstic, tant de treball com d'oci, que en molts moments també ajuda al bon rotllo del lab. Amb tots vosaltres he viscut moments inoblidables tant dins com fora del laboratori.

Gràcies Carles per alegrar els nostres dinars, explicant anècdotes i historietes, ja que ni que fos per una hora aconseguies que el meu cap deixes aparcar les mosques al laboratori, i si l'Orxeta hi posava cullerada la conversa encara tenia més suc! Gràcies Aleix per ser tant bona persona i tant bon amic. Gràcies Sergi per ensenyar-me que les coses sempre es poden enfocar des d'un altre punt de vista. Merci Anne per tots els teus consells sobre aquesta nova etapa que estic iniciant. I a la Marta Orxeta per haver-me acollit tantes vegades a casa teua i per tenir un cor tant gran.

Al Roman li vull agrair haver-me ensenyat Barcelona des d'un altra perspectiva que molts no coneixen; anar a córrer amb tu és molt dur però sempre hi ha la recompensa d'unes vistes fantàstiques. Ujué moltes gràcies per transmetre tanta alegria. Quan les coses no van com creus que haurien d'anar, és reconfortant que algú et dediqui un bon dia amb entusiasme i alegria. Salva, gràcies per tots els moments viscuts

preparant regals i sorpreses. Si algun dia no trobes candidat per fer-li algun dels teus regals ja sap, compte amb mi. I com no l'Albert, que a més de ser creatiu i gran músic, té una dona que val un imperi!

I molts altres, Carolina, Sílvia, Katrin, Tomàs, Eva, Olivera, Joan, Marta Blanch, Marta Batlle, David, Xavi, Lorena i molts més que han passat per aquí. Gràcies pels moments entranyables que hem compartit. I no em vull oblidar de l'Alícia, Esther i Estefania, que amb la seva ajuda han fet possible la realització de molts experiments. Als que heu arribat més tard al lab, Milos, Johan, Anna, Laura i Paula us desitjo molta sort en aquesta etapa que tot just comenceu.

Compaginar l'escriptura de la tesi amb la meva maternitat ha sigut un pèl dur. Afortunadament, he tingut l'ajuda dels meus pares i els del Roger, sempre disposats a fer el sopar, a donar un cop de mà amb el Martí o amb el que convingui. Gràcies per tota l'ajuda rebuda.

També vull agrair tot el suport i comprensió rebuda pels meus pares durant aquest temps. Sense ells res no hagués sigut possible i jo no seria com sóc. Mama, gràcies per donar-me la vida i estimar-me tant. Ara que sóc mare, sé lo que se sent per un fill i no sé si mai t'ho podré agrair tot el que has fet per mi. Papa, gràcies per ensenyar-me que en aquesta vida s'ha de lluitar pel que es vol i que amb constància i dedicació tot és possible.

Martí, perdona'm si no he pogut dedicar tot el meu temps a estar per tu. Sort que ets un molt bon nen i has facilitat molt les coses. Gràcies pels teus somriures, són màgics, fan oblidar totes les preocupacions.

Arribat a aquest punt hi ha un persona molt especial a la qual li he d'agrair tot el que has fet, fas i espero que facis per mi. M'has donat la mà quan he caigut, consolat quan he plorat, i fet riure quan ha calgut. Sense la teva compressió i els teus ànims no sé si això hagués estat possible. Gràcies per tot Roger!

**ÍNDEX**





# ÍNDIX

ABREVIATURES .....	1
INTRODUCCIÓ.....	5
1. El centròmer:.....	7
1.1 Organització de la regió centromèrica en diferents organismes: .....	7
1.1.1 Els cromosomes holocèntrics .....	8
1.1.2 Els cromosomes monocèntrics.....	8
1.2 La cromatina centromèrica .....	11
1.2.1 La cromatina centromèrica i la identitat centromèrica .....	14
2. Les variants centromèriques de la histona H3 .....	14
2.1 L'estructura de les variants centromèriques de la histona H3 .....	15
2.1.1 El domini N-terminal .....	15
2.1.2 El domini globular.....	16
3. Deposició de CenH3 a la regió centromèrica .....	17
3.1 Mecanisme de deposició de CenH3 .....	20
3.1.1 Mis18 i Mis16 .....	20
3.1.2 Les xaperones de CenH3 .....	21
3.2 Mecanismes per evitar la localització ectòpica de CenH3 .....	23
4. El cinetocor.....	24
4.1 La composició molecular del cinetocor.....	25
4.1.1 Les proteïnes centromèriques.....	26
4.1.2 La xarxa KMN.....	31
4.1.3 Les proteïnes del punt de control de la mitosi.....	33
4.2 Regulació de les funcions del cinetocor .....	34
5. Distribució dels centròmers en el nucli.....	36
5.1 Estructura de la membrana nuclear.....	37
5.2 BAF .....	39

OBJECTIUS .....	41
RESULTATS.....	45
CAPÍTOL 1 .....	47
Identificació de noves proteïnes centromèriques a <i>Drosophila melanogaster</i> .....	49
CAPÍTOL 2 .....	101
<i>Drosophila</i> Barrier-to-Autointegration factor (dBAF) associates with centromeres and is required for CENP-C assembly .....	101
CAPÍTOL 3 .....	139
A conserved arginine-rich motif within the hypervariable N-domain of <i>Drosophila</i> centromeric histone H3 (CenH3) mediates BubR1 recruitment.....	141
CAPÍTOL 4 .....	159
The F box protein partner of paired regulates stability of <i>Drosophila</i> centromeric histone H3, CenH3(CID). .....	161
RESUM DELS RESULTATS .....	179
DISCUSSIÓ .....	187
CONCLUSIONS .....	207
BIBLIOGRAFIA .....	211

## **ABREVIATURES**



**ABREVIATURES**

<b>Act</b>	<i>Actina</i>
<b>AT</b>	Adenina-Timina
<b>BAF</b>	<i>Barrier-to-autointegration factor</i>
<b>BSA</b>	Albúmina sèrica bovina
<b>BubR1</b>	<i>Bub1-related 1</i>
<b>CATD</b>	<i>CENP-A targeting domain</i>
<b>CCAN</b>	<i>Constitutive centromere associated network</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementari
<b>CentH3</b>	Variant centromèrica de la histona H3
<b>CENPs</b>	<i>Centromere Proteins</i>
<b>Cid</b>	<i>Centromere identifier</i>
<b>CREST</b>	<i>Calcinosis, Raynaud's phenomenon, Esophageal dysfunction, Sclerodactyly and Telangiectasias</i>
<b>C- terminal</b>	Carboxi-terminal
<b>DAPI</b>	4,6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrat
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfòxid
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>dsRNA</b>	ARN de doble cadena
<b>DTT</b>	Ditiotreitòl
<b>EDTA</b>	Àcid etilen-diamino-tetracètic
<b>EGTA</b>	Àcid etilen-glicol-tetracètic
<b>EYFP</b>	<i>Enhancer yellow fluorescent protein</i>
<b>FBS</b>	Sèrum fetal boví
<b>GC</b>	Guanina-Citocina
<b>h</b>	hores
<b>HA</b>	<i>hemagglutinin</i>
<b>HEPES</b>	Àcid N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosufònic
<b>HFD</b>	<i>Histone fold domain</i>
<b>IgG</b>	Immunoglobulina G
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranòsid
<b>Kb</b>	Quilobases
<b>LB</b>	Medi de cultiu de Luria Bertani
<b>Mb</b>	Megabases
<b>min</b>	Minuts
<b>MN</b>	Membrana nuclear
<b>mRNA</b>	RNA missatger

<b>N-terminal</b>	Amino-terminal
<b>NP-40</b>	Nonidet P-40
<b>O/N</b>	<i>Overnight</i>
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>PAGE</b>	Electroforesi en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Parell de bases
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Bufferd Saline</i>
<b>PLB</b>	<i>Protein loading buffer</i>
<b>PMSF</b>	Fluor de fenimetil sulfònic
<b>Ppa</b>	<i>Partner of Paired</i>
<b>PP1</b>	<i>Protein phosphatase 1</i>
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa
<b>Rpm</b>	Revolucions per minut
<b>RpL22</b>	<i>Ribosomal protein L22</i>
<b>SAC</b>	<i>Spindle assembly checkpoint</i>
<b>SDS</b>	Dodecil sulfat sòdic
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i>
<b>SL2</b>	<i>Schneider Cell Line 2</i>
<b>SN</b>	Sobrenedant
<b>TAP</b>	<i>Tandem affinity purification</i>
<b>TSA</b>	<i>Trichostatin A</i>
<b>TE</b>	Tampó Tris-EDTA
<b>UAS</b>	<i>Upstream Activating Sequence</i>
<b>YFP</b>	<i>Yellow fluorescent protein</i>

## **INTRODUCCIÓ**





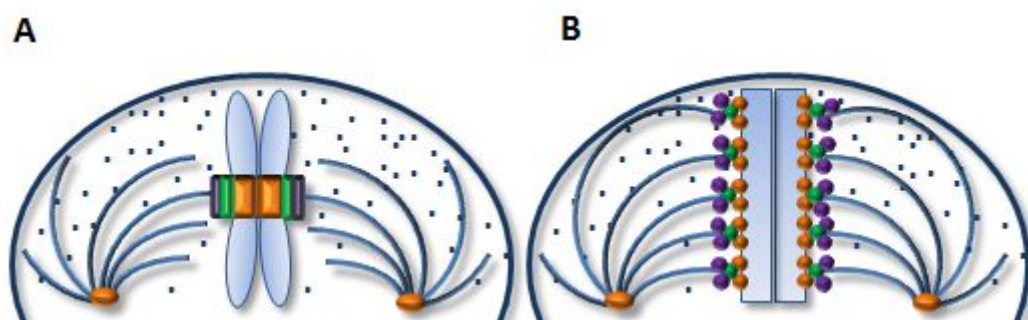
## 1. El centròmer:

El centròmer és una regió especialitzada de la cromatina que permet la correcta segregació cromosòmica durant la divisió cel·lular (Choo, 2000; Sullivan et al., 2001; Sullivan, 2001). Errors en aquest procés de repartiment de la informació genètica pot generar cèl·lules filles amb un número incorrecte de cromosomes, anomenades cèl·lules aneuploides. L'aneuploidia és la causa comú d'algunes malalties congènites o adquirides, com per exemple la infertilitat, defectes en el naixement i la tumorigènesi (Hassold and Hunt, 2001; Holland and Cleveland, 2009).

El centròmer, entre d'altres funcions, intervé en la cohesió de les cromàtides germanes i la formació del cinetocor. El cinetocor és un complex multiproteic que permet la unió dels microtúbuls del fus acromàtic en el centròmer. Quan el cinetocor percep errors en la unió del cromosoma amb el fus mitòtic activa el punt de control de la mitosi per tal d'aturar la transició de metafase a anafase fins que tots els cromosomes tinguin una unió bipolar al fus acromàtic (Rieder and Salmon, 1998).

### 1.1 Organització de la regió centromèrica en diferents organismes:

En els eucariotes, el centròmer va ser identificat com la constricció primària del cromosoma metafàsic visible al microscopi. Amb el pas del temps s'ha observat que no tots els cromosomes tenen la constricció primària i que hi ha espècies en les quals el cinetocor es forma al llarg de tot el cromosoma. Per tant, existeixen dos tipus de cromosomes; els monocèntrics els quals s'uneixen als microtúbuls en una regió concreta, el centròmer; i els holocèntrics en els quals el cinetocor està difús per tot el cromosoma (Figura I.1) (Mandrioli and Manicardi, 2012). Els estudis publicats en aquest camp suggereixen que molts dels components i el mecanisme de funcionament del cinetocor estan conservats en aquests dos tipus de cromosomes (Dernburg, 2001).



**Figura I.1. Dos tipus de cromosomes en funció de la regió on es munta el cinetocor.** En els cromosomes monocèntrics (A) el cinetocor s'assembla en una regió concreta, el centròmer. En canvi, en els cromosomes holocèntrics (B) el cinetocor està difús per tot el cromosoma.

### 1.1.1 Els cromosomes holocèntrics

S'han identificat cromosomes holocèntrics en plantes, protists, insectes i nematodes. El nematode *Caenorhabditis elegans* és el model animal més utilitzat per l'estudi d'aquests cromosomes.

Tot i que no sembla que hi hagin uns requeriments especials en les seqüències de nucleòtids que facilitin l'assemblatge del cinetocor en les espècies amb cromosomes holocèntrics, s'han identificat una sèrie de característiques comunes en els seus genomes (Mandrioli and Manicardi, 2012). En primer lloc, acostumen a ser genomes força compactes. En segon lloc, l'anàlisi del contingut de GC en el genoma de dues espècies amb cromosomes holocèntrics com *Tetranychus urticae* i *C.elegans* denoten que el seu contingut és uniforme en tot el cromosoma tot i que aquest contingut pot variar una mica entre espècies. La densitat dels gens és també constant en tot el cromosoma. En canvi, la distribució dels gens en els cromosomes monocèntrics no és uniforme, hi ha un cert grau d'agrupament. I en darrer lloc, una altra característica dels cromosomes dels nematodes és que presenten seqüències repetitives organitzades formant tàndems que estan distribuïts al llarg de tot el cromosoma. El nombre, la mida, la distribució i la composició de les seqüències repetides és diferent entre les diferents espècies i no tenen una aparent relació amb les seqüències centromèriques presents en altres eucariotes (Subirana and Messeguer, 2013).

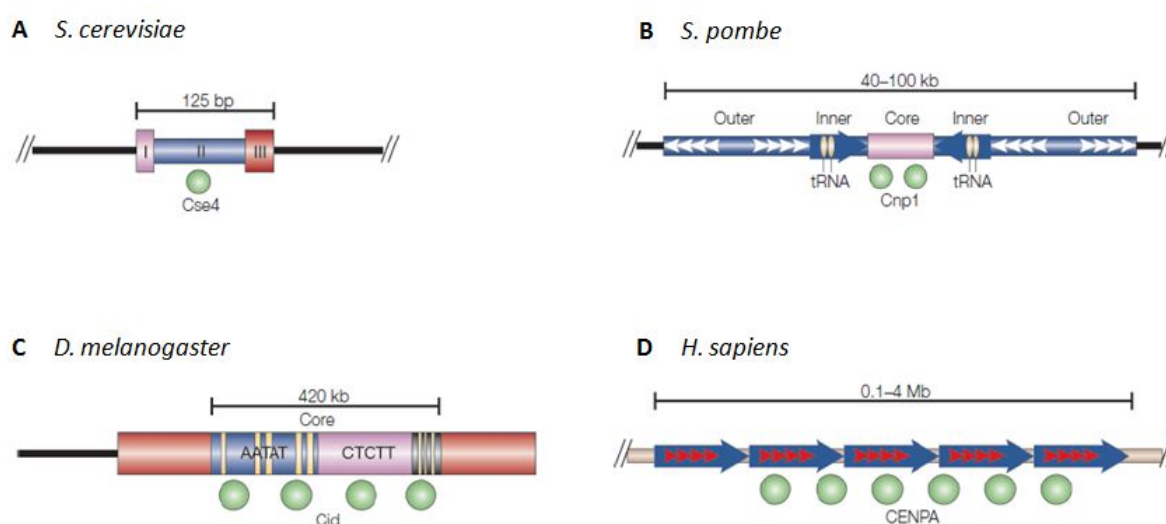
### 1.1.2 Els cromosomes monocèntrics

Els cromosomes monocèntrics es caracteritzen per tenir centròmers localitzats, és a dir, tenen la funció centromèrica restringida en una regió específica del cromosoma. Entre els centròmers localitzats, hi ha una gran variabilitat en mida i seqüència, que va des del centròmer puntual de *Saccharomyces cerevisiae* fins als centròmers regionals trobats en la majoria d'eucariotes com en *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, plantes i humans (Figura I.2).

#### **El centròmer puntual de *Saccharomyces cerevisiae***

En els setze cromosomes del llevat *S. cerevisiae* la funció centromèrica està compresa en una regió conservada de tant sols 125 pb, anomenada seqüència CEN. La seqüència CEN està organitzada en tres dominis: CDEI, CDEII i CDEIII (Murphy and Fitzgerald-Hayes, 1990). Mutacions en qualsevol dels tres dominis produeixen defectes en la segregació cromosòmica, però aquests són més evidents en les mutacions de la regió CDEIII (Newlon, 1988). La seqüència CDEI és molt curta, tant sols 8 pb, i conté una seqüència palindròmica que s'estén des del nucleòtid 3 fins al 8. En aquest domini s'uneix el factor activador de la transcripció Cbf1p (*Centromere-binding factor 1*) formant

un dímer (Mellor et al., 1990). CDEIII és una seqüència de 25 pb on s'uneix el complex proteic CBF3 (Lechner and Carbon, 1991), el qual està format per les proteïnes Ndc10 (*Nuclear division cycle 10*), Cep3 (*Centromere protein 3*), Ctf13 (*Chromosome transmission fidelity protein 13*) i Skp1 (*Suppressor of kinetochore protein 1*). Aquest complex és essencial per la formació del cinetocor ja que permet l'assemblatge de les proteïnes del cinetocor i del nucleosoma que conté la variant centromèrica de la histona H3 de *S. cerevisiae*, CenH3<sup>Cse4</sup> (*Chromosome segregation 4*) (Ortiz et al., 1999). Entre aquests dos elements hi ha el domini CDEII, regió no conservada de 78-86 pb rica en AT. S'ha observat que delecions que modifiquen la seva mida afecten la funció centromèrica i aquesta és restaurada en inserir una seqüència de mida equivalent rica en AT (Gaudet and Fitzgerald-Hayes, 1987). Per tant, l'alt contingut d'AT i la mida de la seqüència influencien la funció centromèrica més que la seqüència de nucleòtids en concret. En aquest domini és on s'uneix l'únic nucleosoma que conté CenH3<sup>Cse4</sup>.



**Figura I.2. Organització estructural dels centròmers de diferents organismes eucariotes.** La seqüència del DNA centromèric no està conservada entre espècies. Tanmateix, tots els centròmers tenen en comú la presència de la variant centromèrica de la histona H3, CenH3. A) El centròmer de *Saccharomyces cerevisiae* és una regió d'uns 125 pb formada per tres elements conservats: CDEI, CDEII i CDEIII. En el domini CDEII s'uneix l'únic nucleosoma que conté CenH3<sup>Cse4</sup>. B) A *Schizosaccharomyces pombe* el centròmer està format per una regió central, envoltada per les seqüències repetitives internes (*inner*) i externes (*outer*). La regió central conjuntament amb les seqüències repetitives internes formen el domini central on es troba la CenH3<sup>Cnp1</sup>. C) En el minicromosoma *Dp1187* de *Drosophila melanogaster* s'ha identificat una regió de 420 Kb que actua com a centròmer. Aquesta regió presenta un domini central format per dos blocs de DNA repetitiu i transposons. D) El principal component dels centròmers dels humans és el DNA satèl·lit alfa, el qual es troba repetit format tàndem des de 100 Kb fins a Mb. Figura extreta de Sullivan et al., 2001.

## Els centròmers regionals

### El centròmer de *Schizosaccharomyces pombe*

Malgrat que els centròmers dels tres cromosomes del llevat *Schizosaccharomyces pombe* són molt diferents pel que fa a la seva mida, des d'aproximadament 35 kb fins a 110 kb, tots ells presenten una estructura global força similar. Cada centròmer té una regió central de 4-7 kb, anomenada *cnt* (*central core*), formada per seqüències no repetitives que presenten un alt contingut d'AT (Takahashi et al., 1992). Tot i que aquestes regions centrals no estan conservades, en els cromosomes 1 i 3 comparteixen un tros de seqüència de 3.3 Kb, anomenada *tm*. A més, en la regió central del cromosoma 2 s'ha identificat una regió que presenta un 48% d'homologia amb l'element *tm* (Wood et al., 2002). Cada regió central està envoltada per les seqüències repetitives internes *imrR* i *imrL* (*inner-most-repeat Right i Left*) que són específiques per cada centròmer i estan orientades invertidament respecte el *cnt*. A la vegada, aquestes seqüències repetitives internes estan flanquejades per unes altres seqüències repetitives externes *otrR* i *otrL* (*outer-repeats Right i Left*) que estan formades pels elements repetitius *dg* i *dh*, també anomenats repeticions *K* i *L*. Malgrat que els elements *dg* i *dh* estan conservats, la seva organització entre ells, la orientació respecte el *cnt* i el nombre és diferent en cada centròmer. Experimentalment, s'ha determinat que per una correcta funció centromèrica és necessària una seqüència mínima que inclou tota la regió central, les repeticions internes i una porció de les repeticions externes (Baum et al., 1994; Hahnenberger et al., 1991). De fet, la regió central i les seqüències repetitives internes formen el domini central. En aquest domini és on es munta el cinetocor i es caracteritza per ser la única regió del centròmer que conté la variant centromèrica de la histona H3 de *S. pombe*, CenH3<sup>Cnp1</sup> (*Centromere protein 1*) (Takahashi et al., 2000). Per altra banda, les seqüències repetitives externes formen el domini d'heterocromatina que permet la cohesió de les cromàtides germanes en els centròmers (Bernard et al., 2001; Nonaka et al., 2002).

### Els centròmers dels eucariotes superiors

La característica estructural més important dels centròmers dels eucariotes superiors és que estan localitzats en regions de DNA repetitiu que pot anar de centenars de kb a Mb. S'entén com a DNA repetitiu o satèl·lit, petites seqüències altament repetitives que formen tàndems.

En el cas de *Drosophila melanogaster*, l'únic centròmer que ha estat caracteritzat és el del minicromosoma *Dp1187* d'1,3 Mb derivat del cromosoma X. Mitjançant deleccions d'aquest minicromosoma, s'ha identificat una regió de 420 Kb que és suficient i necessària per la correcta segregació d'aquest cromosoma (Murphy and Karpen, 1995).

Aquesta regió està formada per dos blocs de DNA repetitiu, AATAT i TTCTC, i una petita regió terminal rica en seqüències AT. En el bloc repetitiu AATAT i la petita regió terminal hi ha inserits transposons que han sigut identificats en altres regions del genoma (Sun et al., 2003; Sun et al., 1997). A més, s'ha observat que tots els minicromosomes derivats de *Dp1187* que es segreguen correctament contenen la variant centromèrica de la histona H3 de *Drosophila*, CenH3<sup>CID</sup> (*Centromere identifier*) (Blower and Karpen, 2001).

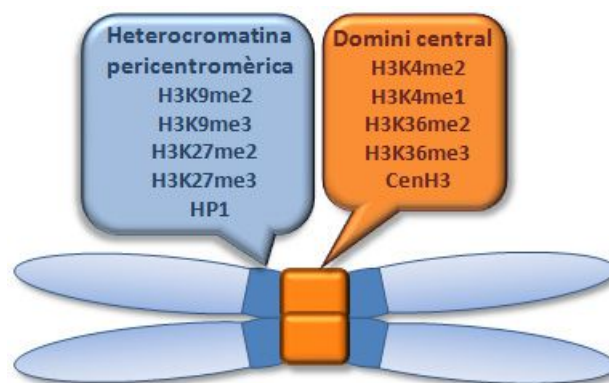
Els centròmers dels humans es caracteritzen per tenir una família de DNA satèl·lit rica en AT, anomenada satèl·lit alfa. Aquest DNA satèl·lit consisteix en la repetició en tàndem d'un monòmer de 171 pb fins a formar dominis des de 100 Kb a megabases (Tyler-Smith and Willard, 1993). En experiments per identificar els requeriments de la seqüència de DNA per formar centròmers de nou en cèl·lules humanes s'ha determinat que el satèl·lit alfa és imprescindible per establir la funció centromèrica (Harrington et al., 1997; Ikeno et al., 1998). A més, s'ha observat que al satèl·lit alfa s'hi uneixen la variant centromèrica de la histona H3 d'humans, CenH3<sup>CENP-A</sup> (*Centromere protein A*) i altres proteïnes centromèriques com CENP-B (*Centromere protein B*) i CENP-C (*Centromere protein C*) (Masumoto et al., 1989b). Concretament, la proteïna CENP-B reconeix específicament un motiu de 17 pb, anomenat *CENP-B box*, present en aquest DNA repetitiu (Masumoto et al., 1989a). No obstant, dues observacions suggereixen que no tot el domini satèl·lit alfa està implicat en la funció centromèrica. En primer lloc, s'ha observat que CenH3<sup>CENP-A</sup> només es localitza en una regió concreta d'aquest domini (Warburton et al., 1997). En segon lloc, els cromosomes en els quals s'ha deletat part d'aquest domini poden assemblar el cinetocor i segregar-se correctament (Mills et al., 1999; Wevrick et al., 1990; Yang et al., 2000).

## 1.2 La cromatina centromèrica

La manca de conservació del DNA centromèric entre els diferents organismes, ha fet pensar que la identitat centromèrica no està associada a la seqüència nucleotídica. Dues observacions més donen suport a aquesta hipòtesi. Una primera observació és que a humans i a *Drosophila* existeixen cromosomes dicèntrics. Aquests es caracteritzen per tenir dues regions separades de DNA centromèric, però només una de les dues pot reclutar les proteïnes centromèriques i formar un cinetocor, mentre que l'altra està inactivada (Earnshaw and Migeon, 1985; Warburton et al., 1997). L'altre observació és la formació de neocentròmers, centròmers originats de nou en regions no centromèriques on es formen cinetocors funcionals (Alonso et al., 2007; Bassett et al., 2010; Warburton et al., 1997). Així doncs, totes aquestes observacions demostren que el DNA repetitiu no és ni suficient ni necessari per la formació d'un centròmer funcional. I per tant, suggereixen que la identitat i la funció centromèrica estan regulades epigenèticament per la formació d'una cromatina especialitzada.

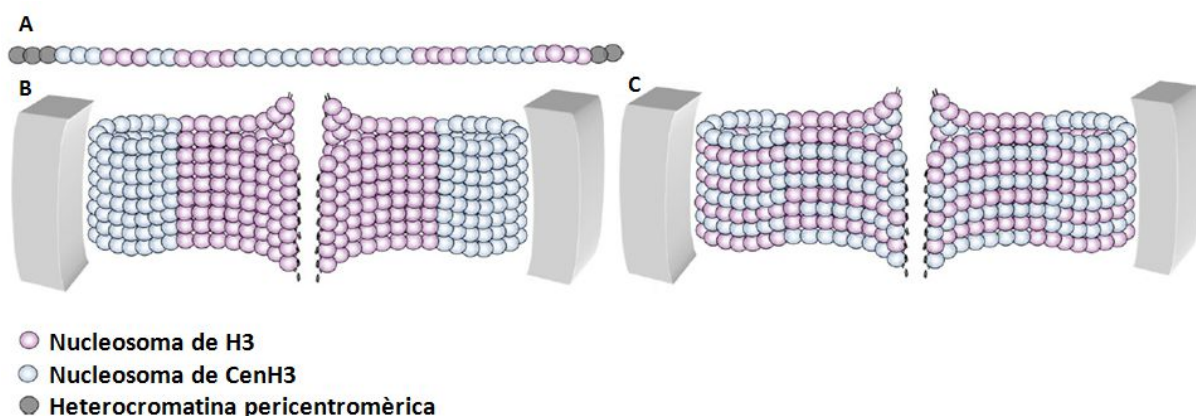
De fet, els centròmers dels diferents organismes presenten un alt grau de similitud pel que fa a la seva estructura i organització a nivell de cromatina. En aquest sentit, una característica comuna en tots els centròmers nadius a excepció del de *S. cerevisiae*, és que estan inserits en l'heterocromatina. Amb el pas del temps, s'ha vist que aquesta regió comprèn dos dominis essencials per la funció centromèrica que es diferencien tant citològicament com funcionalment: l'heterocromatina pericentromèrica i el domini central.

L'heterocromatina pericentromèrica es troba envoltant el domini central. Epigenèticament, es caracteritza per tenir les modificacions post-traduccionals de les histones pròpies de la cromatina silenciada; és a dir, els nucleosomes amb les histones H3 i H4 hipoacetilades i la di i trimetilació de la lisina 9 i 27 de la histona H3 (Figura I.3) (Gopalakrishnan et al., 2009; Sullivan and Karpen, 2004). Associada a aquest domini s'ha detectat HP1 (*Heterochromatin protein 1*), proteïna que reconeix específicament la metilació de la lisina 9 de la histona H3 (Blower and Karpen, 2001). A l'heterocromatina pericentromèrica se li atribueixen bàsicament tres funcions: fer de frontera entre la cromatina transcripcionalment activa i el domini central del centròmer (Chen et al., 2008), permetre la cohesió de les cromàtides germanes durant la mitosi (Bernard et al., 2001; Nonaka et al., 2002) i reprimir la recombinació meiótica al voltant dels centròmers (Ellermeier et al., 2010).



**Figura I.3. Organització estructural de la cromatina centromèrica en els eucariotes a excepció de *S. cerevisiae*.** La funció centromèrica està definida per dos dominis citològicament i funcionalment diferents: l'heterocromatina pericentromèrica (blau) i el domini central (taronja). Les histones de l'heterocromatina pericentromèrica presenten un patró de modificacions post-traduccionals propi de la cromatina silenciada. Associada a aquest domini hi ha la proteïna HP1. Per altra banda, el domini central és caracteritzat per la presència de blocs de nucleosomes que contenen CenH3 alternats amb blocs de nucleosomes que contenen la histona H3. En aquest domini les histones H3 i H4 presenten un patró de modificacions post-traduccionals que difereix tant de l'eucromatina com de l'heterocromatina.

Per altra banda, el domini central de la regió centromèrica es caracteritza molecularment per la presència de la variant centromèrica de la histona H3, CenH3. Aquesta variant substitueix a la histona H3 canònica en els nucleosomes de tots els centròmers funcionals, sent fonamental la seva localització pel correcte assemblatge del cinetocor. En realitat, mitjançant l'anàlisi de fibres de cromatina a *Drosophila* i a humans s'ha vist que en aquest domini hi ha blocs interposats de nucleosomes que contenen CenH3 amb d'altres que contenen les histones H3.1 i H3.3 (Figura I.4.A) (Blower et al., 2002; Dunleavy et al., 2011). S'han proposat dos models per explicar la disposició tridimensional que adopten aquests blocs de nucleosomes en els cromosomes. Un d'ells proposa que la cromatina centromèrica estaria plegada formant un cilindre quedant els blocs de CenH3 a la cara externa del cilindre i els d'H3 en la cara interna (Figura I.4.B) (Blower et al., 2002). L'altre model proposa que aquesta es plegaria formant una estructura de tipus sinusoide, deixant a l'exterior de la constricció tant els nucleosomes de CenH3 com els de la histona H3 (Figura I.4.C) (Ribeiro et al., 2010). Aquest darrer model estaria en concordança amb la observació que tant els nucleosomes d'H3 com els de CenH3 intervenen en el reclutament de les proteïnes del cinetocor (Carroll et al., 2010; Carroll et al., 2009; Hori et al., 2008a). Aquest domini central té un patró de modificacions post-traduccionals que difereix tant de l'euromatina com de l'heterocromatina (Figura I.3). Els nucleosomes de la histona H3 intercalats presenten la mono i dimetilació de lisina 4 i la di i trimetilació de la lisina 36, modificacions típiques de les regions d'euromatina. Per altra banda, les histones H3 i la H4 estan hipoacetilades, modificacions relacionades amb l'heterocromatina (Bergmann et al., 2011; Sullivan and Karpen, 2004). Aquesta combinació única de modificacions post-traduccionals podria crear un estat de la cromatina permissiu a la incorporació de CenH3.



**Figura I.4. Models de l'organització dels centròmers durant la mitosi.** A) Distribució de blocs interposats de nucleosomes amb H3 i nucleosomes amb CenH3 ens els centròmers d'humans i de *Drosophila*. B) Model on els blocs de CenH3 s'orienten cap a la cara externa del centròmers i els que contenen H3 cap a la cara interna. C) L'altre model proposa que els nucleosomes de CenH3 i els de H3 es disposen alternativament format una estructura de tipus sinusoide. Figura modificada a partir de Quénet et al., 2012.



### 1.2.1 La cromatina centromèrica i la identitat centromèrica

Malgrat que en l'establiment de la cromatina centromèrica hi intervenen diferents factors epigenètics, es creu que el factor clau que defineix la identitat i funció centromèrica és CenH3. La principal evidència d'aquesta afirmació ve donada pel fet que la presència d'aquesta variant de la histona H3 és l'única característica que tenen en comú tots els centròmers funcionals, inclosos els neocentròmers (Saffery et al., 2000).

Una altra observació al seu favor és que la seva presència en el centròmer és necessària per la deposició d'altres proteïnes centromèriques i del cinetocor, mentre que la depleció d'aquestes proteïnes generalment no afecta a la seva localització (Goshima et al., 2003; Hori et al., 2008a; Howman et al., 2000; Oegema et al., 2001). A més, s'ha observat en experiments realitzats a *Drosophila* que quan la seva variant centromèrica de la histona H3 és sobreexpressada, aquesta es deslocalitza en regions no centromèriques on recluta proteïnes del cinetocor (Heun et al., 2006; Mendiburo et al., 2011; Moreno-Moreno et al., 2006). Tanmateix, en cèl·lules humanes la sobreexpressió de CenH3 no és suficient per induir la formació d'un cinetocor funcional (Van Hooser et al., 2001). Aquesta darrera observació suggereix que possiblement altres proteïnes, les modificacions post-traduccionals i/o l'heterocromatina pericentromèrica estarien implicades en la consolidació de la marca epigenètica, preservant l'estructura del centròmer.

## 2. Les variants centromèriques de la histona H3

La primera variant centromèrica de la histona H3 fou descrita en humans, CenH3<sup>CENP-A</sup> (Palmer et al., 1991), però s'han trobat proteïnes homòlogues a *S. cerevisiae* (CenH3<sup>Cse4</sup>) (Stoler et al., 1995), *C. elegans* (CenH3<sup>HCP-3</sup>) (Buchwitz et al., 1999), *D. melanogaster* (CenH3<sup>CID</sup>) (Henikoff et al., 2000), *S. pombe* (CenH3<sup>Cnp1</sup>) (Takahashi et al., 2000), *A. thaliana* (CenH3<sup>HTR12</sup>) (Talbert et al., 2002) i *X. laevis* (CenH3<sup>XCENP-A</sup>) (Edwards and Murray, 2005).

En tots els eucariotes estudiats fins ara, la deleció de CenH3 és letal. Aquests mutants tenen problemes en el reclutament de proteïnes centromèriques i del cinetocor i presenten greus defectes durant la segregació cromosòmica (Blower and Karpen, 2001; Howman et al., 2000; Oegema et al., 2001; Régnier et al., 2005). Per tant, totes aquestes observacions suggereixen que CenH3 és necessària per l'assemblatge del cinetocor.

## 2.1 L'estructura de les variants centromèriques de la histona H3

La variant centromèrica de la histona H3 és molt divergent ja que evoluciona molt ràpidament. Aquesta evolució es dona per facilitar la interacció amb el DNA centromèric que és el DNA que més ràpid evoluciona en el genoma (Malik and Henikoff, 2001; Malik et al., 2002). La principal font de divergència es troba en el seu domini N-terminal. Aquest no mostra homologia de seqüència ni de longitud amb el de la histona H3 ni entre les variants centromèriques de diferents organismes (Figura I.5) (Malik and Henikoff, 2001). En canvi, el domini globular, amb plegament tipus histona (HFD), està força conservat entre les diferents variants i respecte la histona H3 (Malik and Henikoff, 2001).

### 2.1.1 El domini N-terminal

Degut a la conformació del nucleosoma, la cua N-terminal de les histones queda fora del nucli nucleosomal, facilitant la possible interacció amb altres proteïnes. De fet, en *S. cerevisiae* dins del domini N-terminal s'ha identificat una regió de 33 aminoàcids, anomenada domini END (*essential N-terminal domain*), que està implicada en la interacció entre CenH3<sup>Cse4</sup> i el complex cinetocòric Ctf19p-Mcm21p-Okp1p (Figura I.5) (Chen et al., 2000). No es coneix sobre la presència d'aquest domini END en altres CenH3s. No obstant, en un anàlisi evolutiu amb diferents espècies de *Drosophila* s'han identificat tres blocs conservats en el domini N-terminal de CenH3<sup>CID</sup> i es proposa que dos d'ells, Bloc 1 i 2, per analogia amb el domini END podrien estar implicats en el reclutament de proteïnes del cinetocor (Figura I.5) (Malik et al., 2002). El Bloc 1 és el més llarg, 44 aminoàcids, i es localitza a prop de l'extrem del domini N-terminal de CenH3<sup>CID</sup>. El Bloc 2 té 20 aminoàcids i es troba en el centre del domini N-terminal. Aquest Bloc està format per residus àcids flanquejats per un parell de serines conservades. Per últim, el Bloc 3 és el domini més curt, integrat per només 6 aminoàcids. Aquest està molt proper al domini HFD i es caracteritza per ser una regió bàsica, rica en arginines. En aquest mateix estudi, en determinades espècies de *Drosophila* s'han identificat dins del domini N-terminal expansions d'oligopèptids que s'assemblen als motius d'unió amb el solc petit del DNA. Aquesta darrera observació suggereix que el domini N-terminal mitjançant aquests motius podria interaccionar amb el DNA internucleosomal, produint un plegament de l'hèlix de DNA que faria que l'estructura de la cromatina fos més compacta.

Normalment les cues N-terminal de les histones presenten un patró de modificacions post-traduccionals que condicionen l'estat de la cromatina on es troben. En el cas de les variants centromèriques de la histona H3 es coneixen molt poques modificacions. Fins fa molt poc, l'única que es coneixia era la fosforilació de la serina 7 de



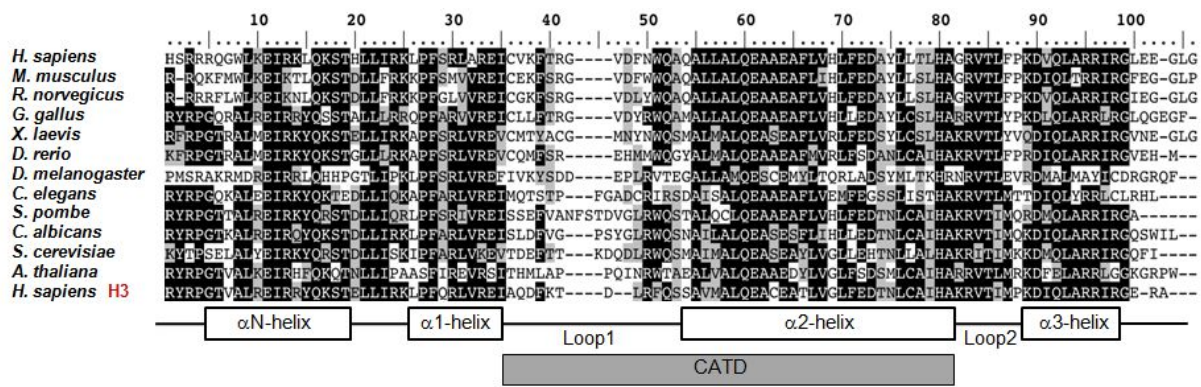
**Figura I.5. El domini N-terminal de les variants centromèriques de la histona H3 de diferents organismes és molt divergent tant en longitud com en seqüència.** Es mostra l'alineament de les seqüències d'aminòcids del domini N-terminal de CenH3 d'espècies diferents. A baix de tot, es mostra la seqüència per la histona canònica H3. La posició que correspon a cada domini conservat en la cua N-terminal de CenH3<sup>CID</sup> està marcada amb un rectangle de color blau (Bloc1), vermell (Bloc2) i lila (Bloc3). Per altra banda, també s'ha indicat amb un rectangle de color groc els aminoàcids que conformen el domini END de l'extrem N-terminal de CenH3<sup>Cse4</sup>.

CenH3<sup>CENP-A</sup> produïda per la quinasa Aurora B. Aquesta modificació es dona en mitosi i està relacionada amb el procés de citocinesi, modulant el patró de localització de tres proteïnes implicades en aquest procés, Aurora B, INCENP i PP1γ1 (Zeitlin et al., 2001). Recentment, s'han identificat tres modificacions post-traduccionals més de CenH3<sup>CENP-A</sup>, la trimetilació de la glicina 1 i la fosforilació de les serines 16 i 18. Pel que fa a la trimetilació de la glicina 1, els autors suggereixen que està implicada en la interacció del domini N-terminal amb el DNA. En canvi, les fosforilacions són necessàries per la correcta segregació cromosòmica i per formar una estructura secundària que estaria alterant les propietats físiques de la fibra de cromatina en el centròmer (Bailey et al., 2013).

En *S. cerevisiae*, s'ha descrit una altra modificació i és la mono i dimetilació de l'arginina 37. Curiosament, aquesta arginina es localitza dintre del domini END de CenH3<sup>Cse4</sup> i la seva metilació regula el reclutament en el centròmer de les proteïnes del cinetocor (Samel et al., 2012).

### 2.1.2 El domini globular

El domini globular amb plegament tipus histona (HFD) està format per quatre α-hèlixs, anomenades α-N, α-1, α-2 i α-3. Les α-hèlixs 1-2 i les 2-3 estan separades pels *loop* 1 i 2, respectivament (Figura I.6). Una característica comuna en les diferents CenH3s és que presenten una inserció de 2 a 6 aminoàcids al *loop* 1 (Cooper and Henikoff, 2004; Malik and Henikoff, 2001).



**Figura I.6. El domini globular amb plegament tipus histona de les variants centromèriques de la histona H3 d'espècies diferents està força conservat.** Es mostra l'alineament de les seqüències d'aminoàcids del domini globular de les proteïnes CenH3 d'espècies diferents. A baix de tot, es mostra la seqüència per la histona canònica H3. La posició que correspon a cada domini del HFD i del CATD està marcada amb un rectangle.

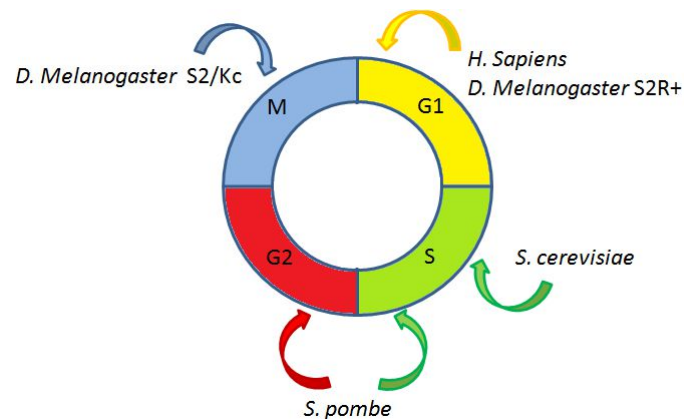
Experiments amb proteïnes quimèriques de la histona H3 i CenH3<sup>CENP-A</sup> mostren que el domini globular de CenH3<sup>CENP-A</sup> és el domini responsable de la seva localització centromèrica (Sullivan et al., 1994). En concret, s'ha vist que el *loop1* i l'hèlix  $\alpha$ -2 formen el domini responsable de la localització centromèrica de CenH3, anomenat CATD (*CENP-A targeting domain*) (Black et al., 2004). El domini CATD també produeix una rigidesa en la interfase entre CenH3 i la histona H4 en el nucleosoma de CenH3, fent que aquest nucleosoma sigui més compacte i amb una conformació més rígida que el nucleosoma que conté la histona H3 (Black et al., 2007). Per tant, aquest darrer treball suggereix que el CATD no només dirigeix l'associació de CenH3 a la cromatina centromèrica, sinó que canvia les propietats físiques dels nucleosomes de CenH3, generant una cromatina centromèrica diferent a la resta del cromosoma.

### 3. Deposició de CenH3 a la regió centromèrica

A diferència de les histones canòniques on la seva deposició està acoblada a la replicació del DNA, per CenH3 el moment del cycle cel·lular en el qual s'incorpora varia segons l'organisme (Figura I.7).

A *S. cerevisiae*, experiments de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) mostren que durant la replicació del DNA centromèric, el nucleosoma de CenH3<sup>Cse4</sup> és eliminat i s'incorpora un de nou en les dues cromàtides (Pearson et al., 2004). En *S. pombe* la deposició de CenH3<sup>Cnp1</sup> es produeix en dos moments del cycle cel·lular, durant la fase S i al final de G2. La deposició en fase S depèn del factor de transcripció dels gens d'histones Asm2 i es creu que és el principal mecanisme d'incorporació. En canvi, quan es depleciona Asm2 la deposició de CenH3<sup>Cnp1</sup> es dona bàsicament en G2. Aquest fet suggereix que la deposició independent de replicació podria ser un mecanisme de rescat per tal d'evitar que les cèl·lules entrin en mitosi sense tenir

la dosi necessària de CenH3<sup>Cnp1</sup> (Takayama et al., 2008). Aquests resultats podrien fer pensar que la deposició de CenH3 també està acoblada a la replicació del DNA. No obstant, s'ha vist que els llevats són l'excepció perquè en la resta d'organismes la deposició de CenH3 és independent de la replicació.



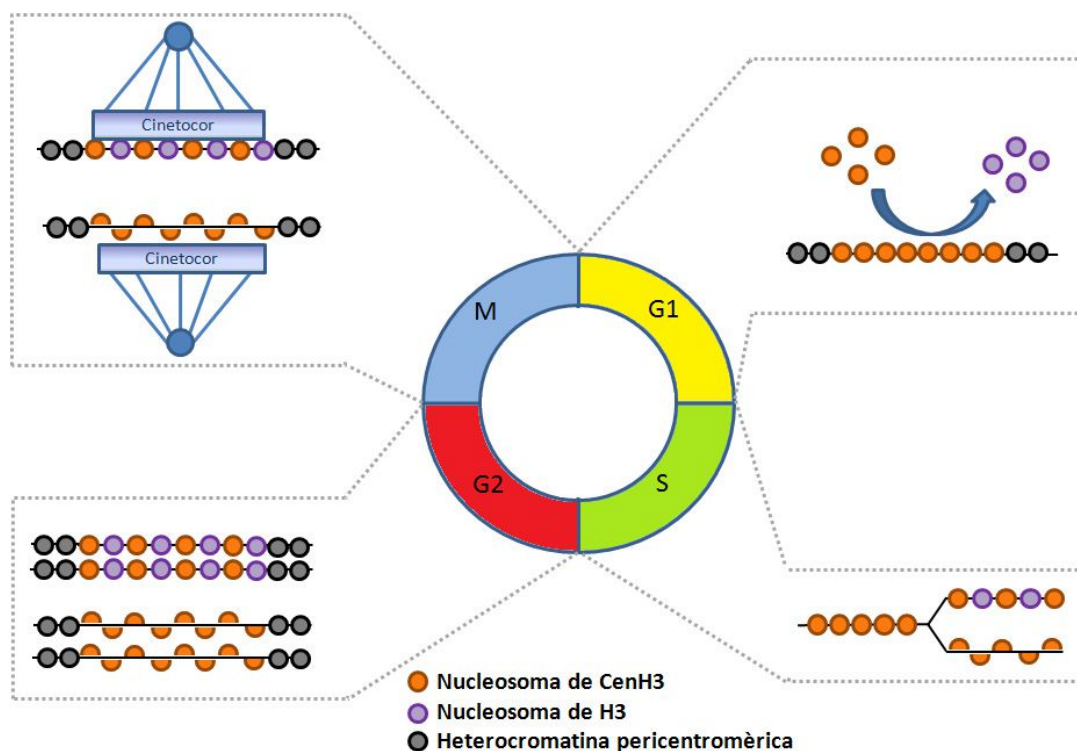
**Figura I.7. Esquema on s'indica el moment de deposició de CenH3 en espècies diferents.** En *S. cerevisiae* la deposició de CenH3<sup>Cse4</sup> està acoblada a la replicació del DNA. En *S. pombe*, CenH3<sup>Cnp1</sup> s'incorpora en dos moments del cicle; durant la fase S i en G2. En cèl·lules humanes la incorporació de CenH3<sup>CENP-A</sup> es dona al final de la telofase i inici de G1. En cèl·lules de *Drosophila*, CenH3<sup>CID</sup> es diposita predominantment a G1, tot i que hi ha una petita incorporació a metafase.

En cèl·lules humanes, la deposició de CenH3<sup>CENP-A</sup> es dona en un interval molt concret, entre el final de la telofase i l'inici de la fase G1 (Hemmerich et al., 2008; Jansen et al., 2007). A més, experiments de fusió de cèl·lules en diferents moments del cicle suggereixen que el pas per mitosi és un requisit necessari per la incorporació de CenH3<sup>CENP-A</sup> en la següent G1 (Jansen et al., 2007).

En cèl·lules embrionàries de *Drosophila* SL2 i Kc s'ha observat que la incorporació de CenH3<sup>CID</sup> es produeix en mitosi, concretament a metafase (Mellone et al., 2011). Per contra, un altre treball més recent en el que s'utilitzen cèl·lules S2R+ indica que, tot i que hi ha una incorporació de CenH3<sup>CID</sup> transitòria a metafase, aquesta es dona predominantment a G1 (Lidsky et al., 2013). També s'observen discrepàncies en el moment de deposició d'aquesta variant entre cèl·lules dels diferents teixits de *Drosophila*. Mentre que en neuroblasts de larves s'incorpora durant la telofase i continua en G1 (Dunleavy et al., 2012), en embrions sincitials la deposició es dona a anafase (Schuh et al., 2007). Aquesta diferència pot ser explicada pel fet que els nuclis dels embrions sincitials de *Drosophila* es divideixen molt ràpidament sense passar per G1 i G2. En conjunt, totes aquestes observacions suggereixen que a *Drosophila* la deposició de CenH3<sup>CID</sup> depèn del tipus de cèl·lula i del moment del desenvolupament.

Així doncs, a excepció dels llevats, durant la replicació del DNA centromèric els nucleosomes de CenH3 són repartits equitativament entre les dues cadenes filles i en el

lloc on s'hauria d'incorporar un nou nucleosoma de CenH3 és genera un forat (Figura I.8). En aquest punt hi ha una mica de controvèrsia ja que s'han descrit dos mecanismes contraposats que disposa la cèl·lula per omplir aquests forats. Per una banda, en cèl·lules humanes s'ha vist que en aquests forats s'incorporen nucleosomes que contenen la variant H3.3 fins la propera G1 on són substituïts pels nucleosomes de CenH3<sup>CENP-A</sup> (Dunleavy et al., 2011). Per altra banda, estudis realitzat en cèl·lules de *Drosophila* SL2 suggereixen que els nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup> es divideixen passant a la configuració de heterotetràmers (CenH3<sup>CID</sup>/H4/H2A/H2B), anomenats hemisomes, per tal d'omplir els forats generats (Dalal and Bui, 2010; Dalal et al., 2007). Tanmateix, es produeixi un o l'altre mecanisme, després de la replicació en cada cadena filla de DNA hi ha la meitat de nucleosomes de CenH3, produint-se una dilució de la marca epigenètica. Donat que a *Drosophila* i a cèl·lules humanes la deposició de CenH3 no es dona fins al final de la mitosi i/o G1, això implica que durant la mitosi, moment clau per la funció centromèrica, hi ha la meitat de la dosi de CenH3. De fet, es creu que aquesta configuració de la cromatina centromèrica podria ser necessària per la funció i propagació dels centròmers.



**Figura I.8. Esquema de l'estat de la cromatina centromèrica en cada moment del cicle en cèl·lules humanes i de *Drosophila*.** Donat que la incorporació de CenH3 en aquests organismes no està acoblada a la replicació, després d'aquest procés, en cada cadena resultant hi ha la meitat del contingut total de CenH3. Per solucionar aquest problema s'han descrit dos mecanismes contraposats. En cèl·lules humanes, els forats són emplenats per la deposició de nucleosomes d'H3. En canvi, en cèl·lules de *Drosophila* es dona l'escissió dels nucleosomes de CenH3. Per tant, la cèl·lula avança durant la fase G2 i la mitosi amb la meitat del contingut de CenH3, fins la seva incorporació a finals de la mitosi i inici de G1.



### 3.1 Mecanisme de deposició de CenH3

Malgrat la diferència en el moment de la incorporació de CenH3 entre *S. pombe* i les cèl·lules humanes, aquest dos organismes tenen proteïnes homòlogues que són essencials per la deposició de CenH3, Mis18 i HJURP/Smc3.

#### 3.1.1 Mis18 i Mis16

Inicialment, la proteïna Mis18 (*Missegregation 18*) va ser identificada en un cribatge de mutacions que causessin problemes de segregació cromosòmica en *S. pombe*. Mis18 conjuntament amb Mis16, una altra proteïna identificada en el cribatge, formen un complex que és essencial per la deposició de CenH3<sup>Cnp1</sup> i de la resta de components del cinetocor (Hayashi et al., 2004). En aquest mateix treball, es demostra que aquest complex és també necessari per mantenir l'estat hipocetilat dels nucleosomes de la regió centromèrica.

Mis16 és la proteïna homòloga en llevats de les proteïnes humanes RbAp46 i RbAp48 (*Retinoblastoma-associated protein 46/48*). RbAp48 és un component del complex d'assemblatge de la cromatina CAF-1 (*Chromatin assembly factor 1*) (Verreault et al., 1996). En cèl·lules humanes, experiments de co-depleció de RbAp46 i RbAp48 demostren que aquestes són necessàries pel reclutament de CenH3<sup>CENP-A</sup> en els centròmers (Dunleavy et al., 2009; Hayashi et al., 2004). A *Drosophila*, l'homòleg de Mis16, p55, és purificat conjuntament amb CenH3<sup>CID</sup> i H4 en el complex d'assemblatge de CenH3<sup>CID</sup>. A més, mitjançant experiments de reconstitució *in vitro* s'ha observat que p55 permet l'assemblatge dels nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup> (Furuyama et al., 2006).

A cèl·lules humanes, el complex format pels homòlegs de Mis18, Mis18 $\alpha$  i Mis18 $\beta$ , i la proteïna M18BP1 (*Mis 18-binding protein1*) també és essencial per la deposició de CenH3<sup>CENP-A</sup> en els centròmers (Fujita et al., 2007). Aquest complex es localitza en els centròmers en un interval de temps molt petit que va des d'anafase fins al principi de G1, just abans que CenH3<sup>CENP-A</sup> sigui dipositada (Fujita et al., 2007). Aquesta observació i el fet que cap component d'aquest complex interaccioni directament amb CenH3<sup>CENP-A</sup> suggereixen que la seva funció és la de modificar la cromatina centromèrica per fer-la permissiva a la deposició de CenH3. De fet, el tractament amb TSA (*Trichostatin A*), un inhibidor de les deacetilases d'histones, restaura la deposició de CenH3<sup>CENP-A</sup> en absència de hMis18 (Fujita et al., 2007). Així doncs, un possible paper d'aquest complex conjuntament amb Mis16/ RbAp46/48 seria el de mantenir un estat d'acetilació de la regió centromèrica favorable per la deposició de CenH3 (Figura I.9).

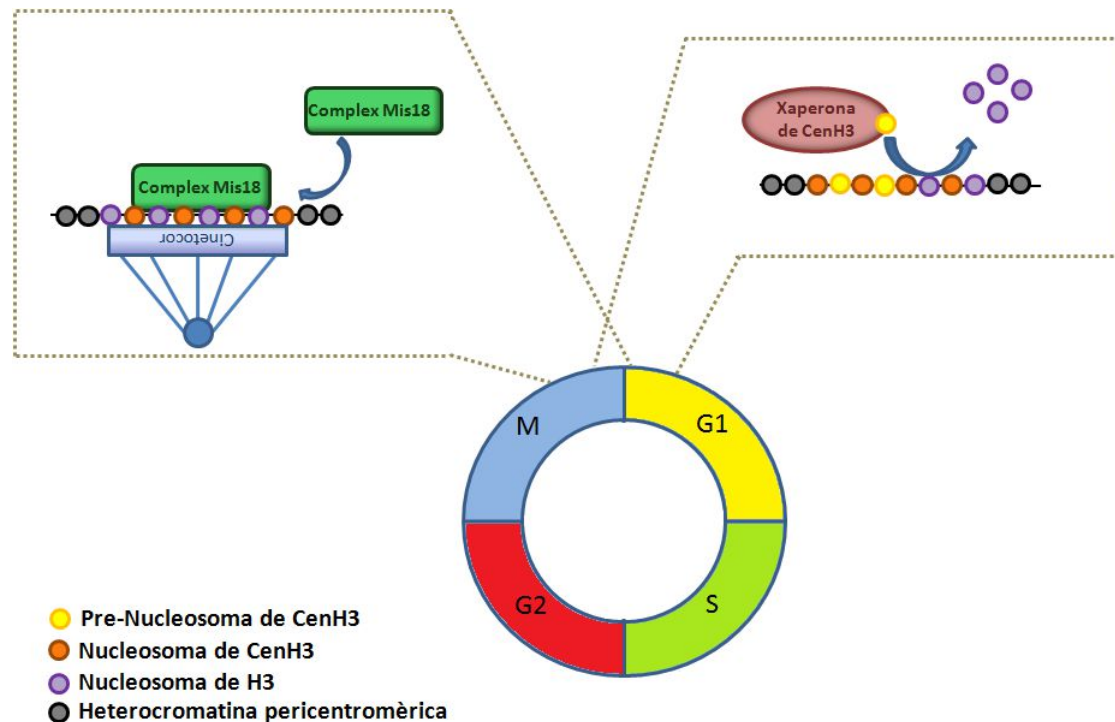
### 3.1.2 Les xaperones de CenH3

Entre d'altres funcions, les xaperones s'uneixen a les histones i permeten la transferència d'aquestes a la cromatina. Normalment, les xaperones solen formar complexos solubles amb les histones abans que aquestes siguin incorporades a la cromatina per tal d'evitar-ne la degradació.

Concretament, en cèl·lules humanes s'ha vist que el pre-nucleosoma de CenH3<sup>CENP-A</sup> interacciona amb tres xaperones; RbAp46/48, Npm1 (*Nucleophosmin1*) i HJURP (*Holliday Junction Recognition Protein*) (Dunleavy et al., 2009). Tant RbAp46/48 com Npm1 no són xaperones específiques de CenH3<sup>CENP-A</sup> ja que interaccionen amb altres histones (Murzina et al., 2008; Namboodiri et al., 2004; Okuwaki et al., 2001; Song et al., 2008; Verreault et al., 1998). En canvi, es considera que HJURP és la xaperona específica per la deposició de CenH3<sup>CENP-A</sup> als centròmers per diferents raons. Entre elles, cal destacar que HJURP i CenH3<sup>CENP-A</sup> interaccionen directament. Aquesta interacció es dona pel domini CATD de CenH3<sup>CENP-A</sup> i un domini que hi ha a la cua N-terminal de HJURP (Shuaib et al., 2010). En segon lloc, quan s'elimina HJURP hi ha una disminució dràstica dels nivells de CenH3<sup>CENP-A</sup> en els centròmers (Dunleavy et al., 2009; Shuaib et al., 2010). I per últim, HJURP colocalitza amb CENP-A en els centròmers al final de la telofase/principi G1, moment precís en que es diposita CenH3<sup>CENP-A</sup> (Figura I.9) (Dunleavy et al., 2009). La localització de HJURP als centròmers depèn del complex Mis18, però la interacció directa entre aquests dos no s'ha descrit (Barnhart et al., 2011). Per tant, s'ha proposat que la funció de Mis18 seria la de modificar l'estat de la cromatina centromèrica per facilitar l'accés de HJURP als centròmers.

En *S. pombe*, CenH3<sup>Cnp1</sup> interacciona físicament amb Sim3, una xaperona de histones homòloga a NASP (*Nuclear Autoanigenic Sperm Protein*). Malgrat que Sim3 és necessària per la localització de CenH3<sup>Cnp1</sup> als centròmers aquesta no es localitza als centròmers (Dunleavy et al., 2007). Això suggereix que Sim3 podria actuar com a protector de CenH3<sup>Cnp1</sup>, portar-la als centròmers i facilitar-ne la interacció amb el factor que permet la seva deposició. De fet, es creu que Scm3 (*Suppressor of chromosome missegregation 3*), xaperona homòloga de HJURP en llevats, fa aquesta funció de rebre els nucleosomes de CenH3<sup>Cnp1</sup> que són portats per Sim3. Scm3 interacciona amb CenH3<sup>Cnp1</sup> i és necessària per la seva localització centromèrica. Aquest factor es localitza als centròmers durant tot el cicle cel·lular a excepció de mitosi. La localització centromèrica de Scm3 també depèn del complex Mis16/Mis18 (Pidoux et al., 2009; Williams et al., 2009).

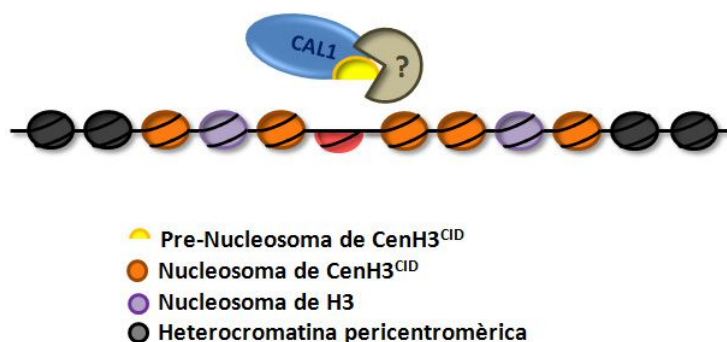




**Figura I.9. Model pel mecanisme de deposició de CenH3<sup>CENP-A</sup> en cèl·lules humanes.** El complex Mis18 es localitza als centròmers humans des d'anafase fins al principi de G1, per modificar la cromatina centromèrica i fer-la permissiva a la deposició de CenH3<sup>CENP-A</sup>. A continuació, a final de telofase i principi de G1 la xaperona HJURP es localitza conjuntament amb CenH3<sup>CENP-A</sup> en els centròmers on intervé en al deposició d'aquesta variant.

Concretament, a *Drosophila* no s'han identificat les proteïnes homòlogues de HJURP/Smc3 ni dels components del complex de Mis18. No obstant, mitjançant un cribatge de defectes mitòtics en cèl·lules SL2 es va identificar la proteïna CAL1 (*Chromosome alignment defect 1*) que és necessària per la localització centromèrica de CenH3<sup>CID</sup> i CENP-C (Goshima et al., 2007). En realitat, CenH3<sup>CID</sup>, CAL1 i CENP-C són mútuament dependents per la localització centromèrica (Erhardt et al., 2008; Goshima et al., 2007). Mitjançant un assaig de dos híbrids s'ha determinat que el domini N-terminal de CAL1 interacciona amb CenH3<sup>CID</sup> i que el domini C-terminal de CAL1 interacciona amb CENP-C (Schittenhelm et al., 2010). Per tant, CAL1 actuaria com pont d'unió entre CenH3<sup>CID</sup> i CENP-C.

CAL1 es localitza als centròmers durant tot el cicle cel·lular i la seva incorporació *de novo* es dona abans que la deposició de CenH3<sup>CID</sup> (Lidsky et al., 2013; Mellone et al., 2011). En el treball de Mellone et al., 2011 també s'ha descrit que CAL1 interacciona amb el pre-nucleosoma de CenH3<sup>CID</sup>. A més, recentment, en experiments de reconstitució *in vitro* de la cromatina s'ha comprovat que CAL1 és suficient per assemblar els nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>, fet que confirmaria que és la xaperona específica per CenH3<sup>CID</sup> (Figura I.10) (Chen et al., 2014).



**Figura I.10. Model del mecanisme de deposició de CenH3<sup>CID</sup> a *Drosophila*.** Durant la mitosi i/o inici de G1, el pre-nucleosoma de CenH3<sup>CID</sup> és incorporat al centròmer amb la col·laboració de CAL1 i/o altres factors implicats en l'assemblatge d'aquesta variant.

### 3.2 Mecanismes per evitar la localització ectòpica de CenH3

Encara que CenH3 està altament enriquida als centròmers, aquesta es pot incorporar en qualsevol lloc del genoma. En concret, s'han detectat nivells baixos de CenH3<sup>Cse4</sup> en les regions eucromàtiques altament transcrites del genoma del llevat (Lefrançois et al., 2009). A més, la sobreexpressió transitòria de CenH3 fa que s'incorpori per tota la cromatina generant inestabilitat genòmica (Heun et al., 2006; Moreno-Moreno et al., 2006; Van Hooser et al., 2001). De fet, en alguns càncers humans, CenH3<sup>CENP-A</sup> està sobreexpressada i, també en aquests casos, es troba deslocalitzada per tota la cromatina (Tomonaga et al., 2003). En conjunt, totes aquestes observacions suggereixen l'existència de mecanismes per garantir que la incorporació estable dels nucleosomes de CenH3 es produeix només en els centròmers.

A excepció dels llevats, un primer mecanisme és que la incorporació centromèrica de CenH3 sigui independent de la replicació, ja que la separació temporal de la seva deposició amb la de la resta d'histones permet evitar errors.

Un altre mecanisme és la regulació de la seva transcripció. En cèl·lules humanes, el pic d'expressió de CenH3<sup>CENP-A</sup> es produeix després de la replicació del DNA, concretament a G2 (Shelby et al., 1997). D'aquesta manera se'n limita la disponibilitat quan no s'ha d'incorporar. En canvi, l'expressió de l'homòleg de *Drosophila*, CenH3<sup>CID</sup>, té lloc en la fase S (Henikoff et al., 2000). Per tant, hi ha d'haver mecanismes addicionals per evitar la deposició dels nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup> en llocs no centromèrics durant la replicació del DNA i/o per eliminar-los després. De fet, experiments d'expressió transitòria realitzats en cèl·lules de *Drosophila* Kc, mostren que CenH3<sup>CID</sup> inicialment es deslocalitza per tota la cromatina (Moreno-Moreno et al., 2006). No obstant això, amb el temps, la localització de CenH3<sup>CID</sup> es restringeix progressivament als centròmers a través

d'un procés que implica la degradació del CenH3<sup>CID</sup> deslocalitzat via proteosoma (Moreno-Moreno et al., 2006). La degradació proteolítica de CenH3 també s'ha detectat en *S. cerevisiae* (Collins et al., 2004) i en cèl·lules humanes senescens o bé infectades amb el virus de l'*herpes simplex* tipu 1 (Lomonte et al., 2001; Maehara et al., 2010), el que indica que és un mecanisme conservat. Concretament, en *S. cerevisiae* s'ha identificat una ubiquitina-lligasa E3, Psh1, que indueix la poliubiquitinació de CenH3<sup>Cse4</sup>, requisit necessari per la seva posterior degradació via proteosoma (Hewawasam et al., 2010; Ranjitkar et al., 2010). Psh1 reconeix el domini CATD de la variant, el que indica que aquest domini en regula l'estabilitat (Ranjitkar et al., 2010). També s'ha observat que la interacció de CenH3<sup>Cse4</sup> amb la xaperona Smc3 la protegeix de la degradació (Hewawasam et al., 2010). En absència de Psh1, la sobreexpressió de CenH3<sup>Cse4</sup> indueix la seva incorporació a l'eucromatina i afecta la viabilitat de la cèl·lula. Tanmateix, la deleció de Psh1 no estabilitza completament CenH3<sup>Cse4</sup>, suggerint que hi ha altres vies de degradació de la variant. Aquesta observació és coherent amb el fet que el mutant de CenH3<sup>Cse4</sup> que no pot ser ubiquitinat, continua sent degradat (Collins et al., 2004).

Per últim, altres proteïnes centromèriques poden regular que la incorporació de CenH3 es doni només al centròmer. En *Drosophila*, els nivells estrictament controlats de CAL1 limiten la incorporació de CenH3<sup>CID</sup> i CENP-C a la cromatina centromèrica (Schittenhelm et al., 2010).

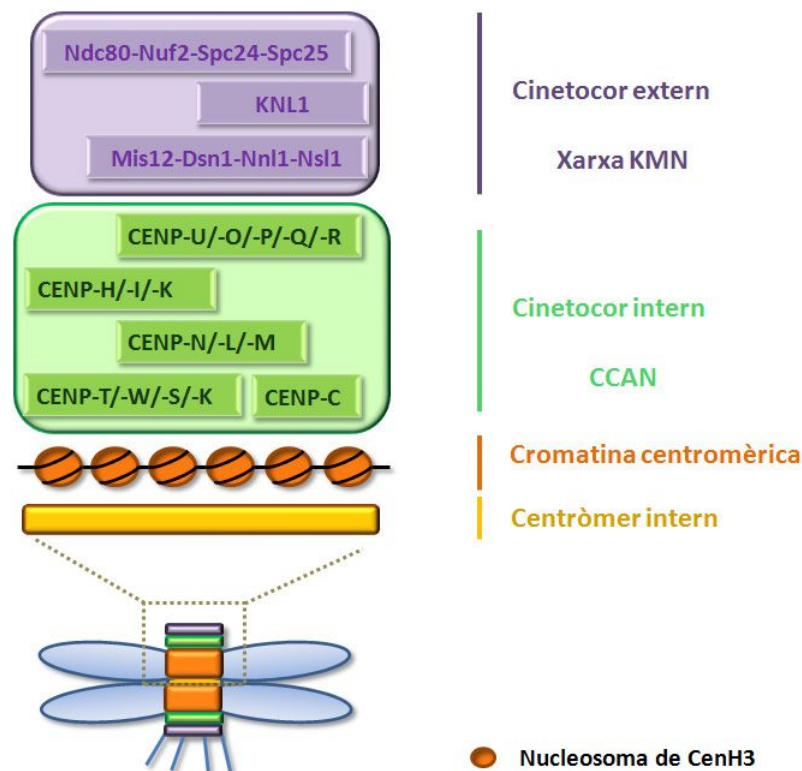
#### 4. El cinetocor

En tots els eucariotes, és necessària la interacció dels cromosomes amb els microtúbuls dels fus acromàtic perquè la segregació cromosòmica sigui correcte. Aquesta interacció es produeix mitjançant el cinetocor, complex multiproteic que s'assembla en el centròmer de cada cromosoma durant la mitosi (Cheeseman and Desai, 2008). A més de permetre la interacció centròmer-microtúbuls, el cinetocor realitza altres funcions per garantir una correcta segregació cromosòmica. Entre aquestes funcions cal destacar la transmissió de la força per moure els cromosomes i la producció d'un senyal que retarda la transició de metafase a anafase fins que tots els cromosomes estan units correctament al fus (Maiato et al., 2004; Musacchio and Salmon, 2007; Rieder and Salmon, 1998; Tanaka et al., 2007).

Estudis convencionals de microscòpia electrònica mostren que el cinetocor té una estructura trilaminar (Brinkley and Stubblefield, 1966; Jokelainen, 1967). Aquesta morfologia ha influenciat la divisió del cinetocor en tres regions; la cara interna que contacta amb la cromatina centromèrica, una cara externa que contacta amb els microtúbuls i una regió central entre aquestes dues. El terme centròmer intern fa referència a la cromatina compresa entre els dos cinetocors germans.

#### 4.1 La composició molecular del cinetocor

En els darrers vint anys, gràcies a la combinació d'estudis genètics, bioquímics i proteòmics en organismes models i en cèl·lules de vertebrats s'han identificat una gran quantitat de proteïnes del cinetocor. Encara que hi ha algunes característiques específiques per cada organisme, en termes generals la composició i l'organització dels cinetocors està conservada entre els eucariotes. A grans trets, a la cara interna del cinetocor hi ha un grup de proteïnes que estan associades constitutivament a la cromatina centromèrica, les proteïnes centromèriques. Aquestes conjuntament amb CenH3 formen un entorn permissiu per l'assemblatge del cinetocor durant la mitosi. En canvi, la cara externa del cinetocor es forma en cada mitosi i està composta per les proteïnes necessàries per la interacció amb els microtúbuls. Entre elles cal destacar, les proteïnes que s'uneixen directament als microtúbuls, com ara les de la xarxa KMN (KNL1, Mis12, Ndc80), així com els factors més transitoris que modulen aquesta interacció, les proteïnes del punt de control de mitosi (Figura I.11) (Cheeseman and Desai, 2008).



**Figura I.11. Esquema de l'estructura del cinetocor en organismes superiors.** A la cara interna del cinetocor, en contacte directe amb la cromatina centromèrica, hi ha les proteïnes que estan constitutivament unides a la cromatina i que conformen el CCAN (*Constitutive centromere-associated network*). En canvi, la cara externa es forma en cada mitosi i conté les proteïnes necessàries per la interacció amb els microtúbuls, com ara els components de la xarxa KMN.

### 4.1.1 Les proteïnes centromèriques

Associades constitutivament a la cromatina centromèrica dels eucariotes superiors s'han identificat un grup de proteïnes que formen el CCAN (*Constitutive centromere-associated network*). Durant la mitosi, aquestes proteïnes recluten els components de la xarxa KMN per formar un cinetocor funcional.

L'esdeveniment clau en el procés d'identificació de les proteïnes que formen el CCAN va ser l'observació que el sèrum de pacients afectats pel Síndrome de CREST reconeixia tres proteïnes centromèriques: CENP-A, CENP-B i CENP-C (Earnshaw and Rothfield, 1985). Treballs posteriors van demostrar que la proteïna anomenada CENP-A és la variant centromèrica de la histona H3 (Palmer et al., 1991; Palmer et al., 1987). Més endavant, es van identificar dues proteïnes centromèriques més; CENP-H (Sugata et al., 1999) i CENP-I (Nishihashi et al., 2002). L'any 2006, se'n van afegir 11 més a la llista; CENP-K, CENP-L, CENP-M, CENP-N, CENP-O, CENP-P, CENP-Q, CENP-R, CENP-S, CENP-T i CENP-U(50) (Foltz et al., 2006; Okada et al., 2006). Les darreres proteïnes identificades han estat CENP-W que interacciona amb CENP-T (Hori et al., 2008a) i CENP-X que forma complex amb CENP-S (Amano et al., 2009).

Mitjançant anàlisi bioquímics, estructurals i genètics, les proteïnes del CCAN es poden classificar en cinc subgrups: CENP-C, el grup de proteïnes CENP-H, -I, -K, el grup de proteïnes CENP-L, -M i -N, el complex CENP-T-W-S-X i el grup de proteïnes CENP-O, -P, -Q, -R i -U(50) (Taula I.1) (Cheeseman et al., 2008; Hori et al., 2008b; Nishino et al., 2012; Okada et al., 2006).

Tenint en compte que CenH3 és necessària pel reclutament de totes les proteïnes del CCAN (Foltz et al., 2006; Hori et al., 2008a; Régnier et al., 2005); i que aquestes interaccionen amb les proteïnes del cinetocor, es considera que CenH3 és l'element essencial en el procés d'assemblatge del cinetocor. Tot i els avanços fets en els darrers anys, el mecanisme molecular precís pel qual els nucleosomes de CenH3 dicten la formació del cinetocor no es coneix.

Per algunes espècies com per exemple *S. cerevisiae* i *S. pombe* s'han identificat algunes de les proteïnes homòlogues a les del CCAN (Przewlaka and Glover, 2009). No obstant, en *C. elegans* i *D. melanogaster* es desconeixen totes, a excepció de CENP-C suggerint que en aquestes espècies l'assemblatge del cinetocor potser és més simple (Taula I.1).

<i>H. sapiens</i>	<i>S. pombe</i>	<i>D. melanogaster</i>	Localització centromèrica	Afecta localització centromèrica de CenH3	Funció
<b>Proteïnes centromèriques</b>					
CenH3 <sup>CENP-A</sup>	CenH3 <sup>Cnp1</sup>	CenH3 <sup>CID</sup>	Constitutiva		
CENP-C	Cnp3	CENP-C	Constitutiva	No o molt poca afectació en cèl·lules de vertebrats i <i>C. elegans</i> (Carroll et al., 2010; Hori et al., 2008a; Kwon et al., 2007; Oegema et al., 2001). Sí a <i>D. melanogaster</i> (Erhardt et al., 2008; Goshima et al., 2007; Orr and Sunkel, 2010)	Intervé en el reclutament de proteïnes centromèriques i del cinetocor (Kwon et al., 2007; Liu et al., 2006; Milks et al., 2009)
<b>Grup de proteïnes CENP-H,-I,-K</b>					
CENP-H	Fta3	--	Constitutiva	En cèl·lules de pollastre les proteïnes d'aquest grup són necessàries per la incorporació centromèrica de GFP-CenH3 <sup>CENP-A</sup> de nova síntesi (Okada et al., 2006). A <i>S. pombe</i> , Mis6 també intervé en la deposició de CenH3 <sup>Cnp1</sup> (Takahashi et al., 2000)	En cèl·lules de vertebrats les proteïnes d'aquest grup intervenen en el reclutament de proteïnes del complex Ndc80 i del punt de control de mitosi (Cheeseman et al., 2008; Liu et al., 2006; Okada et al., 2006).
CENP-I	Mis6	--	Constitutiva		
CENP-K	Sim4	--	Constitutiva		
<b>Grup de proteïnes CENP-L,-M,-N</b>					
CENP-L	Fta1	--	Constitutiva	En cèl·lules humanes la depleció de CENP-N redueix el contingut de CenH3 <sup>CENP-A</sup> en els centròmers (Carroll et al., 2009). A <i>S. pombe</i> , la mutació de Mis15 indueix el mateix defecte (Hayashi et al., 2004).	Les proteïnes d'aquest grup tenen un paper més relacionat amb la connexió entre la cromatina centromèrica i el cinetocor. CENP-N interacciona directament i específicament amb els nucleosomes de CenH3 <sup>CENP-A</sup> <i>in vitro</i> (Carroll et al., 2009).
CENP-M	Mis17	--	Constitutiva		
CENP-N	Mis15	--	Constitutiva		

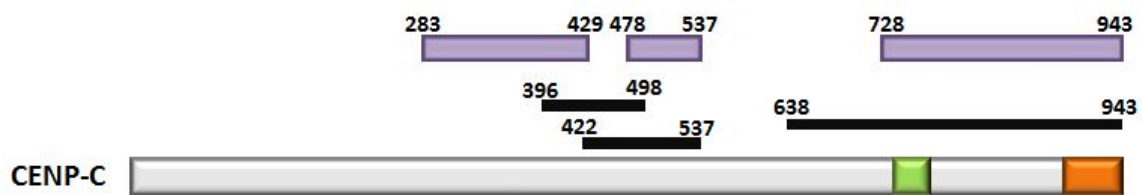
**Taula I.1.- Taula resum de les diferents proteïnes centromèriques identificades en vertebrats.** S'indica els seus ortòlegs en *S. pombe* i en *D. melanogaster*, el tipus de localització centromèrica, si afecten a al deposició de CenH3 i les seves funcions.

<i>H. sapiens</i>	<i>S. pombe</i>	<i>D. melanogaster</i>	Localització centromèrica	Afecta localització centromèrica de CenH3	Funció
<b>Complex CENP-T-W-S-X</b>					
CENP-T	Cnp20	--	Constitutiva	Les proteïnes d'aquest complex no afecten a la localització centromèrica de CenH3 <sup>CENP-A</sup> en cèl·lules de vertebrat (Hori et al., 2008a)	Formen un heterotetràmer que interacciona amb el DNA, formant una estructura semblant a la d'un nucleosoma (Nishino et al., 2012). El subcomplex CENP-T-W interacciona amb els nucleosomes d'H3 adjacents als de CenH3 (Hori et al., 2008a).  El domini N-terminal de CENP-T uneix directament al complex Ndc80 (Gascoigne et al., 2011).  El subcomplex CENP-T-W és necessari pel reclutament de proteïnes del grup CENP-H, -I i -K i del grup CENP-O, -P, -Q i -U(50) en el centròmer. En canvi, CENP-C no es veu afectada, suggerint que CENP-C i el complex CENP-T-W actuen en paral·lel en els processos de formació del cinetocor (Hori et al., 2008a).  El subcomplex CENP-S-X és necessari per l'assemblatge de proteïnes del cinetocor com KNL1 i Ndc80 (Amano et al., 2009).
CENP-W	SPAC17G8.15	--	Constitutiva		
CENP-S	SPBC2D10.16	--	Constitutiva		
CENP-X	Mhf2	--	Constitutiva		
<b>Grup de proteïnes CENP-O,-P,-Q,-R,-U</b>					
CENP-O	Mal2	--	Constitutiva	Les proteïnes d'aquest complex no afecten a la localització centromèrica de CenH3 en cèl·lules de vertebrat (Hori et al., 2008a)	Necessàries per la recuperació després del dany en el fus, evitant la prematura separació de les cromàtides germanes fins que els microtúbuls estan units correctament als cinetocors (Hori et al., 2008b). Els components d'aquest grup són interdependents pel que fa a la seva localització centromèrica i dependents de CENP-H, -I i -K (Hori et al., 2008b; Okada et al., 2006).
CENP-P	Fta2	--	Constitutiva		
CENP-Q	Fta7	--	Constitutiva		
CENP-U	Fta4	--	Constitutiva		
CENP-R	--	--	Constitutiva		

Taula I.1. Continuació

## CENP-C

La proteïna CENP-C es caracteritza per estar conservada evolutivament i per tenir la capacitat d'unir-se al DNA no específicament (Saitoh et al., 1992; Sugimoto et al., 1994; Yang et al., 1996). Estudis estructurals i funcionals han permès identificar els dominis de CENP-C implicats en la interacció amb el DNA i en la seva localització centromèrica (Figura I.12) (Lanini and McKeon, 1995; Sugimoto et al., 1997; Sugimoto et al., 1994; Suzuki et al., 2004; Trazzi et al., 2002; Yang et al., 1996). Un d'aquests dominis es localitza en la regió central de la proteïna i l'altre en l'extrem C-terminal. El domini de l'extrem C-terminal està conservat en la majoria dels ortòlegs de CENP-C i s'anomena domini CENP-C (Heeger et al., 2005; Talbert et al., 2004). Tot i que a *Drosophila*, aquest domini no està del tot conservat també és necessari per la localització centromèrica de la proteïna (Heeger et al., 2005). En l'extrem C-terminal hi ha un altre domini que és el responsable de la dimerització de la proteïna (Cohen et al., 2008; Sugimoto et al., 1997).



**Figura I.12. Representació esquemàtica de la proteïna CENP-C d'humans.** En la proteïna CENP-C s'han identificat dos regions responsables de la seva interacció amb el DNA (rectangles negres) i de la seva localització centromèrica (rectangles liles). Una d'aquestes regions és la part central de la proteïna que no està conservada entre espècies. En canvi, l'altre regió que es localitza en l'extrem C-terminal de la proteïna presenta dos dominis conservats: el domini CENP-C (rectangle verd), necessari per la interacció amb el DNA, i el domini de dimerització (rectangle taronja).

Per altra banda, mitjançant experiments d'immunoprecipitació de cromatina prèviament digerida amb nucleasa micrococcal, s'ha observat que CENP-C interacciona amb els nucleosomes d'H3 quan la cromatina està completament digerida donant un patró de mononucleosomes (Hori et al., 2008a). En canvi, quan la digestió és parcial, per tant en l'extracte hi ha polinucleosomes, els nucleosomes de CenH3<sup>CENP-A</sup> co-immunoprecipiten amb CENP-C, suggerint que CENP-C està unida als nucleosomes d'H3 adjacents als de CenH3<sup>CENP-A</sup> (Ando et al., 2002; Hori et al., 2008a). Per contra, treballs més recents suggereixen que CENP-C interacciona directament amb els nucleosomes de CenH3<sup>CENP-A</sup>. Experiments *in vitro* demostren que els sis aminoàcids finals del domini C-terminal de CenH3<sup>CENP-A</sup> interaccionen amb la regió central de CENP-C (Carroll et al., 2010; Guse et al., 2011). Aquesta interacció explicaria el fet que la localització centromèrica de CENP-C depèn de CenH3 (Goshima et al., 2007; Heeger et al., 2005; Hori et al., 2008a; Howman et al., 2000; Oegema et al., 2001; Régnier et al., 2005). En canvi, la depleció de CENP-C no afecta significativament els nivells de CenH3 (Hori et al.,



2008a; Kwon et al., 2007; Oegema et al., 2001), a excepció de *Drosophila* on s'ha observat que la localització centromèrica d'aquestes dues proteïnes és interdependent (Erhardt et al., 2008; Goshima et al., 2007; Orr and Sunkel, 2010).

La relació de dependència entre CENP-C i les proteïnes CENP-H, -I i -K també és força complexa en cèl·lules de vertebrats. Experiments de depleció de CENP-H, -I o -K en cèl·lules de pollastre DT40 mostren que CENP-C depèn d'aquestes proteïnes per la seva localització centromèrica en interfase, però no durant la mitosi (Cheeseman et al., 2008; Fukagawa et al., 2001; Kwon et al., 2007; Nishihashi et al., 2002). Aquests resultats suggereixen que hi ha dos mecanismes independents de deposició de CENP-C un que actua en interfase i depèn de les proteïnes CENP-H, -I i -K i l'altre que actua en mitosi. En cèl·lules de *Drosophila*, també s'ha descrit que la deposició de CENP-C succeeix en diferents moments del cicle, en interfase al final de la fase S i G2, i durant la metafase (Lidsky et al., 2013; Mellone et al., 2011). Els dos mecanismes moleculars d'incorporació es desconeixen. Tanmateix, estudis realitzats en el blat de moro i en cèl·lules humanes suggereixen que els RNAs no codificants juguen un paper important en l'assemblatge-estabilització de CENP-C en els centròmers (Du et al., 2010; Wong et al., 2007). En concret, al tractar cèl·lules HeLa amb RNasa els nivells de CENP-C en els centròmers dels cromosomes metafàsics es veuen greument reduïts, sense afectar els nivells de CenH3<sup>CENP-A</sup>.

En tots els eucariotes estudiats fins ara, la proteïna CENP-C té un paper essencial en la viabilitat de la cèl·lula, ja que la seva depleció produeix aturada en mitosi degut a defectes en l'alineament dels cromosomes en la placa metafàsica, aneuploidies i apoptosi (Fukagawa and Brown, 1997; Heeger et al., 2005; Kalitsis et al., 1998; Kwon et al., 2007; Orr and Sunkel, 2010; Tanaka et al., 2009; Tomkiel et al., 1994). Aquests fenotips s'expliquen perquè la seva depleció produeix una reducció del reclutament d'altres proteïnes centromèriques i del cinetocor, desencadenant greus defectes en l'assemblatge del cinetocor (Kwon et al., 2007; Liu et al., 2006; Milks et al., 2009). Concretament, experiments bioquímics mostren que el domini N-terminal de CENP-C s'uneix directament amb el complex Mis12 i que aquesta interacció és estequiomètrica (Screpanti et al., 2011). En cèl·lules de *Drosophila* SL2, també s'ha observat que aquest domini interacciona amb proteïnes del cinetocor que pertanyen a la xarxa KMN i alhora és suficient per reclutar-les ectòpicament en altres llocs de la cèl·lula (Przewloka et al., 2011). En aquest mateix treball, mitjançant experiments de *GST-pull down*, s'ha demostrat la interacció directa d'aquest domini N-terminal amb Nsf1 i puntualment amb Nsl1, dues subunitats del complex Mis12. Per tant, tenint en compte totes aquestes observacions, es pot considerar que CENP-C actua com a mediador entre la cromatina centromèrica i alguns components de la cara externa del cinetocor per tal de garantir una correcta segregació cromosòmica.

### 4.1.2 La xarxa KMN

La xarxa KMN es localitza a la cara externa del cinetocor i té un paper clau en la interacció del cinetocor amb els microtúbuls. Aquesta xarxa està integrada per tres grups de proteïnes conservades en els eucariotes; el complex Mis12, la proteïna KNL1 i el complex Ndc80 (Cheeseman et al., 2006; Cheeseman et al., 2004). Aquestes proteïnes es comencen a detectar als cinetocors durant la fase G2 i es dissocien al final de la mitosi (Gascoigne and Cheeseman, 2011).

#### El complex Mis12

El complex Mis12 està format per quatre proteïnes; Mis12, Nnf1, Nsl1 i Dsn1 (Cheeseman et al., 2006; Cheeseman et al., 2004; Obuse et al., 2004). La pèrdua d'algun component d'aquest complex induïx defectes en l'alineament, orientació i segregació dels cromosomes perquè produeix una disminució del reclutament de proteïnes del cinetocor en el centròmer (Goshima et al., 2003; Goshima et al., 1999; Kline et al., 2006; Venkei et al., 2011). Tanmateix, a *D. melanogaster* no s'ha identificat la proteïna homòloga a Dsn1, i es creu que aquesta ha sigut funcionalment substituïda en part per KNL1 o Nsl1 (Przewloka et al., 2009; Schittenhelm et al., 2009).

Estudis estructurals i bioquímics mostren que les quatre subunitats formen una estructura lineal amb el següent ordre: Nnf1, Mis12, Dsn1 i Nsl1 en els cinetocors dels vertebrats (Petrovic et al., 2010). L'extrem Nnf1 està orientat cap la cara interna del cinetocor on interacciona directament amb el domini N-terminal de CENP-C (Przewloka et al., 2011; Screpanti et al., 2011). En canvi, l'extrem Nsl1 està orientat cap a la cara externa de cinetocor on el domini C-terminal de Nsl1 interacciona amb Spc24 i Spc25, dues proteïnes del complex Ndc80, i amb KNL1 (Petrovic et al., 2010). Encara que el complex Mis12 no s'uneix directament amb els microtúbuls, la interacció d'aquest amb KNL1 i Ndc80 incrementa la capacitat d'aquestes dues proteïnes per unir-se als microtúbuls (Cheeseman et al., 2006). Així doncs, aquestes observacions suggereixen que el complex Mis12 connecta la cara interna del cinetocor amb la cara externa on actua com a plataforma per l'assemblatge de Ndc80 i KNL1.

#### La proteïna KNL1

KNL1 va ser identificada en *C. elegans* perquè la seva depleció produïa problemes de segregació cromosòmica similars als que s'observen al deplecionar CenH3<sup>HCP-3</sup> i CENP-C en aquest organisme model (Desai et al., 2003). Posteriorment, es van identificar els seus homòlegs en altres organismes; Blinkin a humans (Cheeseman et al., 2004; Obuse et al., 2004), Spc105 a llevats (Kerres et al., 2004; Nekrasov et al., 2003) i Spc105R a *D. melanogaster* (Przewloka et al., 2007). En tots aquests organismes, KNL1 és essencial

per la funció del cinetocor, ja que la seva depleció fa que la interacció cinetocor-microtúbuls no sigui estable i que els cromosomes no s'alineïn en la placa metafàsica correctament (Cheeseman et al., 2008; Desai et al., 2003; Kiyomitsu et al., 2007; Schittenhelm et al., 2009).

Encara que el grau de conservació de KNL1 entre espècies és baix, s'han identificat uns motius conservats que permeten la interacció amb altres proteïnes. Mitjançant el seu domini N-terminal, KNL1 interacciona directament amb els microtúbuls i permet el reclutament de dues quinases del punt de control de mitosi, Bub1 (*Budding Uninhibited by Benomyl 1*) i BubR1 (*Bub1-related 1*) (Cheeseman et al., 2006; Kiyomitsu et al., 2007; Liu et al., 2010).

Per altra banda, mitjançant el seu domini C-terminal, KNL1 interacciona amb Nsl1 i Dsn1 del complex Mis12 (Petrovic et al., 2010). En canvi, no està clar si KNL1 pot interaccionar directament amb el complex Ndc80. En cèl·lules humanes quan es depleciona KNL1, la localització centromèrica del complex Ndc80 no es veu afectada (Cheeseman et al., 2008; Kiyomitsu et al., 2007). No obstant, quan es deplecionen simultàniament KNL1 i CENP-K el complex Ndc80 no es localitza al cinetocor, suggerint que a vertebrats la localització d'aquest complex depèn de l'acció coordinada de KNL1 i de CENP-K (Cheeseman et al., 2008). Per contra, a *C.elegans* i a *D. melanogaster* la depleció de KNL1 sí que impedeix el reclutament del complex Ndc80 als cinetocors (Cheeseman et al., 2004; Schittenhelm et al., 2009).

## **El complex Ndc80**

El complex Ndc80 es localitza en la part més externa del cinetocor i està format per la interacció de dos heterodímers: Spc24-Spc25 (*Spindle pole component 24 / 25*) i Nuf2 (*Nuclear filamentous 2*)-Ndc80/Hec1 (*Highly expressed in cancer protein 1*) (Bharadwaj et al., 2004; Janke et al., 2001; McClelland et al., 2004; Wigge and Kilmartin, 2001). Anàlisis estructurals revelen que aquests heterodímers interaccionen mitjançant els seus dominis en forma d'espiral localitzats a C-terminal del dímer Ndc80-Nuf2 i a N-terminal del dímer Spc24/Spc25. En l'altre extrem de cada dímer, les proteïnes tenen dominis globulars. Així doncs, el complex Ndc80 té una forma semblant al d'una pesa amb una estructura central llarga en forma d'espiral i dos dominis globulars a cada extrem (Ciferri et al., 2005; Wei et al., 2005).

Els dominis globulars del dímer Spc24-Spc25 interaccionen amb el complex Mis12 (Petrovic et al., 2010), permetent el reclutament del complex Ndc80 al cinetocor. En canvi, l'extrem format pel dímer Ndc80-Nuf2 interacciona directament amb els microtúbuls (Cheeseman et al., 2006; Wei et al., 2007).

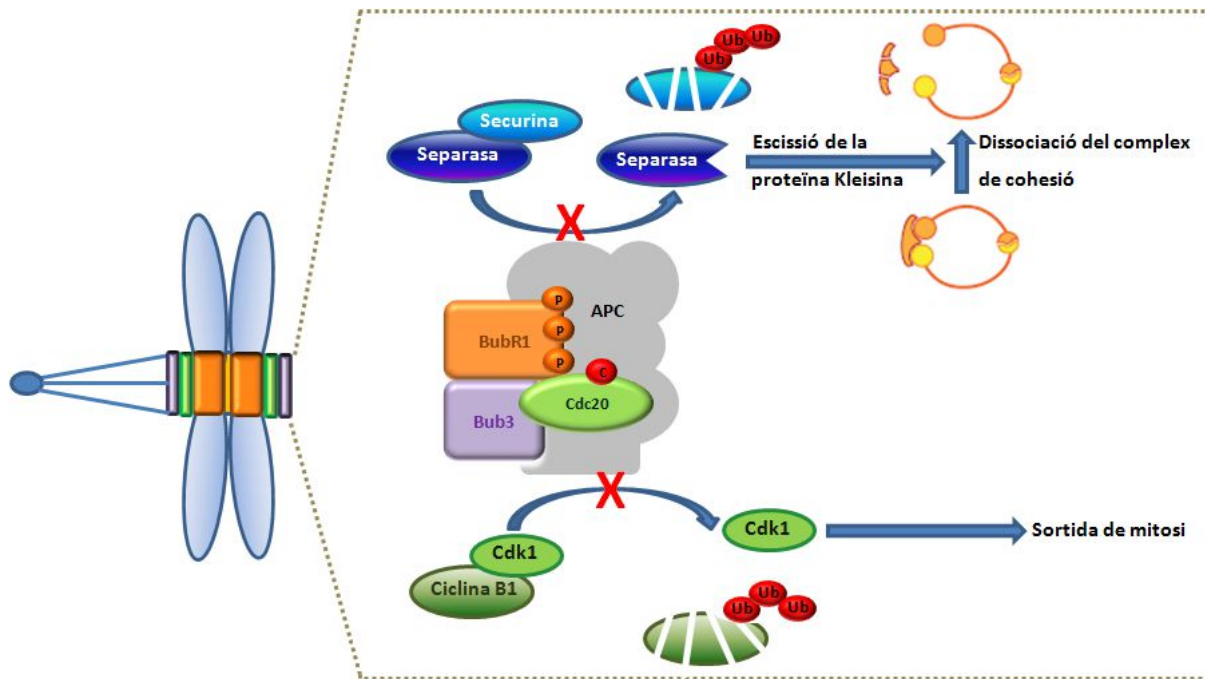
### 4.1.3 Les proteïnes del punt de control de la mitosi

Per evitar errors en la segregació cromosòmica degut a defectes en la interacció cinetocor-microtúbul, la cèl·lula disposa d'un mecanisme de control, anomenat el punt de control de la mitosi o SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*). El SAC s'activa en els cinetocors que no tenen interacció amb els microtúbuls i genera una senyal per evitar la transició metafase-anafase fins que tots els cinetocors estan correctament orientats i units al fus mitòtic (Musacchio and Salmon, 2007).

Bàsicament, el SAC indueix la formació d'un heterotetràmer format per les proteïnes Mad2 (*Mitotic arrest deficient 2*), BubR1/Mad3 (l'ortòleg en llevats de BubR1), Bub3 i Cdc20, conegut com el complex MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*) (Hardwick et al., 2000; Sudakin et al., 2001). Donat que Cdc20 és un cofactor essencial de l'APC/C (*Anaphase promoting complex/cyclosome*) i que la formació del complex MCC indueix la seva inactivació, es conclou que el complex MCC és un inhibidor de l'APC/C.

L'APC/C és una ubiquitina-ligasa E3 que ubiquitina dos substrats en metafase, la ciclina B i la proteïna Securin, per ser posteriorment degradats via proteosoma (Figura I.13). Securin és un inhibidor de la proteasa Separasa. Per tant, la degradació de Securin desencadena l'activació de la proteasa Separasa que permet l'escissió dels complexos de cohesió i la separació de les cromàtides germanes. Per altra banda, la degradació de la ciclina B1 indueix la inactivació de la quinasa Cdk1 (*cyclin-dependent kinase 1*) i la sortida de mitosi. Així doncs, la inhibició de l'APC/C per part del complex MCC impedeix la segregació de les cromàtides germanes i la sortida de mitosi (Pines, 2011). Ara bé, quan tots els cromosomes presenten una unió bipolar al fus, es produeix el silenciament del SAC. Bàsicament, aquest procés requereix dues accions; inhibir la producció del complex MCC i la reversió de la inhibició de l'APC/C.

A més de les proteïnes que formen el complex MCC, hi ha altres proteïnes que també estan relacionades amb el SAC. Entre elles cal destacar les que permeten el reclutament del SAC en el cinetocor; Mad1 (*Mitotic arrest deficient 1*), KNL1 i les proteïnes del complex RZZ; les quinases Bub1 i Mps1 (*Monopolar spindle 1*), i així com els components dels mecanismes de silenciament del SAC, *Spindly*, p31comet i *Dineïna* (Bolanos-Garcia et al., 2011; Kiyomitsu et al., 2007; Lan and Cleveland, 2010; Musacchio and Salmon, 2007). Com s'ha mencionat anteriorment, la proteïna KNL1 recluta els components del SAC, tant directament com és el cas de Bub1, BubR1 i Bub3 o via el complex RZZ en el cas de Mad1/Mad2 (Bolanos-Garcia et al., 2011; Kops et al., 2005; Krenn et al., 2012; Petrovic et al., 2010). Per altra banda, la proteïna Ndc80 està implicada també en el reclutament de Mad1 i Mad2 en els cinetocors (Martin-Lluesma et al., 2002). Així doncs, tots aquestes observacions ressalten la importància de la xarxa KMN en l'activació del SAC.



**Figura I.13. Esquema del mecanisme d'acció del punt de control de la mitosi.** L'activació del punt de control de mitosi induïx la formació del complex MCC, el qual actua com a inhibidor de l'APC/C. L'APC/C és una ubiquitina-lligasa que intervé en la degradació proteolítica, entre altres proteïnes, de Securin i la ciclina B1. La degradació de Securin permet l'activació de la proteasa Separasa i la posterior escissió dels complexos de cohesió. La degradació de la ciclina B1 inactiva la quinasa Cdk1 induint la sortida de mitosi. Per tant, la inhibició de l'APC/C impedeix la separació de les cromàtids germanes i la sortida de mitosi.

## 4.2 Regulació de les funcions del cinetocor

Tant el procés d'activació del SAC com la seva desactivació, així com la interacció cinetocor-microtúbul, són processos regulats per l'acció de quinases i fosfatases. La interacció cinetocor-microtúbul ha de ser suficientment dinàmica per tal que les interaccions errònies siguin desestabilitzades i eliminades, mentre que les correctes siguin estabilitzades. Aquestes dues necessitats contraposades s'equilibren a través de la fosforilació reversible dels components que vehiculen aquesta interacció, amb la contribució essencial de la quinasa Aurora B i la fosfatasa PP2A-B56. La quinasa Aurora B és un component del complex CPC (*Chromosomal passenger complex*) que fosforila diferents components del cinetocor, com ara les proteïnes Ndc80 i KNL1 (Cheeseman et al., 2006; DeLuca et al., 2006; Hua et al., 2011; Welburn et al., 2010). La fosforilació d'aquests substrats per part Aurora B redueix la seva afinitat pels microtúbuls, per tant té un paper desestabilitzador de la interacció cinetocor-microtúbul, facilitant l'eliminació de les interaccions errònies (Cimini et al., 2006; Lampson et al., 2004). En canvi, la fosfatasa PP2A-B56 contrareasta l'acció d'Aurora B, desfosforilant aquests substrats i per tant, estabilitzant la interacció cinetocor-microtúbul (Foley et al., 2011).

Per altra banda, la regulació del SAC depèn principalment de l'activitat de les quinases Mps1 i Bub1. No obstant, l'activitat d'altres quinases, com ara Aurora B i Polo, també afecta la funció del SAC mitjançant la regulació de Mps1 (Conde et al., 2013; Saurin et al., 2011). Bàsicament, Mps1 organitza esdeveniments que contribueixen a la inhibició d'APC/C, incloent la localització de Bub1, Bub3, BubR1 i Mad1 en els cinetocors (London et al., 2012; Santaguida et al., 2010; Shepperd et al., 2012), la fosforilació de BubR1 per promoure la localització al cinetocor de Cdc20 (Conde et al., 2013) i l'estabilitat dels complex inhibidor d'APC/C (Maciejowski et al., 2010). Tant a cèl·lules d'humans com a cèl·lules de *Drosophila* SL2, el complex Ndc80 i Aurora B estan implicats en el reclutament de Mps1 en els cinetocors no units al fus acromàtic (Conde et al., 2013; Saurin et al., 2011). A *S. cerevisiae*, s'ha descrit que Mps1 interacciona directament amb el complex Ndc80 (Kemmler et al., 2009).

L'activitat quinasa de Bub1 també contribueix a l'activació del SAC mitjançant la fosforilació de la histona H2A, que recluta indirectament Aurora B (Ricke et al., 2012). A més, el seu domini N-terminal, no quinasa, permet el reclutament de proteïnes essencials per l'activació del SAC, com ara Mad1-Mad2 i BubR1 (Klebig et al., 2009). Totes aquestes observacions indiquen que la quinasa Bub1 és també necessària per l'activació del SAC.

El paràleg de Bub1, BubR1, també juga un paper crític en l'activació del SAC a través de la formació del complex MCC i la inhibició de l'APC/C mitjançant el seu domini N-terminal (Lara-Gonzalez et al., 2011). En canvi, la funció del domini quinasa en l'activació del SAC no sembla necessària. Diversos motius crítics per les quinases canòniques estan mutats o absents en BubR1 i l'homòleg en llevat de BubR1, Mad3, no presenta aquest domini quinasa. No obstant, l'homòleg a *Drosophila* manté el domini quinasa similar al de Bub1 (Suijkerbuijk et al., 2012).

Tal i com s'ha comentat anteriorment, en llevats i en les cèl·lules humanes Mps1 promou el reclutament de Bub1, Bub3 i BubR1 als cinetocors, mitjançant la fosforilació de KNL1 (London et al., 2012; Shepperd et al., 2012; Yamagishi et al., 2012). En canvi, a *Drosophila* s'ha observat que els mutants de *spc105*, *mis12* o *nsl1* presenten només una petita disminució de BubR1 en els centròmers i continuen activant el SAC en resposta a defectes d'interacció cinetocor-microtúbul (Schittenhelm et al., 2009; Venkei et al., 2011). Aquestes observacions suggereixen que a *Drosophila* existeixen com a mínim dos mecanismes de reclutament de BubR1; un que depèn del cinetocor i l'altre del centròmer.

D'altra banda, en el procés de silenciament del SAC les fosforilacions activadores del SAC s'inverteixen per l'acció de les fosfatases localitzades al cinetocor, com ara PP1. PP1 es reclutat per KNL1 i aquesta interacció contribueix a la inactivació del SAC en els llevats i en *C. elegans* (Meadows et al., 2011; Rosenberg et al., 2011).

## 5. Distribució dels centròmers en el nucli

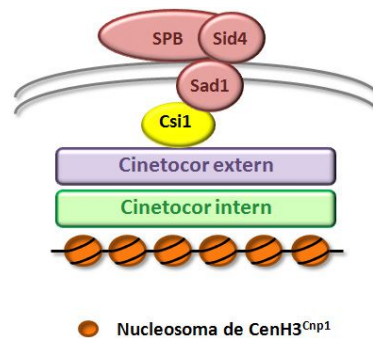
La distribució de la cromatina en els nuclis en interfase no és aleatòria, ja que cada cromosoma tendeix a ocupar una regió concreta del nucli (Cremer and Cremer, 2010). L'organització espacial i temporal dels cromosomes és essencial per a la regulació de l'expressió gènica i el manteniment de l'estabilitat del genoma (Dion and Gasser, 2013; Misteli, 2007).

La primera evidència de l'organització del genoma va ser l'observació de l'orientació Rabl en els nuclis de les larves de Salamandra (Rabl, 1885). L'orientació Rabl es caracteritza per ser una disposició polaritzada de la cromatina, els centròmers s'agrupen en una regió concreta propera a la membrana nuclear i els telòmers es troben en el pol oposat del nucli (Cowan et al., 2001). Aquesta configuració s'ha observat també en les plantes i en *Drosophila* (Cowan et al., 2001; Hochstrasser et al., 1986). En canvi, en les cèl·lules dels mamífers sembla que els cromosomes no adopten aquesta configuració. No obstant, els estudis de l'organització del genoma realitzats en cèl·lules de mamífer mostren que els seus cromosomes estan disposats de manera no aleatòria. Aquests estudis suggereixen que els centròmers i els telòmers tendeixen a ocupar regions concretes del nucli (Billia and De Boni, 1991; Carvalho et al., 2001; Katsumata and Lo, 1988; Moroi et al., 1981). Concretament, en interfase, els centròmers humans es distribueixen lliurement pel nucleoplasma o bé, associats al nuclèol o a la cara interna de la membrana nuclear (Carvalho et al., 2001; Moroi et al., 1981; Ochs and Press, 1992; Solovei et al., 2004). La disposició dels centròmers és específica per cada tipus de cèl·lula i pot estar influenciada pel moment del cicle cel·lular, l'estat de diferenciació i per condicions fisiològiques o patològiques (Haaf and Schmid, 1989; Raz et al., 2006; Sarkar et al., 2007; Solovei et al., 2004; Tagawa et al., 1997; Weimer et al., 1992).

L'associació dels centròmers amb el nuclèol s'explica pel fet que en els cromosomes humans les regions organitzadores nucleolars estan situades adjacents als centròmers. Per tant, quan els cromosomes que tenen aquestes regions es localitzen al voltant del nuclèol fan que els seus centròmers també estiguin associats al nuclèol (Henderson et al., 1972; Moroi et al., 1981).

A més dels mamífers, la localització dels centròmers propera a la membrana nuclear també s'ha descrit a llevats i *Drosophila* (Agard and Sedat, 1983; Funabiki et al., 1993). Tanmateix, el mecanisme concret d'interacció només es coneix en *S. pombe*. Durant la interfase, els centròmers d'aquest llevat formen un clúster que s'uneix a la cara interna de la membrana nuclear en una regió propera al SPB (*spindle pole body*), l'equivalent al centrosoma en els llevats (Funabiki et al., 1993). Recentment, s'han identificat els dos factors que permeten aquesta unió: la proteïna amb domini SUN, Sad1, la qual és una proteïna de la cara interna de la membrana nuclear, i Csi1, una

proteïna nuclear que interacciona tant amb Sad1 com amb els components del cinetocor durant la interfase (Figura I.14) (Hou et al., 2012). Aquest mecanisme no sembla estar conservat en altres espècies ja que no s'han identificat les proteïnes homòlogues a Csi1.



**Figura I.14. Interacció dels centròmers amb el SPB (*spindle pole body*) en *S. pombe*.** Les proteïnes Sad1 i Csi1 actuen com a pont d'unió entre la membrana nuclear i els centròmers.

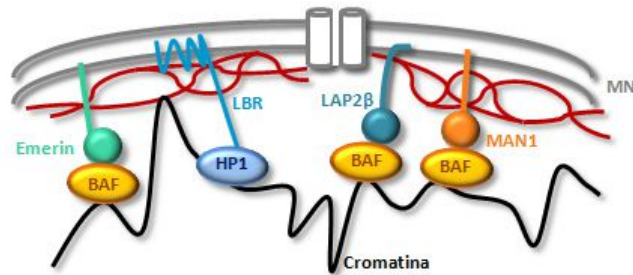
## 5.1 Estructura de la membrana nuclear

La membrana nuclear és una estructura complexa que envolta completament el nucli i el separa del citoplasma. Aquest està format per dues membranes, una d'interior i una d'exterior, els porus nuclears, els complexos de LINC (*Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*) i la làmina nuclear.

La làmina nuclear és una xarxa entremesclada de filaments intermedis formats per làmines, situada entre la membrana nuclear interna i la cromatina (Stuurman et al., 1998). En els vertebrats, les làmines es classifiquen en dos categories: làmines de tipus -A o de tipus -B. Diversos estudis han demostrat que tant les d'un tipus com les de l'altre s'uneixen directament a la cromatina, així com també amb proteïnes de la cara interna de la membrana nuclear LBR (*Lamin B receptor*), LAP1 i LAP2 (*Lamina-associated polypeptides 1/2*) (Figura I.15) (Foisner and Gerace, 1993; Glass et al., 1993; Senior and Gerace, 1988; Taniura et al., 1995; Worman et al., 1988).

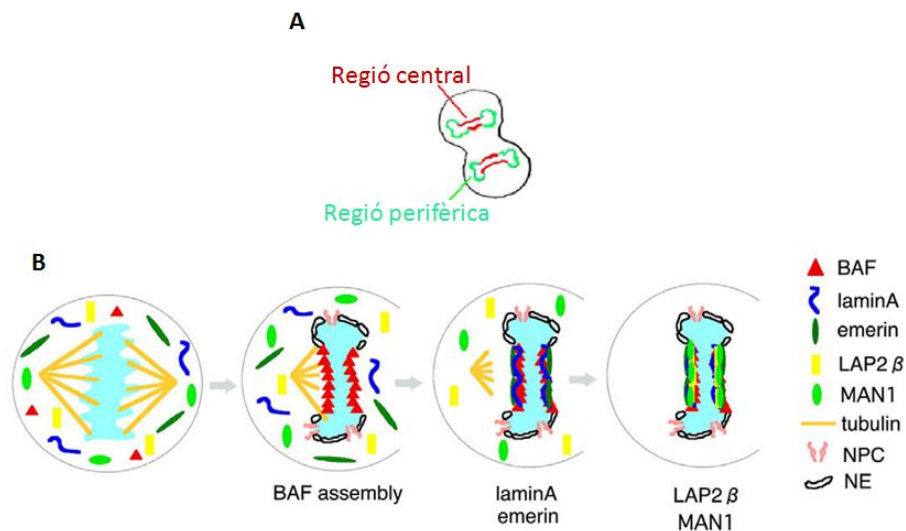
En tots els eucariotes que realitzen la mitosi oberta, l'embolcall nuclear es desmunta en l'inici de la mitosi com a conseqüència de la fosforilació de la làmina i de les proteïnes d'unió a aquesta (Foisner and Gerace, 1993; Heald and McKeon, 1990; Nikolakaki et al., 1997). Durant la telofase, la membrana es reconstrueix al voltant dels cromosomes. Estudis realitzats en cèl·lules humanes revelen que en el procés de reassemblatge de l'embolcall juguen un paper clau les proteïnes de la membrana interna (Dechat et al., 2004; Haraguchi et al., 2008). Aquestes es poden classificar en dos grups segons el lloc d'associació als cromosomes telofàsics. LBR, LAP2 $\beta$  i les làmines de tipus B inicialment s'uneixen en les regions més perifèriques de la massa de cromosomes, i posteriorment s'estenen a les regions centrals (Figura I.16) (Haraguchi et al., 2008).





**Figura I.15. Esquema de les interaccions entre els components de la membrana nuclear i la cromatina.** La làmina nuclear (filaments de color vermell) és una xarxa de filaments intermedis que es troba en contacte amb la cara interna de la membrana nuclear (MN) i interacciona amb diferents tipus de proteïnes associades a la MN. Per una banda, interacciona amb les proteïnes Emerin, LA2β i MAN1. Aquestes proteïnes es caracteritzen per tenir un domini conservat amb afinitat per la proteïna BAF (*Barrier-to-autointegration factor*), la qual té afinitat per la cromatina. Un segon exemple és la proteïna LBR, la qual interacciona amb la proteïna de l'heterocromatina HP1.

Per contra, LAP2 $\alpha$ , Emerin i les làmines de tipus A s'uneixen en les regions centrals de la massa de cromosomes telofàsics, properes als llocs d'unió del fus, des d'on s'estenen a les regions perifèriques (Dechat et al., 2004; Haraguchi et al., 2008; Haraguchi et al., 2001). La unió de LAP2 $\alpha$ , Emerin i les làmines de tipus A a la regió central es dona mitjançant una proteïna anomenada BAF (*Barrier-to-autointegration factor*). Estudis realitzats *in vivo* mostren que BAF és el primer factor que s'uneix a aquestes regions, on forma un complex immòbil que permet el reclutament de les altres proteïnes (Figura I.16B) (Haraguchi et al., 2008). De fet, les isoformes de LAP2, Emerin i la proteïna MAN1 comparteixen un domini, anomenat domini LEM, que és el responsable de la interacció amb BAF (Furukawa, 1999; Lin et al., 2000).



**Figura I.16. Esquema del procés de reassemblatge de la membrana nuclear en les regions centrals de la massa de cromosomes telofàsics.** A) Dibuix on s'indiquen les regions centrals i les perifèriques de la massa de cromosomes telofàsics. B) En les regions centrals la primera proteïna que es detecta és BAF, la qual facilita el reclutament d'altres proteïnes associades a la membrana nuclear. En concret, després de BAF en aquestes regions es detecten la làmina A, Emerin i LAP2 $\alpha$  i aproximadament uns 30 segons més tard LAP2 $\beta$  i MAN1. Figura extreta de l'article Haraguchi et al., 2008.

## 5.2 BAF

BAF és una proteïna altament conservada en els organismes multicel·lulars que es localitza tant al citoplasma com al nucli de la cèl·lula en interfase (Dechat et al., 2004; Margalit et al., 2007; Shimi et al., 2004). Al inici de la mitosi, no està clar quin és el seu patró de localització ja que aquest varia segons la tècnica utilitzada. Estudis d'immunolocalització suggereixen que està uniformement distribuïda per tot el cromosoma (Dechat et al., 2004; Furukawa, 1999; Furukawa et al., 2003). En canvi, estudis de localització realitzats amb la forma quimèrica GFP-BAF indiquen que està difosa per tota la cèl·lula (Haraguchi et al., 2001). Ara bé, tots els estudis coincideixen que després de la transició metafase-anafase, es concentra a la regió central dels cromosomes telofàsics on coordina l'assemblatge de la membrana nuclear (Dechat et al., 2004; Gorjánác et al., 2007; Haraguchi et al., 2008; Haraguchi et al., 2001).

Entre les seves característiques moleculars cal destacar que interacciona amb el DNA de doble cadena de manera inespecífica i que oligomeritza (Zheng et al., 2000). Així doncs, aquestes dues propietats li permeten compactar el DNA i formar complexes nucleoproteïcs. A més, donat que també interacciona amb les histones H3 i H1.1 (Montes de Oca et al., 2005) i les proteïnes amb domini LEM, BAF actuaria com a pont d'unió entre la cromatina i la membrana nuclear interna. Tanmateix, la interacció amb el DNA i les proteïnes amb domini LEM depèn del seu estat de fosforilació (Bengtsson and Wilson, 2006; Nichols et al., 2006). Concretament, en mamífers s'ha vist que les quinases conservades de la família VRK (*Vaccinia-related kinases*) fosforilen en l'extrem N-terminal de BAF la Ser-4, principalment, i també les Thr-2 i/o Thr-3. De la mateixa manera, a *Drosophila* l'ortòleg de VRK1, NHK-1 (*Nucleosomal histone kinase 1*) també fosforila els aminoàcids Ser-2, Thr-3 i Ser-4 de dBAF, suggerint que BAF és un substrat conservat per aquesta família de quinases (Lancaster et al., 2007). Experiments *in vitro* demostren que quan BAF és fosforilat aquest no pot interaccionar amb el DNA i disminueix la seva interacció amb les proteïnes amb domini LEM (Nichols et al., 2006). Per tant, això suggereix que la fosforilació de BAF a l'inici de la mitosi es dona per alliberar-lo de la cromatina i de la membrana nuclear (Asencio et al., 2012; Molitor and Traktman, 2014).

En canvi, en el procés de reassemblatge de la membrana nuclear al final de la mitosi és necessari que BAF sigui desfosforilat per refer les seves interaccions amb la cromatina i les proteïnes amb domini LEM. Recentment, tant a *C.elegans* com a cèl·lules humanes s'ha descrit que la proteïna LEM4 actua coordinant la desfosforilació de BAF per un doble mecanisme. LEM-4 interacciona amb VRK1 i inhibeix la seva activitat quinasa, i alhora també interacciona amb la fosfatasa PP2A (*protein phosphatase 2A*) que desfosforila BAF (Asencio et al., 2012). Contràriament, un altre treball suggereix que la fosfatasa PP4C (*Protein phosphatase 4 catalytic subunit*) desfosforila la Ser-4 de BAF.

Aquest mateix treball descriu que la forma fosforilada de BAF és localitzada a la regió central dels cromosomes telofàsics, sent necessària per l'assemblatge de l'embolcall nuclear (Zhuang et al., 2014).

Inicialment, BAF va ser identificat com el component de la cèl·lula hoste que s'uneix a el DNA dels virus de la leucèmia murina de Moloney i del virus de la immunodeficiència humana de tipus 1, formant el complex de preintegració en el citoplasma (Lin and Engelman, 2003; Suzuki and Craigie, 2002). En aquest complex BAF compacta el DNA víric, i com a conseqüència impedeix l'autointegració d'aquest. A més, la capacitat de BAF d'interaccionar amb el DNA facilita el reclutament del complex en el DNA de la cèl·lula infectada, i per tant en promou la integració intermolecular (Lee and Craigie, 1998; Suzuki and Craigie, 2002). Més recentment, s'ha demostrat que BAF pot actuar com agent antiviral. Específicament, durant la infecció amb el virus Vaccinia, BAF és localitzada a llocs de replicació del DNA víric en el citoplasma i n'impedeix la replicació (Ibrahim et al., 2011; Wiebe and Traktman, 2007). Per contrarestar aquest efecte, el virus expressa una quinasa viral coneguda com B1, que té un alt nivell de similitud amb les quinases VRK i que també fosforila BAF (Nichols et al., 2006).

Malgrat el seu paper en la resposta a la infecció vírica, BAF és una proteïna essencial per la cèl·lula en condicions fisiològiques. A *D. melanogaster*, els mutants nuls per *baf* són letals en la transició larva-pupa. Les larves d'aquests mutants tenen el cervell més petit del normal i sovint han perdut els discs imaginals. Concretament, a nivell cel·lular, s'observa aturada del cicle cel·lular, aglomeracions de la cromatina en interfase, morfologia anormal dels cromosomes en mitosi, distribució inusual de la lamina i aberrant morfologia del nucli (Furukawa et al., 2003). A *C.elegans*, la depleció de BAF desencadena la mort dels embrions a estadis primerencs, els quals presenten problemes de segregació cromosòmica en mitosi, defectes en l'assemblatge de la membrana nuclear i la condensació anormal de la cromatina en interfase (Margalit et al., 2005; Zheng et al., 2000). Les similituds entre els fenotips de la depleció de BAF en aquest dos organismes models suggereixen que BAF és una proteïna implicada en l'organització de la cromatina i de la membrana nuclear. El treball de Margalit et al., 2005 suggereix un model en que aquestes dues funcions estan relacionades. Durant la mitosi, BAF induiria canvis en l'estructura de la cromatina que són necessaris per l'assemblatge de la membrana nuclear.

Per altra banda, BAF també interacciona amb factors de transcripció i proteïnes implicades en la reparació del DNA (Montes de Oca et al., 2009; Wang et al., 2002). Això suggereix que, a més de la seva funció mitòtica, BAF pot modular l'expressió de determinats gens i la resposta al dany en el DNA.

**OBJECTIUS**



En els darrers anys, s'han fet molts avanços en la identificació de les proteïnes que determinen la identitat i la funció centromèrica. En concret, en cèl·lules de vertebrats s'han identificat un total de setze proteïnes que conjuntament amb CenH3 formen la plataforma necessària en el centròmer per l'assemblatge del cinetocor durant la mitosi. Tanmateix, a *Drosophila melanogaster* es desconeix els ortòlegs d'aquestes proteïnes centromèriques, així com també el mecanisme molecular pel qual CenH3<sup>CID</sup> dicta la formació del cinetocor. En aquest treball hem volgut aprofundir en aquests aspectes. Concretament, els nostres objectius varen ser:

- 1.- Identificació i caracterització de noves proteïnes centromèriques de *Drosophila melanogaster*.
- 2.- Anàlisi de la contribució del domini N-terminal de la variant centromèrica de la histona H3 de *Drosophila*, N-CenH3<sup>CID</sup>, en l'assemblatge del cinetocor.
- 3.- Anàlisi dels factors que regulen l'estabilitat de CenH3<sup>CID</sup>.



**RESULTATS**





## **CAPÍTOL 1**



## **Identificació de noves proteïnes centromèriques a *Drosophila melanogaster***

Sònia Medina-Giró i Ferran Azorín

Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC) i Institut d'Investigació Biomèdica, IRB Barcelona, Barcelona.



**RESUM**

La identitat i funció centromèrica estan regulades epigenèticament per la deposició de la variant centromèrica de la histona H3, CenH3. Els nucleosomes de CenH3 actuen com a plataforma pel reclutament d'altres proteïnes que estan associades constitutivament al centròmer, com ara els multicomplexes de proteïnes NAD (*CENP-A nucleosome associated complex*) i CAD (*CENP-A-nucleosome distal complex*). Alhora, aquests complexos permeten el reclutament de les proteïnes del cinetocor extern durant la mitosi. Tanmateix, a *Drosophila* es coneixen molt poques proteïnes associades als nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>. En aquest treball, vam purificar els nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>-TAP i vam identificar les proteïnes associades a aquests mitjançant espectrometria de masses. Entre les cinquanta proteïnes identificades, es van seleccionar vuit com a possibles candidates a estar relacionades amb els centròmers. D'aquestes vuit, tres presentaven un patró de localització cel·lular molt interessant. Les proteïnes CG8289-FLAG-HA i RpL22-FLAG-HA s'acumulen en interfase properes als clústers de CENP-C. Per altra banda, la proteïna BAF-FLAG-HA es localitza propera als centròmers en els cromosomes metafàsics. En aquest treball, es va continuar amb la caracterització de la proteïna codificada pel gen CG8289. Estructuralment, aquesta proteïna es caracteritza per presentar un domini cromo força similar al de les isoformes d'HP1. De fet, el senyal de la proteïna CG8289 en cèl·lules SL2 en interfase s'acumula propera als centròmers i colocalitza amb el d'HP1a. A més, en cromosomes politènics, aquesta proteïna està enriquida en el cromocentre i en els telòmers. Així doncs, en conjunt els nostres resultats apunten a la identificació d'un nou factor de la heterocromatina pericentròmerica de funció fins al moment desconeguda.



## INTRODUCCIÓ

El centròmer és una estructura especialitzada del cromosoma que durant la mitosi permet l'assemblatge del cinetocor, complex multiproteic que permet la unió dels microtúbuls del fus acromàtic i regula la segregació cromosòmica (Choo, 2000; Sullivan et al., 2001; Sullivan, 2001). Encara que la funció del centròmer està conservada, la manca de conservació del DNA centromèric entre els diferents organismes (Sullivan et al., 2001) i la formació de neocentròmers en regions no centromèriques (Choo, 2001; Warburton et al., 1997) suggereixen que la identitat i propagació del centròmer no està associada a la seqüència nucleotídica, sinó que està marcada epigenèticament. Un clar candidat d'aquest component epigenètic és la variant centromèrica de la histona H3, CenH3. Aquesta variant substitueix a la histona H3 canònica en els nucleosomes de tots els centròmers funcionals, sent fonamental la seva localització pel correcte assemblatge del cinetocor.

En tots els eucariotes estudiats fins ara, la deleció de CenH3 és letal. Aquests mutants tenen problemes en el reclutament de proteïnes del cinetocor i presenten greus defectes durant la segregació cromosòmica (Blower and Karpen, 2001; Howman et al., 2000; Oegema et al., 2001; Régner et al., 2005). Totes aquestes observacions suggereixen que CenH3 és necessària per l'assemblatge del cinetocor, però actualment es desconeix el mecanisme molecular pel qual CenH3 dicta la formació del cinetocor.

En termes generals la composició i l'organització dels cinetocors està conservada entre els vertebrats. A grans trets, a la cara interna del cinetocor hi ha un grup de setze proteïnes que estan associades constitutivament a la cromatina centromèrica, formant el CCAN (*Constitutive centromere-associated network*) (Foltz et al., 2006; Hori et al., 2008a; Okada et al., 2006). Durant la mitosi, aquestes proteïnes recluten els components conservats de la xarxa KMN (KNL1, Mis12, Ndc80) per formar un cinetocor funcional. Per algunes espècies com ara *S. cerevisiae* i *S. pombe* s'han identificat algunes de les proteïnes homòlogues a les del CCAN (Przewloka and Glover, 2009). No obstant, a *C. elegans* i *D. melanogaster* es desconeixen totes, a excepció de CENP-C.

Concretament, a *Drosophila* només es coneixen tres proteïnes centromèriques: la variant centromèrica de la histona H3, anomenada CenH3<sup>CID</sup> (*Centromere identifier*), CENP-C i CAL1 (*Chromosome alignment 1*) (Goshima et al., 2007; Heeger et al., 2005; Henikoff et al., 2000). Experiments de reclutament ectòpic de CenH3<sup>CID</sup> mostren que aquesta és suficient per induir la formació d'un cinetocor funcional en el lloc de reclutament (Mendiburo et al., 2011). A més, en aquest organisme model també s'ha observat que el domini N-terminal de CENP-C, interacciona amb proteïnes del cinetocor i alhora és suficient per reclutar-les ectòpicament en altres llocs de la cèl·lula (Przewloka et al., 2011). Per tant, aquests dos estudis atribueixen a CenH3<sup>CID</sup> i CENP-C un paper clau en l'assemblatge del cinetocor a *Drosophila*. La localització centromèrica d'aquestes



dues proteïnes és interdependent i també depèn de CAL1 (Erhardt et al., 2008; Goshima et al., 2007). De fet, CAL1 actua com pont d'unió entre CenH3<sup>CID</sup> i CENP-C i alhora, degut a la seva baixa expressió, limita la incorporació excessiva d'aquestes dues proteïnes en els centròmers (Schittenhelm et al., 2010). A més, s'ha observat que CAL1 interacciona amb el pre-nucleosoma de CenH3<sup>CID</sup> i permet la seva incorporació en experiments de reconstitució *in vitro*, indicant que podria ser la xaperona específica d'aquesta variant (Chen et al., 2014; Mellone et al., 2011).

La no identificació de més factors específics en el centròmer de *Drosophila* i la manca d'homòlegs funcionals de les proteïnes del CCAN indicarien que en aquesta espècie l'assemblatge del cinetocor deu ser més simple. Tanmateix, donat que les proteïnes centromèriques evolucionen ràpidament (Henikoff et al., 2001) i que a *Drosophila* no s'hagin realitzat molts estudis per identificar-ne de noves, és probable que en quedin per descobrir.

En aquest treball, per tal d'identificar noves proteïnes associades als centròmers de *Drosophila*, es va realitzar la purificació i posterior identificació de les proteïnes associades als nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>-TAP. En total es van identificar 50 proteïnes, de les quals se'n van seleccionar vuit com a possibles candidates a estar relacionades amb els centròmers basant-nos en la bibliografia publicada i la consistència en la seva identificació. A continuació, es va analitzar el patró de localització de les proteïnes seleccionades i es va observar que tres d'elles ja sigui en interfase o bé en mitosi estan relacionades amb els centròmers. Una d'aquestes proteïnes és la codificada pel gen *CG8289*. Aquesta proteïna es caracteritza per tenir un domini cromosòmic, similar al de les isoformes d'HP1. De fet, en cèl·lules de *Drosophila* SL2 en interfase el senyal de la proteïna *CG8289* i el d'HP1a colocalitzen i són propers als clústers de CENP-C. En neuroblastos es van detectar petites acumulacions per la proteïna que també tenen associats un o dos clústers de CENP-C. Finalment, mitjançant experiments d'immunodetecció a cromosomes politènics es va confirmar l'associació d'aquesta proteïna amb el cromocentre i els telòmers. En conjunt, els nostres resultats mostren que la proteïna codificada pel gen *CG8289*, conservada en el gènere *Drosophila*, està associada a la cromatina pericentromèrica en interfase on desenvolupa una o varies funcions desconegudes fins al moment.

## MATERIALS I MÈTODES

### Soques bacterianes

En aquest treball es van utilitzar les següents soques d'*Escherichia coli*:

Soca utilitzada per a l'amplificació de plasmidis:

- **DH5 $\alpha$** : *deoR endA1 gyrA96 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) recA1 relA1 supE44 thi-1 F'[traD36 proAB<sup>+</sup> lac1<sup>q</sup> lacZ  $\Delta$ M15]*

Soca utilitzada per a l'expressió de proteïnes:

- **BL21(DE3)**: *BF dcm ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal $\lambda$  (DE3)*

### Línia cel·lular eucariota: cèl·lules SL2 de *Drosophila melanogaster*

La línia cel·lular SL2 (*Schneider's Drosophila Line 2*), també anomenada S2, deriva d'un cultiu primari d'embrions de *D. melanogaster* en estadis tardans (20-24 hores) (Schneider, 1972). Són cèl·lules d'aspecte esfèric que creixen tant enganxades a la superfície del recipient en que es troben com en suspensió en un *spinner*.

### Stocks de *Drosophila melanogaster*

A la taula M.1 s'indiquen els diferents *stocks* de *D. melanogaster* utilitzats, així com les seves característiques més importants.

<b>Stock</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Característiques</b>
White <sup>-</sup>	X	Té una mutació al gen <i>white</i> que elimina tota la proteïna. Ulls blancs
w <sup>-</sup> ; if/Cyo;Ly/Tm3	Doble balancejat	Presenta balancejadors i marcadors als cromosomes II i III sobre un fons white <sup>-</sup>
Act5CGal4/TM6B, Tb	3	Expressa Gal4 sota el control del promotor d' <i>actina</i>
UAS-RNAi CG8289	2	Expressa un <i>hairpin</i> de RNA contra el CG8289 sota el control de llocs d'unió de Gal4. Correspon al número de <i>stock</i> 106910 de <i>Vienna Drosophila Resource Center</i>

**Taula M.1. Stocks de *Drosophila melanogaster* utilitzats en aquest treball.** En la taula també s'especifica el cromosoma i les característiques principals.

## Plasmidis

A continuació, es detallen tots els plasmidis utilitzat en aquest treball:

- **pMK33-CTAP:** conté el promotor de la metal·lotioneïna que permet l'expressió, induïble amb Coure, de proteïnes amb un TAP (*tandem affinity purification*) a C-terminal. També conté la resistència a Higromicina que permet la selecció de les cèl·lules estabament transfectades. Dissenyat per Veraksa i col·laboradors (Veraksa et al., 2005).
- **pMK33-CTAP $\Delta$ MT:** en aquest plasmidi es va eliminar el promotor de la metal·lotioneïna present en el plasmidi pMK33-CTAP. Per eliminar-lo es va amplificar el plasmidi pMK33-CTAP amb els oligonucleòtids 7016pMK33F i 6559pMK33R que exclouen la regió compresa pel promotor i contenen la diana per l'enzim de restricció Acc65I en el seus extrems 5'.
- **pCid-YFP:** vector cedit per la Dra. Olga Moreno Moreno. Conté clonat el promotor de CenH3<sup>CID</sup> i el cDNA de CenH3<sup>CID</sup>.
- **pCID-CID-CTAP:** permet l'expressió en cèl·lules SL2 de la proteïna de fusió CenH3<sup>CID</sup>-TAP sota el control del promotor de CenH3<sup>CID</sup>. Per obtenir-lo es van amplificar el promotor de CenH3<sup>CID</sup> conjuntament amb el cDNA de CenH3<sup>CID</sup> a partir del vector pCid-YFP amb les oligonucleòtids PromCIDF i CIDR que contenen en els seus extrems 5' la diana de restricció per l'enzim Acc65I. El producte obtingut va ser digerit amb aquest enzim i clonat al pMK33-CTAP $\Delta$ MT per la mateixa diana.
- **pET29b** (Novagen): permet obtenir proteïnes fusionada amb una cua de 6 histidines en posició carboxi-terminal.
- **pET-CG8289:** el cDNA de CG8289 va ser amplificat a partir del vector FMO02571 amb els oligonucleòtids NT-CG8289-EcoRv i CT-CG8289-XhoI, els quals contenen dianes pels enzims de restricció EcoRV i XhoI, respectivament. El producte obtingut va ser digerit amb aquests enzim i clonat al pET29b per les mateixes dianes.

Per tal d'expressar transitòriament les proteïnes seleccionades vam obtenir del *Drosophila Genomics Resource Center* (DGRC) els vectors que contenen l'ORF que codifica per aquestes proteïnes. Per algunes de les proteïnes, es van adquirir els ORFs clonats en plasmidis que permeten l'expressió de la proteïna fusionada a FLAG-HA a C-terminal i sota el control d'expressió del promotor de metal·lotioneïna. Aquests darrers plasmidis corresponen a la col·lecció *BDGP Tagged ORF Collection*, FMO. En la taula M.2 es detallen els plasmidis adquirits (Clon ID) i la col·lecció del DGRC a la qual pertanyen.

<b>Proteïna</b>	<b>Clon ID i DGRC col·lecció</b>
BAF	FMO05822 (BDGP Tagged ORF Collection)
CG8289	FMO02571 (BDGP Tagged ORF Collection)
CG3612	FMO02974 (BDGP Tagged ORF Collection)
RpL22	FMO04478 (BDGP Tagged ORF Collection)
Lethal (2) 03709	LD46344 (BDGP Gold cDNAs)
CG30122	GH01011 (BDGP ESTs)
Hrp48	GH26816 (BDGP Gold cDNAs)
Glorund	AT27789 (BDGP Gold cDNAs)

**Taula M.2. Llistat de clons de cDNA adquirits al DGRC per cada proteïna.** En aquesta taula s'especifica el codi d'identificació de cada clon de cDNA comprat, clon ID, així com també la col·lecció de DGRC a la qual pertany.

Per les proteïnes que no estava disponible el plasmidi de la col·lecció FMO, es va adquirir el que conté només l'ORF per tal d'amplificar el cDNA amb els oligonucleòtids corresponents. En concret, per amplificar els cDNA de Lethal (2)03709, Glorund i CG30122 es van utilitzar oligonucleòtids, anomenats NT-nom de la proteïna-BamHI i CT-nom de la proteïna-SpeI, els quals contenen dianes pels enzims de restricció BamHI i SpeI, respectivament. En canvi, el cDNA de Hrp48 va ser amplificat amb els oligonucleòtids NT-Hrp48-XhoI i CT-Hrp48-EcoRV, els quals contenen dianes pels enzims de restricció XhoI i EcoRV, respectivament. Els productes de PCR obtinguts van ser digerits per les dianes introduïdes mitjançant els oligonucleòtids i clonats al pMK33-CTAP per les mateixes dianes.

## Oligonucleòtids

En aquest treball es van utilitzar oligonucleòtids sintetitzats per SIGMA. La seqüència de tots ells es relaciona en la taula M.3.

Nom	Seqüència (5'→ 3')	Diana de restricció
7016pMK33F	GATCGGTACCATGGAAAAGAGAAGATGGAAA	Acc65I
6559pMK33R	GATCGGTACCGATCCAGACATGATAAGATAC	Acc65I
PromCID F	GATCGGTACCGACATGGCTGTATCTTCAGTG	Acc65I
CID R	GATCGGTACCTCGGTCGAGATGTAGGCCAT	Acc65I
NT-CG8289-EcoRV	<u>GATATCGATGGCCAAGGCGAGTAAGAAGGTG</u>	EcoRV
CT-CG8289-XhoI	<u>CTCGAGTCACTCCTCGCCGTAGAAAATGCG</u>	XhoI
NT-lethal2-BamHI	<u>GGATCCATGGCACAGAGCAAATTGAACGAT</u>	BamHI
CT-lethal2-SpeI	<u>ACTAGTTCCTTTACTTTTGTAAACCTTCTC</u>	SpeI
NT-Glorund-BamHI	<u>GGATCCATGTCCAACGCAGACGTGCAATTT</u>	BamHI
CT-Glorund-SpeI	<u>ACTAGTTCGATGCGCCGCGAAAAGTTTCC</u>	SpeI
NT-30122-BamHI	GATCGGATCCATGGATGTGGCGAAGCTGGAGAAG	BamHI
CT-30122-SpeI	GATCACTAGTTCCTTCTTGTCGGCACCCGCATT	SpeI
NT-Hrp48-XhoI	<u>CTCGAGATGGAGGAAGACGAGAGGGGCAAA</u>	XhoI
CT-Hrp48-EcoRV	<u>GATATCTCCGACAGCCTGCGAGGTTGCATAGGG</u>	EcoRV
RNAi CG F	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCCACTTCGCCCGCAAAAATGGCAAAA</u>	
RNAi CG R	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTCTCATCCTCTGTTCCAGCATCGACAT</u>	
RNAi LacZ F	<u>TAATACGACTCACTATAGGGATGACCATGATTACGCCAAGC</u>	
RNAi LacZ R	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCAATTTCCATTGCCATTTCAG</u>	

**Taula M.3. Relació de tots els oligonucleòtids emprats en aquest treball.** S'indica també la seva seqüència i si té dianes per enzims de restricció en els seus extrems 5'. En els oligonucleòtids RNAi es subratlla la seqüència promotora de la RNA polimerasa T7.

## Anticossos

En aquest treball s'han utilitzat diferents anticossos pels assajos d'immunolocalització i de *Western-Blot*. En les taules M.4 i M.5 s'indiquen tots els anticossos primaris i secundaris utilitzats, respectivament.

Anticòs primari	Característiques	Fabricant	Experiment utilitzat i dilució emprada
$\alpha$ -TAP	Anticòs policlonal de conill. Reconeix específicament el tag TAP.	Open Biosystems (CAB1001)	Immunolocalització 1:300 <i>Western-Blot</i> 1:2500
$\alpha$ -CENP-C	Anticòs policlonal de rata. Reconeix específicament la proteïna CENP-C de <i>D. melanogaster</i> .	Cedit per la Dra. Mònica Torràs-Llort	Immunolocalització 1:200 <i>Western-Blot</i> 1:3000
$\alpha$ -FLAG	Anticòs policlonal de conill. Reconeix específicament el tag FLAG.	Sigma (F7425)	Immunolocalització 1:500
$\alpha$ -HA	Anticòs monoclonal de rata. Reconeix el pèptid HA derivat de la proteïna Hemaglutinina	Roche (Ref: 1867 423)	Immunolocalització 1:350
$\alpha$ -CENP-C	Anticòs policlonal de conill. Reconeix específicament la proteïna CENP-C de <i>D. melanogaster</i> .	Cedit per la Dra. Mònica Torràs-Llort	Immunolocalització 1:500
$\alpha$ -GFP	Anticòs policlonal de conill. Reconeix específicament la proteïna GFP	Molecular Probes A11122	Immunolocalització 1:1000
$\alpha$ -HP1a	Anticòs policlonal de rata. Reconeix específicament la proteïna HP1a de <i>D. melanogaster</i> .	Cedit per la Dr Joan Font-Burgada	Immunolocalització 1:200
$\alpha$ -CG8289	Anticòs policlonal de conill. Reconeix específicament la proteïna codificada pel CG8289 de <i>D. melanogaster</i>	Generat en aquest treball	Immunolocalització 1:200 <i>Western-Blot</i> 1:2500
$\alpha$ -H3	Anticòs policlonal de conill. Reconeix específicament la histona H3 canònica	Cell signaling (9715S)	<i>Western-Blot</i> 1:2500
$\alpha$ -GFP	Anticòs policlonal de ratolí. Reconeix específicament la proteïna YFP	Roche (Ref: 1814460)	Immunolocalització 1:50

**Taula M.4. Relació de tots els anticossos primaris emprats en aquest treball.** S'indica també les seves característiques, la procedència, tipu d'experiment en que es va utilitzar i la dilució emprada.

<b>Anticòs secundari</b>	<b>Característiques</b>	<b>Fabricant</b>	<b>Experiment utilitzat i dilució emprada</b>
<b><math>\alpha</math>-conill-HRP</b>	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a la peroxidasa de rave ( <i>Horseradish peroxidase</i> , HRP)	Amersham Biosciences (Ref. NA 934)	<i>Western-Blot</i> 1:10000
<b><math>\alpha</math>-rata-HRP</b>	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de rata. Està conjugat a la peroxidasa de rave ( <i>Horseradish peroxidase</i> , HRP)	Jackson ImmunoResearch (712-035-150)	<i>Western-Blot</i> 1:10000
<b><math>\alpha</math>-conill-Cy2</b>	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a Cy2	Jackson ImmunoResearch (111-225-144)	Immunolocalització 1:400
<b><math>\alpha</math>-conill- Cy3</b>	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a Cy3	Jackson ImmunoResearch (111-165-144)	Immunolocalització 1:400
<b><math>\alpha</math>-conill- Cy5</b>	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de conill. Està conjugat a Cy5	Jackson ImmunoResearch (111-175-144)	Immunolocalització 1:400
<b><math>\alpha</math>- rata- Cy2</b>	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de rata. Està conjugat a Cy2	Jackson ImmunoResearch (112-225-143)	Immunolocalització 1:400
<b><math>\alpha</math>-rata-Cy5</b>	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de rata. Està conjugat a Cy5	Jackson ImmunoResearch (112-175-143)	Immunolocalització 1:400
<b><math>\alpha</math>-ratolí- Cy2</b>	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de ratolí. Està conjugat a Cy2	Jackson ImmunoResearch (115-225-146)	Immunolocalització 1:400
<b><math>\alpha</math>-ratolí-Cy5</b>	Reconeix la cadena pesada dels anticossos de ratolí. Està conjugat a Cy5	Jackson ImmunoResearch (115-175-146)	Immunolocalització 1:400

**Taula M.5. Relació de tots els anticossos secundaris emprats en aquest treball.** S'indica també les seves característiques, la procedència, tipu d'experiment en que es va utilitzar i la dilució emprada.

## Tècniques de manipulació del DNA plasmídic

Tots els plasmidis utilitzats en el present treball es van obtenir mitjançant tècniques bàsiques de Biologia Molecular i verificats per la digestió amb enzims de restricció i electroforesi en un gel d'agarosa a l'1%. A continuació, els clons positius van ser analitzats mitjançant seqüenciació automàtica.

## Minipreparacions de DNA plasmídic

Per obtenir petites quantitats de plasmidis es va utilitzar el mètode de lisi alcalina (Sambrook et al., 1989). El DNA va ser resuspès en 50  $\mu$ l de tampó TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) amb 1  $\mu$ g de RNasa A i es va incubar a 37° C durant 15 minuts.

## Maxipreparacions de DNA plasmídic

Per obtenir grans quantitats de DNA plasmídic amb un alt grau de puresa es va utilitzar el kit comercial Qiagen® Plasmid Maxi Kit, seguint les instruccions del fabricant. El *pellet* final de DNA va ser resuspès amb tampó TE o amb H<sub>2</sub>O milliQ (en el cas dels vectors que han de ser transfectats en cèl·lules SL2).

## Transformació de DNA en bacteris

Prèviament, es van preparar les cèl·lules competents mitjançant el mètode de clorur càlcic (Sambrook et al., 1989), i es van congelar a -80°C. Per transformar el DNA, les cèl·lules van ser descongelades en gel. Es va afegir 200 µl de cèl·lules en *l'ependorf* que contenia el DNA a transformar i es va incubar en gel durant 30 minuts. A continuació, es va realitzar un xoc tèrmic a 42°C durant 2 minuts i 30 segons. Els bacteris es van recuperar amb 800 µl de medi LB (triptona 10 g/l, extracte de llevat 5 g/l, NaCl 10 g/l, NaOH 1 mM) a 37°C durant 1 hora. Es va centrifugar a 9000 rpm durant 2 minuts. Es va treure 850 µl del sobrenedant i la resta es va utilitzar per resuspendre el sediment cel·lular. Finalment, es va plaquejar tota la suspensió en plaques de LB (LB + agar 15 g/l) amb el corresponent antibiòtic. Les plaques es van incubar durant la nit a 37°C.

## Mètodes de treball amb cèl·lules SL2

### Creixement:

En tots els experiments es va utilitzar la línia cel·lular de *Drosophila Schneider 2* (SL2 o S2). Aquestes cèl·lules es van créixer a 25°C en medi *Schneider* (Sigma) sense CO<sub>2</sub> suplementat amb 100 µg/ml d'estreptomicina (Gibco), 100 unitats/ml de penicil·lina (Gibco) i un 10% de sèrum fetal bovi (FBS) (Gibco), el qual s'ha inactivat prèviament a 56°C durant 30 minuts. Aquestes cèl·lules van ser mantingudes en flascons *Corning*® de 25 cm<sup>2</sup> a una densitat de 1-5 x 10<sup>6</sup> cèl·lules/ml en un volum total de 5 ml, fent dilucions 1/4 o 1/5 cada 3-4 dies.

### Transfecció transitòria

Per transfectar transitòriament els DNA plasmídics es va utilitzar el mètode del fostat càlcic. Aquest mètode facilita l'entrada del DNA dintre la cèl·lula mitjançant la formació de precipitats de DNA-fosfat.

Inicialment, es va determinar la concentració de cèl·lules mitjançant el comptatge amb la cambra de *Neubauer*. A continuació, es van plaquejar 3x10<sup>6</sup> cèl·lules per placa de cultiu de 60 mm<sup>2</sup> (Corning) en un volum final de 5ml i es van incubar a 25°C durant 24



hores. A l'endemà, per cada placa es van transfectar 20 µg de DNA en un volum final de 50 µl. Cada transfecció es fa per duplicar, i per tant les barreges es van preparar escalades per 2,5 transfeccions. Així doncs, en un *ependorf* es va addicionar la quantitat de DNA necessària en un volum final de 125 µl, completat el volum amb aigua esterilitzada. Llavors, en cada *ependorf* es va addicionar 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,25 M. En un tub *falcon* de 15ml es va addicionar 1ml de HEBS 2X (250 mM NaCl, 9 mM KCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM glucosa, 50 mM HEPES pH 7,1). Mentre es vortejava suaument el HEBS, es va afegir gota a gota la mescla de CaCl<sub>2</sub>-DNA per tal de formar petits precipitats de color blanc. Aquests precipitats es van incubar a 25°C durant 35 minuts. Transcorregut aquest temps, es va resuspendre els precipitats i es va addicionar 850 µl de la suspensió en cada placa. Les plaques es van incubar 48h a 25°C.

### **Línies cel·lulars estables**

Cèl·lules SL2 van ser transfectades com en el cas de la transfecció transitòria amb 20 µg del DNA plasmídic d'interès. Al cap de 24 hores de la transfecció, es va treure la solució de fosfat de calci i es van rentar les cèl·lules dues vegades amb medi complet (medi *Schneider* amb FBS) amb penicil·lina i estreptomicina. A continuació, es va afegir medi complet i es van deixar incubar les cèl·lules a 25°C durant 2 dies. Després, es van centrifugar les cèl·lules a 100 g durant 5 minuts, es van resuspendre amb medi complet que contenia 0,3 mg/ml d'Higromicina B (Invitrogen) i es van plaquejar en flascons de 25 cm<sup>2</sup>. El medi selectiu s'anava renovant cada 4-5 dies fins que van aparèixer les colònies resistents.

### **Inducció amb CuSO<sub>4</sub> de les cèl·lules transfectades transitòriament**

Per induir l'expressió de les construccions regulades pel promotor de la metal·lotioneïna, que és induïble per metalls pesants, es va addicionar en el medi de cultiu CuSO<sub>4</sub> (Sigma). En concret, al cap de 24 hores d'haver transfectat transitòriament les cèl·lules amb aquestes construccions, es va afegir en el medi de cultiu CuSO<sub>4</sub> a una concentració final de 500 µM al medi de cultiu. Al cap de 24 hores d'haver induït l'expressió de la construcció es van recollir les cèl·lules i es van realitzar experiments consecutius.

### **Tractament de les cèl·lules SL2 amb dsRNA**

Per obtenir cèl·lules SL2 que no expressin la proteïna codificada pel gen CG8289, es va incubar aquestes cèl·lules amb RNA de doble cadena (dsRNA) de seqüència homologa a un tros del gen. En concret, el dsRNA generat és homòleg al segment comprès entre els nucleòtids 254-568 que correspon al primer exó i no inclou el tros de

seqüència que codifica pel domini cromò, homòleg al d'altres proteïnes. Com a control es va utilitzar un dsRNA de LacZ, gen absent en el genoma de *Drosophila*.

Per a l'obtenció dels dsRNAs de CG8289 i LacZ, en primer lloc es va sintetitzar el segment del DNA motlle que contenia en els extrems la seqüència promotora de la RNA polimerasa T7. Així doncs, utilitzant encebadors que contenien aquesta seqüència en els seus extrems i els plasmidis FMO02571 o pBS-SK mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) es van sintetitzar els DNAs motlle del CG8289 i del LacZ, respectivament. A continuació, utilitzant els reactius i *buffers* subministrats pel kit MEGAscript<sup>®</sup> T7 *Transcription* (Invitrogen) es van sintetitzar els dsRNA. En concret, en un *epENDORF* es van afegir els NTPs, el *buffer* de la reacció, l'enzim RNA polimerasa T7 i el DNA motlle, mantenint les proporcions especificades pel fabricant i es va incubar a 37°C durant tota la nit.

El dia següent per tal de digerir el DNA motlle es va afegir a cada *epENDORF* 1µl de TURBO DNasa i es va incubar 15 minuts a 37°C. Posteriorment, es va procedir a la purificació dels dsRNAs utilitzant les columnetes i els reactius subministrats pel Kit RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit-QIAGEN. Es va comprovar la integritat i la concentració dels dsRNAs carregant una alíquota en un gel d'agarosa de l'1%.

Un cop sintetitzats els dsRNAs es va procedir a tractar les cèl·lules amb aquests. En primer lloc, en cada placa de cultiu de 60 mm<sup>2</sup> es van plaquejar 2,5x10<sup>6</sup> cèl·lules SL2 en 2ml de medi Schneider sense sèrum. A cada placa es va addicionar 15 µg del dsRNA corresponent i es va deixar incubar a 25°C durant una hora. Transcorregut aquest temps, es va addicionar a cada placa 3ml de medi Schneider suplementat amb 5/3 de FPS i es va deixar a 25°C. Al cap de 3 dies es va afegir en cada placa 15 µg més del dsRNA corresponent i es va incubar a 25°C durant 4 dies més. Passat aquest temps, es van recollir les cèl·lules i es van utilitzar per fer experiments consecutius.

### **Obtenció d'un extracte proteic a partir de cèl·lules SL2**

Es van recollir les cèl·lules SL2 i es van centrifugar a 1500 rpm durant 4 minuts. A continuació, es va treure el sobrenedant i el sediment de cèl·lules es va resuspendre amb 150 µl de la solució de PLB (PLB 1x, 9% β-mercaptoetanol) per cada 5 ml de cèl·lules inicials. Es va sonicar la mostra utilitzant un sonicador *Digital Sonifier*<sup>®</sup> (Branson), durant 10 segons i una amplitud del 40%. Finalment, abans de carregar una petita alíquota de la mostra en un gel de poliàcrilamida-SDS, aquesta es va bullir durant 5 min a 95°C.

## **Purificació per afinitat de les proteïnes associades a la cromatina que conté nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>-TAP**

Per purificar les proteïnes associades als nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>-TAP, es va partir d'un *pellet* de 120 g de cèl·lules que establement expressaven la construcció CenH3<sup>CID</sup>-TAP. Es va resuspendre el *pellet* amb 3 volums, considerant un volum el volum del *pellet* inicial de cèl·lules, de Buffer A (Sacarosa 0,23 M, KCl 60 mM, NaCl 15 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,25 mM, Espermina 0,15 mM, Espermidina 0,5 mM, Tris 15 mM pH 7,4, β-mercaptoetanol (0,95 μ/ml) i *Protease Inhibitor Cocktail* (SIGMA). A continuació, es van homogenitzar les cèl·lules amb el *Dounce* i l'èmbol L fent 40 passades i posteriorment es va centrifugar durant 15 min a 4°C a 3500g en el rotor JA-14. Es va llençar el sobrenedant i el *pellet* de nuclis es va rentar seguint una metodologia similar a la descrita en Foltz et al., 2006. Primer es va rentar amb 3 volums del *Buffer* de rentat (HEPES 20 mM pH 7,7, KCl 20 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 0,5 mM, PMSF 0,5 mM i *Protease Inhibitor Cocktail*) i es va centrifugar durant 15 min a 4°C a 3500g en el rotor JA-14. A continuació, es va fer un segon rentat amb 3 volums del *Buffer* de rentat suplementat amb NaCl 150mM. Després d'aquest segon rentat, es va resuspendre el *pellet* de nuclis amb 1 volum de *Buffer* de rentat suplementat amb NaCl 150mM i CaCl<sub>2</sub> 3mM. Llavors, es va digerir la cromatina amb nucleasa micrococcal a la concentració de 0,04U per 100 μg de cromatina durant 15 min a 37°C. Transcorreguts els 15 min, es va aturar la reacció amb EGTA a la concentració final en l'extracte de 5 mM. Tot seguit, per facilitar la solubilització de la cromatina digerida es va addicionar a l'extracte NP40.05% i NaCl 150 mM i es va incubar en gel durant 2h i 30 min. Es va centrifugar durant 15 min a 4°C a 10.000g en el rotor 25.50. El sobrenedant és la fracció soluble de la cromatina (SN1), la qual representava aproximadament el 66% de la cromatina total. El *pellet* restant va ser solubilitzat amb solucions creixents d'EDTA 2mM, 20mM i 200mM, respectivament. En concret, es va resuspendre el *pellet* amb 1 volum de la solució d'EDTA suplementada amb NaCl 300 mM i NP40 0.05%. Es va deixar incubar en gel durant 30 min i es va centrifugar durant 15 min a 4°C a 10.000g en el rotor 25.50. Al final d'aquest procediment teníem quatre sobrenedant, SN1, el de 2 mM d'EDTA (SN2), el de 20 mM d'EDTA (SN20) i el de 200 mM d'EDTA (SN200). Per cada sobrenedant, es va determinar el contingut de CenH3<sup>CID</sup>-TAP i CENP-C així com el % de cromatina solubilitzada. Els sobrenedants SN1 i SN2 es van barrejar.

Per cada sobrenedant es va fer una purificació per afinitat. A grans trets, primer de tot, per tal de netejar un mica el sobrenedant es va incubar aquest durant 2h i 30 min amb 80mg de *Dynabeads* (Invitrogen) bloquejades prèviament amb BSA. A continuació, donat que les *Dynabeads* estan magnetitzades, amb l'ajuda d'una gradeta per falcons magnetitzada es van treuen les BSA-*Dynabeads* de l'extracte. Després, es va incubar

l'extracte amb 80 mg d'IgG-*Dynabeads*, durant tota la nit a 4°C. Teòricament, les proteïnes A del TAP es va unir a les IgG. Per tant, després de la incubació les IgG-*Dynabeads* tenien units els nucleosomes de CenH3<sup>CTD</sup>-TAP i les proteïnes associades a aquests.

A l'endemà amb l'ajuda de la gradeta per falcons magnetitzada es van concentrar totes les IgG-*Dynabeads* en un falcon de 15 ml. Llavors, es renten les IgG-*Dynabeads* 10 vegades amb el *Buffer* de rentat suplementat amb NaCl 300mM. Per tal d'anar reduint el volum del recipient i acabar tenint totes les IgG-*Dynabeads* concentrades en un sol *ependorf*, en cada rentat es va disminuint el volum de *Buffer* de rentat. Un cop finalitzats els 10 rentats, es va procedir a fer 8 elucions àcides. Cada elució àcida consisteix en addicionar a l'*ependorf* que conté les IgG-*Dynabeads* 120 µl d'una solució de glicina 50 mM a pH3, es va vortejar, es va deixar reposar durant 2 min, es va posar l'*ependorf* en la gradeta d'*ependorf* magnetitzada i es va treure l'eluït. Per cada elució, es va treure un alíquota de 12 µl i la resta es va congelar a -80°C.

A cada alíquota de l'eluït es va addicionar 4 µl de PLB 5X i 1 µl de β-mercaptoetanol i es van carregar en un gel de poliacrilamida-SDS de gradient 9%-15%. Per tal de visualitzar les proteïnes, es va tenyir el gel amb tinció de plata.

Per fer la tinció de plata es va deixar el gel tot la nit amb la solució fixadora, solució del 50% de metanol. A l'endemà, es va treure la solució fixadora i es va afegir la solució de plata. La solució de plata s'havia preparat prèviament afegint la solució B (4ml d'H<sub>2</sub>O i 0,8 mg de nitrat de plata) a la solució A (40 ml d'H<sub>2</sub>O, 1,4ml d'amoníac al 25% i 190 µl de NaOH 10 mM), gota a gota, i en agitació. Es va deixar tenyir durant 20 min en agitació. Es va rentar amb aigua desionitzada durant 5 min. A continuació, es va revelar amb 150 ml d'aigua als quals s'havia afegit 750 µl d'àcid acètic i 75 µl de formaldehid. Es va observar el revelat mentre s'agita. Quan el gel estava prou revelat es va aturar amb la solució 50% metanol i 12% acètic durant 15 min. Aleshores, es posar el gel amb aigua i es va procedir a analitzar.

Per les elucions seleccionades es va carregar tota la mostra en un gel de poliacrilamida-SDS de 1,5 mm de gruixut. Quan la mostra va passar uns 2mm de l'interfase entre el gel apilador (5% d'acrilamida) i el gel separador (10% d'acrilamida) es va parar l'electroforesi. Llavors, el gel es va tenyir durant 2h i 30 min amb la solució Coomassie (0,1% *Coomassie blue brilliant*, 40% etanol, 10% àcid acètic). Es va deixar el gel destenyint-se tota la nit a temperatura ambient i en agitació en la solució 40% etanol, 10% àcid acètic. A l'endemà, es va hidratar el gel amb aigua milliQ i es va portar al servei de Proteòmica.

## **Immunolocalització a cèl·lules de *Drosophila* SL2**

Les immunolocalitzacions de les proteïnes es van realitzar en cèl·lules SL2 que expressaven transitòriament o establement les proteïnes d'interès. Es van utilitzar dos mètodes diferents en funció del grau de resolució que es desitjava. Per una banda, es van fer immunolocalitzacions en cèl·lules adherides en cobreobjectes amb Concanavalina. Aquesta tècnica permet mantenir intacte l'estructura de la cèl·lula i per tant, permet determinar si la proteïna d'interès es localitza al citoplasma o bé al nucli. En canvi, l'altre mètode consisteix en impactar les cèl·lules en el portaobjectes mitjançant citocentrifugació. Aquesta tècnica és més agressiva, es trenca normalment la membrana citoplasmàtica però, permet obtenir nuclis i cromosomes de més bona qualitat.

### **Immunolocalització a cèl·lules SL2 adherides en cobreobjectes amb Concanavalina**

Inicialment, es van posar 20 µl de Concanavalina 0,5 mg/ml sobre cada cobreobjectes de 12 mm de diàmetre i es van deixar assecar durant una hora a temperatura ambient dins de la campana de flux laminar. Transcorregut aquest temps, es van introduir els cobreobjectes dins dels pous d'una placa d'Elisa de 24 pous. A continuació, es va afegir a cada pou 0,5 ml de cèl·lules a la concentració de  $1,2 \times 10^6$  cèl·lules/ml i es va deixar la placa 2 hores a 25°C.

Transcorregudes les dues hores i ja en el laboratori, per cada pou es va treure el medi de cultiu i es va rentar amb 0,5 ml de PBS 1X (NaCl 1,3 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 70 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mM pH 7,3) durant 10 minuts en agitació. Per fixar les cèl·lules es va addicionar a cada pou 100 µl de paraformaldehid al 4 % durant 10 minuts sense agitació. Es va tornar a fer un rentat amb PBS 1X durant 15 minuts en agitació per eliminar les restes de paraformaldehid. Seguidament, es van fer 2 rentats amb PBS-Tritó-BSA (PBS 1X, 0.1% Tritó X-100, 1mg/ml BSA) per permeabilitzar les cèl·lules i permetre l'entrada dels anticossos. A continuació, es va addicionar en cada pou 150 µl de la dilució corresponent de l'anticòs primari i es va incubar en agitació dins d'una càmera humida durant 1 hora a temperatura ambient i tota la nit a 4°C.

Al dia següent, es van fer 3 rentats amb PBS-Tritó-BSA de 10 minuts. Posteriorment, es va addicionar a cada pou 150 µl de la dilució corresponent de l'anticòs secundari i es va incubar en agitació durant 1 hora a temperatura ambient. Es van fer 2 rentats amb PBS-Tritó (PBS 1X, 0.1% Tritó X-100) durant 10 minuts en agitació i després, 2 rentats més amb PBS 1X. Finalment, a cada cobreobjectes es va addicionar 5µl del medi de muntatge *Mowiol*-DAPI (500 µl *Mowiol* (Calbiochem-Novabiochem) i 50 µl DAPI (SIGMA) 2 ng/ml) i es va col·locar en un portaobjectes.

L'observació es va realitzar en el microscopi de fluorescència Eclipse E-800 (Nikon) amb la càmera Olympus DP72 i el *software* CellF o bé amb el microscopi confocal TCS/SPE i el *software* LAS/AF. Les imatges van ser analitzades amb el *software ImageJ* o *Adobe Photoshop*.

### **Immunolocalització a cèl·lules SL2 impactades sobre portaobjectes amb citocentrifugació**

En primer lloc, es van recollir les cèl·lules i es van barrejar 300 µl (línies estables) o bé 400 µl (expressió transitòria) de cèl·lules amb 1 ml de medi hipotònic MAC (glicerol 50 mM, KCl 5 mM, NaCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,8 mM, sacarosa 10 mM). Es va deixar incubar durant 5 minuts per tal de que les cèl·lules incorporeassin aigua i s'inflessin, però sense excedir el temps perquè si no hi havia el risc que acabessin rebentant. Ràpidament, es van addicionar 200 µl de la mescla en cada tub de la citocentrífuga *ThermoShandon Cytospin 4*. Per impactar les cèl·lules en els portaobjectes es va centrifugar durant 10 minuts a 500 rpm amb acceleració baixa. A continuació, es van deixar assecar els portaobjectes a temperatura ambient durant 30-60 minuts. Posteriorment, es van fixar les cèl·lules posant 50 µl de paraformaldehid al 3,7 % (diluint en PBS 1X) durant 10 min sobre el cercle de cèl·lules. Es van rentar amb PBS 1X durant 15 minuts. En aquest punt, un cop els portaobjectes estan secs es poden guardar a 4°C embolicats en paper d'alumini fins al moment en que s'hagin d'utilitzar.

Per fer les immunolocalitzacions, es van rentar els portaobjectes dues vegades amb PBT-BSA (PBS 1X, BSA (Fracció V) 0,1 % i Tween 20 0,2 %) per tal de permeabilitzar les cèl·lules i permetre l'entrada dels anticossos. A continuació, es va addicionar sobre cada cercle de cèl·lules 15 µl de la dilució corresponent de l'anticòs primari, es va posar un cobreobjectes i es va incubar dins d'una cambra humida durant 1 hora a temperatura ambient i tota la nit a 4°C.

A l'endemà, es van fer 2 rentats amb PBT-BSA de 10 minuts i es van incubar amb l'anticòs secundari corresponent durant 45 minuts a temperatura ambient dins de la cambra humida. Després de la incubació amb l'anticòs secundari, es van fer 2 rentats amb PBT-BSA durant 10 minuts i 2 més amb PBS 1X. Finalment, es va assecar els portes i es va afegir 15 µl del medi de muntatge *Mowiol*-DAPI i es va col·locar un cobreobjectes. Les mostres van ser visualitzades i analitzades tal i com s'explica a l'apartat anteriorment.

### **Immunolocalització a neuroblastos**

Es van disseccionar els cervells de larves en estadi 3 en PBS 1X i es van rentar en medi salí NaCl 0,7% durant 5 minuts. Després, es va fer un xoc hipotònic amb citrat-sòdic 0.5% a temperatura ambient durant 5-10 minuts. A continuació, es van fixar els

cervells amb formaldehid al 3,7% durant 20 minuts. Posteriorment, es van transferir els cervells a un cobreobjectes siliconitzat que conté 16 µl d'àcid acètic al 60%, es va col·locar a sobre un portaobjectes i es va fer un *squash*. Fer un *squash* consisteix en picar sobre el cobreobjectes amb un punxó fins que les taques blanques que corresponen als cervells desapareixien. Després es posa sobre un tros de paper i es pressiona fort amb el dit polze durant 10 segons. Finalment, es va submergir el portaobjectes en N<sub>2</sub> líquid fins que es deixa de sentir el brunzit del N<sub>2</sub> líquid i es treu el cobreobjectes, quedant la preparació en el portaobjectes. Tot seguit, es poden guardar els portaobjectes en PBS-Tritó (PBS 1x, Tritó X-100 0,1%) O/N a 4°C.

Per seguir amb la immunolocalització, es va bloquejar les preparacions amb PBS-Tritó-llet (PBS 1X, Tritó X-100 0,1% i llet en pols 1%) durant 1 hora. Seguidament, es van incubar amb 25 µl de la dissolució de l'anticòs primari en PBS-Tritó-llet en una cambra humida durant 1 hora a temperatura ambient i posteriorment a 4°C tota la nit. A l'endemà, es van rentar les preparacions 2 vegades amb PBS-Tritó-llet durant 10 minuts. A continuació, es van incubar amb 25 µl de la dissolució de l'anticòs secundari corresponent durant 45 minuts en una cambra humida i a temperatura ambient. Posteriorment, es van fer 2 rentats de 10 minuts amb PBS-Tritó-llet i 2 més amb PBS 1X. Per últim, es van muntar les preparacions amb 30 µl del medi de muntatge *Mowiol*-DAPI i es va col·locar un cobreobjectes.

L'observació es va realitzar en el microscopi confocal TCS/SPE i el *software* LAS/AF. Les imatges van ser analitzades amb el *software* *ImageJ* o *Adobe Photoshop*.

### **Immunolocalització a cromosomes politènics**

Per preparar cromosomes politènics es van extreure les glàndules salivals de larves de *D. melanogaster* en estadi 3 en medi Cohen-Gotchell (MgCl<sub>2</sub> 10 mM, sodium glycerol 3P 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, NP40 0.5%, KCl 30 mM, sacarosa 160 mM en H<sub>2</sub>O) i es van incubar en aquest medi durant 8-10 minuts, mai més de 10 minuts. Es van deixar les glàndules lo més netes possibles, eliminant el teixit adipós que les envolta. Seguidament, es van transferir les glàndules en un recipient on hi havia la solució de fixació 1 (PBS 1X, 0,74 % formaldehid) durant 2 minuts. Després, es van incubar durant 3 minuts més amb la solució de fixació 2 (45% àcid acètic, 0,74 % formaldehid). En un cobreobjectes siliconitzat es van posar 20 µl de la solució fixadora 2 i a dins la gota s'hi van dipositar les glàndules salivals. Es va posar un portaobjectes sobre el cobreobjectes fins que va quedar en contacte amb la gota que contenia les glàndules. Aleshores, es va girar el portaobjectes unit al cobreobjectes deixant a la part superior el cobreobjectes. A continuació, es va ser un *squash*, procediment descrit en l'apartat anterior. Finalment, es van submergir les preparacions dins d'una cubeta de portaobjectes amb PBS 1X.

Per la immunolocalització es van fer 3 rentats de 5 minuts amb PBS-Tween (PBS 1X, Tween 20 0,05 %) en agitació dins de la cubeta de portaobjectes. Tot seguit, es van incubar les preparacions amb 25 µl de la dissolució de l'anticòs primari en una cambra humida durant 1 hora a temperatura ambient i posteriorment a 4°C tota la nit.

El dia següent es van fer 3 rentats de 5 min en agitació a la cubeta portaobjectes amb PBS-Tween. Després de l'últim rentat, es van incubar les preparacions amb 25 µl de la dissolució de l'anticòs secundari corresponent durant 1 h i 30 min dins la cambra humida i a temperatura ambient. Posteriorment, es van fer 3 rentats de 5 minuts amb PBS-Tween i un rentat final de 5 minuts amb PBS 1x. Per últim, es van muntar les preparacions amb 25 µl del medi de muntatge *Mowiol*-DAPI i es va col·locar un cobreobjectes.

L'observació es va realitzar en el microscopi confocal TCS/SPE i el software LAS/AF. Les imatges van ser analitzades amb el software *ImageJ* o *Adobe Photoshop*.

### **Obtenció d'un extracte proteic a partir de larves de *Drosophila melanogaster***

Es van disseccionar de 6 a 8 larves de tercer estadi en medi PBS 1X per cada condició. Es van transferir els cervells, els disc imaginals i les glàndules salivals en un *ependorf* que contenia 30 µl de la solució C ( PLB 1X, PMSF 1 mM, NP40 0.05%). Llavors, amb la pipeta p200 i una punta groga sense tallar es va pipetejar la mostra per tal de desintegrar els teixits i extreure les proteïnes. Finalment, es va centrifugar a 10.000 g durant 10 min a 4°C. Ens vam quedar amb el sobrenedant que va ser analitzat per *Western-Blot* amb els anticossos corresponents.

### **Obtenció d'anticossos policlonals contra la proteïna codificada pel gen CG8289**

Per generar anticossos policlonals específics contra la proteïna codificada pel gen CG8289 es va injectar la proteïna recombinant CG8289-His en conills. Per obtenir la proteïna recombinat, primer es va expressar a *E.coli* i posteriorment es va purificar per cromatografia d'afinitat mitjançant una columna de Ni<sup>2+</sup>.

### **Expressió de proteïnes fusionades a una cua d'histidines**

Per expressar la proteïna CG8289 fusionada amb una cua de 6 histidines en posició carboxi-terminal es va clonar la regió codificant per la proteïna en el vector pET29b (Novagen). Els vectors de tipus pET permeten l'expressió de les proteïnes de fusió sota el control de senyals de transcripció i traducció de la RNA polimerasa del bacteriòfag T7. La soca d'*E. Coli* utilitzada per expressar les proteïnes, BL21, conté una còpia cromosomal del gen de la RNA polimerasa T7 sota el promotor *lacUV5*, induïble amb IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Així doncs, en afegir IPTG en el



medi de cultiu, aquest desplaça el repressor lac, s'indueix l'expressió de RNA T7 polimerasa i conseqüentment també s'indueix la sobreexpressió de la proteïna de fusió.

En concret, es va transformar el plasmidi pET-CG8289 a la soca BL21. A l'endemà es van inocular 1 tubs de LB amb colònies independents i es van créixer a 37°C durant tota la nit en agitació. Es van inocular 500 ml de medi LB amb el minicultiu. Es van fer créixer els bacteris en agitació a 37°C fins que el cultiu va arribar a una densitat òptica entre 0,6-0,8. En aquest punt, es va treure una alíquota de 400 µl per analitzar posteriorment en el gel SDS-PAGE. A continuació, es va induir l'expressió del plasmidi amb IPTG 1mM durant 3 hores, en agitació a 37°C. Un cop finalitzada la inducció, es va treure una alíquota de 400 µl per carregar en el gel SDS-PAGE, com a control de la inducció, i la resta es va centrifugar a 4000 rpm en el rotor JA-14 (Beckman) durant 10 minuts a 4°C. Es va descartar el sobrenedant i el sediment cel·lular es va resuspendre amb 10 ml de tampó de lisi (NaCl 0,5 M, glicerol 20 %, HEPES-KOH 20 mM pH 7,9, EDTA 1 mM pH 8, NP40 0,1 %, β-Mercaptoetanol 15 mM i PMSF 1mM). Seguidament, es va sonicar la mostra utilitzant un sonicador *Digital Sonifier*<sup>®</sup> (Branson), fent 4 cicles de 10 segons amb intervals de 15 segons de descans, i una amplitud del 40%. Després es va centrifugar el lisat a 35000 rpm a 4°C, amb el rotor SW41 en una centrífuga Beckman durant 1 hora per separar la fase soluble de la insoluble, sobrenedant i sediment, respectivament. El sobrenedant es va transferir en un tub nou. Tant el sobrenedant com el sediment es van congelar amb neu carbònica i es van guardar a -80°C.

Per analitzar si la proteïna d'interès és soluble o insoluble es van carregar en un gel SDS-PAGE 25 µl de la fracció soluble, una mica del sediment agafat amb una punta groga i ressuspès en 500 µl de tampó de càrrega i 25 µl dels controls d'abans i després d'induir. El gel SDS-PAGE es va tenyir amb solució de Coomassie per veure si havia funcionat la sobreexpressió i si la proteïna era soluble o insoluble. En el nostre cas, la proteïna va resultar ser insoluble.

Per la tinció amb blau de Coomassie es va incubar el gel amb la solució de tinció (0,05% *Coomassie blue brilliant*, 40% etanol, 10% àcid acètic) durant uns 20 minuts. Després, per eliminar l'excés de colorant, es va destenyir amb una solució d'àcid acètic 10%.

### **Purificació de proteïnes fusionades a una cua d'histidines a partir de la fracció insoluble.**

Es va deixar el sediment en resuspensió tota la nit amb 10 ml de tampó de clorur de guanidina (clorur de guanidina 6M, Hepes pH 7.9 20mM, NaCl 100mM i β-mercaptoetanol 10 mM) a temperatura ambient i en agitació. A l'endemà es va centrifugar la suspensió durant 1 hora a 11000 rpm a temperatura ambient.

La utilització d'una cua d'histidines com a *tag* permet la purificació de la proteïna mitjançant una cromatografia d'afinitat amb una columna de  $\text{Ni}^{2+}$ , el qual interacciona amb els grups imidazol de les histidines fent que aquestes quedin retingudes a la columna. Així doncs, es van empaquetar 1 ml de la reïna *Ni-NTA Agarose* (Qiagen) en una columna *Econocolumn* (Bio-Rad). Es va equilibrar la reïna amb 10 ml de tampó de clorur de guanidina. Aquest pas i els posteriors es van realitzar amb l'ajuda d'una bomba peristàtica *LKB Pump P-1* (Pharmacia) a una velocitat entre 6 i 8 de la posició 1. Es va fer passar 3 vegades la mostra per la columna i es va recollir la primera fracció anomenada *Flow Through* (FT). Posteriorment, es van fer 2 rentats. El primer rentat amb 10 ml de tampó de clorur de guanidina (fracció R1) i el segon amb 5 ml de tampó d'urea (KCl 100 mM, HEPES-KOH pH 7.9 20mM, Urea 8 M i  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM) (fracció R2).

Finalment es va eluir la proteïna per competició amb imidazol en un procés de tres passos. Primer es va fer una preelució amb 3 ml de tampó d'Urea-20 mM Imidazol, recollint fraccions d'1ml (PE1, PE2, PE3). Aquest primer pas serveix per eliminar contaminants que s'uneixen a la reïna amb menor afinitat que la cua d'histidines. Després es va eluir amb 5 ml de tampó d'Urea-100 mM Imidazol, recollint fraccions d'1 ml (E1-E5). Finalment, es va eluir amb 5 ml de tampó d'Urea-500 mM Imidazol, recollint també fraccions d'1 ml (E6-E10). A continuació, es va comprovar el funcionament de la cromatografia analitzant 10  $\mu\text{l}$  de cada una de les elucions en un gel SDS-PAGE i es va tenyir el gel amb solució de Coomassie.

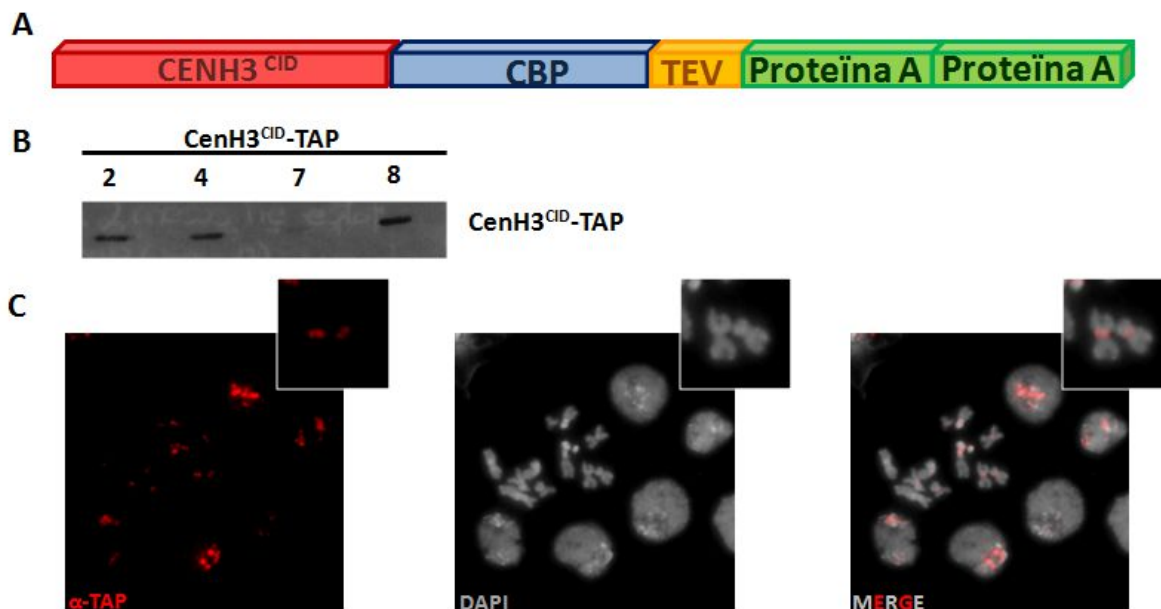
Un cop comprovat que la purificació havia sigut òptima, es va carregar l'elució més enriquida amb la proteïna de fusió en un gel de poliacrilamida-SDS del 10% de 20 X 20 i un gruix d' 1,5 mm, utilitzant com a pinta per fer el pou una pinta de *MiniProtean* posada al revés. Un cop acabada l'electroforesi el gel es va tenyir amb una solució fresca de Coomassie al 0,05% en aigua durant uns 10 minuts en agitació. Es va retallar la banda de la proteïna d'interès i es va trossejar en trossos el més petits possible. Es va fer passar l'acrilamida trossejada per una xeringa de 2 ml, dipositant-la en un *ependorf* de 1,5ml. A continuació, per tal que l'acrilamida quedés el més fina possible i així evitar possibles obturacions de l'agulla a l'hora de la immunització del conill, es va fer un forat amb una agulla a la base d'aquest tub, es va col·locar dins d'un altre i es va centrifugar a 14000 rpm durant 2 minuts. Aquest procés es va repetir dues vegades més, disminuint cada vegada el diàmetre del forat de la base de l'*ependorf*. Finalment, es va resuspendre la mostra amb un volum de PBS 1% i es va vortejar la suspensió fins que va tenir una consistència viscosa que es podia agafar amb la pipeta. Les immunitzacions van ser realitzades en conills de forma subcutània per la Dra. Eva Prats del servei d'estabulari CID-CSIC (Barcelona).

## RESULTATS

### Obtenció de la línia cel·lular que expressa establement CenH3<sup>CID</sup>-TAP

Per tal d'identificar noves proteïnes centromèriques de *Drosophila melanogaster* vam generar línies estables de cèl·lules embrionàries de *Drosophila* SL2 que expressessin establement la proteïna de fusió CenH3<sup>CID</sup>-TAP sota el control del promotor de CenH3<sup>CID</sup>. A CenH3<sup>CID</sup> es va fusionar el tag TAP (*Tandem Affinity Purification*) perquè aquest tag està dissenyat per permetre una ràpida i eficient purificació de les proteïnes unides a la proteïna de fusió (Figura R.1.A). Per altra banda, es va optar per l'expressió de la construcció sota el control del promotor de CenH3<sup>CID</sup> per aconseguir que el seu nivell d'expressió fos el més semblant possible al de la proteïna endògena i així evitar la seva deslocalització a regions no centromèriques.

Un cop obtingudes les línies cel·lulars, es van preparar extractes proteics a partir d'aquestes i es va determinar mitjançant *Western Blot* l'expressió de la construcció CenH3<sup>CID</sup>-TAP (Figura R.1.B). A continuació, una al·lquota de cada línia cel·lular va ser impactada en un portaobjectes i es va fer la immunolocalització amb l'anticòs  $\alpha$ -TAP per comprovar que el patró de localització fos centromèric (Figura R.1.C). De totes les línies cel·lulars generades, es va seleccionar la número 2 ja que era la que mimetitzava millor el patró de localització de la proteïna endògena.

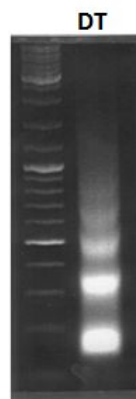


**Figura R.1. Caracterització de les línies cel·lulars que expressen establement la proteïna de fusió CenH3<sup>CID</sup>-TAP.** A) Esquema del constructe CenH3<sup>CID</sup>-TAP. CenH3<sup>CID</sup> a C-terminal té fusionat el tag TAP. Aquest tag està format per dos dominis que faciliten la purificació: un pèptid amb afinitat per la Calmodulina (CBP), i l'altre amb dues Proteïnes A en tàndem que permeten la interacció amb les IgG. Aquest dos dominis estan separats per un lloc de digestió per la proteasa TEV. B) El nivell d'expressió de la construcció CenH3<sup>CID</sup>-TAP va ser analitzat per *Western Blot* utilitzant l'anticòs  $\alpha$ -TAP en extractes proteics preparats a partir de les diferents línies cel·lulars (2, 4, 7 i 8) que expressen establement la construcció. C) El patró de localització de CenH3<sup>CID</sup>-TAP en la línia cel·lular 2 va ser determinat mitjançant la immunotinció amb l'anticòs  $\alpha$ -TAP (vermell). El DNA està tenyit amb DAPI (gris). A la dreta de cada imatge de C es mostren imatges ampliades.

## Purificació i identificació de les proteïnes associades als nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>-TAP

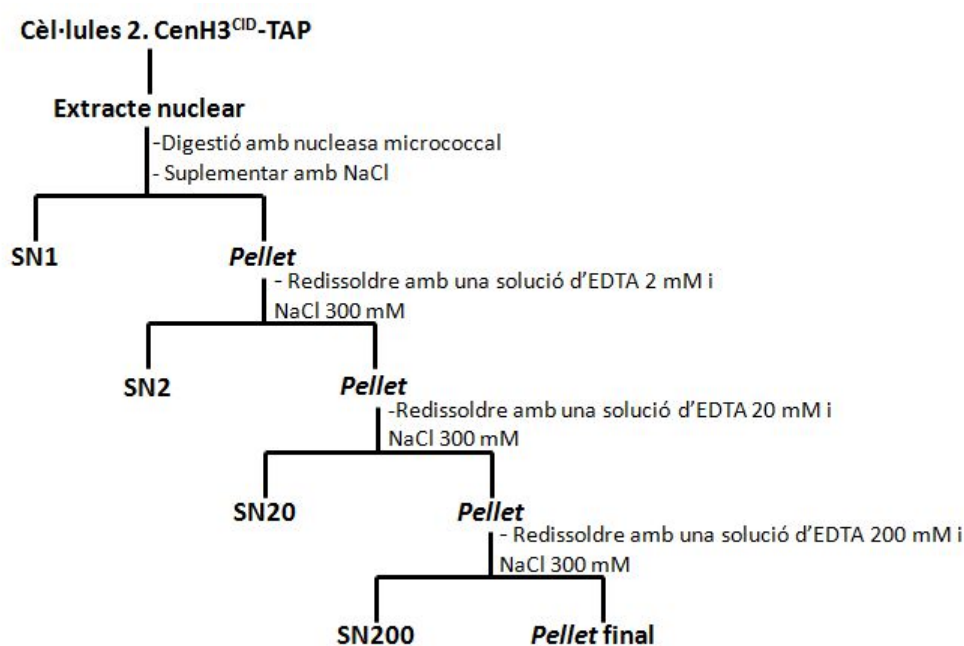
Abans de realitzar la purificació, es van fer proves a petita escala per posar a punt les condicions d'obtenció de l'extracte nucleosomal, material de partida de la purificació. En primer lloc, es van optimitzar les condicions de digestió de la cromatina amb la nucleasa micrococcal ja que ens interessava obtenir un patró de digestió de mono, di, tri i com a màxim tetranucleosomes. A continuació, es van fer proves per millorar la solubilització d'aquests nucleosomes digerits, modificant la força iònica i la concentració d'EDTA.

Un cop posades a punt totes les condicions, es va procedir a l'obtenció de l'extracte nucleosomal. En termes generals, es va partir de 120 g de cèl·lules de la línia cel·lular 2. CenH3<sup>CID</sup>-TAP que van ser lisades per obtenir un extracte nuclear. Tot seguit, aquest extracte va ser tractat amb nucleasa micrococcal durant 15 minuts a 37°C per digerir la cromatina i obtenir un extracte de nucleosomes. Després d'aturar la digestió, es va agafar una petita alíquota de l'extracte i es va comprovar mitjançant electroforesis en gel d'agarosa que la digestió havia funcionat correctament, ja que es va obtenir un extracte de nucleosomes enriquit amb mono, di, tri i tetranucleosomes (Figura R.2).



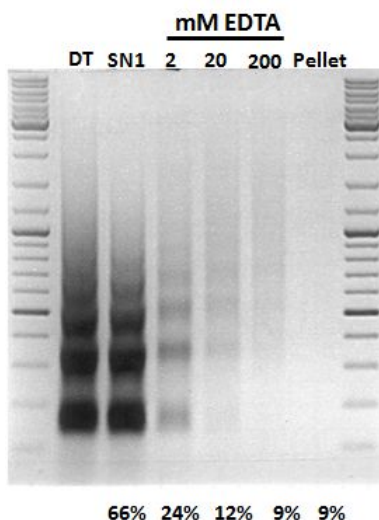
**Figura R.2. Comprovació de la digestió de la cromatina de l'extracte nucleosomal.** Anàlisi del patró de digestió de la cromatina en l'extracte nucleosomal un cop finalitzada la reacció, DT, mitjançant electroforesis en gel d'agarosa.

A continuació, l'extracte va ser suplementat amb NaCl, essent la concentració final del NaCl en l'extracte de 300 mM, i posteriorment centrifugat. El sobrenedant obtingut era la fracció soluble de la cromatina (SN1) i representava aproximadament el 66% del total de la cromatina. El material insoluble restant es va extreure augmentant la concentració d'EDTA de 2 mM fins a 200 mM d'EDTA, passant per una extracció intermèdia de 20 mM d'EDTA (Figura R.3). En tots els cassos la solució d'EDTA contenia NaCl a 300 mM. Al final d'aquest procediment teníem quatre sobrenedants, SN1, el de 2 mM d'EDTA (SN2), el de 20 mM d'EDTA (SN20) i el de 200 mM d'EDTA (SN200).



**Figura R.3. Esquema del procediment seguit per solubilitzar la cromatina un cop va ser digerida.** Bàsicament, un cop finalitzada la digestió es va addicionar NaCl fins assolir la concentració final de 300 mM de NaCl en l'extracte nucleosomal. Posteriorment, es va centrifugar l'extracte nucleosomal, es va treure el SN1 i el *pellet* resultant va ser redissolt amb una solució d'EDTA 2 mM suplementada amb NaCl 300 mM. Aquest pas va ser repetit dues vegades més amb solucions de concentració 20 i 200 mM d'EDTA suplementades amb NaCl, respectivament.

Tot seguit, es va procedir a caracteritzar els diferents sobrenedants obtinguts per seleccionar el més adequat per fer la purificació. En primer lloc, es va analitzar la composició nucleosomal de cadascun d'ells mitjançant electroforesis en gel d'agarosa. En la Figura R.4 s'observa que el procés de solubilització de la cromatina va ser molt bo ja que en els dos primers sobrenedants es va arribar a solubilitzar fins a tetranucleosomes i a més, el contingut de DNA d'aquestes dues fraccions representava aproximadament el 90% de la cromatina total.



**Figura R.4. Anàlisi del patró nucleosomal de la cromatina solubilitzada en cada sobrenedant.** Per cada sobrenedant obtingut es van agafar dues alíquotes. Una d'elles es va utilitzar per analitzar el patró de nucleosomes solubilitzat en cada sobrenedant mitjançant una electroforesis en gel d'agarosa. Amb l'altra alíquota es va determinar la concentració de DNA que hi havia en cada sobrenedant. Comparant la concentració de DNA per cada SN o la del *pellet* final amb la concentració de DNA de la cromatina inicial es va determinar el % de cromatina solubilitzada en cada sobrenedant i en el *pellet* final. Es considera la concentració de DNA de la cromatina inicial la determinada tot just després de digerir la cromatina (DT).

En darrer lloc, es va determinar el contingut de CenH3<sup>CID</sup>-TAP i CENP-C en aquests sobrenedants per *Western Blot* (Figura R.5). Tant CenH3<sup>CID</sup>-TAP com CENP-C es van detectar en tots els sobrenedants, així com també una petita fracció que roman insoluble en el *pellet*.



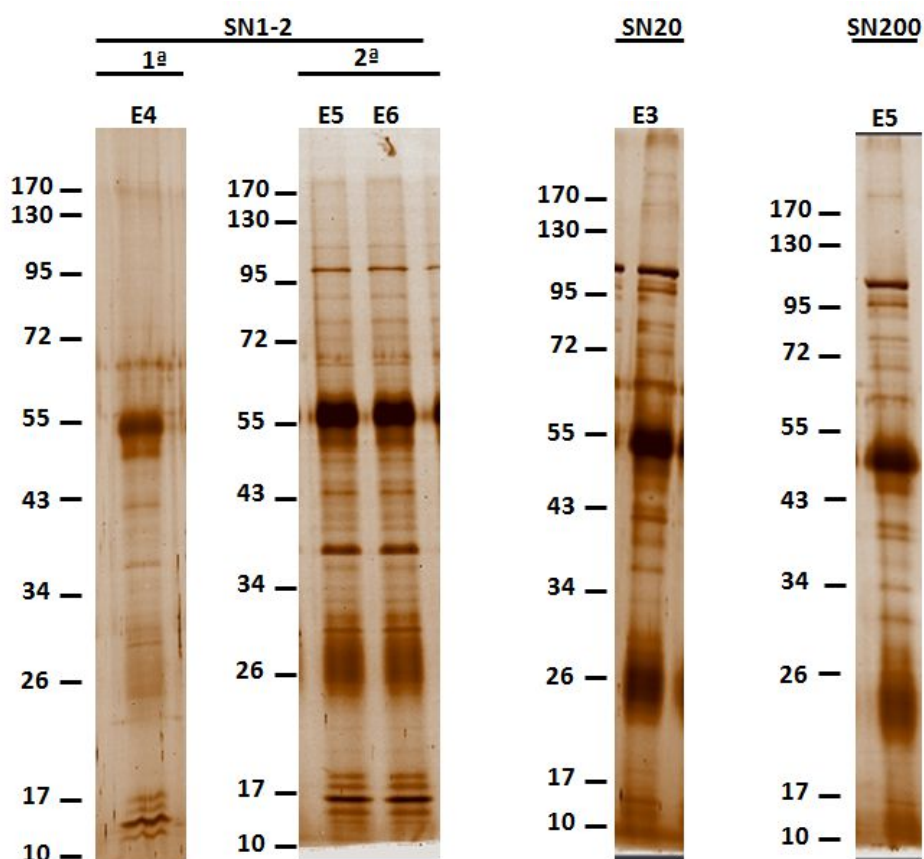
**Figura R.5. Determinació del contingut de CenH3<sup>CID</sup>-TAP (A) i CENP-C (B) en cada sobrenedant i en el *pellet* final.** Es van fer dos gel de poliacrilamida-SDS on es va carregar la mateixa quantitat de cada sobrenedant. Després, per cada gel es va fer un *Western Blot* utilitzant l'anticòs  $\alpha$ -TAP (A) o  $\alpha$ -CENP-C (B) per determinar la quantitat de CenH3<sup>CID</sup>-TAP i CENP-C, respectivament, en cada sobrenedant i en el *pellet* final.

Tenint en compte les nostres observacions, es va optar per fer quatre purificacions independents. En una d'elles es va utilitzar, com a material inicial, la barreja dels sobrenedants SN1 i SN2 (anomenat a partir d'ara com a SN1-2), ja que aquests eren de naturalesa molt similar i representaven aproximadament el 90% de la cromatina total. Un cop finalitzada aquesta primera purificació es va utilitzar aquest mateix SN1-2 per realitzar una segona purificació. En les altres dues purificacions es van utilitzar el SN20 i el SN200, respectivament.

En comptes de fer una purificació per afinitat en tàndem convencional, es va seguir un altre mètode de purificació basant-nos en la interacció de les proteïnes A del

TAP amb les IgG. A grans trets, en cada purificació es va incubar el sobrenedant amb IgGs prèviament unides a unes boletes magnètiques, anomenades *Dynabeads*. En el procés d'incubació només els nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>-TAP i les proteïnes associades a aquests van quedar retingudes a les IgG-*Dynabeads*. A continuació, es van eluir els nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>-TAP i les seves proteïnes associades, trencant la interacció entre les proteïnes A del TAP i les IgG amb una solució àcida. Per cada purificació es van fer varies elucions, ja que en les primeres el pH no era suficientment àcid i no s'eluien les proteïnes.

Un cop finalitzades les purificacions, per cadascuna d'elles es va fer un gel de poliacrilamida-SDS on es va carregar una petita alíquota (10%) de cada elució. Posteriorment, es va tenyir el gel amb tinció de plata per visualitzar les proteïnes i així, poder seleccionar l'elució més enriquida en proteïnes (Figura R.6). En concret, es van seleccionar l'elució 4 de la primera purificació del SN1-2, les elucions 5 i 6 de la segona purificació d'aquest mateix sobrenedant, l'elució 3 de la purificació del SN20 i l'elució 5 de la purificació del SN200.



**Figura R.6. Purificació de les proteïnes associades als nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>-TAP.** Per cada sobrenedant SN1-2, SN20 i SN200 es van purificar els nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>-TAP i les proteïnes associades a aquests. En el cas concret del SN1-2 es van fer dues purificacions. Per cada purificació, es va carregar una alíquota de cada elució en un gel de poliacrilamida-SDS de gradient 9-15%. Les proteïnes van ser visualitzades mitjançant la tinció de plata. Per cadascuna de les purificació es mostra la part del gel que correspon a l'elució seleccionada.

Per les elucions seleccionades, la part restant de l'elució es va carregar en un gel de poliacrilamida-SDS *stacking*, on tota la mostra va quedar compactada en una sola banda. Es va tallar la banda i es va analitzar per LC/MC a la Unitat de Proteòmica de d'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron de Barcelona o bé a la Plataforma de Proteòmica de Parc Científic de Barcelona.

En la taula R.1 es detallen totes les proteïnes identificades, així com els paràmetres més característics de la seva identificació.

<b>Proteïna identificada</b>	<b>Mostra identificada</b>	<b>Mascot Score</b>	<b>Coverage (%)</b>	<b>Nº de pèptids identificats</b>
Histona H4	SN1-2: elució 4	594.5	48.5	11
	SN1-2: elució 5	436.2	54.4	7
Actina	SN200: elució 5	441.5	28.5	7
	SN20: elució 3	197.1	17.8	4
	SN1-2: elució 4	134.7	17.0	3
	SN1-2: elució 5	86.1	9.0	2
Histona H2B	SN1-2: elució 4	422.5	45.5	8
	SN1-2: elució 5	392.1	45.5	8
	SN200: elució 5	129.6	19.5	2
	SN20: elució 3	57.6	16.3	2
<i>Porin</i> , isoforma A	SN1-2: elució 5	371.2	31.2	6
	SN1-2: elució 4	273.4	24.5	6
	SN1-2: elució 6	27.9	21.3	5
CenH3 <sup>CID</sup>	SN1-2: elució 4	303.1	38.2	6
	SN1-2: elució 5	199.9	15.7	4
	SN20: elució 3	83.3	4.7	1
	SN1-2: elució 6	33.3	13.3	3
<i>Lamin</i>	SN20: elució 3	236.8	13.5	4
	SN200: elució 5	230.5	7.1	4
<i>Shrub</i>	SN200: elució 5	222.8	19.9	4
	SN20: elució 3	43.4	3.1	1
Histona H3	SN1-2: elució 5	182.2	22.1	4
	SN1-2: elució 4	134.4	19.9	3
Histona H2A variant	SN1-2: elució 5	174.5	24.1	3
	SN1-2: elució 4	123.8	17.0	2
	SN1-2: elució 6	45.3	20.6	5
Histona H2A	SN1-2: elució 4	167.6	25.8	2
	SN1-2: elució 5	164.3	25.8	1
	SN200: elució 5	69.2	14.3	1
	SN20: elució 3	50.5	14.3	1

**Taula R.1. Llista de les proteïnes identificades en les nostres purificacions ordenades en funció del score de la seva identificació.** En la taula també s'especifiquen altres paràmetres de la seva identificació.



<b>Proteïna identificada</b>	<b>Mostra identificada</b>	<b>Mascot Score</b>	<b>Coverage (%)</b>	<b>Nº de pèptids identificats</b>
<i>Mitochondrial ATP synthase</i>	SN1-2: elució 5	127.3	29.2	3
<i>Lethal (2) 03709, isoforma C</i>	SN1-2: elució 5	125.1	7.4	2
	SN1-2: elució 4	70.6	3.3	1
CG30122, isoforma B	SN1-2: elució 4	120.4	3.0	2
<i>Barrier-to-autointegration factor</i>	SN1-2: elució 4	97.0	16.7	1
	SN1-2: elució 5	84.0	16.7	1
	SN1-2: elució 6	12.8	27.8	2
Hrp48.1	SN1-2: elució 5	91.8	4.2	1
	SN1-2: elució 4	76.3	11.2	1
	SN1-2: elució 6	12.6	7.4	2
ADP/ATP translocasa	SN1-2: elució 4	90.4	5.7	2
<i>Scully</i>	SN1-2: elució 5	90.2	5.9	1
<i>Lethal (2) 37 Cc</i>	SN1-2: elució 5	89.9	9.1	1
	SN1-2: elució 4	54.8	5.9	1
<i>Bj6 protein</i>	SN1-2: elució 5	82.5	2.7	2
	SN1-2: elució 6	3.4	2.7	1
CG8289	SN1-2: elució 5	74.0	7.1	1
	SN1-2: elució 4	49.8	5.1	1
<i>Bellwether</i>	SN1-2: elució 4	69.9	2.2	1
	SN1-2: elució 6	16.5	7.97	4
<i>Ribosomal protein L22</i>	SN1-2: elució 4	69.4	3.8	1
	SN1-2: elució 6	2.3	4.0	1
ATP sintetasa subunitat beta	SN1-2: elució 4	62.1	4.2	2
	SN200: elució 5	43.6	2.6	1
<i>Glorund, isoforma A</i>	SN1-2: elució 5	61.9	1.7	1
<i>Heat shock protein 60</i>	SN1-2: elució 5	61.8	6.1	2
	SN1-2: elució 6	15.9	10.1	4
<i>Heat shock protein cognate 71</i>	SN1-2: elució 4	59.2	1.7	1
<i>Phosphate transporter precursor</i>	SN1-2: elució 4	57.7	3.4	1
<i>Oligomycine sensitivity conferring protein precursor</i>	SN200: elució 5	56.4	8.1	1
CG11999	SN20: elució 3	56.1	5.6	1

Taula R.1. Continuació

<b>Proteïna identificada</b>	<b>Mostra identificada</b>	<b>Mascot Score</b>	<b>Coverage (%)</b>	<b>Nº de pèptids identificats</b>
<i>Signal sequence receptor beta</i>	SN1-2: elució 5	47.4	12.6	1
CG14235	SN200: elució 5	41.2	8.3	1
CG5787	SN1-2: elució 4	40.9	1.9	1
<i>Calreticulin</i>	SN1-2: elució 5	39.9	6.2	1
<i>Target of rapamycin</i>	SN20: elució 3	38.6	0.3	1
	SN200: elució 5	38.2	0.3	1
CG3884, isoform B	SN200: elució 5	38.5	5.9	1
CG4169	SN1-2: elució 5	37.4	4.5	1
<i>Lethal (3) 03670</i>	SN20: elució 3	36.7	7.6	1
Hrb98DE	SN1-2: elució 6	17.1	13.7	5
<i>Heat shock protein 70 cognate 5</i>	SN1-2: elució 6	13.6	6.7	4
Su(var) 205	SN1-2: elució 6	13.6	19.4	3
<i>Chromosomal protein D1</i>	SN1-2: elució 6	5.8	8.5	2
ATP-dependent RNA helicasa p62	SN1-2: elució 6	5.5	2.1	1
ATP sintetasa subunitat gamma	SN1-2: elució 6	4.4	3.7	1
ATP sintetasa subunitat d	SN1-2: elució 6	3.5	7.3	1
<i>Hoip</i>	SN1-2: elució 6	2.6	9.5	1
<i>Structural polyprotein</i>	SN1-2: elució 6	2.4	0.9	1
<i>Protein lingerer</i>	SN1-2: elució 6	2.3	0.9	1
<i>Ribosomal protein L28</i>	SN1-2: elució 6	2.2	5.6	1
<i>Elongation factor 1-alpha</i>	SN1-2: elució 6	2.0	2.3	1
<i>Circadian clock-controlled protein</i>	SN1-2: elució 6	2.0	3.1	1

Taula R.1. Continuació

Com era d'esperar en totes les elucions, a excepció de la del SN200, es va identificar CenH3<sup>CID</sup>. Tanmateix, només en les elucions de les purificacions del SN1-2 es va identificar la resta de histones que conformen l'octàmer. A més, en aquestes mateixes elucions també es va identificar la histona H3 i la variant de la histona H2Av.

Del total de proteïnes identificades, se'n van seleccionar un total de vuit com a possibles candidates basant-nos en els criteris de localització, fenotips dels RNAi, característiques estructurals, bibliografia relacionada, funció dels homòlegs, *score* de les proteïnes i la freqüència de la seva identificació (Taula R.2). Curiosament, les vuit proteïnes seleccionades van ser identificades en les purificacions del SN1-2, suggerint que per aquestes purificacions la identificació havia sigut més bona.

### **Determinació del patró de localització cel·lular de les proteïnes seleccionades**

Per tal de determinar el patró de localització cel·lular de les proteïnes seleccionades, es van obtenir els plasmidis que permeten l'expressió, sota el control del promotor de la metal·lotioneïna, d'aquestes proteïnes fusionades a C-terminal als *tags* FLAG-HA o bé al *tag* TAP. El promotor de la metal·lotioneïna és induïble amb coure, per tant els nivells d'expressió de les proteïnes no són els endògens sinó que estan sobreexpressades.

Així doncs, es van transfectar cèl·lules embrionàries de *Drosophila* SL2 amb aquests plasmidis, i 24 hores més tard es va induir l'expressió de les proteïnes de fusió amb CuSO<sub>4</sub>. Al cap de 48 hores de la transfecció, es van transferir les cèl·lules en cobreobjectes tractats amb concanavalina i es van fer immunolocalitzacions amb anticossos que reconeixien específicament les etiquetes FLAG o TAP.

Es va observar que de les vuit proteïnes, dues presenten un patró exclusivament citoplasmàtic, quatre un patró mixt citoplasmàtic i nuclear i les dues restants només nuclear (Taula R.3 i Figura R.7). Després d'aquest primer experiment, es van descartar les proteïnes *Lethal (2)03709* i CG3612 degut a la seva localització cel·lular preferentment citoplasmàtica.

Tot seguit, només per les proteïnes que presentaven un patró de localització nuclear es va analitzar la seva localització en interfase i en cromosomes mitòtics. Bàsicament, es va seguir el mateix procediment descrit anteriorment: es van transfectar cèl·lules SL2 amb els plasmidis d'interès, a l'endemà es va induir l'expressió de la proteïna amb CuSO<sub>4</sub> i al cap de 48 h de la transfecció es va fer la immunolocalització. No obstant, es van modificar dos aspectes. En primer lloc, en comptes de transferir les cèl·lules en cobreobjectes tractats amb concanavalina, aquestes van ser impactades sobre portaobjectes mitjançant citocentrifugació. Aquesta tècnica permet obtenir nuclis i

Proteïna seleccionada	Score	Coverage (%)	Nº de pèptids identificats	Freqüència d'identificació	Observacions
<i>Lethal (2)03709</i>	125.1	7.4	2	2	Es desconeix la seva funció. RNAi contra aquesta proteïna afecta la citocinesis (Eggert et al., 2004). El seu homòleg humà, Prohibitin 2, protegeix la cohesió de les cromàtides germanes durant la mitosi (Takata et al., 2007).
CG30122	120.4	3.0	2	1	Té un domini SAP, que és un domini putatiu d'unió al DNA. També està relacionada amb el processament dels mRNA (Herold et al., 2009).
<i>Barrier-to-autointegration factor (BAF)</i>	97.0	16.7	1	2	Permet la interacció entre la membrana nuclear i la cromatina. Mutants nuls per <i>baf</i> a <i>Drosophila</i> mostren defectes mitòtics (Furukawa et al., 2003). RNAi contra BAF a <i>C. elegans</i> produeix problemes en la segregació cromosòmica durant la mitosi (Zheng et al., 2000).
Hrp48	91.8	4.2	1	2	RNAi contra aquesta proteïna afecta la citocinesis (Eggert et al., 2004). RNAi contra aquesta conjuntament amb RNAi contra CdC27, subunitat de l'APC/C, afecta l'alineament dels cromosomes en la placa metafàsica (Goshima et al., 2007). Intervé en la regulació del processament dels mRNA, via spliceosoma (Blanchette et al., 2009).
CG8289	74.0	7.1	1	2	Té un putatiu domini cromosòmic que permetria la interacció amb la cromatina. Es desconeix la seva funció.
<i>Bellwether</i>	69.9	2.2	1	2	Malgrat que la seva funció predita és ser una subunitat de l'ATP sintetasa s'ha identificat en 2 purificacions independents.
<i>Ribosomal protein L22 (RpL22)</i>	69.4	3.8	1	2	En <i>Drosophila</i> està associada a la cromatina i té un rol similar al de la histona H1 (Ni et al., 2006).
<i>Glorund</i> , isoform A	61.9	1.7	1	1	Forma un complex amb Hrp48 i també intervé en la regulació del processament dels mRNA (Kalifa et al., 2009).

**Taula R.2. Llista de les proteïnes seleccionades.** En la taula també s'especifica els paràmetres de la seva identificació i algunes observacions referents a cadascuna d'elles.

<b>Patró de localització</b>		
<b>Citoplasmàtic</b>	<b>Nuclear</b>	<b>Citoplasmàtic i nuclear</b>
CG3612 <i>Lethal (2)03709</i>	BAF CG30122	RpL22 <i>Glorund</i> Hrp48 CG8289

**Taula R.3. Classificació de les proteïnes seleccionades segons el seu patró de localització cel·lular**

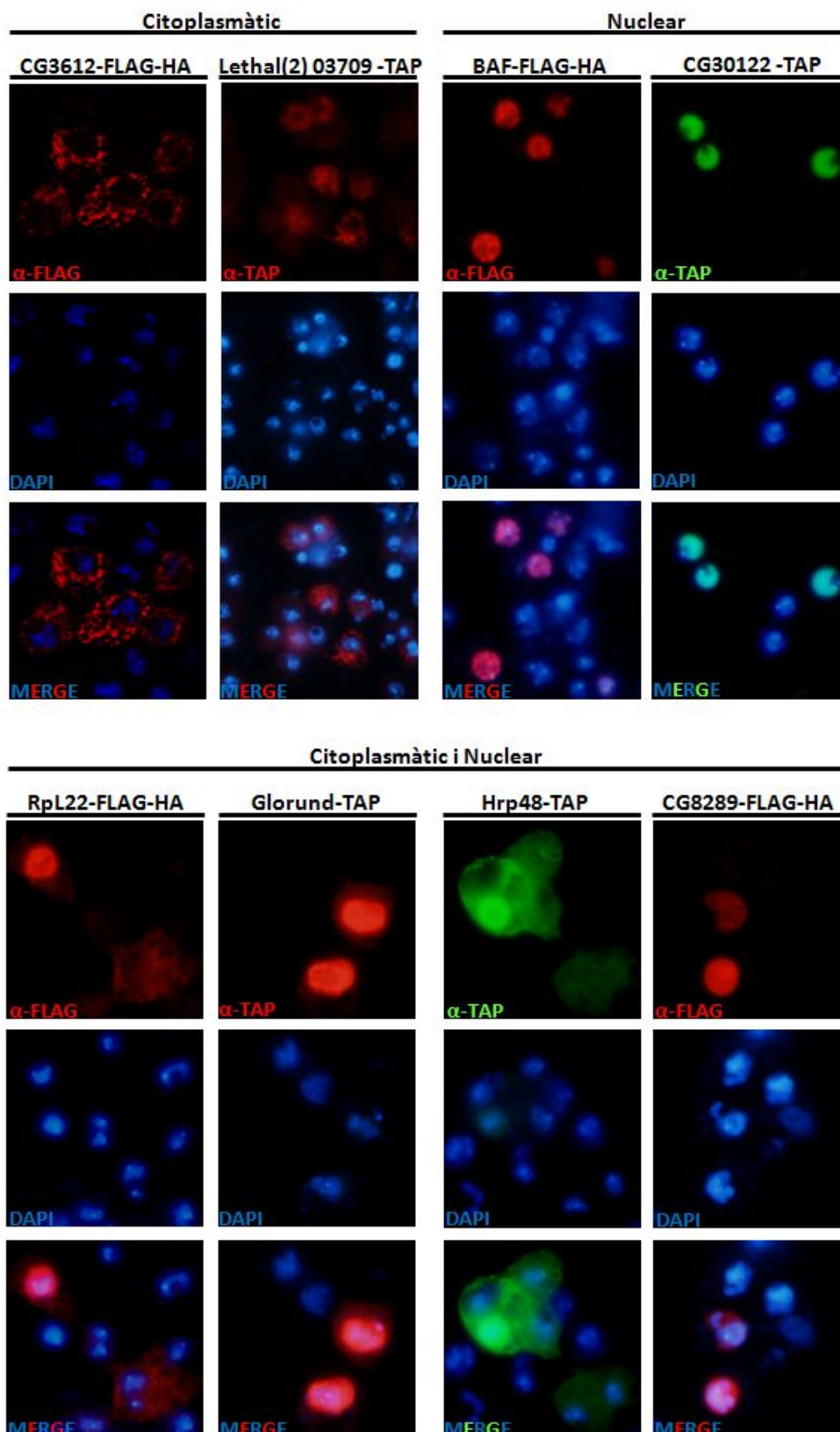
cromosomes mitòtics de més bona qualitat. En segon lloc, a més de la immunolocalització de les proteïnes de fusió, es va realitzar la co-immunodetecció de la proteïna centromèrica CENP-C, per tal indicar la posició dels centròmers en la cromatina i així poder estudiar la relació de les proteïnes de fusió amb els centròmers.

En les Figures R.8-R.10 es pot observar que les proteïnes de fusió Hrp48-TAP, *Glorund*-TAP i CG30122-TAP presenten un patró puntejat per tot el nucli que no colocalitza amb el senyal de CENP-C en interfase. A més, en els cromosomes mitòtics tampoc es detecta senyal per aquestes proteïnes de fusió.

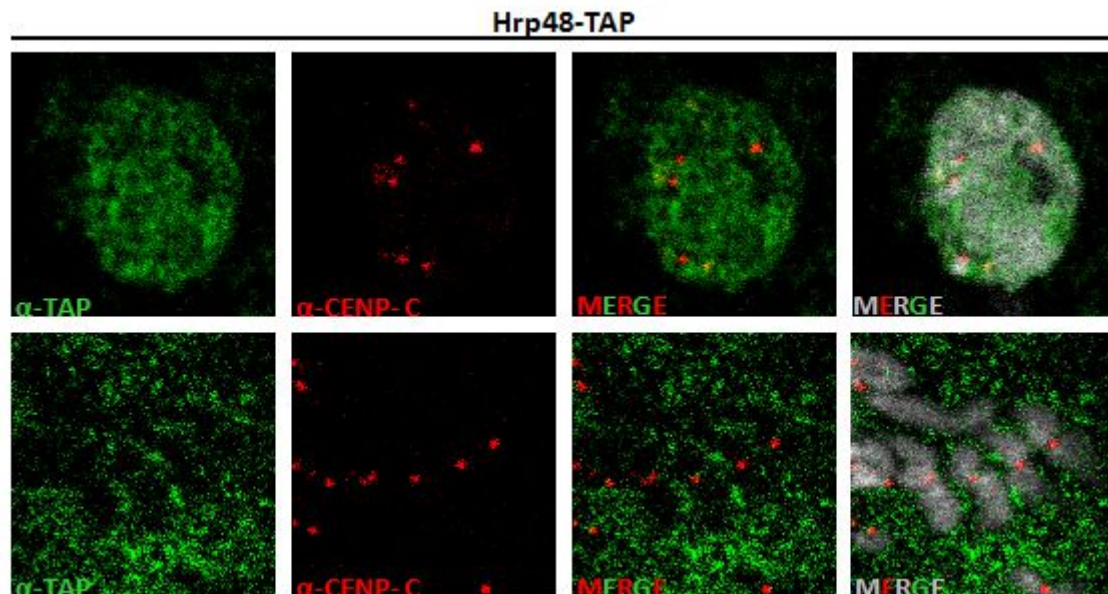
Per altra banda, les proteïnes CG8289-FLAG-HA i RpL22-FLAG-HA en interfase s'acumulen al voltat dels centròmers. En canvi, en els cromosomes mitòtics no es detecta senyal específica per aquestes proteïnes (Figures R.11 i R.12).

Finalment, la proteïna de fusió BAF-FLAG-HA presenta en interfase una patró puntejat que no colocalitza amb el senyal de CENP-C (Figura R.13). No obstant, curiosament, en alguns cromosomes mitòtics s'observa senyal de BAF-FLAG-HA molt proper al de CENP-C.

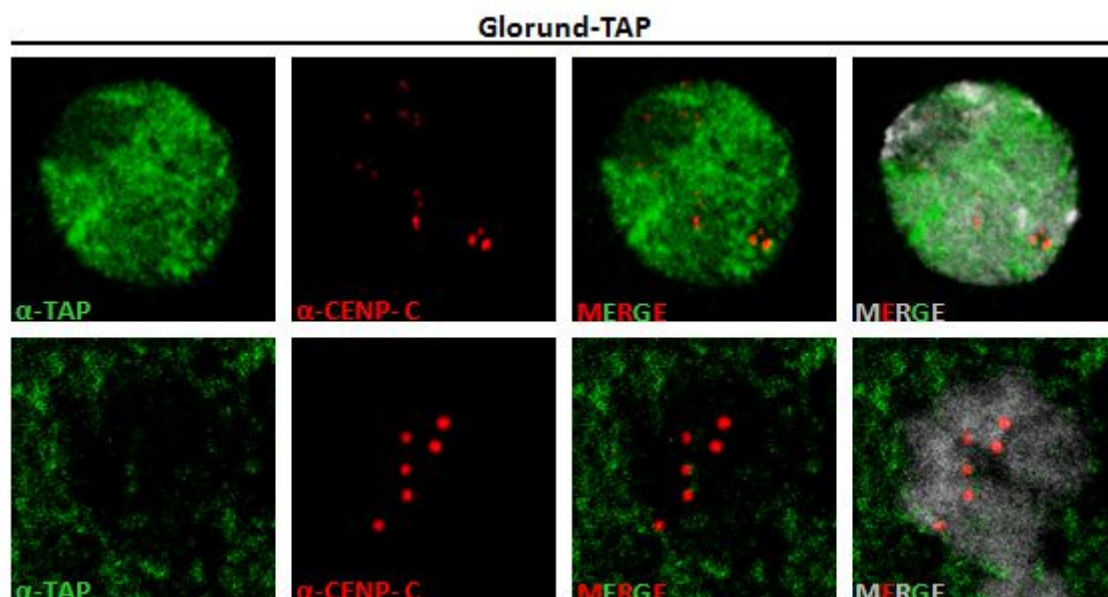
Així doncs, aquestes darreres observacions van fer que l'estudi de les proteïnes CG8289, RpL22 i BAF fos molt atractiu, ja que en interfase o bé en mitosi estan relacionades amb els centròmers. Tanmateix, en aquest treball vam seguir amb la caracterització de la proteïna codificada pel gen CG8289. Donat que aquesta proteïna no té un nom específic la vam anomenar proteïna CG8289.



**Figura R.7. Patró de localització cel·lular de les proteïnes seleccionades.** Expressió transitòria de les proteïnes fusionades als *tags* FLAG-HA o TAP a C-terminal i posterior determinació de la seva localització en cèl·lules en interfase adherides a cobreobjectes amb concanavalina mitjançant la immunotinció amb  $\alpha$ -FLAG o  $\alpha$ -TAP (verd o vermell). El DNA està tenyit amb DAPI (blau).

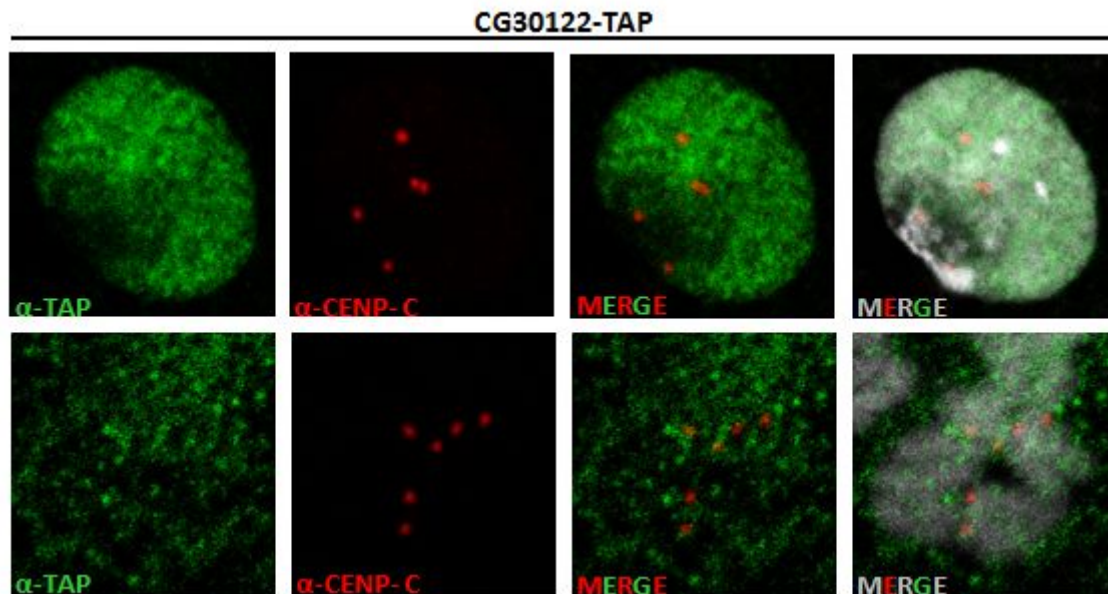


**Figura R.8. Patró de localització de la proteïna Hrp48-TAP.** Expressió transitòria de la proteïna Hrp48 fusionada al *tag* TAP a C-terminal i posterior determinació de la seva localització en nuclis en interfase i en cromosomes mitòtics mitjançant la immunotinció amb  $\alpha$ -TAP (verd) i  $\alpha$ -CENP-C (vermell). El DNA està tenyit amb DAPI (gris).

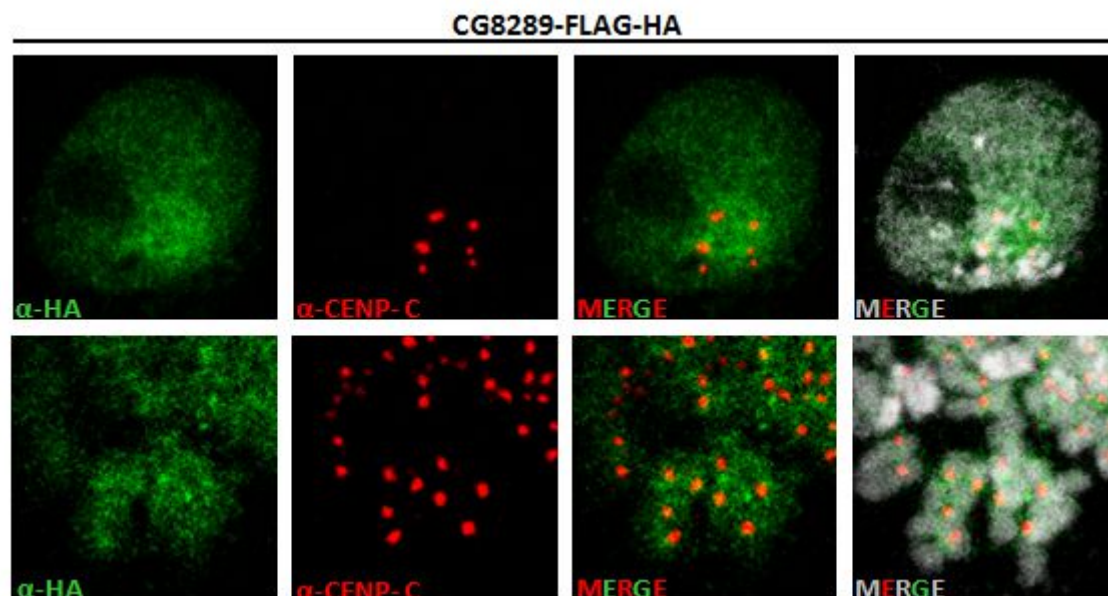


**Figura R.9. Patró de localització de la proteïna Glorund-TAP.** Expressió transitòria de la proteïna Glorund fusionada al *tag* TAP a C-terminal i posterior determinació de la seva localització en nuclis en interfase i en cromosomes mitòtics mitjançant la immunotinció amb  $\alpha$ -TAP (verd) i  $\alpha$ -CENP-C (vermell). El DNA està tenyit amb DAPI (gris).



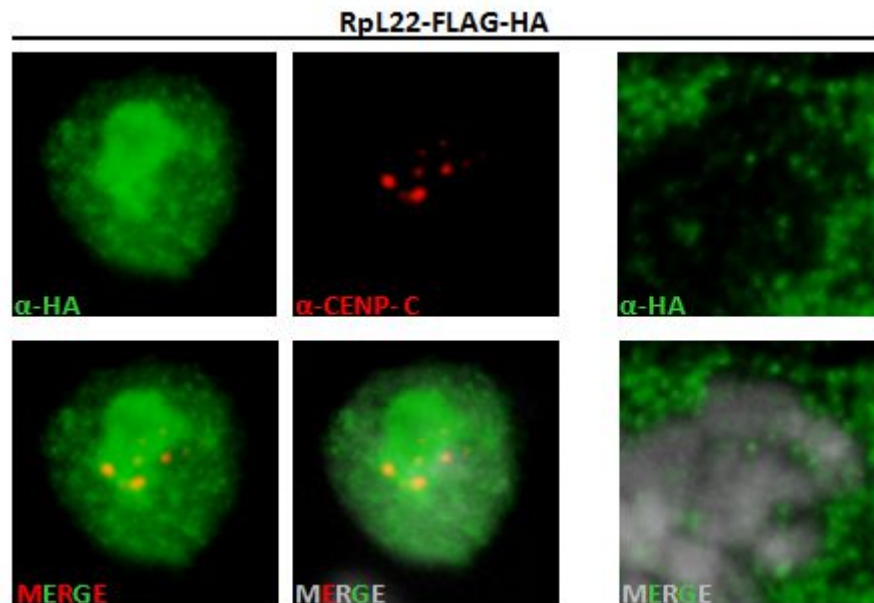


**Figura R.10. Patró de localització de la proteïna CG30122-TAP.** Expressió transitòria de la proteïna codificada pel gen CG30122 fusionada al *tag* TAP a C-terminal i posterior determinació de la seva localització en nuclis en interfase i en cromosomes mitòtics mitjançant la immunotinció amb  $\alpha$ -TAP (verd) i  $\alpha$ -CENP-C (vermell). El DNA està tenyit amb DAPI (gris).

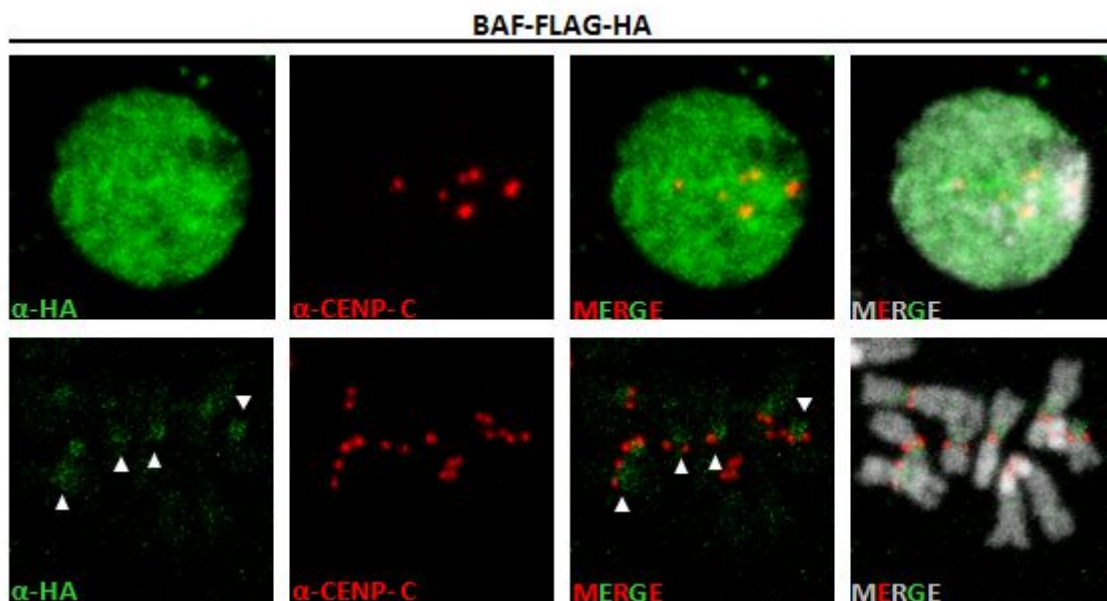


**Figura R.11. Patró de localització de la proteïna CG8289-FLAG-HA.** Expressió transitòria de la proteïna codificada pel gen CG8289 fusionada als *tags* FLAG-HA a C-terminal i posterior determinació de la seva localització en nuclis en interfase i en cromosomes mitòtics mitjançant la immunotinció amb  $\alpha$ -HA (verd) i  $\alpha$ -CENP-C (vermell). El DNA està tenyit amb DAPI (gris).





**Figura R.12. Patró de localització de la proteïna RpL22-FLAG-HA.** Expressió transitòria de la proteïna RpL22 fusionada als *tags* FLAG-HA a C-terminal i posterior determinació de la seva localització en nuclis en interfase i en cromosomes mitòtics mitjançant la immunotinció amb  $\alpha$ -HA (verd) i  $\alpha$ -CENP-C (vermell). El DNA està tenyit amb DAPI (gris).



**Figura R.13. Patró de localització de la proteïna BAF-FLAG-HA.** Expressió transitòria de la proteïna BAF fusionada als *tags* FLAG-HA a C-terminal i posterior determinació de la seva localització en nuclis en interfase i en cromosomes mitòtics mitjançant la immunotinció amb  $\alpha$ -HA (verd) i  $\alpha$ -CENP-C (vermell). El DNA està tenyit amb DAPI (gris). Les fletxes indiquen l'acumulació de BAF-FLAG-HA propera als centròmers.

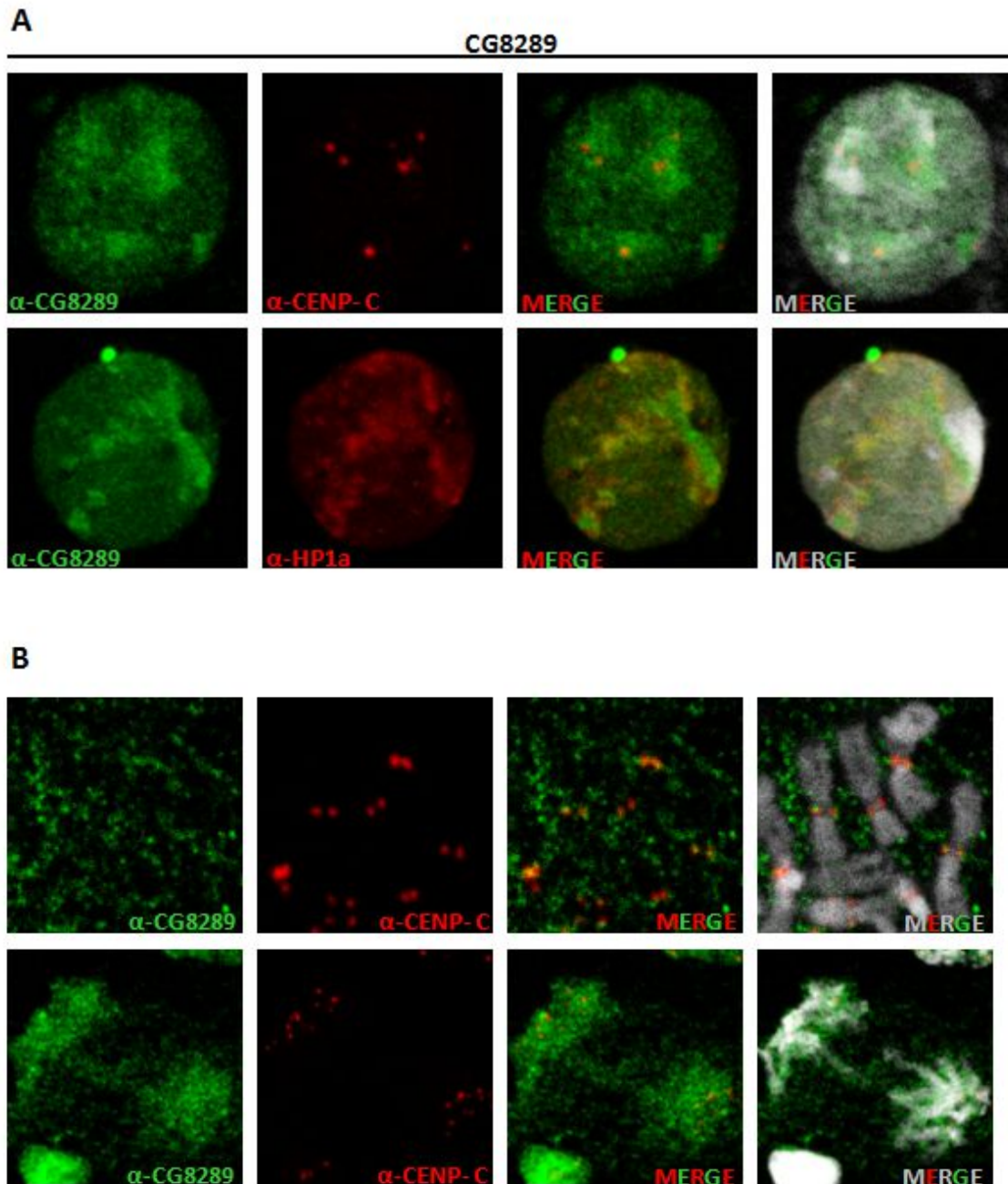
## Localització de la proteïna codificada pel gen **CG8289** a cèl·lules **SL2**

El patró de localització de la proteïna codificada pel gen *CG8289* descrit fins el moment s'havia obtingut mitjançant transfeccions transitòries en cèl·lules SL2 i sobreexpressant la proteïna *CG8289-FLAG-HA*. Per tant, hi havia la possibilitat que el patró de localització fos degut a la sobreexpressió de la proteïna de fusió.

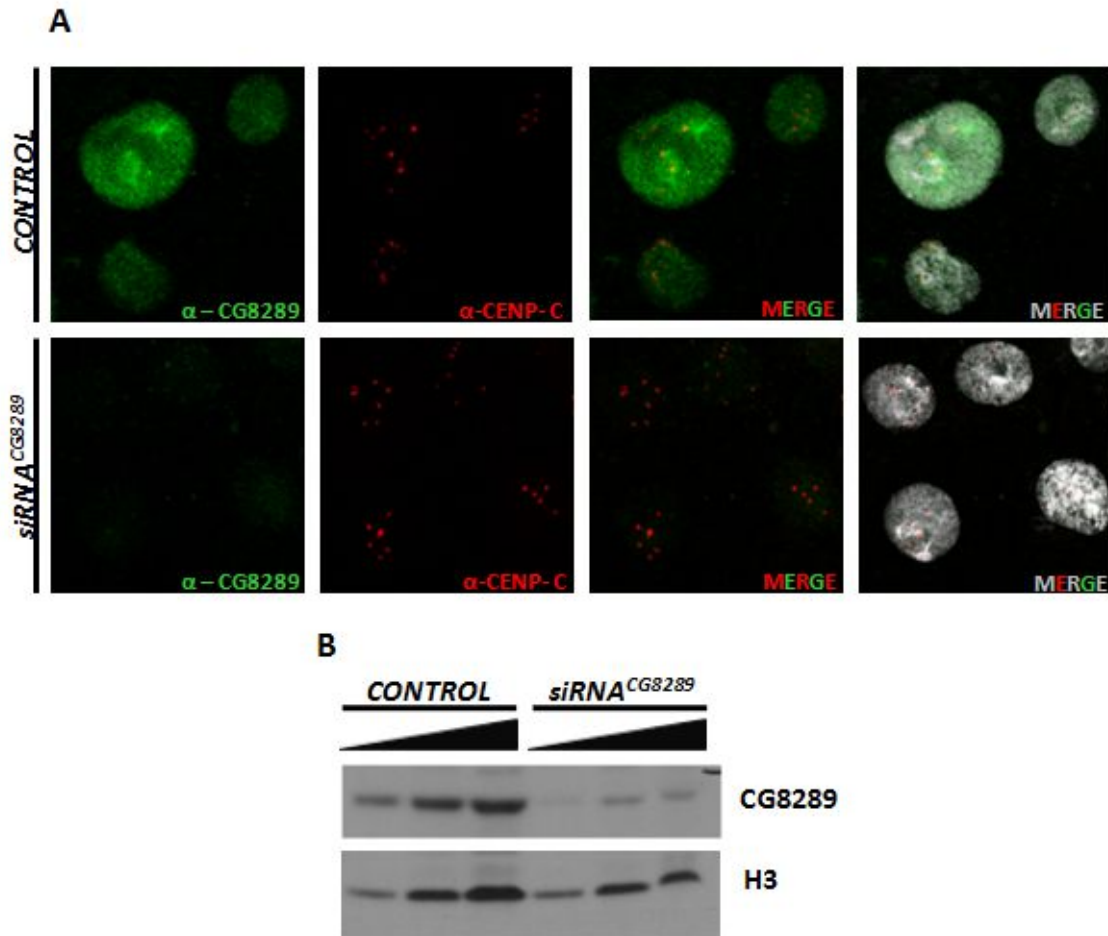
Per analitzar aquesta possibilitat, es va determinar el patró de localització de la proteïna *CG8289* endògena a cèl·lules SL2. En primer lloc, es van generar anticossos policlonals específics contra aquesta proteïna en conills. A continuació, es van impactar cèl·lules SL2 en portaobjectes i posteriorment es va fer la co-immunodetecció amb l'anticòs  $\alpha$ -*CG8289* i amb  $\alpha$ -CENP-C o  $\alpha$ -HP1a. Com es pot observar a la Figura R.14.A, en els nuclis en interfase es reproduïa el patró observat anteriorment per la proteïna de fusió, *CG8289-FLAG-HA* (veure Figura R.11); la proteïna s'acumula en regions properes als centròmers. A més, aquestes acumulacions colocalitzen sovint amb el senyal per la proteïna HP1a. En mitosi, en cromosomes metafàsics és difícil determinar si la proteïna es localitza en els centròmers ja que l'anticòs  $\alpha$ -*CG8289* dóna molt senyal de fons. En canvi, en cromosomes anafàsics clarament la proteïna es troba dispersa per tota la cromatina (Figura R.14.B).

Com s'ha mencionat anteriorment, la proteïna *CG8289* es caracteritza per presentar un domini cromò, amb força homologia amb el de les diferents isoformes de HP1. Per tant, tenint en compte que l'anticòs  $\alpha$ -*CG8289* s'havia generat contra tota la proteïna *CG8289* fusionada a C-terminal a una cua d'histidines, hi havia la possibilitat que aquest anticòs estès reconeixent les isoformes de HP1.

Per determinar l'especificitat de l'anticòs, es van tractar cèl·lules SL2 amb dsRNA de *CG8289* durant 7 dies. Transcorregut aquest temps, es van recollir les cèl·lules i se'n va agafar una petita alíquota per impactar en portaobjectes i realitzar co-immunolocalitzacions amb els anticossos  $\alpha$ -*CG8289* i  $\alpha$ -CENP-C. Amb les cèl·lules restants es van preparar extractes proteics i es va comparar el contingut de la proteïna *CG8289* en aquest extracte respecte un extracte control mitjançant *Western Blot*. Es va utilitzar com a mostra control l'extracte proteic obtingut a partir de cèl·lules SL2 tractades amb dsRNA de *lacZ*, gen absent en el genoma de *Drosophila*, durant 7 dies. Tant per *Western Blot* com per immunofluorescència es va observar una disminució significativa dels nivells d'expressió de *CG8289* en les cèl·lules tractades amb dsRNA contra aquesta proteïna, confirmant que el nostre anticòs reconeix específicament la proteïna *CG8289* en cèl·lules SL2. (Figura R.15).



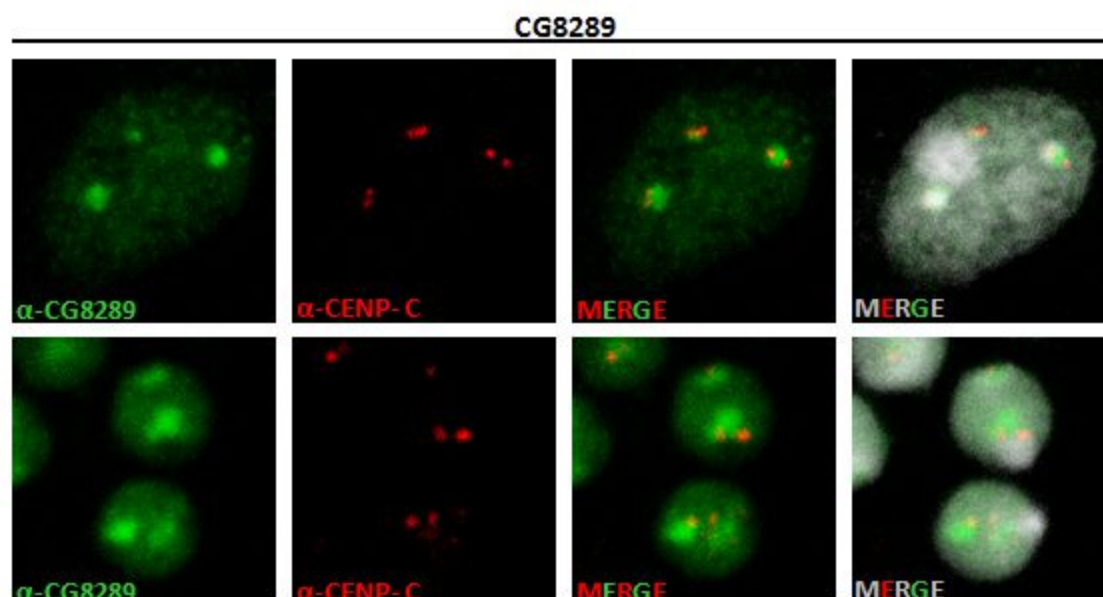
**Figura R.14. Patró de localització de la proteïna codificada pel gen *CG8289* en interfase (A) i en mitosi (B).** (A) Es mostra el patró de localització de la proteïna CG8289 endògena (verd) i CENP-C o HP1a (vermell) en nuclis en interfase de cèl·lules SL2. (B) En cromosomes metafàsics (primera fila) és difícil determinar si realment la proteïna CG8289 (verd) colocalitza amb CENP-C (vermell), ja que l'anticòs  $\alpha$ -CG8289 dóna molt soroll de fons. En canvi, en cromosomes anafàsics (segona fila) es detecta senyal de CG8289 difosa pels cromosomes. El DNA està tenyit amb DAPI (gris).



**Figura R.15. L'anticòs  $\alpha$ -CG8289 reconeix específicament la proteïna codificada pel gen *CG8289* a cèl·lules SL2.** (A) El patró de localització de la proteïna CG8289 va ser determinat mitjançant la immunotinció amb els anticossos  $\alpha$ -CG8289 (verd) i  $\alpha$ -CENP-C (vermell) en cèl·lules SL2 tractades amb dsRNA de *lacZ* (control) o de *CG8289* durant una setmana. El DNA està teñit amb DAPI (gris). (B) El contingut de la proteïna CG8289 va ser analitzat per *Western Blot* utilitzant els anticossos  $\alpha$ -CG8289 i  $\alpha$ -H3 en extractes proteics preparats a partir de les cèl·lules SL2 tractades amb dsRNA de *lacZ* (control) o de *CG8289* durant una setmana. La histona H3 es va utilitzar com a control de càrrega. En tots dos casos es van analitzar quantitats creixents dels extractes.

### Localització de la proteïna codificada pel gen *CG8289* a neuroblastos

A continuació, es va determinar el patró de localització d'aquesta proteïna en neuroblastos preparats a partir de cervells de larves *wild-type* en estadi 3. En realitat, després de fer *l'squash* als cervells, en la preparació hi ha una barreja de diferents tipus de cèl·lules del cervell, essent les cèl·lules més grosses els neuroblastos. No obstant, tant en els neuroblastos com en les cèl·lules que deriven d'aquests es va observar un patró molt curiós, petites acumulacions de la proteïna CG8289 que tenen associades un o dos clústers de CENP-C (Figura R.16).



**Figura R.16. Patró de localització de la proteïna codificada pel gen *CG8289* a neuroblastos** (A) Es mostra el patró de localització de CG8289 (verd) i CENP-C (vermell) en neuroblastos (fila de dalt) i en altres cèl·lules del sistema nerviós central (fila de baix) de larves en estadi 3 de *Drosophila*. Per tots dos tipus de cèl·lules s'observa petites acumulacions de la proteïna que tenen associades un o dos clústers de CENP-C. El DNA està tenyit amb DAPI (gris).

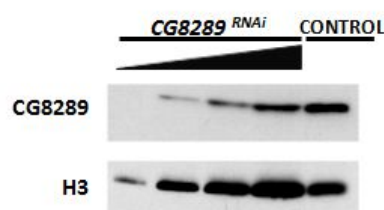
Per determinar l'especificitat de l'anticòs en neuroblastos, es va utilitzar el sistema Gal4/UAS. Aquest sistema permet expressar específicament en determinats teixits o bé ubiquament per tota la larva, en funció del *driver* utilitzat, el constructe desitjat. Concretament, es van creuar femelles que expressen *Gal4* sota el control del promotor d'*actina* amb mascles que expressen *hairpins* de RNA contra el *CG8289* sota el control de les seqüències UAS. Quan els dos constructes coincidien en el mateix organisme, l'expressió de *Gal4* induïa l'expressió dels *hairpins* de RNA els quals eren processats per donar siRNAs i aquests darrers induïen la degradació específica del RNA missatger de *CG8289*.

Per analitzar si realment aquest sistema induïa una disminució dels nivells d'expressió de *CG8289*, en primer lloc, es van dissecar els cervells, els discos imaginals i les glàndules salivals de larves mutants per *CG8289* en estadi 3. A partir d'aquests teixits es va obtenir un extracte proteic. Paral·lelament, es va fer al mateix partint de larves control del creuament. Tot seguit, mitjançant *Western Blot* es va comprovar que hi havia una disminució dels nivells totals de la proteïna CG8289 en l'extracte de larves mutants per *CG8289* respecte l'extracte de les larves control (Figura R.17).

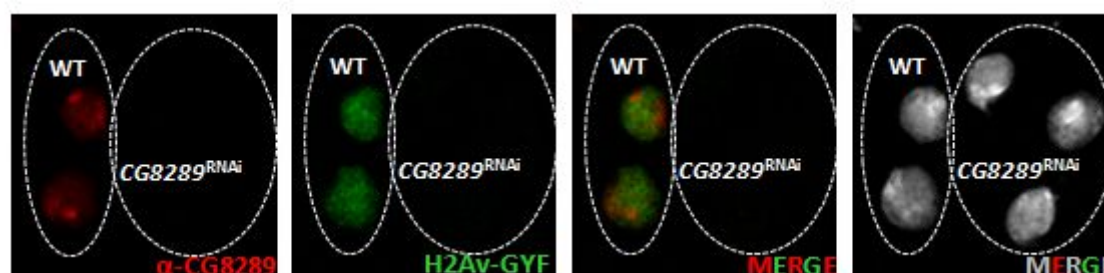
Un cop comprovat que en les larves mutants es deplecionava CG8289, es van preparar neuroblastos a partir d'aquestes larves. En realitat, en el mateix portaobjectes es van barrejar cervells de larves mutants amb els de les larves controls per poder comparar en el mateix portaobjectes les dues condicions. Com a larves controls es van



utilitzar larves que expressen ubiquament la histona H2Av fusionada a C-terminal al GFP. A continuació, es van realitzar immunolocalitzacions amb l'anticòs  $\alpha$ -CG8289. En la Figura R.18 s'observa que en els neuroblastos derivats de les larves control es detectava el mateix patró descrit anteriorment; petites acumulacions de la proteïna. En canvi, pels neuroblastos derivats de la condició mutant no es detecta cap senyal. Així doncs, el patró observat per la proteïna codificada pel gen *CG8289* a neuroblastos *wild-type* és específic i no es deu al reconeixement d'altres proteïnes amb domini crom.



**Figura R.17. L'expressió del *hairpin* de RNA contra *CG8289* indueix la depleció de *CG8289* a nivell de tota la larva.** El contingut de *CG8289* va ser analitzat per *Western Blot* utilitzant els anticossos  $\alpha$ -*CG8289* i  $\alpha$ -H3 en extractes proteics preparats a partir de glàndules salivals, discs imaginals i cervells de larves mutants *CG8289<sup>RNAi</sup>*, *Act5C-GAL4* i larves control. En el cas concret de les larves mutants es van analitzar quantitats creixents de l'extracte. La histona H3 es va utilitzar com a control de càrrega.



**Figura R.18. El senyal de *CG8289* a neuroblastos amb l'anticòs  $\alpha$ -*CG8289* és específic.** El patró de localització de la proteïna *CG8289* va ser determinat mitjançant la immunotinció amb  $\alpha$ -*CG8289* (vermell) i  $\alpha$ -GFP (verd) en neuroblastos preparats a partir de larves mutants *CG8289<sup>RNAi</sup>*, *Act5C-GAL4* i larves control que expressen ubiquament la histona H2Av-GFP. El DNA està tenyit amb DAPI (gris). En verd es mostra el senyal de la proteïna de fusió H2Av-GFP, indicant els neuroblastos control.

### Localització de la proteïna *CG8289* a cromosomes politènics

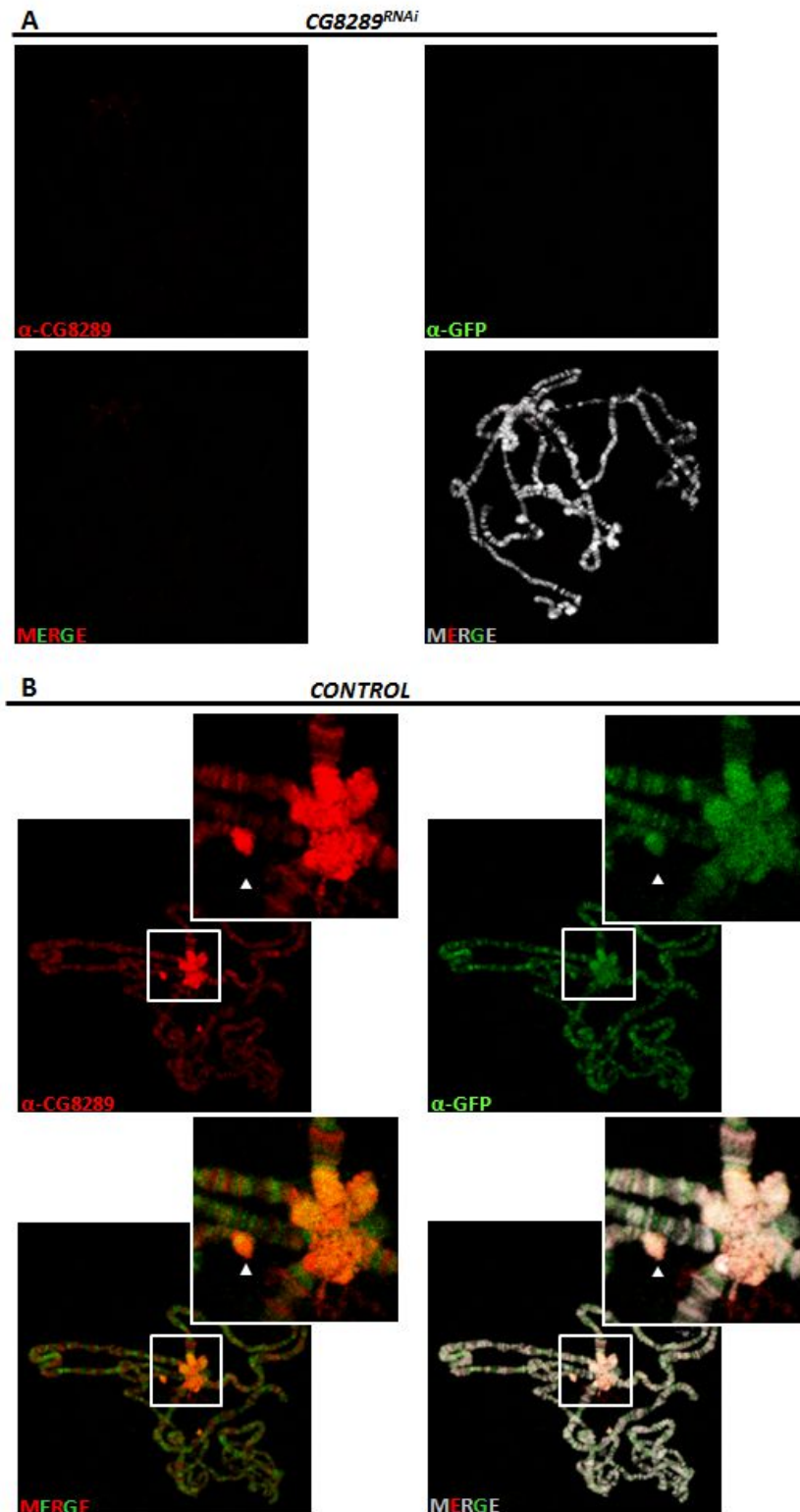
D'altra banda, per descriure en quines regions de la cromatina s'uneix la proteïna *CG8289* es van realitzar assajos d'immunolocalitzacions a cromosomes politènics de *Drosophila*. Aquests tipus de cromosomes es van obtenir a partir de les glàndules salivals de larves *wild-type* en estadi 3. En concret, durant el desenvolupament de les larves, les cèl·lules de les glàndules salivals no es divideixen, estan permanentment en interfase i els seus cromosomes encadenen rondes repetitives de replicació sense separar-se, originant cromosomes politènics. Estructuralment, aquest cromosomes es caracteritzen

per tenir els cromosomes homòlegs aparellats, presentar un patró de bandes i interbandes característic, i per l'associació de les regions heterocromàtiques properes al centròmer de cada cromosoma, formant un cromocentre. Tal i com es pot observar en la Figura R.19, en aquest tipus de cromosomes la proteïna CG8289 es localitza bàsicament a les regions heterocromàtiques, cromocentre i les bandes dels braços del cromosomes. Les bandes corresponen a les regions de cromatina inactiva que degut al plegament que adopten són tenyides intensament pel DAPI.



**Figura R.19. Patró de localització de la proteïna CG8289 a cromosomes politènics.** El patró de localització de la proteïna CG8289 va ser determinat mitjançant la immunotinció amb  $\alpha$ -CG8289 (vermell) en cromosomes politènics preparats a partir de larves *wild-type*. La fletxa indica la posició del cromocentre que està tenyit intensament per CG8289. A més augments, es mostra el patró d'immunolocalització de CG8289 que es localitza a les bandes dels braços dels cromosomes. El DNA és tenyit amb DAPI (gris).

Per determinar si el patró observat per la proteïna CG8289 en els cromosomes politènics és específic, es va seguir una estratègia similar a la realitzada pels neuroblastos. Es van barrejar en el mateix portaobjectes glàndules salivals de larves mutants per CG8289 i de larves control que expressaven ubiquament la proteïna H2Av-GFP. Un cop obtinguts els cromosomes politènics, es van realitzar immunolocalitzacions amb  $\alpha$ -CG8289. Mentre que pels cromosomes de les larves mutants no es detectava senyal per la proteïna, en els cromosomes de les larves control es reproduïa el patró observat prèviament (Figura R.20). És a dir, s'observava senyal de la proteïna en el cromocentre i en les bandes dels braços dels cromosomes. A més, també es va detectar senyal de CG8289 en els telòmers. Per tant, els nostres resultats suggereixen que la proteïna CG8289, es localitza bàsicament a l'heterocromatina constitutiva, telòmers i centròmers, i l'heterocromatina intercalada en els braços dels cromosomes.



**Figura R.20. La proteïna CG8289 és localitzada a l'heterocromatina constitutiva, centròmers i telòmers.** El patró de localització de CG8289 va ser determinat mitjançant la immunotinció amb  $\alpha$ -CG8289 (vermell) i  $\alpha$ -GFP (verd) en cromosomes politènics preparats a partir de larves mutants *CG8289<sup>RNAi</sup>*, *Act5C-GAL4* (A) i larves control (B), que expressen ubiquament la histona H2Av-GFP (verd). El DNA està tenyit amb DAPI (gris). En verd es mostra la senyal de la proteïna de fusió H2Av-GFP, indicant els cromosomes politènics control. La fletxa senyala la localització de CG8289 en els telòmers.



## DISCUSSIÓ

En aquest treball vam realitzar quatre purificacions de les proteïnes associades als nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>-TAP, partint en cadascuna d'elles de diferents extractes nucleosomals SN1-2, S20 i S200. En total, en les nostres purificacions es van identificar 50 proteïnes, entre elles la proteïna *bait*, CenH3<sup>CID</sup>. No obstant, per la purificació del S200 no es va identificar CenH3<sup>CID</sup> i per la del S20 sí que es va identificar el *bait*, però no la totalitat de histones que integren el nucleosoma, suggerint que per aquests sobrenedant la purificació i identificació no havia sigut tant bona. De fet, això era d'esperar si es té en compte que el contingut de cromatina en aquests extractes era molt baix, el 12% de la cromatina inicial pel SN20 i només el 9% en el SN200. En canvi, en les purificacions de l'extracte SN1-2, que el seu contingut en cromatina representava aproximadament el 90% de la cromatina inicial, sí que es va identificar la totalitat d'histones que integren el nucleosoma de CenH3<sup>CID</sup>, posant de manifest la qualitat d'aquestes purificacions.

En les purificacions d'aquest extracte SN1-2 també es va identificar la histona H3 canònica. Tenint en compte que a *Drosophila* els nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup> són homotípics, no contenen mescla de histona H3 i CenH3<sup>CID</sup> (Blower et al., 2002; Zhang et al., 2012), i que en els nostres extractes nucleosomals hi ha una mescla de mono, di, tri i tetranucleosomes, hi ha varies possibilitats per explicar l'origen de la histona H3 identificada. Una primera possibilitat és que aquesta provingui dels blocs de nucleosomes de H3 interposats amb els que contenen CenH3<sup>CID</sup> en el domini central del centròmer de *Drosophila* (Blower et al., 2002). Una segona possibilitat és que per proximitat s'hagin purificat nucleosomes que contenen la histona H3 de l'heterocromatina pericentromèrica.

En les nostres purificacions no es van detectar algunes de les proteïnes centromèriques de *Drosophila* descrites prèviament. És molt probable que això sigui degut a que les condicions aplicades durant la purificació hagin trencat la interacció dèbil d'aquestes amb la cromatina. També pot ser degut a que sovint la interacció d'aquestes amb la cromatina està regulada al llarg del cicle cel·lular, com per exemple pels components del cinetocor extern que només es localitzen en els centròmers durant la mitosi. Per tant, tenint en compte que el nostre extracte cel·lular de partida s'havia preparat a partir d'un cultiu asincrònic de cèl·lules SL2 i que en aquestes condicions només el 2-5 % del cultiu està en mitosi, és normal la no identificació de components del cinetocor extern.

En aquestes purificacions tampoc vam identificar cap proteïna ortòloga a les del CCAN descrites en altres eucariotes. De fet, en un treball recent de Barth et al., 2014, on utilitzen una estratègia similar a la nostra, tampoc n'identifiquen cap, suggerint que a *Drosophila* l'estructura del cinetocor és més simple i que les proteïnes del CCAN no estan conservades en aquest organisme model.

Del total de 50 proteïnes identificades, se'n van seleccionar vuit com a possibles candidates a l'estudi, basant-nos en la bibliografia publicada i en la robustesa de la seva identificació. De fet, totes les proteïnes seleccionades van ser identificades també en el treball de Barth et al., 2014. No obstant, en aquest treball no van continuar estudiant-les perquè, tot i que algunes estaven enriquides en les purificacions de la cromatina centromèrica, es van detectar també en les purificacions control. Tanmateix, el nostre anàlisi del patró de localització cel·lular per aquestes vuit proteïnes seleccionades va confirmar que com a mínim tres d'elles estan relacionades directament amb la cromatina centromèrica ja sigui en interfase o bé en mitosi. En concret, vam observar que les proteïnes de fusió CG8289-FLAG-HA i RpL22-FLAG-HA en interfase formen acumulacions properes als clústers de CENP-C. En canvi, en cromosomes mitòtics no es va detectar senyal específica per aquestes proteïnes. Per altra banda, per la proteïna de fusió BAF-FLAG-HA, mentre que en interfase s'observava un patró puntejar difús per tot el nucli, en cromosomes metafàsics es va detectar l'acumulació de la proteïna propera als centròmers. Així doncs, encara que aquestes observacions suggerien que l'estudi d'aquestes tres proteïnes era molt atractiu, es va decidir continuar l'estudi només amb dues d'elles, la proteïna BAF (veure capítol 2) i la codificada pel gen *CG8289*.

A continuació, es va determinar el patró de localització de la proteïna *CG8289* en cèl·lules SL2, mitjançant experiments d'immunolocalització utilitzant l'anticòs generat que reconeix específicament aquesta proteïna. Bàsicament, es reproduïa el patró descrit per la proteïna de fusió *CG8289-FLAG-HA* en interfase, la proteïna s'acumula en regions molt properes als clústers de CENP-C. Aquestes acumulacions sovint colocalitzen amb el senyal d'HP1a, indicant que la proteïna *CG8289* és localitza, entre altres regions, a l'heterocromatina centromèrica. En canvi, en mitosi, concretament en cromosomes metafàsics, no vam poder detectar una associació directa d'aquesta proteïna amb els centròmers. Per tant, la proteïna *CG8289* com altres components de la heterocromatina pericentromèrica en iniciar-se la mitosi seria eliminada d'aquesta regió i reclutada en altres regions o bé dispersa en el nucleoplasma (Carmena et al., 2012). En cromosomes anafàsics tampoc es va observar una relació entre la proteïna i els centròmers, ja que aquesta es localitza dispersa per tota la cromatina.

Per altra banda, en neuroblastos en interfase obtinguts a partir de cervells de larves en estadi tres de *Drosophila* es va observar un patró bastant similar a l'observat a cèl·lules SL2; acumulacions de la proteïna que tenen associats un o dos clústers de CENP-C. En conjunt, les nostres observacions suggereixen un possible paper de la proteïna *CG8289* en la formació/estabilització dels clústers dels centròmers i/o en l'associació d'aquests amb determinades estructures del nucli com ara la membrana nuclear o bé el nuclèol. Donat que la funció concreta per la proteïna *CG8289* es desconeix, seria molt interessant analitzar aquesta possibilitat.

En darrer lloc, per caracteritzar amb més detall la interacció de la proteïna CG8289 amb la cromatina es van fer estudis d'immunolocalització a cromosomes politènics. En concret, vam observar que, tot i que la proteïna CG8289 es localitza també en les bandes del braços dels cromosomes, aquesta està enriquida en el cromocentre i en els telòmers. Aquesta observació està d'acord amb els treballs d'Antão et al., 2012 i de Van Bommel et al., 2013 on mostren que la proteïna CG8289 es localitza a les seqüències repetitives TAS (*Telomere-associated sequence*) dels telòmers i a les regions pericentromèriques, respectivament.

Associada també a aquestes regions pericentromèriques hi ha la proteïna HP1a, així com també les proteïnes que s'uneixen a aquesta, HP3 i HP6. De fet, es creu que HP1 actua com a plataforma per reclutar els altres components que integren el complex multiproteic necessari per establir l'heterocromatina. Tanmateix, la localització de CG8289 en aquestes regions no depèn d'HP1, ja que la depleció d'HP1 no afecta la seva localització (van Bommel et al., 2013). Aquesta darrera observació suggereix que la proteïna CG8289 no formaria part d'aquest complex multiproteic depenent d'HP1 i per tant, possiblement tinguin funcions diferents. En un futur, seria molt interessant determinar quines són les funcions específiques de la proteïna CG8289 en la regió pericentromèrica i si estan relacionades amb la funció centromèrica; així com també, analitzar la seva relació amb altres proteïnes de l'heterocromatina pericentromèrica.

## BIBLIOGRAFIA

- Antão, J.M., Mason, J.M., Déjardin, J., and Kingston, R.E. (2012). Protein landscape at *Drosophila melanogaster* telomere-associated sequence repeats. *Mol Cell Biol* 32, 2170-2182.
- Barth, T.K., Schade, G.O., Schmidt, A., Vetter, I., Wirth, M., Heun, P., Thomae, A.W., and Imhof, A. (2014). Identification of novel *Drosophila* centromere associated proteins. *Proteomics*.
- Blanchette, M., Green, R.E., MacArthur, S., Brooks, A.N., Brenner, S.E., Eisen, M.B., and Rio, D.C. (2009). Genome-wide Analysis of Alternative Pre-mRNA Splicing and RNA-Binding Specificities of the *Drosophila* hnRNP A/B Family Members. *Mol Cell* 33, 438-449.
- Blower, M.D., and Karpen, G.H. (2001). The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol* 3, 730-739.
- Blower, M.D., Sullivan, B.A., and Karpen, G.H. (2002). Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell* 2, 319-330.
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., and Earnshaw, W.C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 789-803.

- Chen, C.-C., Dechassa, M.L., Bettini, E., Ledoux, M.B., Belisario, C., Heun, P., Luger, K., and Mellone, B.G. (2014). CAL1 is the *Drosophila* CENP-A assembly factor. *J Cell Biol* 3;204(3):313-29.
- Choo, K. (2000). Centromerization. *Trends Cell Biol* 10, 182-188.
- Choo, K.H. (2001). Domain organization at the centromere and neocentromere. *Dev cell* 1, 165-177.
- Eggert, U.S., Kiger, A.A., Richter, C., Perlman, Z.E., Perrimon, N., Mitchison, T.J., and Field, C.M. (2004). Parallel chemical genetic and genome-wide RNAi screens identify cytokinesis inhibitors and targets. *PLoS Biol* 2, e379.
- Erhardt, S., Mellone, B.G., Betts, C.M., Zhang, W., Karpen, G.H., and Straight, A.F. (2008). Genome-wide analysis reveals a cell cycle-dependent mechanism controlling centromere propagation. *J Cell Biol* 183, 805-818.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E., Black, B.E., Bailey, A.O., Yates, J.R., and Cleveland, D.W. (2006). The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol* 8, 458-469.
- Furukawa, K., Sugiyama, S., Osouda, S., Goto, H., Inagaki, M., Horigome, T., Omata, S., McConnell, M., Fisher, P.A., and Nishida, Y. (2003). Barrier-to-autointegration factor plays crucial roles in cell cycle progression and nuclear organization in *Drosophila*. *J Cell Sci* 116, 3811-3823.
- Goshima, G., Wollman, R., Goodwin, S.S., Zhang, N., Scholey, J.M., Vale, R.D., and Stuurman, N. (2007). Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science* 316, 417-421.
- Heeger, S., Leismann, O., Schittenhelm, R., Schraidt, O., Heidmann, S., and Lehner, C.F. (2005). Genetic interactions of separase regulatory subunits reveal the diverged *Drosophila* Cenp-C homolog. *Genes Dev* 19, 2041-2053.
- Henikoff, S., Ahmad, K., and Malik, H.S. (2001). The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 293, 1098-1102.
- Henikoff, S., Ahmad, K., Platero, J.S., and van Steensel, B. (2000). Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 716-721.
- Herold, N., Will, C.L., Wolf, E., Kastner, B., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2009). Conservation of the protein composition and electron microscopy structure of *Drosophila melanogaster* and human spliceosomal complexes. *Mol Cell Biol* 29, 281-301.
- Hori, T., Amano, M., Suzuki, A., Backer, C.B., Welburn, J.P., Dong, Y., McEwen, B.F., Shang, W.-H., Suzuki, E., and Okawa, K. (2008). CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell* 135, 1039-1052.
- Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., Redward, S., MacDonald, A.C., Kalitsis, P., and Choo, K.A. (2000). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1148-1153.
- Kalifa, Y., Armenti, S.T., and Gavis, E.R. (2009). Glorund interactions in the regulation of *gurken* and *oskar* mRNAs. *Dev Biol* 326, 68-74.

- Mellone, B.G., Grive, K.J., Shteyn, V., Bowers, S.R., Oderberg, I., and Karpen, G.H. (2011). Assembly of *Drosophila* centromeric chromatin proteins during mitosis. *PLoS Genet* 7, e1002068.
- Mendiburo, M.J., Padeken, J., Fülöp, S., Schepers, A., and Heun, P. (2011). *Drosophila* CENH3 is sufficient for centromere formation. *Science* 334, 686-690.
- Ni, J.-Q., Liu, L.-P., Hess, D., Rietdorf, J., and Sun, F.-L. (2006). *Drosophila* ribosomal proteins are associated with linker histone H1 and suppress gene transcription. *Genes Dev* 20, 1959-1973.
- Oegema, K., Desai, A., Rybina, S., Kirkham, M., and Hyman, A.A. (2001). Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 153, 1209-1226.
- Okada, M., Cheeseman, I.M., Hori, T., Okawa, K., McLeod, I.X., Yates, J.R., 3rd, Desai, A., and Fukagawa, T. (2006). The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nat Cell Biol* 8, 446-457.
- Przewloka, M.R., and Glover, D.M. (2009). The kinetochore and the centromere: a working long distance relationship. *Annu Rev Genet* 43, 439-465.
- Przewloka, M.R., Venkei, Z., Bolanos-Garcia, V.M., Debski, J., Dadlez, M., and Glover, D.M. (2011). CENP-C is a structural platform for kinetochore assembly. *Curr Biol* 21, 399-405.
- Régnier, V., Vagnarelli, P., Fukagawa, T., Zerjal, T., Burns, E., Trouche, D., Earnshaw, W., and Brown, W. (2005). CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Mol Cell Biol* 25, 3967-3981.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*, Vol 2 (Cold spring harbor laboratory press New York).
- Schittenhelm, R.B., Althoff, F., Heidmann, S., and Lehner, C.F. (2010). Detrimental incorporation of excess Cenp-A/Cid and Cenp-C into *Drosophila* centromeres is prevented by limiting amounts of the bridging factor Cal1. *J Cell Sci* 123, 3768-3779.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 27, 353-365.
- Sullivan, B.A., Blower, M.D., and Karpen, G.H. (2001). Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nat Rev Genet* 2, 584-596.
- Sullivan, K.F. (2001). A solid foundation: functional specialization of centromeric chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 11, 182-188.
- Takata, H., Matsunaga, S., Morimoto, A., Ma, N., Kurihara, D., Ono-Maniwa, R., Nakagawa, M., Azuma, T., Uchiyama, S., and Fukui, K. (2007). PHB2 protects sister-chromatid cohesion in mitosis. *Curr Biol* 17, 1356-1361.
- van Bommel, J.G., Filion, G.J., Rosado, A., Talhout, W., de Haas, M., van Welsem, T., van Leeuwen, F., and van Steensel, B. (2013). A Network Model of the Molecular Organization of Chromatin in *Drosophila*. *Mol Cell* 49, 759-771.

- Veraksa, A., Bauer, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Analyzing protein complexes in *Drosophila* with tandem affinity purification-mass spectrometry. *Dev Dyn* 232, 827-834.
- Warburton, P.E., Cooke, C.A., Bourassa, S., Vafa, O., Sullivan, B.A., Stetten, G., Gimelli, G., Warburton, D., Tyler-Smith, C., and Sullivan, K.F. (1997). Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol* 7, 901-904.
- Zhang, W., Colmenares, S.U., and Karpen, G.H. (2012). Assembly of *Drosophila* Centromeric Nucleosomes Requires CID Dimerization. *Mol Cell* 45, 263-269.
- Zheng, R., Ghirlando, R., Lee, M.S., Mizuuchi, K., Krause, M., and Craigie, R. (2000). Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8997-9002.



## **CAPÍTOL 2**





***Drosophila* Barrier-to-Autointegration factor (dBAF) associates with centromeres and is required for CENP-C assembly**

Sònia Medina-Giró<sup>1,2</sup>, Mònica Torras-Llort<sup>1,2</sup>, Olga Moreno-Moreno<sup>1,2</sup> and Fernando Azorín<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology of Barcelona, CSIC. 08028 Barcelona. Spain.

<sup>2</sup>Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona. 08028 Barcelona. Spain.

\*Corresponding author:

Dr. F. Azorín

Institute of Molecular Biology of Barcelona, CSIC

Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona

Baldiri Reixac, 10. 08028 Barcelona. Spain

Phone: 3493-4034958; Fax: 3493-4034979; e-mail: fambmc@ibmb.csic.es



## **INFORME DEL DIRECTOR DE TESI SOBRE L'AUTORIA DE LA PUBLICACIÓ**

El Dr. Ferran Azorín Marín, Director de la Tesi Doctoral de Sònia Medina Giró, informa que el manuscrit "*Drosophila Barrier-to-Autointegration factor (dBAF) associates with centromeres and is required for CENP-C assembly*" està pendent de publicació.

Aquest manuscrit és fruit del treball de la doctoranda Sònia Medina amb la col·laboració puntual de les Dras. Mònica Torras-Llort i Olga Moreno-Moreno. En concret, la doctoranda va realitzar: la purificació i posterior identificació de les proteïnes associades als nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup> descrits a la Figura S7; la determinació del patró de localització de dBAF descrit a la Figura 1; l'anàlisi de la contribució de dBAF en la regulació dels nivells centromèrics de CENP-C i CenH3<sup>CID</sup> descrit a les Figures 2, 3, 4, 5, S1, S2 i S3, i la determinació de la interacció de dBAF amb CENP-C descrit a la Figura 6. La doctoranda també ha participat en la redacció del manuscrit i l'anàlisi i discussió dels resultats. Cal indicar que els resultats descrits en aquest treball no han estat presentats en cap altre Tesi Doctoral.

El Director,

Dr. Ferran Azorín Marín



**ABSTRACT**

dBAF is a conserved protein that links chromatin to the nuclear envelope (NE) and plays an essential role in NE re-assembly during mitosis. Here, we report that dBAF localizes at centromeres and mediates CENP-C assembly. dBAF binds across heterochromatin in interphase but, in metaphase chromosomes, its localization is restricted to centromeres. Overexpression of a dominant-negative dBAF-YFP form reduces centromeric CENP-C, but not CenH3/CENP-A, levels. dBAF depletion also reduces centromeric CENP-C levels. Co-immunoprecipitation experiments support a direct dBAF-CENP-C interaction. Overexpression of NHK1, which phosphorylates dBAF at mitosis, impairs dBAF-CENP-C interaction and NHK1 depletion favors it. Furthermore, a phosphomutant dBAF<sup>3A</sup> form localizes at centromeres while a phosphomimetic dBAF<sup>3E</sup> form does not. These results suggest that unphosphorylated dBAF interacts with CENP-C and localizes at centromeres. We also show that, consistent with a role of RNAs in centromeric CENP-C targeting, treatment with RNase A affects centromeric CENP-C localization and, interestingly, impairs dBAF-CENP-C interaction. In summary, our results unveil a novel dBAF function in CENP-C assembly and, thus, centromere/kinetochore function.



## INTRODUCTION

The centromere is a specialized chromosomal structure that, at mitosis, assembles the kinetochore, a large macromolecular ensemble that mediates spindle attachment and regulates chromosome segregation. The molecular bases of centromere function and kinetochore assembly are just beginning to be understood (reviewed in Allshire & Karpen, 2008; Bernad et al., 2009; Maddox et al., 2012; Malik & Henikoff, 2009; Perpelescu & Fukagawa, 2011; Przewloka & Glover, 2009; Torras-Llort et al., 2009; Verdaasdonk & Bloom, 2011; Westermann & Scheleiffer, 2013). All functional centromeres analyzed to date contain a specific histone H3 variant CenH3/CENP-A, which determines centromere identity and provides the foundation for kinetochore assembly. In addition to CenH3/CENP-A, a group of up to sixteen proteins (Constitutive Centromere Associated Network or CCAN) has been shown to associate with centromeres throughout the cell cycle and participate in kinetochore assembly. Amongst these, CENP-C appears to play a key role. CENP-C is an essential protein that is widely conserved through evolution from yeasts and plants to *Drosophila*, nematodes, and vertebrates. CENP-C depletion has drastic effects on chromosome alignment and kinetochore assembly (Fukagawa & Brown, 1997; Fukagawa et al., 1999; Kalitsis et al., 1998; Kwon et al., 2007). Recent evidence supports a role of CENP-C in connecting centromeric chromatin and the outer kinetochore components that ultimately bind spindle microtubules. Although experiments in human HeLa and chicken DT40 cells indicate that CENP-C mainly associates with centromeric H3 nucleosomes (Ando et al., 2002; Hori et al., 2008), its centromeric localization depends on CenH3/CENP-A (Erhardt et al., 2008; Goshima et al., 2003; Goshima et al., 2007; Heeger et al., 2005; Hori et al., 2008; Howman et al., 2000; Oegema et al., 2001; Régnier et al., 2005) and it has been shown to bind CenH3/CENP-A nucleosomes *in vitro* (Carroll et al., 2010; Guse et al., 2011). On the other hand, CENP-C directly interacts with the Mis12 complex, a member of the kinetochore KMN network (Przewloka et al., 2011; Screpanti et al., 2011), and ectopic CENP-C localization induces accumulation of major kinetochore components and assembly of a functional kinetochore (Gascoigne et al., 2011; Hori et al., 2013). Interestingly, CENP-C is required for centromeric CenH3/CENP-A assembly in *Drosophila* (Erhardt et al., 2008; Goshima et al., 2007) and, though to a lesser extent, in human cells (Carroll et al., 2010).

A second group of factors associate with centromeres only transiently and regulate structural and functional transitions during cell cycle progression. In this regard, several factors have been shown to regulate centromeric CenH3/CENP-A assembly. These include specific CenH3/CENP-A chaperones, such as HJURP in vertebrates



(Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009; Shuaib et al., 2010), CAL1 in *Drosophila* (Chen et al., 2014; Erhardt et al., 2008; Mellone et al., 2011; Schittenhelm et al., 2010) and Scm3 in yeasts (Camahort et al., 2007; Mizuguchi et al., 2007; Pidoux et al., 2009; Shivaraju et al., 2011; Stoler et al., 2007; Williams et al., 2009), as well as licensing factors that, like MIS18 in vertebrates, *C. elegans* and yeast (Fujita et al., 2007; Hayashi et al., 2004; Maddox et al., 2007), act on chromatin prior to CenH3/CENP-A deposition. In contrast, factors and mechanisms that regulate centromeric assembly of CCAN components are largely undetermined.

Centromere composition in *Drosophila* is not fully understood since, apart from CenH3/CENP-A (called CID in *Drosophila*) and CENP-C, most other constitutive centromeric proteins identified in others organisms do not appear to be conserved in the fly (Perpelescu & Fukagawa, 2011). To identify novel *Drosophila* centromere associated proteins, we performed affinity purification experiments using TAP-tagged CID nucleosomes as bait. These experiments result in the identification of Barrier-to-Autointegration Factor (dBAF). BAF is a small 10kDa conserved chromatin-associated protein that links chromatin to the nuclear envelope (NE) by binding the LEM-proteins LAP2 $\alpha/\beta$ , Emerin, MAN1 and LEM-2 (reviewed in Margalit et al., 2007; Segura-Totten & Wilson, 2004). BAF has been shown to play a key role in NE re-assembly after mitosis (Gorjánác et al., 2007; Haraguchi et al., 2008; Haraguchi et al., 2001; Margalit et al., 2005; Molitor & Traktman, 2014). Here, we show that dBAF localizes at centromeres, interacts with CENP-C and mediates centromeric CENP-C assembly. At mitosis, phosphorylation by the Vaccinia-related kinase-1 (VRK1) impairs binding of BAF to both the LEM-proteins and chromatin (Asencio et al., 2012; Gorjánác et al., 2007; Lancaster et al., 2007; Margalit et al., 2007; Nichols et al., 2006). Our results suggest that centromeric dBAF is not phosphorylated and phosphorylation by the *Drosophila* VRK1 homologue (NHK1) disrupts the interaction with CENP-C. Consistent with previous results in maize and human cells (Du et al., 2010; Wong et al., 2007), we show that centromeric localization of *Drosophila* CENP-C depends on RNA and, most interestingly, dBAF-CENP-C interaction is sensitive to RNase A treatment. Altogether, these results identify dBAF as a novel centromere-associated protein that regulates centromeric CENP-C assembly.

## RESULTS

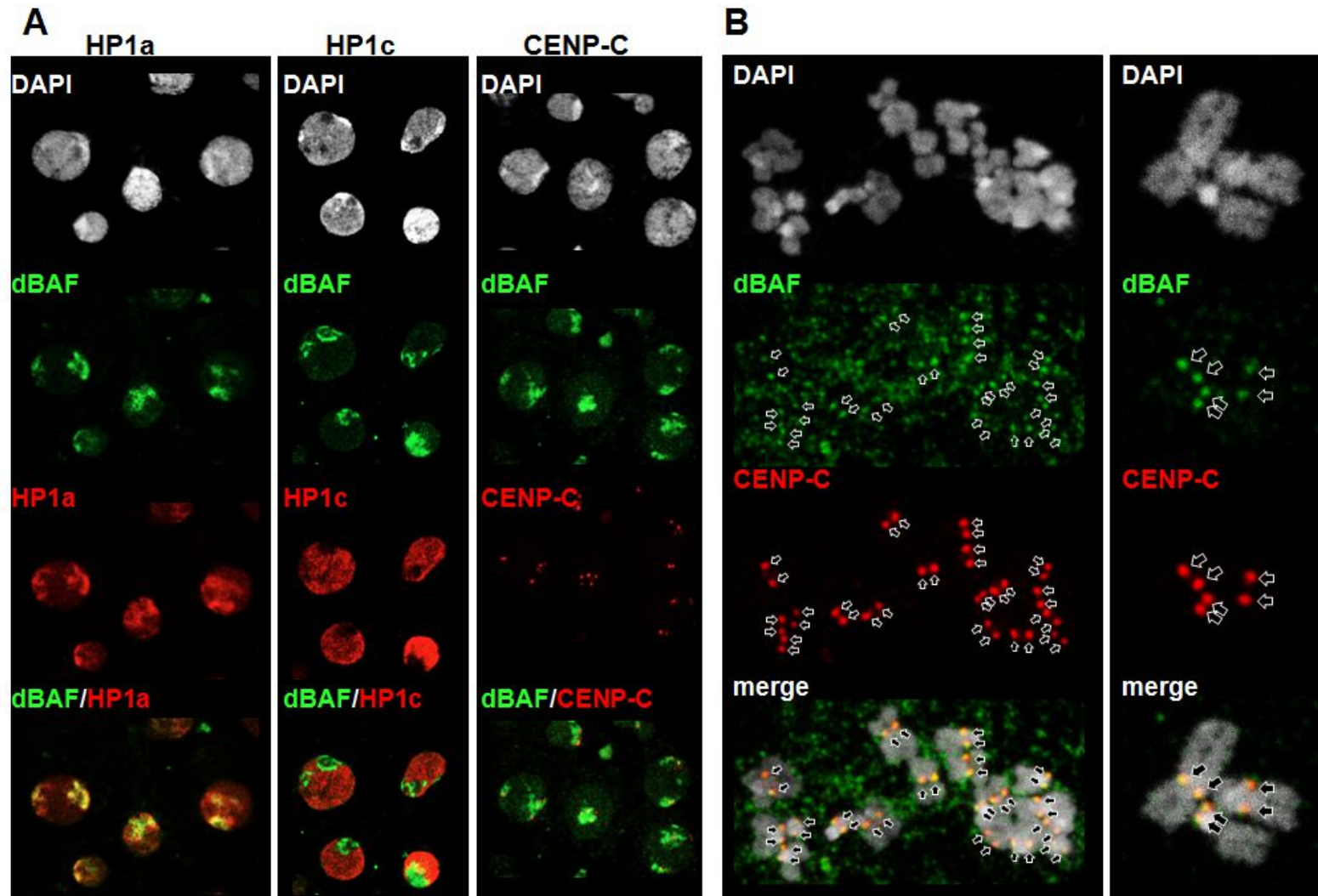
### dBAF localizes at centromeres

dBAF was identified amongst proteins co-purifying with CenH3<sup>CID</sup>-TAP containing chromatin (see Materials and Methods for details). Immunostaining experiments in S2 cells confirmed the association of dBAF with chromatin (Figure 1). In interphase, dBAF preferentially associate with centric heterochromatin, as it strongly co-localizes with the heterochromatic HP1a variant (Figure 1A, left) and is largely excluded from regions enriched in the euchromatic HP1c isoform (Figure 1A, center). At mitosis, though in a high background, we detected strong  $\alpha$ -dBAF signals at centromeres of metaphase chromosomes overlapping with  $\alpha$ -CENP-C signals (Figure 1B). The centromeric  $\alpha$ -dBAF increases when S2 cells are treated with colcemid. The heterochromatic  $\alpha$ -dBAF immunostaining observed in interphase cells as well as the centromeric  $\alpha$ -dBAF signals observed in metaphase chromosomes are significantly decreased upon RNAi-mediated depletion of dBAF (p-value < 0.0001) (Figure E1B).

Next, to further analyze centromeric localization of dBAF, we performed transient expression experiments of YFP-tagged constructs in S2 cells. In these experiments, we analyzed both a C-terminal dBAF-YFP and an N-terminal YFP-dBAF fusion. Both proteins, which are expressed to similar levels (Figure E2A), are distributed throughout the nucleus in interphase cells, suggesting a broad association with chromatin (Figures 3A, 3B and 3C). In metaphase chromosomes, both constructs are detected at centromeric regions but, in contrast to endogenous dBAF, their distribution extends to centric heterochromatin (Figure 2A). YFP-dBAF is also detected at other chromosomal regions, particularly at telomeres.

### dBAF is required for centromeric CENP-C assembly

Centromeric localization of dBAF suggests a contribution to centromere organization and function. In this regard, we observed that dBAF-YFP overexpression significantly decreases CENP-C levels at centromeres (p-value < 0.0001) (Figures 3A and 3D) to the extent that, though in a low percentage of cells (3.7%), no  $\alpha$ -CENP-C signal could be detected. In contrast, overexpression of YFP-dBAF does not affect centromeric CENP-C levels (Figures 3A and 3D). Genetic analyses indicate that, while YFP-dBAF is functional, the C-terminal dBAF-YFP fusion is a non-functional protein that acts as a strong dominant-negative mutation. In these experiments, *baf*<sup>RNAi</sup> knockdown flies, which carry a UAS<sub>GAL4</sub>-construct expressing a synthetic hairpin from the *baf* coding region, were

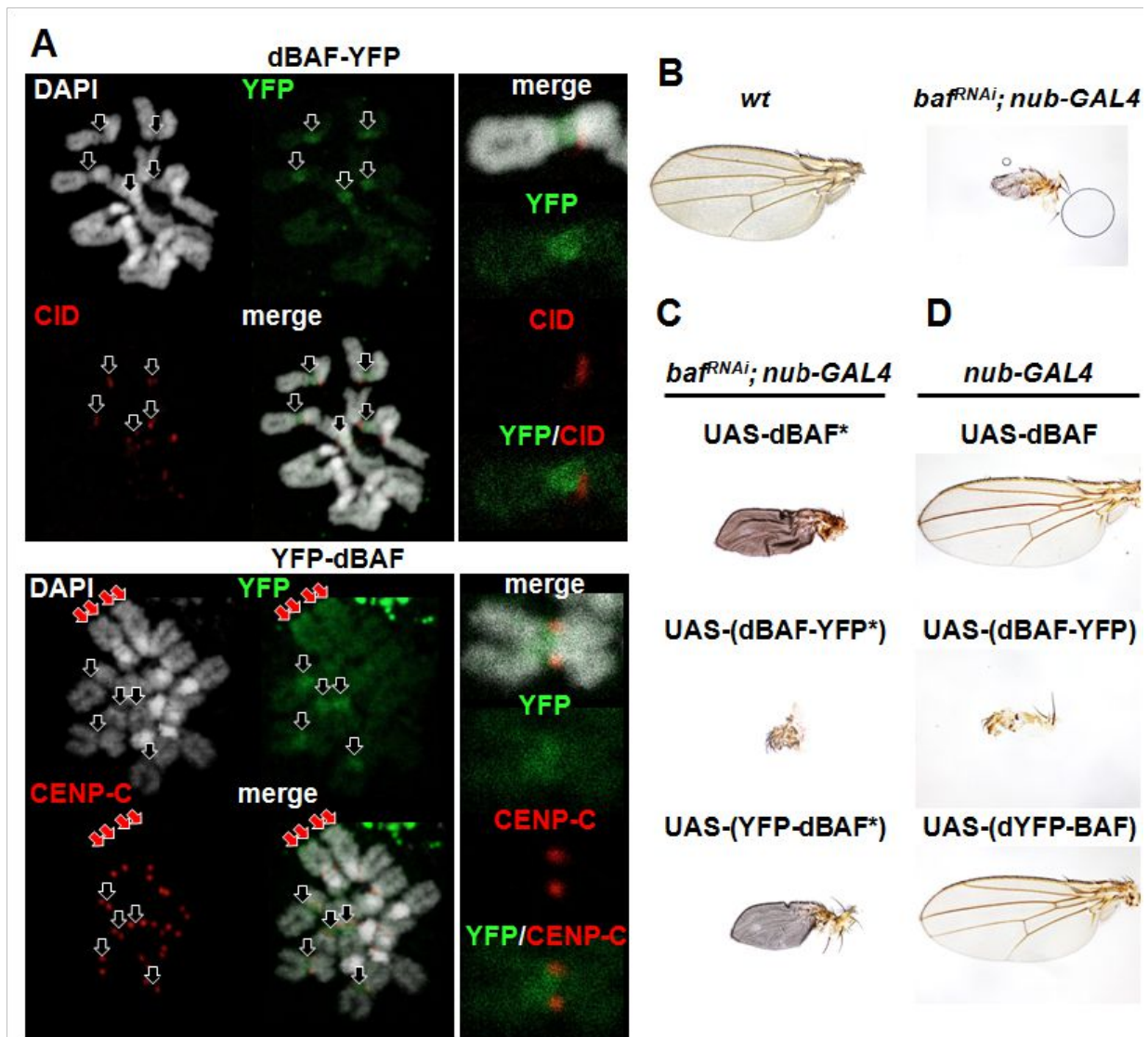


**Figure 1. dBAF localizes at centromeres.** (A) The patterns of immunolocalization with  $\alpha$ -dBAF antibodies (green), and  $\alpha$ -HP1a (left),  $\alpha$ -HP1c (center) and  $\alpha$ -CENP-C (right) antibodies (red) are presented in interphase S2 cells. DNA was stained with DAPI. (B) The patterns of immunolocalization with  $\alpha$ -dBAF (green) and  $\alpha$ -CENP-C (red) antibodies are presented in metaphase chromosomes from S2 cells treated with colcemid. Enlarged images are presented on the right. Arrows indicate strong  $\alpha$ -dBAF signals that overlap with  $\alpha$ -CENP-C signals at centromeres. DNA was stained with DAPI.

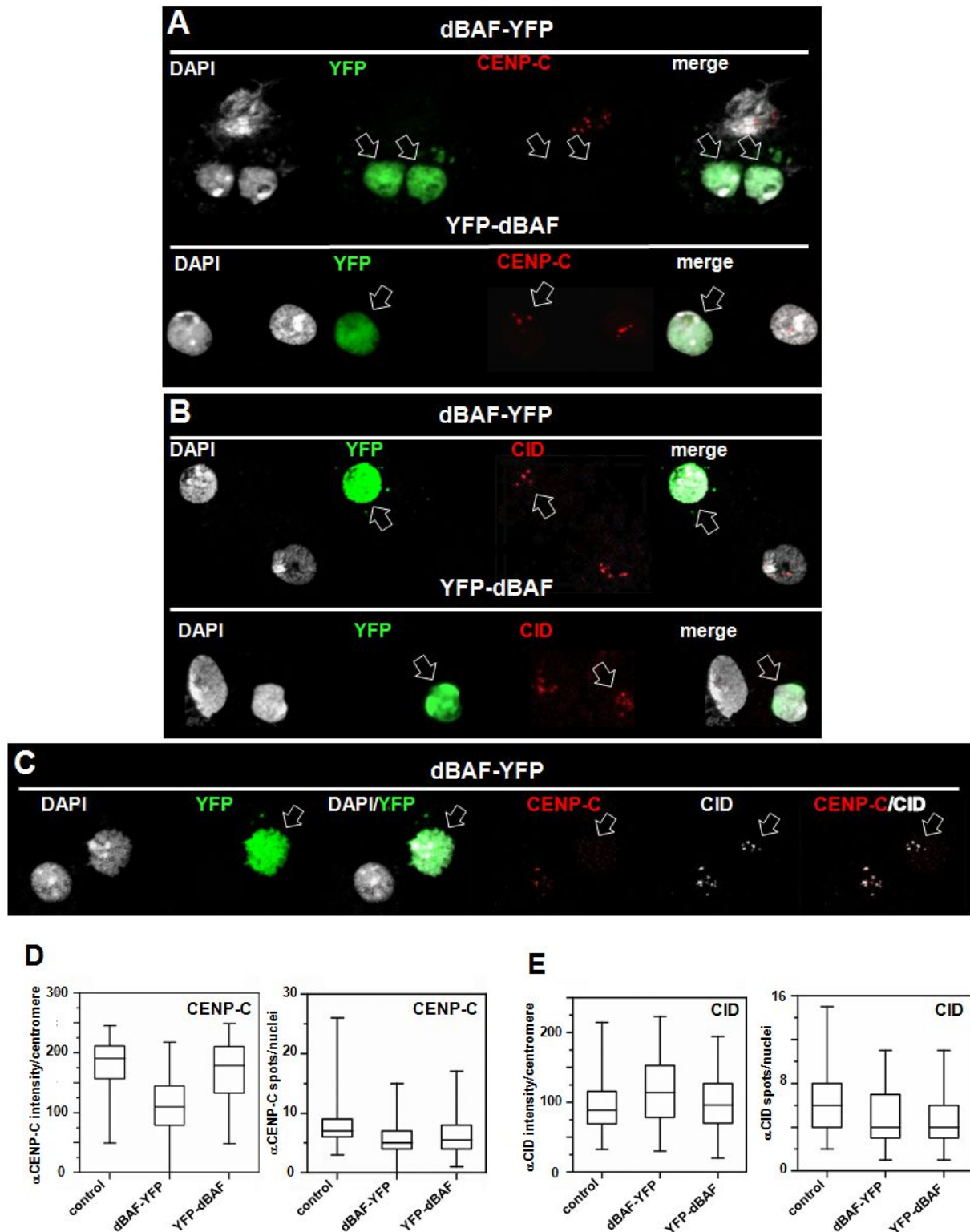
crossed to *nub*-GAL4 flies to specifically induced dBAF depletion in the pouch region of wing imaginal discs. Under these conditions, dBAF depletion results in strong phenotypes in adult flies that show very small undeveloped wings (Figure 2B). This phenotype is partially rescued by expression of RNAi-resistant untagged dBAF\* (Figure 2C, top) and the N-terminal YFP-dBAF\* tagged form (Figure 2C, bottom). However, expression of a similar RNAi-resistant dBAF-YFP\* construct shows not significant rescue (Figure 2C, center), reflecting its non-functional character. Moreover, overexpression of dBAF-YFP in control wild-type flies mimics the loss-of-function phenotype observed upon dBAF depletion (Figure 2D, center), indicating that it strongly impairs the function of endogenous dBAF. Notice that overexpression of untagged dBAF (Figure 2D, top) and the YFP-dBAF construct (Figure 2D, bottom) causes no detectable wing defects.

Decreased CENP-C levels detected at centromeres upon overexpression of the dominant-negative dBAF-YFP construct is not due to a defect in centromeric CID deposition since overexpressing cells show similar CID levels at centromeres as control non-overexpressing cells or cells overexpressing the functional YFP-dBAF construct (Figures 3B and 3E). Actually,  $\alpha$ -CID signals are detected in dBAF-YFP expressing cells that show no-detectable  $\alpha$ -CENP-C reactivity (Figure 3C). Overexpression of dBAF-YFP does not significantly affect centromere clustering, as the actual number of  $\alpha$ -CID spots observed per nuclei is similar as in control cells (Figure 3E, right). Concomitant to decreased centromeric CENP-C, overexpression of dBAF-YFP induces a strong G2/M arrest (Figure E3A, center). On the other hand, overexpression of the functional YFP-dBAF construct, which does not affect centromeric CENP-C and CID levels (Figure 3), shows no significant cell cycle defects (Figure E3A, right).

Like overexpression of the dominant-negative dBAF-YFP construct, RNAi-mediated depletion of dBAF also induces a significant reduction of the levels of CENP-C detected at centromeres (p-value < 0.0001) (Figures 4A and 4B), indicating that this defect is due to the loss-of-function of dBAF. However, in contrast to dBAF-YFP overexpression, dBAF depletion also reduces CID at centromeres (p-value < 0.0001), though to a lower extent than CENP-C (Figures 5A and 5B), and causes rather weak cell cycle defects with a modest increase of the percentage of cells with high DNA content (Figure E3B).



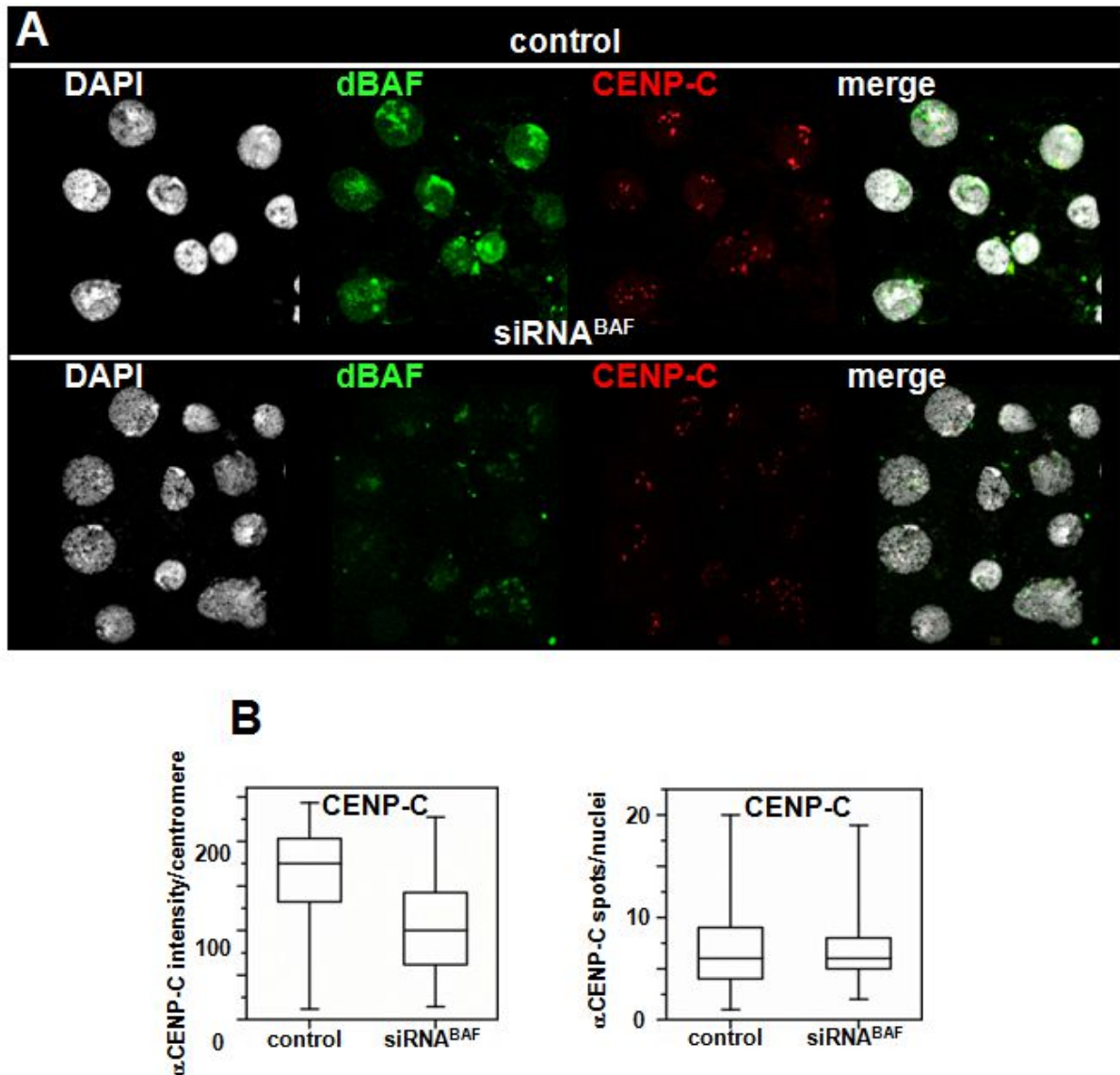
**Figure 2. dBAF-YFP is a dominant-negative mutant.** (A) The patterns of localization of dBAF-YFP (top) and YFP-dBAF (bottom) are determined by direct fluorescence (green) in metaphase chromosomes from S2 cells. The patterns of immunolocalization with  $\alpha$ -CID (top) and  $\alpha$ -CENP-C (bottom) antibodies (red) are also presented. Enlarged images are presented on the right. Black arrows indicate YFP signals detected at centromeric regions. Red arrows indicated YFP signals detected at telomeric regions. DNA was stained with DAPI. (B) Wings from control *wt* (left) and *baf<sup>RNAi</sup>; nub-GAL4* (right) flies are presented. (C) Wings from *baf<sup>RNAi</sup>; nub-GAL4* flies overexpressing an RNAi-resistant untagged dBAF\* construct (top), and similar RNAi-resistant tagged dBAF-YFP\* (center) and YFP-dBAF\* (bottom) forms are presented. (D) As in C, but for control *nub-GAL4* flies.



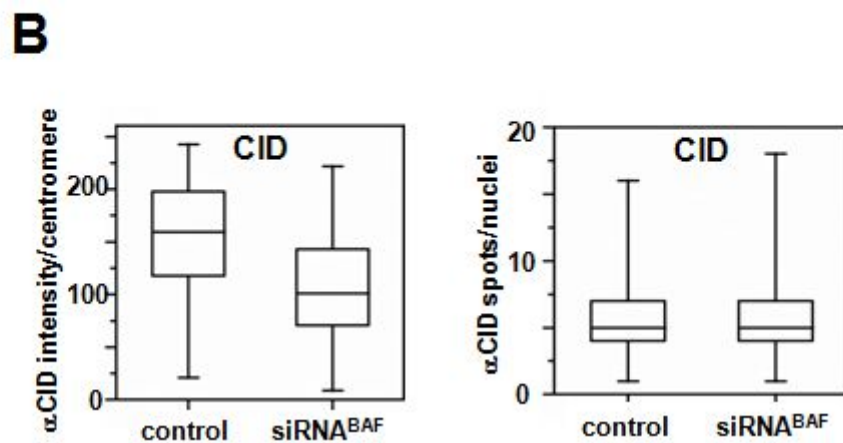
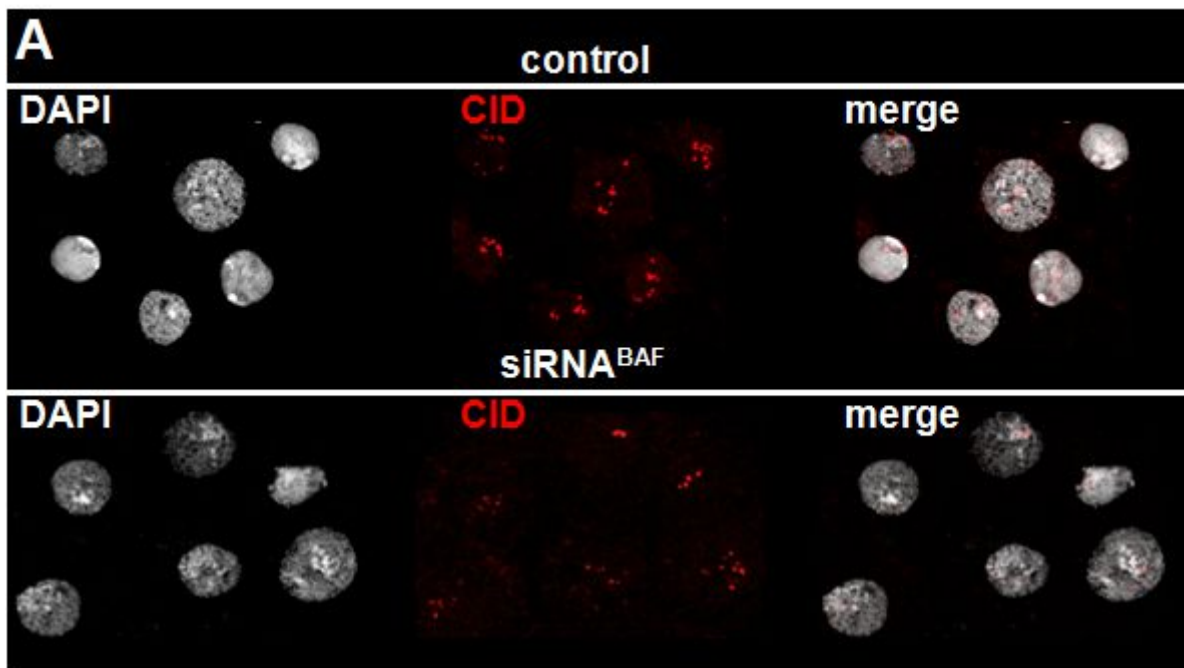
**Figure 3. Overexpression of dBAF-YFP reduces centromeric CENP-C levels.** (A) The patterns of immunolocalization with  $\alpha$ -CENP-C antibodies (red) are presented in S2 cells transfected with dBAF-YFP (top) and YFP-dBAF (bottom) constructs. Arrows indicate cells expressing the corresponding YFP constructs determined by direct fluorescence (green). Cells showing no detectable expression are also shown. DNA was stained with DAPI. (B) As in A, but for the patterns of immunolocalization with  $\alpha$ -CID antibodies. (C) Co-immunostaining with  $\alpha$ -CENP-C (red) and  $\alpha$ -CID (grey) antibodies of S2 cells transfected with dBAF-YFP. The arrow indicates a cell expressing dBAF-YFP as detected by direct fluorescence (green). A cell showing no



detectable dBAF-YFP expression is also shown. DNA was stained with DAPI. (D) Quantitative analyses of the results shown in A. On the left, the intensity of  $\alpha$ -CENP-C at centromeres, determined as the average grey value per centromere, is presented for cells expressing dBAF-YFP, YFP-dBAF and control cells not expressing any construct. On the right, the number of  $\alpha$ -CENP-C spots detected per nuclei is presented for cells expressing dBAF-YFP, YFP-dBAF and control cells. (E) As in D, but for the intensity of  $\alpha$ -CID at centromeres (left) and the number of  $\alpha$ -CID spots per nuclei (right).



**Figure 4. dBAF depletion reduces centromeric CENP-C levels.** (A) The patterns of immunolocalization with  $\alpha$ -dBAF (green) and  $\alpha$ -CENP-C antibodies (red) are presented in S2 cells upon RNAi-mediated depletion of dBAF (siRNA<sup>BAF</sup>) (bottom) and in control undepleted cells (top). DNA was stained with DAPI. (B) Quantitative analyses of the results shown in A. On the left, the intensity of  $\alpha$ -CENP-C at centromeres, determined as the average grey value per centromere, is presented for siRNA<sup>BAF</sup> and control cells. On the right, the number of  $\alpha$ -CENP-C spots detected per nuclei is presented for siRNA<sup>BAF</sup> and control cells.



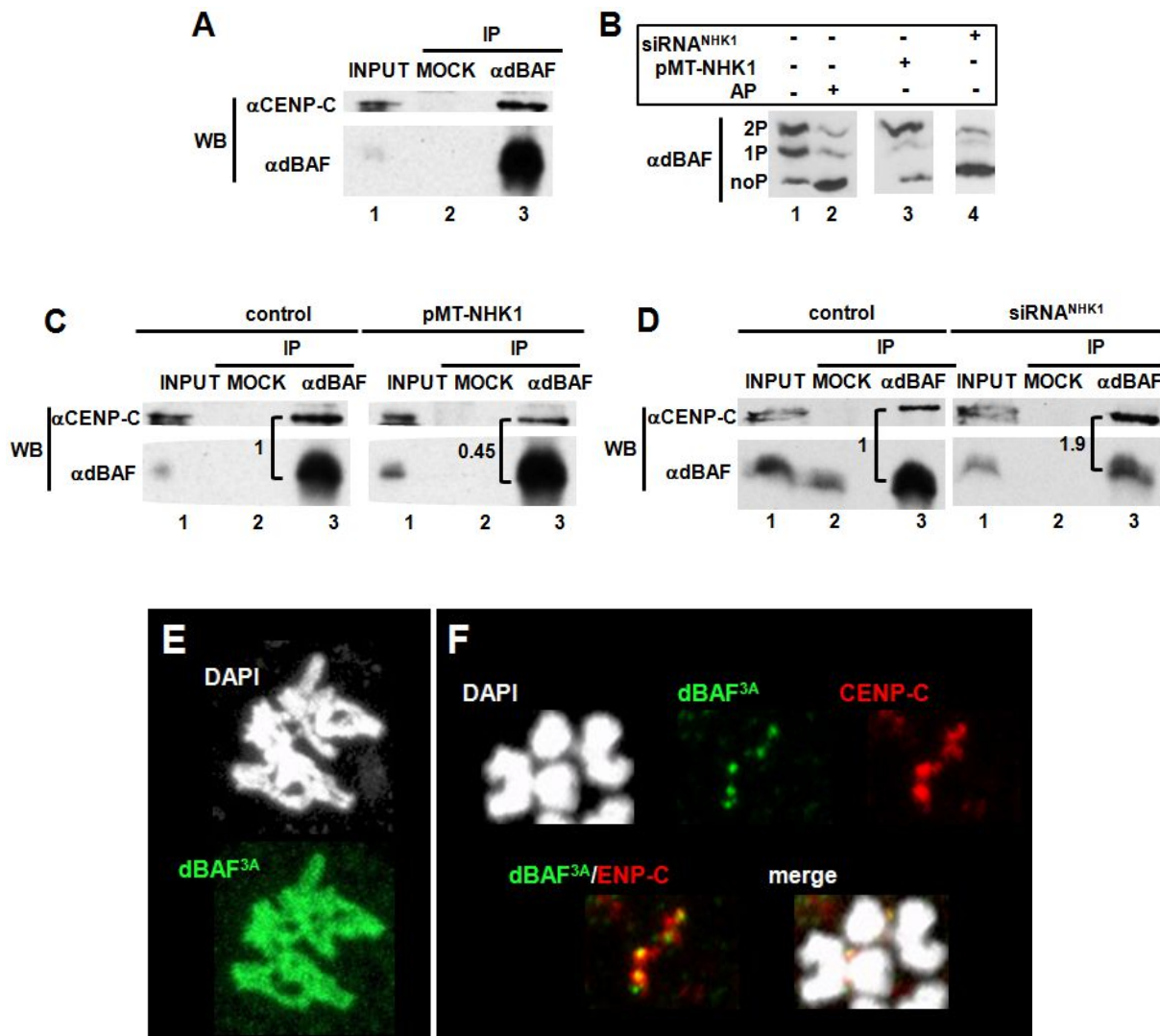
**Figure 5. dBAF depletion reduces centromeric CID levels.** (A) The patterns of immunolocalization with  $\alpha$ -CID antibody (red) is presented in S2 cells upon RNAi-mediated depletion of dBAF (siRNA<sup>BAF</sup>) (bottom) and in control undepleted cells (top). DNA was stained with DAPI. (B) Quantitative analyses of the results shown in A. On the left, the intensity of  $\alpha$ -CID at centromeres, determined as the average grey value per centromere, is presented for siRNA<sup>BAF</sup> and control cells. On the right, the number of  $\alpha$ -CID spots detected per nuclei is presented for siRNA<sup>BAF</sup> and control cells.



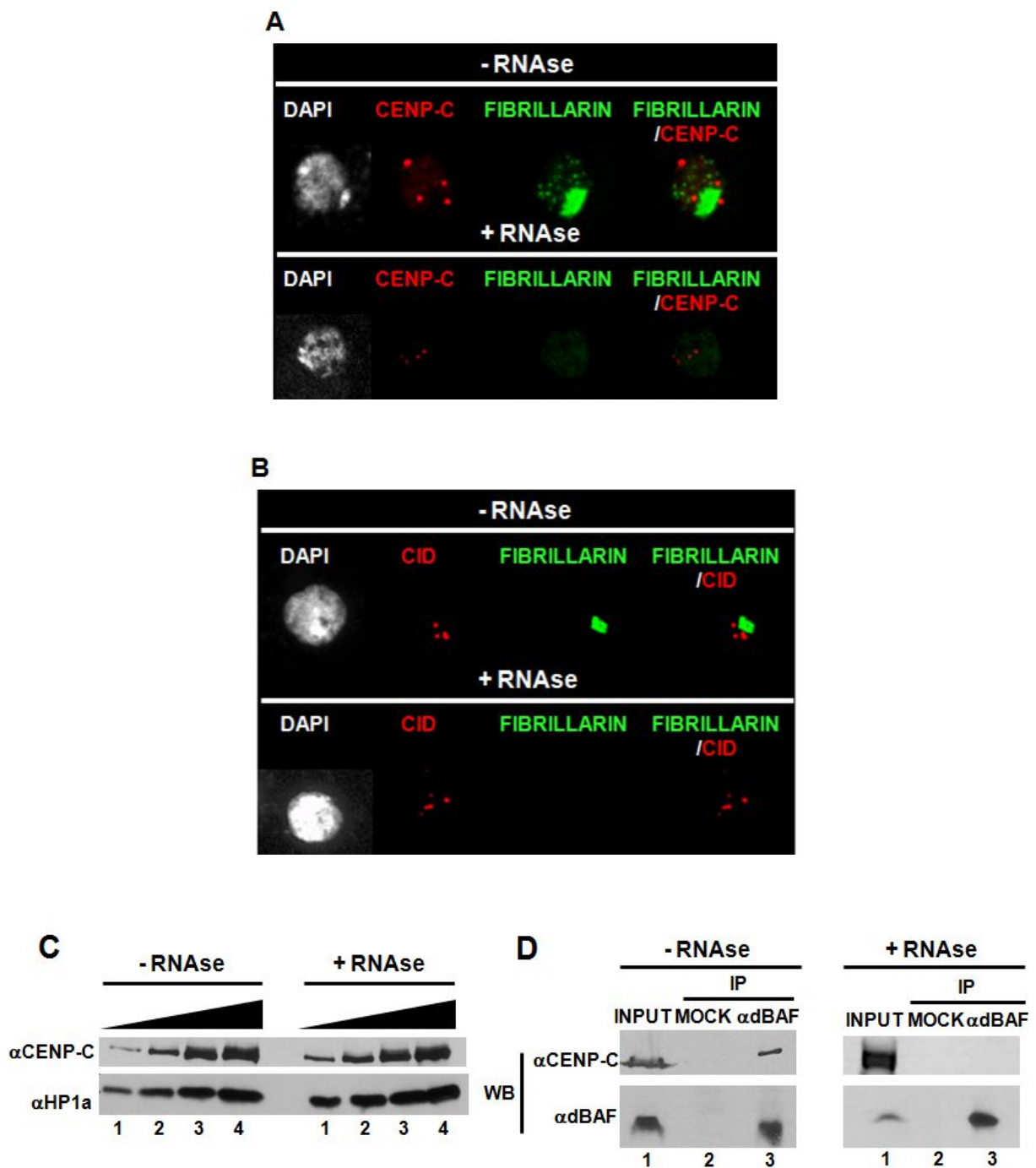
**dBAF interacts with CENP-C**

Co-immunoprecipitation experiments indicate that dBAF interacts with CENP-C, as  $\alpha$ -dBAF antibodies efficiently co-immunoprecipitates CENP-C (Figure 6A). It was shown that, both in mammals and *Drosophila*, VRK1/NHK1 phosphorylates BAF and regulates its interaction with chromatin as well as the NE (Gorjánác et al., 2007; Lancaster et al., 2007; Nichols et al., 2006). Thus, we analyzed whether NHK1 phosphorylation regulates centromeric localization of dBAF and its interaction with CENP-C. Phos-tag gel electrophoretic analyses (see Materials and Methods for details) detect mono- and di-phosphorylated dBAF forms that migrate slower than unphosphorylated dBAF and are sensitive to treatment with alkaline phosphatase (AP) (Figure 6B, lanes 1 and 2). NHK1 overexpression increases the proportion of di-phosphorylated dBAF (Figure 6B, lane 3) and, concomitantly, the efficiency of CENP-C co-immunoprecipitation with  $\alpha$ -dBAF antibodies decreases to ~45% of that observed in the absence of overexpression (Figure 6C). On the other hand, NHK1 depletion increases unphosphorylated dBAF (Figure 6B, lane 4) and CENP-C co-immunoprecipitation also increases by ~1.9-fold (Figure 6D). These results suggest that CENP-C preferentially interacts with unphosphorylated dBAF. Next, to analyze the effect of phosphorylation on centromeric localization of dBAF, we transiently expressed in S2 cells a phosphomutant Flag-dBAF<sup>3A</sup> form where NHK1-phosphorylatable residues are replaced to A (Figure E4A) and, thus, phosphorylation is impaired (Figure E4B). After 48h of transfection, Flag-dBAF<sup>3A</sup> is mostly found uniformly distributed across chromosomes (Figure 6E). However, 72h after transfection we observed that, in ~15% of metaphases (N= 123), the distribution of Flag-dBAF<sup>3A</sup> is restricted to centromeric regions and strongly overlaps with CENP-C (Figure 6F). In contrast, a similar phosphomimetic Flag-dBAF<sup>3E</sup> construct could not be detected on metaphase chromosomes (N= 238) (Figure E5).

In good agreement with previous results in human cells (Wong et al., 2007), treatment with RNase A of *Drosophila* S2 cells strongly affects centromeric CENP-C localization (Figure 7A), without affecting global CENP-C levels (Figure 7C) or centromeric CID localization (Figure 7B). Most interestingly, co-immunoprecipitation experiments with  $\alpha$ -dBAF antibodies show that treatment with RNase A impairs dBAF-CENP-C interaction (Figure 7D).



**Figure 6. dBAF interacts with CENP-C.** (A) CENP-C co-immunoprecipitates with dBAF. IPs were performed with  $\alpha$ -dBAF antibodies (lane 3) and control preimmune serum (lane 2). IP-materials were analyzed by Western blot using  $\alpha$ -CENP-C (top) and  $\alpha$ -dBAF (bottom) antibodies. Lane 1 corresponds to 2.5% of the input material. (B) Phosphorylation of dBAF is analyzed by Phos-tag gel electrophoresis. Extracts were prepared from cells treated with dsRNA against NHK1 (siRNA<sup>NHK1</sup>) (lane 4), overexpressing NHK1 (pMT-NHK1) (lane 3) and control cells treated with alkaline phosphatase (AP) (lane 2) or not (lane 1). Extracts were analyzed by Western blot using  $\alpha$ -dBAF antibodies. The positions corresponding to unphosphorylated (noP), and mono- (1P) and di-phosphorylated (2P) species are indicated. (C) Co-IP experiments with  $\alpha$ -dBAF antibodies (lanes 3) were performed with extracts prepared from cells overexpressing NHK1 (pMT-NHK1) (right) and control cells (left). Lanes 2 correspond to mock IPs performed with preimmune serum. IP-materials were analyzed by Western blot using  $\alpha$ -CENP-C (top) and  $\alpha$ -dBAF (bottom) antibodies. The efficiency of CENP-C co-immunoprecipitation is presented as the ratio of  $\alpha$ -CENP-C and  $\alpha$ -dBAF signals normalized respect to the control cells. Lanes 1 correspond to 2.5% of the input material. (D) As in C, but for cells treated with dsRNA against NHK1 (siRNA<sup>NHK1</sup>) (right) and control cells (left). (E) The pattern of immunolocalization of Flag-dBAF<sup>3A</sup> is determined with  $\alpha$ -Flag antibodies (green) in metaphase chromosomes from S2 cells 48h after transfection. DNA was stained with DAPI. (F) The patterns of immunolocalization of Flag-dBAF<sup>3A</sup> (green) and CENP-C (red) are presented in metaphase chromosomes from S2 cells 72h after transfection. Arrows indicate Flag-BAF<sup>3A</sup> signals that overlap with  $\alpha$ -CENP-C signals at centromeres. DNA was stained with DAPI.



**Figure 7. dBAF-CENP-C interaction is sensitive to RNase A treatment.** (A) The patterns of immunolocalization with  $\alpha$ -CENP-C antibodies (red) and  $\alpha$ -Fibrillarín (green) are presented in S2 cells after treatment with RNase A (bottom) or not (top). DNA was stained with DAPI. (B) As in A, but with  $\alpha$ -CID antibodies. (C) Extracts prepared from S2 cells treated with RNase A (right) or not (left) are analyzed by Western blot using  $\alpha$ -CENP-C (top) and  $\alpha$ -HP1a (bottom) antibodies as control for normalization. Increasing amount of extracts (lanes 1-4) are analyzed. (D) Co-IP experiments with  $\alpha$ -dBAF antibodies (lanes 3) were performed with extracts prepared from cells treated with RNase A (right) or not (left). Lanes 2 correspond to mock IPs performed with preimmune serum. IP-materials were analyzed by Western blot using  $\alpha$ -CENP-C (top) and  $\alpha$ -dBAF (bottom) antibodies.

## DISCUSSION

Here, we have shown that dBAF localizes at centromeres of metaphase chromosomes (Figures 1B and 2A). Previous results suggest that, at mitosis, phosphorylation prevents binding of BAF to chromatin (Asencio et al., 2012; Gorjánác et al., 2007; Margalit et al., 2007; Nichols et al., 2006). In this regard, it must be noticed that we also detected strong  $\alpha$ -dBAF reactivity not overlapping with chromosomes, which is consistent with a large proportion of dBAF being soluble, not bound to chromosomes, during mitosis (Haraguchi et al., 2001; Shimi et al., 2004). This high non-chromosomal background likely masked centromeric localization of BAF in previous studies. We cannot unambiguously determine whether dBAF also associates with centromeres during interphase since, at this stage, dBAF shows a broad distribution across centric heterochromatin (Figure 1A) and centromeres are embedded within this domain. Indeed,  $\alpha$ -CENP-C signals lie within the large heterochromatic  $\alpha$ -dBAF domain (Figure 1A, right). Binding of endogenous dBAF to heterochromatin is no longer detected at mitosis, when dBAF is phosphorylated and chromatin binding generally weakens. Interestingly, while a mutant dBAF<sup>3E</sup> construct that mimics phosphorylation does not bind to chromosomes (Figure E5), a dBAF<sup>3A</sup> form that cannot be phosphorylated localizes at centromeres (Figure 6F), suggesting that centromeric dBAF is not phosphorylated. These observations suggest that, at mitosis, phosphorylation releases dBAF from heterochromatin and restricts its localization to centromeres. It is possible that kinetochore assembly protects centromeric dBAF from phosphorylation and, thus, preserves binding to chromatin.

Centromeric CENP-C levels strongly decrease upon dBAF depletion (Figure 4) and overexpression of a dominant-negative dBAF-YFP form (Figure 3), indicating that dBAF is required for centromeric CENP-C assembly. Centromeric localization of CENP-C is known to depend on CID (Erhardt et al., 2008; Goshima et al., 2007). However, the contribution of dBAF to centromeric CENP-C assembly appears to be independent of CID, as overexpression of dBAF-YFP selectively affects centromeric CENP-C but not CID levels (Figure 3). In contrast, dBAF depletion also reduces centromeric CID levels (Figure 5). In this regard, it must be noticed that dBAF depletion involves a much longer treatment (7 days) than dBAF-YFP overexpression (48 hours). In addition, CENP-C is required for centromeric CID assembly in *Drosophila* (Erhardt et al., 2008; Goshima et al., 2007), and dBAF depletion affects CENP-C levels to a higher extent than CID levels (Figures 4 and 5). These observations suggest that reduced centromeric CID levels induced by dBAF depletion are likely a consequence of the effects on CENP-C levels.

Our results strongly support a direct dBAF-CENP-C interaction (Figure 6). This interaction is regulated by phosphorylation, as CENP-C preferentially interacts with

unphosphorylated dBAF. Interestingly, though some centromeric CENP-C deposition appears to occur at mitosis, it mainly takes place during interphase (Hemmerich et al., 2008; Lidsky et al., 2013; Mellone et al., 2011), which is when dBAF is predominantly unphosphorylated and, thus, could interact with CENP-C. In addition, RNAs have been implicated in targeting CENP-C to centromeres (Du et al., 2010; Wong et al., 2007) and, most remarkably, dBAF-CENP-C interaction is sensitive to RNase A treatment (Figure 7). Altogether, these results strongly argue in favor of a direct role of dBAF in centromeric CENP-C targeting and assembly.

The molecular basis of the dominant-negative character of dBAF-YFP is not fully understood. BAF is known to dimerize and, in the dimer structure, the C-termini are in close contact (Cai et al., 1998). Therefore, C-terminal tags could interfere with BAF dimerization and function. As a matter of fact, dBAF-YFP does not interact with endogenous dBAF in co-IP experiments (Figure E6A). In addition, we also observed that phosphorylation of dBAF-YFP is impaired (Figure E6B), which could account for its persistent binding to heterochromatin in metaphase chromosomes (Figure 2A). Furthermore, overexpression of dBAF-YFP appears to increase phosphorylation of endogenous dBAF (Figure E6C) and, thus, could affect the binding of endogenous dBAF to chromatin and its interaction with CENP-C. It is also possible that dBAF-YFP is not functional in NE re-assembly since C-terminal tags appear to interfere with localization at the NE (Segura-Totten and Wilson, 2004). However, whether they impair NE localization of endogenous BAF is not known.

In summary, our results suggest that, in addition to its well-established function in NE re-assembly, BAF contributes to centromeric CENP-C assembly and, thus, to centromere/kinetochore function. Consistent with a contribution to centromere/kinetochore function, BAF loss-of-function causes chromosome segregation defects (Liu et al., 2003; Liu et al., 2000; Margalit et al., 2005) that, in *C. elegans*, appear to be independent of the effects in NE re-assembly (Gorjánác et al., 2007). In this regard, it is tempting to speculate that BAF could co-ordinate chromosome segregation and NE re-assembly, two essential processes that occur at mitosis.

## MATERIALS AND METHODS

### Fly stocks

nub-*GAL4* and actin5C-*GAL4* flies were obtained from Bloomington Stock Center. *baf<sup>RNAi</sup>* corresponds to 102013 stock from the Vienna *Drosophila* RNAi Center. Transgenic flies carrying the various UAS-dBAF constructs described in the text were obtained by site-directed integration of the corresponding pUASTattb plasmids into chromosome 3 using 3R-86Fb embryos.

### DNAs, protein constructs and antibodies

cDNA encoding dBAF was obtained from *Drosophila* Genomics Resource Center (clone GH06291). dBAF\* constructs resistant to *baf<sup>RNAi</sup>* knock-down were obtained by modifying codon usage following the *Drosophila* RNAi Escape Strategy Construct (RESC) described in Schulz et al., 2009. TAP- and YFP-tagged proteins were obtained by cloning the appropriate constructs into plasmids pMK33-C-TAP and pEYFP-N1/pEYFP-C1 (Clontech).

Rabbit polyclonal  $\alpha$ -dBAF antibodies were raised against bacterially expressed dBAF by conventional methods. Specificity of  $\alpha$ -dBAF antibodies was determined by Western blot (Figures E1A and E1C) and immunostaining (Figure 4A and Figure E1B) experiments. Rat and rabbit polyclonal  $\alpha$ -CENP-C antibodies were raised against a bacterially expressed His-tagged dCENP-C fragment (aa, 505-1227) by conventional methods. Rabbit polyclonal  $\alpha$ -CID is described in Moreno-Moreno et al., 2006, and rat polyclonal  $\alpha$ -HP1a and  $\alpha$ -HP1c antibodies are described in Font-Burgada et al., 2008. The rest of antibodies used were commercially available: rabbit polyclonal  $\alpha$ -H3 (Cell Signaling, 9715S) and  $\alpha$ -TAP (Open Biosystems, CAB1001), and mouse monoclonal  $\alpha$ -Flag (SIGMA A2220),  $\alpha$ -Fibrillarin (Abcam, ab4566) and  $\alpha$ -Tubulin (Millipore, 3408).

### TAP-affinity purification of proteins associated with CID-TAP containing chromatin

Stable S2 cells expressing a CID-TAP fusion under the control of a 412bp long fragment from the 5'-regulatory region of *CID* were obtained according to standard procedures and the localization pattern of the fused protein was determined by immunostaining experiments using  $\alpha$ -TAP antibodies (Figure E7A). TAP-affinity purification of proteins associated with CID-TAP containing chromatin was performed basically as described in Foltz et al., 2006. Briefly, nuclei were purified and digested with

micrococcal nuclease (Sigma). After digestion was stopped, the soluble chromatin fraction (SN1), which accounted for ~66% of total chromatin, was prepared by centrifugation at 10,000g for 15min at 4°C. The remaining insoluble material was extracted at increasing EDTA concentration from 2mM to 200mM. Nucleosomal composition of each fraction was analyzed by agarose gel electrophoresis (Figure E7B). CID-TAP and CENP-C content was determined by Western blot (Figures E7C and E7D). Then, the SN1 and 2mM EDTA fractions were pooled and subjected to conventional TAP-affinity purification using IgG-Dynabeads (Invitrogen). Bound proteins were eluted and analyzed by standard LC/MS at the Proteomics Unit of the "Institut de Recerca de la Vall d'Hebron" (Barcelona). In these experiments, amongst various other proteins, dBAF was identified with high confidence (mascot score: 97) and sequence coverage (16.7%).

### **RNAi knockdown and overexpression experiments**

RNAi-mediated dBAF knockdown experiments in S2 cells were performed according to standard procedures using 15µg of dsRNA encompassing the entire dBAF-coding region and, after 3 days, a second dose of 15µg of dsRNA for 4 days. The extent of dBAF depletion was determined by Western blot (Figure E1A) and immunostaining analyses (Figures 4 and E1B). NHK1 knockdown experiments were performed as for dBAF with two doses of 30µg of dsRNA from two different amplicons (667-1167bp and 1263-1780bp). The extent of NHK1 depletion was assessed from the effects on dBAF phosphorylation (Figure 6B). For experiments with knockdown *baf<sup>RNAi</sup>* flies, crosses were left at 25°C until third-instar larvae stage. Protein extracts were prepared from a mixture of salivary glands, imaginal discs and brains of third-instar *baf<sup>RNAi</sup>*; *actin5C-GAL4* larvae and analyzed by Western blot in order to determine the extent of dBAF depletion (Figure E1C). To analyze the effects on wing development, *baf<sup>RNAi</sup>*; *nub-GAL4* flies were kept in 75% ethanol, 25% glycerol solution for at least 24h at room temperature, washed in PBS, wings dissected and immediately mounted in Fauré's medium under gentle pressure. Images were collected using a 4X objective lens on a Nikon E-600 microscope equipped with an Olympus DP72 camera and CellF software.

Overexpression of dBAF-YFP and YFP-dBAF constructs in S2 cells was performed by transfecting pEYFP-N1-BAF and pEYFP-C1-BAF plasmids, where the fused protein is under the control of a 916bp long fragment from the 5'-regulatory region of *dBAF*. The extent of overexpression was determined by Western blot analyses (Figure E2A). In flies, overexpression of the indicated dBAF constructs were carried out by crossing flies carrying the corresponding UAS-dBAF construct to *actin5C-GAL4* flies and the extent of overexpression was determined by Western blot analyses of protein extracts prepared

from a mixture of salivary glands, imaginal discs and brains of third-instar larvae (Figures E2B and E2C). Wing phenotypes associated with the overexpression of the indicated dBAF constructs were analyzed as described above.

### **FACS analyses**

For FACS analyses, cells were fixed in 70% ethanol, stained with 20 $\mu$ g/ml propidium iodide in PBS, 0.1% Triton X-100, 0.2mg/ml RNase A, and analyzed in a Coulter Epics-XL flow cytometer. The percentages of cells at each cell cycle phase were estimated using FlowJo V.7.6.5 and WINCYCLE 4.0.0.4 for Windows software.

### **Immunostaining experiments**

Immunostaining experiments were performed in S2 cell, as described elsewhere (Moreno-Moreno et al., 2006) using  $\alpha$ -BAF (1:200),  $\alpha$ -CENP-C (1:500),  $\alpha$ -CID (1:500),  $\alpha$ HP1a (1:200),  $\alpha$ -HP1c (1:500),  $\alpha$ -Fibrillarin (1:2500),  $\alpha$ -Flag (1:500) and  $\alpha$ -TAP (1:300) antibodies. For visualization, slides were mounted in Mowiol (Calbiochem-Novabiochem) containing 0.2ng/ml DAPI (Sigma) and visualized by confocal microscope Leica TCS/SPE equipped with LAS/AF software. Images were analyzed using ImageJ and Adobe Photoshop software. For quantitative analyses, all images were acquired and processed identically, and fluorescence intensity was determined using ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) macros designed at the Advanced Digital Microscopy Core Facility of IRB Barcelona using the Fiji distribution of ImageJ (Schindelin et al., 2012). To determine the mean grey value per nuclei, masks were created from DAPI filtered and thresholded images. The number of spots per nuclei and their mean grey value were calculated on thresholded images running Analyze particles plugin on the FeatureJ Laplacian (<http://imagescience.org/meijering/software/featurej/>) at DAPI masked regions of interest. The output of both macros was a spreadsheet file in xls format. Statistical significance of the differences was assessed by the Kruskal-Wallis test.

### **Co-IP experiments**

Co-IP experiments were performed according to standard procedures. Crude cell extracts were obtained in 50mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.1mM PMSF, Protease Inhibitor Cocktail and, after homogenization with Dounce (B pestle), supplemented to 300mM NaCl and centrifuged at 14,000rpm for 15min at 4°C. The supernatant was incubated overnight at 4°C with  $\alpha$ -BAF antibodies or preimmune serum as control (mock). Then, Protein A Sepharose beads (GE Healthcare) were added



and incubated at 4°C for 2h. After incubation, beads were pelleted by centrifugation, washed and eluted in PLB 1X, 10%  $\beta$ -mercaptoethanol, and analyzed by Western blot.

### **Analysis of dBAF phosphorylation**

To analyze dBAF phosphorylation, S2 cell extracts were obtained in 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH8, 10% glycerol, 0.1% SDS, 1% NP40, 1mM PMSF, Protease Inhibitor cocktail, 50mM NaF, 2mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  and 10mM Glycerol Phosphate. Alkaline phosphatase (AP) treatment was performed with calf intestine AP (Roche) for 1h at 37°C in 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH8, 10mM  $\text{MgCl}_2$  and 1mM DTT. Phosphorylated forms were analyzed by Phos-tag gel electrophoresis (Kinoshita et al., 2006) according to manufacturers' instructions (Wako Chemicals Inc.). Briefly, 50 $\mu\text{M}$  of Acrylamide-pendant Phos-tag<sup>TM</sup> (AAL-107) and 100 $\mu\text{M}$  of  $\text{MnCl}_2$  were added to 10% polyacrylamide resolving gel solution before polymerization. After electrophoresis, gels were incubated 15min in transfer buffer with 1mM EDTA and 15min in transfer buffer without EDTA, and analyzed by Western blot.

### **RNase A treatment**

RNase A treatment of S2 cells was performed as described in Maison et al., 2002. Cells were grown on slides pretreated with Concanavalin A (0.5mg/ml), permeabilized in PBS containing 0.05% Triton X-100, 0.05% Tween for 5min, treated with 1mg/mL RNase A (Roche) in PBS for 10min at room temperature and washed twice with PBS. For immunostaining experiments, RNase A treated cells were fixed in 4% paraformaldehyde and processed as described above. For co-IP experiments, cells were grown in culture, treated with RNase A and processed as described above.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are thankful to Anna Lladó of the IRB Advanced Digital Microscopy Facility for designing of ImageJ macros and to Oscar Reina of the IRB Biostatistics and Bioinformatics Unit for statistical analyses. We are also thankful to Marc García-Montolio for work related to this manuscript and to Esther Fuentes, Estefanía Freire and Alicia Vera for technical assistance. This work was supported by grants from MICINN (CSD2006-49, BFU2009-07111 and BFU2012-30724) and the Generalitat de Catalunya (SGR2009-1023). This work was carried out within the framework of the "Centre de Referència en Biotecnologia" of the "Generalitat de Catalunya". SMG acknowledges receipt of a FPU fellowship from the MINECO.

**REFERENCES**

- Allshire RC, Karpen GH (2008) Epigenetic regulation of centromeric chromatin: Old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet* 9: 923-937.
- Ando S, Yang H, Nozaki N, Okazaki T, Yoda, K (2002) CENP-A, -B, and -C chromatin complex that contains the I-type alpha-satellite array constitutes the prekinetochore in HeLa cells. *Mol Cell Biol* 22: 2229-2241.
- Asencio C, Davidson IF, Santarella-Mellwig R, Ly-Hartig TB, Mall M, Wallenfang MR, Mattaj IW, Gorjánác M (2012) Coordination of kinase and phosphatase activities by Lem4 enables nuclear envelope reassembly during mitosis. *Cell* 150: 122-135.
- Bernad R, Sánchez P, Losada A (2009) Epigenetic specification of centromeres by CENP-A. *Exp Cell Res* 315: 3233-3241.
- Cai M, Huang Y, Zheng R, Wei SQ, Ghirlando R, Lee MS, Craigie R, Gronenborn AM, Clore GM (1998) Solution structure of the cellular factor BAF responsible for protecting retroviral DNA from autointegration. *Nat Struct Biol* 5: 903-909.
- Camahort R, Li B, Florens L, Swanson SK, Washburn MP (2007) Scm3 is essential to recruit the histone H3 variant CSE4 to centromeres and to maintain a functional kinetochore. *Mol Cell* 26: 853-865.
- Carroll CW, Milks KJ, Straight, AF (2010) Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. *J Cell Biol* 189: 1143-1155.
- Chen CC, Dechassa ML, Bettini E, Ledoux MB, Belisario C, Heun P, Luger K, Mellone BG (2014) CAL1 is the *Drosophila* CENP-A assembly factor. *J Cell Biol* 204: 313-329.
- Du Y, Topp CN, Dawe RK (2010) DNA binding of centromere protein C (CENP-C) is stabilized by single-stranded RNA. *PLoS Genet* 6: e1000835.
- Dunleavy EM, Roche D, Tagami H, Lacoste N, Ray-Gallet D, Nakamura Y, Daigo Y, Nakatani Y, Almouzni-Pettinotti G (2009) HJURP is a cell cycle dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* 137: 485-497.
- Erhardt S, Mellone BG, Betts CM, Zhang W, Karpen GH, Straight AF (2008) Genome-wide analysis reveals a cell cycle-dependent mechanism controlling centromere propagation. *J Cell Biol* 183: 805-818.

- Foltz DR, Jansen LE, Black BE, Bailey AO, Yates JRr, Cleveland DW (2006) The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol* 8: 427-429.
- Foltz DR, Jansen LET, Bailey AO, Yates III JR, Bassett EA, Wood S, Black BE, Cleveland DW (2009) Centromere specific assembly of CENP-A nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* 137: 472-484.
- Font-Burgada J, Rossell D, Auer H, Azorín F (2008) *Drosophila* HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC (ROW) to regulate gene expression. *Genes Dev* 22: 3007-3023.
- Fujita Y, Hayashi T, Kiyomitsu T, Toyoda Y, Kokubu A, Obuse C, Yanagida M (2007) Priming of centromere for CENP-A recruitment by human hMis18alpha, hMis18beta, and M18BP1. *Dev Cell* 12: 17-30.
- Fukagawa T, Brown WR (1997) Efficient conditional mutation of the vertebrate CENP-C gene. *Hum Mol Genet* 6: 2301-2308.
- Fukagawa T, Pendon C, Morris J, Brown WR (1999) CENP-C is necessary but not sufficient to induce formation of a functional centromere. *EMBO J* 18: 4196-4209.
- Gascoigne KE, Takeuchi K, Suzuki A, Hori T, Fukagawa T, Cheeseman IM (2011) Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes. *Cell* 145: 410-422.
- Gorjánác M, Klerkx EP, Galy V, Santarella R, López-Iglesias C, Askjaer P, Mattaj IW (2007) *Caenorhabditis elegans* BAF-1 and its kinase VRK-1 participate directly in post-mitotic nuclear envelope assembly. *EMBO J* 26: 132-143.
- Goshima G, Kiyomitsu T, Yoda K, Yanagida M (2003) Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J Cell Biol* 160: 25-39.
- Goshima G, Wollman R, Goodwin SS, Zhang N, Scholey JM, Vale RD, Stuurman N (2007) Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science* 316: 417-421.
- Guse A, Carroll CW, Moree B, Fuller CJ, Straight AF (2011) *In vitro* centromere and kinetochore assembly on defined chromatin templates. *Nature* 477: 354-358.

- Haraguchi T, Kojidani T, Koujin T, Shimi T, Osakada H, Mori C, Yamamoto A, Hiraoka Y (2008) Live cell imaging and electron microscopy reveal dynamic processes of BAF-directed nuclear envelope assembly. *J Cell Sci* 121: 2540-2554.
- Haraguchi T, Koujin T, Segura-Totten M, Lee KK, Matsuoka Y, Yoneda Y, Wilson KL, Hiraoka Y (2001) BAF is required for emerlin assembly into the reforming nuclear envelope. *J Cell Sci* 114: 4575-4585.
- Hayashi T, Fujita Y, Iwasaki O, Adachi Y, Takahashi K, Yanagida M (2004) Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell* 118: 715-729.
- Heeger S, Leismann O, Schittenhelm R, Schraidt O, Heidmann S, Lehner CF (2005) Genetic interactions of separase regulatory subunits reveal the diverged *Drosophila* Cenp-C homolog. *Genes Dev* 19: 2041-2053.
- Hemmerich P, Weidtkampt-Peters S, Hoischen C, Schmiedeberg L, Erliandri I, Diekmann S (2008) Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells. *J Cell Biol* 180: 1101-1114.
- Hori T, Amano M, Suzuki A, Backer CB, Welburn JP, Dong Y, McEwen BF, Shang WH, Suzuki E, Okawa K, *et al* (2008) CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell* 135: 1039-1052.
- Hori T, Shang WH, Takeuchi K, Fukagawa T (2013) The CCAN recruits CENP-A to the centromere and forms the structural core for kinetochore assembly. *J Cell Biol* 200: 45-60.
- Howman EV, Fowler KJ, Newson AJ, Redward S, MacDonald AC, Kalitsis P, Choo KH (2000) Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1148-1153.
- Kalitsis P, Fowler KJ, Earle E, Hill J, Choo KH (1998) Targeted disruption of mouse centromere protein C gene leads to mitotic disarray and early embryo death. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1136-1141.
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T (2006) Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics* 5: 749-757.

- Kwon MS, Hori T, Okada M, Fukagawa T (2007) CENP-C is involved in chromosome segregation, mitotic checkpoint function, and kinetochore assembly. *Mol Biol Cell* 18: 2155-2168.
- Lancaster OM, Cullen CF, Ohkura H (2007) NHK-1 phosphorylates BAF to allow karyosome formation in the *Drosophila* oocyte nucleus. *J Cell Biol* 179: 817-824.
- Lidsky PV, Sprenger F, Lehner CF (2013) Distinct modes of centromere protein dynamics during cell cycle progression in *Drosophila* S2R+ cells. *J Cell Sci* 26: 4782-4793.
- Liu J, Lee KK, Segura-Totten M, Neufeld E, Wilson KL, Gruenbaum Y (2003) MAN1 and emerlin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4598-4603.
- Liu J, Rolef Ben-Shahar T, Riemer D, Treinin M, Spann P, Weber K, Fire A, Gruenbaum Y (2000) Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Mol Biol Cell* 11: 3937-3947.
- Maddox PS, Corbett KD, Desai A (2012) Structure, assembly and reading of centromeric chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 22: 139-147.
- Maddox PS, Hyndman F, Monen J, Oegama K, Desai A (2007) Functional genomics identifies a Myb domain-containing protein family required for assembly of CENP-A chromatin. *J Cell Biol* 176: 757-763.
- Maison C, Bailly D, Peters AH, Quivy JP, Roche D, Taddei A, Lachner M, Jenuwein T, Almouzni G (2002) Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nature Genet* 30: 329-334.
- Malik HS, Henikoff S (2009) Major evolutionary transitions in centromere complexity. *Cell* 138: 1067-1082.
- Margalit A, Brachner A, Gotzmann J, Foisner R, Gruenbaum Y (2007) Barrier-to-autointegration factor - a BAFfling little protein. *Trends Cell Biol* 17: 202-208.
- Margalit A, Segura-Totten M, Gruenbaum Y, Wilson KL (2005) Barrier-to-autointegration factor is required to segregate and enclose chromosomes within the nuclear

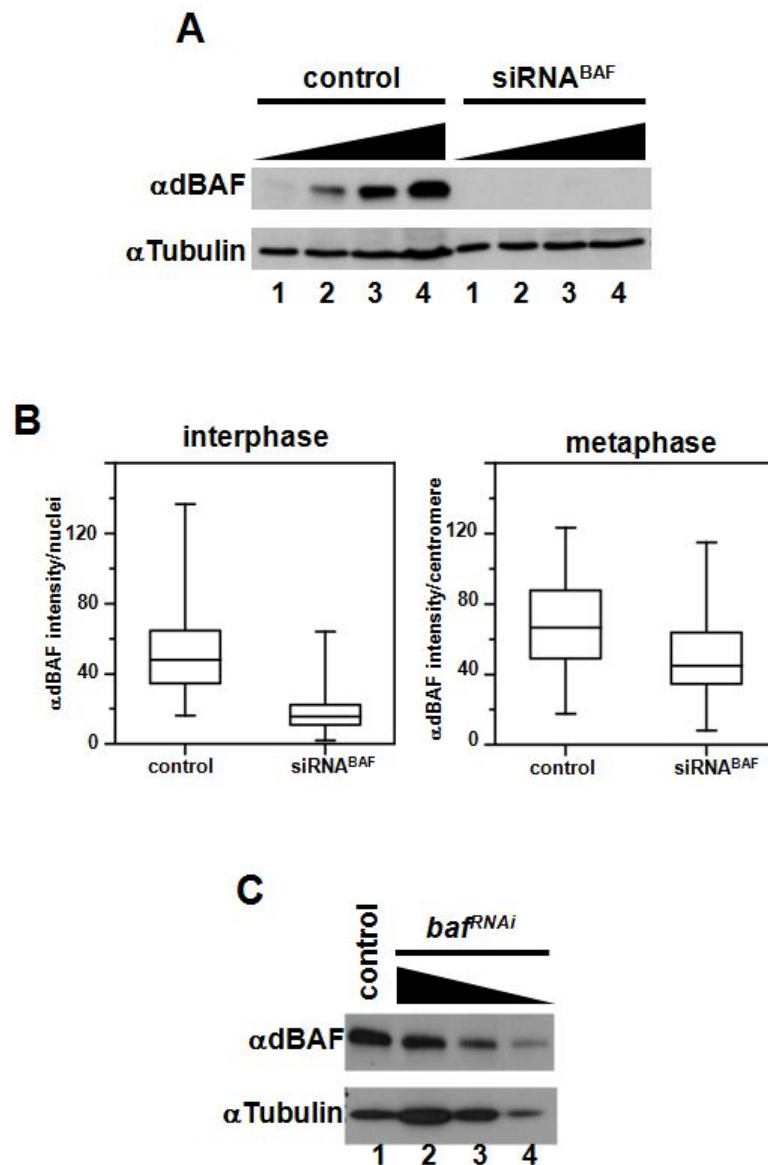
- envelope and assemble the nuclear lamina. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3290-3295.
- Mellone BG, Grive KJ, Shteyn V, Bowers SR, Oderberg I, Karpen GH (2011) Assembly of *Drosophila* centromeric chromatin proteins during mitosis. *PLoS Genet* 7:e1002068.
- Mizuguchi G, Xiao H, Wisniewski J, Smith MM, Wu C (2007) Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes. *Cell* 129: 1153-1164.
- Molitor TP, Traktman P (2014) Depletion of the protein kinase VRK1 disrupts nuclear envelope morphology and leads to BAF retention on mitotic chromosomes. *Mol Biol Cell* 25: 891-903.
- Moreno-Moreno O, Torras-Llort M, Azorín F (2006) Proteolysis restricts localization of CID, the centromere-specific histone H3 variant of *Drosophila*, to centromeres. *Nucleic Acids Res* 34: 6247-6255.
- Nichols RJ, Wiebe MS, Traktman P (2006) The vaccinia-related kinases phosphorylate the N' terminus of BAF, regulating its interaction with DNA and its retention in the nucleus. *Mol Biol Cell* 17: 2451-2464.
- Oegema K, Desai A, Rybina S, Kirkham M, Hyman AA (2001) Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 153: 1209-1226.
- Perpelescu M, Fukagawa T (2011) The ABCs of CENPs. *Chromosoma* 120: 425-446.
- Pidoux AL, Choi ES, Abbott JKR, Liu X, Kagansky A, Castillo AG, Hamilton GL, Richardson W, Rappsilber J, He X, *et al* (2009) Fission yeast Scm3: a CENP-A receptor required for integrity of subkinetochore chromatin. *Mol Cell* 33; 299-311.
- Przewloka MR, Glover DM (2009) The kinethocore and the centromere: a working long distance relationship. *Annu Rev Genet* 43: 439-465.
- Przewloka MR, Venkei Z, Bolanos-García VM, Debski J, Dadlez M, Glover DM (2011) CENP-C is a structural platform for kinetochore assembly. *Curr Biol* 21: 399-405.

- Régnier V, Vagnarelli P, Fukagawa T, Zerjal T, Burns E, Trouche D, Earnshaw W, Brown W (2005) CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Mol Cell Biol* 25: 3967-3981.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, *et al* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676-682.
- Schittenhelm RB, Althoff F, Heidmann S, Lehner CF (2010) Detrimental incorporation of excess Cenp-A/Cid and Cenp-C into *Drosophila* centromeres is prevented by limiting amounts of the bridging factor Cal1. *J Cell Sci* 123: 3768-3779.
- Schulz JG, David G, Hassan BA (2009) A novel method for tissue-specific RNAi rescue *in Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 37: e93.
- Screpanti E, De Antoni A, Alushin GM, Petrovic A, Melis T, Nogales E, Musacchio A (2011) Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Curr Biol* 21: 391-398.
- Segura-Totten M, Wilson KL (2004) BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol* 14: 261-266.
- Shimi T, Koujin T, Segura-Totten M, Wilson KL, Haraguchi T, Hiraoka Y (2004) Dynamic interaction between BAF and emerin revealed by FRAP, FLIP, and FRET analyses in living HeLa cells. *J Struct Biol* 147: 31-41.
- Shivaraju M, Camahort R, Mattingly M, Gerton JL (2011) Scm3 is a centromeric nucleosome assembly factor. *J Biol Chem* 286: 12016-12023.
- Shuaib M, Ouararhni K, Dimitrov S, Hamiche A (2010) HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 1349-1354.
- Stoler S, Rogers K, Weitze S, Morey L, Fitzgerald-Hayes M, Baker RE (2007) Scm3, an essential *Saccharomyces cerevisiae* centromere protein required for G2/M progression and Cse4 localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10571-10576.
- Torras-Llort M, Moreno-Moreno O, Azorín F (2009) Focus on the centre: The role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *EMBO J* 28: 2337-2348.

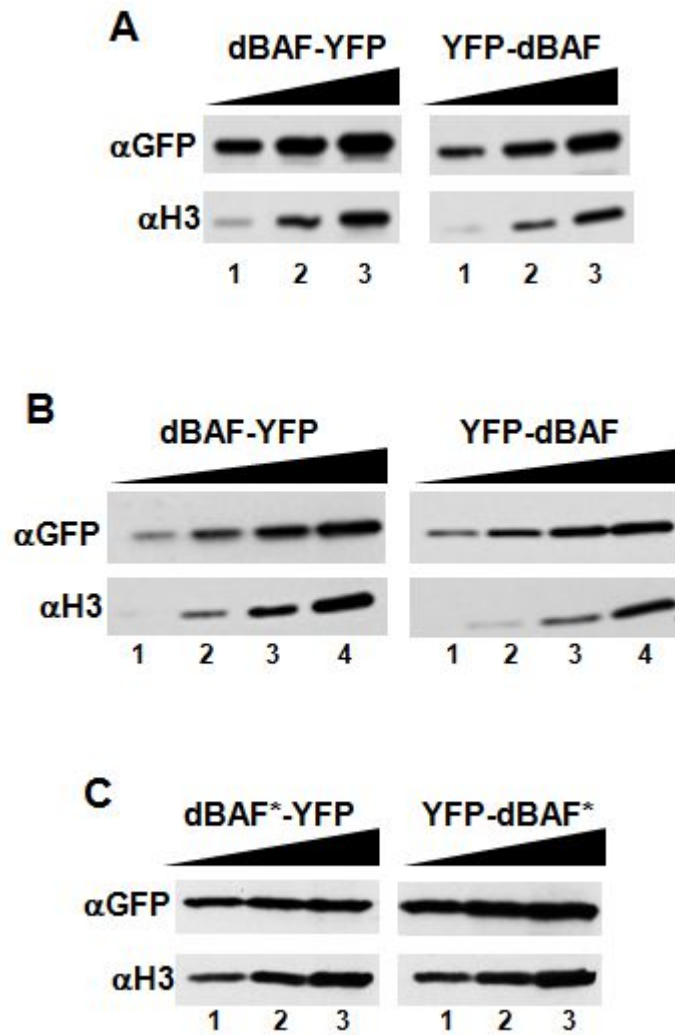
- Verdaasdonk JS, Bloom K (2011) Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 320-332.
- Westermann S, Scheleiffer A (2013) Family matters: structural and functional conservation of centromere-associated proteins from yeast to humans. *Trends Cell Biol* 23: 260-269.
- Williams JS, Hayashi T, Yanagida M, Russell P (2009) Fission yeast Scm3 mediates stable assembly of Cnp1/CENP-A into centromeric chromatin. *Mol Cell* 33: 287-298.
- Wong LH, Brettingham-Moore KH, Chan L, Quach JM, Anderson MA, Northrop EL, Hannan R, Saffery R, Shaw ML, Williams E, *et al* (2007) Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. *Genome Res* 17: 1146-1160.



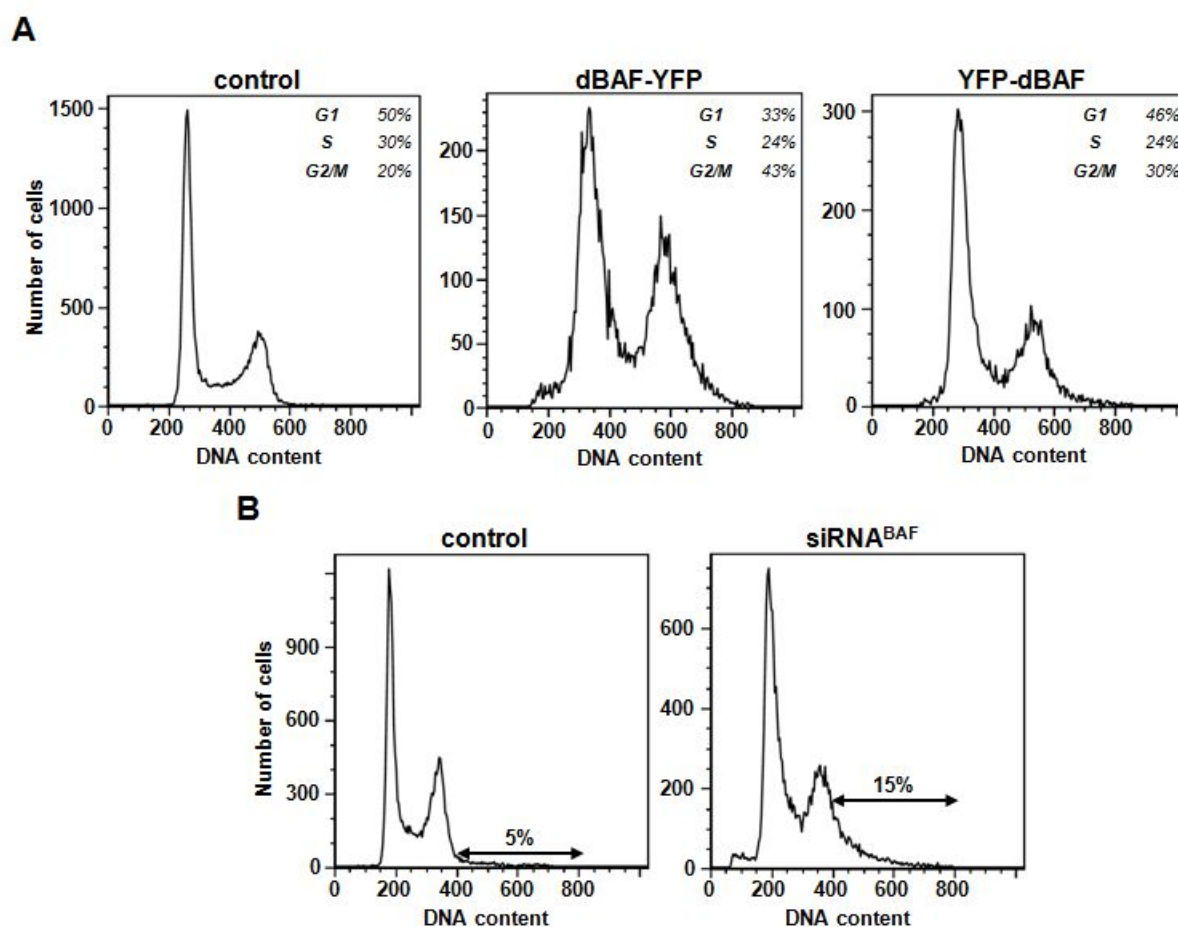
## SUPPLEMENTAL FIGURES



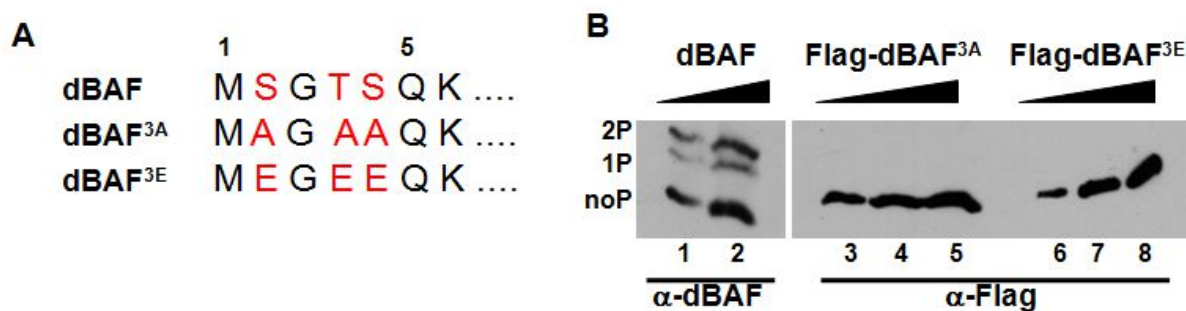
**Figure E1.** (A) S2 cells were treated with dsRNA against dBAF ( $\text{siRNA}^{\text{BAF}}$ ) (right) or not (control) (left), and the extent of dBAF depletion was determined by Western blot analyses of increasing amounts of total cell extracts (lanes 1-4) using  $\alpha$ -dBAF antibodies (top) and  $\alpha$ -Tubulin antibodies as loading control. (B) On the left, the intensity of  $\alpha$ -dBAF, determined as the average grey value per nuclei, is presented for  $\text{siRNA}^{\text{BAF}}$  and control interphase cells. On the right, the intensity of  $\alpha$ -dBAF at centromeres, determined as the average grey value per centromere, is presented for  $\text{siRNA}^{\text{BAF}}$  and control metaphase chromosomes. (C) The efficiency of dBAF depletion in  $\text{ba1}^{\text{RNAi}}$ ;  $\text{actin5C-GAL4}$  flies is determined by Western blot analyses of decreasing amounts of extract prepared from a mixture of salivary glands, imaginal discs and brains of third-instar larvae (lanes 2-4) using  $\alpha$ -dBAF antibodies (top) and  $\alpha$ -Tubulin antibodies as loading control. Lane 1 corresponds to a similar extract prepared from control ( $\text{wt}$ ) flies.



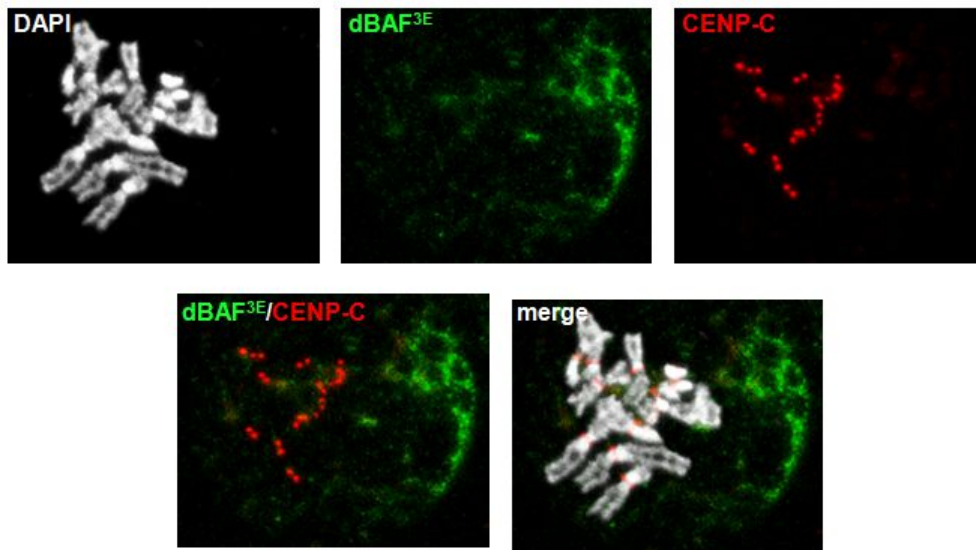
**Figure E2.** (A) The extent of overexpression of dBAF-YFP and YFP-dBAF constructs in S2 cells is determined by Western blot analyses of increasing amounts of total cell extracts (lanes 1-3) using  $\alpha$ -GFP antibodies (top) and  $\alpha$ -H3 antibodies (bottom) as loading control. (B) The extent of overexpression of dBAF-YFP and YFP-dBAF in *actin5C-GAL4* flies carrying the corresponding UAS-dBAF constructs is determined by Western blot analyses of increasing amounts of extracts prepared from a mixture of salivary glands, imaginal discs and brains of third-instar larvae (lanes 1-4). (C) As in B, but for RNAi-resistant dBAF-YFP\* and YFP-dBAF\* forms.



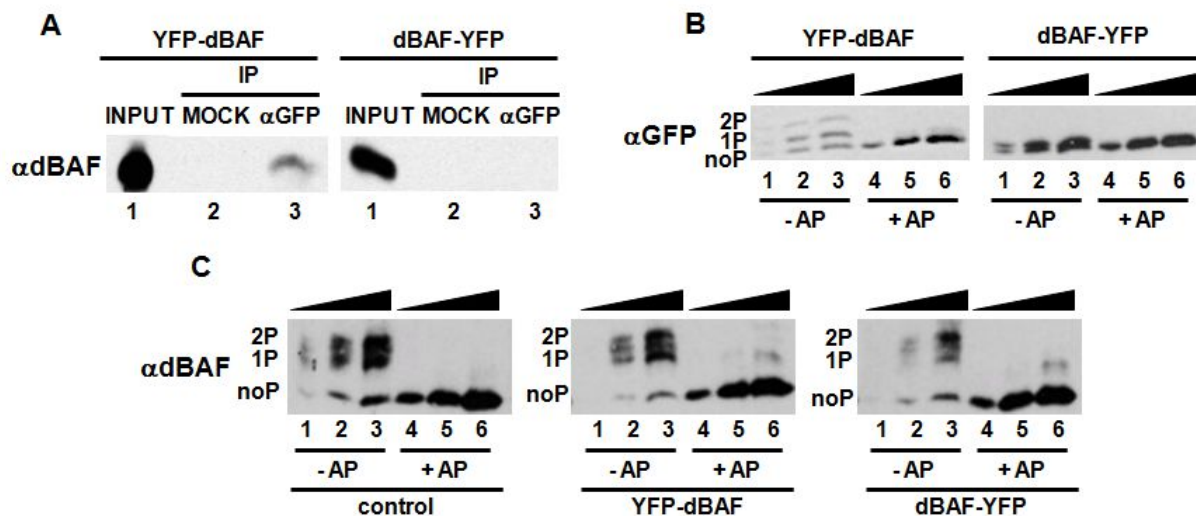
**Figure E3.** (A) The cell cycle profiles of S2 cells expressing dBAF-YFP (center) and YFP-dBAF (right) are compared to control cells expressing no construct (left). The percentage of cells in G1, S and G2 are indicated. (B) Cell cycle profiles of S2 cells treated with dsRNA against dBAF (siRNA<sup>BAF</sup>) (right) and control cells (left). The percentage of cells showing high DNA content is indicated.



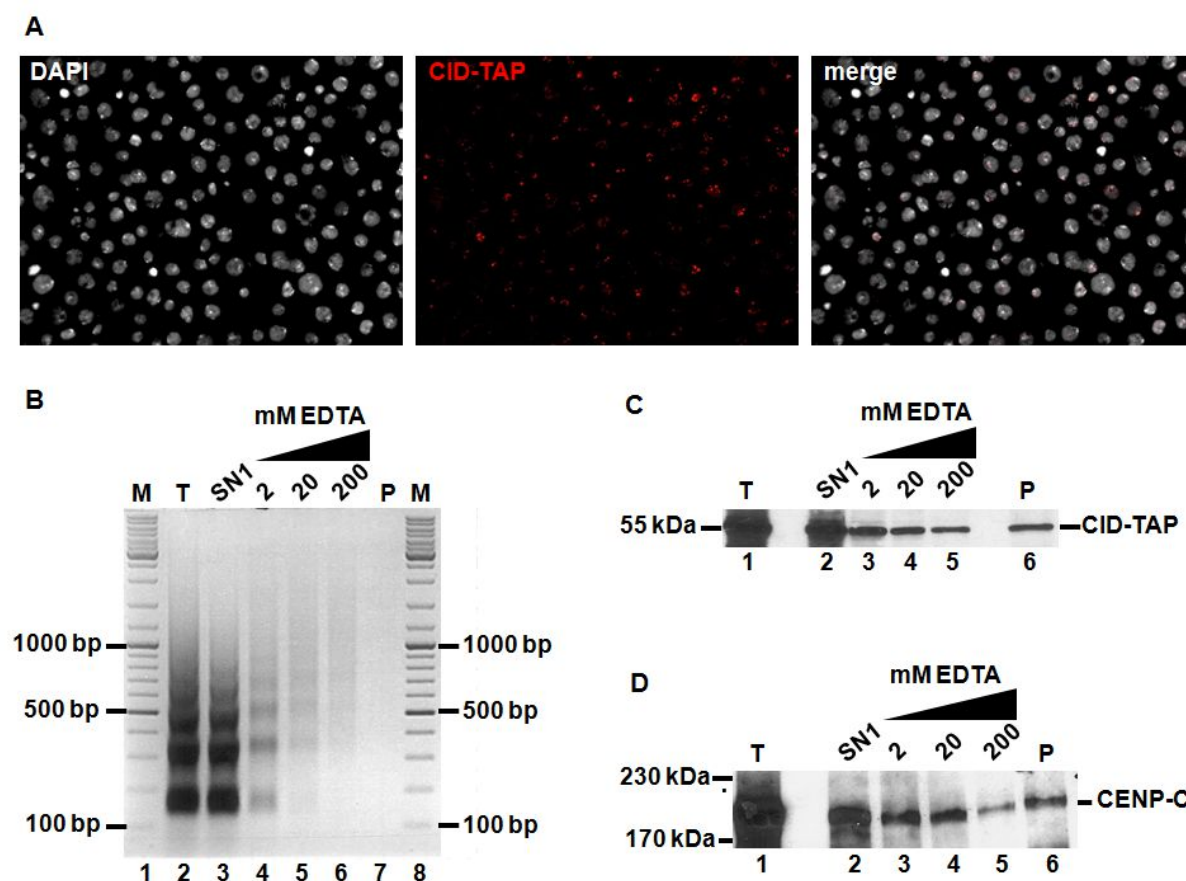
**Figure E4.** (A) Sequence of the dBAF N-terminus (aa 1-7). In red, residues phosphorylated by NHK1 that are replaced to A in the phosphomutant Flag-dBAF<sup>3A</sup> form and to E in the phosphomimetic Flag-dBAF<sup>3E</sup> form. (B) Phosphorylation of dBAF (left), Flag-dBAF<sup>3A</sup> (center) and Flag-dBAF<sup>3E</sup> (right) is analyzed by Phos-tag gel electrophoresis. Increasing amounts of extracts are analyzed by Western blot using  $\alpha$ -dBAF (left) and  $\alpha$ -Flag (center and right) antibodies. The positions corresponding to unphosphorylated (noP), and mono- (1P) and di-phosphorylated (2P) species are indicated.



**Figure E5.** The pattern of immunolocalization of Flag-dBAF<sup>3E</sup> is determined with  $\alpha$ -Flag antibodies in metaphase chromosomes from S2 cells transfected with a Flag-dBAF<sup>3E</sup> expressing construct. The pattern of immunostaining with  $\alpha$ -CENP-C antibodies (red) is also presented. DNA was stained with DAPI.



**Figure E6.** (A) Co-IP experiments with  $\alpha$ -GFP antibodies (lanes 3) were performed with extracts prepared from cells expressing YFP-dBAF (left) and dBAF-YFP (right). Lanes 2 correspond to mock IPs performed with preimmune serum. IP-materials were analyzed by Western blot using  $\alpha$ -dBAF antibodies. (B) The patterns of phosphorylation of YFP-dBAF (left) and dBAF-YFP (right) are analyzed by Phos-tag gel electrophoresis. Increasing amounts of extracts are analyzed by Western blot using  $\alpha$ -GFP antibodies before (lanes 1-3) and after (lanes 4-6) treatment with alkaline phosphatase (AP). The positions corresponding to unphosphorylated (noP), and mono- (1P) and di-phosphorylated (2P) species are indicated. (C) The pattern of phosphorylation of endogenous dBAF is determined by Phos-tag gel electrophoresis in cells overexpressing YFP-dBAF (center) and dBAF-YFP (right), and cells expressing a similar empty YFP vector as control (left). Increasing amounts of extracts are analyzed by Western blot using  $\alpha$ -dBAF antibodies before (lanes 1-3) and after (lanes 4-6) treatment with alkaline phosphatase (AP). The positions corresponding to unphosphorylated (noP), and mono- (1P) and di-phosphorylated (2P) species are indicated.



**Figure E7.** (A) Stable S2 cells expressing CID-TAP are stained with  $\alpha$ -TAP antibodies (in red) to determine the pattern of localization of CID-TAP. DNA was stained with DAPI. (B) Agarose gel electrophoretic analysis of total DNA fragments produced after micrococcal nuclease digestion of purified nuclei prepared from stable S2 cells expressing CID-TAP (T) (lane 2) and those contained in fraction SN1 (lane 3), released at increasing EDTA concentration (lanes 4-6) or retained in the insoluble pellet (P) (lane 7) (see Materials and Methods for details). Lanes 1 and 8 correspond to molecular weight markers (M). The size in bp of selected markers is indicated. (C) CID-TAP content of the indicated fractions is determined by Western blot analysis using  $\alpha$ -TAP antibodies. The position corresponding to a selected molecular weight marker is indicated. (D) CENP-C content of the indicated fractions is determined by Western blot analysis using  $\alpha$ -CENP-C antibodies. The positions corresponding to selected molecular weight markers are indicated.

## **CAPÍTOL 3**



## **A conserved arginine-rich motif within the hypervariable N-domain of *Drosophila* centromeric histone H3 (CenH3) mediates BubR1 recruitment**

Mònica Torras-Llort<sup>1,2</sup> \*, Sònia Medina-Giró<sup>1,2</sup> \*, Olga Moreno-Moreno<sup>1,2</sup> and Fernando Azorín<sup>1,2</sup>,

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology of Barcelona, CSIC. 08028 Barcelona. Spain.

<sup>2</sup>Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona. 08028 Barcelona. Spain.

\*This authors contributed equally to this work

### **REVISTA:**

PLoS One

2010 Oct 29;5(10):e13747.

PMID: 21060784

Corresponding author:

Dr. F. Azorín

Institute of Molecular Biology of Barcelona, CSIC

Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona

Baldiri Reixac, 10. 08028 Barcelona. Spain

Phone: 3493-4034958; Fax: 3493-4034979; e-mail: fambmc@ibmb.csic.es





## **INFORME DEL DIRECTOR DE TESI SOBRE EL FACTOR D'IMPACTE I LA COAUTORIA DE LA PUBLICACIÓ**

El Dr. Ferran Azorín Marín, Director de la Tesi Doctoral de Sònia Medina Giró, informa que el manuscrit "*A conserved arginine-rich motif within the hypervariable N-domain of Drosophila centromeric histone H3 (CenH3) mediates BubR1 recruitment*" va ser publicat a la revista PloS One l'any 2010. Aquesta revista està dintre del primer quartil de la categoria *Multidisciplinary Sciences* i el seu factor d'impacte segons *Journal Citation Reports* era de 4,411 per l'any 2010 i de 3,534 per l'any 2013.

Aquest treball va ser fruit de la col·laboració de la doctoranda Sònia Medina-Giró i la Dra. Mònica Torras-Llort amb la contribució puntual de la Dra. Olga Moreno-Moreno. En concret, els experiments recollits a les Figures 4 i S3 van ser realitzades integrament per la doctoranda. A més, la doctoranda va realitzar alguns dels clonatges i les immunolocalitzacions descrites en les Figura S4 i S5, i una part important dels experiments recollits a les Figures 1 i 2. Finalment, la doctoranda també va participar en l'anàlisi i discussió dels resultats així com en la redacció del manuscrit. Cal indicar que els resultats descrits en aquest treball no han estat presentats en cap altre Tesi Doctoral.

El Director,

Dr. Ferran Azorín Marín



# A Conserved Arginine-Rich Motif within the Hypervariable N-Domain of *Drosophila* Centromeric Histone H3 (CenH3<sup>CID</sup>) Mediates BubR1 Recruitment

Mònica Torras-Llort<sup>1</sup>, Sònia Medina-Giró<sup>2</sup>, Olga Moreno-Moreno, Fernando Azorín\*

Institute of Molecular Biology of Barcelona, CSIC, and Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona, Barcelona, Spain

## Abstract

**Background:** Centromere identity is determined epigenetically by deposition of CenH3, a centromere-specific histone H3 variant that dictates kinetochore assembly. The molecular basis of the contribution of CenH3 to centromere/kinetochore functions is, however, incompletely understood, as its interactions with the rest of centromere/kinetochore components remain largely uncharacterised at the molecular/structural level.

**Principal Findings:** Here, we report on the contribution of *Drosophila* CenH3<sup>CID</sup> to recruitment of BubR1, a conserved kinetochore protein that is a core component of the spindle attachment checkpoint (SAC). This interaction is mediated by the N-terminal domain of CenH3<sup>CID</sup> (NCenH3<sup>CID</sup>), as tethering NCenH3<sup>CID</sup> to an ectopic reporter construct results in BubR1 recruitment and BubR1-dependent silencing of the reporter gene. Here, we also show that this interaction depends on a short arginine (R)-rich motif and that, most remarkably, it appears to be evolutionarily conserved, as tethering constructs carrying the highly divergent NCenH3 of budding yeast and human also induce silencing of the reporter. Interestingly, though NCenH3 shows an exceedingly low degree of conservation, the presence of R-rich motives is a common feature of NCenH3 from distant species. Finally, our results also indicate that two other conserved sequence motives within NCenH3<sup>CID</sup> might also be involved in interactions with kinetochore components.

**Conclusions:** These results unveil an unexpected contribution of the hypervariable N-domain of CenH3 to recruitment of kinetochore components, identifying simple R-rich motives within it as evolutionary conserved structural determinants involved in BubR1 recruitment.

**Citation:** Torras-Llort M, Medina-Giró S, Moreno-Moreno O, Azorín F (2010) A Conserved Arginine-Rich Motif within the Hypervariable N-Domain of *Drosophila* Centromeric Histone H3 (CenH3<sup>CID</sup>) Mediates BubR1 Recruitment. PLoS ONE 5(10): e13747. doi:10.1371/journal.pone.0013747

**Editor:** Daniela Cimini, Virginia Tech, United States of America

**Received:** June 1, 2010; **Accepted:** October 7, 2010; **Published:** October 29, 2010

**Copyright:** © 2010 Torras-Llort et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** SMG acknowledges receipt of a FPU fellowship from MCINN. This work was financed by grants from “Ministerio de Ciencia e Innovación” (BFU2009-07111; CSD2006-00049) and “Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica” (2009SGR1023). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: fambmc@ibmb.csic.es

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Centromere function ensures accurate chromosome segregation during mitosis and meiosis, as the centromere dictates assembly of the kinetochore that, in turn, regulates the spindle attachment checkpoint (SAC), which delays anaphase onset until all chromosomes are correctly attached in a bipolar fashion to the mitotic spindle. Centromere identity is regulated epigenetically by deposition of the centromere-specific histone H3 variant CenH3 that, being exclusively found at centromeres, constitutes the structural and functional foundation for kinetochore assembly and function [1,2,3,4,5,6,7,8]. CenH3 is essential for viability, being required for centromeric localisation of all centromere/kinetochore proteins analysed to date.

Little is known, however, about the actual molecular/structural basis of the contribution(s) of CenH3 to kinetochore assembly and function, as its interactions with the rest of centromere/kinetochore proteins is just beginning to be understood. In this context, it was recently reported that CENP-N and CENP-C, which are compo-

nents of the constitutive centromere associated network (CCAN) in vertebrates [9,10], directly interact with human CenH3<sup>CENP-A</sup>-containing nucleosomes *in vitro* [11,12]. These interactions involve the C-terminal and centromere targeting (CATD) domains of CenH3<sup>CENP-A</sup>, respectively. Here, we report on the contribution of the N-terminal domain of *Drosophila* CenH3<sup>CID</sup> (NCenH3<sup>CID</sup>) to recruitment of BubR1, an evolutionarily conserved kinetochore protein that is a core component of the spindle attachment checkpoint (SAC) [13,14,15]. This interaction is mediated by a simple arginine (R)-rich motif within the hypervariable NCenH3<sup>CID</sup> domain. Our results also suggest that this interaction is likely conserved in the highly divergent NCenH3 of budding yeast and humans. Most remarkably, though NCenH3 is poorly conserved through evolution [16,17], the presence of R-rich motives is a common feature of NCenH3 from distant species, including budding yeast and humans [2]. In *Drosophila*, NCenH3<sup>CID</sup> contains two other conserved motives that might also mediate interactions with kinetochore components. Altogether, these results indicate that conserved sequence motives within the

hypervariable NCenH3 domain mediate centromere/kinetochore interactions.

## Results and Discussion

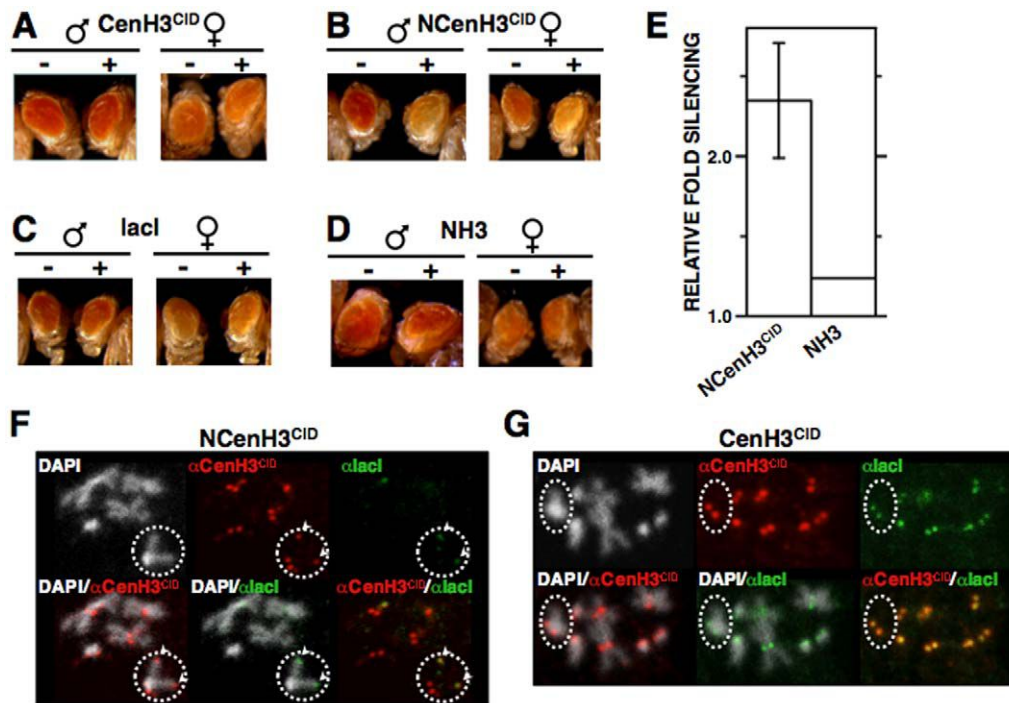
### Targeting NCenH3<sup>CID</sup> to an ectopic *white*-reporter constructs silences reporter expression

To analyse the contribution of CenH3<sup>CID</sup> to the regulation of centromere/kinetochore interactions, we performed ectopic targeting experiments using *Drosophila* transgenic lines carrying a *white*-reporter transgene that contains multiple binding sites for the bacterial lacI repressor at the regulatory region, about 500 bp upstream from the reporter gene. In these experiments, lines *S9.2* and *157.1* were used, which contain 46 and 256 lacI-repeats inserted on the third- and X-chromosome, respectively [18]. We anticipated that, if resulting in recruitment of kinetochore proteins, tethering of fused CenH3<sup>CID</sup>-lacI proteins would interfere with expression of the *white*-reporter gene, which is easily monitored by analysing changes in eye pigmentation. As shown in Figure 1A, in line *S9.2*, expression of a CenH3<sup>CID</sup>-lacI fusion does not significantly affect *white* expression. In contrast, expression of an NCenH3<sup>CID</sup>-lacI fused protein, which carries only the N-terminal domain of CenH3<sup>CID</sup>, significantly silences reporter expression (Figure 1B and 1E). This effect is specific of NCenH3<sup>CID</sup>, as no silencing is observed in flies expressing the lacI-DNA-binding domain alone (Figure 1C) [18,19], or, more important, an NH3-lacI construct (Figure 1D and 1E), carrying the N-terminal domain

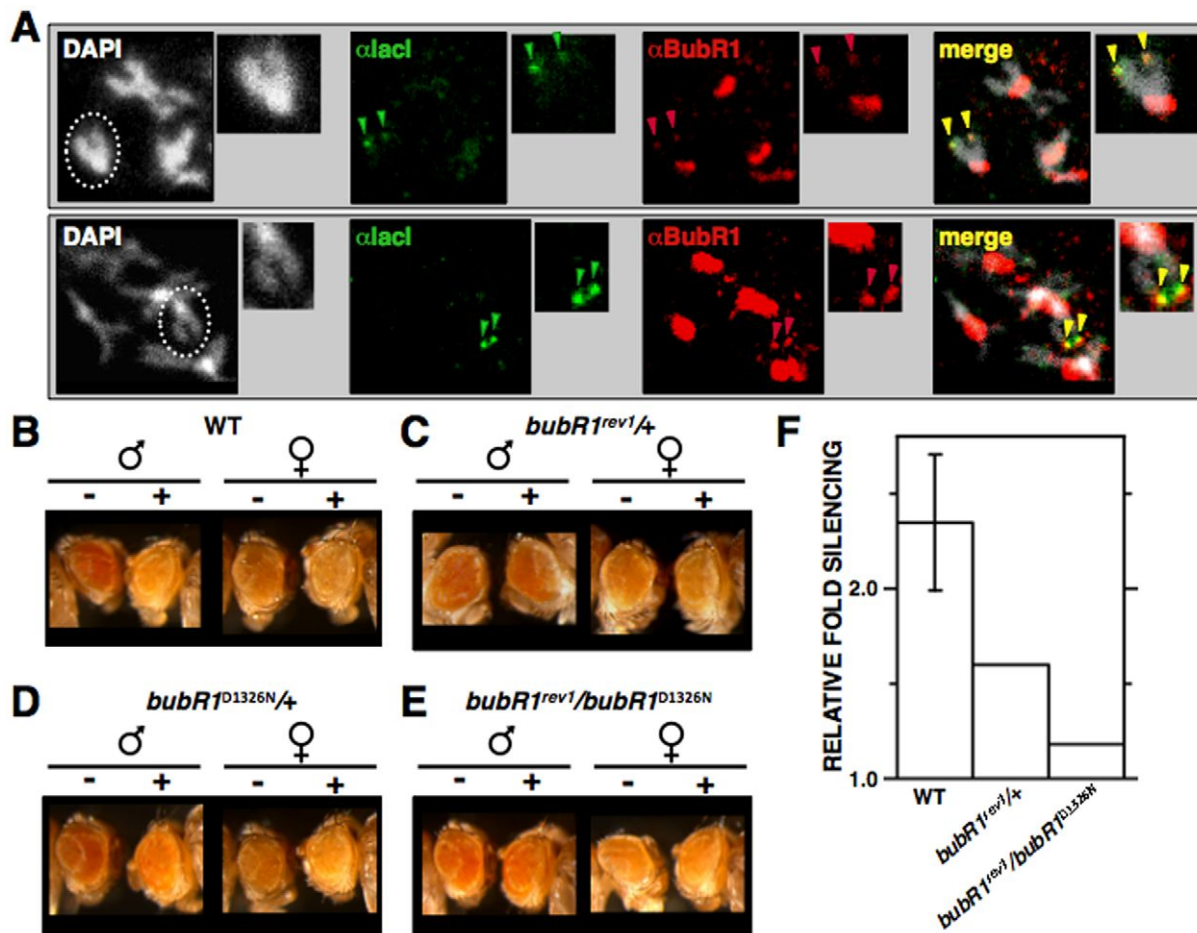
of canonical histone H3. Similar results were obtained when expression was carried out in line *157.1* (Figure S1A, D and E), though, in this case, the observed effects are weaker since expression of the *white*-reporter is low in control flies expressing no fused proteins [18,19]. Immunolocalisation experiments showed that CenH3<sup>CID</sup>-lacI fails to localise to the reporter construct but, on the contrary, incorporates to all centromeres (Figures 1G and S2A), indicating that, in CenH3<sup>CID</sup>-lacI, the histone-fold domain (HFD) of CenH3<sup>CID</sup> predominates over the lacI-DNA-binding domain, so that CenH3<sup>CID</sup>-lacI incorporates into nucleosomes, like endogenous CenH3<sup>CID</sup> does, being specifically deposited at centromeres. On the other hand, NCenH3<sup>CID</sup>-lacI exclusively localises to the ectopic reporter sites (Figure 1F and S2B). From these results, we conclude that lack of silencing observed in the case of CenH3<sup>CID</sup>-lacI is actually the consequence of its failure to localise to the ectopic reporter sites.

### Tethering NCenH3<sup>CID</sup>-lacI results in ectopic BubR1 recruitment

Next, we addressed whether ectopic targeting of NCenH3<sup>CID</sup>-lacI actually results in recruitment of kinetochore proteins. For this purpose, immunolocalisation experiments using antibodies against several *Drosophila* kinetochore proteins were performed (Figures 2 and 3). In mitotic chromosomes, tethering NCenH3<sup>CID</sup>-lacI to the reporter construct results in recruitment of BubR1, as distinct ectopic  $\alpha$ BubR1 signals are detected on the X-chromosome in approximately 15% of chromosomes (N = 60; p < 0.001) (Figure 2A).



**Figure 1. Tethering NCenH3<sup>CID</sup> to a *white*-reporter silences reporter expression.** (A–D) The eye phenotype of *S9.2* flies expressing the indicated lacI-fused proteins (+) is compared to that of siblings where no fused protein is expressed (–). Results are presented for both female and male individuals. (E) Quantitative analysis is presented for lines expressing NCenH3<sup>CID</sup>-lacI and NH3<sup>CID</sup>-lacI constructs. Relative fold silencing is expressed as the ratio between OD<sub>480</sub> of control *S9.2* lines expressing no fused protein and that of lines expressing the indicated constructs. For NCenH3<sup>CID</sup>-lacI, results correspond to the average of three independent lines. For NH3<sup>CID</sup>-lacI, results are presented for a single representative line. (F and G) NCenH3<sup>CID</sup>-lacI, but not CenH3<sup>CID</sup>-lacI, bind to the ectopic *white*-reporter construct. Fused proteins were expressed in *157.1* flies, where the *white*-reporter is inserted at a distal position on the X-chromosome, and localisation was determined in mitotic chromosomes by immunostaining with  $\alpha$ lacI (green) and  $\alpha$ CenH3<sup>CID</sup> (red), which also detects endogenous CenH3<sup>CID</sup> at centromeres. Dotted circles indicate X-chromosomes. Arrows indicate co-localisation of  $\alpha$ CenH3<sup>CID</sup> and  $\alpha$ lacI signals at ectopic sites on the X-chromosome, reflecting binding of NCenH3<sup>CID</sup>-lacI to the reporter. DNA was stained with DAPI. See Figure S4 for a description of the constructs. doi:10.1371/journal.pone.0013747.g001



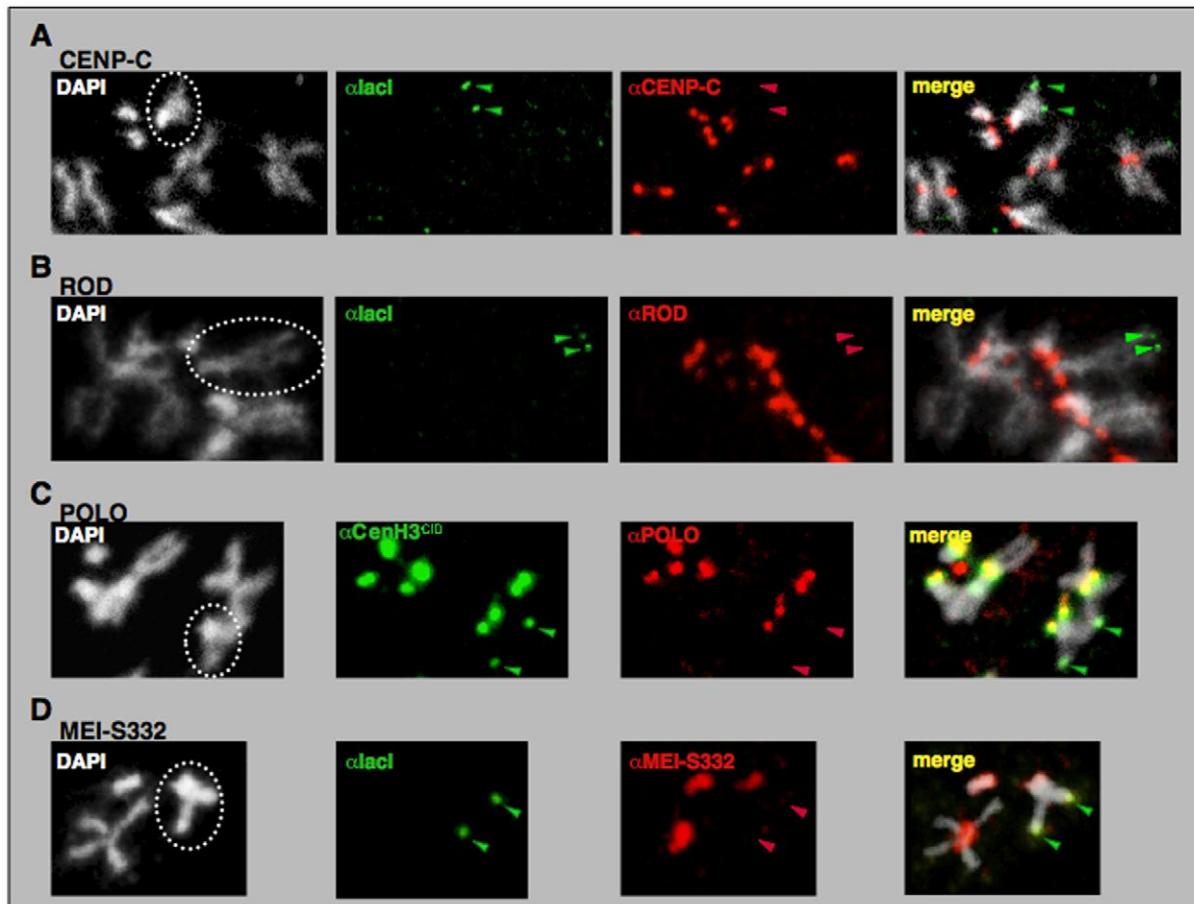
**Figure 2. NCenH3<sup>CID</sup> mediates BubR1 recruitment.** (A) Localisation of NCenH3<sup>CID</sup>-lacI and BubR1 was determined in mitotic chromosomes from 157.1 flies by immunostaining with  $\alpha$ lacI (green) and  $\alpha$ BubR1 (red). Dotted circles indicate X-chromosomes. Arrows indicate co-localisation of  $\alpha$ lacI and  $\alpha$ BubR1 signals at ectopic sites on the X-chromosome, reflecting recruitment of BubR1 by NCenH3<sup>CID</sup>-lacI. Enlarged images are shown on the right of each panel for easier visualisation. DNA was stained with DAPI. Two independent examples are presented. On the bottom, pictures were recorded to a higher intensity to better visualise the ectopic  $\alpha$ BubR1 signals observed on the X-chromosome. (B–E) Silencing induced by NCenH3<sup>CID</sup>-lacI depends on BubR1. The eye phenotype of S9.2 flies expressing NCenH3<sup>CID</sup>-lacI (+) or not (–) is presented in the indicated genetic backgrounds. Results are presented for both female and male individuals. (F) Quantitative analysis is presented for flies expressing NCenH3<sup>CID</sup>-lacI in the indicated genetic backgrounds. Relative fold silencing is expressed as the ratio between OD<sub>480</sub> of control S9.2 flies expressing no fused protein and that of flies expressing NCenH3<sup>CID</sup>-lacI in the indicated genetic backgrounds. For wild-type, results correspond to the average of three independent lines. For mutants, results are presented for a single representative line. doi:10.1371/journal.pone.0013747.g002

These  $\alpha$ BubR1 signals overlap with  $\alpha$ lacI signals, which reflect binding of NCenH3<sup>CID</sup>-lacI to the lacI-repeats and, therefore, mark the position corresponding to the reporter. Ectopic  $\alpha$ BubR1 signals are weak compared to those observed at the kinetochore, indicating that ectopic BubR1 recruitment is less efficient than at the kinetochore, which might simply reflect the limited number of NCenH3<sup>CID</sup>-lacI molecules that can be targeted to the reporter, a maximum of 256 copies. It is also possible that additional factors are involved in stabilising BubR1 at the kinetochore. Actually, as discussed below (see “General considerations and implications”), recruitment and maintenance of BubR1 at kinetochores might involve different mechanisms. In good agreement with these results, silencing of the reporter depends on BubR1, as it is suppressed by *bubR1* mutations (Figure 2B–F). In these experiments, *bubR1<sup>rev1</sup>* and *bubR1<sup>D1326N</sup>* mutants were used, which correspond to a deletion and a point-mutation at the catalytic kinase-domain, respectively [20,21]. In heterozygous *bubR1<sup>rev1/+</sup>* flies, silencing induced by NCenH3<sup>CID</sup>-lacI is strongly suppressed (Figure 2C and 2F), when compared to control wild-type flies (Figure 2B and 2F). This

dominant suppressor effect is observed in approximately 50% of the off-spring (N = 75), the rest showing only slight or no suppression. *bubR1<sup>rev1</sup>* mutation is homozygous lethal, so that silencing induced by NCenH3<sup>CID</sup>-lacI could not be analysed in homozygous *bubR1<sup>rev1/bubR1<sup>rev1</sup></sup>* flies. However, suppression is enhanced in trans-heterozygous *bubR1<sup>rev1/bubR1<sup>D1326N</sup></sup>*, where the complete off-spring (N = 55) shows strong suppression (Figure 2E and 2F). On the other hand, heterozygous *bubR1<sup>D1326N/+</sup>* flies show only slight suppression (Figure 2D).

Results described above indicate that, in *Drosophila*, NCenH3<sup>CID</sup> is involved in recruitment of BubR1, an evolutionarily conserved kinetochore protein, which is a core component of the spindle attachment checkpoint (SAC). Current models for SAC function suggest that unattached kinetochores recruit SAC components, such as BubR1, to generate a diffusible signal that delays anaphase onset. Therefore, ectopic recruitment of BubR1 could reflect formation of a functional ectopic kinetochore. This possibility, however, is highly unlikely since targeting NCenH3<sup>CID</sup> does not result in recruitment of other essential kinetochore components,





**Figure 3. Targeting of NCenH3<sup>CID</sup>-lacI to the reporter construct in 157.1 flies does not result in ectopic recruitment of CENP-C.** (A), ROD (B), POLO (C) or MEI-S332 (D). Localisation of NCenH3<sup>CID</sup>-lacI (green) and CENP-C, ROD, POLO or MEI-S332 (red) was determined in mitotic chromosomes by immunostaining with the indicated specific antibodies. Dotted circles indicate X-chromosomes. Arrows indicate ectopic  $\alpha$ lacI or  $\alpha$ CenH3<sup>CID</sup> signals on the X-chromosome, which reflect binding of NCenH3<sup>CID</sup>-lacI to the reporter construct. doi:10.1371/journal.pone.0013747.g003

including CENP-C [22], ROD [23,24], POLO [25], and MEI-S332/Sgo [26,27] (Figure 3). Also in agreement with this hypothesis, ectopic targeting of NCenH3<sup>CID</sup> does not induce any detectable proliferation defects (not shown), which is contrary to what would be expected if resulting in efficient formation of an ectopic kinetochore [28]. Altogether, these results argue against formation of a functional kinetochore, indicating that NCenH3<sup>CID</sup> is not sufficient by itself to support kinetochore assembly. Actually, it was recently reported that, in vertebrates, both the C-terminal and central CATD domains of CenH3<sup>CENP-A</sup> mediate interactions with two essential CCAN-components, CENP-C and CENP-N [11,12], being, therefore, required for full kinetochore assembly.

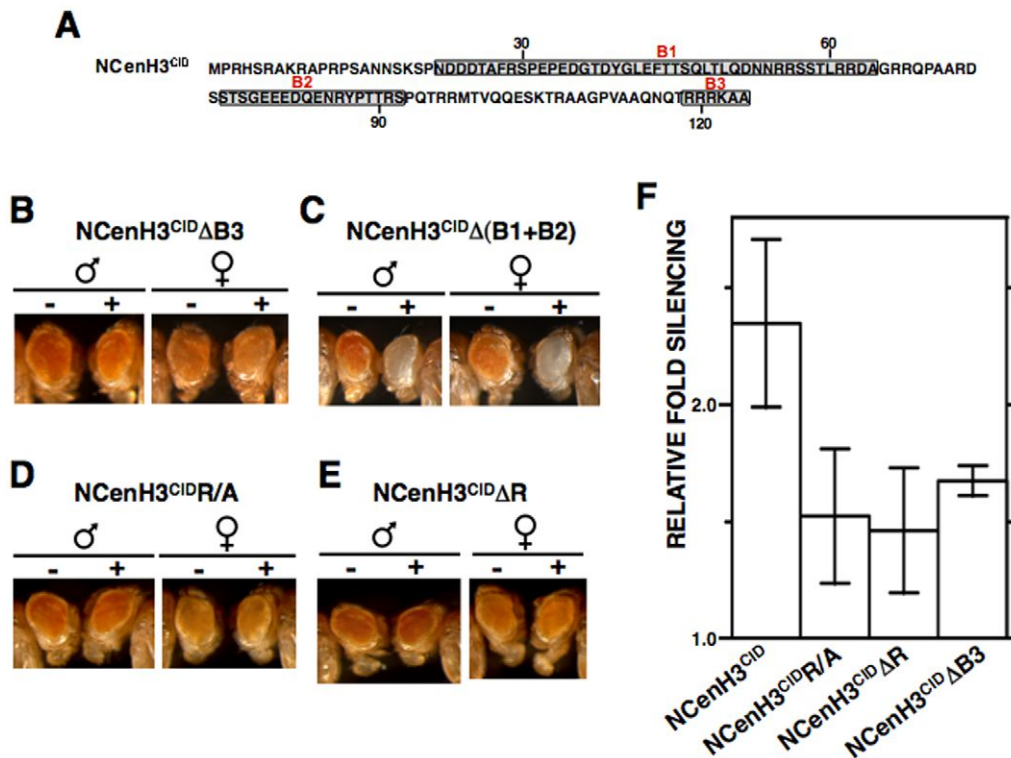
#### Silencing induced by CenH3<sup>CID</sup> depends on a simple arginine-rich sequence motif

Next, we asked about the molecular basis of the contribution of NCenH3<sup>CID</sup> to BubR1 recruitment. Within the *Drosophila* genus, NCenH3<sup>CID</sup> shows significant variability. However, sequence comparison of NCenH3<sup>CID</sup> from a broad group of *Drosophila* species [17], allowed identification of three sequence motifs (B1, B2 and B3) (Figure 4A) that, being evolutionarily conserved over 25 million years, were good candidates to mediate recruitment of BubR1. To test this possibility, we performed deletion analyses, where the contribution of each conserved motif to silencing of the

*white*-reporter was determined in ectopic targeting experiments. As shown in Figure 4, motif B3 has a major contribution, as its deletion strongly impairs silencing (Figure 4B and 4F) and is capable by itself to induce robust silencing of the reporter (Figure 4C). Moreover, deletion of motifs B1 or B2 has no detectable effect on reporter silencing (Figure S3B and S3C). Motif B3 corresponds to a rather simple sequence, <sup>119</sup>RRRKAA<sup>124</sup>, showing a peculiar enrichment in arginine (R) residues. As a matter of fact, silencing induced by NCenH3<sup>CID</sup> is strongly impaired when R-residues within B3 are replaced by alanine (A) (Figure 4D and 4F) or deleted (Figure 4E and 4F), and, concomitant to the lack of silencing, no ectopic  $\alpha$ BubR1 signals are detected in these cases (Figure 5). Altogether, these results identify R-residues within B3 as involved in BubR1 recruitment.

#### Highly divergent NCenH3 of budding yeast and human also silence reporter expression

In comparison to canonical histone H3, CenH3 is much less well conserved [16,17]. Homology, that at the histone-fold domain ranges from 40% to 60% identity, is, however, insignificant for NCenH3 that, showing strong variability both in size (ranging from 20 to 200 aa) and sequence, cannot be aligned across different eukaryotic lineages. Therefore, in this context, we asked whether the effects described above are restricted to *Drosophila*



**Figure 4. Silencing induced by NCenH3<sup>CID</sup> depends on a conserved simple arginine (R)-rich motif.** (A) Amino acid sequence of the N-terminal domain of *D. melanogaster* CenH3<sup>CID</sup>. Sequence motifs (B1, B2 and B3) that are conserved amongst distant *Drosophila* species are indicated. (B–E) The eye phenotype of S9.2 flies expressing the indicated NCenH3<sup>CID</sup>-lacI deletions (+) is compared to that of siblings where no fused protein is expressed (–). Results are presented for both female and male individuals. (F) Quantitative analysis is presented for lines expressing the indicated constructs. Relative fold silencing is expressed as the ratio between OD<sub>480</sub> of control S9.2 lines expressing no fused protein and that of lines expressing each construct. Results correspond to the average of four (NCenH3<sup>CID</sup>R/A), three (NCenH3<sup>CID</sup>), and two (NCenH3<sup>CID</sup>ΔR and NCenH3<sup>CID</sup>ΔB3) independent lines. See Figure S4 for a description of the constructs. doi:10.1371/journal.pone.0013747.g004

CenH3<sup>CID</sup>. To address this question, lacI-fusions carrying NCenH3 from *Saccharomyces cerevisiae* (NCenH3<sup>Cse4</sup>) or humans (NCenH3<sup>CenpA</sup>) were expressed in *Drosophila* S9.2 reporter flies and the extent to which they induce silencing of the reporter determined. Both constructs induce silencing (Figure 6B–D), though it is less robust than that observed for NCenH3<sup>CID</sup>, being significant only in a fraction of lines analysed. In the case of NCenH3<sup>Cse4</sup>, 75% (N = 4) of lines show strong silencing similar to that observed for NCenH3<sup>CID</sup> (Figure 6B and 6D). On the other hand, 50% (N = 4) of lines expressing NCenH3<sup>CenpA</sup>-lacI show significant silencing, which is slightly weaker than that induced by NCenH3<sup>CID</sup>-lacI (Figure 6C and 6D). Similar results were obtained when expression was performed in 157.1 flies (Figure S1B and C). These results strongly suggest that the contribution of NCenH3 to recruitment of BubR1 is conserved through evolution, from *S. cerevisiae* to humans, which is in contrast to its low degree of conservation. It must be noted, however, that a common feature of NCenH3 from distant species is its enrichment in R-residues in comparison to canonical histone H3. As a matter of fact, R-rich motives similar to motif B3 that mediates BubR1 recruitment in *Drosophila*, are present at NCenH3 from most species, including those analysed here, but absent in canonical histone H3 [2] (Figure 6A).

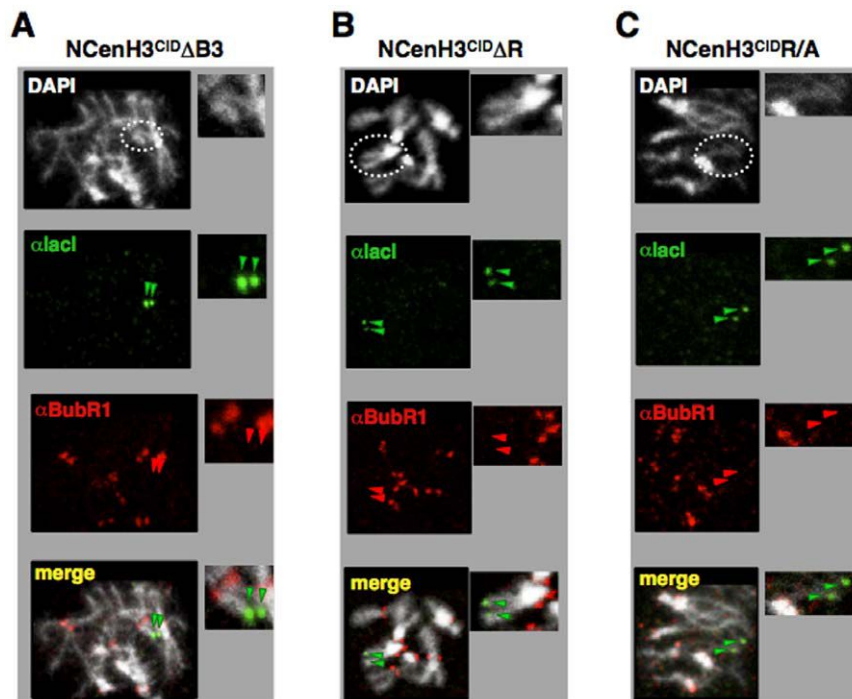
### General considerations and implications

Current models for kinetochore assembly and function suggest that presence of CenH3 at the centromere results in a specialised

chromatin structure, which provides a physical foundation to build the kinetochore. CenH3-kinetochore interactions remain, however, incompletely understood at the molecular level. Results reported here identify simple R-rich motives within the hyper-variable NCenH3<sup>CID</sup> as evolutionary conserved structural determinants involved in BubR1 recruitment. Whether the contribution of NCenH3<sup>CID</sup> to BubR1 recruitment is direct or mediated by additional unidentified factor(s) is uncertain, as GST-pull down assays failed to detect any direct physical interaction between BubR1 and NCenH3<sup>CID</sup> *in vitro* or upon co-transfection into cultured S2-cells (not shown).

These results, which are based on ectopic targeting experiments, are likely relevant in the context of the endogenous locus. BubR1 recruitment is detected in early prometaphase, when kinetochores are bound by only few or no microtubules [29]. Our results suggest that BubR1 recruitment does not require full kinetochore assembly, as ectopic targeting of NCenH3<sup>CID</sup>, which does not result in formation of a functional kinetochore, is capable of recruiting BubR1. Several observations support this hypothesis. On one hand, in chicken DT40 cells, strong reduction of CenH3<sup>CENP-A</sup> to levels that severely impair centromeric localisation of several CCAN-components (CENP-C, -H, and -I), as well as some outer kinetochore proteins (Nuf2/Hec1, Mad2, and CENP-E), shows only a moderate effect on the initial recruitment of BubR1 in early prometaphase [30]. Furthermore, in *Drosophila*, *cid* mutants, that fail to assemble the kinetochore, show a BubR1-dependent early mitotic delay [31]. Altogether, these observations





**Figure 5. R-residues within B3 motif mediate recruitment of BubR1.** Co-localisation of BubR1 with NCenH3<sup>CID</sup>ΔB3-lacI (A), NCenH3<sup>CID</sup>ΔR-lacI (B) and NCenH3<sup>CID</sup>R/A-lacI (C) was determined in mitotic chromosomes from *157.1* flies by immunostaining with αlacI (green) and αBubR1 (red). Dotted circles indicate X-chromosomes. Arrows indicate the position of the reporter construct on the X-chromosome. Enlarged images are shown on the right of each panel for easier visualisation. DNA was stained with DAPI.  
doi:10.1371/journal.pone.0013747.g005

suggest a BubR1-CenH3 interaction occurring early in mitosis, prior to full kinetochore assembly. Whether this interaction is mediated by NCenH3 remains, however, to be determined. On the other hand, association of BubR1 to metaphase kinetochores appears to depend strongly on kinetochore assembly, as it is strongly destabilised in CenH3<sup>CENP-A</sup>-depleted DT40 cells [30], suggesting that initial recruitment and maintenance of BubR1 at kinetochores involve different mechanisms and, perhaps, fulfil different functions. Actually, BubR1 is known to play multiple roles during mitosis [32].

NCenH3<sup>CID</sup>-BubR1 interaction appears to be regulated during cell-cycle progression, as no ectopic αBubR1 signals are detected on polytene chromosomes, which constitute a special type of interphase chromatin, or in interphase nuclei from larval neuroblasts (Figure 7), indicating that, like at the kinetochore, ectopic recruitment of BubR1 by NCenH3<sup>CID</sup> is constrained to mitosis. In contrast, our results show that NCenH3<sup>CID</sup>-mediated silencing of the *white*-reporter depends on BubR1, indicating that BubR1 is required to repress reporter expression at interphase. BubR1 recruitment at mitosis might stabilise binding of factor(s) required for repression at interphase. It is also possible that BubR1 facilitates chromatin modification, as recent results show that Bub1, a closely related SAC-kinase that plays partially redundant functions, regulates H2AS121-phosphorylation in fission yeast, which lacks BubR1 [33].

In addition to the B3 R-rich motif, *Drosophila* NCenH3<sup>CID</sup> contains two other evolutionarily conserved regions (motives B1 and B2) (Figure 4A), which might also mediate centromere/kinetochore interactions. Support for this hypothesis comes from the observation that constructs containing only motif B1 or B2 retain some silencing competence (Figure S3D and S3E). However, in comparison to

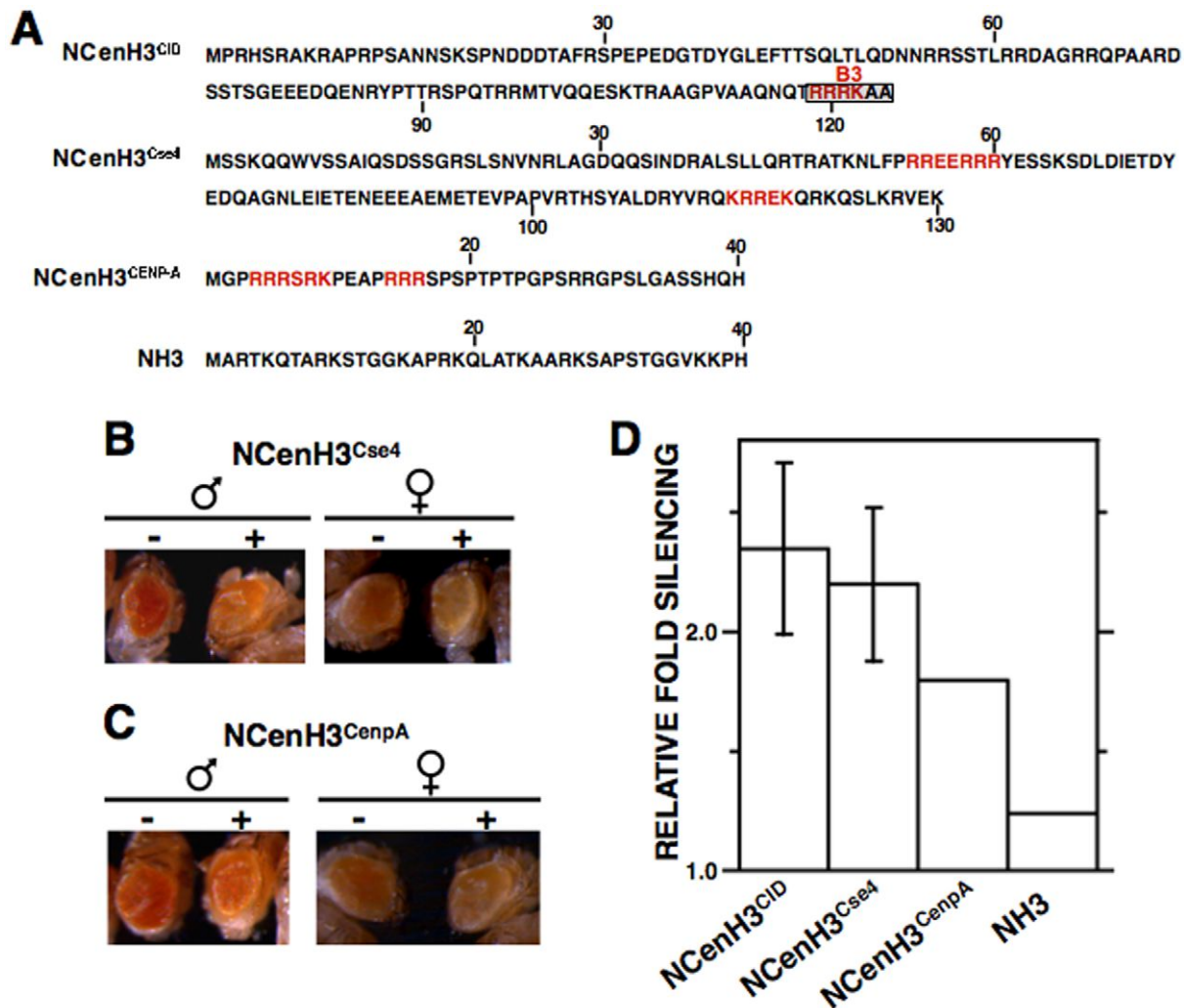
motif B3, the contribution of motives B1 and B2 to silencing is only minor, as by themselves induce much weaker silencing (Figure S3D and S3E), and their deletion does not significantly affect silencing (Figure S3B and S3C, and Figure 4C). Whether silencing induced by motives B1 and B2 also reflects interaction with kinetochore proteins remains, however, to be determined.

Altogether, these observations favour the hypothesis that some kinetochore proteins bind CenH3-chromatin through the recognition of specific sequence motives within the hypervariable NCenH3 domain, unveiling its essential contribution to CenH3 functionality. Results obtained in *S. cerevisiae* support this hypothesis, as NCenH3<sup>Cse4</sup> is essential for viability and, moreover, interacts genetically with components of COMA, a kinetochore complex that is functionally related to CCAN and mediates protein-protein interactions with other centromere/kinetochore proteins, including the essential CBF3 complex [34,35].

## Materials and Methods

### Fly stocks

For targeting experiments, CenH3<sup>CID</sup>, NCenH3<sup>CID</sup>, NH3, NCenH3<sup>Cse4</sup> and NCenH3<sup>CenpA</sup> were fused at N-terminus of the lacI-DNA-binding domain (see Figure S4 for a description of the constructs), using plasmid lacI<sup>ST</sup>-Topo-TA and cloned into pNHT4 plasmid [36], where expression is driven by the *hsp70*-promoter. For deletion-analyses, NCenH3<sup>CID</sup>-lacI<sup>ST</sup>-Topo-TA was used as template and the various deletions cloned to vector pNHT4 (Figure S4). Transgenic lines were generated in +;+/+;γ<sup>506</sup>/γ<sup>506</sup> flies by standard procedures. All constructs were tested for expression and their ability to target the reporter construct determined in polytene chromosomes (Figure S5).



**Figure 6. Expression of fused proteins carrying highly divergent NCenH3 of budding yeast (NCenH3<sup>Cse4</sup>) and human (NCenH3<sup>CENP-A</sup>) also silence reporter expression.** (A) Amino acid sequence of the N-terminal domain of *D. melanogaster* CenH3<sup>CID</sup>, *S. cerevisiae* CenH3<sup>Cse4</sup>, human CenH3<sup>CENP-A</sup>, and canonical histone H3 (NH3). Motif B3 that is responsible for silencing induced by *D. melanogaster* NCenH3<sup>CID</sup> is indicated. R-rich motives (basic sequences containing  $\geq 40\%$  R) are highlighted in red. (B and C) The eye phenotype of *S9.2* flies expressing the indicated lacI-fused proteins (+) is compared to that of siblings where no fused protein is expressed (-). Results are presented for both female and male individuals. (F) Quantitative analysis is presented for lines expressing the indicated constructs. Relative fold silencing is expressed as the ratio between OD<sub>480</sub> of control *S9.2* lines expressing no fused protein and that of lines expressing each construct. For NCenH3<sup>CID</sup>-lacI and NCenH3<sup>Cse4</sup>-lacI, results correspond to the average of three independent lines. For NCenH3<sup>CENP-A</sup>-lacI, where only 50% of the lines show significant silencing, and NH3-lacI, results are presented for a single representative line. See Figure S4 for a description of the constructs.

doi:10.1371/journal.pone.0013747.g006

*bubR1<sup>rev1</sup>* and *bubR1<sup>D1326N</sup>* mutants are described elsewhere [20,21]. Lines *S9.2* or *157.1* are also described elsewhere [18].

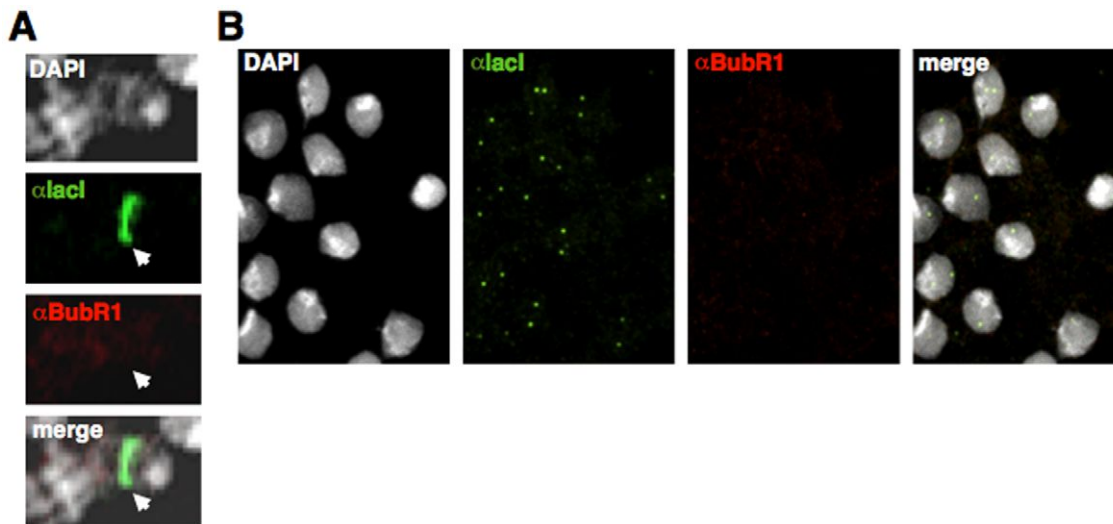
### Tethering experiments

For tethering experiments, heterozygous flies carrying the indicated lacI-constructs were crossed to homozygous *S9.2* or *157.1* reporter flies. Crosses were, then, subjected to daily heat-shock treatment for 45 min at 37°C and the eye phenotype of flies expressing the corresponding lacI-fused protein compared to that of siblings, of the same sex and age, expressing no fused protein. For each lacI-construct, at least four independent lines were analysed. When silencing induced by NCenH3<sup>CID</sup>-lacI was analysed in *bubR1<sup>rev1</sup>* and *bubR1<sup>D1326N</sup>* mutant backgrounds, heterozygous NCenH3<sup>CID</sup>-lacI/+ males were crossed to *bubR1<sup>rev1</sup>*/+ or *bubR1<sup>D1326N</sup>*/+ reporter *S9.2* females. When silencing

was analysed in trans-heterozygous *bubR1<sup>rev1</sup>*/*bubR1<sup>D1326N</sup>* flies, *bubR1<sup>D1326N</sup>*/+ reporter *S9.2* females were crossed to *bubR1<sup>rev1</sup>*/+ males carrying NCenH3<sup>CID</sup>-lacI. For quantitative analyses, eye pigment was extracted with 30% acid-ethanol (pH = 2) according to [37] and OD<sub>480</sub> determined in a Nanodrop 1000/3.7. Extraction was performed from 20 heads obtained from male individuals. Relative fold silencing was then expressed as the ratio between OD<sub>480</sub> of control *S9.2* line expressing no fused protein and that of lines expressing the corresponding constructs.

### Immunostaining experiments

For immunostaining experiments, homozygous flies carrying the indicated lacI-constructs were crossed to homozygous *157.1* reporter flies and crosses were subjected to daily heat-shock



**Figure 7. Ectopic targeting of NCenH3<sup>CID</sup> does not induce BubR1 recruitment in interphase.** Localisation of NCenH3<sup>CID</sup>-lacI and BubR1 was determined in polytene chromosomes (A) and in interphase cells from brain squashes (B) by immunostaining with  $\alpha$ lacI (green) and  $\alpha$ BubR1 (red).  $\alpha$ lacI signals indicate binding of NCenH3<sup>CID</sup>-lacI to the reporter construct. DNA was stained with DAPI.  
doi:10.1371/journal.pone.0013747.g007

treatment for 45 min at 37°C to the third-instar larvae stage. After the last heat-shock treatment, larvae were left to recover at 25°C for 2 h prior to dissection. Brains were, then, incubated in 0.5 mg/ml colcemid in PBS for 1.5 h before fixation in 3.7% formaldehyde. Neuroblasts squashes and immunostainings were performed as described elsewhere [19,38] using rabbit polyclonal  $\alpha$ CenH3<sup>CID</sup> (1:500), rabbit polyclonal  $\alpha$ BubR1 (Rb666) (1:1000) [39], mouse monoclonal  $\alpha$ Polo (mab294) (1:100) [40], rabbit  $\alpha$ CenpC polyclonal antibody (1:5000) [22], rabbit  $\alpha$ Rod polyclonal antibody (1:200) [41], guinea pig  $\alpha$ MEI-S332 polyclonal antibody (1:1000) [27] and mouse monoclonal  $\alpha$ lacI (clone 9A5, Upstate) (1:150). For visualization, slides were mounted in Mowiol (Calbiochem-Novabiochem) containing 0.2 ng/ml DAPI (Sigma) and visualized by confocal microscopy (Leica TCS SP2-AOBS).

## Supporting Information

**Figure S1** Tethering NCenH3-lacI to the ectopic white-reporter of *157.1* flies induces silencing of the reporter gene. (A–E) The eye phenotype of flies expressing the indicated fused proteins (+) is compared to that of siblings where no fused protein is expressed (–). Results are presented only for male individuals.  
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013747.s001 (0.46 MB PDF)

**Figure S2** In interphase nuclei, CenH3<sup>CID</sup>-lacI incorporates to centromeres. CenH3<sup>CID</sup>-lacI (A) and NCenH3<sup>CID</sup>-lacI (B) were expressed in *157.1* flies carrying an ectopic white reporter construct inserted at a distal position on the X-chromosome. Localisation of the fused proteins was determined in interphase cells from brain squashes of third instar larvae by immunostaining with  $\alpha$ CenH3<sup>CID</sup> (red) and  $\alpha$ lacI (green). In cells expressing CenH3<sup>CID</sup>-lacI (A), all  $\alpha$ CenH3<sup>CID</sup> signals co-localise with  $\alpha$ lacI, indicating incorporation of CenH3<sup>CID</sup>-lacI to centromeres. In contrast, in cells expressing NCenH3<sup>CID</sup>-lacI (B), co-localisation is restricted to two-spots (indicated by the arrows), reflecting binding of the fused protein to the ectopic reporter construct.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013747.s002 (0.09 MB PDF)

**Figure S3** Motives B1 and B2 retain silencing competence. (A) Amino acid sequence of the N-terminal domain of *D. melanogaster* CenH3<sup>CID</sup>. Conserved sequence motives (B1, B2 and B3) are indicated. (B–E) The eye phenotype of *S9.2* flies expressing the indicated NCenH3<sup>CID</sup>-lacI deletions (+) is compared to that of siblings where no fused protein is expressed (–). Results are presented for both female and male individuals. See Figure S4 for a description of the constructs.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013747.s003 (1.45 MB PDF)

**Figure S4** Constructs used in these experiments. Schematic representation of fused proteins used in these experiments. The position of motives B1, B2 and B3 is indicated. Numbers correspond to amino acid positions on the corresponding sequences. DNA-binding domain of lacI is indicated in red.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013747.s004 (0.02 MB PDF)

**Figure S5** Constructs used in these experiments target the reporter construct in polytene chromosomes. Localisation of the indicated constructs was determined in polytene chromosomes by immunostaining with  $\alpha$ lacI (green). DNA was stained with DAPI.  
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0013747.s005 (0.15 MB PDF)

## Acknowledgments

We are thankful to Drs R.E. Karess, C.F. Lehner, T.L. Orr-Weaver, C.E. Sunkel and L.L. Wallrath for materials. We are also most thankful to Esther Fuentes for technical support.

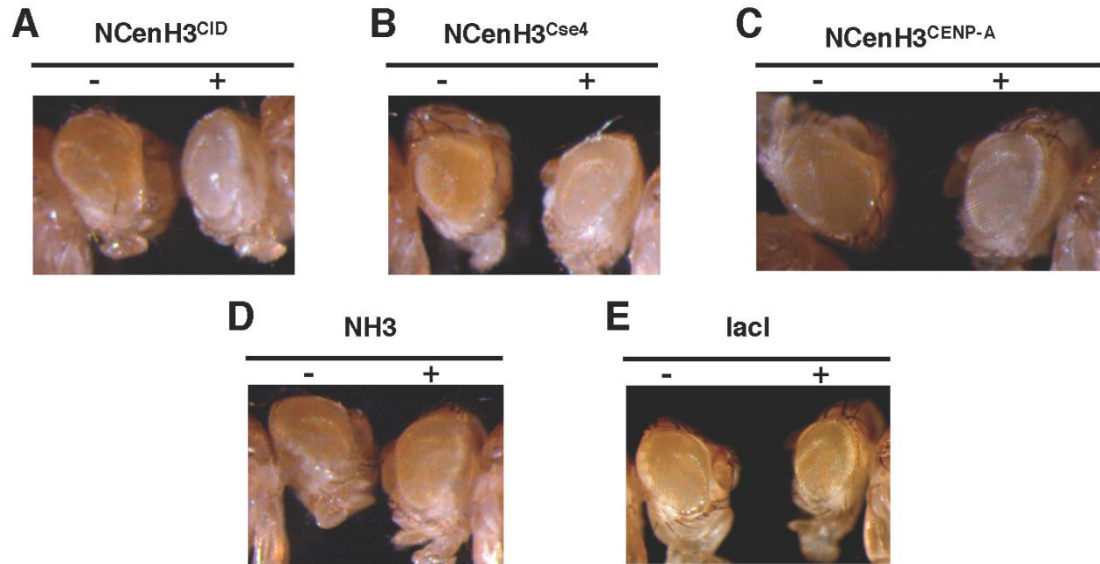
## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MTL SMG OMM FA. Performed the experiments: MTL SMG OMM. Analyzed the data: MTL SMG OMM FA. Wrote the paper: MTL SMG OMM FA.

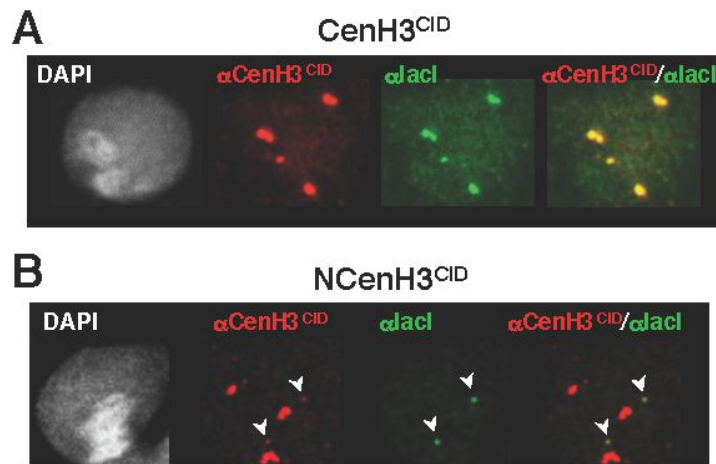
## References

- Malik HS, Henikoff S (2009) Major evolutionary transitions in centromere complexity. *Cell* 138: 1067–1082.
- Torras-Llort M, Moreno-Moreno O, Azorín F (2009) Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *EMBO J* 28: 2337–2348.
- Bloom K (2007) Centromere dynamics. *Curr Opin Genet Dev* 17: 1–6.
- Ekwall K (2007) Epigenetic control of centromere behavior. *Annu Rev Genet* 41: 63–81.
- Morris CA, Moazed D (2007) Centromere assembly and propagation. *Cell* 128: 647–650.
- Sullivan KF (2001) A solid foundation: functional specialization of centromeric chromatin. *Curr Opin Gen Dev* 11: 182–188.
- Allshire RC, Karpen GH (2008) Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nature Rev Genet* 9: 923–937.
- Smith MM (2002) Centromeres and variant histones: what, where, when and why? *Curr Opin Cell Biol* 14: 279–285.
- Foltz DR, Jansen LET, Black BE, Bailey AO, Yates JR, III, et al. (2006) The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nature Cell Biol* 8: 458–469.
- Okada M, Cheeseman IM, Hori T, Okawa K, McLeod IX, et al. (2006) The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nature Cell Biol* 8: 446–457.
- Carroll CW, Milks KJ, Straight AF (2010) Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. *J Cell Biol* 189: 1143–1155.
- Carroll CW, Silva MCC, Godek KM, Jansen LET, Straight AF (2009) Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A nucleosomes by CENP-N. *Nature Cell Biol* 11: 896–902.
- Lew DJ, Burke DJ (2003) The spindle assembly and spindle position checkpoints. *Annu Rev Genet* 37: 251–282.
- Musacchio A, Salmon ED (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Rev Mol Cell Biol* 8: 379–393.
- Straight AF (1997) Checkpoint proteins and kinetochores. *Curr Biol* 7: R613–R616.
- Malik HS, Henikoff S (2001) Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in *Drosophila*. *Genetics* 157: 1293–1298.
- Malik HS, Vermaak D, Henikoff S (2002) Recurrent evolution of DNA-binding motifs in the *Drosophila* centromeric histone. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 1449–1454.
- Li Y, Danzer JR, Alvarez P, Belmont AS, Wallrath LL (2003) Effects of tethering HPI1 to euchromatic regions of the *Drosophila* genome. *Development* 130: 1817–1824.
- Font-Burgada J, Rossell D, Auer H, Azorín F (2008) *Drosophila* HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression. *Genes Dev* 22: 3007–3023.
- Basu J, Bousbaa H, Logarinho E, Li Z, Williams BC, et al. (1999) Mutations in the essential spindle checkpoint gene *bub1* cause chromosome missegregation and fail to block apoptosis in *Drosophila*. *J Cell Biol* 146: 13–28.
- Malmanche N, Owen S, Gegick S, Steffensen S, Tomkiel JE, et al. (2007) *Drosophila* BubR1 is essential for meiotic sister-chromatid cohesion and maintenance of synaptonemal complex. *Curr Biol* 17: 1–9.
- Heeger S, Leismann O, Schittenhelm R, Schraidt O, Heidmann S, et al. (2005) Genetic interactions of separate regulatory subunits reveal the diverged *Drosophila* Cenp-C homolog. *Genes Dev* 19: 2041–2053.
- Basto R, Gomes R, Karess RE (2000) Rough deal and Zwi10 are required for metaphase checkpoint in *Drosophila*. *Nature Cell Biol* 2: 939–943.
- Williams BC, Li Z, Liu S, Williams EV, Leung G, et al. (2003) Zwi10, a new component, of the ZW10/ROD complex required for kinetochore functions. *Mol Biol Cell* 14: 1379–1391.
- Logarinho E, Sunkel C (1998) The *Drosophila* POLO kinase localises to multiple compartments of the mitotic apparatus and is required for phosphorylation of MPM2 reactive epitopes. *J Cell Sci* 111: 2897–2909.
- Blower MD, Karpen GH (2001) The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nature Cell Biol* 3: 730–739.
- Tang TT-L, Bickel SE, Young LM, Orr-Weaver TL (1998) Maintenance of sister-chromatid cohesion at the centromere by the *Drosophila* MEI-S332 protein. *Genes Dev* 12: 3843–3856.
- Heun P, Erhardt S, Blower MD, Weiss S, Skora AD, et al. (2006) Mislocalization of the *Drosophila* centromere-specific histone CID promotes formation of functional ectopic kinetochores. *Dev Cell* 10: 303–315.
- Hoffman DB, Pearson CG, Yen TJ, Howell BJ, Salmon ED (2001) Microtubule-dependent changes in assembly of microtubule motor proteins and mitotic spindle checkpoint proteins at PtK1 kinetochores. *Mol Biol Cell* 12: 1995–2009.
- Régnier V, Vagnarelli P, Fukagawa T, Zerjal T, Burns E, et al. (2005) CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Mol Cell Biol* 25: 3967–3981.
- Blower MD, Daigle T, Kaufman T, Karpen G (2006) *Drosophila* CENP-A mutations cause a BubR1-dependent early mitotic delay without normal localization of kinetochore components. *PLoS Genet* 2: e110.
- Rahmani Z, Gagou ME, Lefebvre C, Emre D, Karess RE (2009) Separating the spindle, checkpoint, and timer functions of BubR1. *J Cell Biol* 187: 597–605.
- Kawashima SA, Yamagishi Y, Honda T, Ishiguro K-i, Watanabe Y (2010) Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing Shugoshin. *Science* 327: 172–177.
- Chen Y, Baker RE, Keith KC, Harris K, Stoler S, et al. (2000) The N terminus of centromere H3-like protein Cse4p performs an essential function distinct from that of the histone fold domain. *Mol Cell Biol* 20: 7037–7048.
- Keith KC, Baker RE, Chen Y, Harris K, Stoler S, et al. (1999) Analysis of primary structural determinants that distinguish the centromere-specific functions of histone variant Cse4p from histone H3. *Mol Cell Biol* 19: 6130–6139.
- Nagao T, Leuzinger S, Acampora D, Simeone A, Finkelstein R, et al. (1998) Developmental rescue of *Drosophila* cephalic defects by the human Otx genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3737–3742.
- Ephrussi B, Herold JL (1944) Studies of eye pigments of *Drosophila*. I. Methods of extraction and quantitative estimation of the pigment components. *Genetics*. pp 148–175.
- Gatti M, Bonaccorsi S, Pimpinelli S (1994) Looking at *Drosophila* mitotic chromosomes. *Methods Cell Biol* 44: 371–391.
- Logarinho E, Bousbaa H, Dias JM, Lopes C, Amorim I, et al. (2004) Different spindle checkpoint proteins monitor microtubule attachment and tension at kinetochores in *Drosophila* cells. *J Cell Sci* 117: 1757–1771.
- Llamazares S, Moreira A, Tavares A, Girdham C, Spruce BA, et al. (1991) Polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev* 5: 2153–2165.
- Scaërrou F, Aguilera I, Saunders R, Kane N, Blottière L, et al. (1999) The rough deal protein is a new kinetochore component required for accurate chromosome segregation in *Drosophila*. *J Cell Sci* 112: 3757–3768.

**SUPPLEMENTAL FIGURES**

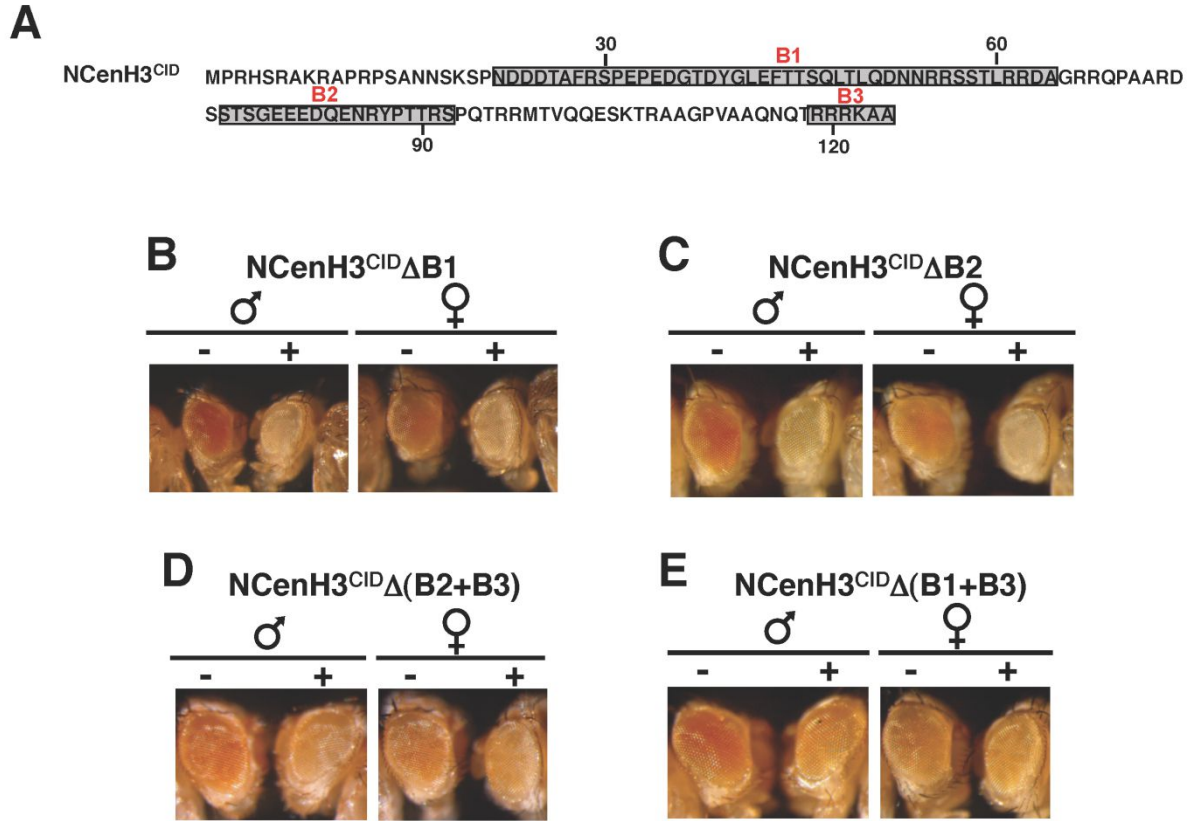


**Figure S1. Tethering NCenH3-lacI to the ectopic white-reporter of *157.1* flies induces silencing of the reporter gene.** (A–E) The eye phenotype of flies expressing the indicated fused proteins (+) is compared to that of siblings where no fused protein is expressed (–). Results are presented only for male individuals.

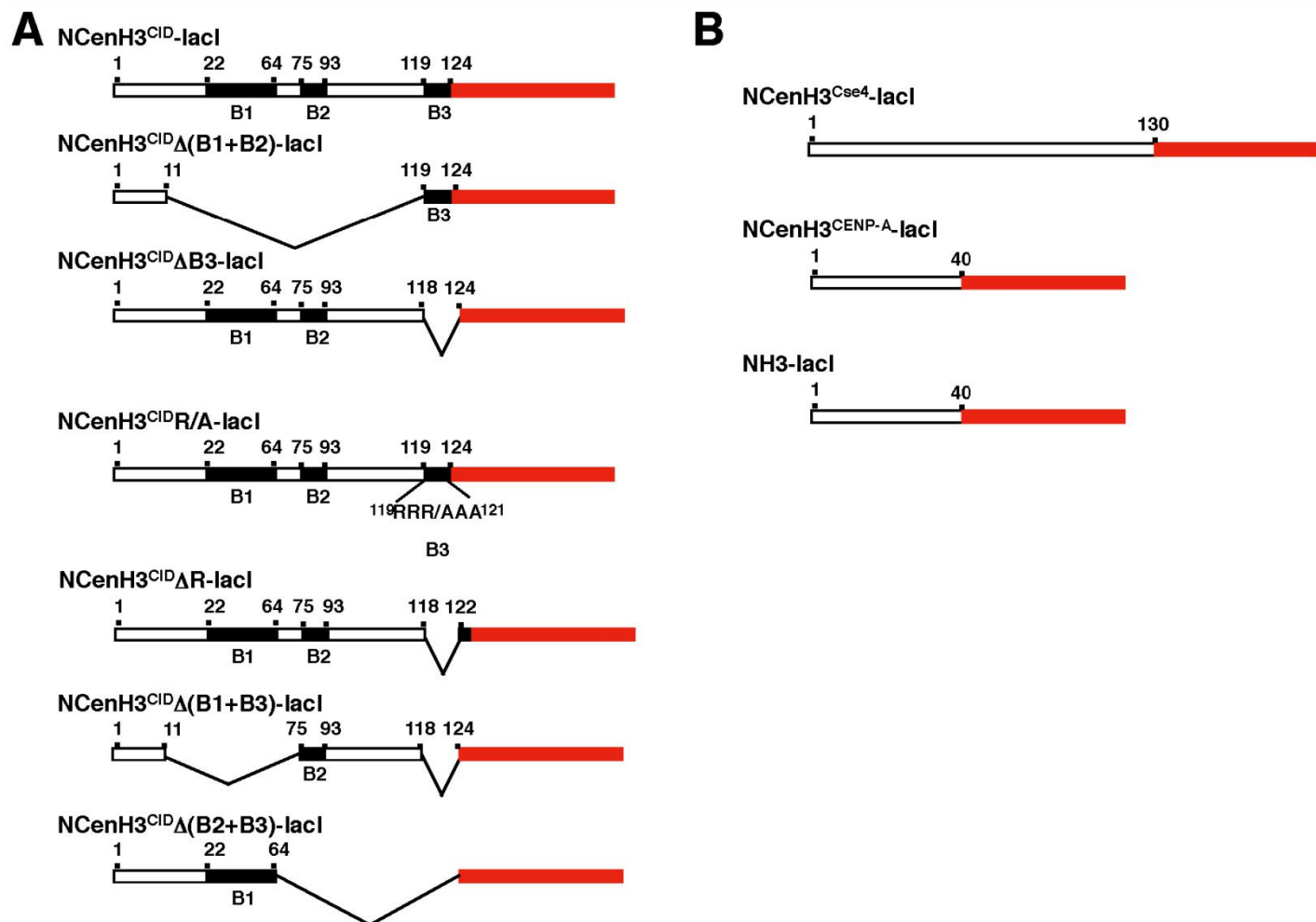


**Figure S2. In interphase nuclei, CenH3<sup>CID</sup>-lacI incorporates to centromeres.** CenH3<sup>CID</sup>-lacI (A) and NCenH3<sup>CID</sup>-lacI (B) were expressed in *157.1* flies carrying an ectopic white reporter construct inserted at a distal position on the X-chromosome. Localisation of the fused proteins was determined in interphase cells from brain squashes of third instar larvae by immunostaining with  $\alpha$ -CenH3<sup>CID</sup> (red) and  $\alpha$ -lacI (green). In cells expressing CenH3<sup>CID</sup>-lacI (A), all  $\alpha$ -CenH3<sup>CID</sup> signals co-localise with  $\alpha$ -lacI, indicating incorporation of CenH3<sup>CID</sup>-lacI to centromeres. In contrast, in cells expressing NCenH3<sup>CID</sup>-lacI (B), co-localisation is restricted to two-spots (indicated by the arrows), reflecting binding of the fused protein to the ectopic reporter construct.

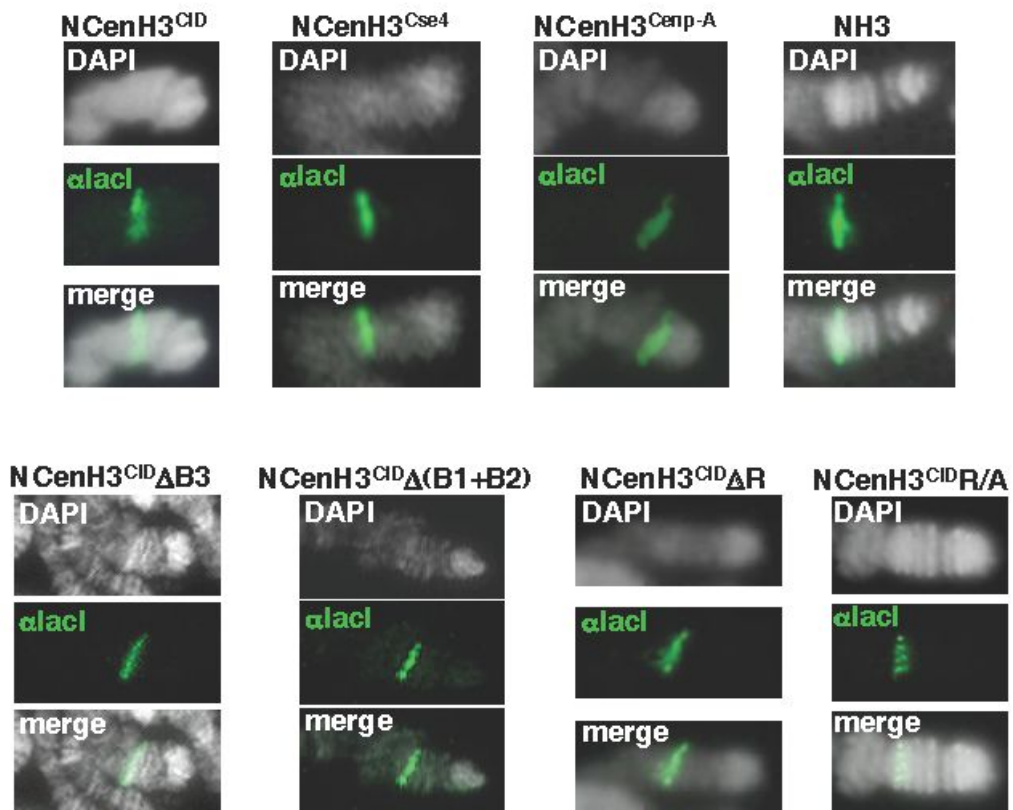




**Figure S3. Motives B1 and B2 retain silencing competence.** (A) Amino acid sequence of the N-terminal domain of *D. melanogaster* CenH3<sup>CID</sup>. Conserved sequence motives (B1, B2 and B3) are indicated. (B–E) The eye phenotype of *S9.2* flies expressing the indicated NCenH3<sup>CID</sup>-lacI deletions (+) is compared to that of siblings where no fused protein is expressed (–). Results are presented for both female and male individuals. See Figure S4 for a description of the constructs.



**Figure S4. Constructs used in these experiments.** Schematic representation of fused proteins used in these experiments. The position of motives B1, B2 and B3 is indicated. Numbers correspond to amino acid positions on the corresponding sequences. DNA-binding domain of lacI is indicated in red.



**Figure S5. Constructs used in these experiments target the reporter construct in polytene chromosomes.** Localisation of the indicated constructs was determined in polytene chromosomes by immunostaining with  $\alpha$ -lacI (green). DNA was stained with DAPI.





## **CAPÍTOL 4**



**The F box protein partner of paired regulates stability of *Drosophila* centromeric histone H3, CenH3(CID).**

Olga Moreno-Moreno<sup>1,2</sup>, Sònia Medina-Giró<sup>1,2</sup>, Mònica Torras-Llort<sup>1,2</sup> and Fernando Azorín<sup>1,2</sup>,

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology of Barcelona, CSIC. 08028 Barcelona. Spain.

<sup>2</sup>Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona. 08028 Barcelona. Spain.

**REVISTA:**

Current Biology.

2011 Sep 13;21(17):1488-93

PMID: 21871803

Corresponding author:

Dr. F. Azorín

Institute of Molecular Biology of Barcelona, CSIC

Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona

Baldiri Reixac, 10. 08028 Barcelona. Spain

Phone: 3493-4034958; Fax: 3493-4034979; e-mail: fambmc@ibmb.csic.es



## **INFORME DEL DIRECTOR DE TESI SOBRE EL FACTOR D'IMPACTE I LA COAUTORIA DE LA PUBLICACIÓ**

El Dr. Ferran Azorín Marín, Director de la Tesi Doctoral de Sònia Medina Giró, informa que el manuscrit "*The F box protein partner of paired regulates stability of Drosophila centromeric histone H3, CenH3(CID)*" va ser publicat a la revista *Current Biology* l'any 2011. Aquesta revista està situada dins del primer quartil de les categories *Biochemistry and Molecular Biology i Cell Biology*. El factor d'impacte per aquesta revista segons *Journal Citation Reports* era de 9,647 per l'any 2011 i de 9.916 per l'any 2013.

La participació de la doctoranda en aquest treball va ser la generació i caracterització de les línies cel·lulars descrites a Figura 2C, i de les línies transgèniques utilitzades en els experiments recollits en les Figures 3B, 4, S3 i S4. A més, la doctoranda també va participar en l'anàlisi i la discussió dels resultats així com en la redacció del manuscrit. Cal indicar que resultats preliminars relatius als experiments descrits a les Figures 1 i 2 van ser presentats a la Tesi Doctoral de la Dra. Olga Moreno-Moreno.

El Director

Dr. Ferran Azorín Marín



# The F Box Protein Partner of Paired Regulates Stability of *Drosophila* Centromeric Histone H3, CenH3<sup>CID</sup>

Olga Moreno-Moreno,<sup>1</sup> Sònia Medina-Giró,<sup>1</sup>  
Mònica Torras-Llort,<sup>1</sup> and Fernando Azorín<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology of Barcelona, CSIC,  
and Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona,  
Barcelona Science Park, Baldiri Reixac 10-12,  
08028 Barcelona, Spain

## Summary

Centromere identity and function is determined by the specific localization of CenH3 (reviewed in [1–7]). Several mechanisms regulate centromeric CenH3 localization, including proteasome-mediated degradation that, both in budding yeast and *Drosophila*, regulates CenH3 levels and prevents promiscuous misincorporation throughout chromatin [8, 9]. CenH3<sup>CENP-A</sup> proteolysis has also been reported in senescent human cells [10] or upon infection with herpes simplex virus 1 [11]. Little is known, however, about the actual mechanisms that regulate CenH3 proteolysis. Recent work in budding yeast identified Psh1 as an E3-ubiquitin ligase that mediates degradation of CenH3<sup>Cse4p</sup> [12, 13], but E3-ligases regulating CenH3 stability in metazoans are unknown. Here, we report that the F box protein partner of paired (Ppa), which is a variable subunit of the main E3-ligase SCF [14–17], mediates CenH3<sup>CID</sup> stability in *Drosophila*. Our results show that Ppa depletion results in increased CenH3<sup>CID</sup> levels. Ppa physically interacts with CenH3<sup>CID</sup> through the CATD<sup>CID</sup> that, in the fly, mediates Ppa-dependent CenH3<sup>CID</sup> stability. Altogether, these results strongly suggest that, in *Drosophila*, SCF<sup>Ppa</sup> regulates CenH3<sup>CID</sup> proteolysis. Interestingly, most known SCF complexes are inactive when, at mitosis, de novo CenH3<sup>CID</sup> deposition takes place at centromeres, suggesting that, in *Drosophila*, CenH3<sup>CID</sup> deposition and proteolysis are synchronized events.

## Results and Discussion

### Proteasome-Mediated Degradation Regulates CenH3<sup>CID</sup> Levels

It is known that overexpression of CenH3 results in its misincorporation throughout chromatin [9, 18–20]. Our own previous studies showed that, in cultured *Drosophila* Kc cells, transient overexpression of CenH3<sup>CID</sup> induces mislocalization through chromatin [9]. However, upon culturing of the cells, CenH3<sup>CID</sup> localization is progressively restricted to centromeres through a process that involves proteasome-mediated degradation, as it is prevented when cells are cultured in the presence of proteasome inhibitors [9]. However, whether endogenous CenH3<sup>CID</sup>, or only the misincorporated overexpressed protein, is regulated by proteolysis remained to be determined.

Here, we have addressed this question in the fly using two temperature-sensitive (ts) mutations of the proteasome, *Pros26*<sup>1</sup> and *Prosβ2*, which carry T47I and G209R substitutions

in the β6 and β2 subunits, respectively [21, 22]. In these experiments, the patterns of CenH3<sup>CID</sup> localization were determined in brain squashes obtained from third-instar *Pros26*<sup>1/+</sup> and *Prosβ2/+* heterozygous larvae, because both mutations are homozygous lethal. Control wild-type (WT) flies show a distinct punctuated pattern of CenH3<sup>CID</sup> localization that reflects centromeric localization and is not altered when larvae are raised at nonpermissive temperature, 29°C (Figure 1A). On the other hand, at 29°C, approximately 8% of *Pros26*<sup>1/+</sup> cells (n = 6,566) show a diffuse αCenH3<sup>CID</sup> staining, which is not observed at permissive temperature, 25°C (0%, n = 3,250) (Figure 1B). This difference is statistically significant: p < 0.0001. Similar results were obtained when *Prosβ2/+* flies were analyzed (Figure 1C). *Prosβ2* is a stronger ts mutation, so that *Prosβ2/+* individuals die early during larval development at 29°C. In this case, however, a significant percentage of cells show diffuse αCenH3<sup>CID</sup> staining even at 25°C (7%, n = 2,632) but not at 18°C (0.12%, n = 3,255) (Figure 1C). Altogether, these results show that mutations impairing proteasome functionality result in increased CenH3<sup>CID</sup> levels and delocalization through chromatin, indicating that proteolysis also regulates endogenous CenH3<sup>CID</sup>. Western blot analyses strongly suggest that CenH3<sup>CID</sup> is directly targeted for proteasome-mediated degradation because CenH3<sup>CID</sup> species of high molecular weight, compatible with conjugation of one or two ubiquitin molecules, are detected in extracts prepared from proteasome mutant larvae (Figure 1D).

### CenH3<sup>CID</sup> Interacts with the F Box Protein Partner of Paired

A yeast two-hybrid screen performed to search for proteins capable of binding the N-terminal domain of CenH3<sup>CID</sup> (NCenH3<sup>CID</sup>) identified an interaction with partner of paired (Ppa), an F box protein that is a variable component of the E3-ubiquitin ligase SCF [14–17]. One of the 18 different positive clones identified in this screen, Ppa<sup>113</sup>, corresponds to a truncated form of Ppa that retains the last three leucine-rich repeats, which are known to mediate specific recognition of the substrate [16, 23, 24]. As judged from growth in the absence of leucine (Leu<sup>-</sup>), which detects positive interactions, Ppa<sup>113</sup> interacts with NCenH3<sup>CID</sup> (Figure 2A).

CenH3<sup>CID</sup>-Ppa interaction was confirmed in vitro by glutathione S-transferase (GST) pull-down assays, because GST-CenH3<sup>CID</sup> interacts very efficiently with Ppa (Figure 2B, lane 3 in upper panel) and, vice versa, CenH3<sup>CID</sup> was strongly bound by a GST-Ppa fusion (Figure 2B, lane 3 in lower panel). In addition, these experiments also show that Ppa interacts both with NCenH3<sup>CID</sup> (Figure 2B, lane 5 in upper panel), as well as with the HFD of CenH3<sup>CID</sup> (HFD-CenH3<sup>CID</sup>) (Figure 2B, lane 4 in upper panel). Binding to HFD-CenH3<sup>CID</sup> is, however, significantly stronger than to NCenH3<sup>CID</sup>, indicating that, though CenH3<sup>CID</sup>-Ppa interaction involves several determinants, the main one resides within HFD-CenH3<sup>CID</sup>.

To test whether Ppa also binds CenH3<sup>CID</sup> in a nucleosomal context, we performed similar GST pull-down assays using nucleosomes obtained from a stable S2 cell line overexpressing a CenH3<sup>CID</sup>-TAP fusion. Bulk nucleosomes, which contain only a minor proportion of CenH3<sup>CID</sup> nucleosomes, were prepared by micrococcal nuclease digestion, purified

\*Correspondence: fambmc@ibmb.csic.es



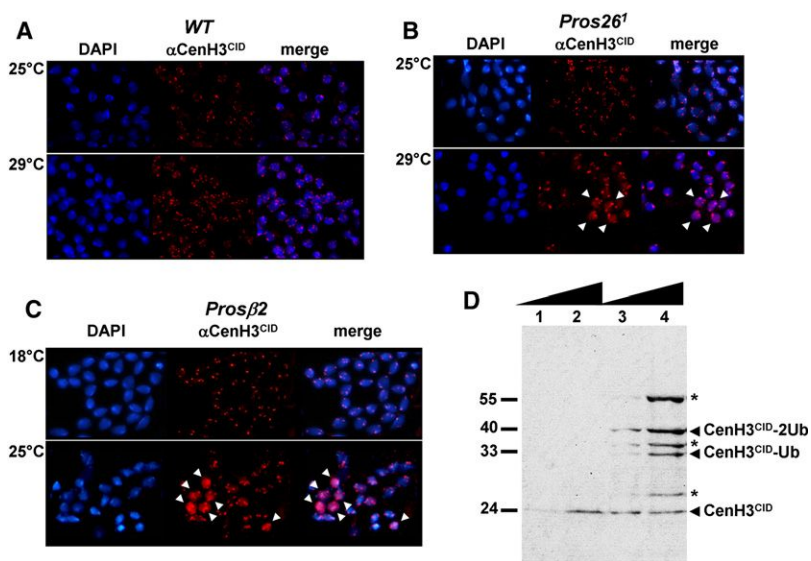


Figure 1. CenH3<sup>CID</sup> Is Regulated by Proteolysis

(A–C) CenH3<sup>CID</sup> localization was determined by immunostaining with  $\alpha$ CenH3<sup>CID</sup> antibodies (in red) in brain squashes from control wild-type (WT) larvae (A) and heterozygous larvae for two temperature-sensitive (ts) mutations of the proteasome, *Pros26*<sup>1</sup> (B) and *Prosβ2* (C), raised under permissive (upper panels) or nonpermissive conditions (lower panels). DNA was stained with DAPI. Arrows indicate cells showing increased CenH3<sup>CID</sup> content and delocalization.

(D) Protein extracts were prepared from *Prosβ2* mutant larvae raised under permissive (lanes 1 and 2) or nonpermissive conditions (lanes 3 and 4), and increasing amount of extracts were analyzed by western blot using specific  $\alpha$ CenH3<sup>CID</sup> antibodies. Bands of low electrophoretic mobility showing molecular weight increments compatible with the conjugation of one (CenH3<sup>CID</sup>-Ub) and two ubiquitin molecules (CenH3<sup>CID</sup>-2Ub) are indicated. The asterisks indicate a second set of bands of lower electrophoretic mobility that, showing increments compatible with the conjugation of ubiquitin, likely correspond to CenH3<sup>CID</sup> species carrying an additional unidentified modification. The position corresponding to selected molecular weight markers (kDa) is indicated.

by sucrose gradient centrifugation, and assayed for binding to GST-Ppa. Under these conditions, nucleosomes bound to GST-Ppa are highly enriched in CenH3<sup>CID</sup> in comparison to H3 (Figure 2C, lane 2 in upper panel), indicating that GST-Ppa preferentially binds CenH3<sup>CID</sup> nucleosomes over canonical H3-containing nucleosomes. Note that H2A is also detected in the pull-down material, confirming binding to nucleosomes. Binding of Ppa to CenH3<sup>CID</sup> nucleosomes largely depends on CATD<sup>CID</sup>, a divergent L1/ $\alpha$ 2 region of the HFD that, both in humans and flies, determines centromeric

localization of CenH3 [25, 26] and mediates interaction with other constitutive centromere/kinetochore components [27], specific chaperones [28–30], and, in particular, Psh1, an E3-ubiquitin ligase that regulates CenH3<sup>Cse4p</sup> stability in budding yeast [12, 13]. As shown in Figure 2C (lane 2 in lower panel), GST-Ppa does not efficiently bind nucleosomes obtained from a stable S2 cell line overexpressing a TAP-tagged CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup> chimera, where CATD<sup>CID</sup> was replaced by the corresponding region of canonical histone H3, CATD<sup>H3</sup>.

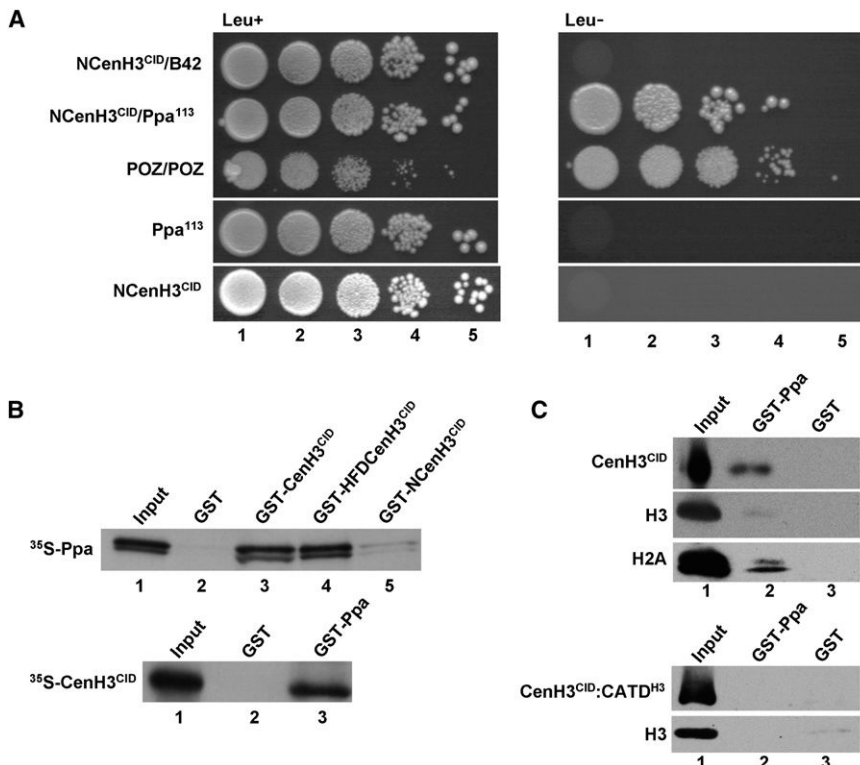


Figure 2. CenH3<sup>CID</sup> Interacts with the F Box Protein Ppa

(A) A yeast two-hybrid assay of the interaction between the N-terminal domain of CenH3<sup>CID</sup> (NCenH3<sup>CID</sup>) and Ppa<sup>113</sup>, a truncated form of Ppa that retains the last three leucine-rich repeats, is presented (row NCenH3<sup>CID</sup>/Ppa<sup>113</sup>). Row POZ/POZ corresponds to a positive control and the rest are negative controls. See Supplemental Experimental Procedures for details. Twenty microliters of cultures carrying the indicated constructs were plated on Leu+ (left) and Leu- (right) plates at a cell density of  $2 \times 10^6$  cells/ml (lanes 1) and serial 10-fold dilutions (lanes 2–5). Positive interactions are detected by growth in the absence of leucine (Leu-).

(B) Glutathione S-transferase (GST) pull-down assays of the CenH3<sup>CID</sup>-Ppa interaction. Full-length Ppa (upper panel) and CenH3<sup>CID</sup> (lower panel) were <sup>35</sup>S-labeled in vitro coupled transcription/translation and subjected to binding by the indicated GST-fused proteins (lanes 2–5). Lane 1 shows 10% of the input protein.

(C) GST pull-down assay of the interaction between Ppa and CenH3<sup>CID</sup>-containing nucleosomes. Bulk nucleosomes obtained from stable S2 cell lines overexpressing TAP-tagged CenH3<sup>CID</sup> (upper panel) and CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup> (lower panel) were assayed for binding to GST-Ppa (lane 2) and GST alone (lane 3). Histone composition of bound nucleosomes was determined by western blot using  $\alpha$ TAP (top),  $\alpha$ H3 (center), and  $\alpha$ H2A antibodies to detect CenH3<sup>CID</sup>-TAP, H3, and H2A, respectively. Lane 1 shows 10% of the input nucleosomes.

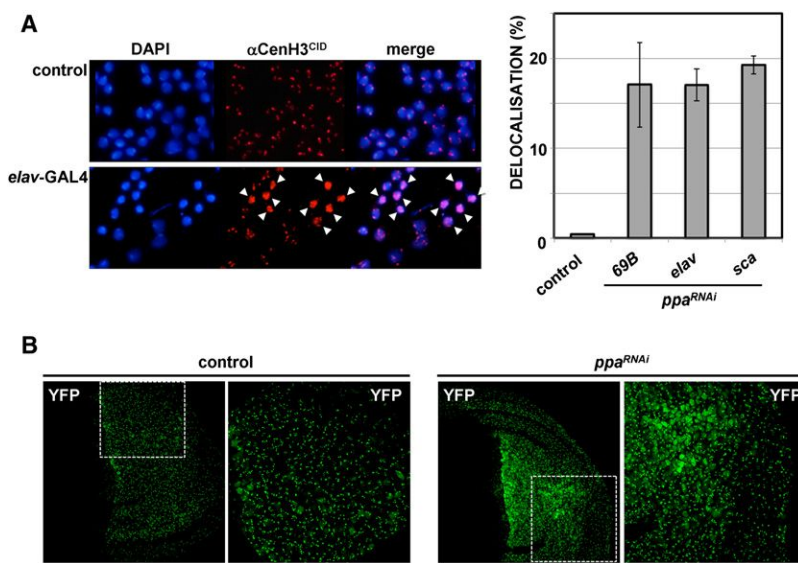


Figure 3. Ppa Depletion Increases CenH3<sup>CID</sup> Levels

(A) On the left, CenH3<sup>CID</sup> localization was determined by immunostaining with  $\alpha$ CenH3<sup>CID</sup> antibodies (in red) in brain squashes from knockdown *ppa*<sup>RNAi(2)</sup> larvae, where depletion of Ppa was induced by the *elav*-GAL4 driver (n = 8,166) and from control *ppa*<sup>RNAi(2)</sup> larvae, where no depletion was induced (upper panel) (n = 1,825). DNA was stained with DAPI. Arrows indicate cells showing increased CenH3<sup>CID</sup> content and delocalization. See also Figure S1A for results obtained when depletion was induced by 69B-GAL4 (n = 6,241) and *sca*-GAL4 drivers (n = 3,968). Quantitative analysis of the results is shown on the right, where the percentage of cells showing delocalized CenH3<sup>CID</sup> is presented when Ppa depletion was induced by the indicated GAL4-drivers and when no depletion was induced (control). Error bars are standard deviation (SD). See also Figure S1 and Figure S2.

(B) Ppa depletion increases expression of a CenH3<sup>CID</sup>-YFP fused protein. CenH3<sup>CID</sup>-YFP was specifically overexpressed at the posterior compartment in wing imaginal discs by crossing flies carrying a UAS<sub>GAL4</sub>/CenH3<sup>CID</sup>-YFP construct to flies carrying an *en*-GAL4 driver. Overexpression was induced in control (left) or in knockdown *ppa*<sup>RNAi(1)</sup> flies (right), where *en*-GAL4

induces both expression of CenH3<sup>CID</sup>-YFP and depletion of Ppa at the posterior compartment. CenH3<sup>CID</sup>-YFP localization was determined by direct fluorescence visualization. Images taken at two magnifications (63 $\times$  and 126 $\times$ ) are shown. Regions corresponding to the images taken at the higher magnification are indicated.

### Ppa Regulates CenH3<sup>CID</sup> Stability

Results reported above suggest that Ppa might be involved in proteolytic degradation of CenH3<sup>CID</sup>. To test this hypothesis, we used *ppa*<sup>RNAi(2)</sup> knockdown transgenic flies, which carry a UAS<sub>GAL4</sub> construct expressing a synthetic hairpin from the coding region of *ppa* that, upon crossing to flies expressing GAL4, generates siRNAs to silence *ppa* expression. *ppa*<sup>RNAi(2)</sup> significantly reduces *ppa* mRNA levels (see Supplemental Experimental Procedures available online for details). As shown in Figure 3A and Figure S1A available online, depletion of Ppa results in increased CenH3<sup>CID</sup> levels and delocalization through chromatin. In these experiments, Ppa depletion was induced ubiquitously, by crossing *ppa*<sup>RNAi(2)</sup> to flies carrying a 69B-GAL4 driver, or specifically at larval brains, by crossing to flies carrying *elav*-GAL4 or *sca*-GAL4 drivers, and the pattern of CenH3<sup>CID</sup> localization was determined in brain squashes by immunostaining with specific  $\alpha$ CenH3<sup>CID</sup> antibodies. In all cases, a significant percentage of cells showed increased levels and delocalization of CenH3<sup>CID</sup> (Figure 3A, right). Similar results were obtained when an independent *ppa*<sup>RNAi(1)</sup> knockdown line was used (Figure S2). These effects are the consequence of Ppa depletion, because no delocalization is observed in any of the parental *ppa*<sup>RNAi</sup> knockdown lines, the GAL4-drivers used, or when RNAi is hyperactivated in control *GFP*<sup>RNAi</sup> flies, expressing siRNAs against GFP (Figure 3A; Figures S1B, S1C, and S2).

Overexpression experiments confirmed the contribution of Ppa to the regulation of CenH3<sup>CID</sup> stability (Figure 3B). In these experiments, flies carrying a UAS<sub>GAL4</sub> construct expressing a tagged CenH3<sup>CID</sup>-YFP form were crossed to flies carrying an *en*-GAL4 driver, where GAL4 is specifically expressed in the posterior compartment, so that, in wing imaginal discs, CenH3<sup>CID</sup>-YFP overexpression is specifically induced in the posterior compartment. Under these conditions, a vast majority of cells in the posterior compartment show a punctuated pattern of CenH3<sup>CID</sup>-YFP localization that reflects targeting to centromeres, with only few cells showing diffuse CenH3<sup>CID</sup>-YFP localization throughout chromatin (Figure 3B, left). Strong

CenH3<sup>CID</sup>-YFP delocalization is observed, however, when overexpression is performed in *ppa*<sup>RNAi</sup> knockdown flies, where *en*-GAL4 induces CenH3<sup>CID</sup>-YFP overexpression and, at the same time, Ppa depletion in the posterior compartment. In this case, a large proportion of cells shows high CenH3<sup>CID</sup>-YFP levels and delocalization throughout chromatin (Figure 3B, right). Concomitantly, in adult flies, specific wing phenotypes are observed in the posterior compartment only when CenH3<sup>CID</sup>-YFP overexpression is combined with Ppa depletion (Figure S3), indicating that, only under these conditions, normal cell functioning is compromised. As judged by western blot analysis, ubiquitous Ppa depletion increases CenH3<sup>CID</sup>-YFP levels by approximately 2-fold (Figure 4B, lanes 1 and 2).

### The CATD<sup>CID</sup> Mediates Ppa-Dependent CenH3<sup>CID</sup> Stability

Next, we asked whether CATD<sup>CID</sup>, which mediates CenH3<sup>CID</sup>-Ppa interaction in vitro (Figure 2C), regulates Ppa-dependent CenH3<sup>CID</sup> stability in the fly. To address this question, we performed similar overexpression experiments as those described in Figure 3B, using transgenic flies expressing an YFP-tagged CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup> chimera, where CATD<sup>CID</sup> is replaced by CATD<sup>H3</sup>. As judged by direct fluorescence visualization and western blot analysis, CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup> is expressed to significantly higher levels than CenH3<sup>CID</sup> (Figure 4A, compare control in panels CenH3<sup>CID</sup> and CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup>; Figure 4B, compare lanes 1 and 3), indicating that CATD<sup>CID</sup> downregulates CenH3<sup>CID</sup> stability. In good agreement with these results, expression of an H3:CATD<sup>CID</sup> chimera, where CATD<sup>H3</sup> is replaced by CATD<sup>CID</sup>, is drastically reduced by approximately 9-fold in comparison to H3 (Figure 4C, compare control in panels H3 and H3:CATD<sup>CID</sup>; Figure 4D, compare lanes 1 and 3). These effects do not reflect variable expression of the constructs as a result of the different chromosomal locations where they are inserted, because two independent transgenic lines were analyzed for each construct, showing similar results. Most important, the contribution of CATD<sup>CID</sup> to the regulation of CenH3<sup>CID</sup> stability depends on Ppa, because its depletion strongly increases expression of

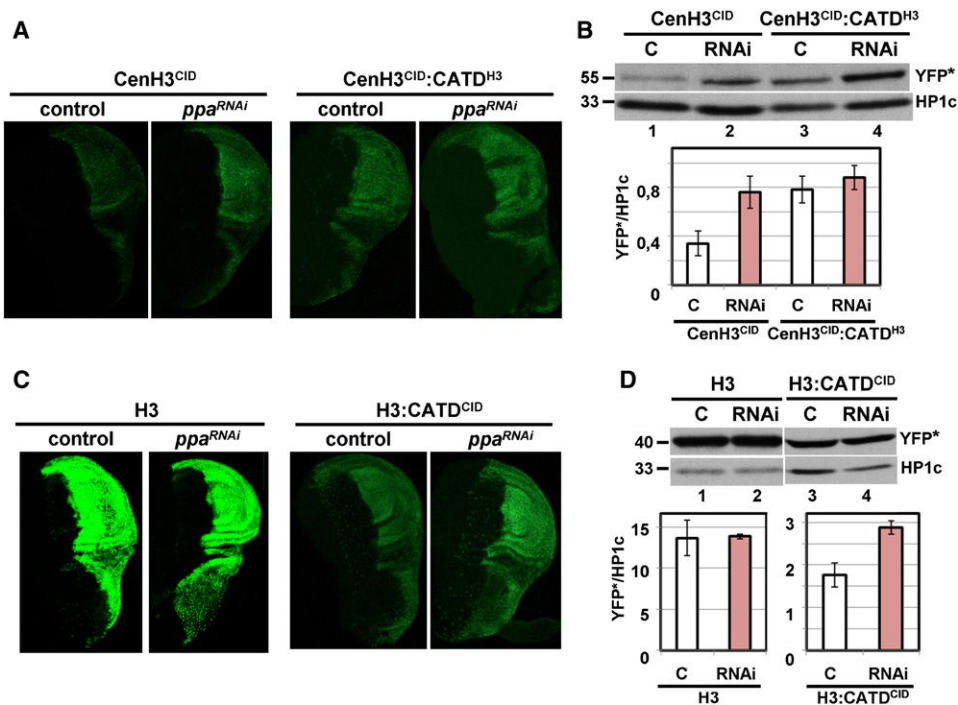


Figure 4. CATD<sup>CID</sup> Mediates Ppa-Dependent CenH3<sup>CID</sup> Stability

(A) Overexpression of CenH3<sup>CID</sup>-YFP (left) and CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup>-YFP (right) was induced by *en*-GAL4 in control flies or in knockdown *ppa*<sup>RNAi(1)</sup> flies, where *en*-GAL4 induces both expression of the YFP-tagged proteins and depletion of Ppa at the posterior compartment. Protein localization was determined by direct fluorescence visualization.

(B) Western blot analysis of the levels of expression of CenH3<sup>CID</sup>-YFP (lanes 1 and 2) and CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup>-YFP (lanes 3 and 4) in control (lanes 1 and 3) and *ppa*<sup>RNAi(1)</sup> larvae (lanes 2 and 4). Overexpression of the various constructs and depletion of Ppa was ubiquitously induced by crossing to flies carrying an *Act5C*-GAL4 driver.  $\alpha$ GFP antibodies were used for detection of the YFP-tagged proteins (YFP\*). For loading control,  $\alpha$ HP1c antibodies were used. The position corresponding to the indicated molecular weight markers (kDa) is indicated. Quantitative analysis is shown at the bottom. Error bars are SD.

(C) As in (A), but for H3-YFP (left) and H3:CATD<sup>CID</sup>-YFP (right).

(D) As in (B), but for H3-YFP (lanes 1 and 2) and H3:CATD<sup>CID</sup>-YFP (lanes 3 and 4). Notice the different y axis scales used for H3-YFP and H3:CATD<sup>CID</sup>-YFP and with respect to CenH3<sup>CID</sup>-YFP and CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup>-YFP. See also Figure S3 and Figure S4.

constructs carrying CATD<sup>CID</sup> (i.e., CenH3<sup>CID</sup> and H3:CATD<sup>CID</sup>), whereas it has no significant effect on expression of constructs carrying CATD<sup>H3</sup> (i.e., H3 and CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup>) (Figure 4). Additional determinants appear to contribute to CenH3<sup>CID</sup> stability, because H3:CATD<sup>CID</sup> is expressed to higher levels than CenH3<sup>CID</sup> (compare Figure 4B, lane 1, and Figure 4D, lane 3) and Ppa depletion slightly increases CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup> levels (Figure 4B, lanes 3 and 4). At this respect, it must be noted that, as shown by yeast two-hybrid and GST pull-down assays, Ppa also interacts with the N-terminal domain of CenH3<sup>CID</sup> (Figures 2A and 2B).

Altogether, these results indicate that Ppa-dependent stability of CenH3<sup>CID</sup> is largely mediated by CATD<sup>CID</sup>. Most remarkably, in budding yeast, CATD<sup>Cse4p</sup> has also been shown to mediate interaction with Psh1 and proteolytic degradation of CenH3<sup>Cse4p</sup> [13], suggesting that a conserved function of CATD is to regulate CenH3 stability. CATD has also been implicated in targeting CenH3 to centromeres [25, 26]. As a matter of fact, CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup> mislocalizes through chromatin (Figure S4). It must be noted, however, that H3:CATD<sup>CID</sup> shows diffuse localization throughout chromatin (Figure S4) indicating that, in *Drosophila*, CATD<sup>CID</sup> is necessary but not sufficient for targeting CenH3<sup>CID</sup> to centromeres, which is in contrast to what is observed in human cells, where CATD<sup>CenpA</sup> is both necessary and sufficient for targeting CenH3<sup>CenpA</sup> to centromeres [25]. These observations suggest

that, in *Drosophila*, other determinants also contribute to centromeric localization of CenH3<sup>CID</sup>. Actually, in budding yeast, H3 constructs capable of rescuing lethality associated to a *cse4 $\Delta$*  deletion carry, in addition to CATD<sup>Cse4p</sup>, a short region of helix  $\alpha$ 3 and the complete N-terminal domain [31]. Alternatively, considering that CenH3<sup>CID</sup>-Ppa interaction appears to involve several determinants, it is possible that chimeric proteins carrying only CATD<sup>CID</sup> are not sufficiently downregulated and, therefore, are deposited throughout chromatin.

#### General Considerations and Implications

Results reported here show that, in *Drosophila*, the F box protein Ppa regulates CenH3<sup>CID</sup> stability. Ppa is a component of SCF [14–17], a main E3-ubiquitin ligase complex that incorporates different F box proteins as variable subunits for specific recognition of the substrate and mediates degradation of key cell-cycle regulators (reviewed in [23, 24]). Several observations strongly favor that SCF<sup>Ppa</sup> may be directly involved in the regulation of CenH3<sup>CID</sup> proteolysis, because Ppa physically interacts with CenH3<sup>CID</sup> and binding of Ppa to CenH3<sup>CID</sup> nucleosomes is mediated by CATD<sup>CID</sup> that, in the fly, regulates CenH3<sup>CID</sup> stability in a Ppa-dependent manner.

Interestingly, in *Drosophila* syncytial embryos, de novo CenH3<sup>CID</sup> deposition at centromeres occurs at anaphase [32], which is precisely when most known SCF complexes



are not active [23, 24]. In this scenario, it is tempting to speculate that proteolytic degradation and centromeric deposition of CenH3<sup>CID</sup> are tightly synchronized. It is possible that, at interphase, SCF<sup>Ppa</sup> regulates CenH3<sup>CID</sup> levels to prevent its promiscuous incorporation during DNA replication or at sites of high histone turnover. In this model, newly synthesized CenH3<sup>CID</sup> becomes available for deposition when, at mitosis, CenH3<sup>CID</sup> is no longer regulated by SCF<sup>Ppa</sup>. Most interestingly, in human cells, centromeric CenH3<sup>CenpA</sup> deposition also occurs at late anaphase/early G1 [33, 34], suggesting that SCF-mediated proteolysis could be a general mechanism to regulate CenH3 deposition. At this respect, it must be noted that in budding yeast, where centromeric CenH3<sup>Cse4p</sup> deposition occurs during DNA replication after all preexisting CenH3<sup>Cse4p</sup> has been evicted from centromeres [35], a different E3-ligase, Psh1, has been shown to regulate CenH3<sup>Cse4p</sup> stability [12, 13]. In fission yeast, CenH3<sup>Cnp1</sup> deposition also occurs both at S and in late G2 [36]. It is possible that SCF regulates CenH3 stability only in metazoans, where CenH3 deposition is replication independent [37–39]. It is also possible that, both in yeasts and metazoans, various E3-ligases regulate CenH3 stability. As a matter of fact, CenH3<sup>Cse4p</sup> degradation is not fully abolished in a *psh1*Δ strain [12, 13].

#### Supplemental Information

Supplemental Information includes four figures and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at doi:10.1016/j.cub.2011.07.041.

#### Acknowledgments

We are thankful to J.M. Belote, M.L. Espinàs, J. Font-Burgada, and M. Weir for materials. We are also thankful to E. Fuentes and E. Freire for technical assistance and to M. Lamy for help in related experiments. S.M.-G. acknowledges receipt of a Formación del Profesorado Universitario fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MCINN). This work was supported by grants from MCINN (CSD2006-49 and BFU2009-07111), the CSIC (200420E391), and the Generalitat de Catalunya (SGR2009-1023). This work was carried out within the framework of the Centre de Referència en Biotecnologia of the Generalitat de Catalunya.

Received: February 21, 2011

Revised: June 7, 2011

Accepted: July 28, 2011

Published online: August 25, 2011

#### References

- Allshire, R.C., and Karpen, G.H. (2008). Epigenetic regulation of centromeric chromatin: Old dogs, new tricks? *Nat. Rev. Genet.* 9, 923–937.
- Bloom, K. (2007). Centromere dynamics. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 151–156.
- Ekwall, K. (2007). Epigenetic control of centromere behavior. *Annu. Rev. Genet.* 41, 63–81.
- Malik, H.S., and Henikoff, S. (2009). Major evolutionary transitions in centromere complexity. *Cell* 138, 1067–1082.
- Morris, C.A., and Moazed, D. (2007). Centromere assembly and propagation. *Cell* 128, 647–650.
- Sullivan, K.F. (2001). A solid foundation: Functional specialization of centromeric chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 182–188.
- Torras-Llort, M., Moreno-Moreno, O., and Azorín, F. (2009). Focus on the centre: The role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *EMBO J.* 28, 2337–2348.
- Collins, K.A., Furuyama, S., and Biggins, S. (2004). Proteolysis contributes to the exclusive centromere localization of the yeast Cse4/CENP-A histone H3 variant. *Curr. Biol.* 14, 1968–1972.
- Moreno-Moreno, O., Torras-Llort, M., and Azorín, F. (2006). Proteolysis restricts localization of Cid, the centromere-specific histone H3 variant of *Drosophila*, to centromeres. *Nucleic Acids Res.* 34, 6247–6255.
- Maehara, K., Takahashi, K., and Saitoh, S. (2010). CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Mol. Cell Biol.* 30, 2090–2104.
- Lomonte, P., Sullivan, K.F., and Everett, R.D. (2001). Degradation of nucleosome-associated centromeric histone H3-like protein CENP-A induced by herpes simplex virus type 1 protein ICP0. *J. Biol. Chem.* 276, 5829–5835.
- Hewawasam, G., Shivaraju, M., Mattingly, M., Venkatesh, S., Martin-Brown, S., Florens, L., Workman, J.L., and Gerton, J.L. (2010). Psh1 is an E3 ubiquitin ligase that targets the centromeric histone variant Cse4. *Mol. Cell* 40, 444–454.
- Ranjitkar, P., Press, M.O., Yi, X., Baker, R., MacCoss, M.J., and Biggins, S. (2010). An E3 ubiquitin ligase prevents ectopic localization of the centromeric histone H3 variant via the centromere targeting domain. *Mol. Cell* 40, 455–464.
- Das, T., Purkayastha-Mukherjee, C., D'Angelo, J., and Weir, M. (2002). A conserved F-box gene with unusual transcript localization. *Dev. Genes Evol.* 212, 134–140.
- Ou, C.-Y., Pi, H., and Chien, C.-T. (2003). Control of protein degradation by E3 ubiquitin ligases in *Drosophila* eye development. *Trends Genet.* 19, 382–389.
- Raj, L., Vivekanand, P., Das, T.K., Badam, E., Fernandes, M., Finley, R.L., Jr., Brent, R., Appel, L.F., Hanes, S.D., and Weir, M. (2000). Targeted localized degradation of Paired protein in *Drosophila* development. *Curr. Biol.* 10, 1265–1272.
- Skaar, J.R., Pagan, J.K., and Pagano, M. (2009). SnapShot: F box proteins I. *Cell* 137, 1160–1160.
- Heun, P., Erhardt, S., Blower, M.D., Weiss, S., Skora, A.D., and Karpen, G.H. (2006). Mislocalization of the *Drosophila* centromere-specific histone CID promotes formation of functional ectopic kinetochores. *Dev. Cell* 10, 303–315.
- Tomonaga, T., Matsushita, K., Yamaguchi, S., Oohashi, T., Shimada, H., Ochiai, T., Yoda, K., and Nomura, F. (2003). Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Res.* 63, 3511–3516.
- Van Hooser, A.A., Ouspenski, I.I., Gregson, H.C., Starr, D.A., Yen, T.J., Goldberg, M.L., Yokomori, K., Earnshaw, W.C., Sullivan, K.F., and Brinkley, B.R. (2001). Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J. Cell Sci.* 114, 3529–3542.
- Saville, K.J., and Belote, J.M. (1993). Identification of an essential gene, *l(3)73Ai*, with a dominant temperature-sensitive lethal allele, encoding a *Drosophila* proteasome subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8842–8846.
- Smyth, K.A., and Belote, J.M. (1999). The dominant temperature-sensitive lethal DTS7 of *Drosophila melanogaster* encodes an altered 20S proteasome  $\beta$ -type subunit. *Genetics* 151, 211–220.
- Cardozo, T., and Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: Insights into a molecular machine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 739–751.
- Nakayama, K.I., and Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: Cell-cycle control and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 369–381.
- Black, B.E., Foltz, D.R., Chakravarthy, S., Luger, K., Woods, V.L., Jr., and Cleveland, D.W. (2004). Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature* 430, 578–582.
- Vermaak, D., Hayden, H.S., and Henikoff, S. (2002). Centromere targeting element within the histone fold domain of Cid. *Mol. Cell Biol.* 22, 7553–7561.
- Carroll, C.W., Silva, M.C.C., Godek, K.M., Jansen, L.E.T., and Straight, A.F. (2009). Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A nucleosomes by CENP-N. *Nat. Cell Biol.* 11, 896–902.
- Dunleavy, E.M., Roche, D., Tagami, H., Lacoste, N., Ray-Gallet, D., Nakamura, Y., Daigo, Y., Nakatani, Y., and Almouzni-Pettinotti, G. (2009). HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* 137, 485–497.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E.T., Bailey, A.O., Yates, J.R., 3rd, Bassett, E.A., Wood, S., Black, B.E., and Cleveland, D.W. (2009). Centromere-specific assembly of CENP-A nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* 137, 472–484.
- Shuaib, M., Ouararhni, K., Dimitrov, S., and Hamiche, A. (2010). HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 1349–1354.
- Black, B.E., Jansen, L.E.T., Maddox, P.S., Foltz, D.R., Desai, A.B., Shah, J.V., and Cleveland, D.W. (2007). Centromere identity maintained by

- nucleosomes assembled with histone H3 containing the CENP-A targeting domain. *Mol. Cell* 25, 309–322.
32. Schuh, M., Lehner, C.F., and Heidmann, S. (2007). Incorporation of *Drosophila* CID/CENP-A and CENP-C into centromeres during early embryonic anaphase. *Curr. Biol.* 17, 237–243.
  33. Hemmerich, P., Weidtkamp-Peters, S., Hoischen, C., Schmiedeberg, L., Erliandri, I., and Diekmann, S. (2008). Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells. *J. Cell Biol.* 180, 1101–1114.
  34. Jansen, L.E.T., Black, B.E., Foltz, D.R., and Cleveland, D.W. (2007). Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J. Cell Biol.* 176, 795–805.
  35. Pearson, C.G., Yeh, E., Gardner, M., Odde, D., Salmon, E.D., and Bloom, K. (2004). Stable kinetochore-microtubule attachment constrains centromere positioning in metaphase. *Curr. Biol.* 14, 1962–1967.
  36. Takayama, Y., Sato, H., Saitoh, S., Ogiyama, Y., Masuda, F., and Takahashi, K. (2008). Biphasic incorporation of centromeric histone CENP-A in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 19, 682–690.
  37. Ahmad, K., and Henikoff, S. (2001). Centromeres are specialized replication domains in heterochromatin. *J. Cell Biol.* 153, 101–110.
  38. Shelby, R.D., Monier, K., and Sullivan, K.F. (2000). Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. *J. Cell Biol.* 151, 1113–1118.
  39. Lermontova, I., Schubert, V., Fuchs, J., Klatte, S., Macas, J., and Schubert, I. (2006). Loading of *Arabidopsis* centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *Plant Cell* 18, 2443–2451.

## Supplemental Information

### The F Box Protein Partner of Paired Regulates Stability of *Drosophila*

### Centromeric Histone H3, CenH3<sup>CID</sup>

Olga Moreno-Moreno, Sònia Medina-Giró, Mònica Torras-Llort,  
and Fernando Azorín

## Supplemental Inventory

### 1. Supplemental Figures and Tables

Figure S1, related to Figure 3

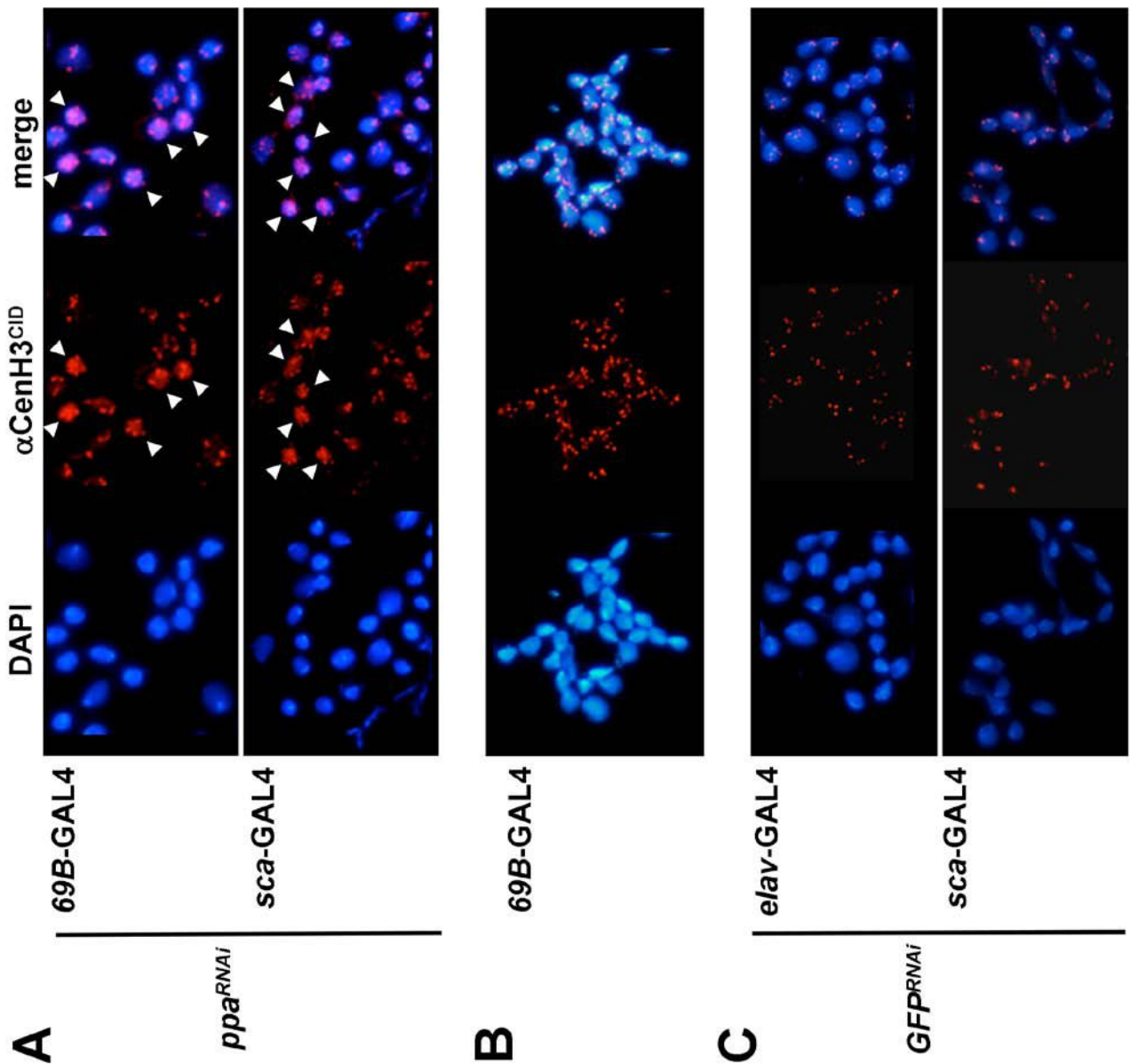
Figure S2, related to Figure 3

Figure S3, related to Figure 4

Figure S4, related to Figure 4

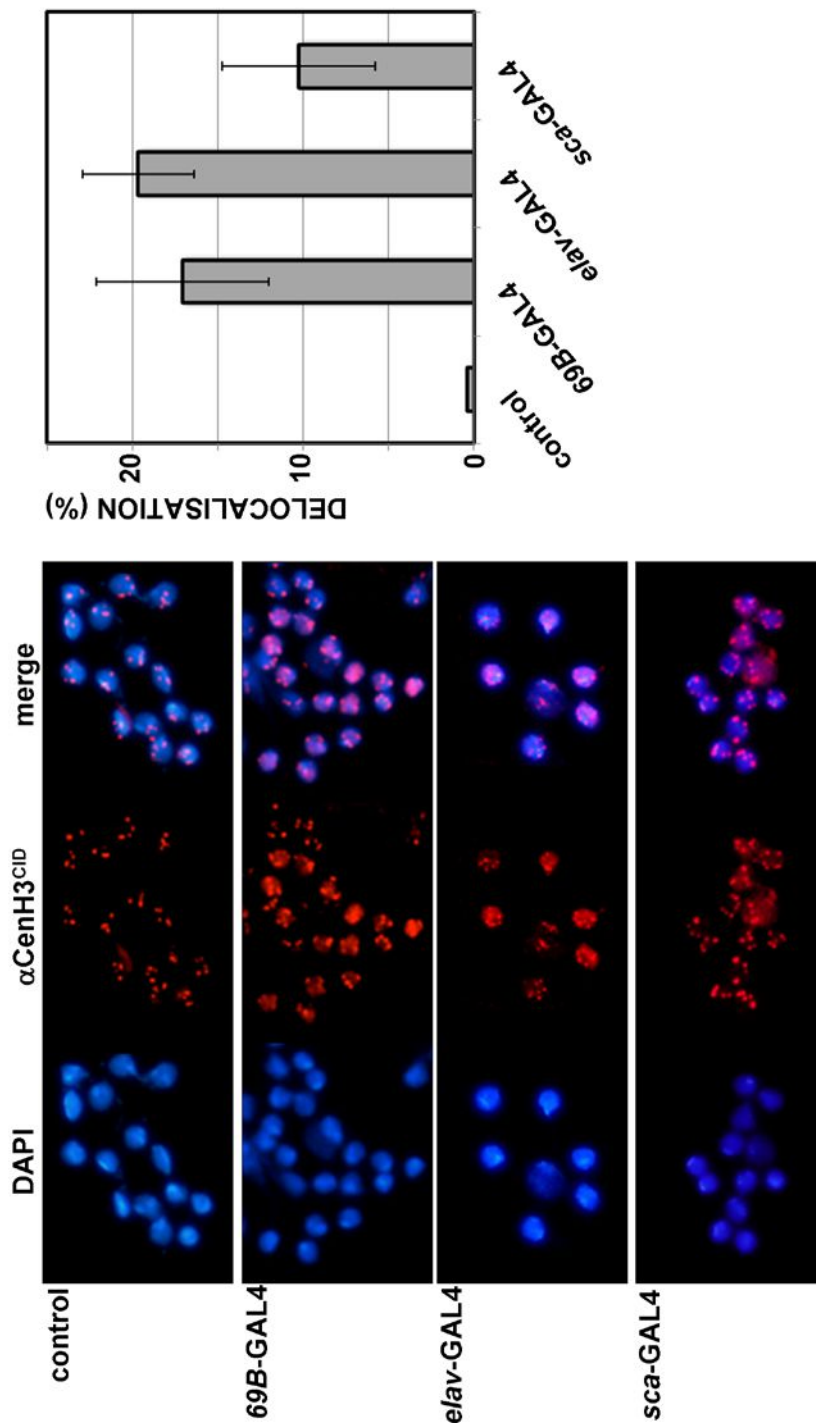
### 2. Supplemental Experimental Procedures

### 3. Supplemental References



**Figure S1, Related to Figure 3.**

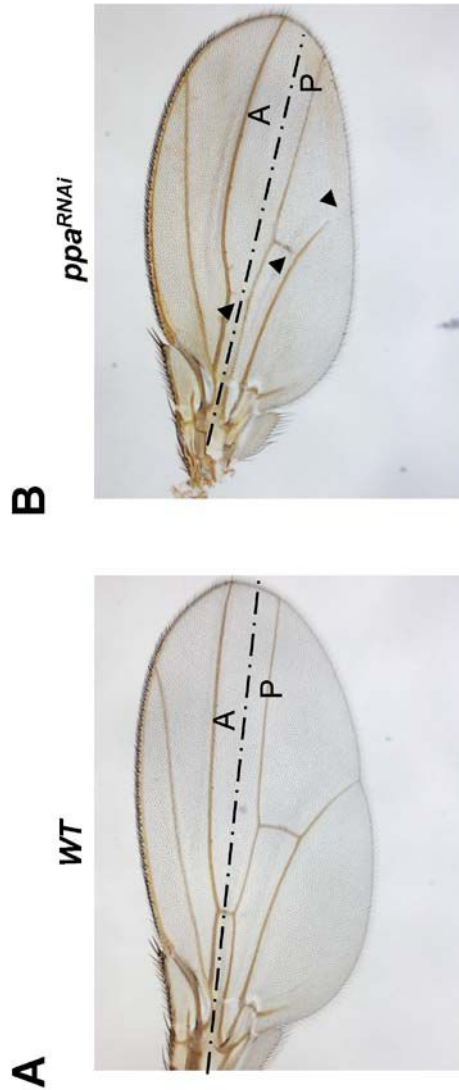
Ppa depletion increases CenH3<sup>CID</sup> levels. CenH3<sup>CID</sup> localisation was determined by immunostaining with  $\alpha$ CenH3<sup>CID</sup> antibodies (in red) in brain squashes from: (A) knockdown *ppa*<sup>RNAi(2)</sup> larvae, where depletion of Ppa was induced by 69B-GAL4 (upper panel) (N= 6241) or *sca*-GAL4 drivers (lower panel) (N= 3968); (B) 69B-GAL4 larvae (N= 937), and (C) control *GFP*<sup>RNAi</sup> larvae where expression of siRNAs against GFP was induced by *elav*-GAL4 (upper panel) (N= 627) or *sca*-GAL4 drivers (lower panel) (N= 536). DNA was stained with DAPI. Arrows indicate cells showing increased CenH3<sup>CID</sup> content and delocalisation.



**Figure S2, Related to Figure 3.**

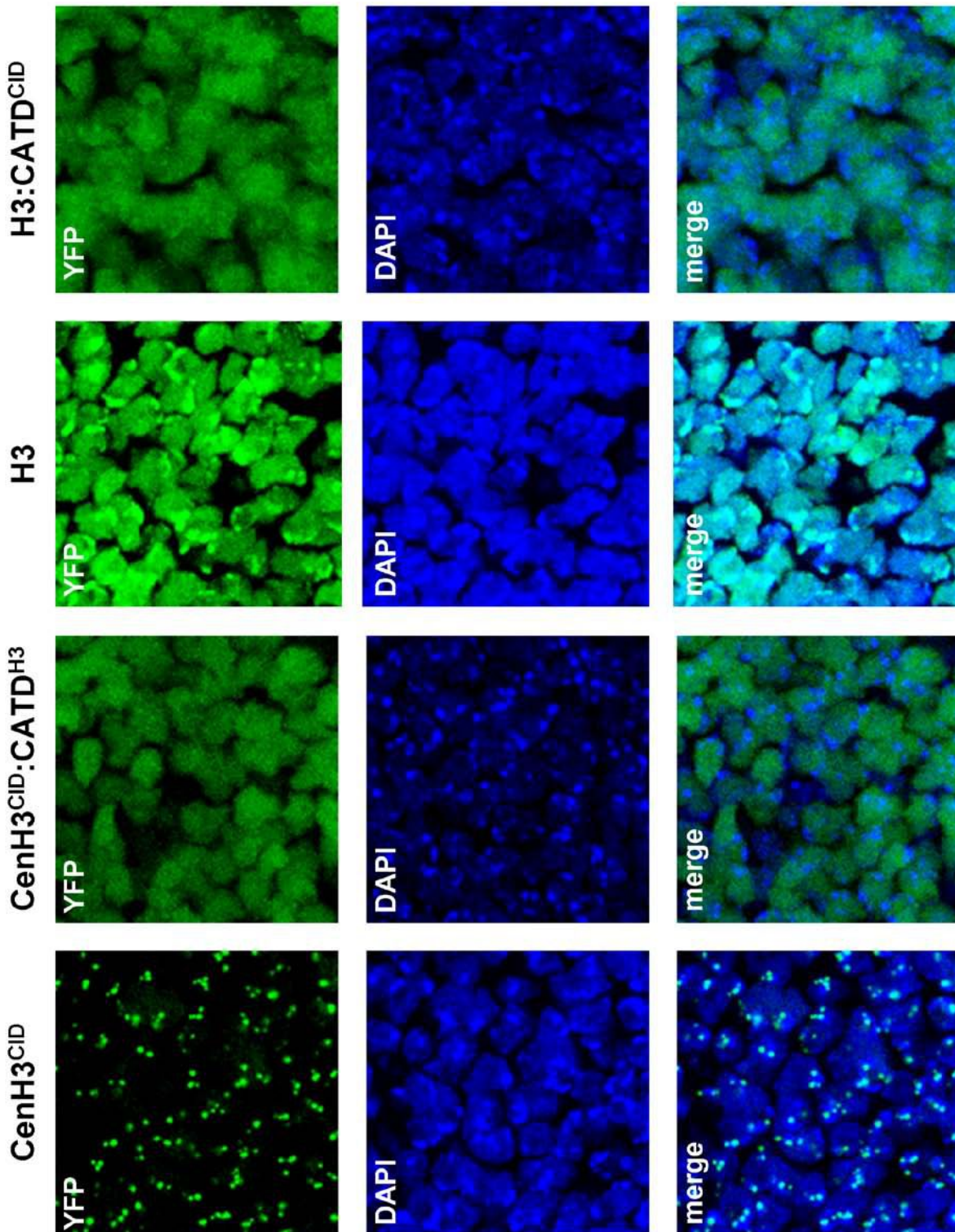
Ppa depletion induced by an independent  $ppa^{RNA(1)}$  mutation shows also increased CenH3<sup>CID</sup> expression and delocalisation. As in Figures 3A and S1A, but with an independent  $ppa^{RNA(1)}$  knockdown line. (N= 1825 (control), 10347 (69B-GAL4), 2590 (elav-GAL4) and 1280 (sca-GAL4)).





**Figure S3, Related to Figure 4.**

Over-expression of CenH3-YFP at the posterior compartment causes specific wing defects only when combined with Ppa depletion. CenH3<sup>CID</sup>-YFP was specifically over-expressed at the posterior compartment in wing imaginal discs by crossing flies carrying a UAS<sub>GAL4</sub>/CenH3<sup>CID</sup>-YFP construct to flies carrying an *en*-GAL4 driver. Over-expression was induced in control (*wt*) flies (A) or in knockdown *ppa*<sup>RNAi(1)</sup> flies (B), where *en*-GAL4 induces both expression of CenH3<sup>CID</sup>-YFP and depletion of Ppa at the posterior compartment. Adult wings were prepared from flies kept in 75% ethanol, 25% glycerol solution for at least 24h at room temperature. Flies were washed in PBS, wings dissected and immediately mounted in Fauré's medium under gentle pressure. Images were collected using a 4X objective lens of a Nikon E-600 microscope equipped with an Olympus DP72 camera and CellF software. In B, specific wing phenotypes are observed, including lack of anterior cross-vein and defects on vein L5 and posterior cross-vein (indicated by the arrows). In addition, wings are smaller in size, showing a highly reduced posterior compartment. The position of the anterior/posterior border is indicated.



**Figure S4, Related to Figure 4.**

CATD<sup>CID</sup> is necessary but not sufficient for centromeric localisation. Over-expression of the indicated YFP-tagged proteins was induced by *en*-GAL4 in wild-type flies and their patterns of localisation determined by direct fluorescence visualisation. DNA was stained with DAPI. In the case of H3-YFP, images were taken at 1/4th the laser intensity used for the rest of constructs.

## Supplemental Experimental Procedures

### Constructs and Antibodies

NCenH3<sup>CID</sup> and HFDCenH3<sup>CID</sup> correspond to residues 1 to 123, and 124 to 225 of CenH3<sup>CID</sup>, respectively. To obtain CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup>, residues 161 to 200 of CenH3<sup>CID</sup> were substituted by aminoacids 76 to 113 of histone H3. And *vice versa*, to obtain H3:CATD<sup>CID</sup> aminoacids 76 to 113 of histone H3 were substituted by aminoacids 161 to 200 of CenH3<sup>CID</sup>.

Rabbit polyclonal  $\alpha$ CenH3<sup>CID</sup> and rat polyclonal  $\alpha$ HP1c antibodies are described in [1] and [2], respectively. Rabbit polyclonal  $\alpha$ TAP was from Open Biosystems (CAB1001), rabbit polyclonal  $\alpha$ H3 from Cell Signaling (9715), rabbit polyclonal  $\alpha$ H2A from Abcam (ab13923) and mouse monoclonal  $\alpha$ GFP from Roche.

### Fly Stocks

*Pros26*<sup>1</sup>, obtained from Bloomington Stock Center (stock number 6182), and *Pros $\beta$ 2*, a gift from Dr. J. M. Belote, are described in [3, 4]. *ppa*<sup>RNAi(1)</sup> and *ppa*<sup>RNAi(2)</sup> correspond to lines 9952R-2 from NIG-FLY and 29903 from VDRC, respectively. *GFP*<sup>RNAi</sup> line was provided by Dr. Espinàs. *69B-GAL4*, *elav-GAL4*, *sca-GAL4*, *en-GAL4* and *Act5C-GAL4* lines are described in Bloomington Stock Center. For over-expression experiments, the various constructs used were fused at C-terminus to YFP using pEYFP-N1 vector (Clontech), and then transferred to pUAST vector to generate transgenic lines according to standard procedures by injection of the corresponding construct in *w;+/-;+/-* flies.

To analyse the efficiency of Ppa depletion in *ppa*<sup>RNAi</sup> flies, the relative levels of *ppa* mRNA, with respect to *actin5C* mRNA, were determined by qRT-PCR for control wild-type flies, and *ppa*<sup>RNAi(1)</sup> and *ppa*<sup>RNAi(2)</sup> knockdown flies, where Ppa depletion was induced by *sca-GAL4* and *elav-GAL4* drivers, respectively. Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen) from 50 third-instar larvae brains and purified using the RNeasy Mini Kit (Quiagen). For quantitative RT-PCR, cDNA was synthesized from 1 $\mu$ g of total RNA using oligodT and the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche), and analysed by real-time qPCR using LightCycler 480 DNA SYBR Green I Master (Roche). Real-time PCR data were analyzed using the 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> method. Primers were: *Ppa*, 5'CCCTGTCCCTCAATCAGTGC<sup>3'</sup> and 5'CGATCTTTAGCATGCCGTGA<sup>3'</sup>; *Act5C* 5'GCGCGGTTACTCTTTACCA<sup>3'</sup> and 5'ATGTCACG GACGATT TCACG<sup>3'</sup>. In *ppa*<sup>RNAi(1)</sup> and *ppa*<sup>RNAi(2)</sup> knockdown flies, *ppa* mRNA levels were reduced to 73% and 63% the original levels, respectively.

### Yeast Two-Hybrid Assays

Yeast two-hybrid screen was performed in strain EGY48 (*MAT $\alpha$* , *his3*, *trp1*, *ura3*, *LexA<sub>op(x6)</sub>-LEU2*) that carries six copies of the LexA operator at the regulatory region of a *LEU2* reporter. EGY48 cells were sequentially transformed. First, we introduced pLexNCenH3<sup>CID</sup>, where NCenH3<sup>CID</sup> was fused at C-terminus to the prokaryotic LexA DNA-binding domain using a modified pLexA vector (Pharmacia), and then, selected transformants were grown and transformed with 10 $\mu$ g of the RFLY1 library [5], a *Drosophila* embryonic cDNA (0-12h) library fused at C-terminus to the B42 activation domain, in which the expression of fused proteins is driven by the inducible yeast *GAL1* promoter. Colonies were grown on minimal medium containing 2% galactose and 1% raffinose as carbon source, and lacking leucine (-Leu) to select those

harbouring interacting proteins. One out of the 18 different positive clones identified (clone Ppa<sup>113</sup>) corresponded to a truncated cDNA encoding the last 92 residues of Ppa. To verify the specificity of the interaction we co-transformed EGY48 cells with pLexNCenH3<sup>CID</sup> and Ppa<sup>113</sup>. Cells were grown to a density of 2x10<sup>6</sup> cells/ml, and 20µl of the culture and four serial 10-fold dilutions were plated on Leu+ and Leu- plates. As negative controls, we transformed both constructs alone (rows Ppa<sup>113</sup> and NCenH3<sup>CID</sup> in Figure 2A) and we co-transformed pLexNCenH3<sup>CID</sup> and pJG4-5, a plasmid expressing only the B42 activation domain (row NCenH3<sup>CID</sup>/B42 in Figure 2A). As positive control, we used constructs of the POZ domain of GAGA (row POZ/POZ in Figure 2A), which are described in [6].

### GST Pull-Down Assays

For pull down assays, GST fusion proteins were bound to Glutathione Sepharose-4B beads, equilibrated in binding buffer (25mM HEPES pH 7.5, 150mM KCl, 12.5mM MgCl<sub>2</sub>, 20% glycerol, 0.1% NP40, 0.15mg/ml BSA, 1mM DTT), and incubated for 1h at room temperature with the corresponding <sup>35</sup>S - labelled proteins that were produced *in vitro*, using the TNT - coupled reticulocyte lysate system (Promega). Beads were washed four times with 1ml of 20mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% NP40, and bound proteins analysed on SDS-PAGE gels by autoradiography.

When GST-pull down assays were performed with mononucleosomes, we used stable S2 cell lines over-expressing CenH3<sup>CID</sup>-TAP or CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup>-TAP, where the corresponding constructs were fused at C-terminus to TAP using pMK33-CTAP vector [7], and over-expression is under the control of a Cu-inducible promoter. After induction with 0,5mM CuSO<sub>4</sub> for 24h, approximately 2.5x10<sup>9</sup> cells were harvested and bulk nucleosomes were obtained by micrococcal nuclease (Sigma) digestion of purified nuclei. Mononucleosomes were purified on 10-35% linear sucrose gradients (100mM NaCl, 5mM HEPES pH 7.9, 0.2mM EDTA) by centrifugation on Beckman SW32 rotor at 27000 rpm for 16h at 4°C. Pull downs were performed as described in [2]. Briefly, 10µg of GST-Ppa were bound to Glutathione Sepharose-4B beads in 350µl of pull down buffer (100mM NaCl, 5mM HEPES pH 7.9, 0.2mM EDTA, 0.1% NP40, 1mM DTT, 0.1mM PMSF) and then incubated with 100µl of purified mononucleosomes for 2h30min at 4°C. After incubation beads were washed five times for 5min at 4°C in the same buffer, eluted with SDS-PAGE loading buffer and analysed by Western blot.

### Fluorescence Microscopy Analysis

For experiments with *ts*-proteasome mutants, crosses were kept for 24h at permissive temperature (18°C for *Prosβ2*/TM3, and 25°C for *Pros26<sup>1</sup>*/TM3 and wild type flies) and, after removing adult flies, shifted to the restrictive temperature (25°C for *Prosβ2*/TM3, and 29°C for *Pros26<sup>1</sup>*/TM3 and wild type flies) until larvae reached the third-instar stage. For experiments with knockdown *ppa*<sup>RNAi</sup> lines, crosses were left at 29°C until third-instar larvae stage.

Brains were dissected in 0.7% NaCl, and after an hypotonic treatment with 0.5% sodium citrate for 10min, were fixed in 3.7% formaldehyde for 30min. Brain squashes were performed by standard methods [8]. For immunostaining, brain squashes were blocked in PBS, 0.1% Triton X-100, 1% milk for 1h at room temperature, incubated overnight at 4°C with αCenH3<sup>CID</sup> (1:300) in blocking buffer,

washed twice and incubated with rabbit  $\alpha$ Cy3 conjugated antibody (1:400; Jackson Immunoresearch laboratories) in blocking buffer. For visualization, slides were mounted in Mowiol (Calbiochem-Novabiochem) containing 0.2ng/ $\mu$ l DAPI (Sigma). Images were collected with an Olympus DP72 camera mounted on a Nikon Eclipse E-800 inverted microscope with a 40x objective lens. Acquisition parameters were controlled by CellF software and images were analysed with Adobe Photoshop.

Wing imaginal disc were dissected in PBS, fixed in PBS, 4% paraformaldehyde for 20min at room temperature, washed in PBS, 0.3% Triton X-100 three times for 5min and once in PBS for 10min, incubated for 30min at room temperature with 0.02ng/ $\mu$ l DAPI in PBS, washed for 5min in PBS, 0.3% Triton X-100 and mounted in Mowiol (Calbiochem-Novabiochem). GFP fluorescence was visualized directly in a Leica TCS/SPE confocal microscope equipped with LAS/AF software. Images were analyzed with ImageJ software.

### Western Blot Analysis

Western blot analyses of GST-pull down assays were performed using  $\alpha$ TAP (1:2500),  $\alpha$ H3 (1:2500) and  $\alpha$ H2A (1:2500) antibodies. When levels of YFP-fusion proteins were analysed, flies carrying the different YFP-constructs were crossed to flies carrying *Act5C-GAL4* driver and protein extracts were prepared from a mixture of brains, imaginal discs and salivary glands, and analysed by Western blot with  $\alpha$ GFP (1:2000) and  $\alpha$ HP1c (1:10000) antibodies. Quantitative analyses were carried out with a GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad) and Quantity One software.

### References

1. Moreno-Moreno, O., Torras-Llort, M., and Azorín, F. (2006). Proteolysis restricts localization of CID, the centromere-specific histone H3 variant of *Drosophila*, to centromeres. *Nucleic Acids Res.* 34, 6247-6255.
2. Font-Burgada, J., Rossell, D., Auer, H., and Azorín, F. (2008). *Drosophila* HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC (ROW) to regulate gene expression. *Genes Dev.* 22, 3007-3023.
3. Saville, K.J., and Belote, J.M. (1993). Identification of an essential gene, *l(3)73Ai*, with a dominant temperature-sensitive lethal allele, encoding a *Drosophila* proteasome subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8842-8846.
4. Smyth, K.A., and Belote, J.M. (1999). The dominant temperature-sensitive lethal DTS7 of *Drosophila melanogaster* encodes an altered 20S proteasome  $\beta$ -type subunit. *Genetics* 151, 211-220.
5. Finley, R.L.J., Thomas, B.J., Zipursky, S.L., and Brent, R. (1996). Isolation of *Drosophila* cyclin D, a protein expressed in the morphogenetic furrow before entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3011-3015.
6. Espinàs, M.L., Canudas, S., Fanti, L., Pimpinelli, S., Casanova, J., and Azorín, F. (2000). The GAGA factor of *Drosophila* interacts with SAP18, a Sin3-associated polypeptide. *EMBO Rep.* 1, 253-259.
7. Veraksa, A., Bauer, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Analyzing protein complexes in *Drosophila* with tandem affinity purification-mass spectrometry. *Dev. Dyn.* 232, 827-834.
8. Gatti, M., Bonaccorsi, S., and Pimpinelli, S. (1994). Looking at *Drosophila* mitotic chromosomes. *Methods Cell. Biol.* 44, 371-391.

## **RESUM DELS RESULTATS**



## RESUM DELS RESULTATS

En els capítols 1 i 2 d'aquesta Tesi es presenten dos treballs que han tingut com objectiu la identificació i caracterització de noves proteïnes centromèriques a *Drosophila melanogaster*. En el capítol 1 es descriu com s'ha realitzat la purificació i posterior identificació de les proteïnes associades als nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>. En aquest mateix capítol també s'analitza el patró de localització d'una de les proteïnes identificades, la proteïna codificada pel gen *CG8289*. En treball del capítol 2 s'estudia el patró de localització de la proteïna dBAF, també identificada en les nostres purificacions; així com també la seva contribució en la funció centromèrica. En resum, s'ha observat que dBAF es localitza als centròmers dels cromosomes metafàsics i intervé en la deposició i/o estabilització de la proteïna centromèrica CENP-C. Aquesta darrera observació és molt rellevant perquè fins al moment no es coneixia cap factor implicat en la deposició de CENP-C en cap organisme.

Per altra banda, en el capítol 3 es presenta un treball en el que s'ha analitzat la contribució del domini N-terminal de CenH3<sup>CID</sup> en l'assemblatge del cinetocor. Concretament, s'ha observat que un domini ric en arginines dins del domini N-terminal de CenH3<sup>CID</sup> permet el reclutament de BubR1, una proteïna conservada del punt de control de mitosi. A més, també s'ha vist que la contribució del domini N-terminal en el reclutament de proteïnes del cinetocor està evolutivament conservada.

Per últim, en el darrer capítol es presenta un treball en el que s'ha confirmat la contribució de la proteïna F-box Ppa en l'estabilitat de CenH3<sup>CID</sup>. Ppa reconeix específicament el domini CATD de CenH3<sup>CID</sup>, induint la poliubiquitinació i posterior degradació d'aquesta variant via proteosoma.

### **1. Identificació de noves proteïnes centromèriques a *Drosophila melanogaster***

Per tal d'identificar noves proteïnes centromèriques a *Drosophila* vam realitzar la purificació i posterior identificació per espectroscòpia de masses de les proteïnes associades als nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>. En total es va identificar un cinquantena de proteïnes de les quals se'n van seleccionar vuit com a possibles candidates a estar relacionades amb els centròmers. A continuació, per tal d'analitzar el patró de localització cel·lular de les proteïnes seleccionades, es van transfectar transitòriament a cèl·lules SL2 els plasmidis que permetien l'expressió de les proteïnes fusionades als *tags* FLAG-HA o bé TAP a C-terminal. Per tres de les vuit proteïnes es van observar patrons de localització cel·lular molt interessants. Concretament, per les proteïnes de fusió *CG8289-FLAG-HA* i *RpL22-FLAG-HA* es va observar en interfase un comportament bastant similar, l'acumulació de la proteïna de fusió a una regió concreta del nucli i molt propera als clústers de CENP-C. Per contra, en cromosomes mitòtics no es va detectar senyal específica per les proteïnes de fusió.



Per altra banda, per la proteïna BAF-FLAG-HA es va detectar que s'acumula propera als centròmers dels cromosomes mitòtics. En canvi, a interfase es localitza difosa per tot el nucli.

En el treball del capítol 1 es va continuar amb la caracterització de la proteïna codificada pel gen *CG8289*. En primer lloc, es va analitzar el seu patró de localització a cèl·lules SL2. Concretament, es va observar que la proteïna s'acumula propera als clústers de CENP-C i que sovint aquestes acumulacions colocalitzen amb el senyal per la proteïna HP1a. Curiosament, en neuroblastos es va observar un comportament força similar, acumulacions de la proteïna que tenen associats clústers de CENP-C. En darrer lloc, es va determinar el seu patró de localització a cromosomes politènics, detectant un enriquiment per la proteïna en el cromocentre i els telòmers.

## **2. *Drosophila* Barrier-to-Autoinegration factor (dBAF) es localitza als centròmers i és necessària per l'assemblatge de CENP-C**

Inicialment en aquest treball, es va observar que la proteïna dBAF es localitza a l'heterocromatina de les cèl·lules SL2 en interfase, ja que el seu senyal colocalitza amb el d'HP1a i en canvi, exclou el d'HP1c, isoforma d'HP1 que es localitza bàsicament a l'eucromatina. Tanmateix, un cop iniciada la mitosi aquesta es localitza exclusivament en els centròmers dels cromosomes metafàsics. La interacció de dBAF amb la cromatina centromèrica està regulada pel seu estat de fosforilació. Mitjançant l'expressió de la forma mutant de dBAF que no es poden fosforilar i de la forma mutant mimètica per la fosforilació de dBAF, vam determinar que la fracció de dBAF unida als centròmers dels cromosomes metafàsics no està fosforilada.

Per altra banda, vam detectar que la sobreexpressió del dominant negatiu dBAF-YFP disminueix els nivells centromèrics de CENP-C sense afectar significativament els nivells de CenH3<sup>CID</sup>. A més, es va observar un increment significatiu del percentatge de cèl·lules amb alt contingut de DNA, indicant que la sobreexpressió d'aquesta construcció indueix una aturada del cicle a G2/M. En canvi, la sobreexpressió de la construcció funcional YFP-dBAF no afecta els nivells de CENP-C i de CenH3<sup>CID</sup> en els centròmers ni la progressió del cicle cel·lular. Paral·lelament, la depleció de dBAF en cèl·lules SL2 també produeix una disminució significativa dels nivells de CENP-C en els centròmers, induint lleugers defectes en la segregació cromosòmica i en la divisió cel·lular. En conjunt, totes aquestes observacions suggereixen que dBAF intervé en l'assemblatge i/o estabilització de CENP-C en els centròmers.

Per altra banda, els nostres experiments de co-immunoprecipitació mostren que dBAF i CENP-C interaccionen i que aquesta interacció depèn de l'estat de fosforilació de dBAF. En concret, CENP-C interacciona preferentment amb dBAF no fosforilat. Alhora, aquesta interacció també depèn del RNA, ja que és sensible al tractament amb RNasa. A més, de forma similar que en cèl·lules humanes (Wong et al., 2007), l'assemblatge i/o estabilització de CENP-C en

els centròmers de *Drosophila* també depèn del RNA, ja que al tractar les cèl·lules amb RNasa els nivells de CENP-C en els centròmers es veuen greument reduïts, sense afectar els nivells de CenH3<sup>CID</sup>. Totes aquestes observacions suggereixen que dBAF podria formar part d'un complex nucleoproteic que permet la deposició i/o posterior estabilització de CENP-C en els centròmers.

### **3. Un domini conservat ric en arginines dins del domini N-terminal de CenH3<sup>CID</sup> intervé en el reclutament de BubR1**

El mecanisme molecular pel qual CenH3 dicta l'assemblatge del cinetocor en cada mitosi es desconeix, ja que les interaccions de CenH3 amb la resta de components del centròmer i del cinetocor no estan del tot caracteritzades a nivell molecular ni estructural.

En aquest treball, vam observar la contribució de CenH3<sup>CID</sup>, en el reclutament de BubR1, una proteïna conservada del cinetocor que està implicada en l'activació del punt de control de la mitosi. Aquesta interacció es dona mitjançant el domini N-terminal de CenH3<sup>CID</sup> (N-CenH3<sup>CID</sup>), ja que el reclutament ectòpic d'aquest domini davant d'un gen *reporter* produeix el reclutament de BubR1 i indueix el silenciament d'aquest gen. També, vam observar que aquest efecte depèn d'un domini conservat de N-CenH3<sup>CID</sup> entre les diferents espècies del grup de *Drosophila*. Aquest domini és molt petit i ric en arginines. Els nostres resultats suggereixen que aquestes arginines són necessàries per produir el silenciament, ja que la seva deleció o mutació per alanines elimina pràcticament el silenciament del gen *reporter*.

Curiosament, tot i la manca de conservació del domini N-terminal de CenH3 entre organismes, la presència de motius rics en arginines és una característica comuna de tots ells. A més, el reclutament dels dominis N-terminals de les CenH3s de *S. cerevisiae* i de humans també indueixen el silenciament del gen *reporter*, indicant que malgrat el baix grau de conservació d'aquest domini entre espècies, la contribució de CenH3 en el reclutament de proteïnes del cinetocor està evolutivament conservada.

En conclusió, els nostres resultats desvetllen una inesperada contribució del domini N-terminal de CenH3<sup>CID</sup> en el reclutament dels components del cinetocor, identificant un domini ric en arginines dins d'aquest que està evolutivament conservat i implicat en el reclutament de BubR1.

### **4. La proteïna F-box Ppa regula l'estabilitat de CenH3<sup>CID</sup>**

La variant centromèrica de la histona H3 té la capacitat d'incorporar-se en qualsevol lloc del genoma. En el llevat *S. cerevisiae* s'han detectat nivells baixos de CenH3<sup>Cse4</sup> en les regions eucromàtiques altament transcrits (Lefrançois et al., 2009). A més, en cèl·lules de *Drosophila* i d'humans s'ha observat que l'expressió transitòria de CenH3 fa que s'incorpori per tota la cromatina generant inestabilitat genòmica (Heun et al., 2006; Moreno-Moreno et

al., 2006; Van Hooser et al., 2001). Per tant, la cèl·lula ha de disposar de mecanismes per garantir que la incorporació estable dels nucleosomes de CenH3 només es produeixi en els centròmers.

Un d'aquests mecanismes és la degradació proteolítica via proteosoma dels nucleosomes de CenH3 incorporats en l'eucromatina però no dels units als centròmers. Aquest mecanisme ha sigut detectat en *S. cerevisiae*, en *D. melanogaster* i en cèl·lules humanes senescens o bé infectades amb el virus de l'herpes simple 1 (Collins et al., 2004; Lomonte et al., 2001; Maehara et al., 2010; Moreno-Moreno et al., 2006), el que indica que és un mecanisme conservat. Tanmateix, donat que el treball que descriu aquest mecanisme a *Drosophila* s'havia realitzat en condicions de sobreexpressió de CenH3<sup>CID</sup> (Moreno-Moreno et al., 2006), hi havia la possibilitat que aquest mecanisme no actués en condicions naturals. Així doncs, inicialment, es va confirmar que aquest mecanisme de degradació via proteosoma també afecta a CenH3<sup>CID</sup> endògena. En concret, vam observar que en mutants del proteosoma CenH3<sup>CID</sup> es deslocalitza per tota la cromatina.

Prèviament en el nostre laboratori, mitjançant un assaig de dos híbrids en llevat s'havia observat que el domini N-terminal de CenH3 de *Drosophila* (N-CenH3<sup>CID</sup>) interacciona amb la proteïna Ppa (*Partner of Paired*). Ppa és una proteïna F-box que forma part del complex SCF (*Skp1-Cullin-F-box-protein*), complex amb activitat ubiquitina-ligasa E3 que incorpora diferents proteïnes F-box en funció del substrat a reconèixer. També s'havia confirmat la interacciona de Ppa tant amb el domini N-terminal com amb el domini globular que té plegament tipus histona (HFD) de CenH3<sup>CID</sup>, essent la interacció amb aquest darrer domini més intensa. Aquestes dues observacions suggerien que Ppa podia ser la F-box que regula l'estabilitat de CenH3<sup>CID</sup>.

Per analitzar aquesta possibilitat, en primer lloc, vam estudiar la interacció de Ppa amb CenH3<sup>CID</sup> en el context nucleosomal. En concret, vam observar que Ppa interacciona específicament amb els nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup> i que aquesta interacció es dona mitjançant el domini CATD<sup>CID</sup> ubicat en el HFD de CenH3<sup>CID</sup>.

Posteriorment, vam confirmar que Ppa regula l'estabilitat de CenH3<sup>CID</sup>, ja que la depleció de Ppa incrementa els nivells d'aquesta variant i n'indueix la seva deslocalització per tota la cromatina. A més, la sobreexpressió de CenH3<sup>CID</sup>-YFP en absència de Ppa també induïx la deslocalització d'aquesta proteïna de fusió per tota l'eucromatina, compromentent la viabilitat de la cèl·lula. D'altra banda, experiments de sobreexpressió de CenH3<sup>CID</sup>, H3 i de les proteïnes quimèriques CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup> i H3:CATD<sup>CID</sup> van demostrar que el domini CATD<sup>CID</sup> regula l'estabilitat de CenH3<sup>CID</sup>. Concretament, es va observar que els nivells d'expressió de CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup> són superiors als de CenH3<sup>CID</sup>, indicant que CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup> no es pot degradar perquè no té el domini CATD<sup>CID</sup>. En canvi, els nivells d'H3 són superiors als d'H3:CATD<sup>CID</sup>, ja que aquesta darrera és degradada. Tanmateix, en absència de Ppa s'incrementen els nivells d'H3:CATD<sup>CID</sup>, però no tant com els d'H3,

suggestint que altres enzims poden reconèixer el domini CATD<sup>CID</sup> i induir la degradació d'H3:CATD<sup>CID</sup>. Finalment, els nostres resultats també mostren que el domini CATD<sup>CID</sup> és necessari però no suficient per la localització centromèrica de CenH3<sup>CID</sup>, ja que tant la proteïna quimèrica CenH3<sup>CID</sup>:CATD<sup>H3</sup> com la H3:CATD<sup>CID</sup> es deslocalitzen per tota la cromatina.

En conclusió, els nostres resultats suggereixen que Ppa reconeix específicament CenH3<sup>CID</sup> mitjançant el domini CATD i indueix la poliubiquitinació i posterior degradació de CenH3<sup>CID</sup> via proteosoma.



**DISCUSSIÓ**



## DISCUSSIÓ

En els darrers anys, s'han fet avenços importants en la descripció del mecanisme molecular d'assemblatge del cinetocor en les cèl·lules dels vertebrats. Aquest procés és jeràrquic i seqüencial, essent l'element clau CenH3, ja que la depleció d'aquesta variant indueix la deslocalització de la resta de components del cinetocor.

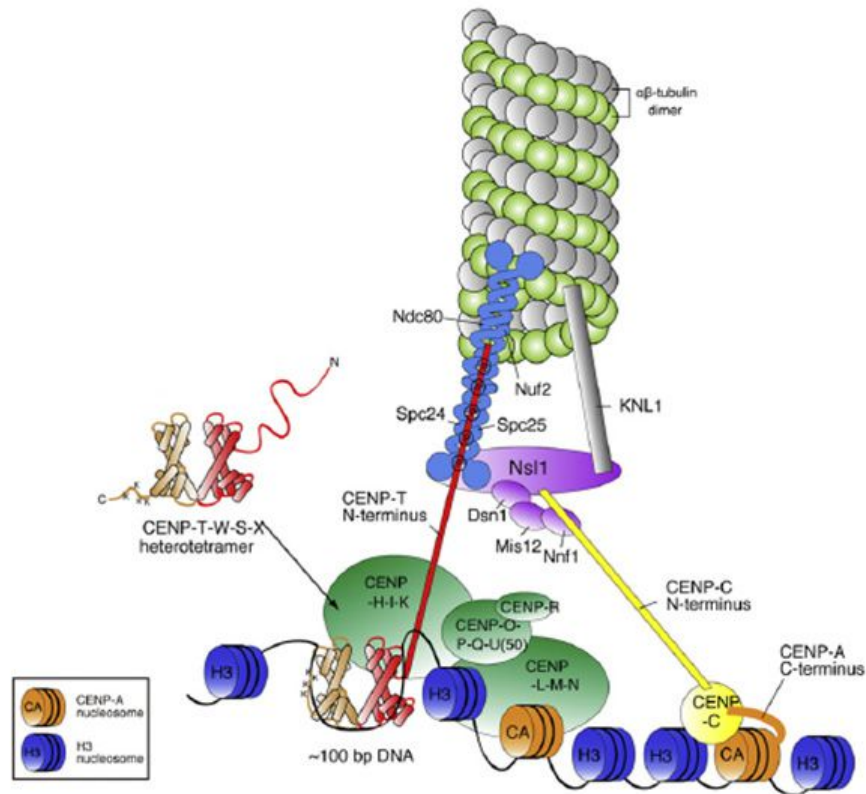
En vertebrats, a més de CenH3, unides constitutivament a la cromatina centromèrica s'han identificat setze proteïnes més que conformen el CCAN (Foltz et al., 2006; Hori et al., 2008a; Okada et al., 2006). Mitjançant anàlisis bioquímics, estructurals i genètics aquestes proteïnes es poden classificar en cinc subgrups: CENP-C, el grup de proteïnes CENP-H, -I, -K, el grup de proteïnes CENP-L, -M i -N, el complex CENP-T-W-S-X i el grup de proteïnes CENP-O, -P, -Q, -R i -U(50). El complex CENP-T-W-S-X s'uneix a una regió de DNA d'aproximadament 100 pb lliure de nucleosomes i forma una estructura similar a la d'un nucleosoma (Nishino et al., 2012). Associats a aquest complex hi ha els grups de proteïnes integrats per les proteïnes CENP-H, CENP-L i CENP-O (Hori et al., 2008a). En canvi, la proteïna CENP-C interacciona directament amb els nucleosomes d'H3 adjacents als nucleosomes de CenH3<sup>CENP-A</sup> i amb l'extrem final del domini C-terminal de CenH3<sup>CENP-A</sup> (Carroll et al., 2010; Hori et al., 2008a). Aquestes observacions suggereixen que en vertebrats hi ha dues vies de reclutament de les proteïnes del CCAN, una que depèn de l'estructura formada pel DNA-complex CENP-T-W-S-X i l'altre dependent dels nucleosomes d'H3 i de CenH3 (Takeuchi and Fukagawa, 2012) (Figura D.1).

En cada mitosi, aquestes proteïnes centromèriques permeten el reclutament de les proteïnes de la xarxa KMN, les quals interaccionen directament amb els microtúbuls. En concret, s'ha descrit que l'extrem N-terminal de CENP-T interacciona directament amb el complex Ndc80 (Gascoigne et al., 2011). Per altra banda, l'extrem N-terminal de CENP-C interacciona directament amb el complex Mis12 (Screpanti et al., 2011). Així doncs, CENP-C i el complex CENP-T-W-S-X, a més de ser reclutats per mecanismes diferents en el centròmer, actuen en vies paral·leles en el procés de formació del cinetocor, reclutant components diferents de la xarxa KMN. De forma general, tenint en compte totes aquestes observacions un possible model d'assemblatge del cinetocor en vertebrats seria l'existència de dues vies independents d'assemblatge que conflueixen en un punt, el reclutament dels components de la xarxa KMN. De fet, biològicament parlant, té molt de sentit que la cèl·lula disposi de dos mecanismes diferents per construir el cinetocor ja que aquest és indispensable per la segregació cromosòmica.

Curiosament, entre els components de la xarxa KMN s'estableixen relacions d'interdependència. A més, tot i que el complex Mis12 no s'uneix directament amb els microtúbuls, la interacció d'aquest amb KNL1 i Ndc80 incrementa la capacitat d'aquestes dues proteïnes per unir-se als microtúbuls (Cheeseman et al., 2006). Per tant, en aquest



punt les dues vies d'assemblatge del cinetocor s'unirien i actuarien en sinergia per potenciar la interacció del cinetocor amb els microtúbuls.

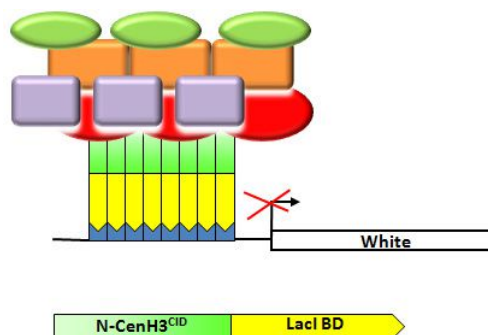


**Figura D.1. Estructura molecular del cinetocor dels vertebrats.** El complex CENP-T-W-S-X s'uneix a les regions de la cromatina centromèrica lliures de nucleosomes on forma una estructura similar a la d'un nucleosoma. Aquest complex mitjançant el domini N-terminal de CENP-T intervé en el reclutament del complex Ndc80 en els cinetocors. Els grups de proteïnes centromèriques integrats per CENP-H, CENP-O i CENP-L s'associen a aquesta estructura. En canvi, la localització centromèrica de CENP-C és independent del complex CENP-T-W-S-X. A més, CENP-C intervé en una via diferent d'assemblatge del cinetocor ja que intervé en el reclutament del complex Mis12. No obstant, les dues vies estant interconnectades, ja que les subunitats Spc24 i Spc25 del complex Ndc80 interaccionen amb la subunitat Nsl1 del complex Mis12. KNL1 s'uneix al complex Mis12 a través de la interacció amb Nsl1. Per últim, tant les subunitats Ndc80 i Nuf2 del complex Ndc80 com la proteïna KNL1 interaccionen directament amb els microtúbuls. Figura modificada a partir de Takeuchi and Fukagawa, 2012.

A més d'interaccionar amb els microtúbuls, els components de la xarxa KMN també intervenen en el reclutament dels components del punt de control de la mitosi. En concret, Ndc80 està implicada en el reclutament de Mad1 i Mad2. Per altra banda, KNL1 recluta els components del SAC, via el complex RZZ en el cas de Mad1 i Mad2 o directament com és el cas de Bub1, Bub3 i BubR1 (Bolanos-Garcia et al., 2011; Kops et al., 2005; Krenn et al., 2012; Petrovic et al., 2010). Tanmateix, els nostres resultats suggereixen que hi ha un segon mecanisme de reclutament de BubR1 en el centròmer que és independent del cinetocor.

### El domini N-terminal de CenH3<sup>CID</sup> recluta BubR1

En concret, vam observar que el reclutament ectòpic del domini N-terminal de CenH3<sup>CID</sup> (N-CenH3<sup>CID</sup>) davant d'un gen *reporter* indueix el silenciament d'aquest gen, suggerint que aquest domini pot interaccionar amb proteïnes centromèriques i/o del cinetocor que dificulten l'expressió d'aquest (Figura D.2). No obstant, en el lloc de reclutament ectòpic de N-CenH3<sup>CID</sup> no es van detectar proteïnes essencial del cinetocor com ara, CENP-C, ROD, POLO i MEI-S332, indicant que en aquesta regió no s'origina un cinetocor funcional. A més, l'expressió d'aquesta construcció no indueix defectes en la proliferació, fenotip que caldria esperar si en el lloc d'inserció s'originés un cinetocor funcional. Així doncs, aquest domini no és suficient per dictar l'assemblatge del cinetocor. Aquesta observació està d'acord amb els estudis publicats per Carroll et al., 2009 i 2010 on mostren que el domini CATD i l'extrem C-terminal de CenH3<sup>CENP-A</sup> interaccionen directament amb dues proteïnes del CCAN, CENP-N i CENP-C, respectivament, suggerint que aquests dos dominis són necessaris per la formació del cinetocor. Tanmateix, quan es sobreexpressa una forma de CenH3<sup>CENP-A</sup> en la qual s'ha deletat part del domini N-terminal, aquesta es deslocalitza en regions no centromèriques però, a diferència de la forma sencera, és incapaç de reclutar CENP-C i hSMC1 (*Human Structural Maintenance of chromosomes protein 1*) en els llocs ectòpics (Van Hooser et al., 2001). Per tant, malgrat que N-CenH3 no és suficient, sí que és necessari per reclutar proteïnes centromèriques en els llocs d'inserció.



**Figura D.2. Model del silenciament del gen *white* induït pel reclutament del domini N-terminal de CenH3<sup>CID</sup> (N- CenH3<sup>CID</sup>).** A la regió reguladora del gen *reporter*, aproximadament a unes 500 pb davant de l'inici de la regió codificant, hi ha llocs d'unió pel repressor bacterià LacI. La construcció N-CenH3<sup>CID</sup>- LacI s'uneix a la regió reguladora del gen *reporter* on indueix el reclutament d'altres proteïnes centromèriques i/o del cinetocor. Aquestes darreres per impediment estèric o bé modificant l'estat de la cromatina dificultarien l'expressió del gen *white*.

Encara que en els llocs de reclutament ectòpic de N-CenH3<sup>CID</sup> no s'originava un cinetocor funcional, es va observar el reclutament de BubR1, proteïna del cinetocor que està implicada en l'activació del punt de control de mitosi. Ara bé, el senyal de BubR1 en aquestes regions era menor que en els centròmers, suggerint que el reclutament era menys eficient. Aquesta observació es pot explicar per diferents raons. La primera és que en el lloc ectòpic hi havia menys CenH3<sup>CID</sup> que en els centròmers, per tant és d'esperar que hi hagi menys reclutament de BubR1. Una altra motiu possible és que el centròmer-cinetocor disposi de diferents mecanismes per reclutar BubR1. De fet, a cèl·lules humanes s'ha descrit que la proteïna KNL1 indueix el reclutament de BubR1 als cinetocors (Kiyomitsu et al., 2007). No obstant, a *Drosophila* els mutants de *spc105/KNL1* presenten només una petita disminució de BubR1 en els centròmers i continuen activant el SAC en resposta a defectes d'interacció cinetocor-microtúbuls (Schittenhelm et al., 2009). Segons aquestes observacions, a *Drosophila* existirien com a mínim dos mecanismes de reclutament de BubR1, un que depèn del cinetocor-KNL1 i l'altre del centròmer-CenH3<sup>CID</sup>.

Un estudi realitzat a cèl·lules de pollastre suggereix que aquest darrer mecanisme dependent del centròmer també estaria conservat. Concretament, en reduir dràsticament els nivells de CenH3<sup>CENP-A</sup> a cèl·lules DT40, fins al punt d'impedir l'assemblatge del cinetocor, només s'observa una lleugera afectació del reclutament de BubR1 a l'inici de prometafase. És a dir, els nivells residuals de CenH3<sup>CENP-A</sup> serien suficients per promoure el reclutament de BubR1. En canvi, al final de prometafase els nivells de BubR1 si que estan greument afectats, indicant la necessitat del cinetocor per mantenir BubR1 als centròmers (Régnier et al., 2005). Així doncs, existeixen dos mecanismes, un de reclutament inicial de BubR1 als centròmers que és independent del cinetocor i un de manteniment que depèn del cinetocor.

Tenint en compte que CenH3<sup>CID</sup> està constitutivament unida a la cromatina centromèrica, el mecanisme de reclutament de BubR1 independent del cinetocor es podria donar en qualsevol moment del cicle cel·lular. En canvi, els nostres resultats indiquen que està regulada, ja que només es va detectar en cromosomes mitòtics. Un possible mecanisme de regulació seria que la cua N-CenH3<sup>CID</sup> fos modificada post-traduccionament durant la mitosi per afavorir la interacció amb BubR1 o bé amb un factor intermedi, ja que no vam poder demostrar la interacció directa entre N-CenH3<sup>CID</sup> i BubR1. No obstant, malgrat que en interfase no vam detectar la interacció, és en aquest moment del cicle quan s'inhibeix l'expressió del gen *reporter*. Per tant, d'alguna manera la interacció N-CenH3<sup>CID</sup> i BubR1 en mitosi condicionava l'estat de la cromatina i impedia l'expressió del gen *white* en interfase.

## El silenciament produït per N-CenH3<sup>CID</sup> depèn d'un motiu ric en arginines

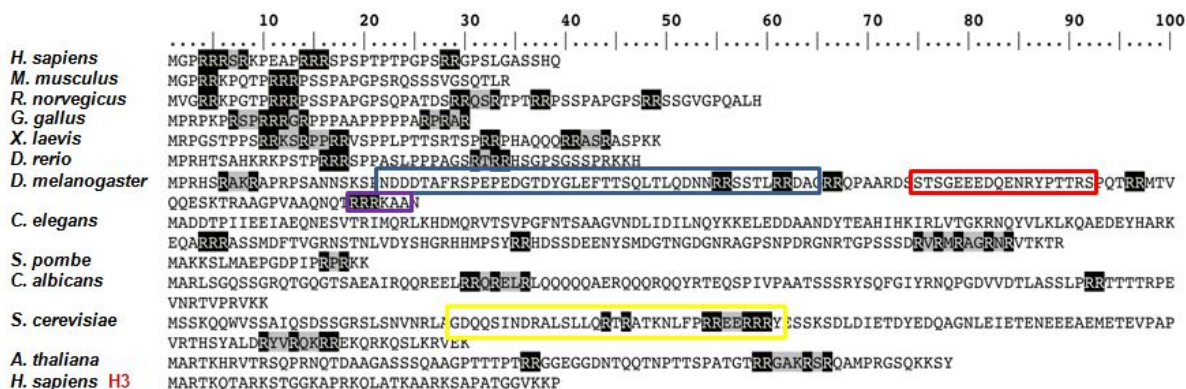
Prèviament, en un estudi de comparació de seqüències de N-CenH3<sup>CID</sup> de diferents espècies del grup de *Drosophila* s'havien identificat tres dominis evolutivament conservats, anomenats Bloc 1, 2 i 3 (Malik et al., 2002). Per determinar si aquests Blocs contribueixen en el silenciament del gen *reporter* vam realitzar experiments de reclutament ectòpic de cada un d'ells i de les diferents combinacions d'aquests. Els nostres resultats mostren que el Bloc 3 és el que té major contribució en el silenciament. Encara que el Bloc 1 i 2 produeixen una mica de silenciament, el Bloc 3 sol és suficient per produir un fort silenciament i la seva deleció elimina pràcticament el silenciament del gen *reporter*. De fet, l'efecte produït pel Bloc3 sol és molt més intens que el que s'observa amb el N-CenH3<sup>CID</sup> sencer, suggerint que en aquest darrer hi ha dominis que interfereixen en el reclutament de BubR1.

El Bloc 3 es caracteritza per ser molt petit, només 6 aminoàcids i ser ric en arginines <sup>119</sup>RRRKAA<sup>124</sup> (Malik et al., 2002). Per determinar la contribució d'aquestes arginines en el silenciament del gen *reporter* vam realitzar experiments de reclutament ectòpic del N-CenH3<sup>CID</sup> on aquestes arginines eren mutades per alanines o delecionades. Els nostres resultats mostren que aquestes arginines són necessàries per produir el silenciament, ja que la seva deleció o mutació elimina el reclutament de BubR1 en els llocs ectòpics i conseqüentment s'observa l'expressió del gen *reporter*.

Tal i com s'ha mencionat abans, el Bloc 1 indueix un silenciament significatiu, i curiosament en l'extrem final d'aquest Bloc també hi ha un motiu ric en arginines (<sup>55</sup>RRSSTLRR<sup>62</sup>) (Malik et al., 2002). A més, en els N-CenH3 de la majoria d'espècies hi ha motius rics en arginines, essent absents en la cua N-terminal de la histona H3 canònica (Figura D.3) (Torras- Llorca et al., 2009). Concretament, a *S. cerevisiae* dins del domini END de N-CenH3<sup>Cse4</sup> hi ha un motiu ric en arginines, <sup>54</sup>RREERRR<sup>60</sup>. Per tant, és possible que la contribució dels N-CenH3 en el reclutament d'algunes proteïnes del cinetocor es doni mitjançant aquests motius rics en arginines. Així doncs, un possible model seria que en mitosi aquestes arginines fossin modificades post-traduccionament per induir el reclutament de proteïnes del cinetocor. De fet, recentment, en el llevat *S. cerevisiae* s'ha descrit la mono i dimetilació de l'arginina 37. Aquesta arginina es localitza dins del domini END de N-CenH3<sup>Cse</sup> i la seva metilació regula el reclutament en el centròmer de proteïnes del cinetocor (Samel et al., 2012).

Finalment, per determinar si l'efecte del domini N-CenH3 en el silenciament del gen *reporter* està conservat o bé està restringit només al de *Drosophila* es van fer experiments de reclutament amb els dominis N-CenH3 d'humans (N-CenH3<sup>CENP-A</sup>) i de *S. cerevisiae* (N-CenH3<sup>Cse4</sup>). Encara que menys robust que per N-CenH3<sup>CID</sup>, ambdós dominis també produeixen el silenciament del gen *reporter*. Per tant, els nostres resultats

suggereixen que la contribució del N-CenH3 en el reclutament de BubR1 està conservada en l'evolució des dels llevats fins als humans, malgrat el baix nivell de conservació d'aquest domini.



**Figura D.3. Els dominis N-terminals de CenH3 de la majoria d'espècies tenen motius rics en arginines.** Es mostra l'alineament de les seqüències d'aminoàcids del domini N-terminal de les proteïnes CenH3 d'espècies diferents. A baix de tot, es mostra la seqüència per la histona H3 canònica. En negre estan indicades les arginines i en gris els aminoàcids que conformen el motiu ric en arginines. La posició que correspon a cada domini conservat en la cua N-terminal de CenH3<sup>CID</sup> està marcada amb un rectangle de color blau (Bloc1), vermell (Bloc2) i lila (Bloc3). Per altra banda, també s'ha indicat amb un rectangle de color groc els aminoàcids que conformen el domini END de l'extrem N-terminal de CenH3<sup>Cse4</sup>.

### Identificació de noves proteïnes centromèriques de *Drosophila*

En termes generals, la composició i l'organització dels cinetocors està conservada en els eucariotes. No obstant, hi ha algunes característiques específiques per cada organisme com ara a *Drosophila* i *C.elegans*, pels quals es desconeixen totes les proteïnes del CCAN, a excepció de CENP-C.

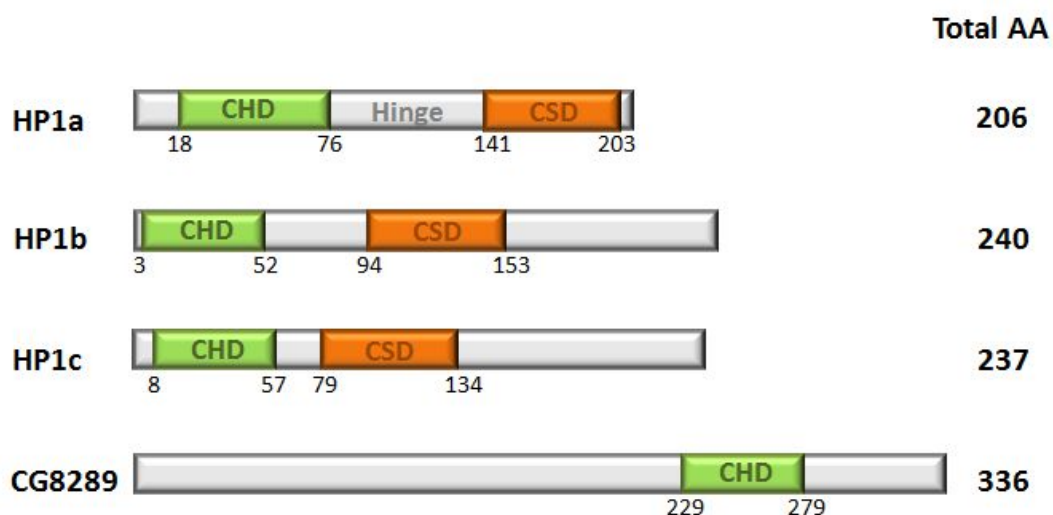
Així doncs, per tal d'identificar i caracteritzar noves proteïnes centromèriques de *Drosophila* vam realitzar la purificació i posterior identificació de les proteïnes associades als nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup>. En les nostres purificacions vam identificar 50 proteïnes, però cap d'elles és ortòloga a les del CCAN descrites en altres eucariotes. En un estudi publicat recentment per Barth et al., 2014 on s'utilitza una estratègia similar a la nostra, identifiquen noves proteïnes centromèriques de *Drosophila* però tampoc cap d'elles és ortòloga als components del CCAN. Totes aquestes observacions suggereixen que a *Drosophila* l'estructura del cinetocor és més simple i que possiblement només existeix la via d'assemblatge dependent de CENP-C.

Entre les proteïnes que vam identificar, en vam seleccionar només vuit com a possibles candidates, basant-nos en la bibliografia publicada i la consistència en la seva identificació. Després d'analitzar el seu patró de localització cel·lular, vam continuar

l'estudi amb les dues proteïnes que tenien una localització cel·lular més interessant; la proteïna codificada pel gen *CG8289* i la proteïna *Barrier-to-autointegration factor*, dBAF.

### La proteïna **CG8289** un nou factor de l'heterocromatina pericentromèrica

Estructuralment, la proteïna CG8289 es caracteritza per tenir un domini cromò amb un 34% d'identitat al de la proteïna HP1a (Figura D.4). Per tant, de la mateixa manera que les isoformes d'HP1, la associació del CG8289 amb la cromatina és probable que es doni mitjançant aquest domini (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). En canvi, a diferència de les isoformes d'HP1, aquesta proteïna no té el domini *chromo shadow*. Tenint en compte que aquest domini és el responsable de la interacció proteïna-proteïna, permetent la dimerització d'HP1 o la interacció d'aquesta amb altres proteïnes de l'heterocromatina (Brasher et al., 2000; Brideau and Barbash, 2011; Delattre et al., 2000; Schwendemann et al., 2008), possiblement la proteïna CG8289 no interaccioni directament amb les isoformes d'HP1.



**Figura D.4. Representació esquemàtica de les diferents isoformes d'HP1 de *D. melanogaster* i de la proteïna codificada pel ge *CG8289*.** Estructuralment, les diferents isoformes d'HP1 es caracteritzen per presentar un domini cromò (CHD) a l'extrem N-terminal i un domini *chromo shadow* (CSD) a l'extrem C-terminal separats per un domini Hinge.

Tanmateix, mitjançant immunolocalitzacions vam observar que en cèl·lules SL2 en interfase el senyal de CG8289, que és molt proper als clústers de CENP-C, colocalitza amb d'HP1a, suggerint que la proteïna CG8289 es localitza com HP1a en l'heterocromatina pericentromèrica. A més, en cromosomes politènics la proteïna CG8289 es localitza en el cromocentre i els telòmers, patró de localització similar al d'HP1a. Aquestes observacions estan d'acord amb l'estudi de Van Bommel et al., 2013 on mostren que la proteïna CG8289 s'uneix en les mateixes regions de la cromatina que la proteïna HP1, la histona metiltransferasa SU(VAR)3-9, i les proteïnes que s'uneixen a

HP1 com ara, HP3 i HP6. En aquest mateix treball observen que la localització de CG8289 en aquestes regions no depèn d'HP1, ja que la depleció d'HP1 no afecta la unió de CG8289 en aquestes regions de la cromatina. Aquest fet és curiós, ja que normalment les proteïnes que es localitzen a l'heterocromatina necessiten HP1 per la seva localització (Greil et al., 2007). A més, en les diferents intents d'identificar les proteïnes associades a les diferents isoformes de HP1 no s'ha identificat la proteïna codificada pel gen CG8289 (Greil et al., 2007, Ryu et al., 2014). Totes aquestes observacions suggereixen que malgrat CG8289 i HP1a es localitzen en les mateixes regions del genoma no formen part del mateix complex, i per tant, possiblement tinguin funcions diferents. Aquesta diferència de funcionalitat podria ser determinada pel fet que la proteïna CG8289, a diferència de les isoformes d'HP1, davant del domini cromo presenta una regió d'uns 200 aa que no presenta homologia amb altres proteïnes de *Drosophila*.

La funció específica de la proteïna CG8289 no està descrita. Tanmateix, a neuroblastos vam observar un patró de localització per la proteïna molt curiós, petites acumulacions d'aquesta que tenen associades un o dos clústers de CENP-C. Tenint en compte aquest patró, una possible funció de la proteïna seria facilitar la formació i/o estabilització dels clústers dels centròmers o bé permetre la interacció d'aquests amb determinades estructures del nucli. De fet, s'ha descrit que en la interacció de l'heterocromatina amb la membrana nuclear intervé, entre altres, la proteïna HP1 (Polshko et al., 2013; Ye and Worman, 1996). Per tant, per similitud i tenint en compte que en les nostres purificacions s'han identificat altres proteïnes relacionades amb la membrana nuclear seria interessant estudiar si la proteïna CG8289 intervé en el procés d'ancoratge de la regió centromèrica a la membrana nuclear.

### **dBAF és localitza als centròmers dels cromosomes metafàsics**

En les nostres purificacions també vam identificar la proteïna *Barrier-to-autointegration factor*. Aquesta proteïna està evolutivament conservada i té un paper clau en el procés de reassemblatge de la membrana nuclear al final de la telofase (Dechat et al., 2004; Gorjánác et al., 2007; Haraguchi et al., 2008; Haraguchi et al., 2001; Margalit et al., 2007). A més, en interfase actua com a pont d'unió entre la membrana nuclear i la cromatina, mitjançant la seva interacció amb les proteïnes amb domini LEM de la cara interna de la membrana nuclear i la cromatina (Furukawa, 1999; Lin et al., 2000; Montes de Oca et al., 2005).

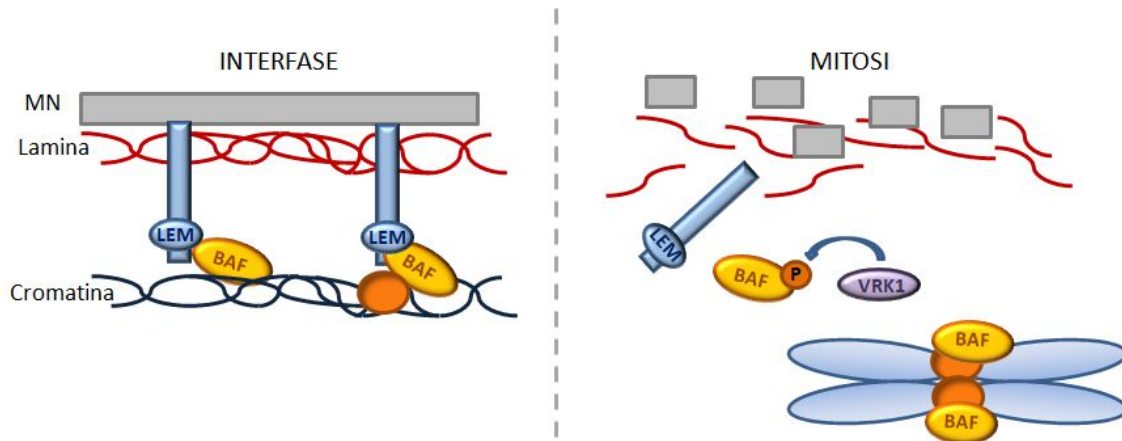
Concretament, mitjançant immunolocalitzacions en cèl·lules SL2 en interfase vam observar que dBAF és localitza en l'heterocromatina. La funció concreta de dBAF en l'heterocromatina es desconeix. Ara bé, tenint en compte que BAF té la capacitat de compactar el DNA formant complexos nucleoproteics (Zheng et al 2000), una possible funció d'aquesta seria mitjançar l'estat compactat de l'heterocromatina.

Per altra banda, en cèl·lules SL2 en mitosi vam observar que dBAF es localitza exclusivament en els centròmers dels cromosomes metafàsics. Curiosament, al tractar les cèl·lules amb colcemida, droga que despolimeritza els microtúbuls i indueix una parada del cicle en mitosi, es visualitza millor el senyal de dBAF en els centròmers dels cromosomes metafàsics. Aquest increment del senyal en trencar-se la interacció cinetocor-microtúbuls pot indicar que la localització de dBAF en els centròmers no depèn dels microtúbuls i que d'alguna manera el tractament n'afavoreix la interacció amb el centròmer.

Donat que la interacció de BAF amb la cromatina i les proteïnes amb domini LEM de la membrana nuclear està regulada pel seu estat de fosforilació es va estudiar com afectava l'estat de fosforilació dBAF en el seu patró de localització centromèric. En concret, vam observar que la forma mutant de dBAF que no es pot fosforilar es localitza en els centròmers dels cromosomes metafàsics. En canvi, el mutant mimètic de dBAF per la fosforilació no s'uneix a la cromatina, suggerint que la fracció de dBAF unida als centròmers no està fosforilada.

Així doncs, tenint en compte totes aquestes observacions podem descriure un possible model del patró de localització de dBAF a la cromatina a llarg del cicle cel·lular (Figura D.5). Bàsicament, durant la interfase dBAF es localitza a l'heterocromatina pericentromèrica. Un cop iniciada la mitosi, aquest és fosforilat perdent l'afinitat per la cromatina i per les proteïnes de la membrana nuclear, quedant majoritàriament soluble en el citoplasma a excepció d'una petita fracció que roman unida als centròmers. En aquest punt, caldria determinar si la fracció de dBAF unida als centròmers ja hi és prèviament o bé es diposita de nou en metafase. Per tant, una possibilitat és que dBAF estigui sempre unit als centròmers i que a diferència de la resta de la cromatina, degut a l'estructura del centròmer-cinetocor, no es pot fosforilar durant la mitosi. Una segona possibilitat seria que dBAF sigui reclutat en cada mitosi com ara HP1 i els components del CPC (*Chromosomal passenger complex*) que un cop s'inicia la mitosi són eliminats de l'heterocromatina pericentromèrica per ser reclutats en la regió del centròmer compresa entre els dos cinetocors (Carmena et al., 2012). Donat que quan s'expressen transientment les fusions dBAF-YFP o YFP-dBAF en cèl·lules SL2, ambdues proteïnes són detectades tant als centròmers com a l'heterocromatina pericentromèrica, ens fa pensar que potser és una combinació de les dues possibilitats. És com si per les dues proteïnes de fusió la transició de l'heterocromatina pericentromèrica als centròmer durant la mitosi estès impedida i és per aquesta raó que es continuen observant a l'heterocromatina quan en realitat s'haurien de localitzar exclusivament als centròmers. A més, per completar aquest model caldria determinar quins factors faciliten el reclutament de dBAF en els centròmers; si és mitjançant la interacció amb el DNA centromèric o bé és reclutat per factors específics.





**Figura D.5. Model del patró de localització de dBAF durant el cicle cel·lular.** En interfase, dBAF interacciona amb la cromatina i les proteïnes amb domini LEM de la cara interna de la membrana nuclear (MN), actuant de pont d'unió entre la cromatina i la membrana nuclear. Un cop iniciada la mitosi, dBAF és fosforilat per la quinasa NHK-1, perdent l'afinitat per la cromatina i les proteïnes amb domini LEM i quedant soluble en el nucleoplasma. Tanmateix, una petita fracció de dBAF no fosforilat roman unida als centròmers (cercles taronges) dels cromosomes metafàsics.

En contraposició a les nostres observacions, en immunolocalitzacions realitzades en cromosomes mitòtics de cèl·lules del sistema nerviós central o dels discs imaginals de larves de *Drosophila*, la senyal de dBAF es localitza per tot el cromosoma (Furukawa et al., 2003). Aquestes discrepàncies en el patró de localització de dBAF suggereixen que aquest és específic per cada tipus de cèl·lules i que possiblement també estigui condicionat pel moment del desenvolupament en que es troba l'organisme.

Tot i ser inesperat que una proteïna relacionada amb la membrana nuclear és localitzi als centròmers durant la mitosi no és la primera vegada que es descriu aquesta dualitat de localització i funcionalitat. Un exemple el podem trobar en cèl·lules humanes on s'ha observat que quan entren en mitosi i es desmunta la membrana nuclear les proteïnes dels porus nuclears que integren el complex Nup107-160 es recol·loquen en el cinetocor fins que es torna a reassemblar la membrana nuclear (Belgareh et al., 2001). Al tractar aquestes cèl·lules amb colcemida es detecta un enriquiment del senyal de Nup107 en els cinetocors, comportament similar al que observem per dBAF (Orjalo et al., 2006). En el cinetocor, aquest complex exerceix un paper crític en l'alineament dels cromosomes en la placa metafàsica i en la segregació d'aquests, mitjançant la regulació de la localització centromèrica de la quinasa Aurora B com de la resta de components del complex CPC (Platani et al., 2009). No obstant, a *Drosophila* Nup107 no es localitza als cinetocors, indicant que aquesta associació no està conservada (Katsani et al., 2008).

La funció concreta de dBAF en els centròmers durant la mitosi no la coneixem. Tenint en compte la contribució de BAF en el reassemblatge de la membrana nuclear un cop finalitzada la mitosi és temptador considerar la possibilitat que aquesta actuï com a factor coordinador de la segregació cromosòmica i el reassemblatge de la membrana nuclear.

## **dBAF és necessari per l'assemblatge de CENP-C en els centròmers**

La localització centromèrica de dBAF suggereix que podria contribuir en la funció i organització del centròmers. En aquest sentit, vam observar que l'expressió de la fusió dBAF-YFP indueix una forta disminució dels nivells de CENP-C en els centròmers sense afectar significativament els nivells de CenH3<sup>CID</sup>. En alguns casos extrems es van detectar cèl·lules sense senyal de CENP-C. A més, es va observar un increment significatiu del percentatge de cèl·lules amb alt contingut de DNA, indicant que la sobreexpressió d'aquesta construcció indueix una aturada en G2/M. En canvi, la sobreexpressió de la construcció YFP-dBAF no produeix una disminució dels nivells de CENP-C i CenH3<sup>CID</sup> en els centròmers i no afecta la progressió del cicle cel·lular.

La diferència de comportament de les dues fusions es pot explicar tenint en compte els resultats del nostre anàlisi genètic. L'expressió de dBAF o YFP-dBAF rescata el fenotip d'ala induït per la depleció de dBAF en la regió *pouch* del disc imaginal d'ala. En canvi, aquest fenotip no es rescatat per l'expressió de dBAF-YFP, indicant que aquesta construcció no és funcional. A més, la sobreexpressió de dBAF-YFP mimetitzava el fenotip de pèrdua de funció observat al deplecionar dBAF, suggerint que aquesta construcció impedeix la funció de dBAF endogen. Així doncs, el fet que la sobreexpressió de la fusió dBAF-YFP en cèl·lules SL2 indueix una disminució dels nivells de CENP-C en els centròmers sense afectar els nivells de CenH3<sup>CID</sup> suggereix que dBAF intervé en la deposició i/o estabilització de CENP-C en els centròmers, independentment de CenH3<sup>CID</sup>.

El mecanisme pel qual la sobreexpressió de dBAF-YFP interfereix en la funció de dBAF el desconeixem. No obstant, considerant les nostres observacions i la bibliografia publicada podem formular diferents hipòtesis. En primer lloc, hem observat que la fracció de dBAF unida als centròmers no està fosforilada i que la sobreexpressió de dBAF-YFP incrementa l'estat de fosforilació de dBAF endogen. Així doncs, una possibilitat és que la sobreexpressió d'aquesta fusió estigui afectant la capacitat de dBAF d'interaccionar amb la cromatina centromèrica i interferint en la seva funció centromèrica.

Per altra banda, hem observat que la fusió dBAF-YFP no es pot fosforilar, suggerint que la interacció d'aquesta amb la cromatina està afavorida. Així doncs, una segona possibilitat seria que la sobreexpressió d'aquesta fusió induís la hipercondensació de la cromatina, fenotip que s'observa en afegir BAF en excés en les reaccions d'assemblatge nuclear en *Xenopus* (Segura-Totten et al., 2002). La hipercondensació de la cromatina centromèrica podria induir la heterocromatització del centròmer, alterant l'estructura i l'organització d'aquest. De fet, estudis realitzats en cromosomes humans artificials demostren que la heterocromatització del centròmer indueix la pèrdua de les proteïnes centromèriques (Cardinale et al., 2009; Nakano et al., 2008). Aquest procés d'inactivació del centròmer és seqüencial, essent afectat CENP-C abans que CenH3<sup>CENP-A</sup>

(Cardinale et al., 2009). Curiosament, la sobreexpressió de dBAF-YFP també afecta els nivells de CENP-C i no els de CenH3<sup>CID</sup>. Una tercera opció seria la combinació de les altres dues. És a dir, la sobreexpressió de dBAF-YFP podria modificar l'estructura del centròmer, induint la seva inactivació i per tant afavorint l'eliminació de CENP-C i alhora, impedit la deposició i/o estabilització mitjançada per dBAF.

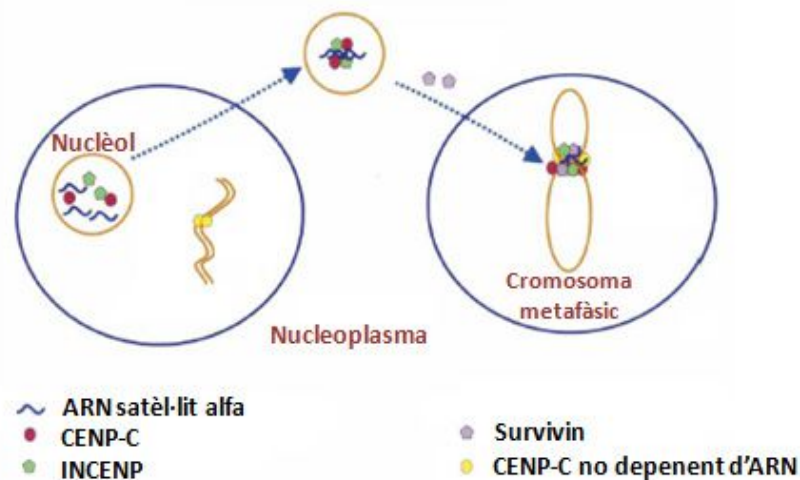
Per analitzar una mica més la contribució de dBAF en la funció centromèrica es va depleccionar aquesta proteïna en cèl·lules SL2 mitjançant RNA d'interferència. Els nostres resultats mostren que la depleció de dBAF també induïx una disminució significativa dels nivells de CENP-C en els centròmers. Alhora, també s'observa una disminució del contingut de CenH3<sup>CID</sup> en els centròmers. Donat que la deposició de CenH3<sup>CID</sup> es veu menys afectada que la de CENP-C i que la incorporació d'aquestes dues proteïnes a *Drosophila* és interdependent (Erhardt et al., 2008; Goshima et al., 2007), podria ser que l'afectació en la deposició de CenH3<sup>CID</sup> sigui conseqüència de l'afectació en la incorporació de CENP-C. En canvi, en sobreexpressar dBAF-YFP els nivells de CenH3<sup>CID</sup> en el centròmer no es veuen afectats. Aquesta diferència es pot explicar si es té en compte que la depleció de dBAF implica un tractament més llarg, 7 dies, metres la sobreexpressió tant sols de 48 hores. És a dir, encara que l'afectació dels nivells de CENP-C siguin més forta, en la sobreexpressió del dominant negatiu no transcorre el temps suficient com per afectar significativament els nivells de CenH3<sup>CID</sup> en el centròmer.

Tenint en compte que la disminució del contingut de les proteïnes centromèriques origina defectes mitòtics, es va analitzar la progressió del cycle cel·lular mitjançant citometria de flux de les cèl·lules tractades amb dsBAF. En concret, vam observar que la depleció de dBAF induïx un lleuger increment del percentatge de cèl·lules amb alt contingut de DNA (>4N), indicant defectes en la segregació cromosòmica i en la divisió cel·lular. Tanmateix, la funció centromèrica no està prou compromesa com per induir una aturada del cycle a G2-M. Per altra banda, es va observar una increment de la població de cèl·lules en G1 i una disminució del percentatge de cèl·lules en fase S, indicant que les cèl·lules després de superar la mitosi entrarien en G1 on serien aturades. Les nostres observacions estan d'acord amb un estudi realitzat amb cèl·lules mares embrionàries humanes on al depleccionar BAF observen també un increment del percentatge de cèl·lules en G1 i en G2-M i per contra, una disminució del percentatge de cèl·lules en S (Cox et al., 2011). L'aturada en G1 pot ser deguda a diverses raons. Una possibilitat és que es limiti l'entrada a mitosi de la cèl·lula si les funcions de BAF en interfase estan compromeses. Una segona possibilitat podria ser que aquesta aturada fos conseqüència de l'afectació de la funció centromèrica, ja que en embrions de *Drosophila* la disminució de CenH3<sup>CID</sup> induïx una aturada en interfase (Blower and Karpen, 2001). A més, per la línia cel·lular de fibroblasts humans primaris TIG3, s'ha descrit que la reducció dels nivells de CenH3<sup>CENP-A</sup> induïx la senescència en aquestes cèl·lules, actuant com a

mecanisme de defensa per prevenir que les cèl·lules amb la funció centromèrica compromesa entrin en mitosi i originin de forma massiva cèl·lules aneuploides (Maehara et al., 2010).

### La interacció de dBAF amb CENP-C depèn de RNA i de l'estat de fosforilació de dBAF

En conjunt, els nostres resultats suggereixen que dBAF participa en la deposició i/o estabilització de CENP-C en els centròmers, independentment de CenH3<sup>CID</sup>. No obstant, el mecanisme concret pel qual dBAF intervé en aquest procés es desconeix. De fet, el mecanisme de deposició de CENP-C no s'ha descrit en cap organisme. Tanmateix, en cèl·lules humanes s'ha vist que la localització de CENP-C en el nuclèol i en el centròmer depèn d' $\alpha$ -satèl·lit RNA (Wong et al., 2007). En concret, segons el model proposat per Wong et al 2007, hi hauria dues fraccions de CENP-C (Figura D.6). Una fracció estaria unida constitutivament a la cromatina centromèrica. En canvi, l'altra conjuntament amb altres proteïnes centromèriques i el RNA formaria un complex nucleoproteic en el nuclèol. En iniciar-se la mitosi, aquest complex seria alliberat al nucleoplasma per unir-se als centròmers dels cromosomes metafàsics on permetria la deposició i posterior estabilització de CENP-C.



**Figura D.6. Model per la localització del complex nucleoproteic integrat per proteïnes centromèriques durant el cicle cel·lular en cèl·lules humanes.** L'acumulació nucleolar i centromèrica de CENP-C així com també INCENP i/o Survivin depèn de la presència de RNA satèl·lit alfa. L'acumulació en el nuclèol d'aquestes proteïnes podria servir com font d'emmagatzematge durant la interfase i alhora facilitar l'assemblatge del complex nucleoproteic abans de ser alliberat al nucleoplasma. Un cop iniciada la mitosi, aquest complex seria traslladat al centròmer dels cromosomes mitòtics. Aquesta imatge ha sigut extreta de Wong et al., 2007.

En aquest sentit, els nostres experiments de co-immunoprecipitació suggereixen que dBAF i CENP-C formarien part d'un mateix complex nucleoproteic, donat que la

interacció entre aquestes dues proteïnes en els extractes nuclears solubles depèn de RNA. Aquesta interacció també depèn de l'estat de fosforilació de dBAF ja que es va observar que CENP-C interacciona preferentment amb dBAF no fosforilat, indicant que aquest complex podria interaccionar amb la cromatina. A més, de forma similar que en cèl·lules humanes (Wong et al., 2007), l'assemblatge-estabilització de CENP-C en els centròmers de *Drosophila* també depèn de RNA ja que al tractar les cèl·lules amb RNasa els nivells de CENP-C en els centròmers es veuen greument reduïts, sense afectar els nivells de CenH3<sup>CID</sup>. Així doncs, en conjunt les nostres observacions suggereixen que dBAF podria formar part d'un complex nucleoproteic que permet la deposició i/o posterior estabilització de CENP-C en els centròmers.

En un futur, caldria determinar quin és el patró de localització d'aquest complex al llarg de cicle. És a dir, determinar si aquest es troba soluble en el nucleoplasma i puntualment es localitza en els centròmers o bé es troba constitutivament associat al centròmer. També seria molt interessant determinar en quin dels dos mecanismes de deposició de CENP-C participa, ja que s'ha vist que en cèl·lules de *Drosophila*, aquesta es produeix en dos moments del cicle, en interfase al final de la fase S i G2, i durant la metafase (Lidsky et al., 2013; Mellone et al., 2011).

### **Ppa regula l'estabilitat de CenH3<sup>CID</sup> a *Drosophila***

L'observació que dBAF intervé en el procés d'assemblatge i/o estabilització de CENP-C en els centròmers és molt rellevant perquè fins al moment no es coneixia cap dels factors implicats en la deposició de CENP-C per cap organisme.

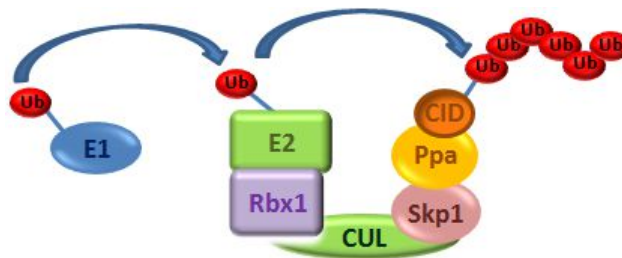
En canvi, per CenH3, en els darrers anys, s'han fet avenços molt importants en la descripció dels mecanismes i dels factors implicats en la seva deposició, així com dels mecanismes que eviten la seva deposició en llocs ectòpics. Al respecte, prèviament, en el nostre laboratori s'havia identificat un d'aquests mecanismes, la degradació proteolítica via proteosoma de CenH3<sup>CID</sup> deslocalitzada en l'eucromatina (Moreno-Moreno et al., 2006).

En aquest treball, s'ha fet un pas important en la descripció molecular d'aquest mecanisme, ja que s'ha demostrat que la proteïna Ppa (*Partner of Paired*) regula l'estabilitat de CenH3<sup>CID</sup>. Ppa és una proteïna F-box que forma part del complex SCF (*Skp1-Cullin-F-box-protein*), complex amb activitat ubiquitina-ligasa E3 que incorpora diferents proteïnes F-box en funció del substrat a reconèixer.

Concretament, la depleció de Ppa incrementa els nivells de CenH3<sup>CID</sup> i n'indueix la seva deslocalització per tota la cromatina. A més, la sobreexpressió de CenH3<sup>CID</sup>-YFP en absència de Ppa també induïx la deslocalització d'aquesta proteïna de fusió per tota l'eucromatina, ocasionant problemes en la proliferació cel·lular. Aquests defectes poden ser deguts a diversos motius. Tal i com s'ha esmentat anteriorment en aquesta memòria,

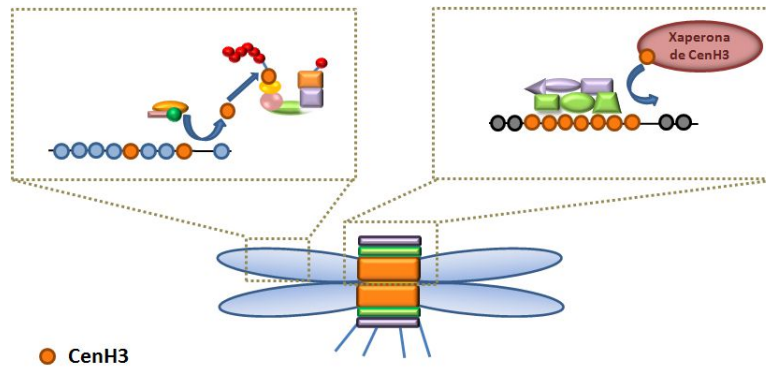
la deslocalització de CenH3<sup>CID</sup> en llocs no centromèrics induïx la formació de cinetocors ectòpics (Heun et al., 2006), generant problemes de segregació que afectarien la viabilitat de la cèl·lula. Una altra possibilitat seria que la presència dels nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup> en l'eucromatina estarien alterant processos essencials de la cromatina com ara la transcripció.

Per altra banda, mitjançant experiments de *Pull-down* s'ha observat que Ppa interacciona preferentment amb els nucleosomes de CenH3<sup>CID</sup> que amb els de la histona H3 canònica. Per tant, els nostres resultats suggereixen que la subunitat Ppa del complex SCF reconeix específicament CenH3<sup>CID</sup> per tal d'induir la seva poliubiquitinació i posterior degradació via proteosoma (Figura D.7).



**Figura D.7. Esquema del mecanisme de poliubiquitinació de CenH3<sup>CID</sup>.** El complex SCF (*Skp1-Cullin-F-box-protein*) actua com a Ubiquitina-ligasa E3, catalitzant la reacció de transferència de l'ubiquitina des de l'enzim de conjugació E2 al substrat, CenH3<sup>CID</sup>. El substrat és poliubiquitinat i posteriorment degradat via proteosoma.

Concretament, els nostres resultats mostren que el domini CATD<sup>CID</sup> és l'element regulador de CenH3<sup>CID</sup> en la degradació d'aquesta dependent de Ppa. De fet, en el llevat *S. cerevisiae* també s'ha identificat una ubiquitina-ligasa E3, Psh1, que regula els nivells de CenH3<sup>Cse4</sup> mitjançant el reconeixement del domini CATD d'aquesta variant (Hewawasam et al., 2010; Ranjitkar et al., 2010). Per tant, la regulació de l'estabilitat de CenH3 és una nova funció conservada del domini CATD. A més, en aquest llevat s'ha observat que la interacció de CenH3<sup>Cse4</sup> amb la seva xaperona Smc3 la protegeix de la degradació dependent de Psh1 (Hewawasam et al., 2010). Curiosament, en cèl·lules humanes on la interacció de CenH3<sup>CENP-A</sup> amb la seva xaperona, HJURP, es dona mitjançant el domini CATD, la depleció de HJURP també induïx una disminució dels nivells intracel·lulars de CenH3<sup>CENP-A</sup> (Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009). De forma general, tenint en compte totes aquestes observacions, un possible model seria que CenH3 unit a la seva xaperona és protegit de la degradació i alhora és portat als centròmers on el cinetocor evita la seva degradació. En canvi, CenH3 incorporada a l'eucromatina al no ser protegida pel cinetocor és desallotjada i posteriorment degradada via proteosoma (Figura D.8).



**Figura D.8. Esquema del model proposat per la protecció de la CenH3 unida a la seva xaperona.** La interacció de CenH3 unida a la seva xaperona específica la protegeix de la degradació proteolítica per un doble mecanisme. Per una banda, evita que la ubiquitina-ligasa E3 la reconegui i alhora, facilita la seva deposició al centròmer on el cinetocor evita la seva degradació. En canvi, CenH3 unida a altres regions de la cromatina no és protegida pel cinetocor i conseqüentment és desallotjada de la cromatina per ser posteriorment degradada via proteosoma.

El mecanisme concret pel qual CenH3 incorporada als centròmers és protegida de la degradació proteolítica no es coneix. Per una banda, es considera que l'entorn centromèric d'alguna manera estabilitza la interacció d'aquesta amb la cromatina o bé, en limita l'accessibilitat de la maquinària proteolítica. A favor d'aquesta hipòtesi, recentment, a *Drosophila* s'ha descrit el mecanisme pel qual la xaperona de CenH3<sup>CID</sup>, CAL1, estabilitza els nivells d'aquesta variant als centròmers. En aquest mecanisme també intervé una Ubiquitina-ligasa E3, CUL3/RDX, la qual reconeix CAL1 però ubiquitina CenH3<sup>CID</sup>. En aquest context la ubiquitinació de CenH3<sup>CID</sup> no indueix la seva degradació sinó que l'estabilitza i manté els seus nivells en els centròmers (Bade et al., 2014).

Una altra possibilitat és que la activitat del complex SCF estigui regulada al llarg del cicle. De fet, aquest complex és inactiu en mitosi, just quan CenH3<sup>CID</sup> de nova síntesi s'incorpora als centròmers (Lidsky et al., 2013; Mellone et al., 2011). En cèl·lules humanes la deposició de CenH3<sup>CENP-A</sup> també es dona a final de telofase i G1 (Hemmerich et al., 2008; Jansen et al., 2007), suggerint que aquest mecanisme de regulació dels nivells de CenH3 pel complex SCF possiblement estigui conservat en els metazous. En canvi, en el llevat *S. cerevisiae* on la deposició de CenH3<sup>Cse4</sup> és dependent de la replicació s'ha identificat una altra ubiquitina-ligasa E3, Psh1. Així doncs, en cada organisme podria actuar una ubiquitina-ligasa E3 diferent per regular els nivells de CenH3 en funció del moment del cicle en el qual CenH3 s'ha d'incorporar al centròmer. Però, també podria ser que l'estabilitat de CenH3 fos regulada per diferents vies de degradació complementàries. A favor d'aquesta hipòtesi, en el nostre treball s'ha observat que en absència de Ppa s'incrementen els nivells d'expressió de la quimera H3:CATD<sup>CID</sup>, però continuen sent inferiors als de la histona H3, suggerint que hi ha altres mecanismes de degradació de CenH3<sup>CID</sup> independents de Ppa que també reconeixen el domini CATD<sup>CID</sup>.

Per altra banda, en *S. cerevisiae* la deleció de Psh1 no estabilitza completament els nivells de CenH3<sup>Cse4</sup>, indicant que aquesta variant també disposa de diferents vies de degradació. En un futur, seria interessant determinar els diferents mecanismes que controlen l'estabilitat de CenH3, com aquests es complementen, com es regulen i si estan conservats per intentar definir millor el complex procés d'establiment i manteniment de la identitat centromèrica.





**CONCLUSIONS**



## CONCLUSIONS

1. S'han identificat i caracteritzat dues proteïnes relacionades amb la cromatina centromèrica a *Drosophila*: la proteïna codificada pel gen *CG8289* i dBAF.
2. En cromosomes politènics, la proteïna codificada pel gen *CG8289* es localitza preferentment en les regions d'heterocromatina constitutiva, el cromocentre i els telòmers. D'altra banda, en cèl·lules SL2 colocalitza amb HP1a en regions properes als clústers de CENP-C i en neuroblastos obtinguts a partir de larves en tercer estadi forma petites acumulacions que tenen associades un o dos clústers de CENP-C. En conjunt, aquests resultats suggereixen que la proteïna *CG8289* es localitza a l'heterocromatina pericentromèrica.
3. dBAF es localitza a l'heterocromatina de les cèl·lules SL2 en interfase. Un cop iniciada la mitosi aquesta es localitza exclusivament en els centròmers dels cromosomes metafàsics. La interacció de dBAF amb la cromatina centromèrica està regulada pel seu estat de fosforilació, essent la forma no fosforilada la que interacciona amb el centròmer.
4. La sobreexpressió de la proteïna de fusió dBAF-YFP, que es comporta com a un dominant negatiu, indueix una disminució significativa dels nivells de CENP-C en els centròmers, sense afectar els nivells de CenH3<sup>CID</sup>. En canvi, la sobreexpressió de la proteïna de fusió YFP-dBAF, que és funcional, no afecta els nivells de CENP-C ni de CenH3<sup>CID</sup> en els centròmers. La depleció de dBAF en cèl·lules SL2 també indueix una disminució significativa dels nivells centromèrics de CENP-C tot i que, en aquest cas, també disminueixen els nivells de CenH3<sup>CID</sup>.
5. dBAF interacciona amb CENP-C. Aquesta interacció està regulada per l'estat de fosforilació de dBAF, essent la forma no fosforilada la que té més afinitat per CENP-C. A més, aquesta interacció també depèn del RNA, ja que és sensible al tractament amb RNasa.
6. El reclutament ectòpic del domini N-terminal de CenH3<sup>CID</sup> davant d'un gen *reporter* indueix el reclutament de BubR1 i conseqüentment el silenciament del gen *reporter*.
7. Aquests efectes depenen d'un motiu conservat a les diferents espècies de *Drosophila*, Bloc 3. Aquest motiu és ric en arginines les quals són necessàries pel reclutament de BubR1 i el silenciament del gen *reporter*.

8. Els dominis N-CenH3 de *S. cerevisiae* i de humans també indueixen el silenciament del gen *reporter*, suggerint que la contribució del N-CenH3 en el reclutament de BubR1 està evolutivament conservada.
9. La proteïna F box Ppa regula l'estabilitat de CenH3<sup>CID</sup>, ja que la depleció d'aquesta incrementa els nivells de CenH3<sup>CID</sup> i n'indueix la deslocalització per tota la cromatina.
10. El domini CATD<sup>CID</sup> ubicat en el HFD de CenH3<sup>CID</sup> és necessari per la interacció amb Ppa.

## **BIBLIOGRAFIA**



**BIBLIOGRAFIA**

- Agard, D.A., and Sedat, J.W. (1983). Three-dimensional architecture of a polytene nucleus. *Nature* *302*, 676-681.
- Alonso, A., Fritz, B.r., Hasson, D., Abrusan, G.r., Cheung, F., Yoda, K., Radlwimmer, B., Ladurner, A.G., and Warburton, P.E. (2007). Co-localization of CENP-C and CENP-H to discontinuous domains of CENP-A chromatin at human neocentromeres. *Genome Biol* *8*, R148.
- Amano, M., Suzuki, A., Hori, T., Backer, C., Okawa, K., Cheeseman, I.M., and Fukagawa, T. (2009). The CENP-S complex is essential for the stable assembly of outer kinetochore structure. *J Cell Biol* *186*, 173-182.
- Ando, S., Yang, H., Nozaki, N., Okazaki, T., and Yoda, K. (2002). CENP-A, -B, and -C chromatin complex that contains the I-type alpha-satellite array constitutes the prekinetochore in HeLa cells. *Mol Cell Biol* *22*, 2229-2241.
- Asencio, C., Davidson, I.F., Santarella-Mellwig, R., Ly-Hartig, T.B.N., Mall, M., Wallenfang, M.R., Mattaj, I.W., and Gorjánácz, M. (2012). Coordination of kinase and phosphatase activities by Lem4 enables nuclear envelope reassembly during mitosis. *Cell* *150*, 122-135.
- Bade, D., Pauleau, A.-L., Wendler, A., and Erhardt, S. (2014). The E3 Ligase CUL3/RDX Controls Centromere Maintenance by Ubiquitylating and Stabilizing CENP-A in a CAL1-Dependent Manner. *Dev Cell* *28*, 508-519.
- Bailey, A.O., Panchenko, T., Sathyan, K.M., Petkowski, J.J., Pai, P.-J., Bai, D.L., Russell, D.H., Macara, I.G., Shabanowitz, J., and Hunt, D.F. (2013). Posttranslational modification of CENP-A influences the conformation of centromeric chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 11827-11832.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* *410*, 120-124.
- Barnhart, M.C., Kuich, P.H.J., Stellfox, M.E., Ward, J.A., Bassett, E.A., Black, B.E., and Foltz, D.R. (2011). HJURP is a CENP-A chromatin assembly factor sufficient to form a functional de novo kinetochore. *J Cell Biol* *194*, 229-243.
- Barth, T.K., Schade, G.O., Schmidt, A., Vetter, I., Wirth, M., Heun, P., Thomae, A.W., and Imhof, A. (2014). Identification of novel Drosophila centromere associated proteins. *Proteomics*.
- Bassett, E.A., Wood, S., Salimian, K.J., Ajith, S., Foltz, D.R., and Black, B.E. (2010). Epigenetic centromere specification directs aurora B accumulation but is insufficient to efficiently correct mitotic errors. *J Cell Biol* *190*, 177-185.
- Baum, M., Ngan, V.K., and Clarke, L. (1994). The centromeric K-type repeat and the central core are together sufficient to establish a functional *Schizosaccharomyces pombe* centromere. *Mol Biol Cell* *5*, 747-761.
- Belgareh, N., Rabut, G., Bai, S.W., van Overbeek, M., Beaudouin, J.I., Daigle, N., Zatssepina, O.V., Pasteau, F., Labas, V.r., and Fromont-Racine, M. (2001). An evolutionarily conserved NPC subcomplex, which redistributes in part to kinetochores in mammalian cells. *J Cell Biol* *154*, 1147-1160.
- Bengtsson, L., and Wilson, K.L. (2006). Barrier-to-autointegration factor phosphorylation on Ser-4 regulates emerin binding to lamin A in vitro and emerin localization in vivo. *Mol Biol Cell* *17*, 1154-1163.
- Bergmann, J.H., Rodríguez, M.G., Martins, N., Kimura, H., Kelly, D.A., Masumoto, H., Larionov, V., Jansen, L.E., and Earnshaw, W.C. (2011). Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore. *EMBO J* *30*, 328-340.
- Bernard, P., Maure, J.-F.o., Partridge, J.F., Genier, S., Javerzat, J.-P., and Allshire, R.C. (2001). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* *294*, 2539-2542.
- Bharadwaj, R., Qi, W., and Yu, H. (2004). Identification of two novel components of the human NDC80 kinetochore complex. *J Biol Chem* *279*, 13076-13085.



- Billia, F., and De Boni, U. (1991). Localization of centromeric satellite and telomeric DNA sequences in dorsal root ganglion neurons, in vitro. *J Cell Sci* *100*, 219-226.
- Black, B.E., Brock, M.A., Bédard, S., Woods, V.L., and Cleveland, D.W. (2007). An epigenetic mark generated by the incorporation of CENP-A into centromeric nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 5008-5013.
- Black, B.E., Foltz, D.R., Chakravarthy, S., Luger, K., Woods, V.L., and Cleveland, D.W. (2004). Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature* *430*, 578-582.
- Blower, M.D., and Karpen, G.H. (2001). The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol* *3*, 730-739.
- Blower, M.D., Sullivan, B.A., and Karpen, G.H. (2002). Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell* *2*, 319-330.
- Bolanos-Garcia, V.M., Lischetti, T., Matak-Vinkovic, D., Cota, E., Simpson, P.J., Chirgadze, D.Y., Spring, D.R., Robinson, C.V., Nilsson, J., and Blundell, T.L. (2011). Structure of a Blinkin-BUBR1 complex reveals an interaction crucial for kinetochore-mitotic checkpoint regulation via an unanticipated binding Site. *Structure* *19*, 1691-1700.
- Brasher, S.V., Smith, B.O., Fogh, R.H., Nietlispach, D., Thiru, A., Nielsen, P.R., Broadhurst, R.W., Ball, L.J., Murzina, N.V., and Laue, E.D. (2000). The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *EMBO J* *19*, 1587-1597.
- Brideau, N.J., and Barbash, D.A. (2011). Functional conservation of the Drosophila hybrid incompatibility gene Lhr. *BMC Evol Biol* *11*, 57.
- Brinkley, B., and Stubblefield, E. (1966). The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell in vitro. *Chromosoma* *19*, 28-43.
- Buchwitz, B.J., Ahmad, K., Moore, L.L., Roth, M.B., and Henikoff, S. (1999). Cell division: a histone-H3-like protein in *C. elegans*. *Nature* *401*, 547-548.
- Cardinale, S., Bergmann, J.H., Kelly, D., Nakano, M., Valdivia, M.M., Kimura, H., Masumoto, H., Larionov, V., and Earnshaw, W.C. (2009). Hierarchical inactivation of a synthetic human kinetochore by a chromatin modifier. *Mol Biol Cell* *20*, 4194-4204.
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., and Earnshaw, W.C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *13*, 789-803.
- Carroll, C.W., Milks, K.J., and Straight, A.F. (2010). Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly. *J Cell Biol* *189*, 1143-1155.
- Carroll, C.W., Silva, M.C., Godek, K.M., Jansen, L.E., and Straight, A.F. (2009). Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A nucleosomes by CENP-N. *Nat Cell Biol* *11*, 896-902.
- Carvalho, C.I., Pereira, H.M., Ferreira, J., Pina, C., Mendonça, D., Rosa, A.C., and Carmo-Fonseca, M. (2001). Chromosomal G-dark bands determine the spatial organization of centromeric heterochromatin in the nucleus. *Mol Biol Cell* *12*, 3563-3572.
- Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M., and Desai, A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* *127*, 983-997.
- Cheeseman, I.M., and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 33-46.
- Cheeseman, I.M., Hori, T., Fukagawa, T., and Desai, A. (2008). KNL1 and the CENP-H/I/K complex coordinately direct kinetochore assembly in vertebrates. *Mol Biol Cell* *19*, 587-594.
- Cheeseman, I.M., Niessen, S., Anderson, S., Hyndman, F., Yates, J.R., Oegema, K., and Desai, A. (2004). A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension. *Genes Dev* *18*, 2255-2268.

- Chen, C.-C., Dechassa, M.L., Bettini, E., Ledoux, M.B., Belisario, C., Heun, P., Luger, K., and Mellone, B.G. (2014). CAL1 is the *Drosophila* CENP-A assembly factor. *J Cell Biol* 3;204(3):313-29.
- Chen, C.-C., Greene, E., Bowers, S.R., and Mellone, B.G. (2012). A role for the CAL1-partner Modulo in centromere integrity and accurate chromosome segregation in *Drosophila*. *PLoS One* 7, e45094.
- Chen, E.S., Zhang, K., Nicolas, E., Cam, H.P., Zofall, M., and Grewal, S.I. (2008). Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly. *Nature* 451, 734-737.
- Chen, Y., Baker, R.E., Keith, K.C., Harris, K., Stoler, S., and Fitzgerald-Hayes, M. (2000). The N terminus of the centromere H3-like protein Cse4p performs an essential function distinct from that of the histone fold domain. *Mol Cell Biol* 20, 7037-7048.
- Choo, K. (2000). Centromerization. *Trends Cell Biol* 10, 182-188.
- Ciferri, C., De Luca, J., Monzani, S., Ferrari, K.J., Ristic, D., Wyman, C., Stark, H., Kilmartin, J., Salmon, E.D., and Musacchio, A. (2005). Architecture of the human ndc80-hec1 complex, a critical constituent of the outer kinetochore. *J Biol Chem* 280, 29088-29095.
- Cimini, D., Wan, X., Hirel, C.B., and Salmon, E. (2006). Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Curr Biol* 16, 1711-1718.
- Cohen, R., Espelin, C., De Wulf, P., Sorger, P., Harrison, S., and Simons, K. (2008). Structural and functional dissection of Mif2p, a conserved DNA-binding kinetochore protein. *Mol Biol Cell* 19, 4480-4491.
- Collins, K.A., Furuyama, S., and Biggins, S. (2004). Proteolysis contributes to the exclusive centromere localization of the yeast Cse4/CENP-A histone H3 variant. *Curr Biol* 14, 1968-1972.
- Conde, C., Osswald, M., Barbosa, J., Moutinho- Santos, T., Pinheiro, D., Guimarães, S., Matos, I., Maiato, H., and Sunkel, C.E. (2013). *Drosophila* Polo regulates the spindle assembly checkpoint through Mps1- dependent BubR1 phosphorylation. *EMBO J* 32, 1761-1777.
- Cooper, J.L., and Henikoff, S. (2004). Adaptive evolution of the histone fold domain in centromeric histones. *Mol Biol Evol* 21, 1712-1718.
- Cowan, C.R., Carlton, P.M., and Cande, W.Z. (2001). The polar arrangement of telomeres in interphase and meiosis. Rabl organization and the bouquet. *Plant Physiol* 125, 532-538.
- Cox, J.L., Mallanna, S.K., Ormsbee, B.D., Desler, M., Wiebe, M.S., and Rizzino, A. (2011). Banf1 is required to maintain the self-renewal of both mouse and human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 124, 2654-2665.
- Cremer, T., and Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2: a003889; PMID: 20300217.
- Dalal, Y., and Bui, M. (2010). Down the rabbit hole of centromere assembly and dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 22, 392-402.
- Dalal, Y., Wang, H., Lindsay, S., and Henikoff, S. (2007). Tetrameric structure of centromeric nucleosomes in interphase *Drosophila* cells. *PLoS Biol* 5, e218.
- Dechat, T., Gajewski, A., Korbei, B., Gerlich, D., Daigle, N., Haraguchi, T., Furukawa, K., Ellenberg, J., and Foisner, R. (2004). LAP2 $\alpha$  and BAF transiently localize to telomeres and specific regions on chromatin during nuclear assembly. *J Cell Sci* 117, 6117-6128.
- Delattre, M., Spierer, A., Tonka, C.-H., and Spierer, P. (2000). The genomic silencing of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*: interaction between the heterochromatin-associated proteins Su (var) 3-7 and HP1. *J Cell Sci* 113, 4253-4261.
- DeLuca, J.G., Gall, W.E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A., and Salmon, E. (2006). Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell* 127, 969-982.
- Dernburg, A.F. (2001). Here, There, and Everywhere Kinetochore Function on Holocentric Chromosomes. *J Cell Biol* 153, F33-F38.

- Desai, A., Rybina, S., Müller-Reichert, T., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Hyman, A., and Oegema, K. (2003). KNL-1 directs assembly of the microtubule-binding interface of the kinetochore in *C. elegans*. *Genes Dev* *17*, 2421-2435.
- Dion, V., and Gasser, S.M. (2013). Chromatin movement in the maintenance of genome stability. *Cell* *152*, 1355-1364.
- Du, Y., Topp, C.N., and Dawe, R.K. (2010). DNA binding of centromere protein C (CENPC) is stabilized by single-stranded RNA. *PLoS Genet* *6*, e1000835.
- Dunleavy, E.M., Almouzni, G.v., and Karpen, G.H. (2011). H3. 3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G1 phase. *Nucleus* *2*, 146.
- Dunleavy, E.M., Beier, N.L., Gorgescu, W., Tang, J., Costes, S.V., and Karpen, G.H. (2012). The cell cycle timing of centromeric chromatin assembly in *Drosophila* meiosis is distinct from mitosis yet requires CAL1 and CENP-C. *PLoS Biol* *10*, e1001460.
- Dunleavy, E.M., Pidoux, A.L., Monet, M., Bonilla, C., Richardson, W., Hamilton, G.L., Ekwall, K., McLaughlin, P.J., and Allshire, R.C. (2007). A NASP (N1/N2)-related protein, Sim3, binds CENP-A and is required for its deposition at fission yeast centromeres. *Mol Cell* *28*, 1029-1044.
- Dunleavy, E.M., Roche, D.I., Tagami, H., Lacoste, N., Ray-Gallet, D., Nakamura, Y., Daigo, Y., Nakatani, Y., and Almouzni-Pettinotti, G.v. (2009). HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* *137*, 485-497.
- Earnshaw, W.C., and Migeon, B.R. (1985). Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome. *Chromosoma* *92*, 290-296.
- Earnshaw, W.C., and Rothfield, N. (1985). Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* *91*, 313-321.
- Edwards, N.S., and Murray, A.W. (2005). Identification of xenopus CENP-A and an associated centromeric DNA repeat. *Mol Biol Cell* *16*, 1800-1810.
- Ellermeier, C., Higuchi, E.C., Phadnis, N., Holm, L., Geelhood, J.L., Thon, G., and Smith, G.R. (2010). RNAi and heterochromatin repress centromeric meiotic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 8701-8705.
- Erhardt, S., Mellone, B.G., Betts, C.M., Zhang, W., Karpen, G.H., and Straight, A.F. (2008). Genome-wide analysis reveals a cell cycle-dependent mechanism controlling centromere propagation. *J Cell Biol* *183*, 805-818.
- Foisner, R., and Gerace, L. (1993). Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* *73*, 1267-1279.
- Foley, E.A., Maldonado, M., and Kapoor, T.M. (2011). Formation of stable attachments between kinetochores and microtubules depends on the B56-PP2A phosphatase. *Nat Cell Biol* *13*, 1265-1271.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E., Bailey, A.O., Yates III, J.R., Bassett, E.A., Wood, S., Black, B.E., and Cleveland, D.W. (2009). Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* *137*, 472-484.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E., Black, B.E., Bailey, A.O., Yates, J.R., and Cleveland, D.W. (2006). The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat Cell Biol* *8*, 458-469.
- Fujita, Y., Hayashi, T., Kiyomitsu, T., Toyoda, Y., Kokubu, A., Obuse, C., and Yanagida, M. (2007). Priming of centromere for CENP-A recruitment by human hMis18alpha, hMis18beta, and M18BP1. *Dev Cell* *12*, 17-30.
- Fukagawa, T., and Brown, W.R. (1997). Efficient conditional mutation of the vertebrate CENP-C gene. *Hum Mol Genet* *6*, 2301-2308.
- Fukagawa, T., Mikami, Y., Nishihashi, A., Regnier, V., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Sugata, N., Todokoro, K., Brown, W., and Ikemura, T. (2001). CENP-H, a constitutive centromere component, is required for centromere targeting of CENP-C in vertebrate cells. *EMBO J* *20*, 4603-4617.

- Funabiki, H., Hagan, I., Uzawa, S., and Yanagida, M. (1993). Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J Cell Biol* *121*, 961-976.
- Furukawa, K. (1999). LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J Cell Sci* *112*, 2485-2492.
- Furukawa, K., Sugiyama, S., Osouda, S., Goto, H., Inagaki, M., Horigome, T., Omata, S., McConnell, M., Fisher, P.A., and Nishida, Y. (2003). Barrier-to-autointegration factor plays crucial roles in cell cycle progression and nuclear organization in *Drosophila*. *J Cell Sci* *116*, 3811-3823.
- Furuyama, T., Dalal, Y., and Henikoff, S. (2006). Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 6172-6177.
- Gascoigne, K.E., and Cheeseman, I.M. (2011). Kinetochore assembly: if you build it, they will come. *Curr Opin Cell Biol* *23*, 102-108.
- Gascoigne, K.E., Takeuchi, K., Suzuki, A., Hori, T., Fukagawa, T., and Cheeseman, I.M. (2011). Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes. *Cell* *145*, 410-422.
- Gaudet, A., and Fitzgerald-Hayes, M. (1987). Alterations in the adenine-plus-thymine-rich region of CEN3 affect centromere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *7*, 68-75.
- Glass, C., Glass, J., Taniura, H., Hasel, K., Blevitt, J., and Gerace, L. (1993). The alpha-helical rod domain of human lamins A and C contains a chromatin binding site. *EMBO J* *12*, 4413.
- Gopalakrishnan, S., Sullivan, B.A., Trazzi, S., Della Valle, G., and Robertson, K.D. (2009). DNMT3B interacts with constitutive centromere protein CENP-C to modulate DNA methylation and the histone code at centromeric regions. *Hum Mol Genet* *18*, 3178-3193.
- Gorjánácz, M., Klerkx, E.P., Galy, V., Santarella, R., López-Iglesias, C., Askjaer, P., and Mattaj, I.W. (2007). *Caenorhabditis elegans* BAF-1 and its kinase VRK-1 participate directly in post-mitotic nuclear envelope assembly. *EMBO J* *26*, 132-143.
- Goshima, G., Kiyomitsu, T., Yoda, K., and Yanagida, M. (2003). Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J Cell Biol* *160*, 25-39.
- Goshima, G., Saitoh, S., and Yanagida, M. (1999). Proper metaphase spindle length is determined by centromere proteins Mis12 and Mis6 required for faithful chromosome segregation. *Genes Dev* *13*, 1664-1677.
- Goshima, G., Wollman, R., Goodwin, S.S., Zhang, N., Scholey, J.M., Vale, R.D., and Stuurman, N. (2007). Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science* *316*, 417-421.
- Greil, F., de Wit, E., Bussemaker, H.J., and van Steensel, B. (2007). HP1 controls genomic targeting of four novel heterochromatin proteins in *Drosophila*. *EMBO J* *26*, 741-751.
- Guse, A., Carroll, C.W., Moree, B., Fuller, C.J., and Straight, A.F. (2011). In vitro centromere and kinetochore assembly on defined chromatin templates. *Nature* *477*, 354-358.
- Haaf, T., and Schmid, M. (1989). Centromeric association and non-random distribution of centromeres in human tumour cells. *Hum genet* *81*, 137-143.
- Hahnenberger, K.M., Carbon, J., and Clarke, L. (1991). Identification of DNA regions required for mitotic and meiotic functions within the centromere of *Schizosaccharomyces pombe* chromosome I. *Mol Cell Biol* *11*, 2206-2215.
- Haraguchi, T., Kojidani, T., Koujin, T., Shimi, T., Osakada, H., Mori, C., Yamamoto, A., and Hiraoka, Y. (2008). Live cell imaging and electron microscopy reveal dynamic processes of BAF-directed nuclear envelope assembly. *J Cell Sci* *121*, 2540-2554.
- Haraguchi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Lee, K.K., Matsuoka, Y., Yoneda, Y., Wilson, K.L., and Hiraoka, Y. (2001). BAF is required for emerin assembly into the reforming nuclear envelope. *J Cell Sci* *114*, 4575-4585.

- Hardwick, K.G., Johnston, R.C., Smith, D.L., and Murray, A.W. (2000). MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J Cell Biol* *148*, 871-882.
- Harrington, J.J., Van Bokkelen, G., Mays, R.W., Gustashaw, K., and Willard, H.F. (1997). Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat Genet* *15*, 345-355.
- Hassold, T., and Hunt, P. (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* *2*, 280-291.
- Hayashi, T., Fujita, Y., Iwasaki, O., Adachi, Y., Takahashi, K., and Yanagida, M. (2004). Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell* *118*, 715-729.
- Heald, R., and McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* *61*, 579-589.
- Heeger, S., Leismann, O., Schittenhelm, R., Schraidt, O., Heidmann, S., and Lehner, C.F. (2005). Genetic interactions of separase regulatory subunits reveal the diverged *Drosophila* Cenp-C homolog. *Genes Dev* *19*, 2041-2053.
- Hemmerich, P., Weidtkamp-Peters, S., Hoischen, C., Schmiedeberg, L., Erliandri, I., and Diekmann, S. (2008). Dynamics of inner kinetochore assembly and maintenance in living cells. *J Cell Biol* *180*, 1101-1114.
- Henderson, A., Warburton, D., and Atwood, K. (1972). Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc Natl Acad Sci U S A* *69*, 3394-3398.
- Henikoff, S., Ahmad, K., and Malik, H.S. (2001). The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* *293*, 1098-1102.
- Henikoff, S., Ahmad, K., Platero, J.S., and van Steensel, B. (2000). Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 716-721.
- Heun, P., Erhardt, S., Blower, M.D., Weiss, S., Skora, A.D., and Karpen, G.H. (2006). Mislocalization of the *Drosophila* centromere-specific histone CID promotes formation of functional ectopic kinetochores. *Dev Cell* *10*, 303-315.
- Hewawasam, G., Shivaraju, M., Mattingly, M., Venkatesh, S., Martin-Brown, S., Florens, L., Workman, J.L., and Gerton, J.L. (2010). Psh1 is an E3 ubiquitin ligase that targets the centromeric histone variant Cse4. *Mol Cell* *40*, 444-454.
- Hochstrasser, M., Mathog, D., Gruenbaum, Y., Saumweber, H., and Sedat, J.W. (1986). Spatial organization of chromosomes in the salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* *102*, 112-123.
- Holland, A.J., and Cleveland, D.W. (2009). Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 478-487.
- Hori, T., Amano, M., Suzuki, A., Backer, C.B., Welburn, J.P., Dong, Y., McEwen, B.F., Shang, W.-H., Suzuki, E., and Okawa, K. (2008a). CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore. *Cell* *135*, 1039-1052.
- Hori, T., Okada, M., Maenaka, K., and Fukagawa, T. (2008b). CENP-O class proteins form a stable complex and are required for proper kinetochore function. *Mol Biol Cell* *19*, 843-854.
- Hou, H., Zhou, Z., Wang, Y., Wang, J., Kallgren, S.P., Kurchuk, T., Miller, E.A., Chang, F., and Jia, S. (2012). Csi1 links centromeres to the nuclear envelope for centromere clustering. *J Cell Biol* *199*, 735-744.
- Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., Redward, S., MacDonald, A.C., Kalitsis, P., and Choo, K.A. (2000). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 1148-1153.
- Ibrahim, N., Wicklund, A., and Wiebe, M.S. (2011). Molecular characterization of the host defense activity of the barrier to autointegration factor against vaccinia virus. *J Virol* *85*, 11588-11600.
- Ikeno, M., Grimes, B., Okazaki, T., Nakano, M., Saitoh, K., Hoshino, H., McGill, N.I., Cooke, H., and Masumoto, H. (1998). Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nat Biotechnol* *16*, 431-439.

- Janke, C., Ortiz, J., Lechner, J., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Magiera, M.M., Schramm, C., and Schiebel, E. (2001). The budding yeast proteins Spc24p and Spc25p interact with Ndc80p and Nuf2p at the kinetochore and are important for kinetochore clustering and checkpoint control. *EMBO J* 20, 777-791.
- Jansen, L.E., Black, B.E., Foltz, D.R., and Cleveland, D.W. (2007). Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J Cell Biol* 176, 795-805.
- Jokelainen, P.T. (1967). The ultrastructure and spatial organization of the metaphase kinetochore in mitotic rat cells. *J Ultrastruct Res* 19, 19-44.
- Kalitsis, P., Fowler, K.J., Earle, E., Hill, J., and Choo, K.A. (1998). Targeted disruption of mouse centromere protein C gene leads to mitotic disarray and early embryo death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1136-1141.
- Katsani, K.R., Karess, R.E., Dostatni, N., and Doye, V. (2008). In vivo dynamics of *Drosophila* nuclear envelope components. *Mol Biol Cell* 19, 3652-3666.
- Katsumata, M., and Lo, C.W. (1988). Organization of chromosomes in the mouse nucleus: analysis by in situ hybridization. *J Cell Sci* 90, 193-199.
- Kemmler, S., Stach, M., Knapp, M., Ortiz, J., Pfannstiel, J., Ruppert, T., and Lechner, J. (2009). Mimicking Ndc80 phosphorylation triggers spindle assembly checkpoint signalling. *EMBO J* 28, 1099-1110.
- Kerres, A., Vietmeier-Decker, C., Ortiz, J., Karig, I., Beuter, C., Hegemann, J., Lechner, J., and Fleig, U. (2004). The fission yeast kinetochore component Spc7 associates with the EB1 family member Mal3 and is required for kinetochore-spindle association. *Mol Biol Cell* 15, 5255-5267.
- Kiyomitsu, T., Obuse, C., and Yanagida, M. (2007). Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Dev Cell* 13, 663-676.
- Klebig, C., Korinth, D., and Meraldi, P. (2009). Bub1 regulates chromosome segregation in a kinetochore-independent manner. *J Cell Biol* 185, 841-858.
- Kline, S.L., Cheeseman, I.M., Hori, T., Fukagawa, T., and Desai, A. (2006). The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation. *J Cell Biol* 173, 9-17.
- Kops, G.J., Kim, Y., Weaver, B.A., Mao, Y., McLeod, I., Yates, J.R., Tagaya, M., and Cleveland, D.W. (2005). ZW10 links mitotic checkpoint signaling to the structural kinetochore. *J Cell Biol* 169, 49-60.
- Krenn, V., Wehenkel, A., Li, X., Santaguida, S., and Musacchio, A. (2012). Structural analysis reveals features of the spindle checkpoint kinase Bub1-kinetochore subunit Knl1 interaction. *J Cell Biol* 196, 451-467.
- Kwon, M.-S., Hori, T., Okada, M., and Fukagawa, T. (2007). CENP-C is involved in chromosome segregation, mitotic checkpoint function, and kinetochore assembly. *Mol Biol Cell* 18, 2155-2168.
- Lachner, M., O'Carroll, D.n., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-120.
- Lampson, M.A., Renduchitala, K., Khodjakov, A., and Kapoor, T.M. (2004). Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nat Cell Biol* 6, 232-237.
- Lan, W., and Cleveland, D.W. (2010). A chemical tool box defines mitotic and interphase roles for Mps1 kinase. *J Cell Biol* 190, 21-24.
- Lancaster, O.M., Cullen, C.F., and Ohkura, H. (2007). NHK-1 phosphorylates BAF to allow karyosome formation in the *Drosophila* oocyte nucleus. *J Cell Biol* 179, 817-824.
- Lanini, L., and McKeon, F. (1995). Domains required for CENP-C assembly at the kinetochore. *Mol Biol Cell* 6, 1049-1059.
- Lara-Gonzalez, P., Scott, M.I., Diez, M., Sen, O., and Taylor, S.S. (2011). BubR1 blocks substrate recruitment to the APC/C in a KEN-box-dependent manner. *J Cell Sci* 124, 4332-4345.
- Lechner, J., and Carbon, J. (1991). A 240 kd multisubunit protein complex, CBF3, is a major component of the budding yeast centromere. *Cell* 64, 717-725.

- Lee, M.S., and Craigie, R. (1998). A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1528-1533.
- Lefrançois, P., Euskirchen, G.M., Auerbach, R.K., Rozowsky, J., Gibson, T., Yellman, C.M., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). Efficient yeast ChIP-Seq using multiplex short-read DNA sequencing. *BMC genomics* 10, 37.
- Lidsky, P.V., Sprenger, F., and Lehner, C.F. (2013). Distinct modes of centromere protein dynamics during cell cycle progression in *Drosophila* S2R+ cells. *J Cell Sci* 126, 4782-4793.
- Lin, C.-W., and Engelman, A. (2003). The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *J Virol* 77, 5030-5036.
- Lin, F., Blake, D.L., Callebaut, I., Skerjanc, I.S., Holmer, L., McBurney, M.W., Paulin-Levasseur, M., and Worman, H.J. (2000). MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem* 275, 4840-4847.
- Liu, D., Vleugel, M., Backer, C.B., Hori, T., Fukagawa, T., Cheeseman, I.M., and Lampson, M.A. (2010). Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase. *J Cell Biol* 188, 809-820.
- Liu, S.-T., Rattner, J.B., Jablonski, S.A., and Yen, T.J. (2006). Mapping the assembly pathways that specify formation of the trilaminar kinetochore plates in human cells. *J Cell Biol* 175, 41-53.
- Lomonte, P., Sullivan, K.F., and Everett, R.D. (2001). Degradation of nucleosome-associated centromeric histone H3-like protein CENP-A induced by herpes simplex virus type 1 protein ICP0. *J Biol Chem* 276, 5829-5835.
- London, N., Ceto, S., Ranish, J.A., and Biggins, S. (2012). Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 regulates Bub1 localization to kinetochores. *Curr Biol* 22, 900-906.
- Maciejowski, J., George, K.A., Terret, M.-E., Zhang, C., Shokat, K.M., and Jallepalli, P.V. (2010). Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *J Cell Biol* 190, 89-100.
- Maehara, K., Takahashi, K., and Saitoh, S. (2010). CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses. *Mol Cell Biol* 30, 2090-2104.
- Maiato, H., DeLuca, J., Salmon, E., and Earnshaw, W.C. (2004). The dynamic kinetochore-microtubule interface. *J Cell Sci* 117, 5461-5477.
- Malik, H.S., and Henikoff, S. (2001). Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in *Drosophila*. *Genetics* 157, 1293-1298.
- Malik, H.S., Vermaak, D., and Henikoff, S. (2002). Recurrent evolution of DNA-binding motifs in the *Drosophila* centromeric histone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1449-1454.
- Mandrioli, M., and Manicardi, G.C. (2012). Unlocking holocentric chromosomes: new perspectives from comparative and functional genomics? *Curr Genomics* 13, 343-349.
- Margalit, A., Brachner, A., Gotzmann, J., Foisner, R., and Gruenbaum, Y. (2007). Barrier-to-autointegration factor—a BAFFling little protein. *Trends Cell Biol* 17, 202-208.
- Margalit, A., Segura-Totten, M., Gruenbaum, Y., and Wilson, K.L. (2005). Barrier-to-autointegration factor is required to segregate and enclose chromosomes within the nuclear envelope and assemble the nuclear lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3290-3295.
- Martin-Lluesma, S., Stucke, V.M., and Nigg, E.A. (2002). Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2. *Science* 297, 2267-2270.
- Masumoto, H., Masukata, H., Muro, Y., Nozaki, N., and Okazaki, T. (1989a). A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol* 109, 1963-1973.

- Masumoto, H., Sugimoto, K., and Okazaki, T. (1989b). Alphoid satellite DNA is tightly associated with centromere antigens in human chromosomes throughout the cell cycle. *Exp Cell Res* 181, 181-196.
- McClelland, M.L., Kallio, M.J., Barrett-Wilt, G.A., Kestner, C.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Gorbsky, G.J., and Stukenberg, P.T. (2004). The vertebrate Ndc80 complex contains Spc24 and Spc25 homologs, which are required to establish and maintain kinetochore-microtubule attachment. *Curr Biol* 14, 131-137.
- Meadows, J.C., Shepperd, L.A., Vanoosthuysse, V., Lancaster, T.C., Sochaj, A.M., Buttrick, G.J., Hardwick, K.G., and Millar, J. (2011). Spindle checkpoint silencing requires association of PP1 to both Spc7 and kinesin-8 motors. *Dev Cell* 20, 739-750.
- Mellone, B.G., Grive, K.J., Shteyn, V., Bowers, S.R., Oderberg, I., and Karpen, G.H. (2011). Assembly of *Drosophila* centromeric chromatin proteins during mitosis. *PLoS Genet* 7, e1002068.
- Mellor, J., Jiang, W., Funk, M., Rathjen, J., Barnes, C., Hinz, T., Hegemann, J., and Philippsen, P. (1990). CPF1, a yeast protein which functions in centromeres and promoters. *EMBO J* 9, 4017.
- Mendiburo, M.J., Padeken, J., Fülöp, S., Schepers, A., and Heun, P. (2011). *Drosophila* CENH3 is sufficient for centromere formation. *Science* 334, 686-690.
- Milks, K.J., Moree, B., and Straight, A.F. (2009). Dissection of CENP-C directed Centromere and Kinetochore Assembly. *Mol Biol Cell* 20, 4246-4255.
- Mills, W., Critcher, R., Lee, C., and Farr, C.J. (1999). Generation of an approximately 2.4 Mb human X centromere-based minichromosome by targeted telomere-associated chromosome fragmentation in DT40. *Hum Mol Genet* 8, 751-761.
- Misteli, T. (2007). Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell* 128, 787-800.
- Molitor, T.P., and Traktman, P. (2014). Depletion of the protein kinase VRK1 disrupts nuclear envelope morphology and leads to BAF retention on mitotic chromosomes. *Mol Biol Cell* 25, 891-903.
- Montes de Oca, R., Lee, K.K., and Wilson, K.L. (2005). Binding of barrier to autointegration factor (BAF) to histone H3 and selected linker histones including H1. 1. *J Biol Chem* 280, 42252-42262.
- Montes de Oca, R., Shoemaker, C.J., Gucek, M., Cole, R.N., and Wilson, K.L. (2009). Barrier-to-autointegration factor proteome reveals chromatin-regulatory partners. *PLoS One* 4, e7050.
- Moreno-Moreno, O., Torras-Llort, M., and Azorín, F. (2006). Proteolysis restricts localization of CID, the centromere-specific histone H3 variant of *Drosophila*, to centromeres. *Nucleic Acids Res* 34, 6247-6255.
- Moroi, Y., Hartman, A.L., Nakane, P.K., and Tan, E.M. (1981). Distribution of kinetochore (centromere) antigen in mammalian cell nuclei. *J Cell Biol* 90, 254-259.
- Murphy, M., and Fitzgerald-Hayes, M. (1990). Cis- and trans-acting factors involved in centromere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 4, 329-336.
- Murphy, T.D., and Karpen, G.H. (1995). Localization of centromere function in a *Drosophila* minichromosome. *Cell* 82, 599-609.
- Murzina, N.V., Pei, X.-Y., Zhang, W., Sparkes, M., Vicente-Garcia, J., Pratap, J.V., McLaughlin, S.H., Ben-Shahar, T.R., Verreault, A., and Luisi, B.F. (2008). Structural basis for the recognition of histone H4 by the histone-chaperone RbAp46. *Structure* 16, 1077-1085.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 379-393.
- Nakano, M., Cardinale, S., Noskov, V.N., Gassmann, R., Vagnarelli, P., Kandels-Lewis, S., Larionov, V., Earnshaw, W.C., and Masumoto, H. (2008). Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers. *Dev Cell* 14, 507-522.
- Namboodiri, V., Akey, I.V., Schmidt-Zachmann, M.S., Head, J.F., and Akey, C.W. (2004). The Structure and Function of *Xenopus* NO38-Core, a Histone Chaperone in the Nucleolus. *Structure* 12, 2149-2160.



- Nekrasov, V.S., Smith, M.A., Peak-Chew, S., and Kilmartin, J.V. (2003). Interactions between centromere complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* *14*, 4931-4946.
- Newlon, C.S. (1988). Yeast chromosome replication and segregation. *Microbiol Rev* *52*, 568-601.
- Nichols, R.J., Wiebe, M.S., and Traktman, P. (2006). The vaccinia-related kinases phosphorylate the N-terminus of BAF, regulating its interaction with DNA and its retention in the nucleus. *Mol Biol Cell* *17*, 2451-2464.
- Nikolakaki, E., Meier, J., Simos, G., Georgatos, S.D., and Giannakouros, T. (1997). Mitotic phosphorylation of the lamin B receptor by a serine/arginine kinase and p34cdc2. *J Biol Chem* *272*, 6208-6213.
- Nishihashi, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Ikemura, T., Regnier, V., Dodson, H., Earnshaw, W.C., and Fukagawa, T. (2002). CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells. *Dev Cell* *2*, 463-476.
- Nishino, T., Takeuchi, K., Gascoigne, K.E., Suzuki, A., Hori, T., Oyama, T., Morikawa, K., Cheeseman, I.M., and Fukagawa, T. (2012). CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a histone-like fold. *Cell* *148*, 487-501.
- Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S.I., and Watanabe, Y. (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* *4*, 89-93.
- Obuse, C., Iwasaki, O., Kiyomitsu, T., Goshima, G., Toyoda, Y., and Yanagida, M. (2004). A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat Cell Biol* *6*, 1135-1141.
- Ochs, R.L., and Press, R.I. (1992). Centromere autoantigens are associated with the nucleolus. *Exp Cell Res* *200*, 339-350.
- Oegema, K., Desai, A., Rybina, S., Kirkham, M., and Hyman, A.A. (2001). Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* *153*, 1209-1226.
- Okada, M., Cheeseman, I.M., Hori, T., Okawa, K., McLeod, I.X., Yates, J.R., 3rd, Desai, A., and Fukagawa, T. (2006). The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nat Cell Biol* *8*, 446-457.
- Okuwaki, M., Matsumoto, K., Tsujimoto, M., and Nagata, K. (2001). Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS letters* *506*, 272-276.
- Orjalo, A.V., Arnaoutov, A., Shen, Z., Boyarchuk, Y., Zeitlin, S.G., Fontoura, B., Briggs, S., Dasso, M., and Forbes, D.J. (2006). The Nup107-160 nucleoporin complex is required for correct bipolar spindle assembly. *Mol Biol Cell* *17*, 3806-3818.
- Orr, B., and Sunkel, C.E. (2010). *Drosophila* CENP-C is essential for centromere identity. *Chromosoma* *120*, 83-96.
- Ortiz, J., Stemmann, O., Rank, S., and Lechner, J. (1999). A putative protein complex consisting of Ctf19, Mcm21, and Okp1 represents a missing link in the budding yeast kinetochore. *Genes Dev* *13*, 1140-1155.
- Padeken, J., Mendiburo, M.J., Chlamydas, S., Schwarz, H.-J., Kremmer, E., and Heun, P. (2013). The nucleoplasmin homolog NLP mediates centromere clustering and anchoring to the nucleolus. *Mol Cell* *50*, 236-249.
- Palmer, D.K., O'Day, K., Trong, H., Charbonneau, H., and Margolis, R.L. (1991). Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 3734-3738.
- Palmer, D.K., O'Day, K., Wener, M.H., Andrews, B.S., and Margolis, R.L. (1987). A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol* *104*, 805-815.
- Pearson, C.G., Yeh, E., Gardner, M., Odde, D., Salmon, E., and Bloom, K. (2004). Stable kinetochore-microtubule attachment constrains centromere positioning in metaphase. *Curr Biol* *14*, 1962-1967.

- Petrovic, A., Pasqualato, S., Dube, P., Krenn, V., Santaguida, S., Cittaro, D., Monzani, S., Massimiliano, L., Keller, J., and Tarricone, A. (2010). The MIS12 complex is a protein interaction hub for outer kinetochore assembly. *J Cell Biol* 190, 835-852.
- Pidoux, A.L., Choi, E.S., Abbott, J.K., Liu, X., Kagansky, A., Castillo, A.G., Hamilton, G.L., Richardson, W., Rappsilber, J., and He, X. (2009). Fission yeast Scm3: A CENP-A receptor required for integrity of subkinetochore chromatin. *Mol Cell* 33, 299-311.
- Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 427-438.
- Platani, M., Santarella-Mellwig, R., Posch, M., Walczak, R., Swedlow, J.R., and Mattaj, I.W. (2009). The Nup107-160 nucleoporin complex promotes mitotic events via control of the localization state of the chromosome passenger complex. *Mol Biol Cell* 20, 5260-5275.
- Poleshko, A., Mansfield, K.M., Burlingame, C.C., Andrade, M.D., Shah, N.R., and Katz, R.A. (2013). The Human Protein PRR14 Tethers Heterochromatin to the Nuclear Lamina during Interphase and Mitotic Exit. *Cell Rep* 5, 292-301.
- Przewloka, M.R., and Glover, D.M. (2009). The kinetochore and the centromere: a working long distance relationship. *Annu Rev Genet* 43, 439-465.
- Przewloka, M.R., Venkei, Z., Bolanos-Garcia, V.M., Debski, J., Dadlez, M., and Glover, D.M. (2011). CENP-C is a structural platform for kinetochore assembly. *Curr Biol* 21, 399-405.
- Przewloka, M.R., Venkei, Z., and Glover, D.M. (2009). Searching for Drosophila Dsn1 kinetochore protein. *Cell Cycle* 8, 1-1293.
- Przewloka, M.R., Zhang, W., Costa, P., Archambault, V., D'Avino, P.P., Lilley, K.S., Laue, E.D., McAinsh, A.D., and Glover, D.M. (2007). Molecular analysis of core kinetochore composition and assembly in Drosophila melanogaster. *PLoS One* 2, e478.
- Quénet, D. and Dalal, Y. 2012. The CENP-A nucleosome: a dynamic structure and role at the centromere. *Chromosome Res.* 20(5):465-79.
- Rabi, C. (1885). *Über Zelltheilung*. *Morphol. Jahrb.* 10, 214-330.
- Ranjitkar, P., Press, M.O., Yi, X., Baker, R., MacCoss, M.J., and Biggins, S. (2010). An E3 ubiquitin ligase prevents ectopic localization of the centromeric histone H3 variant via the centromere targeting domain. *Mol Cell* 40, 455-464.
- Raz, V., Carlotti, F.o., Vermolen, B.J., van der Poel, E., Sloos, W.C., Knaän-Shanzer, S., de Vries, A.A., Hoeben, R.C., Young, I.T., and Tanke, H.J. (2006). Changes in lamina structure are followed by spatial reorganization of heterochromatic regions in caspase-8-activated human mesenchymal stem cells. *J Cell Sci* 119, 4247-4256.
- Régnier, V., Vagnarelli, P., Fukagawa, T., Zerjal, T., Burns, E., Trouche, D., Earnshaw, W., and Brown, W. (2005). CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Mol Cell Biol* 25, 3967-3981.
- Ribeiro, S.A., Vagnarelli, P., Dong, Y., Hori, T., McEwen, B.F., Fukagawa, T., Flors, C., and Earnshaw, W.C. (2010). A super-resolution map of the vertebrate kinetochore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10484-10489.
- Ricke, R.M., Jeganathan, K.B., Malureanu, L., Harrison, A.M., and van Deursen, J.M. (2012). Bub1 kinase activity drives error correction and mitotic checkpoint control but not tumor suppression. *J Cell Biol* 199, 931-949.
- Rieder, C.L., and Salmon, E.D. (1998). The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol* 8, 310-318.
- Rosenberg, J.S., Cross, F.R., and Funabiki, H. (2011). KNL1/Spc105 recruits PP1 to silence the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol* 21, 942-947.
- Ryu, H.W., Lee, D.H., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P. and Kwon, S.H., (2014). Analysis of the heterochromatin protein 1 (HP1) interactome in Drosophila. *J Proteomics.* 6;102:137-47.
- Saffery, R., Irvine, D.V., Griffiths, B., Kalitsis, P., Wordeman, L., and Choo, K.A. (2000). Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of

- 20 functionally important kinetochore-associated proteins. *Hum Mol Genet* 9, 175-185.
- Saitoh, H., Tomkiel, J., Cooke, C.A., Ratrie III, H., Maurer, M., Rothfield, N.F., and Earnshaw, W.C. (1992). CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. *Cell* 70, 115-125.
- Samel, A., Cuomo, A., Bonaldi, T., and Ehrenhofer-Murray, A.E. (2012). Methylation of CenH3 arginine 37 regulates kinetochore integrity and chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9029-9034.
- Santaguida, S., Tighe, A., D'Alise, A.M., Taylor, S.S., and Musacchio, A. (2010). Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J Cell Biol* 190, 73-87.
- Sarkar, R., Guffei, A., Vermolen, B.J., Garini, Y., and Mai, S. (2007). Alterations of centromere positions in nuclei of immortalized and malignant mouse lymphocytes. *Cytometry Part A* 71, 386-392.
- Saurin, A.T., van der Waal, M.S., Medema, R.H., Lens, S.M., and Kops, G.J. (2011). Aurora B potentiates Mps1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis. *Nat Commun* 2, 316.
- Schittenhelm, R.B., Althoff, F., Heidmann, S., and Lehner, C.F. (2010). Detrimental incorporation of excess Cenp-A/Cid and Cenp-C into *Drosophila* centromeres is prevented by limiting amounts of the bridging factor Cal1. *J Cell Sci* 123, 3768-3779.
- Schittenhelm, R.B., Chaleckis, R., and Lehner, C.F. (2009). Intrakinetochore localization and essential functional domains of *Drosophila* Spc105. *EMBO J* 28, 2374-2386.
- Schuh, M., Lehner, C.F., and Heidmann, S. (2007). Incorporation of *Drosophila* CID/CENP-A and CENP-C into Centromeres during Early Embryonic Anaphase. *Curr Biol* 17, 237-243.
- Schwendemann, A., Matkovic, T., Linke, C., Klebes, A., Hofmann, A., and Korge, G.n. (2008). Hip, an HP1-interacting protein, is a haplo- and triplo-suppressor of position effect variegation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 204-209.
- Screpanti, E., De Antoni, A., Alushin, G.M., Petrovic, A., Melis, T., Nogales, E., and Musacchio, A. (2011). Direct binding of Cenp-C to the Mis12 complex joins the inner and outer kinetochore. *Curr Biol* 21, 391-398.
- Segura-Totten, M., Kowalski, A.K., Craigie, R., and Wilson, K.L. (2002). Barrier-to-autointegration factor major roles in chromatin decondensation and nuclear assembly. *J Cell Biol* 158, 475-485.
- Senior, A., and Gerace, L. (1988). Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *J Cell Biol* 107, 2029-2036.
- Shelby, R.D., Vafa, O., and Sullivan, K.F. (1997). Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *J Cell Biol* 136, 501-513.
- Shepperd, L.A., Meadows, J.C., Sochaj, A.M., Lancaster, T.C., Zou, J., Buttrick, G.J., Rappsilber, J., Hardwick, K.G., and Millar, J. (2012). Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Curr Biol* 22, 891-899.
- Shimi, T., Koujin, T., Segura-Totten, M., Wilson, K.L., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2004). Dynamic interaction between BAF and emerin revealed by FRAP, FLIP, and FRET analyses in living HeLa cells. *J Struct Biol* 147, 31-41.
- Shuaib, M., Ouarrhni, K., Dimitrov, S., and Hamiche, A. (2010). HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1349-1354.
- Solovei, I., Schermelleh, L., Düring, K., Engelhardt, A., Stein, S., Cremer, C., and Cremer, T. (2004). Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types. *Chromosoma* 112, 410-423.
- Song, J.-J., Garlick, J.D., and Kingston, R.E. (2008). Structural basis of histone H4 recognition by p55. *Genes Dev* 22, 1313-1318.

- Stoler, S., Keith, K.C., Curnick, K.E., and Fitzgerald-Hayes, M. (1995). A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev* 9, 573-586.
- Stuurman, N., Heins, S., and Aebi, U. (1998). Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* 122, 42-66.
- Subirana, J.A., and Messeguer, X. (2013). A satellite explosion in the genome of holocentric nematodes. *PLoS One* 8, e62221.
- Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 154, 925-936.
- Sugata, N., Munekata, E., and Todokoro, K. (1999). Characterization of a novel kinetochore protein, CENP-H. *J Biol Chem* 274, 27343-27346.
- Sugimoto, K., Kuriyama, K., Shibata, A., and Himeno, M. (1997). Characterization of internal DNA-binding and C-terminal dimerization domains of human centromere/kinetochore autoantigen CENP-C in vitro: role of DNA-binding and self-associating activities in kinetochore organization. *Chromosome Res* 5, 132-141.
- Sugimoto, K., Yata, H., Muro, Y., and Himeno, M. (1994). Human centromere protein C (CENP-C) is a DNA-binding protein which possesses a novel DNA-binding motif. *J Biochem* 116, 877-881.
- Suijkerbuijk, S.J., van Dam, T.J., Karagöz, G.E., von Castelmur, E., Hubner, N.C., Duarte, A., Vleugel, M., Perrakis, A., Rüdiger, S.G., and Snel, B. (2012). The vertebrate mitotic checkpoint protein BUBR1 is an unusual pseudokinase. *Dev Cell* 22, 1321-1329.
- Sullivan, B.A., Blower, M.D., and Karpen, G.H. (2001). Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nat Rev Genet* 2, 584-596.
- Sullivan, B.A., and Karpen, G.H. (2004). Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1076-1083.
- Sullivan, K.F. (2001). A solid foundation: functional specialization of centromeric chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 11, 182-188.
- Sullivan, K.F., Hechenberger, M., and Masri, K. (1994). Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J Cell Biol* 127, 581-592.
- Sun, X., Le, H.D., Wahlstrom, J.M., and Karpen, G.H. (2003). Sequence analysis of a functional Drosophila centromere. *Genome Res* 13, 182-194.
- Sun, X., Wahlstrom, J., and Karpen, G. (1997). Molecular structure of a functional Drosophila centromere. *Cell* 91, 1007-1019.
- Suzuki, N., Nakano, M., Nozaki, N., Egashira, S.-i., Okazaki, T., and Masumoto, H. (2004). CENP-B interacts with CENP-C domains containing Mif2 regions responsible for centromere localization. *J Biol Chem* 279, 5934-5946.
- Suzuki, Y., and Craigie, R. (2002). Regulatory mechanisms by which barrier-to-autointegration factor blocks autointegration and stimulates intermolecular integration of Moloney murine leukemia virus preintegration complexes. *J Virol* 76, 12376-12380.
- Tagawa, Y., Nanashima, A., Yasutake, T., Hatano, K., Nishizawa-Takano, J.E., and Ayabe, H. (1997). Differences in spatial localization and chromatin pattern during different phases of cell cycle between normal and cancer cells. *Cytometry* 27, 327-335.
- Takahashi, K., Chen, E.S., and Yanagida, M. (2000). Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science* 288, 2215-2219.
- Takahashi, K., Murakami, S., Chikashige, Y., Funabiki, H., Niwa, O., and Yanagida, M. (1992). A low copy number central sequence with strict symmetry and unusual chromatin structure in fission yeast centromere. *Mol Biol Cell* 3, 819-835.

- Takayama, Y., Sato, H., Saitoh, S., Ogiyama, Y., Masuda, F., and Takahashi, K. (2008). Biphasic incorporation of centromeric histone CENP-A in fission yeast. *Mol Biol Cell* 19, 682-690.
- Takeuchi, K., and Fukagawa, T. (2012). Molecular architecture of vertebrate kinetochores. *Exp Cell Res* 318, 1367-1374.
- Talbert, P.B., Bryson, T.D., and Henikoff, S. (2004). Adaptive evolution of centromere proteins in plants and animals. *J Biol* 3, 18.
- Talbert, P.B., Masuelli, R., Tyagi, A.P., Comai, L., and Henikoff, S. (2002). Centromeric localization and adaptive evolution of an Arabidopsis histone H3 variant. *Plant Cell* 14, 1053-1066.
- Tanaka, K., Kitamura, E., Kitamura, Y., and Tanaka, T.U. (2007). Molecular mechanisms of microtubule-dependent kinetochore transport toward spindle poles. *J Cell Biol* 178, 269-281.
- Tanaka, K., Li Chang, H., Kagami, A., and Watanabe, Y. (2009). CENP-C functions as a scaffold for effectors with essential kinetochore functions in mitosis and meiosis. *Dev Cell* 17, 334-343.
- Taniura, H., Glass, C., and Gerace, L. (1995). A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J Cell Biol* 131, 33-44.
- Tomkiel, J., Cooke, C.A., Saitoh, H., Bernat, R.L., and Earnshaw, W.C. (1994). CENP-C is required for maintaining proper kinetochore size and for a timely transition to anaphase. *J Cell Biol* 125, 531-545.
- Tomonaga, T., Matsushita, K., Yamaguchi, S., Oohashi, T., Shimada, H., Ochiai, T., Yoda, K., and Nomura, F. (2003). Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer. *Cancer Res* 63, 3511-3516.
- Torras-Llort, M., Moreno-Moreno, O., and Azorín, F. (2009). Focus on the centre: the role of chromatin on the regulation of centromere identity and function. *EMBO J* 28, 2337-2348.
- Trazzi, S., Bernardoni, R., Diolaiti, D., Politi, V., Earnshaw, W.C., Perini, G., and Della Valle, G. (2002). In vivo functional dissection of human inner kinetochore protein CENP-C. *J Struct Biol* 140, 39-48.
- Tyler-Smith, C., and Willard, H.F. (1993). Mammalian chromosome structure. *Curr Opin Genet Dev* 3, 390-397.
- van Bommel, J.G., Filion, G.J., Rosado, A., Talhout, W., de Haas, M., van Welsem, T., van Leeuwen, F., and van Steensel, B. (2013). A Network Model of the Molecular Organization of Chromatin in *Drosophila*. *Mol Cell* 49, 759-771.
- Van Hooser, A.A., Ouspenski, II, Gregson, H.C., Starr, D.A., Yen, T.J., Goldberg, M.L., Yokomori, K., Earnshaw, W.C., Sullivan, K.F., and Brinkley, B.R. (2001). Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J Cell Sci* 114, 3529-3542.
- Venkei, Z., Przewloka, M.R., and Glover, D.M. (2011). *Drosophila* Mis12 complex acts as a single functional unit essential for anaphase chromosome movement and a robust spindle assembly checkpoint. *Genetics* 187, 131-140.
- Vermaak, D., Hayden, H.S., and Henikoff, S. (2002). Centromere targeting element within the histone fold domain of Cid. *Mol Cell Biol* 22, 7553-7561.
- Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1996). Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* 87, 95-104.
- Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1998). Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr Biol* 8, 96-108.
- Wang, X., Xu, S., Rivolta, C., Li, L.Y., Peng, G.-H., Swain, P.K., Sung, C.-H., Swaroop, A., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (2002). Barrier to autointegration factor interacts with the cone-rod homeobox and represses its transactivation function. *J Biol Chem* 277, 43288-43300.
- Warburton, P.E., Cooke, C.A., Bourassa, S., Vafa, O., Sullivan, B.A., Stetten, G., Gimelli, G., Warburton, D., Tyler-Smith, C., and Sullivan, K.F. (1997). Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres. *Curr Biol* 7, 901-904.

- Wei, R.R., Al-Bassam, J., and Harrison, S.C. (2007). The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment. *Nat Struct Mol Biol* 14, 54-59.
- Wei, R.R., Sorger, P.K., and Harrison, S.C. (2005). Molecular organization of the Ndc80 complex, an essential kinetochore component. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5363-5367.
- Weimer, R., Haaf, T., Krüger, J., Poot, M., and Schmid, M. (1992). Characterization of centromere arrangements and test for random distribution in G0, G1, S, G2, G1, and early S' phase in human lymphocytes. *Hum genet* 88, 673-682.
- Welburn, J.P., Vleugel, M., Liu, D., Yates III, J.R., Lampson, M.A., Fukagawa, T., and Cheeseman, I.M. (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol Cell* 38, 383-392.
- Wevrick, R., Earnshaw, W.C., Howard-Peebles, P.N., and Willard, H.F. (1990). Partial deletion of alpha satellite DNA associated with reduced amounts of the centromere protein CENP-B in a mitotically stable human chromosome rearrangement. *Mol Cell Biol* 10, 6374-6380.
- Wiebe, M.S., and Traktman, P. (2007). Poxviral B1 kinase overcomes barrier to autointegration factor, a host defense against virus replication. *Cell Host Microbe* 1, 187-197.
- Wigge, P.A., and Kilmartin, J.V. (2001). The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation. *J Cell Biol* 152, 349-360.
- Williams, J.S., Hayashi, T., Yanagida, M., and Russell, P. (2009). Fission yeast Scm3 mediates stable assembly of Cnp1/CENP-A into centromeric chromatin. *Mol Cell* 33, 287-298.
- Wong, L.H., Brettingham-Moore, K.H., Chan, L., Quach, J.M., Anderson, M.A., Northrop, E.L., Hannan, R., Saffery, R., Shaw, M.L., and Williams, E. (2007). Centromere RNA is a key component for the assembly of nucleoproteins at the nucleolus and centromere. *Genome Res* 17, 1146-1160.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., *et al.* (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415, 871-880.
- Worman, H.J., Yuan, J., Blobel, G., and Georgatos, S.D. (1988). A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8531-8534.
- Yamagishi, Y., Yang, C.-H., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2012). MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nat Cell Biol* 14, 746-752.
- Yang, C.H., Tomkiel, J., Saitoh, H., Johnson, D.H., and Earnshaw, W.C. (1996). Identification of overlapping DNA-binding and centromere-targeting domains in the human kinetochore protein CENP-C. *Mol Cell Biol* 16, 3576-3586.
- Yang, J.W., Pendon, C., Yang, J., Haywood, N., Chand, A., and Brown, W.R. (2000). Human mini-chromosomes with minimal centromeres. *Hum Mol Genet* 9, 1891-1902.
- Ye, Q., and Worman, H.J. (1996). Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to *Drosophila* HP1. *J Biol Chem* 271, 14653-14656.
- Zeitlin, S.G., Shelby, R.D., and Sullivan, K.F. (2001). CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J Cell Biol* 155, 1147-1158.
- Zheng, R., Ghirlando, R., Lee, M.S., Mizuuchi, K., Krause, M., and Craigie, R. (2000). Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8997-9002.
- Zhuang, X., Semenova, E., Maric, D., and Craigie, R. (2014). Dephosphorylation of Barrier-to-autointegration Factor by Protein Phosphatase 4 and Its Role in Cell Mitosis. *J Biol Chem* 289, 1119-1127.