



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Factors implicats a l'estructura de l'heterocromatina constitutiva pericèntrica

Jèssica González Nieto



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonComercial-NonDerivs 4.0 Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA
BARCELONA, 2020

Factors implicats a l'estructura de l'heterocromatina constitutiva pericèntrica

Memòria presentada per **Jèssica González Nieto** per optar
al títol de **Doctor** per la **Universitat de Barcelona**

Aquesta tesi s'ha realitzat sota la supervisió del **Dr. Alejandro Vaquero García** en el Programa d'Epigenètica i Biologia del Càncer (PEBC) de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) i posteriorment a l'Institut Josep Carreras (IJC), on es va traslladar el grup.



Dr. Alejandro Vaquero García

Director



Dr. Josep Maria Argilés Huguet

Tutor



Jèssica González Nieto

Doctoranda

Als meus pares i a la meva germana.

Patience is bitter, but its fruit is sweet.

Jean-Jacques Rousseau

AGRAÏMENTS

Ja han passat més de cinc anys des de que vaig començar aquesta experiència tant sacrificada però a la vegada tant enriquidora anomenada tesi, i puc dir que aquesta etapa m'ha fet créixer no només a nivell científic si no també a nivell personal. Hi ha hagut moments de tot, d'esforç, de suor, d'aprenentatge, de llàgrimes i de riures, però gràcies a tots vosaltres he arribat fins aquí. Aquest camí no acaba, tan sols pren una altra direcció.

Primer de tot, vull agrair a l'Àlex per haver confiat en mi i haver-me donat l'oportunitat de formar part d'aquest projecte. També per transmetre'm l'entusiasme i passió que per sents la ciència, i pel coneixement en general, i la importància de la dedicació i perseverança. Des de el primer dia i durant tots aquests anys, no hi ha hagut cap moment en que no hagi estat disposat a discutir resultats i a pensar nous "experimentets" per fer tirar endavant el projecte. Sempre recordaré aquelles llargues conversacions divagant i proposant hipòtesis, entre les quals intercalàvem qualsevol altre tema com tafaneigs, música clàssica, robòtica, etc. A dia d'avui puc dir que ha sigut una sort haver-te tingut com a director.

Vull també donar les gràcies als meus companys de laboratori, que al llarg del temps s'han anat convertint en algo més que companys de feina. Des del principi m'heu acollit molt bé i m'heu fet sentir com a la meva segona casa, hem compartir molts moments que mai oblidaré. A la Laia, amb qui vaig compartir poyata durant els primers anys, per la paciència que has tingut amb mi ensenyant-me les tècniques més utilitzades al laboratori, a organitzar-me els experiments i a resoldre els problemes del dia a dia, tant els professionals com els personals. Gràcies per ajudar-me en tot moment, sempre plena d'energia i disciplinada, gran part del meu treball te'l dec a tu. A l'Anna, que ha sigut un dels meus suports al laboratori, quina sort he tingut d'haver coincidit amb una persona com tu, sempre enfeinada però amb ganes d'ajudar i fer més fàcil la vida a la gent del teu entorn. Durant tot aquest temps sempre m'has recolzat quan ho he necessitat, tant a nivell professional com personal. Ets una de les persones del laboratori que em porto al cor. A la Núria, tot i haver coincidit poc temps, sempre treballant amb un somriure d'orella a orella. A en George, i les seves històries que amainaven les hores de

treball i aquelles estones compartides al tren. A en Nico, per aportar tant bon rotllo i diversió al laboratori, amb els teus comentaris característics i les teves expressions xilenes. A la Maria, el meu altre gran suport al laboratori, amb tu he compartit la majoria dels moments viscuts durant aquesta etapa. Vam començar juntes aquesta experiència i l'estem terminant a la vegada, hem viscut moments de tot tipus, riures, anècdotes divertides, hores de rodatge a la nostra sala, esmorzars, berenars, empipaments i reconciliacions amb hipopòtams Kinder, anades al lavabo, etc. Hem sigut inseparables durant tots aquests anys, aquesta experiència no hagués estat el mateix sense tu. Des de que ens vàrem conèixer ja vam connectar molt bé, i si et dic la veritat, no hagués pogut imaginar una millor companya de viatge. T'has convertit en una de les meves grans amigues i espero que continuï durant molts anys, el que ha unit "el anillo de poder" que no ho separi ningú. A en Pau i el seu entusiasme per la ciència, i la seva manera de prendre't la vida amb alegria. A l'Alfredo, gràcies per haver alegrat les estones que venies a veure'ns, i per els moments tant divertits viscuts amb tu, un plaer ser part de les "células". A la Berta, per estar sempre disposada a discutir sobre ciència amb entusiasme. Gràcies per haver-me escoltat i aconsellat a nivell professional com personal. Al final d'aquesta etapa van arribar en Josema, l'Andrés i la Irene, i varen omplir d'aire fresc el laboratori. En Josema i les seves frases que s'enganxen, gràcies pel teu especial sentit d'humor. L'Andrés sempre amb ganes d'ajudar i facilitar la feina a la resta. I la Irene, per les estones compartides i les hores de cafè juntes. Ha sigut un plaer compartir moments amb tots vosaltres!

Fora del nostre laboratori, també vull agrair als companys de la resta de l'antic PEBC/nou IJC per tots els moments viscuts. A en Fer, per el seu entusiasme i la seva vitalitat, gràcies "chiqui", a la Vanessa, la Laia, el Pere, el Xec, la Lorea, etc. Gràcies per alegrar els creuaments al passadís. En especial, al "Clan leones-Sex on the beach" amb qui he compartit moments de tot tipus, llargues hores de treball, sopars, viatges i excursions. A la Marta, amb qui vaig connectar només arribar, gràcies per escoltar-me i donar-me suport quan ho he necessitat i per entendre'm tant bé. A l'Ana, amb qui he compartit gran part d'aquesta etapa, gràcies pels berenars que ens servien per animar un mal dia, per les anècdotes compartides, pels "ja-ja" i per aportar-me alegria, gràcies per ser com ets "pocahontas". A la Yolanda, i els moments compartits al gim que ens feien desfogar-nos quan no

sortien les coses. I a en David, tot i ser “el ancla” del grup, per totes les estones compartides. Us estic molt agraïda!

També vull donar les gràcies a la Cristina i a l'Àngels, sempre disposades a ajudar en tot el que calgués de les millors de les maneres. Moltes gràcies per haver-me ajudat tant durant aquesta etapa final tant complicada, heu fet que sigui molt més senzilla, gràcies a la vostra eficiència i comprensió.

Els agraïments especials d'aquesta tesi són pels meus pares i la meva germana, perquè sense vosaltres res d'això hagués estat possible. Gràcies per escoltar-me i recolzar-me sempre en qualsevol decisió que he pres, i per ajudar-me en tot, per tal que jo hem pogués dedicar única i exclusivament a la meva feina sense haver de preocupar-me de res més. Gràcies per haver-me donat suport en aquesta etapa final tant complicada i per fer tot el possible per animar-me i que estigués bé. I gràcies per ser els millors pares i germana que podia haver imaginat a la vida. Aquest treball no és només meu, és de tots quatre, del nostre equip, després de tant de temps i esforç, tots junts hem aconseguit arribar a la recta final! Us estimo moltíssim, sou i sereu sempre els pilars fundamentals de la meva vida! Agrair també a l'àvia i a l'avi, que sempre s'han preocupat de mi i de que m'anés bé aquesta etapa de la tesi. Gràcies també als meus peques Bleyse i Dark per acompanyar-me al llarg d'aquesta etapa!

Moltes gràcies a tots,
Jèssica

TAULA DE CONTINGUT

Llistat d'abreviatures	I
Llistat de figures	V
Llistat de taules	IX
RESUM	1
INTRODUCCIÓ	5
1. LA CROMATINA	7
1.1. Composició de la cromatina.....	7
1.2. Dinàmica de la cromatina	8
1.2.1. Modificacions postraduccionals de les histones.....	9
1.2.1.1. Acetilació.....	11
1.2.1.2. Metilació.....	12
1.2.1.3. Fosforilació.....	14
1.2.2. Variants d'histones.....	15
1.2.2.1. H2A.Z.....	18
1.3. Enzims implicats en les modificacions postraduccionals	21
1.3.1. Acetiltransferases d'histones (HATs).....	22
1.3.2. Desacetilases d'histones (HDACs).....	23
1.3.2.1. HDACs de classe III: les Sirtuïnes.....	24
1.3.3. Metiltransferases d'histones (HMTs).....	29
1.3.4. Desmetilases d'histones (HDMs).....	32
1.3.5. Relació entre les HDACs i les HMTs.....	32
1.4. Maquinària de remodelació de la cromatina.....	33
2. ESTRUCTURA DE LA CROMATINA	34
2.1. Organització de la cromatina.....	34
2.2. Classificació funcional de la cromatina: Eucromatina i heterocromatina.	36
2.2.1. Heterocromatina facultativa(HF) i heterocromatina constitutiva(HC)	
.....	37
2.2.1.1. Heterocromatina constitutiva telomèrica (HTC).....	38
2.2.1.2. Heterocromatina constitutiva centromèrica (HCC).....	39
2.2.1.3. Heterocromatina constitutiva pericèntrica (HPC).....	39

3. FACTORS CLAU A L'ESTRUCTURA DE L'HPC	42
3.1. Suv39h1	42
3.2. Isoformes d'HP1: HP1 α , HP1 β , HP1 γ	44
3.3. Suv420h2	50
4. FORMACIÓ DE L'HPC.....	52
5. PAPER DE LES ISOFORMES D'HP1 A L'ESTRUCTURA DE L'HPC.....	53
6. MANTENIMENT DE L'HPC SOTA CONDICIONS D'ESTRÉS: PAPER DE SIRT1 .	56
6.1. Estructura, regulació i funcions de SirT1	58
6.2. Paper de SirT1 en el manteniment de l'HPC	62
6.3. Estructura, regulació i funcions de PARP-1	64
6.4. Antagonisme funcional entre SirT1 i PARP-1 en el manteniment de l'HPC	67
7. LIMITACIÓ DE L'EUCROMATINA I L'HETEROCROMATINA PER LES REGIONS FLANQUEJANTS.....	68
8. IMPORTÀNCIA DE L'ESTABILITAT GENÒMICA	71
OBJECTIUS.....	75
MATERIALS I MÈTODES.....	79
1. CULTIUS CEL·LULARS.....	81
1.1. Fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) immortalitzats.....	81
1.2. Línies cel·lulars	81
2. PROCEDIMENTS CEL·LULARS.....	81
2.1. Transfecció de plàsmids	82
2.2. Transfecció de siRNA.....	82
2.3. Infecció lentiviral	83
2.4. Discriminació de la fase del cicle cel·lular	83
2.5. Tractament amb ciclohexamida	83
3. PROCEDIMENTS AMB ADN I ARN.....	83
3.1. <i>Tagging</i> endògen per CRISPR/Cas9.....	83
3.1.1. Clonatge del vector pSpCas9 (BB)-2A-GFP.....	84
3.1.2. Clonatge del vector pFETCH_Donor.....	84
3.1.3. Selecció de les cèl·lules.....	85
3.2. Obtenció de l'ADN genòmic.....	86
3.3. PCR.....	86

3.4. Purificació de l'ARN i síntesi de cDNA	86
3.5. RT-qPCR.....	87
4. PROCEDIMENTS AMB PROTEÏNES.....	88
4.1. Extractes proteics totals i fraccionament subcel·lular	88
4.2. Western Blot	89
4.3. Co-immunoprecipitació de proteïnes i pull-downs	90
4.4. CHIPs i reCHIPs.....	90
4.5. Purificació de Suv39h1-flag de cèl·lules NIH3T3 taggejades endògenament	92
4.6. Assaig de metilació d'histones <i>in vitro</i>	92
4.7. Immunofluorescència.....	93
4.8. Experiments de FRET.....	94
4.9. Experiments de FRAP.....	94
4.10. Experiments de FLIM-FRET	95
4.11. Anàlisis mitòtics.....	96
5. ANÀLISIS BIOINFORMÀTICS.....	96
5.1. Anàlisi de correlació de CHIP-seq.....	96
5.2. Anàlisi estadístic.....	97
RESULTATS	99
1. PAPER ESPECÍFIC DE LES ISOFORMES D'HP1 A L'ESTRUCTURA I ORGANITZACIÓ DE L'HPC.....	101
1.1. HP1 α controla la propagació d'H4K20me3 i d'H3K27me3 als focis d'HPC	101
1.2. HP1 β es troba funcionalment vinculat a H4K20me3 i a Suv420h2 als focis d'HPC.....	104
1.3. HP1 α i CTCF cooperen en l'organització de l'HPC.....	111
1.4. H2A.Z interactua preferentment amb HP1 β als focis d'HPC	116
1.5. HP1 α controla la propagació d'H2A.Z als focis d'HPC	120
1.6. H2A.Z col·labora en el control de l'organització de l'HPC	123
1.7. La pèrdua d'HP1 α indueix hipercompactació <i>in vivo</i> de l'HPC.....	125
1.8. Anormalitats mitòtiques associades a la pèrdua de les isoformes d'HP1127	
2. PAPER DE PARP-1 EN EL CONTROL DEL MANTENIMENT DE L'HPC MEDIAT PER SIRT1 I SUV39H1.....	128

2.1. Antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte H3K9me3 a l'HPC..	129
2.2. SirT1 i PARP-1 regulen de manera antagònica els nivells de Suv39h1 ..	130
2.3. Generació del <i>tagging</i> endògen de Suv39h1 en cèl·lules NIH3T3 a partir de la tècnica CRISPR-Cas9	132
DISCUSSIÓ	141
1. PAPER ESPECÍFIC DE LES ISOFORMES D'HP1 A L'ESTRUCTURA I ORGANITZACIÓ DE L'HPC.....	143
1.1. Paper de la isoforma HP1 α a l'estructura de l'HPC.....	143
1.2. Paper de la isoforma HP1 β a l'estructura de l'HPC.....	146
1.3. Paper de la isoforma HP1 γ a l'estructura de l'HPC	149
1.4. Efecte diferencial de les isoformes d'HP1 a la compactació de les regions d'HPC.....	150
1.5. Importància de les isoformes d'HP1 a l'estabilitat genòmica.....	152
1.6. Malalties associades a la inestabilitat genòmica.....	154
2. PAPER DE PARP-1 EN EL CONTROL DEL MANTENIMENT DE L'HPC MEDIAT PER SIRT1 I SUV39H1.....	155
2.1. Antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 en la regulació dels nivells de Suv39h1	156
2.2. <i>Tagging</i> endògen de Suv39h1 en cèl·lules NIH3T3 com a model d'estudi	157
2.3. Importància de l'estabilització dels nivells de Suv39h1 a l'estabilitat genòmica	158
CONCLUSIONS	161
1. PAPER ESPECÍFIC DE LES ISOFORMES D'HP1 A L'ESTRUCTURA I ORGANITZACIÓ DE L'HPC.....	163
2. PAPER DE PARP-1 EN EL CONTROL DEL MANTENIMENT DE L'HPC MEDIAT PER SIRT1 I SUV39H1.....	164
BIBLIOGRAFIA	167

LLISTAT D'ABREVIATURES

AceCS2	Acetil-CoA sintasa 2
ARNpolIII	ARN polimerasa II
AROS	Active regulator of SirT1
BER	Reparació per excissió de base
CAF1	Chromatin assembly factor 1
CENP-A	H3 like centromeric protein A
CHD	Chromo domain helicase/ATPase binding protein
CHIP	Immunoprecipitació de la cromatina
Chromo	Chromosome Organization modifier
CHX	Ciclohexamida
CKI	Casein kinase 1
CKII	Casein kinase 2
CoIP	Coimmunoprecipitació
CPS1	Carbamoil fosfat sintetasa 1
CTCF	CCCTC-binding factor
DBC1	Deleted in breast cancer 1
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DSB	Doble cadena
ERK1	Extracellular signal-regulated kinase
ESC	Cèl·lules mare embrionàries
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FAD	Favine adenine dinucleotide
FRAP	Fluorescence recovery after a photobleaching
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GDH	Glutamat deshidrogenasa
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
HA	Hemaglutina
HATs	Acetiltransferases d'histones
HC	Heterocromatina constitutiva

HDACs	Deacetilases d'histones
HDMs	Desmetilases d'histones
HF	Heterocromatina factultativa
HMTs	Metiltransferases d'histones
HP1	Heterochromatin Protein 1
HR	Homologous recombination
IF	Immunofluorescència
IGF	Insulin like growth factor
ING2	Inhibidor de la proteïna de creixement 2
INO80	Inositol
ISWI	Imitation of switch
JMJD2b	Jumonji domain 2
JNK2	C-Jun N-terminal kinase 2
lncRNAs	Long non-coding RNAs
LSD	Lysine-specific histone demetilases
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Me1	Monometilats
Me2	Dimetilats
Me3	Trimetilats
NAM	Nicotinamide
ncRNAs	ARN no codificants
NDR	Nucleosome-depleted regions
NES	Senyals d'exportació nuclear
NHEJ	Non-homologous end joining
NLS	Senyals de localització nuclear
PARP	Poly (ADP-ribose) polimerases
PEI	Polietilenimina
PHD	Plant homeodomain
PKA	Protein kinase A
PRC2	Polycomb repressive complex 2
PRE	Polycomb Response Elements
PRMT	Protein arginine methyltransferase
RT-qPCR	PCR quantitativa a temps real

SAM	S-adenosil-L-metionina
SET	Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax
shRNA	Short hairpin RNA
Sir2	Silent information regulator
siRNA	Small interferint RNA
sncRNAs	Small non-coding RNAs
SSB	Cadena senzilla
Suv39h1	Supressor of variegation 3-9 homolog 1
Suv420h1	Supressor of variegation 4-20 homolog 1
Suv420h2	Supressor of variegation 4-20 homolog 2
SWI/SNF	Switch/sucrose nonfermenting
TRE	Trithorax Response Element
TSA	Trichostatin A

Apolars		Polars no carregts		Polars càrrega +		Polars càrrega -	
Alanina	Ala A	Glicina	Gly G	Arginina	Arg R	Àc. aspàrtic	Asp D
Valina	Val V	Serina	Ser S	Histidina	His H	Àc. Glutàmic	Glu E
Leucina	Leu L	Treonina	Thr T	Lisina	Lys K		
Isoleucina	Ile I	Cisteïna	Cys C				
Prolina	Pro P	Tirosina	Tyr Y				
Metionina	Met M	Glutamina	Gln Q				
Fenilalanina	Phe F	Asparagina	Asn N				
Triptòfan	Trp W						

LLISTAT DE FIGURES

Figura I1. Estructura del nucleosoma.....	7
Figura I2. Principals modificacions postraduccional de les histones	9
Figura I3. <i>Cross talk</i> entre les modificacions postraduccional de les histones....	10
Figura I4. Variants d'histones del nucleosoma central en humà	17
Figura I5. Representació esquemàtica de les isoformes d'H2A.Z en humà	18
Figura I6. Enzims modificadors d'histones i dominis de reconeixement.....	21
Figura I7. Reacció enzimàtica de desacetilació de les sirtuïnes	25
Figura I8. Funcions de les sirtuïnes de mamífer	29
Figura I9. Senyals diana dels remodeladors de la cromatina.....	33
Figura I10. Organització de la cromatina en cèl·lules eucariotes.....	35
Figura I11. Classificació de la cromatina: eucromatina i heterocromatina	37
Figura I12. Estructura de l'HPC a cèl·lules de ratolí	40
Figura I13. Visualització dels <i>chromocentres</i> en cèl·lules murines.....	41
Figura I14. Estructura i dominis de Suv39h1 de ratolí	42
Figura I15. Dominis de les isoformes d'HP1 de ratolí i interacció amb diferents factors.....	44
Figura I16. Localització de les isoformes d'HP1 en cèl·lules de ratolí.....	46
Figura I17. Modificacions postraduccional de les isoformes d'HP1	47
Figura I18. Estructura i dominis de Suv420h2 en humà	51
Figura I19. Esquema del procés de formació de l'HPC	53
Figura I20. Localització d'HP1 α , β i γ als focis d'HPC.....	54
Figura I21. Relació entre les isoformes d'HP1 i les modificacions postraduccional de les histones a l'HPC	55
Figura I22. Anàlisi <i>in vitro</i> de la compactació de la cromatina en cèl·lules WT i HP1 KO	56
Figura I23. Sirtuïnes i mecanismes d'estabilitat genòmica en condicions d'estrès	57
Figura I24. Dominis i senyals de localització de SirT1 en humà.....	58
Figura I25. Model de la formació d'HF mediada per SirT1	59
Figura I26. Model del manteniment de l'HPC mediat per SirT1	63

Figura I27. Alteració de l'organització de l'HPC en MEFS de SirT1	63
Figura I28. Estructura i dominis de PARP-1 en mamífer.....	64
Figura I29. Antagonisme funcional entre SirT1 i PARP-1 en l'organització de l'HPC	67
Figura I30. Antagonisme funcional entre SirT1 i PARP-1 en la regulació de la divisió mitòtica	68
Figura I31. Característiques dels <i>boundary elements</i>	70
Figura I32. Estructura i dominis de CTCF.....	70
Figura R1. La pèrdua d'HP1 α indueix un enriquiment d'H4K20me3 i d'H3K27me3 a l'HPC	102
Figura R2. HP1 α regula directament l'enriquiment d'H4K20me3 i d'H3K27me3 a l'HPC.....	103
Figura R3. Efecte directe d'HP1 α respecte H4K20me3 i d'H3K27me3 a l'HPC .	104
Figura R4. Interacció preferencial de Suv420h2 i HP1 α en extractes nuclears enriquits en cromatina	105
Figura R5. Interacció preferencial de Suv420h2 i HP1 β <i>in vivo</i> a l'HPC	106
Figura R6. Modulació de la dinàmica de Suv420h2 específica d'isoforma d'HP1 <i>in vivo</i> a l'HPC	107
Figura R7. HP1 β s'associa amb cromatina enriquida amb H4K20me3.....	108
Figura R8. HP1 β presenta major afinitat d'unió per H4K20me3	109
Figura R9. Enriquiment d'H4K20me3 i HP1 β a <i>major satellites</i>	110
Figura R10. Correlació de la co-localització d'HP1 α o HP1 β amb H4K20me3 a tot el genoma en ESCs de ratolí.....	110
Figura R11. Interacció de CTCF i HP1 α a nivell global	111
Figura R12. Interacció preferencial de CTCF i HP1 α <i>in vivo</i> a l'HPC	112
Figura R13. Paper de les isoformes d'HP1 en la localització de CTCF.....	113
Figura R14. Paper de les isoformes d'HP1 en els nivells de CTCF	113
Figura R15. Paper de les isoformes d'HP1 en l'enriquiment de CTCF a diferents regions de la cromatina	114
Figura R16. CTCF co-localitza a les regions d'HPC.....	115
Figura R17. Efecte de CTCF respecte H4K20me3 i H3K27me3	116
Figura R18. Interacció preferencial d'H2A.Z i HP1 β en extractes nuclears	117

Figura R19. Interacció endògena d'H2A.Z amb les isoformes d'HP1 en extractes nuclears	118
Figura R20. Interacció preferencial d'H2A.Z i HP1 β <i>in vivo</i> a l'HPC.....	119
Figura R21. Enriquiment d'H2A.Z i HP1 β a <i>major satellites</i> de l'HPC.....	119
Figura R22. La pèrdua d'HP1 α indueix un enriquiment d'H2A.Z sobreexpressat a l'HPC.....	120
Figura R23. La pèrdua d'HP1 α indueix un enriquiment d'H2A.Z endgen a l'HPC	121
Figura R24. Paper d'HP1 α en l'enriquiment d'H2A.Z a l'HPC.....	122
Figura R25. HP1 α controla de manera directa l'enriquiment d'H2A.Z a l'HPC..	123
Figura R26. H2A.Z en la localització de CTCF a l'HPC	124
Figura R27. H2A.Z col·labora en el control de l' <i>spreading</i> de l'HPC	125
Figura R28. La pèrdua d'HP1 α indueix hipercompactació <i>in vivo</i> de l'HPC	126
Figura R29. Anormalitats mitòtiques associades a la pèrdua de les isoformes d'HP1	128
Figura R30. Antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte H3K9me3 a l'HPC	129
Figura R31. SirT1 i PARP-1 regulen de manera antagonica els nivells de Suv39h1	130
Figura R32. Nivells de Suv39h1 a les MEFS de SirT1 i de PARP-1.....	131
Figura R33. Transcripció i estabilitat de Suv39h1 a les MEFS de SirT1 i de PARP-1	132
Figura R34. Generació del <i>tagging</i> endògen de Suv39h1 en NIH3T3 a partir de la tècnica CRISPR-Cas9.....	133
Figura R35. Caracterització a nivell genòmic de la línia cel·lular NIH3T3 Suv39h1-flag obtinguda mitjanant CRISPR/Cas9.....	134
Figura R36. El gen Suv39h1-flag es transcriu correctament.....	135
Figura R37. Caracterització a nivell proteic de la línia cel·lular NIH3T3 Suv39h1-flag obtinguda mitjanant CRISPR/Cas9.....	135
Figura R38. IP de flag en cèl·lules NIH3T3 i NIH3T3 Suv39h1-flag	136
Figura R39. La proteïna Suv39h1-flag és catalíticament activa.....	137
Figura R40. Les NIH3T3 Suv39h1-flag són un bon model per estudiar la localització endògena de Suv39h1	137

Figura R41. Les NIH3T3 Suv39h1-flag són un bon model per estudiar enriquiment endògen de Suv39h1 a la cromatina	138
Figura R42. Obtenció de les línies cel·lulars model per a l'estudi de l'antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte Suv39h1	139
Figura D1. Model proposat per a la regulació de l'estructura de l'HPC per part d'HP1 α	146
Figura D2. Model proposat per a la regulació de l'estructura de l'HPC per part d'HP1 β	149
Figura D3. Model global proposat per a la regulació de les isoformes d'HP1 a l'estructura de l'HPC	151
Figura D4. Anormalitats mitòtiques associades a la pèrdua de les isoformes d'HP1	153
Figura D5. Model proposat per a la regulació de l'estructura de l'HPC per part de SirT1 i PARP-1.....	159

LLISTAT DE TAULES

Taula I1. Principals acetilacions d'histones en mamífer	12
Taula I2. Principals metilacions d'histones en mamífer	14
Taula I3. Famílies d'acetiltransferases d'histones i els seus membres	23
Taula I4. Famílies de desacetilases d'histones i els seus membres	24
Taula I5. Diversitat de les sirtuïnes de mamífer	26
Taula I6. Classificació de les KMT	31
Taula I7. Principals interactors de les isoformes d'HP1	48
Taula I8. Funcions principals de les isoformes d'HP1	49
Taula I9. Funcions importants de PARP-1	65
Taula M1. Plàsmids utilitzats a les transfeccions cel·lulars	82
Taula M2. Primers utilitzats per clonar el gRNA.....	84
Taula M3. Primers utilitzats per clonar els braços d'homologia.....	85
Taula M4. Llistat de primers utilitzats a les RT-qPCR.....	87
Taula M5. Llistat d'anticossos primaris i secundaris emprats per Western Blot.	89
Taula M6. Llistat d'anticossos emprats en CHIPs i reCHIPs	91
Taula M7. Llistat d'anticossos primaris i secundaris emprats per IF	93
Taula D1. Relació entre les isoformes d'HP1 i la progressió del càncer	155

RESUM

La cromatina és una estructura nucleoproteïca dinàmica i jeràrquicament organitzada dins del nucli cel·lular. Segons la seva funcionalitat, la cromatina es pot classificar en dos tipus de regions: l'eucromatina, també anomenada cromatina activa; i l'heterocromatina, que es coneix com a cromatina inactiva. A la seva vegada, l'heterocromatina es pot dividir en dues formes principals en funció de la seva dinàmica funcional, l'heterocromatina facultativa (HF) i l'heterocromatina constitutiva (HC). L'HF es refereix a regions condensades que es troben transcripcionalment inactives però que es poden descompactar per revertir a eucromatina i permetre la transcripció sota determinats contextos específics. Mentre que l'HC es refereix a regions fortament condensades que es troben permanentment silenciades, i que es caracteritzen per tenir baixa densitat gènica i per ser riques en seqüències repetitives d'ADN. Aquestes regions, tenen un rol principalment estructural i són molt importants pel manteniment de l'estabilitat genòmica. Les regions més extenses de l'HC són les regions d'heterocromatina constitutiva pericèntrica (HPC), situades al voltant de la regió centromèrica i vitals per a la formació del cinetocor durant el procés de segregació cromosòmica. D'aquesta manera, l'organització i manteniment de les regions d'HPC és de gran importància per assegurar l'estabilitat genòmica. Ja que l'alteració de la seva estructura condueix a la inestabilitat genòmica, un factor clau en el desenvolupament de moltes patologies humanes com el càncer, les malalties neurodegeneratives, els trastorns cardiovasculars, els trastorns endocrins, i l'envelliment, entre d'altres.

HP1 és una proteïna estructural fonamental a les regions d'HPC. En mamífers han estat descrites tres isoformes, HP1 α , HP1 β i HP1 γ . Al llarg del temps s'ha considerat el paper de les isoformes d'HP1 si més no equivalent degut a la forta redundància funcional d'aquestes proteïnes en alguns aspectes concrets. Actualment però, aquesta perspectiva ha canviat, i han estat descrites múltiples funcions específiques de les isoformes d'HP1. Però tot i la seva importància, la contribució específica d'aquestes isoformes a les regions d'HPC no estava ben definida fins al moment. A la primera part d'aquesta tesi s'ha identificat la contribució distintiva de les isoformes d'HP1 a l'estructura i organització de l'HPC. HP1 α té un paper directe en la limitació de les marques d'heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3 a les regions d'HPC. El nostre treball indica que HP1 α té un paper a l'establiment dels dominis cromatínics a aquestes regions per tal d'evitar la propagació de l'heterocromatina a l'eucromatina adjacent, en conjunció amb el principal regulador de l'arquitectura de la cromatina, CTCF, i amb la variant d'histona H2A.Z. La pèrdua d'HP1 α resulta doncs en una propagació de les marques heterocromatíniques que donen lloc a una hipercompactació de la cromatina, i que s'associa a un determinat patró de defectes mitòtics com són els defectes merotètics o sintètics. Mentre que HP1 β es troba vinculada funcionalment amb la metiltransferasa d'histones (HMT) Suv420h2, responsable de la trimetilació d'H4K20, i podria ser la isoforma més implicada en el reclutament d'aquesta a les regions d'HPC per la formació d'una fibra de cromatina compacta.

Conseqüentment, HP1 β es relaciona estretament amb la marca H4K20me3 a les regions d'HPC. HP1 β sembla també tenir un paper en la restricció de CTCF a posicions específiques tant a les regions d'HPC com a altres regions genòmiques. La pèrdua d'aquesta isoforma induïx descompactació de la cromatina i s'associa amb defectes mitòtics concrets incloent la formació de fus mitòtics multipolars. Finalment, HP1 γ sembla tenir un paper intermig de les altres isoformes, el que suggereix una funció més redundant. De manera que, aquest treball ofereix una visió de les funcions de les isoformes d'HP1 a les regions d'HPC i la seva implicació al manteniment de l'estabilitat genòmica.

Durant l'última dècada, les desacetilases d'histones (HDACs) de tipus III, conegudes com sirtuïnes, han emergit com a factors clau en el manteniment de la integritat genòmica, són proteïnes NAD⁺ cofactor dependents i d'aquesta manera poden actuar com a sensors d'estrés i participar de la comunicació entre l'ambient cel·lular i el genoma. Evidències prèvies del grup definien que SirT1 té un paper clau al manteniment de l'estructura de l'HPC, especialment sota condicions d'estrés. En aquestes condicions, es produeix un increment dels nivells de SirT1, aquest interacciona amb Suv39h1 i l'estabilitza evitant la poliubiquitinització mediada per MDM2 de Suv39h1, incrementant la seva vida mitjana i augmentant els nivells de proteïna. L'increment de la disponibilitat de Suv39h1 all nucli, s'ha associat amb un augment del recanvi i de la seva mobilitat a l'HPC, assegurant el manteniment d'H3K9me3 i d'HP1, i la protecció genòmica a les regions d'HPC. Ha estat descrit un antagonisme funcional entre SirT1 i PARP1 respecte el control d'H3K9me3 i d'HP1 a l'HPC, però encara no es coneixia el mecanisme d'acció ni les relacions entre els factors implicats. Els resultats de la segona part d'aquesta tesi han corroborat l'antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte H3K9me3 a les regions de l'HPC, i mostren que aquest antagonisme funcional és degut a una regulació per part d'aquestes dues proteïnes dels nivells de Suv39h1, l'HMT responsable de l'establiment d'H3K9me3 a les regions d'HPC. SirT1 produeix un increment dels nivells de Suv39h1 a través de la seva estabilització, mentre que PARP-1 té un efecte contrari compensatori de la regulació per part de SirT1. Per poder aprofundir en l'estudi d'aquesta relació i degut a que avui dia no existeix cap anticòs fiable de Suv39h1 que funcioni per estudiar la seva localització o el seu enriquiment a la cromatina, en aquest treball s'ha generat i caracteritzat una línia cel·lular de ratolí que té el gen Suv39h1 taggejat endògenament mitjançant la tècnica CRISPR/Cas9.

INTRODUCCIÓ

1. LA CROMATINA

1.1. Composició de la cromatina

L'ADN és la macromolècula primària que emmagatzema la informació genètica i la propaga de cèl·lula mare a filla, i a la descendència a través de la línia germinal. A les cèl·lules eucariotes, la doble hèlix d'ADN es troba empaquetada amb histones i altres proteïnes accessòries formant la cromatina. La unitat bàsica i repetitiva de la cromatina és el nucleosoma, que està constituït per: el nucleosoma central, que consta d'un tetràmer d'histones H3-H4 i dos dímers d'H2A-H2B, donant lloc a un octàmer d'histones, al qual s'hi embolcallen 147 pb d'ADN; pel DNA connector (10-80 parells de bases) que uneix el nucleosoma central amb el nucleosoma adjacent; i per la histona H1, que s'associa amb l'ADN connector (Figura I1) (Thomas & Kornberg, 1975; Arents et al, 1991; Luger et al, 1997; Kornberg & Lorch, 1999; Wu & Grunstein, 2000; Felsenfeld & Groudine, 2003; McGinty & Tan, 2014).

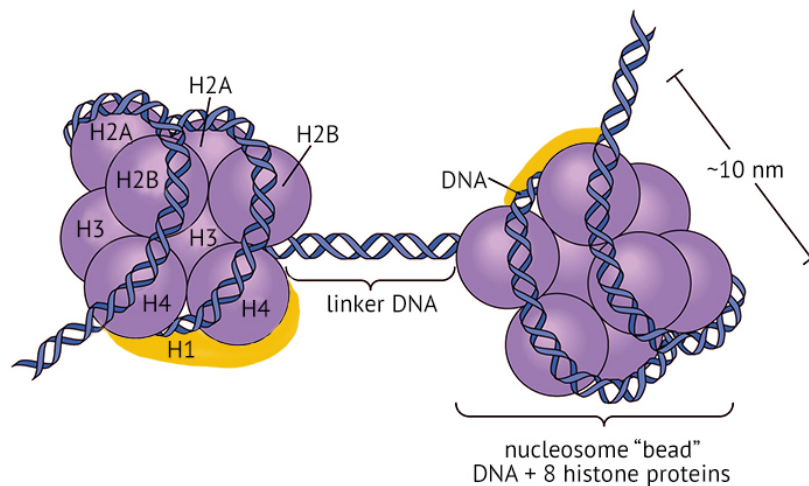


Figura I1. Estructura del nucleosoma. Representació de l'estructura del nucleosoma on s'hi observa el tetràmer d'histones d'H3-H4 i els dos dímers d'H2A-H2B embolcallats per la doble hèlix d'ADN que donen lloc al nucleosoma central, l'ADN connector entre nucleosomes i la histona H1.

Les histones són proteïnes molt bàsiques, característica que li confereix l'alta afinitat que presenta per l'ADN, són relativament petites (11-15kDa), i són de les proteïnes més conservades en eucariotes. L'octàmer d'histones del nucleosoma central presenta una conformació globular estructurada, la qual està formada per l'heterodimerització de les hèlixs dels dos dímers H2A-H2B i del tetràmer d'H3-H4, que permet les interaccions entre histones. D'aquesta conformació globular sobresurten les anomenades cues de les histones, que es troben desestructurades i estan format pels dominis N-terminal i C-terminal (15-38 residus rics en Arg i Lys).

Els residus d'aquestes cues d'histones, principalment de la N-terminal amb algunes excepcions, són susceptibles a un gran nombre de modificacions la qual cosa pot produir canvis en la compactació de la seva estructura i proporciona funcionalitat al nucleosoma. En menor mesura els residus del domini globular poden patir modificacions (Allfrey et al, 1964; Arents et al, 1991; Luger et al, 1997; Kornberg & Lorch, 1999; Strahl & Allis, 2000; Felsenfeld & Groudine, 2003).

La histona H1 presenta una estructura similar a les histones del nucleosoma central, amb una part globular estructurada i les cues desestructurades N-terminal i C-terminal. De la mateixa manera, aquestes cues poden patir modificacions que afectin a l'estructura del nucleosoma (Izzo & Schneider, 2016).

La longitud de l'ADN connector que es troba entre els diferents nucleosomes centrals varia entre espècies i teixits, en molts casos degut a l'atzar. Però a vegades, aquesta longitud és conseqüència de posicions preferides dels nucleosomes per permetre la unió d'elements reguladors (Straka & Horz, 1991; Lu, Wallrath & Elgin, 1995).

Centenars de milers de nucleosomes units mitjançant l'ADN connector formen el que es coneix com a nucleosomes en cadena o *beads-on-a-string*, descrit per primera vegada al 1973 gràcies a les observacions en microscopi electrònic d'alta resolució. És la forma més laxa i accessible de la cromatina, i es coneix també com a fibra d'11nm (Olins & Olins, 1973; Woodcock, 1973; Olins & Olins, 1974; Olins & Olins, 1976; Olins & Olins, 2003).

1.2. Dinàmica de la cromatina

La cromatina és dinàmica, la seva estructura i grau de compactació està finament regulada a través del cicle cel·lular i sota diferents estímuls per tal de preservar la integritat genòmica. Aquesta regulació comprèn mecanismes epigenètics que no produeixen canvis en la seqüència d'ADN, que són reversibles i que poden propagar-se al llarg de les divisions cel·lulars i a través de la línia germinal (Waddington, 1942; Holliday, 1994; Wu & Morris, 2001; Holliday, 2006; Yun et al, 2011).

Els principals mecanismes epigenètics de regulació consisteixen en: modificacions postraduccionals a les histones (PTM), la incorporació de variants d'histones al nucleosoma, la modificació de l'estructura dels nucleosomes pels remodeladors, el paper dels ARN no codificants (ncRNAs), el paper de proteïnes no històniques i la metilació de l'ADN en residus de citosina (Holliday, 1994; Holliday, 2006; Bannister & Kouzarides, 2011; Allis et al, 2015; Allis & Jenowein, 2016).

La desregulació d'aquests mecanismes pot conduir a l'aparició d'instabilitat genòmica, un factor clau en el desenvolupament de càncer, envelliment, malalties neurodegeneratives, malalties autoimmunes, malalties

Existeix una comunicació entre les diferents modificacions postraduccional de les histones. Aquesta pot tenir lloc dins d'una mateixa cua d'histona (*cis cross talk*) o bé entre diferents cues d'histones (*trans cross talk*). De manera que aquestes modificacions succeeixin seqüencialment o bé en combinació, establint un complex programa regulatori amb un sofisticat llenguatge, conegut com a codi d'histones (Figura 13). Els enzims que poden llegir aquestes modificacions anomenats *readers*, permeten una gran diversitat funcional a partir del reconeixement de la combinació dels poc tipus de marques històniques per tal d'establir aquest complex sistema de regulació (Strahl & Allis, 2000; Kouzarides, 2007; Bannister & Kouzarides, 2011; Zhang et al, 2015).

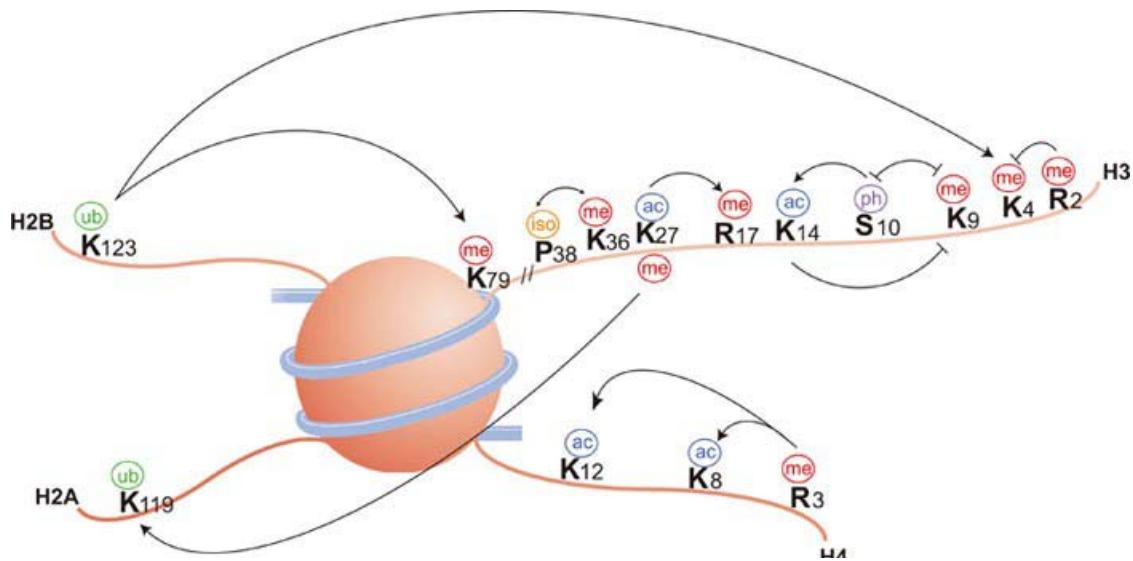


Figura 13. Cross talk entre les modificacions postraduccional de les histones. Interaccions positives i negatives entre les modificacions postraduccional de les histones. Aquest *cross talk* pot tenir lloc dins de la mateixa cua d'histona (*cis cross talk*) o entre diferents cues d'histones (*trans cross talk*). Les puntes de fletxa i les puntes planes indiquen interaccions positives i negatives, respectivament (Bannister & Kouzarides, 2011).

Aquestes modificacions de les histones poden influenciar directament en l'estructura de la cromatina, tal com ha estat descrit per l'acetilació. De forma que, la presència d'aquesta modificació, disminueix la càrrega positiva de les histones i això afebleix la interacció amb l'ADN que es troba carregat negativament. En conseqüència, la cromatina serà més accessible.

D'altra banda, les modificacions postraduccional també poden regular indirectament l'estructura de la cromatina. Aquestes actuen com una plataforma de senyal per reclutar factors reguladors (*readers*) a la cromatina, i aquests efectors són els que en última instància determinen el resultat funcional de les modificacions (Jenowein & Allis, 2001; Yun et al, 2011).

Les modificacions postraduccionals de les histones no només juguen un paper important en la regulació de l'arquitectura de la cromatina si no també en la regulació de la transcripció gènica, en la replicació de l'ADN, en reparació de l'ADN i en l'*splicing* alternatiu (Portela & Esteller, 2010; Bannister & Kouzarides, 2011).

1.2.1.1. Acetilació

Les modificacions postraduccionals de les histones més estudiades són l'acetilació, la metilació i la fosforilació. L'acetilació d'histones consisteix en la transferència d'un grup acetil del cofactor Acetil-CoA al grup ϵ -amino d'un residu de lisina (Lys) (Allfrey et al, 1964; Vidali et al, 1968).

De manera general, l'hiperacetilació d'histones es relaciona amb una forma de la cromatina accessible (cromatina activa) i en conseqüència, amb una activació de la transcripció gènica. A les regions promotores dels gens actius transcripcionalment hi ha un enriquiment dels nivells d'acetilació en H3K9, H3K14 i també en H4K5, H4K8, H4K12 i H4K16. Mentre que l'hipoacetilació d'histones es relaciona amb una forma compactada i transcripcionalment inactiva (Allfrey, Faulkner & Mirsky, 1964; Pokholok et al, 2005; Kouzarides, 2007; Bhaumik et al, 2007).

D'una banda, l'acetilació d'histones neutralitza la càrrega positiva de les Lys diana, atenuant així la interacció entre les histones i l'ADN. Com a conseqüència, la cromatina queda més descondensada i accessible (Eberharter & Becker, 2002; Görisch et al, 2005; Shogren-Knaak et al, 2006). D'altra banda, addicionalment al seu efecte estructural sobre la cromatina, l'acetilació d'histones actua com a senyal per reclutar factors reguladors o *readers*. Aquests *readers* que reconeixen acetilació tenen dominis bromo, que llegeixen específicament l'acetilació, i menys comunament dominis PHD que tot i reconèixer també altres marques històniques poden reconèixer determinades acetilacions. La família de proteïnes que contenen dominis bromo estan implicades en múltiples funcions, com en la remodelació de la cromatina i en el reclutament de factors necessaris per la transcripció (Taula 11). Per exemple, el complex remodelador de la cromatina SWI/SNF conté un domini bromo a la subunitat Swi2/Snf2, que s'uneix específicament a H3K9Ac, H3K14Ac i també a H4K5Ac, H4K8Ac, H4K12Ac i H4K16Ac de les regions promotores per permetre la formació del complex de pre-iniciació per tal que tingui lloc la transcripció. Altre exemple seria el domini bromo de la subunitat Spt7 de l'acetiltransferasa SAGA que només reconeix H3K9Ac (Haynes et al, 1992; Dhalluin et al, 1999; Sterner et al, 1999; Sterner & Berger, 2000; Hassan, Neely & Workman, 2001; Hassan et al, 2002; Hassan et al, 2007; Kouzarides et al, 2007; Yun et al, 2011; Allis et al, 2015; Marmortein & Zhou, 2020).

Histona	Posició	Enzims modificadors	Funcions associades
H2A	Lys 5	Tip60, p300/CBP	Activació de la transcripció
H2B	Lys 5	p300, ATF2	Activació de la transcripció
	Lys12	p300/CBP, ATF2	Activació de la transcripció
	Lys15	p300/CBP, ATF2	Activació de la transcripció
	Lys20	p300	Activació de la transcripció
H3	Lys9	Gcn5, SRC-1	Activació de la transcripció
		ND	Deposició d'histones
	Lys 14	ND	Deposició d'histones
		SRC-1	Activació de la transcripció
		Elp3	Elongació
		Esa1, Tip60	Activació de la transcripció i reparació d'ADN
		TAF1	Transcripció RNA polimerasa II
		Gcn5	Activació de la transcripció i reparació d'ADN
	Lys 18	p300/CBP	Reparació d'ADN i activació de la transcripció
		ND	Deposició d'histones
	Lys 23	Gcn5	Activació de la transcripció i reparació d'ADN
		p300/CBP	Activació de la transcripció
	Lys 27	Gcn5	Activació de la transcripció
	Lys 36	Hat1	Deposició d'histones
H4	Lys 5	ATF2	Activació transcripció
		P300	Activació transcripció
		Gcn5, PCAF	Activació transcripció
	Lys 8	Elp3	Elongació
		p300	Activació transcripció
		Hat1	Deposició d'histones i silenciament telomèric
		Esa1, Tip60	Activació de la transcripció i reparació d'ADN
	Lys 12	Hpa2	ND
		Gnc15	Activació de la transcripció
		MOF	Activació de la transcripció
	Lys 16	ATF2	Activació de la transcripció
		Sas2	Eucromatina

Taula I1. Principals acetilacions d'histones en mamífer. Taula que mostra les histones i la posició de les principals acetilacions d'histones, els enzims modificadors i les funcions associades. ND, no determinat.

1.2.1.2. Metilació

La metilació de les histones es produeix en tots els seus residus bàsics: lisina (Lys), arginina (Arg) i histidina (His), tot i que aquest últim no ha estat gaire caracteritzat. Aquest procés consisteix en la transferència d'un grup metil de la molècula donadora S-adenosil-L-metionina (SAM) al grup ϵ -amino d'un residu de Lys o al grup guanidil d'un residu d'Arg. Els residus de lisina poden ser monometilats (me1), dimetilats (me2) o trimetilats (me3) al seu grup ϵ -amino; i els residus d'arginina poden ser monometilats (me1) o dimetilats (me2), i al seu torn la dimetilació pot ser simètrica (me2s) o asimètrica (me2a) al seu grup guanidil. En contrast amb l'acetilació, la metilació d'histones és una marca més

estable químicament (Ambler & Rees, 1959; Murray & Luck, 1962; Murray, 1964; Kim & Paik, 1965; Hempel et al, 1968; Borun et al, 1972; Paik et al, 2007; Greer & Shi, 2012).

Les posicions de metilació d'histones en els residus de lisina més estudiades són H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 i H4K20, i en els residus d'arginina H3R2, H3R8, H3R17, H3R26 i H4R3 (Zhang & Reinberg, 2001; Fang et al, 2002; Di Lorenzo & Bedford, 2011; Greer & Shi, 2012). És important destacar que les marques de metilació d'histones no apareixen aïllades, si no que existeix una relació entre les diferents marques ja sigui sinèrgica o antagònica. De manera que la metilació pot succeir en múltiples llocs diferents en les histones on la metilació d'un pot requerir de la metilació d'un altre, però també algunes marques històniques són mútuament exclusives. Per exemple, la trimetilació d'H3K4 inhibeix la dimetilació d'H3R2 i de la mateixa manera la dimetilació asimètrica d'H3R2 inhibeix la metilació d'H3K4 (Guccione et al, 2007; Kirmizis et al, 2007; Greer & Shi, 2012).

A diferència de l'acetilació i la fosforilació que modifiquen la càrrega dels residus diana, la metilació no afecta a la càrrega elèctrica de les cadenes laterals dels aminoàcids. Per tant, les funcions de la metilació es consideren principalment exercides per les molècules efectores que reconeixen específicament el lloc metilat (Martin & Zhang, 2005; Taverna et al, 2007; Hyun et al, 2017).

La metilació d'histones és més complicada funcionalment que altres modificacions postraduccionalment principalment per dos motius. El primer motiu, es perquè es pot donar en tres formes diferents: mono-, di- o trimetil per lisines i mono- o di- (simètrica o asimètrica) per arginines. I el segon motiu, és pel fet que les metilacions no apareixen aïllades si no que existeix una gran xarxa de comunicacions sinèrgiques o antagòniques entre elles. Aquesta diversitat de combinacions de metilacions proporciona una capacitat regulatòria excepcional, ja que en funció de les diferents modificacions que es donin es reclutarà una combinació específica de *readers*, que a la seva vegada reclutaran altres factors i determinaran la funcionalitat final. Així, una mateixa modificació pot promoure l'activació de la transcripció, però també la repressió en funció de l'estat de la metilació i del context (**Taula I2**) (Vakoc et al, 2006; Kouzarides, 2007; Taverna et al, 2007; Greer & Shi, 2012; Black et al, 2012; Hyun et al, 2017). Per exemple, H3K4me2 i H3K4me3 generalment s'associen amb activació de la transcripció, però també es poden relacionar amb repressió de la transcripció quan se'ls uneix l'efector inhibidor de la proteïna de creixement 2 (ING2) pel domini PHD (Shi et al, 2006; Bernstein et al, 2006; Greer & Shi, 2012).

Els *readers* de la metilació tenen dominis de reconeixement i unió a grups metil, incloent els dominis PHD, chromo, tudor, barrel, MBT, PWWP, zn-CW, BAH, ADD, HEAT, SAWADEE, repeticions d'anquirina i repeticions WD40. Aquests dominis tenen la capacitat de distingir les metilacions diana en funció de l'estat de la metilació i de l'entorn, i es troben en proteïnes que estan implicades en múltiples funcions, com en el control de la transcripció, en la regulació del cicle cel·lular, en

reparació de l'ADN i en *splicing* alternatiu (Yun et al, 2011; Greer & Shi, 2012; Musselman et al, 2014; Hyun et al, 2017).

De manera general però, les metilacions en H3K4, H3K36 i H3K79 es consideren marques de transcripció activa; mentre que les metilacions en H1K26, H3K9, H3K27 i H4K20 s'associen amb cromatina silenciada (Martin & Zhang, 2005; Vakoc et al, 2006; Kouzarides, 2007; Black et al, 2012; Hyun et al, 2017).

Histona	Posició	Enzims modificadors	Funcions associades
H1	Lys 26	Ezh2	Repressió de la transcripció
H2A	Arg 3	PRMT1/6, PRMT5/7	Activació de la transcripció, repressió de la transcripció
H3	Arg 2	PMRT5, PMRT6	Repressió de la transcripció
	Arg 8	PMRT5, PMRT2/6	Activació de la transcripció, repressió de la transcripció
	Lys 4	Set7/9	Activació de la transcripció
		MLL	Activació de la transcripció
	Lys 9	Suv39h1	Repressió de la transcripció
		G9a	Repressió de la transcripció i imprinting genòmic
		SETDB1	Repressió de la transcripció
	Lys 27	Ezh2	Repressió de la transcripció i inactivació del crom X
		G9a	Repressió de la transcripció
Lys 36	Set2	Elongació	
Lys 79	Dot1	Elongació i resposta i control de checkpoints	
H4	Arg 3	PRMT1/6	Activació de la transcripció
		PRMT5/7	Repressió de la transcripció
	Lys 20	PR-Set7	Repressió de la transcripció
		Suv420	Formació d'heterocromatina
	Lys 59	ND	Repressió de la transcripció

Taula I2. Principals metilacions d'histones en mamífer. Taula que mostra les histones i la posició de les principals metilacions d'histones, els enzims modificadors i les funcions associades. ND, no determinat

1.2.1.3. Fosforilació

La fosforilació d'histones es pot donar en residus de serina (Ser), treonina (Thr) i tirosina (Tyr). Aquest procés consisteix en la transferència d'un grup fosfat de la molècula donadora ATP al grup hidroxil del residu diana. La fosforilació d'histones, augmenta la càrrega negativa d'aquestes afeblint així la interacció entre DNA-histones, la qual cosa hauria d'afavorir la descondensació de la cromatina, tot i que no està clarament demostrat (Roth & Allis, 1992; Strahl & Allis, 2000; Rossetto et al, 2012).

A més a més, la fosforilació d'histones actua com a senyal per reclutar *readers* que, a última instància són els que determinaran el resultat funcional de la modificació. Els *readers* de la fosforilació tenen dominis de reconeixement de grups fosfat del tipus 14-3-3 o BRCT, aquestes proteïnes estan relacionades amb processos de reparació de l'ADN, compactació de la cromatina al llarg del cicle

cel·lular i regulació de la transcripció (Wei et al, 1998; Yun et al, 2011; Rossetto et al, 2012).

En resposta a dany a l'ADN, les quinases ATM, ATR i DNA-PK produeixen la fosforilació de la Ser 139 de la variant d'histona H2A.X (γ -H2A.X) en cèl·lules de mamífer i de la equivalent en llevats, la Ser 129. Aquesta fosforilació actua com a plataforma de reconeixement de factors implicats en la senyalització del trencament de doble cadena de l'ADN i en l'activació de les vies de reparació NHEJ (*non-homologous end joining*), HR (*homologous recombination*) i la reparació de l'ADN acoblada a replicació per permetre la reparació del dany (Rogakou et al, 1998; Downs et al, 2000; Shroff et al, 2004; Foster & Downs, 2005; Chowdhury et al, 2008; Douglas et al, 2010; Macurek et al, 2010).

Altre exemple rellevant seria el següent, al llarg de les fases del cicle cel·lular G₂/M les Aurora quinases fosforilen la Thr 3, Thr 11, Ser 10 i Ser 28 de la histona H3, essent la fosforilació de la Ser 10 la més caracteritzada. Aquestes fosforilacions regulen els factors implicats en la condensació de la cromatina per formar els cromosomes i en la segregació cromosòmica associada als processos de mitosis i meiosis, i es consideren marques d'aquests esdeveniments (Gurley et al, 1978; Hendzel et al, 1997; Wei et al, 1998; Goto et al, 1999; Wei et al, 1999; Nowak & Corces, 2004; Macdonald et al, 2005; Wilkins et al, 2014).

Adicionalment, altres fosforilacions en la Thr 11 de la histona H3, en la Ser 36 de la histona H2B i en la Ser 1 de la histona H4 estan relacionades amb l'expressió de gens sota condicions d'estrès (Nowak & Corces, 2004; Macdonald et al, 2005; Metzger et al, 2008; Bungard et al, 2010; Govin et al, 2010; Strahl & Allis, 2010).

1.2.2. Variants d'histones

Les variants d'histones participen en la dinàmica de la cromatina, cooperant amb els altres mecanismes epigenètics i produint canvis ràpids a la seva estructura. A les cèl·lules eucariotes, la major part de la cromatina està formada per les anomenades histones canòniques. Les histones canòniques estan codificades per múltiples còpies de gens i, la majoria d'aquests gens s'organitzen en clústers al llarg del genoma. La síntesi i deposició de les histones canòniques es troba acoblada al procés de replicació de l'ADN que té lloc durant la fase S, així les histones acabades de sintetitzar s'uneixen a una sèrie de xaperones al citosol que ajuden a les histones a plegar-se correctament i prevenen interaccions inespecífiques, i quan aquests complexos entren al nucli, CAF1 (*chromatin assembly factor 1*) dirigeix la deposició de les histones darrera de la forqueta de replicació de l'ADN, per permetre el correcte assemblatge de la cromatina (Buschbeck & Hake, 2017; Talbert & Henikoff, 2017).

No obstant, l'evolució ha portat al desenvolupament de variants d'histones per permetre una regulació més afinada de múltiples processos cel·lulars tals com

l'expressió gènica, la reparació de l'ADN, la segregació cromosòmica, la condensació dels cromosomes sexuals i l'empaquetatge de la cromatina de l'esperma. Aquestes variants d'histones són isoformes de les histones canòniques que presenten variacions en la seqüència i que, tenen localitzacions restringides i ben definides a la cromatina. Estan codificades només per una o dues còpies del gen i, al contrari de les canòniques, no es localitzen en clústers. En contrast amb les histones canòniques, la síntesi i incorporació de les variants d'histones succeeix al llarg del cicle cel·lular i és independent de la síntesi de l'ADN. De manera que, les variants d'histones es sintetitzen i s'uneixen a xaperones específiques al citosol que ajuden a que es pleguin correctament i les estableixen, llavors aquestes variants d'histones ja estables s'uneixen a la histona canònica parella (una variant d'H2A s'uniria a H2B mentre que una variant d'H3 s'uniria a H4), i s'importen al nucli on els remodeladors de la cromatina dependents d'ATP reconeixen les variants d'histones complexades i permeten o bé l'intercanvi dels dímers que contenen la variant d'histona o bé la deposició del nucleosoma amb la variant d'histona incorporada en les posicions determinades. L'intercanvi d'histones canòniques per variants d'histones produeix canvis en l'estructura del nucleosoma, i com a conseqüència, el grau de compactació de la cromatina pot variar; i produeix el reclutament de *readers* específics de les variants d'histones i de les modificacions postraduccionals d'aquestes, la qual cosa acabarà determinant la funcionalitat final de les variants (Talbert & Henikoff, 2010; Biterge & Schneider, 2014; Buschbeck & Hake, 2017; Talbert & Henikoff, 2017).

La majoria de les variants d'histones es troben en cèl·lules somàtiques tot i que, algunes d'elles s'expressen exclusivament a la línia germinal masculina. La primera variant d'histona va ser identificada l'any 1969 mitjançant mètodes bioquímics de fraccionament de proteïnes. Avui dia en humà han estat descrites vuit variants d'H2A (H2A.X, H2A.Z.1, H2A.Z.2.1, H2A.Z.2.2, macroH2A.1.1, macroH2A.1.2 i macroH2A.2 en cèl·lules somàtiques, i H2A *Barr body deficient* (H2A.bdd) específica a testicles), dos variants d'H2B (H2B *type WT* (H2BFWT) i *testis-specific* H2B (TSH2B) específiques a testicles) i sis variants d'H3 (H3.3, H3 *like centromeric protein A* (CENP-A), H3.Y i H3.X en cèl·lules somàtiques i, H3.1t i H3.5 específica a testicles). Encara no han estat descrites variants d'H4 (Figura I4). Les variants d'histones es troben força conservades als eucariotes superiors, cosa que reflexa funcionals ancestrals comunes, però també hi ha variants que s'han especialitzat i són específiques de llinatge (Pusarla & Bhargava, 2005; Buschbeck & Hake, 2017).

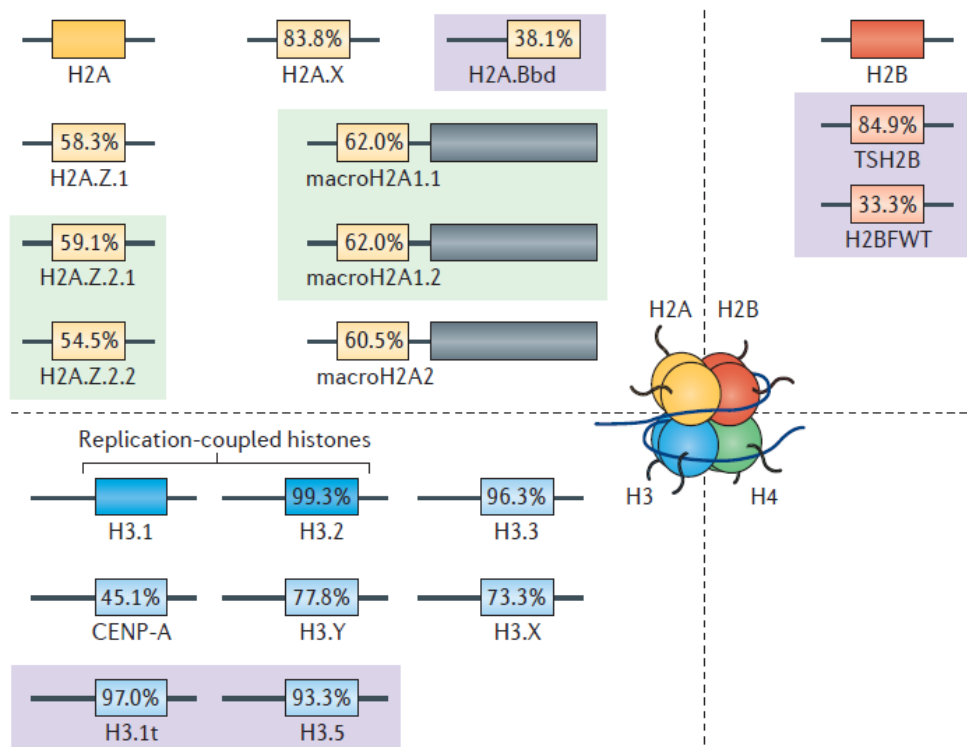


Figura 14. Variants d'histones del nucleosoma central en humà. Es mostren les histones canòniques H2A (groc), H2B (taronja), H3 (blau) i H4 (verd). Les corresponents variants es mostren en groc pàl·lid, taronja pàl·lid i blau pàl·lid, respectivament. No han estat descrites variants de la histona H4. Els rectangles representen les regions centrals i les línies les cues flexibles de les histones. Es mostra el percentatge d'identitat de seqüència de les variants relatives a les histones canòniques. Les variants d'histona específiques de testicles es ressalten amb requadres de color porpra clar i les isoformes que provenen d'*splicing* alternatiu amb requadres de color verd clar (Buschbeck & Hake, 2017).

De manera que, aquestes variants d'histones tenen els seus propis patrons d'expressió temporals i de distribució al llarg del genoma, en funció dels processos cel·lulars específics en les que estan implicades. Com a exemple, la incorporació de la variant d'histona CENP-A és essencial per a la formació dels centròmers dels cromosomes, per l'ensamblatge del complex cinetocòric i per la segregació cromosòmica. La deleció dirigida del gen que codifica per aquesta variant produeix defectes mitòtics i letalitat embrionària en ratolins, i toxicitat en cèl·lules humanes (Howman et al, 2000; Buschbeck & Hake, 2017; Talbert & Henikoff, 2017).

La variant d'histona H3.3 té una seqüència molt similar a les formes canòniques H3.1 i H3.2, diferint només en quatre aminoàcids, tot i aquesta alta similitud aquesta variant té funcions específiques. La variant H3.3 es troba localitzada a cromatina transcripcionalment activa, hi ha enriquiment principalment a les zones dels gens, promotors, *enhancers* i llocs de terminació de la transcripció. També ha estat descrit que té un paper important en l'establiment d'heterocromatina durant la primera fase del desenvolupament embrionari en ratolins, i que la deleció del gen que codifica per aquesta variant produeix letalitat

embrionària (Mito et al, 2005; Santenard et al, 2010; Buschbeck & Hake, 2017; Talbert & Henikoff, 2017).

En el cas de macroH2A, se li atribueix un paper en la repressió de la transcripció ja que s'ha vist un enriquiment d'aquesta variant d'histona en el cromosoma X inactiu (Xi) i que s'associa amb els al·lels inactius dels gens imprintats, tot i que també té un paper actiu a alguns gens. D'altra banda, estudis posteriors indiquen que també hi ha un enriquiment de macroH2A en gens induïbles i en gens bivalents, que són gens silenciats preparats per l'activació i que es caracteritzen per tenir marques potencialment conflictives com seria H3K27me3/H3K4me o H3K9me3/H3K4me (Constanci & Pehrson, 1998; Chakravarthy & Luger, 2006; Choo et al, 2006; Biterge & Schneider, 2014).

1.2.2.1. H2A.Z

La variant d'histona H2A.Z va ser identificada l'any 1980. Aquesta variant d'histona presenta una homologia de seqüència respecte a la forma canònica H2A d'un 60% aproximadament, diferint principalment a la cua C-terminal. S'estima que els nivells de proteïna d'H2A.Z comprenen entre el 5-10% del total d'histona H2A (West & Bonner, 1980; Pusalra & Bhargava, 2005; Corujo & Buschbeck, 2018).

H2A.Z és una de les variants més conservades en eucariotes, de fet comparteix major similitud de seqüència entre diferents espècies que respecte l'H2A canònica del mateix organisme cosa que suggereix que juga un paper important. En vertebrats, hi ha dos gens paral·lels que codifiquen per les isoformes H2A.Z.1 (*H2afz*) i H2A.Z.2 (*H2afv*) que s'expressen sota promotors independents a diferent cromosoma. H2A.Z.1 i H2A.Z.2 difereixen només en tres aminoàcids que es localitzen separats i estructuralment són molt similars. Addicionalment, en primats un d'aquests gens (*H2afv*) genera dues isoformes per splicing alternatiu: H2A.Z.2.1 i H2A.Z.2.2, aquesta última té escurçada la cua C-terminal (**Figura I5**) (Henikoff et al, 2001; Eirín-López, 2009; Matsuda et al, 2010; Talbert & Henikoff, 2016; Buschbeck & Hake, 2017; Giaimo et al, 2019; Cheema et al, 2020).



Figura I5. Representació esquemàtica de les isoformes d'H2A.Z en humà. Es mostra l'alineament de les seqüències aminoacídiques d'H2A.Z.1, d'H2A.Z.2.1 i d'H2A.Z.2. Es destaquen en

gris els residus no conservats entre H2A.Z.1 i H2A.Z.2.1, mentre que els residus ressaltats en groc són els no conservats entre H2A.Z.2.1 i H2A.Z.2.2. Les PTMs identificades s'indiquen amb boles de colors (Giaimo et al, 2019).

Degut a l'alta similitud de seqüència i d'estructura de les isoformes H2A.Z.1 i H2A.Z.2 no hi ha diferències en l'antigenicitat entre aquestes dues proteïnes, i actualment no existeix cap anticòs comercial capaç de distingir-les. De manera que avui dia, gran part del coneixement d'H2A.Z ve donat per una combinació de les funcions d'ambdues isoformes. Tot i així, cada vegada s'està posant més èmfasi en l'estudi de les funcions específiques de cadascuna de les isoformes, estudis recents a partir de la deleció individual dels gens que codifiquen per les dues variants han demostrat una diferent implicació d'H2A.Z.1 i H2A.Z.2. No només això, si no que s'ha observat que existeixen desregulacions específiques d'aquestes isoformes en diferents malalties la qual cosa suggereix una diferent funcionalitat d'aquestes proteïnes (Dryhurst et al, 2009; Eirín-López, 2009; Matsuda et al, 2010; Duun et al, 2017; Cheema et al, 2020).

H2A.Z es requereix per la formació de l'heterocromatina i manteniment del centròmer durant les primeres etapes del desenvolupament en diferents organismes incloent ratolins, *Drosophila* i *Tetrahymena* (Faast et al, 2001; Pusarla & Bhargava, 2005; Buschbeck & Hake, 2017). S'ha descrit que durant les etapes de diferenciació embrionària H2A.Z s'exclou del nuclèol i apareix a les regions pericèntriques, proporcionant una possible marca per la distinció de l'heterocromatina constitutiva i facultativa (Rangasamy et al, 2003; Pusarla & Bhargava, 2005). Altre estudi ha descrit que els embrions de ratolins deficients d'H2A.Z moren a l'etapa de pre-implantació del blastòcit, etapa que correspon al primer punt d'expressió d'H2A.Z (Faast et al, 2001; Buschbeck & Hake, 2017). En ratolins H2AZ.1^{-/-} que presenten letalitat embrionària (Faast et al, 2001), H2A.Z.2 és aparentment incapaç de compensar la pèrdua de l'altre isoforma, suggerint un rol únic d'H2A.Z.1 durant les primeres etapes de desenvolupament embrionari (Eirín-López, 2009). També s'ha vist que H2A.Z està involucrat en la pluripotència de les cèl·lules mare embrionàries (ESC) i en la reprogramació de cèl·lules somàtiques durant el desenvolupament embrionari en ratolí (Wang et al, 2015).

H2A.Z té un paper important a la formació de l'heterocromatina i a la formació del centròmer no només durant les primeres etapes del desenvolupament, si no que també en línies cel·lulars ja establertes. A *Drosophila*, H2A.Z es troba localitzada a l'heterocromatina pericentromèrica, els seus mutants tenen reduïts els nivells de metilació d'H3K9 i de la proteïna de l'heterocromatina 1α (HP1α) a aquestes regions, el qual suggereix que H2A.Z es requereix per un correcte assemblatge de l'heterocromatina. S'ha postulat que H2A.Z probablement actuï controlant la localització d'HP1α a aquestes regions (Pusarla & Bhargava, 2005; Matsuda et al, 2010; Talbert & Henikoff, 2016). En suport a això la deleció d'H2A.Z.1 redueix la unió d'HP1α a l'ADN tant als braços cromosòmics com a les regions pericèntriques a línies cel·lulars de mamífer. Pel fet de ser una histona

important en la formació de l'heterocromatina pericentromèrica, centromèrica i dels braços cromosòmics, H2A.Z té un paper essencial en la formació de l'estructura del centròmer (Meneghini et al, 2003; Greaves et al, 2007). Un dels majors defectes resultants de la deleció d'H2A.Z.1 és la inestabilitat genòmica d'aquestes regions d'heterocromatina i com a conseqüència, la formació de ponts cromosòmics entre les cromàtides germanes mentre es separen cap al fus mitòtic oposat portant a defectes en la segregació cromosòmica que té lloc durant la mitosi (Rangasamy et al, 2004; Greaves et al, 2007; Buschbeck & Hake, 2017).

Els genomes eucariòtics s'organitzen en dos estats, l'eucromatina i l'heterocromatina, les regions flanquejants mantenen aquestes regions separades evitant la propagació de l'heterocromatina per preservar l'eucromatina adjacent. Ha estat descrit que H2A.Z (HTZ1 en llevat) es troba enriquida a aquestes regions d'eucromatina i que actua sinèrgicament amb les regions flanquejants per prevenir la propagació ectòpica de l'heterocromatina en *Saccharomyces*. De manera que, s'ha vist que es produeix la propagació ectòpica dels patrons de modificació d'histones associades a l'heterocromatina en cèl·lules que no tenen HTZ1 (Meneghini et al, 2003; Greaves et al, 2007). Un estudi molt recent descriu que, H2A.Z regula el desempaquetament dels nucleosomes i la unió de CTCF (*CCCTC-binding factor*), un factor de transcripció molt important a les regions flanquejants, a aquestes regions en ESC de ratolí. Els resultats d'aquest estudi mostren que H2A.Z està enriquit als nucleosomes desempaquetats en comparació amb els nucleosomes canònics, i que podria tenir un paper en la regulació gènica i en la regulació de la unió de CTCF mitjançant la modulació dels estats de desenrotllament dels nucleosomes (Wen et al, 2020).

També ha estat descrit que H2A.Z té un paper a la reparació del dany a l'ADN. Quan es produeixen DSBs (*double-strand breaks*) a l'ADN, s'activa la maquinària de reparació del dany. En cèl·lules de mamífer, aquesta reparació pot tenir lloc a través de dues vies: la via de recombinació homòloga o la via NHEJ (*non-homologous end joining*). H2A.Z controla passos crucials tant en recombinació homòloga com en NHEJ (Xu et al, 2012; Buschbeck & Henikoff, 2017). Estudis recents demostren que quan es produeix dany a l'ADN es produeix l'intercanvi d'H2A per H2A.Z.2, i que és aquesta isoforma la que està involucrada a la reparació de l'ADN en cèl·lules humanes (Nishibuki et al, 2014; Fakuto et al, 2018; Giaimo et al, 2019).

Adicionalment, H2A.Z també juga un paper a la consolidació de la memòria i en el desenvolupament del cervell (Zovkic et al, 2014; Yang et al, 2016). En resposta a activitat neuronal, es produeix la transcripció del gen Arc implicat en la plasticitat sinàptica i essencial en l'emmagatzematge de la memòria. Estudis recents descriuen que la deleció d'H2A.Z.2, però no d'H2A.Z.1 deteriora la transcripció d'aquest gen i en conseqüència, la capacitat de memorització (Duun et al, 2017).

H2A.Z també té un rol important tant a l'activació com a la repressió gènica en *Sacharomyces*, en ratolí i en humans. H2A.Z està enriquida a les regions NDR

(*nucleosome-depleted regions*) dels llocs d'iniciació de la transcripció (TSS) actius i recluta la maquinària transcripcional (Nekrasov et al, 2012; Biterge & Schneider, 2014), igualment està enriquida a *enhancers* i promotors gènics (Matsuda et al, 2010). D'altra banda, també s'ha relacionat H2A.Z amb el silenciament gènic (Talbert & Henikoff, 2010).

1.3. Enzims implicats en les modificacions postraduccional

Els enzims implicats a la deposició de les modificacions postraduccional són coneguts com a *writers*. De la mateixa manera, els enzims implicats a l'eliminació d'aquestes marques s'anomenen *erasers*. Aquests enzims formen part de complexes amb varies subunitats i catalitzen la incorporació o eliminació de modificacions específiques de les histones i també de proteïnes no històniques. Entre els *writers* es troben les acetiltransferases d'histones (HATs), les metiltransferases d'histones (HMTs) i les quinases. En el grup d'enzims *erasers* s'inclouen les desacetilases d'histones (HDACs), les desmetilases d'histones (HDMs) i les fosfatases, entre d'altres. Les modificacions postraduccional són el producte del balanç entre aquests enzims d'activitats antagòniques. Els enzims que poden llegir o distingir les modificacions postraduccional són coneguts com a *readers*, tenen dominis de reconeixement mitjançant els quals són reclutats a la cromatina de forma específica per dur a terme la seva funció. Els dominis de reconeixement més rellevants dels *readers* són els dominis Bromo, PHD (*Plant homeodomain*), Chromo (*Chromosome organization modifier*) i Tudor (Figura I6) (Kouzarides et al, 2007; Bannister & Kouzarides, 2011; Allis et al, 2015; Gillette et al, 2015; Hyun et al, 2017).

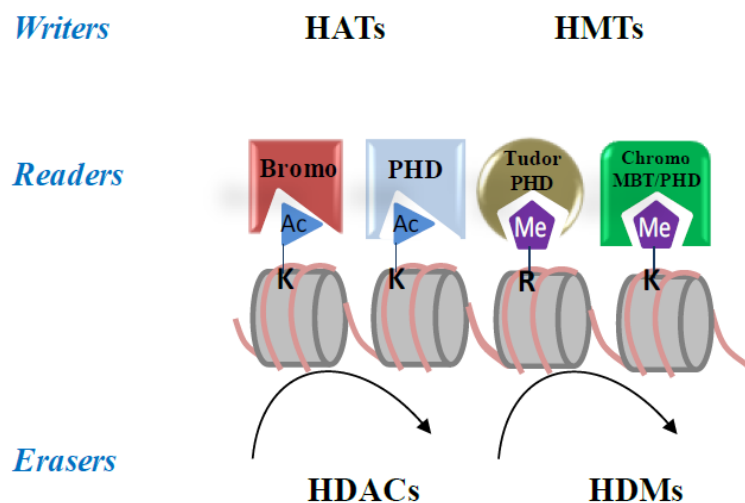


Figura I6. Enzims modificadors d'histones i dominis de reconeixement. Les modificacions postraduccional de les histones són dutes a terme pels writers i eliminades pels erasers. Els readers contenen dominis de reconeixement de les PTM de les histones a través dels quals

s'uneixen al substrat específic i duen a terme la seva funció. Es mostren alguns dels enzims modificadors d'histones i dels dominis de reconeixement importants (Adaptat d'Allis et al, 2015).

Els dominis Bromo són mòduls d'uns 110 aminoàcids presents a moltes proteïnes associades a la cromatina i són els únics que selectivament reconeixen lisines acetilades, tot i que ha estat descrit que els dominis PHD també reconeixen algunes acetilacions. Les HATs i els remodeladors de la cromatina contenen sovint dominis Bromo (Dhalluin et al, 1999; Kouzarides et al, 2007; Zhang et al, 2010; Bannister & Kouzarides, 2011).

Els dits PHD són dominis d'uns 50-80 aminoàcids i es troben presents a més de 100 proteïnes diferents. Aquests motius poden reconèixer lisines acetilades, i lisines i arginines metilades. La família PHD es pot dividir en diferents subgrups, els més rellevants són el grup capaç d'unir-se a H3K4me3 i el grup capaç d'unir-se a H3 no modificada. Aquests dominis es troben en HATs, HMTs, en factors de transcripció i en els remodeladors de la cromatina (Musselman & Kutateladze, 2009).

Els dominis Chromo són regions peptídiques conservades d'uns 50 aminoàcids, que a través d'un solc format per tres aminoàcids aromàtics reconeixen lisines metilades. Aquests dominis Chromo poden reconèixer també seqüències d'ADN i ARN. Algunes HMTs, les proteïnes de la família Polycomb i de la família HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) tenen aquest domini de reconeixement (Akhtar et al, 2000; Bouazone, 2002; Greer & Shi, 2012).

Els dominis Tudor estan formats per uns 50 aminoàcids que reconeixen selectivament arginines metilades. Hi ha quatre subgrups de dominis Tudor però el més representatiu és el format per la família de demetilases d'histones JMJD (Selenko et al, 2001; Jin et al, 2009).

1.3.1. Acetiltransferases d'histones (HATs)

Les HATs promouen l'obertura de la cromatina fent-la més accessible a la maquinària transcripcional i estan implicades per tant, en l'activació de l'expressió gènica. Les HATs es classifiquen en cinc famílies en funció de criteris d'homologia de seqüència: la família GNAT (*Gcn5-related N-acetyltransferase*), la família MYST (anomenada així pels seus membres fundadors: MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 i Tip60), la família p300/CBP (*CREB-binding protein*), la família de cofactors de receptors nuclears i la família de factors de transcripció basals (**Taula 13**) (Sternner & Berger, 2000; Roth et al, 2001; Doyon & Côté, 2004; Nagy & Tora, 2007).

HAT group	HAT (and complexes associated with it)	Histones acetylated by recombinant HAT	Histones acetylated by HAT complex	Interactions with other HATs
GNAT	Gcn5 (SAGA, ADA, A2)	H3 ≫ H4	H3, H2B	p300; CBP
	PCAF (PCAF)	H3 ≫ H4	H3, H4	
	Hat1 (HatB)	H4 ≫ H2A	H4, H2A ^a	
	Elp3 (elongator)	H2A, H2B, H3, H4		
	Hpa2	H3 > H4		
MYST	Esa1 (NuA4)	H4 ≫ H3, H2A	H2A, H4	
	MOF (MSL)	H4 ≫ H3, H2A	H4	
	Sas2	Unknown		
	Sas3 (NuA3)	Unknown	H3	
	MORF	H4 > H3		
	Tip60	H4 ≫ H3, H2A		
	Hbo1 (ORC)		H3, H4	
p300/CBP	p300	H2A, H2B, H3, H4		PCAF; GCN5
	CBP	H2A, H2B, H3, H4		
Basal transcription factors	TAFII250 (TFIID)	H3 ≫ H2A		
	TFIIIC ^b		H3, H4 > H2A	
	Nut1 (mediator)		H3 ≫ H4	
Nuclear receptor cofactors	ACTR ^c	H3 > H4		p300; CBP; PCAF
	SRC1	H3 > H4		

Taula 13. Famílies d'acetiltransferases d'histones i els seus membres. Es mostren les famílies de HAT, els membres que en formen part, els seus substrats histònics i les interaccions entre diferents HATs (Roth et al, 2001).

Les HATs generalment actuen en complexes multiproteics com seria el cas de Gcn5/PCAF (Nagy & Tora, 2007), NuA4/Tip60 (Doyon et al, 2004) i HBO1 (Avvakumov et al, 2012). Només p300 i CBP semblen capaces de funcionar per si soles (Doyon & Côté, 2004).

1.3.2. Desacetilases d'histones (HDACs)

De manera contrària a les HATs, les HDACs condueixen a un estat de la cromatina més condensat i transcripcionalment inactiu. Aquests enzims modificadors d'histones són àmpliament coneguts per participar a la repressió gènica, a la formació de l'heterocromatina, a la reparació de l'ADN, a la regulació del cicle cel·lular, a diferenciació cel·lular i al desenvolupament (Ruitjer et al, 2003; Vaquero, 2009).

Les HDAC són un grup d'enzims molt divers que es classifiquen filogenèticament en quatre famílies en funció de la seva homologia amb *Saccharomyces cerevisiae*: classe I (Rpd3), classe II (Hda1), Classe III (Sir2) i classe IV (Taula 14). Les classes I, II i IV són estructural i mecanísticament semblants, requereixen Zn²⁺ per catalitzar la reacció de desacetilació i s'inhibeixen amb tractament de TSA (*Trichostatin A*). En canvi, la classe III requereix el cofactor

NAD⁺ per dur a terme la reacció, i no són sensibles al TSA si no que s'inhibeixen amb NAM (*Nicotinamide*) (Ekwall, 2005; Wit et al, 2009; Yuan & Marmostein, 2012).

Família HDAC	HDAC mamífers	Complexes
Classe I (Rpd3)	HDAC1	Sin3, NuRD, CoREST, NCoR/SMRT, PRC2
	HDAC2	Sin3, NuRD, CoREST, PRC2
	HDAC3	NCoR/SMRT
	HDAC8	n.d.
Classe II (Hda1)	HDAC4	NCoR/SMRT
	HDAC5	NCoR/SMRT
	HDAC6	n.d.
	HDAC7	NCoR/SMRT
	HDAC9	n.d.
	HDAC10	n.d.
Classe III (Sir2)	SirT1	NCoR/SMRT
	SirT2	n.d.
	SirT3	n.d.
	SirT4	n.d.
	SirT5	n.d.
	SirT6	n.d.
	SirT7	n.d.
Classe IV	HDAC11	n.d.

Taula I4. Famílies de desacetilases d'histones i els seus membres. Es mostren les famílies de HDAC, els membres que en formen part i els complexos multiproteics que formen (Adaptat de Ruitjer et al, 2003; Witt et al, 2009; Yuan & Marmostein, 2012 i Seto & Yoshida, 2014).

Algunes HDACs formen part de complexos multiproteics juntament amb una àmplia varietat d'altres proteïnes que inclouen proteïnes *scaffold*, subunitats reguladores i remodeladors de la cromatina dependents d'ATP. Les classe de les HDAC més estudiades en complexos són les de classe I, dins d'aquesta les HDAC 1, 2 i 3 participen en complexos multiproteics nuclears crucials per la repressió transcripcional (Witt et al, 2009; Hayawaka & Nakayama, 2011). Un exemple seria el cas dels complexos repressors NuRD i SIN3 que contenen HDAC 1 i 2 (Arhinger et al, 2000; Kadamb et al, 2013) o el cas dels complexos repressors NCoR i SMRT que contenen HDAC 3 (Wen et al, 2000).

1.3.2.1. HDACs de classe III: les Sirtuïnes

Els membres de la família Sir2 (*silent information regulator*), conegudes com a sirtuïnes, van ser descrites originalment a *S. cerevisiae* com a enzims implicats al

silenciament transcripcional del loci *mating-type*, de l'rADN nucleolar i dels telòmers, i també se'ls va relacionar amb estabilitat genòmica i longevitat (Shore et al, 1984; Sinclair & Guarente, 1997; Guarente et al, 1999; North & Verdin, 2004). Durant l'última dècada, les sirtuïnes han emergit com a factors clau en el manteniment de la integritat genòmica, són proteïnes NAD⁺ cofactor dependents i d'aquesta manera poden actuar com a sensors d'estrès i participar a la comunicació entre l'ambient cel·lular i el genoma. Les sirtuïnes es troben implicades en una àmplia varietat de processos biològics com la regulació de la cromatina, la supervivència cel·lular en condicions d'estrès, la regulació del metabolisme, la diferenciació cel·lular i el desenvolupament. Consistent amb l'important paper que juguen en aquestes vies se les ha relacionat amb un gran nombre de patologies humanes incloent càncer, diabetis, malalties neurodegeneratives i envelliment, entre d'altres (Imai et al, 2000; Landry et al, 2000; Saunders & Verdin, 2007; Vaquero & Reinberg, 2008).

La reacció enzimàtica de les sirtuïnes més estudiada és la desacetilació. Aquest procés consisteix en la transferència d'un grup acetil d'un residu de lisina de la molècula substrat a una molècula d'ADP-ribosa (generada prèviament a partir de la hidròlisi d'una molècula de NAD⁺ que allibera l'ADP-ribosa i nicotinamida). Com a resultat es genera 2-O-acetil ADP-ribosa, el producte desacetilat i nicotinamida (Figura 17) A part d'aquesta activitat enzimàtica, també poden presentar activitat ADP-ribosiltransferasa i lipoamilasa, tot i que el coneixement d'aquests processos és més limitat (Landry et al, 2000; Sauve et al, 2001; Sauve & Schram, 2003; Vaquero et al, 2007; Fahie et al, 2009; Feldman et al, 2012).

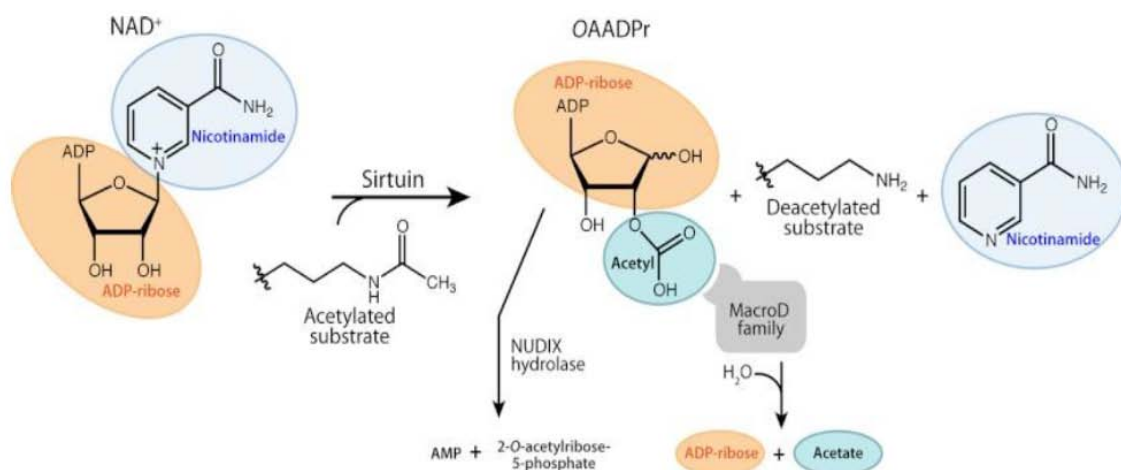


Figura 17. Reacció enzimàtica de desacetilació de les sirtuïnes. La reacció de desacetilació es duu a terme en tres passos: 1. L'enzim s'uneix al NAD⁺ en presència del substrat amb el residu acetilat; 2. L'enzim catabolitza el NAD⁺ generant una molècula d'ADP-ribosa i nicotinamida, que és alliberada. 3. L'enzim catalitza la transferència del grup acetil a l'ADP-ribose donant lloc al producte desacetilat i a 2-O-acetil ADP-ribosa (Feldman et al, 2012).

Les sirtuïnes es troben molt conservades evolutivament i els seus membres engloben els tres dominis principals de la vida: *archaea*, procariotes i eucariotes. El número de sirtuïnes varia segons l'organisme, i generalment correlaciona amb la complexitat d'aquest. A mamífer han estat descrites set sirtuïnes (SirT1-SirT7), que difereixen en l'activitat enzimàtica que desenvolupen, en la localització cel·lular, en l'especificitat de substrat i en funcionalitat (Taula I5) (Vaquero et al, 2009; Witt et al, 2009; Bosch-Presegué & Vaquero, 2011; Oehme et al, 2013; Chalkiadaki & Guarante, 2015).

Sirtuin	Activity	Localization	Substrates and/or targets	Function
SIRT1	Deacetylase	Nucleus	H3K9, H3K56, H4K16, H1K26, SUV39H1, p300 and PCAF	Chromatin regulation and transcription
			HDAC1, PARP1, p53, KU70, NBS1, E2F1, RB, XPA, WRN, survivin, β -catenin, MYC, NF- κ B and TOPBP1	DNA repair and cell survival
			PGC1 α , FOXO1, FOXO3A, FOXA2, CRCT1, CRCT2, PPAR α , PPAR γ , LXR, FXR, RAR β , SREBP1C, SREBP2, HNF4 α , HIF1 α , HIF2 α , CREB, NKX2-1, STAT3, TFAM, MYOD, NHLH2, UCP2, TSC2, eNOS, LKB1, SMAD7, AKT, ATG5, ATG7, ATG8, 14-3-3 ζ , PGAM1, ACECS1, PTP1B and S6K1	Metabolism
SIRT2	Deacetylase	Cytoplasm	Tubulin, keratin 8, PAR3 and PRLR	Differentiation
			G6PD, LDH, PEPCK1, ACLY, MEK1, ITPK1, S6K1 and PGAM	Metabolism
		Nucleus	H4K16, H3K56, H3K18, CDC20, APC/C, CDK9 and BUBR1	Cell cycle
			FOXO1, FOXO3A, p300, NF- κ B and HIF1 α	Metabolism
SIRT3	Deacetylase	Mitochondria	LCAD, VLCAD, HMGCS2, NDUFA9, SKP2, SDHA, ACECS2, GDH, IDH2, MRPL10, PDP1, SOD2, OTC, CYPD, OPA1, PDH, FOXO3 and GOT2	Metabolism
SIRT4	• ADP-ribosylase • Lipoamidase • Deacetylase	Mitochondria	GDH, IDE, SLC25A5, PDH and MCD	Metabolism
SIRT5	• Deacylase • Deacetylase	Mitochondria	CPS1, HMGCS2, PDH, SDH, SOD1 and GAPDH	Metabolism
SIRT6	• Deacylase • Deacetylase • ADP-ribosylase	Nucleus	H3K9, H3K56, CtIP, GCN5, SNF2H, G3BP, FOXO3 and PARP1	Chromatin and DNA repair
			MYC, HIF1 α , NF- κ B, TNF, SREBP1, SREBP2 and USP10	Metabolism
SIRT7	Deacetylase	Nucleus	MYC, H3K18, PAF53, HIF1 α , HIF2 α , ELK4, RNA Pol I, MYBBP1A, TFIIIC2 and p53	Transcription
			mTOR, DCAF1, DDB1, CUL4B and GABP β 1	Metabolism

Taula I5. Diversitat de les sirtuïnes de mamífer. Es mostren els set membres de la família de les sirtuïnes en mamífer (SirT1-SirT7), i es descriu l'activitat catalítica, la localització, els substrats i les funcions principals de cadascuna (Chalkiadaki & Guarante, 2015).

Les sirtuïnes han estat classificades filogenèticament en cinc grups: la classe I, inclou membres que presenten una alta homologia amb Sir2 de llevat, tenen una

activitat desacetilasa robusta i estan relacionades amb la regulació de la cromatina (SirT1-SirT3). La classe II, inclou sirtuïnes d'origen procariota, que tenen una activitat primària ADP-ribosiltransferasa i es troben implicades en el control del metabolisme (SirT4). La classe III, també són sirtuïnes d'origen procariota que inclou a la majoria de sirtuïnes de procariotes i *archaea*, tenen activitat deacilasa i estan implicades en el metabolisme (SirT5). La classe IV està formada per sirtuïnes que es troben a eucariotes i estan relacionats amb regulació de la cromatina. Originalment es va suggerir que només tenien activitat ADP-ribosiltransferasa però recentment s'ha descrit que SirT6 desacetila H3K9Ac a telòmers (Barber et al, 2012) i que SirT7 desacetila H3K18Ac al control de l'expressió gènica (Michishita et al, 2008) (SirT6, SirT7). Finalment la classe U engloba altres sirtuïnes de procariota poc caracteritzades (Frye, 2000; Rajendran et al, 2011; Webster et al, 2012; Martínez-Redondo & Vaquero, 2013).

SirT1 és la sirtuïna més estudiada fins al moment, es troba implicada a l'estructura i l'organització de la cromatina (Vaquero et al, 2007) i a vies moltes vies importants com a la reparació de l'ADN (Jeong et al, 2007), a l'apoptosis (Jiang et al, 2014) i al metabolisme (Li, 2013) (Figura 18). No només això si no que, desregulacions de SirT1 es troben associades a malalties com el càncer (Lin & Fang, 2013) i amb envelliment (Yuan et al, 2016). Es localitza majoritàriament a nucli, tot i que es pot trobar al citoplasma de cèl·lules transformades o de càncer per facilitar l'apoptosi. A nivell d'estructura de la cromatina, SirT1 té un paper important en la formació de l'heterocromatina facultativa a través de la desacetilació d'H4K16Ac i H3K9Ac, la seva interacció amb H1 i desacetilació a la K26 que afavoreix la compactació de la cromatina, i la desacetilació i augment de l'activitat de Suv39h1, la HMT responsable de la trimetilació d'H3K9 a aquestes regions. Aquests efectes s'acompanyen de l'*spreading* o propagació de marques de l'heterocromatina H3K9me3 i H4K20me1, i d'una disminució dels nivells de la marca de cromatina activa H3K79me3 promovent la formació d'heterocromatina (Vaquero et al, 2004; Vaquero et al, 2007; Bosch-Presegué & Vaquero, 2014). SirT1 no només promou la formació d'heterocromatina facultativa, si no que també participa al manteniment de l'heterocromatina constitutiva. Sota condicions d'estrès s'incrementen els nivells de SirT1, SirT1 interacciona amb Suv39h1, i aquesta interacció evita que es poliubiquitinatzi Suv39h1 a la K87. Com a conseqüència, es produeix l'estabilització de Suv39h1 i un augment dels nivells de la proteïna. Això produeix un augment del recanvi a l'heterocromatina constitutiva pericèntrica (HPC), assegurant així el manteniment de H3K9me3 i de l'estabilitat genòmica a aquestes regions d'HPC (Bosch-Presegué et al, 2011).

SirT2 és una sirtuïna predominantment citoplasmàtica durant la major part del cicle cel·lular excepte a la fase G₂/M quan transloca a nucli i s'associa amb la cromatina (North & Verdin, 2007). Es troba implicada al control del cicle cel·lular, SirT2 és necessària per la progressió de la fase S i té un paper important durant la mitosi, fet que reflexa el seu canvi de localització durant aquesta fase del cicle

cel·lular. SirT2 controla l'entra a mitosi a partir de la desacetilació d'H4K16Ac i la regulació de la deposició d'H4K16me1 (Figura I8) (Serrano et al, 2013).

SirT3 és la principal desacetilasa a mitocrondi, ja que la seva deleció produeix hiperacetilació mitocondrial general, mentre l'inhibició de SirT4, de SirT5 o de la resta d'HDACs no causa aquest efecte (Lombard et al, 2007). Les seves funcions principals es troben relacionades amb el metabolisme mitocondrial, SirT3 desacetila Acetil-CoA sintasa 2 (AceCS2) promovent la conversió d'acetat a AcetilCoA en presència d'ATP (Schwer & Verdin, 2008). També desacetila altres enzims mitocondrials clau com el glutamat deshidrogenasa (GDH) necessari per la síntesi d'urea (Figura I8) (He et al, 2012; Iwahara et al, 2012).

SirT4 i SirT5 es localitzen exclusivament a mitocondri. SirT4 presenta principalment activitat ADP-ribosiltransferasa i una feble activitat desacetilasa, és capaç d'ADP-ribosilar l'enzim mitocondrial GDH. L'ADP-ribosilació de GDH per SirT4 inhibeix la seva activitat enzimàtica i limita el metabolisme de glutamat a glutamina per produir ATP (Haigis et al, 2006). SirT5 té una potent activitat desuccinilasa i una activitat menor desacetilasa, regula l'enzim carbamoil fosfat sintetasa 1 (CPS1) per ambdós activitats enzimàtiques (Figura I8) (Rardin et al, 2013).

La sirtuïna nuclear SirT6 es troba implicada en diferents processos clau per al manteniment de la integritat genòmica i la resposta a l'estrès com a la reparació del dany a l'ADN, el manteniment dels telòmers, envelliment, metabolisme de lípids i glucosa i en inflamació. Participa en la senyalització i reparació del dany a l'ADN, tant de trencament de cadena sencilla (SSB) com de doble cadena (DSB). En el cas de la reparació de SSB, SirT6 promou la reparació per excissió de base (BER) ja que facilita l'accés a la cromatina de la maquinària de reparació (Figura I8) (Mostoslavski et al, 2006; Tasselli et al, 2016).

SirT7 és una de les sirtuïnes menys estudiades. Es una proteïna que es troba enriquida a nucleòl, on promou la transcripció de l'rADN dependent de l'ARN polimerasa-I (Michisita et al, 2005). Estudis molt recents del nostre grup demostren que SirT7 té la capacitat d'auto-ADP-ribosilarse, i que l'autoADP-ribosilació de SirT7 regula la resposta a *glucose starvation* a través d'mH2A1 (Figura I8) (Simonet et al, 2020).

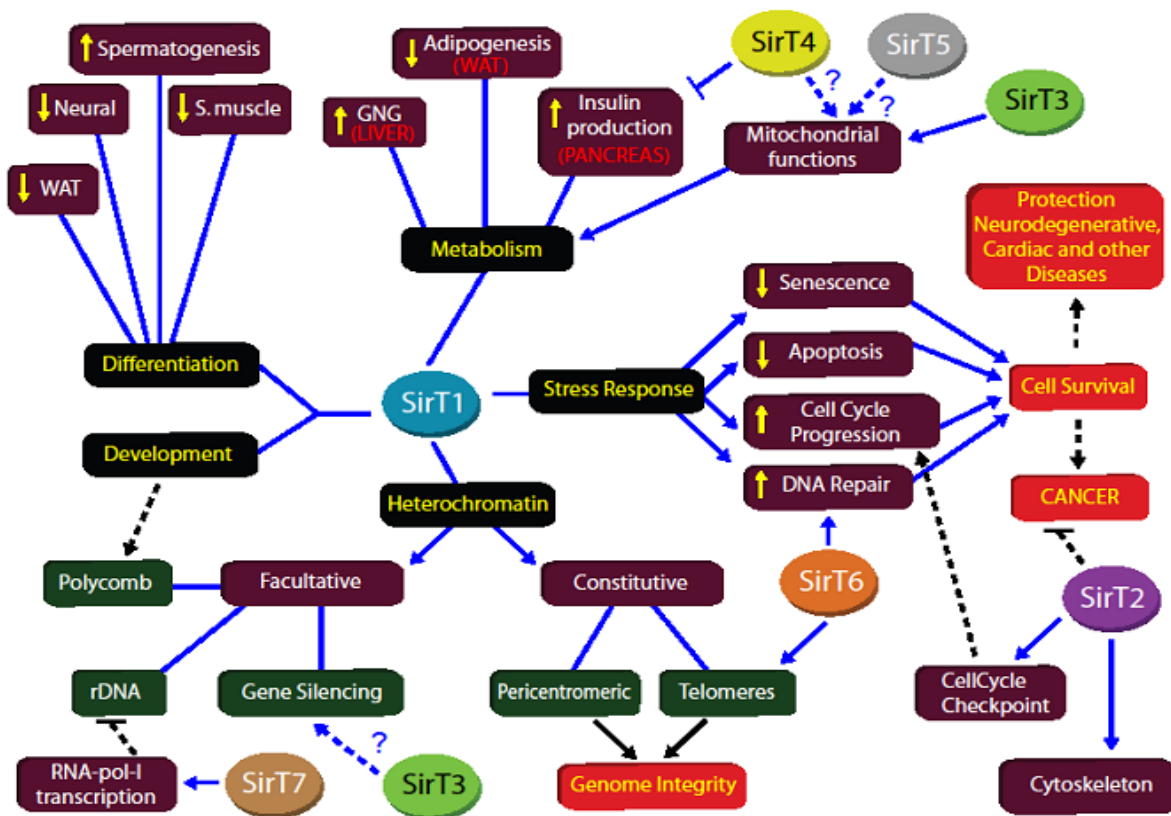


Figura 18. Funcions de les sirtuïnes de mamífer. Esquema que mostra les principals funcions de les sirtuïnes, representades com a ovals de diferent color. S'utilitzen signes d'interrogació per aquelles funcions que no estan demostrades (Vaquero et al, 2009).

Sota condicions d'estrès les sirtuïnes col·laboren per mantenir l'estabilitat genòmica i la integritat cel·lular, i arribada una situació extrema, participen en la inducció de l'apoptosi cel·lular per tal de preservar l'integritat de l'organisme.

1.3.3. Metiltransferases d'histones (HMTs)

Les HMTs són un grup d'enzims molt divers, actualment s'han identificat més de 100 HMTs, i estudis basats en espectrometria de masses revelen que més de 1000 proteïnes del proteoma humà podrien dur a terme metilació de lisines (Husmann & Gozani, 2020). Les HMTs són fonamentals a la regulació de la senyalització de la cromatina i intervenen en múltiples processos com en l'establiment de l'heterocromatina pericèntrica, en la segregació cromosòmica i en la regulació de la longitud dels telòmers, entre d'altres (Fritch et al, 2010; Murr, 2010; Henikoff & Shilatifard, 2011). De manera que, defectes funcionals d'aquests enzims poden portar al desenvolupament de càncer (Schneider, Bannister & Kouzarides, 2002; Albert & Helin, 2010; Husmann & Gozani, 2020), a trastorns

neurològics (Ryu et al, 2006), a patologies del desenvolupament (Morishita & Luccio, 2011) i a altres patologies humanes.

Les metiltransferases d'histones responsables de la metilació a residus d'arginina s'anomenen PRMT (*protein arginine methyltransferase*), i es classifiquen en tres tipus en funció del mecanisme d'unió a l'arginina i de la seva activitat catalítica. Les PRMTs de classe I poden produir monometil arginines i dimetilarginines asimètriques (me2a), a aquesta classe pertanyen PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4, PRMT6 i PRMT8. Les de classe II poden produir monometil arginines i dimetilarginines simètriques (me2s), dins d'aquesta classe es troba PRMT5 i PRMT9. Finalment, les de classe III poden produir només arginines monometilades, com es el cas de PRMT7 (Yang & Bedford, 2013; Blanc & Richard, 2017; Yu & Zhuang, 2019).

Les metiltransferases d'histones responsables de la metilació en residus de lisina s'anomenen KMT (metiltransferases de lisina), actualment han estat identificades més de 50 KMT humanes. Aquests enzims presenten una elevada selectivitat pel residu de lisina al que es dirigeixen i es classifiquen en dues famílies en funció de la seqüència del domini catalític. La primera família són les KMT que contenen el domini SET (*Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax*), anomenat així per que va ser identificat per primera vegada com a una seqüència conservada a tres proteïnes de *D.melanogaster*: un modificador de la variegació efecte-posició anomenat *Supressor of variegation 3-9/Su(va)3-9*, el regulador de la cromatina del grup Polycomb anomenat *Enhancer of Zeste* i el regulador de la cromatina *Trithorax*. El domini SET conté aproximadament uns 130 aminoàcids i s'han trobat proteïnes que contenen aquest domini a tots els organismes eucariotes estudiats fins al moment. Hi ha 7 subfamílies principals d'aquestes proteïnes que contenen el domini SET: SUV39, SET1, SET2, EZ, RIZ, SMYD, SUV4-20 i els membres orfes SET7/9 i SET8. La segona família són les KMT que no contenen el domini SET anomenades DOT1, com seria DOT1-L (Dot1-like) (**Taula 16**) (Rea et al, 2000; Schneider, Banister & Kouzarides, 2002; Vaquero et al, 2003; Dillon et al, 2005; Hyun et al, 2017; Yu & Zhuang, 2019).

El reclutament d'aquests enzims a zones específiques de la cromatina té lloc mitjançant un procés seqüencial de mecanismes coordinats. Les HMTs poden ser dirigides mitjançant la unió a factors de transcripció, lncRNAs (*long non-coding RNAs*), sncRNAs (*small non-coding RNAs*) o altres proteïnes amb funció a la cromatina als elements de reconeixement de l'ADN. Per exemple, les proteïnes del grup *Trithorax*, que són metiltransferases d'H3K4 a *D.melanogaster*, són conduïdes als elements de resposta TREs (*Trithorax Response Elements*) i el grup de proteïnes Polycomb, responsables de la metilació d'H3K27, són dirigits als elements de resposta PREs (*Polycomb Response Elements*) (Tillib et al, 1999; Tsai et al, 2010).

Famílies KMT	Subfamílies	Membres	Substrats	Funció
Domini SET	Suv39	SUV39H1	H3K9	Formació d'heterocromatina /silenciament
		SUV39H2	H3K9	Formació d'heterocromatina /silenciament
		G9a	H3K9	Formació d'heterocromatina /silenciament
		GLP	H3K9	Formació d'heterocromatina /silenciament
		SETDB1/ESET	H3K9	Repressió transcripcional
		SETDB2/CLLL8	-	-
	SET1	Yset1	H3K27	Repressió transcripcional
		EZH1	H3K27	Repressió transcripcional
	SET2	ySET2	H3K36	Activació transcripcional
		NSD1-3	H3K36	Activació transcripcional
	EZ	EZ1	-	-
	RIZ	RIZ1	H3K9	Repressió transcripcional
		PRDM1/BLIMP1	-	-
		PFM1/CRS2	-	-
	SMYD	SMYD2	H3K36/p53	Activació transcripcional
	Suv4-20	SUV420-H1	H4K20	Resposta al dany a l'ADN
		SUV420H2	H4K20	Formació d'heterocromatina/silenciament
Sense grup	SET 7/9	H3K4/p53	Repressió transcripcional	
	SET 8	H4K20	Repressió transcripcional	
DOT1	-	DOT1L	H3K79	Activació transcripcional

Taula 16. Classificació de les KMT. Es mostren les dues famílies de KMT, les corresponents subfamílies i els membres que en formen part. També estan representats els substrats histònics i les funcions principals d'aquests (Adaptat de Yu & Zhuang, 2019).

Suv39h1 (*Suppressor of variegation 3-9 homolog 1*) és la primera metiltransferasa d'histones específica de lisines identificada que contenia un domini SET, i és la principal metiltransferasa d'H3K9me2/3 en mamífers. Suv39h1 té un paper molt important a l'estructura i a la integritat de l'heterocromatina, principalment de l'heterocromatina constitutiva pericèntrica i en telòmers, i és per tant, un enzim clau a l'organització del genoma. En mamífers hi ha dos loci molt relacionats, un en posició proximal al centròmer del cromosoma X, que codifica per Suv39h1 i que s'expressa ubiquament als teixits adults. I l'altre, localitzat al cromosoma 2, que codifica per Suv39h2 amb una expressió restringida a testicles (Rea et al, 2000; O'carrol et al, 2000; Peters et al, 2001; Vaquero et al, 2007; Bosch-Presegué et al, 2011).

EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*) és una metiltransferasa de lisines que conté també un domini SET, i que pot di- i trimetilar H3K27. Aquesta KMT és una subunitat catalítica que forma part del complex PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*) on per exercir la seva activitat són necessaris tots els membres del complex. EZH2 té un rol molt important al silenciament de gens, diferenciació i desenvolupament, i la seva sobreexpressió està involucrada en una àmplia varietat de càncers incloent el càncer de mama i de pròstata (Simon & Lange, 2008; Mozzeta et al, 2014; Duan et al, 2020).

Suv420h2 (*Suppressor of variegation 4-20 homolog 2*) és una metiltransferasa de lisines de la família que contenen dominis SET i és molt important per la

trimetilació d'H4K20me3 en mamífers. Suv420h2 té un paper primordial en l'estructura de l'heterocromatina on s'enriqueix principalment a heterocromatina constitutiva pericèntrica i a telòmers. La unió estable de Suv420h2 a la cromatina és necessària per al correcte assemblatge d'una estructura d'heterocromatina compacta i de la cohesió de les cromàtides germanes. En vertebrats també es troba present Suv420h1 (*Supressor of variegation 4-20 homolog 1*) que és la metiltransferasa que dimetila H4K20 i que té un paper en la reparació de l'ADN (Schotta et al, 2004; Souza et al, 2009, Dambacher et al, 2013; Serrano et al, 2013).

1.3.4. Desmetilases d'histones (HDMs)

Les HDMs es classifiquen en dos famílies en funció de la seva reacció catalítica: la família LSD (*lysine-specific histone demethylases*), que duen a terme una oxidació d'amines en presència del cofactor FAD (*favine adenine dinucleotide*); i la família Jumonji C, que catalitzen una dihidroxilació dependent de Fe²⁺ o α -cetoglutarat. La família LSD està formada per dos membres, LSD1 i LSD2, el primer desmetila específicament lisines mono- i dimetilades d'H3K4 i H3K9 mentre que el segon desmetila lisines mono- i dimetilades d'H3K4. La família Jumonji C està formada per 27 membres que comparteixen el domini conservat Jumonji a la part C-terminal, i ha estat descrit que desmetilen trimetilacions d'H3K4, H3K9, H3K36 i H3K27. Generalment les HDMs formen part de complexes multiproteics que sinergien amb HDACs, HMTs i receptors nuclears (Shi et al, 2004; Metzger et al, 2005; Klose et al, 2006; Tsukada et al, 2006; Cloos et al, 2008, Tian et al, 2013; Harmeyer et al, 2017).

1.3.5. Relació entre les HDACs i les HMTs

Entre les HDACs i les HMTs existeix una relació funcional més estreta del que es creia fins ara, ambdós tipus d'enzims interactuen per regular de manera conjunta l'estructura de la cromatina. Aquesta relació sembla estar conservada evolutivament des de llevats fins a humans (Vaquero, 2009; Swygert & Peterson, 2014; Zhang et al, 2017). Com a exemple, la relació funcional entre SirT1 i Suv39h1 és molt important a la formació de l'heterocromatina facultativa. Sota el reclutament de SirT1 a la cromatina per factors de transcripció, SirT1 a la seva vegada recluta Suv39h1 interaccionant directament i el desacetila al seu domini catalític. Aquesta desacetilació promourà un augment de l'activitat de Suv39h1, que trimetil·larà H3K9 dels nucleosomes propers promovent la formació d'heterocromatina (Vaquero et al, 2007). Un altre exemple seria la relació entre SirT2 i PR-Set7 que té un paper en la regulació de la progressió del cicle cel·lular. Sota determinats estímuls, SirT2 interacciona amb PR-Set7 i el desacetila. Aquesta desacetilació promou la localització de PR-Set7 a la cromatina, que monometil·larà

H4K20 dels nucleosomes adjacents. L'establiment de H4K20me1 té un impacte directe en la progressió de la fase S (Serrano & Martínez-Redondo, 2013).

1.4. Maquinària de remodelació de la cromatina

La maquinària de remodelació de la cromatina modula el posicionament nucleosomal desplaçant o eliminant nucleosomes, i promou alteracions nucleosomals intercanviant histones canòniques per variants d'histones, entre d'altres mecanismes. D'aquesta manera controla l'estructura de la cromatina i l'accessibilitat dels factors de transcripció i d'altres proteïnes amb funció, regulant així processos com la transcripció, replicació, recombinació i reparació de l'ADN (Ausió, 2006; Bai & Morozov, 2010).

Els remodeladors de la cromatina són complexos multiproteïcs que utilitzen l'energia de la hidròlisi de l'ATP per dur a terme les seves funcions, i es poden classificar en quatre grups segons les característiques de la subunitat central ATPasa: SWI/SNF (*switch/sucrose nonfermenting*), ISWI (*imitation of switch*), CHD (*chromo domain helicase/ATPase binding protein*) i INO80 (inositol). Aquests complexos remodeladors llegeixen diverses senyals tals com seqüències d'ADN/metilació d'ADN, ARN associat a la cromatina, modificacions postraduccionals de les histones, variants d'histones i proteïnes no històniques associades a cromatina, que els dirigeixen a posicions específiques de la cromatina (Figura 19) (Erdel et al, 2011; Hargreaves & Crabtree, 2011; Varga-Weisz, 2014; Tyagi et al, 2016). Per tal de reconèixer les modificacions postraduccionals de les histones aquests remodeladors de la cromatina tenen dominis PHD, chromo o bromo en alguna de les seves subunitats reguladores o en la subunitat central ATPasa que els condueixen de manera específica a les cues de les histones modificades (Clapier & Cairns, 2009).

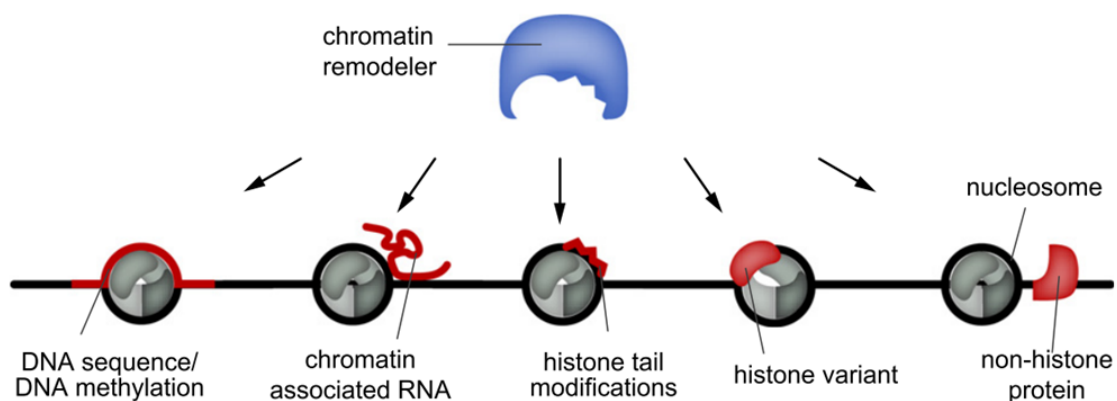


Figura 19. Senyals diana dels remodeladors de la cromatina. Els remodeladors de la cromatina són dirigits a la cromatina per diverses senyals diana tals com determinades seqüències d'ADN/metilacions d'ADN, ARNs associats a la cromatina, PTMs, variants d'histones i proteïnes no històniques associades a la cromatina (Erdel et al, 2011).

Els complexes remodeladors s'associen amb enzims modificadors d'histones i d'aquesta manera tenen un paper a la modulació del patró de les modificacions epigenètiques. Per exemple, ha estat descrit que el remodelador de la cromatina de tipus SWI/SNF anomenat SMARCA4, s'associa amb les desacetilases d'histones HDAC1/2 i les metiltransferases d'histones G9a/GLP i promou la metilació d'H3K9 (Erdel et al, 2011; Rowbotham et al, 2011).

Altre aspecte a destacar és que alguns remodeladors de la cromatina s'associen amb proteïnes estructurals com seria el cas d'HP1 (*heterochromatin protein 1*), una proteïna implicada a l'estructura de l'heterocromatina, i tenen un paper important en el manteniment de l'heterocromatina (Maison & Almouzni, 2004).

2. ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

2.1. Organització de la cromatina

La longitud de l'ADN genòmic és considerablement més llarg que el diàmetre de la cèl·lula. Així doncs, per que tot aquest ADN càpiga dins del nucli cel·lular cal que aquest es compacti de manera eficient. Els mecanismes epigenètics esmentats anteriorment, entre d'altres, modulen l'organització de la cromatina en una jerarquia d'ordres de compactació, que van des de la fibra d'11nm fins al cromosoma (Vaquero, Loyola & Reinberg, 2003).

A les cèl·lules eucariotes, la doble hèlix d'ADN es troba empaquetada amb histones i altres proteïnes accessòries formant la cromatina, la unitat bàsica i repetitiva de la qual són els nucleosomes. Centenars de milers de nucleosomes units formen el que es coneix com a nucleosomes en cadena o *beads-on-a-string*, observat per primera vegada al microscopi electrònic d'alta resolució l'any 1973. Aquesta és la forma més laxa i accessible de la cromatina, aconseguix compactar set cops i es coneix com a fibra d'11nm (Olins & Olins, 1973; Woodcock, 1973; Wolffe, 1998; Hansen, 2002; Khorasanizadeh, 2004; Vaquero, 2009; Maeshima et al, 2014).

El següent nivell de compactació és la fibra helicoïdal de 30nm, aquest esglaió aconseguix compactar sis vegades més. Les observacions en microscopi electrònic d'alta resolució l'any 1976 de cromatina nativa aïllada mostraven l'existència de dues possibles estructures de la fibra de 30nm. En primer lloc el *solenoid*, que consisteix en una disposició de sis nucleosomes per gir; i en segon lloc el *zig-zag*, on els nucleosomes es disposen de manera alterna. En ambdós casos, s'estableixen interaccions intra-fibra que permeten el plegament de la cromatina i es creu que la histona H1, i els factors associats a la cromatina HP1 i Polycomb podrien jugar un

paper fonamental en la formació d'aquestes estructures. Però tot i que la fibra de 30nm s'ha estudiat extensament *in vitro*, no hi ha evidències de la seva existència *in vivo* (Finch & Klug, 1976; Woodcock et al, 1993; Vaquero, Loyola & Reinberg, 2003; Khorasanizadeh, 2004; Robinson et al, 2006; Routh et al, 2008; Stehr et al, 2008; Grigoryev et al, 2009; Kruithof et al, 2009; Hübner et al, 2013). Alternativament a l'organització de la cromatina en una fibra de 30nm, estudis més recents proposen l'anomenat *polymer melt model*, on els nucleosomes no contigus linealment en la cadena d'ADN interactuen dins d'una regió de la cromatina de manera desorganitzada. En aquest model, les interaccions inter-fibra agafarien força desplaçant les interaccions intra-fibra establertes per formar la fibra de 30nm (Eltsov et al, 2008; Stehr et al, 2008; Hübner et al, 2013; Maeshima et al, 2014).

Al següent esglaió, aquesta fibra de cromatina s'organitza en una sèrie de petits glòbuls de 300nm per formar un estat més compacte, que és el que s'anomenen glòbuls fractals. Els glòbuls fractals s'organitzen en dominis de 700nm anomenats territoris cromosòmics (CT), possiblement a través de l'ancoratge de la fibra de cromatina a la perifèria del nucli o a altres proteïnes nuclears que serveixen de plataforma. Aquests territoris es divideixen en dos dominis: un domini ric en gens, que es localitza a la perifèria del nucli i es caracteritza per ser actiu transcripcionalment, i altre domini no perifèric, pobre en gens i transcripcionalment inactiu. Finalment, l'estructura de la cromatina més condensada s'observa en els cromosomes metafàsics, on s'aconsegueix compactar l'ADN fins a 10.000 vegades (Figura I10) (Schardin et al, 1985; Lichter et al, 1988; Hübner et al, 2013; Kalhor et al, 2013; Rodríguez & Bjerling, 2014; Kind et al, 2015; Fortuny & Polo, 2019).

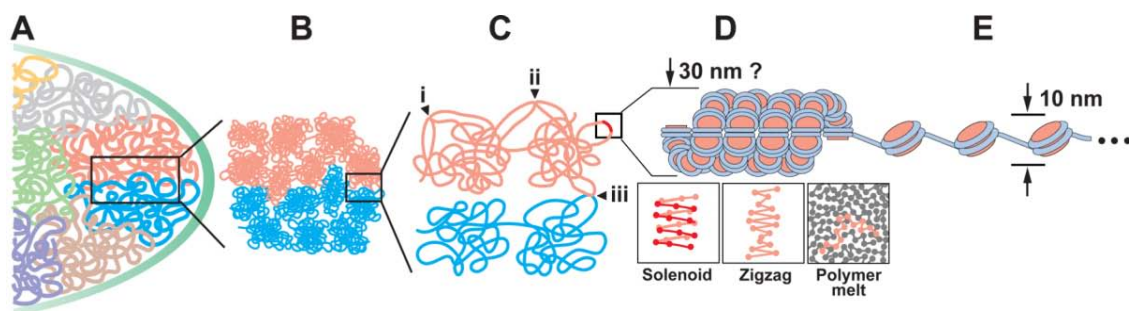


Figura I10. Organització de la cromatina en cèl·lules eucariotes. **A.** Els cromosomes estan organitzats en els territoris cromosòmics; **B.** Els territoris cromosòmics estan compostos de glòbuls fractals; **C.** Les fibres de la cromatina interactuen (i) dins d'un glòbul fractal (freqüent), entre glòbuls fractals d'un mateix territori cromosòmic (poc freqüent), o entre glòbuls fractals de territoris adjacents (infreqüent); **D.** La cromatina pot formar una fibra de 30nm (model *solenoid* o model *zig-zag*) o alternativament organitzar-se com a *polymer melt*; **E.** La cromatina es resol com una fibra d'11nm formada pels nucleosomes (Hübner et al, 2013).

2.2. Classificació funcional de la cromatina: Eucromatina i heterocromatina

La cromatina es pot classificar segons la seva funcionalitat en dos tipus de regions: l'eucromatina que també s'anomena cromatina activa, i l'heterocromatina que és la cromatina inactiva. Aquesta terminologia va ser emprada per primer cop l'any 1928 basant-se en el marcatge de tinció amb Giemsa per visualitzar l'ADN, on l'eucromatina s'observava com a bandes clares mentre que l'heterocromatina com a bandes fosques (Heitz, 1928; Fortuny & Polo, 2018).

L'eucromatina és la forma més laxa de les dues, presenta un nivell de compactació de fibra d'11nm. És accessible a la maquinària transcripcional i s'associa per tant, amb regions transcripcionalment actives. Aquestes regions es caracteritzen per tenir una alta densitat gènica i es correlacionen amb les següents modificacions postraduccionals d'histones: amb l'acetilació de lisines com seria el cas d'H3K9Ac, H3K14Ac, H4K5Ac, H4K8Ac, H4K12Ac i H4K16Ac i amb les metilacions de lisines següents H3K4me_{2/3}, H3K36me₃, H3K79me_{2/3} i H4K3me₂. Aquestes modificacions juntament amb altres factors, poden afavorir l'accés de factors de transcripció a les regions promotores dels gens i permetre la transcripció d'aquestes (Vaquero, Loyola & Reinberg, 2003; Kouzarides, 2007; Eissenber & Shilatifard, 2006; Trojer & Reinberg, 2007; Vaquero, 2009; Hübner et al, 2014; Bégin & Nadeau, 2014).

D'altra banda, l'heterocromatina és la forma més compacta de les dues, nombrosos estudis *in vitro* recolzen que el seu grau de compactació correspon a la fibra de 30nm, tot i que encara no s'ha pogut detectar *in vivo*. És refractària a l'accés de la maquinària de transcripció i s'associa amb regions transcripcionalment inactives. Aquestes regions es caracteritzen per tenir baixa abundància de gens i enriquiment en seqüències repetitives de l'ADN. Les regions d'heterocromatina generalment es correlacionen amb hipoacetilació de lisines i amb les següents metilacions d'histones: H3K9me_{2/3}, H4K20me_{1/3} i H3K27me₃. Aquestes regions són riques en proteïna de l'heterocromatina 1 (HP1), i presenten elevada activitat enzimàtica de la trimetiltransferasa d'H3K9 anomenada Suv39h1, del complex Polycomb que trimetila H3K27 i de la trimetiltransferasa d'H4K20 que s'anomena Suv420h2 (**Figura I11**) (Schotta et al, 2004; Eissenberg & Shilatifard, 2006; Kouzarides, 2007; Tremetick, 2007; Trojer & Reinberg, 2007; Vaquero, 2009; Hübner et al, 2014; Bégin & Nadeau, 2014; Dambacher et al, 2015).

La transició entre aquests dos nivells d'organització de la cromatina és vital pel control de la transcripció, de la replicació i de moltes altres funcions cel·lulars associades a l'ADN (Vaquero, 2009).

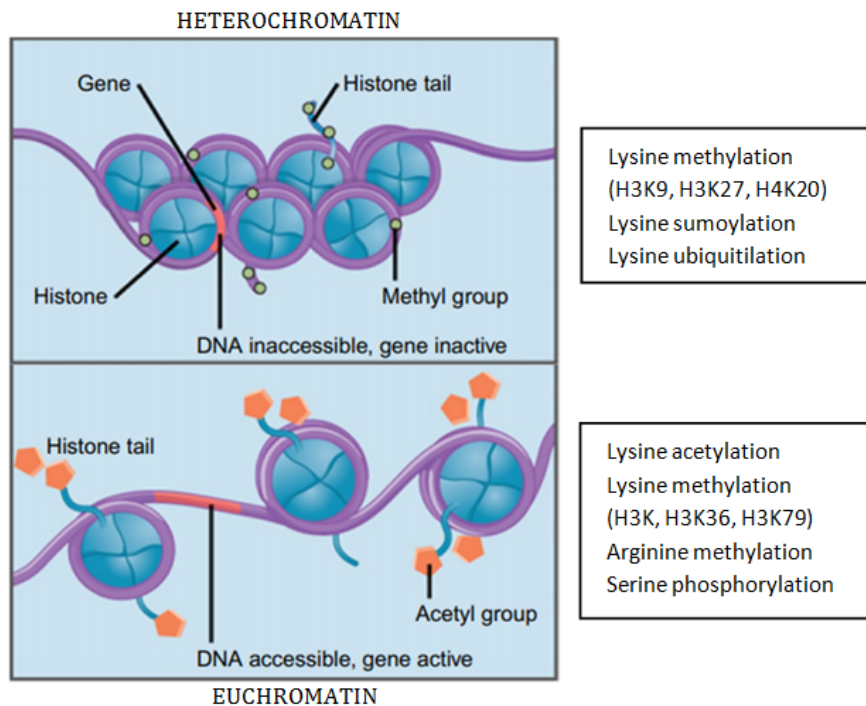


Figura I11. Classificació de la cromatina: eucromatina i heterocromatina. Les modificacions permissives de les histones tals com l'acetilació de lisines, determinades metilacions de lisines (H3K4, H3K36, H3K79), metilacions d'arginines i fosforilació de serines promouen la formació d'eucromatina, que té una estructura laxa i permet la transcripció gènica. Les modificacions repressives de les histones com la sumoïlació de lisines, la ubiquitinització de lisines i determinades metilacions de lisines (H3K9, H3K27, H4K20) promouen la formació de l'estructura condensada de l'heterocromatina, i que impedeix l'accés de la maquinària transcripcional (Adaptat de Bégin & Nadeau, 2014 i Mobley, 2019).

2.2.1. Heterocromatina facultativa (HF) i heterocromatina constitutiva (HC)

L'heterocromatina a la seva vegada es divideix en dues formes principals en funció de la seva dinàmica estructural i funcional: a l'heterocromatina facultativa (HF) i a l'heterocromatina constitutiva (HC). Aquestes dues formes d'heterocromatina es poden distingir amb el marcatge de bandes C, que tenyeix només l'HC (Summer, 2001; Vaquero, 2009).

L'HF, es refereix a regions condensades que es troben transcripcionalment silenciades però que es poden descompactar per revertir a eucromatina i permetre la transcripció sota determinats contextos específics. Els contextos específics que permeten la reversió a eucromatina es classifiquen en: temporals, com poden ser fases específiques del cicle cel·lular o estadis concrets del desenvolupament; en espacials, com seria el canvi de localització a la perifèria del nucli degut a factors exògens; o en parentals, com en el cas de l'expressió gènica monoal·lèlica. Per tant, l'HF pot adoptar una àmplia varietat d'estats de condensació de la cromatina, incloent la fibra d'11nm, estats intermedis i la fibra de 30nm (Craig; 2005; Trojer &

Reinberg, 2007; Rodríguez & Bjerling, 2013). De manera general aquestes regions es caracteritzen per ser riques en les marques de metilació d'histones H4K20me1, H3K27me3 i H3K9me2, i en l'ubiquitinització de l'H2AK119ub. També son regions on es produeix la incorporació de la variant d'histona macroH2A, a la qual se li atribueix un paper en la repressió de la transcripció. Pel que fa a les proteïnes associades a l'HF, aquesta és rica en proteïnes HP1 i també en el complex Polycomb que és reclutat per dur a terme la trimetilació d'H3K27 (Peters et al, 2002; Peters et al, 2003; Feil & Berger, 2007; Guenther et al, 2007, Mikkelsen et al, 2007; Trojer & Reinberg, 2007, Chantalat et al, 2011). L'expansió de les regions d'HF pot variar: pot ocupar des de un cromosoma sencer, com en el cas del cromosoma X inactiu (Xi) de les femelles de mamífer; abarcar grans distàncies, com per exemple grups de gens homeòtics; o bé limitar-se a regions concretes de poques kilobases, com seria el cas de les regions promotores de gens. Generalment, inclou regions amb major densitat gènica (Plath et al, 2003; Craig, 2005; Feil & Berger, 2007; Vaquero, 2009).

D'altra banda, l'HC es refereix a regions fortament condensades que es troben permanentment silenciades. Ocupa grans porcions del cromosoma i es produeix a les mateixes regions genòmiques en tots els tipus cel·lulars: a les regions centromèriques, a les regions pericèntriques i als telòmers. Aquestes regions es caracteritzen per tenir baixa densitat gènica i ser riques en seqüències repetitives d'ADN. Així doncs, les regions d'HC tenen un rol principalment estructural i són molt importants pel manteniment de l'estabilitat genòmica. L'alteració de l'estructura d'aquestes regions porta a defectes en la segregació cromosòmica, a aberracions cromosòmiques, dany a l'ADN i desprotecció telomèrica que poden portar a malalties humanes com càncer i envelliment, entre d'altres (Vaquero, 2009; Carone & Lawrence, 2012, Benáyoun et al, 2015; Saksouk et al, 2015; Feinberg et al, 2016; Talbert & Henikoff, 2016; Bosch-Presegué et al, 2017; Allshire & Madhani, 2018; Janssen et al, 2018). Aquestes regions d'HC es caracteritzen per ser riques en les marques de metilació d'histones H3K9me3, H4K20me3 i H3K27me1, i són regions on es produeix la incorporació de les variants d'histones H2A.Z, CENP-A i H3.3, que estan implicades en l'estructura de les regions pericèntriques, dels centròmers i dels telòmers respectivament. Pel que fa a les proteïnes associades, l'HC és rica en proteïnes HP1 i també tenen un paper important les trimetiltransferases d'H3K9 Suv39h1 i d'H4K20 Suv420h2 (Rea et al, 2000, Peters et al, 2002, Peters et al, 2003; Schotta et al, 2004; Eissenberg & Shilatifard, 2006; Saksouk et al, 2015; Talbert & Henikoff, 2016; Bosch-Presegué, 2015; Fortuny & Polo, 2018; Jenssen et al, 2018).

2.2.1.1. Heterocromatina constitutiva telomèrica (HTC)

L'HTC es localitza als telòmers, situats als dos extrems del cromosoma. Els telòmers es troben molt conservats en eucariotes i tenen una longitud de diverses

kilobases formades per seqüències repetitives curtes d'ADN que poden arribar a repetir-se de l'ordre de 2000 vegades. L'HTC manté la integritat d'aquests dominis telomèrics, i es troba enriquida en les marques històniques H3K9me3 i en la variant d'histona H3.3, que té un paper important a l'estructura d'aquestes regions. També tenen un rol important a aquestes regions la metiltransferasa d'H3K9me3 Suv39h1, el complex remodelador de la cromatina ATRX i la xaperona DAXX que depositen la variant d'histona H3.3, i la proteïna HP1 amb la qual s'associa. Defectes a l'estructura de l'HTC poden portar a la desprotecció telomèrica que a la seva vegada pot desencadenar el desenvolupament de càncer i envelliment (Blackburn, 1991; Gonzalo et al, 2006; Lewis et al, 2010; Shammas, 2011; Iwase et al, 2012; Janssen et al, 2018;).

2.2.1.2. Heterocromatina constitutiva centromèrica (HCC)

L'HCC es localitza als centròmers, que depenen del cromosoma i de l'organisme poden ser: metacèntrics, i situar-se al centre del cromosoma; submetacèntrics, on es situaria a prop del centre, de manera que un dels braços cromosòmics quedaria més llarg que l'altre; subteloèntrics, on es situaria a prop d'un dels telòmers, i un braç quedaria molt curt i l'altre molt llarg; o telocèntrics, on es situaria al costat d'un del telòmer i per tant, només tindrien un braç cromosòmic pràcticament. La majoria de cromosomes humans tenen centròmers submetacèntrics mentre que els cromosomes de ratolí són telocèntrics. En ratolins, aquests centròmers tenen una longitud d'unes 600kb i estan formades per seqüències repetitives d'ADN anomenades *minor satellites* cada una de les quals conté 123 pb. L'HCC manté la integritat d'aquestes regions, i es troba enriquida en la marques històniques H3K9me2/3, H4K20me3, H3K27me1 i H3K4me2, en la metiltransferasa Suv39h1, en la proteïna HP1 i en la variant d'histona CENP-A, essencial per l'assemblatge del complex cinetocòric i per la segregació cromosòmica. Defectes a l'estructura de l'HCC poden portar a defectes en la segregació cromosòmica, a aberracions cromosòmiques i a última instància al desenvolupament de càncer (Maison & Almouzni, 2004; Gieni et al, 2008; Allshire & Madhani, 2018; Janssen et al, 2018; Achrem et al, 2020).

2.2.1.3. Heterocromatina constitutiva pericèntrica (HPC)

L'HPC es localitza a les regions pericèntriques o pericentromèriques, situades al voltant de la regió centromèrica i vitals per la formació del cinetocor durant el procés de segregació cromosòmica. Aquestes regions són més extenses que els telòmers i centròmer, en ratolí tenen una longitud d'unes 6Mb i estan formades per seqüències repetitives d'ADN anomenades *major satellites*, cada una de les quals consta de 234pb i són riques en els nucleòtids A i T. Les seqüències repetitives de

les regions pericèntriques no es troben conservades i poden variar molt entre diferents organismes, el que suggereix que podrien ser regulades epigenèticament (Sullivan et al, 2001; Maison & Almouzni, 2004; Dambacher et al, 2013; Saksouk et al, 2014; Nishibuchi & Déjardin, 2017).

L'HPC manté la integritat d'aquestes regions, i es troba enriquida en les marques històniques H3K9me2/3, H4K20me3 i H3K27me1/3, i en la variant d'histona H2A.Z que té un paper important en la estructura de l'HPC. Les proteïnes més importants en aquestes regions són les trimetiltransferases d'H3K9 Suv39h1 i d'H4K20 Suv420h2, i les proteïnes HP1, totes tres juguen un paper molt important tant en la formació com en l'estructura d'aquestes regions. L'ARN estructural sembla tenir també un paper clau en l'estructura i organització a partir del seu efecte en la deposició d'HP1 a aquestes regions. I recentment ha estat descrit també que el remodelador de la cromatina SMARCAD1 és important per assegurar l'estructura de l'HC (Figura I12) (Peters et al, 2001; Maison et al, 2002; Rangasamy et al, 2003, Maison & Almouzni, 2004; Schotta et al, 2004; Probst & Almouzni, 2008; Santenard et al, 2010; Rowbotham et al, 2011; Müller-Ott et al, 2014; Matveeva, 2014; Saksouk et al 2015; Janssen et al, 2018, Achrem et al, 2020).

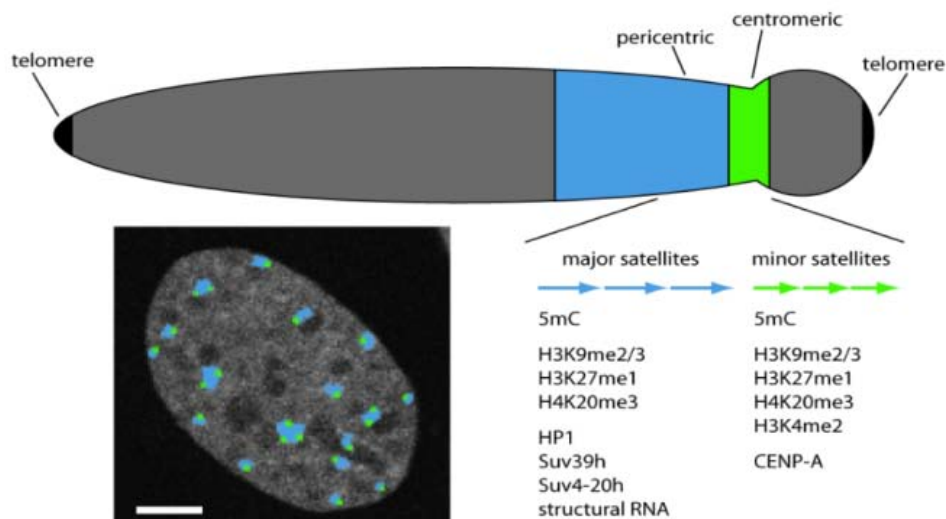


Figura I12. Estructura de l'HPC a cèl·lules de ratolí. L'HPC dels cromosomes murins individuals s'agrupen i formen *focis* de cromatina altament condensada anomenats *chromocentres*, que poden ser visualitzats al microscopi fàcilment mitjançant tinció amb DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (blau). A la perifèria d'aquestes agrupacions pericèntriques es localitzen individualment les regions centromèriques (verd). Les regions pericèntriques estan formades per repeticions de *major satellites* i es troben enriquides en metilacions d'ADN i en les següents metilacions d'histones: H3K9me2/3, H4K20me3 i H3K27me1/3. Aquestes regions co-localitzen amb les proteïnes HP1, Suv39h1, Suv420h2 (Adaptat de Probst & Almouzni, 2008 i de Matveeva, 2014) .

Alteracions de l'estructura de l'HPC es relacionen amb defectes en la segregació cromosòmica, aberracions cromosòmiques, inestabilitat genòmica, i defectes en el silenciament de gens que succeeix quan els gens de l'eucromatina es situen adjacents a l'heterocromatina per reordenament cromosòmic o

transposició, un fenomen que va ser descrit inicialment a *D.melanogaster* com a variegació per efecte de la posició. Tots aquestes defectes poden acabar desencadenant diversos tipus de càncer, com per exemple el càncer epitelial (Eymery et al, 2009) i els neuroblastomes (Enukashvily et al, 2007). No només això si no que també s'ha vist descondensació de l'HPC en varies malalties genètiques de progèria com en la de Hutchinson-Gilford (Shumaker et al, 2006) (Henikoff et al, 1990; Peters et al, 2001; Tadei et al, 2001; Maison & Almouzni, 2004; Saksouk et al, 2015; Janssen et al, 2018).

A les cèl·lules murines, les regions pericèntriques es poden identificar fàcilment per la seva forta tinció amb un marcatge amb DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), un marcador fluorescent que presenta alta afinitat per les regions riques en adenina i timina, i que per tant, marca intensament els *major satellites*. Es poden observar durant tot el cicle cel·lular però són més visibles en nuclis en interfase, on les regions pericèntriques de varis cromosomes s'agrupen i formen clusters anomenats *chromocentres* que queden tenyits en forma de *focis* o punts (Figura I12 i I13). A les cèl·lules humanes no es distingeixen tan bé les regions pericèntriques i per aquesta raó, el nostre model d'estudi són cèl·lules procedents de ratolí (Maison & Almouzni, 2004; Dambacher et al, 2013; Saksouk et al, 2015; Allshire & Madhani, 2018; Janssen et al, 2018).

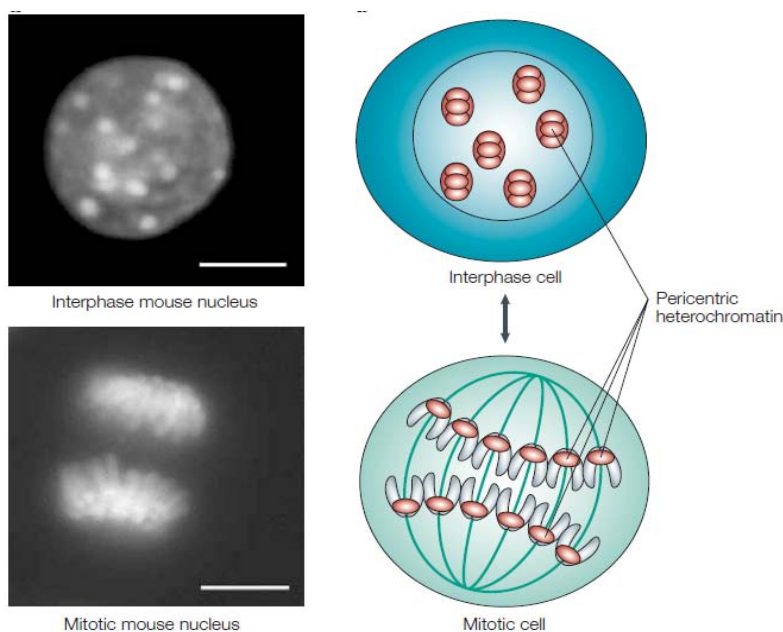


Figura I13. Visualització dels *chromocentres* en cèl·lules murines. Imatges dels *chromocentres* d'HPC en cèl·lules murines en interfase (a dalt) i en mitosi (a baix) (Maison & Almouzni, 2004).

L'estudi de l'estructura i el manteniment de les regions d'PCH és vital per entendre els mecanismes que participen al manteniment de l'estabilitat genòmica. Tot i que s'ha avançat considerablement als últims 30 anys, en alguns aspectes encara no en tenim prou evidències per tenir una perspectiva complerta de la seva

regulació, els components associats, la seva dinàmica estructural i la seva contribució funcional. Aquesta tesi ha intentat avançar en aquest coneixement mitjançant el desenvolupament d'alguns d'aquests aspectes específics.

3. FACTORS CLAU A L'ESTRUCTURA DE L'HPC

3.1. Suv39h1

Suv39h1 (*Suppressor of variegation 3-9 homolog 1*) va ser descoberta a *Drosophila* i és la primera metiltransferasa d'histones específica de lisines identificada que contenia un domini SET (*Su(var)3-9, Enhancer of Zeste, Trithorax*) que, juntament amb el regulador de la cromatina del grup Polycomb *Enhancer of Zeste* i amb el regulador transcripcional *Trithorax*, dóna nom a aquesta gran família de KMT. Dins de la família de KMT amb domini SET, Suv39h1 forma part de la subfamília SUV39. Suv39h1 és la principal metiltransferasa d'H3K9me_{2/3} en mamífers, i té un paper molt important a l'estructura i a la integritat de l'heterocromatina, principalment a l'heterocromatina constitutiva pericèntrica i a telòmers, i és per tant, un enzim clau en l'organització del genoma. I està involucrat en múltiples processos cel·lulars crucials com en la segregació cromosòmica i en la progressió mitòtica (Rea et al, 2000; O'carrol et al, 2000; Peters et al, 2001; Vaquero et al, 2007; Bosch-Presegué et al, 2011).

Aquesta proteïna té un pes molecular d'uns 48kDa i està formada per dos dominis molt conservats: el domini *chromo* situat a la part N-terminal i el domini SET a la part C-terminal. I també consta de dues regions riques en cisteïna associades al domini SET, que s'anomenen regions preSET i postSET (Figura I14).

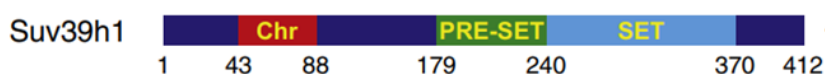


Figura I14. Estructura i dominis de Suv39h1 de ratolí. Representació esquemàtica de l'estructura de Suv39h1 formada pels dominis *chromo* situat a la part N-terminal i el domini SET a la part C-terminal. Consta també d'una regió preSET i d'una regió postSET al votant del domini SET (Bosch-Presegué et al, 2011).

El domini *chromo* de la part N-terminal és un domini conservat en proteïnes reguladores de la cromatina i està format per uns 50 aminoàcids. Aquest domini realitza varies activitats: és el responsable de la unió de Suv39h1 a l'ADN o l'ARN, juga un paper en el reconeixement d'H3K9 monometilat i intervé en la localització de Suv39h1. És també una regió essencial per l'activitat catalítica de Suv39h1, ja

que ha estat descrit que la deleció d'aquest domini altera l'activitat enzimàtica de Suv39h1 tot i mantenir-se intacte el domini SET (Rea et al, 2000; Brehm et al, 2004; Kaustov et al, 2011; Wang et al, 2012). El domini SET de la part C-terminal és un domini molt conservat en proteïnes implicades en el control de l'estructura de la cromatina i de l'expressió gènica. S'ha trobat en un gran nombre d'eucariotes i en alguns bacteris i virus. És un domini gran que consta d'uns 140 aminoàcids i és el domini catalític que confereix a Suv39h1 l'activitat metiltransferasa. Aquest domini es troba envoltat de les regions riques en cisteïna preSET i postSET que són necessàries per la seva activitat enzimàtica (Rea et al, 2000; Peters et al, 2001; Wang et al, 2012).

Suv39h1 està regulat per un gran nombre de modificacions postraduccionals, per proteïnes reguladores i per factors de transcripció. Entre les proteïnes que regulen Suv39h1 es troba el supressor tumoral p53. Quan es produeix dany a l'ADN, p53 s'activa i indueix l'expressió de la demetilasa d'H3K9 anomenada JMJD2b (Jumonji domain 2) i indirectament redueix l'expressió de Suv39h1. D'aquesta manera s'aconsegueix la relaxació de la cromatina per a que pugui accedir la maquinària de reparació de dany a l'ADN (Zheng et al, 2014). Un altre proteïna implicada a la regulació de Suv39h1 és SirT1. SirT1 interacciona directament amb Suv39h1 i la desacetila a la K226 del seu domini catalític SET, promovent un augment de la seva activitat. Aquest augment de la seva activitat catalítica és important durant el procés de formació de l'heterocromatina facultativa i durant el procés de manteniment de l'heterocromatina constitutiva sota condicions d'estrès, on es veuen incrementats els nivells de SirT1 (Vaquero et al, 2004; Vaquero et al, 2007; Bosch-Presegué et al, 2011). Un altre exemple implicat en la regulació de Suv39h1 és DBC1 (*deleted in breast cancer 1*). DBC1 s'uneix a SirT1 i inhibeix la seva activitat desacetilasa, d'aquesta manera indirectament inhibeix l'activitat de Suv39h1 (Li et al, 2009).

Suv39h1 està implicat a diverses funcions cel·lulars, com la formació d'heterocromatina i organització del genoma, l'estabilització dels telòmers, el silenciament gènic, la regulació del cicle cel·lular, en el desenvolupament i la tumorigènesi (O'carrol et al, 2000; Peters et al, 2001).

Suv39h1 és crucial tant per la formació de l'heterocromatina facultativa com per la formació de l'heterocromatina constitutiva pericèntrica i telomèrica. La relació de Suv39h1 és clau per el reclutament d'HP1 a l'heterocromatina gràcies a la di i trimetilació d'H3K9. Un cop es recluta Suv39h1 a aquestes regions, aquest di i trimetila H3K9 que serà reconegut per HP1. A la seva vegada HP1 recluta més Suv39h1 i d'aquesta manera es propaga i dona lloc a l'heterocromatina. Aquest empaquetament de la cromatina per formar heterocromatina està relacionat amb el silenciament gènic (Fenselfeld & Groudine, 2003; Vaquero, 2009; Chu et al, 2012). Degut a que Suv39h1 és un enzim clau per la formació de l'heterocromatina constitutiva pericèntrica i telomèrica, la deleció de Suv39h1 s'ha associat amb inestabilitat genòmica a aquestes regions (Peters et al, 2001; Krouwels et al, 2005) que en última instància poden portar a una mala segregació cromosòmica (Aagaar

et al, 1999; Chu et al, 2012), a defectes a la progressió del cicle cel·lular (Melcher et al, 2000) i a una desorganització dels telòmers (Uhlírová, 2010).

Suv39h1 s'ha relacionat amb la tumorigènesi però el seu paper encara és subjecte a controvèrsies. D'una banda se l'ha relacionat amb la formació d'un complex amb pRb que juga un paper a la inhibició d'E2F1. Tenint un paper a través d'aquestes vies en la supressió tumoral (He et al, 2012). Contràriament, H3K9me3 mediada per Suv39h1 s'ha relacionat amb el silenciament dels gens supressors de tumors E-cadherina i p15INK4B a la leucèmia mieloide aguda (AML) (Zhao et al, 2013).

3.2. Isoformes d'HP1: HP1α, HP1β i HP1γ

HP1 va ser originalment identificada a *Drosophila* com a supressor dominant de la variegació per efecte posició i com a component principal de l'heterocromatina. La família de proteïnes HP1 és troba evolutivament molt conservada, i s'han trobat membres d'aquesta família en gairebé tots els organismes eucariotes, des de *S.pombe* fins a mamífers. La família de proteïnes HP1 per una classe de gens coneguts com a *chromobox* (*cbx*). En mamífers han estat identificades tres isoformes d'HP1, cadascuna codificada pel seu propi gen: HP1α es troba codificada pel gen *chromobox homolog 5* (*cbx5*), localitzat al cromosoma 15 en ratolí ; HP1β pel gen *chromobox homolog 1* (*cbx1*), localitzat al cromosoma 11; i HP1γ pel gen *chromobox homolog 3* (*cbx3*) situat al cromosoma 6. Les isoformes d'HP1 codificades per aquests tres gens tenen una elevada similitud, amb una identitat de seqüència d'aminoàcids d'aproximadament un 65% (Figura I15a) (Eissenberg et al, 1990; Singh et al, 2003; Maison & Almouzni, 2004; Lomberk et al, 2006; Kumar & Kono, 2020).

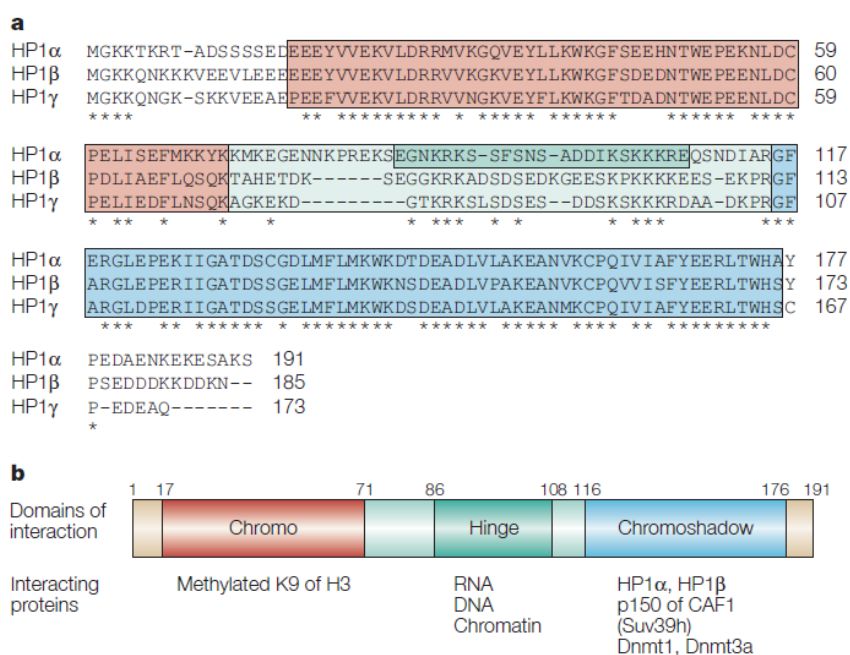


Figura I15. Dominis de les isoformes d'HP1 de ratolí i interacció amb diferents factors. **A.** Alineació de les seqüències aminoacídiques d'HP1 α , HP1 β i HP1 γ . Els asteriscs indiquen els aminoàcids conservats entre les tres isoformes. Es distingeixen els dos dominis i la regió central: el *chromodomain* (vermell), la regió *hinge* (verd) i el *chromoshadow domain* (blau). **B.** Es representen els dominis d'interacció d'HP1 α i algunes de les proteïnes amb les que interaccionen importants per l'estabilitat dels dominis d'heterocromatina (Maison & Almouzni, 2004).

Les tres isoformes d'HP1 són proteïnes petites que tenen pesos moleculars entorn als 25kD, HP1 α de 25kDa, HP1 β de 22kDa i HP1 γ de 20kDa. Aquestes proteïnes estan formades per dos dominis conservats, el *chromodomain* (*chromatin organization modifier*, CD) situat a la part N-terminal de la proteïna i el *chromoshadow domain* (CSD) localitzat a la part C-terminal. Aquests dos dominis es troben units per una regió més variable anomenada regió *hinge* (HR) (Figura I15 b) (Singh et al, 2003; Maison & Almouzni, 2004; Lomberk et al, 2006; Kumar & Kono, 2020).

El domini cromo o *chromodomain* és un domini conservat evolutivament que es troba en un gran nombre de proteïnes, moltes de les quals estan implicades a l'estructura de la cromatina i a l'expressió gènica com és el cas de Suv39h1. Aquest domini consta d'uns 30-60 aminoàcids i és el responsable de la unió d'HP1 a H3K9me2/3, de manera que aquest domini és molt important per direccionar les proteïnes HP1 a l'heterocromatina. A part de dirigir-se a l'heterocromatina a través de la unió a H3K9me2/3, també interacciona amb H3 i es creu que aquesta unió representa la fracció immòbil d'HP1 (Aagaar et al, 1999; Lachner et al, 2001; Singh et al, 2003, Maison & Almouzni, 2004; Schmiedeger et al, 2004; Lomberk et al, 2006; Fischle et al, 2008; Sales-Gil & Vagnarelli, 2020).

El *chromoshadow domain* és un domini que comparteix una alta identitat de seqüència d'aminoàcids amb el CD, amb un tamany similar. Aquest alt grau de similitud suggereix que els gens que codifiquen per HP1 podrien haver-se originat a partir de la duplicació de la seqüència d'un d'aquests dominis. El CDS és responsable de la homo- i heterodimerització d'HP1, i de interacció amb altres proteïnes que requereix el motiu consens PXVXL, que sovint es troba també a les proteïnes amb les que interacciona. Aquest domini per tant, és responsable de la unió d'HP1 amb altres proteïnes HP1, amb Suv39h1, amb les metiltransferases d'ADN Dnmt1 i Dnmt3a i amb CAF1 (*chromatin assembly factor 1*), entre d'altres (Singh et al, 2003; Maison & Almouzni, 2004; Lomberk et al, 2006; Mishima et al, 2012; Sales-Gil & Vagnarelli, 2020).

La regió *hinge* és la regió més variable, tant entre proteïnes HP1 de la mateixa espècie com entre espècies diferents. Aquesta regió és més curta que el CD i el CSD, i ha estat postulat que la seva estructura és flexible. Aquesta regió conté una seqüència de localització nuclear, i és la responsable de la unió d'HP1 amb l'ADN i l'ARN. La regió *hinge* és susceptible a un gran nombre de modificacions postraduccionals que poden afectar a la seva localització, interaccions i funcions,

de manera que podria ser una regió de control central de les proteïnes HP1 (Lomberk et al, 2006; Mishima et al, 2012; Sales-Gil & Vagnarelli, 2020).

La localització de les isoformes d'HP1 pot variar segons la fase del cicle cel·lular o l'estadi de desenvolupament en que es trobi la cèl·lula. En cèl·lules en interfase, HP1 α es localitza majoritàriament a heterocromatina, HP1 β es troba tant a heterocromatina com a eucromatina i HP1 γ majoritàriament a eucromatina (Figura I16) (Mosch et al, 2004; Maison & Almouzni, 2004; Dyalinas et al, 2007; Hayawaka et al, 2003). Pel que fa al patró de localització d'HP1 α , β i γ específicament als focis l'HPC, aquests són àmpliament coincidents però no completament. HP1 α i β es troben enriquides a regions similars de l'HPC, preferentment al voltant del centre dels *foci* tot i que la intensitat de la distribució no és idèntica. HP1 γ mostra menor grau de correlació amb les altres isoformes, i presenta una distribució més dispersa al *foci* (Dyalinas et al, 2007; Bosch-Presegué et al, 2017). Durant la mitosi, una fracció d'HP1 α , però no d'HP1 β ni d'HP1 γ , queda retinguda a aquestes regions d'HPC, on intervé en funcions importants com en la formació del cinetocor. Mentre que la resta de proteïnes HP1 s'allibera de la cromatina per permetre l'accés als factors necessaris per mediar la compactació de la cromatina a cromosomes i per mediar la correcta segregació cromosòmica. La localització cel·lular de les proteïnes d'HP1 pot variar també en funció de la presència o absència d'altres proteïnes importants per l'heterocromatina, per exemple, la pèrdua de Suv39h1 i Suv39h2 deslocalitza completament a les proteïnes HP1 dels focis d'HPC (Dyalinas et al, 2007; Hayawaka et al, 2003; Kwon & Workman, 2011).

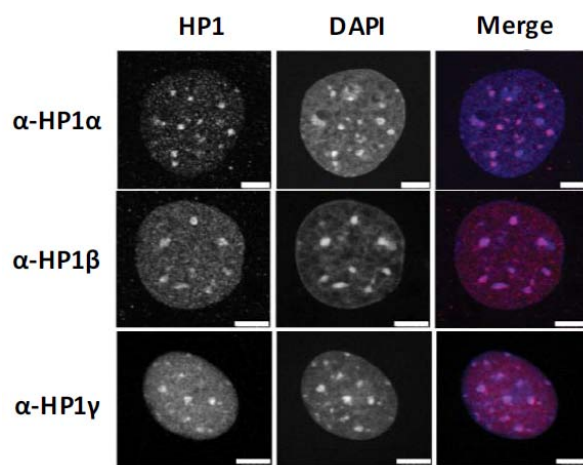


Figura I16. Localització de les isoformes d'HP1 en cèl·lules de ratolí. IF que mostra la localització endògena d'HP1 α , HP1 β i HP1 γ endògenes a cèl·lules MEF (Adaptat de Mosch et al, 2004).

Les proteïnes d'HP1 es troben àmpliament regulades per modificacions postraduccionals incloent acetilació, fosforilació, metilació, ubiquitinització i

sumoïlació, de manera similar a les histones. Cada isoforma d'HP1 es troba regulada per les seves pròpies modificacions postraduccionals, que es poden donar a diferents llocs. Actualment, han estat identificats 35 residus susceptibles a patir modificacions en HP1 α , 34 residus en HP1 β i 37 en HP1 γ (Figura I17). La modificació postraduccionals més abundant i estudiada en les proteïnes HP1 és la fosforilació. Per exemple, la fosforilació de quatre residus d'aminoàcids (Ser11-14) a la regió N-terminal d'HP1 α per la quinasa CKII (*casein kinase II*), té un paper crític a la unió d'HP1 α a H3K9me3 i a la seva localització a heterocromatina (Hirogami-Hamada et al, 2011). HP1 β pot ser fosforilada a la Ser89 i a la Ser175 per CKII, però aquesta fosforilació sembla no afectar a la seva capacitat per unir-se a la cromatina (Munari et al, 2014). Altre cas interessant és la fosforilació de la Ser87 d'HP1 γ per part de la quinasa PKA (*protein kinase A*), que defineix una subpoblació d'aquesta isoforma exclusivament a eucromatina (Fischle et al, 2005; Lomberk et al, 2006; Kwon & Workman, 2011, Sales-Gil & Vagnarelli, 2020).

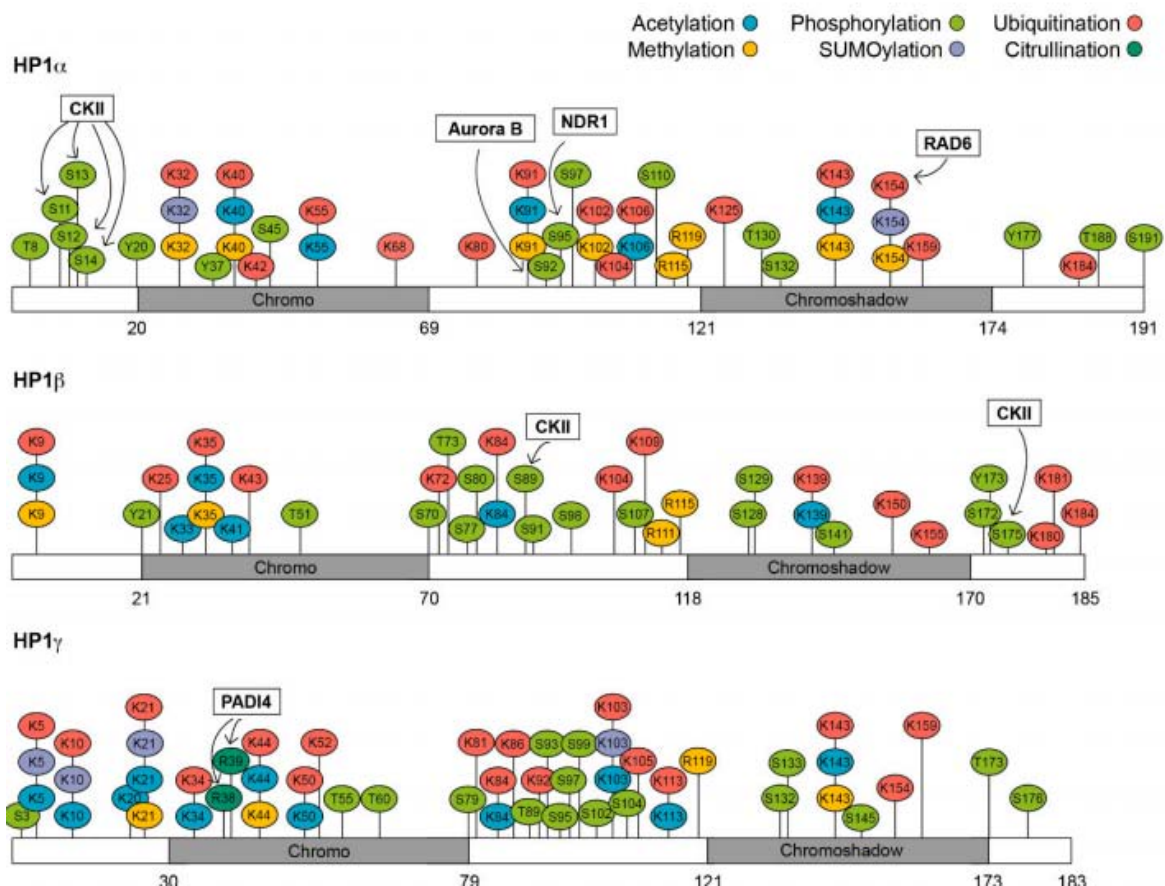


Figura I17. Modificacions postraduccionals de les isoformes d'HP1. Es mostren les posicions de les principals modificacions postraduccionals que tenen lloc a HP1 α , HP1 β i HP1 γ . Acetilació (blau), metil·lació (groc), fosforilació (verd), sumoïlació (porpra), ubiquitinització (vermell) i citrullinació (verd fosc). Es mostren algunes enzimes conegudes que catalitzen modificacions específiques (Sales-Gil & Vagnarelli, 2020).

Les isoformes d'HP1 són capaces d'interaccionar amb una gran varietat de proteïnes involucrades en una àmplia varietat de funcions entre les quals es troben la regulació de la transcripció, la reparació de dany a l'ADN i la replicació cel·lular. Aquestes interaccions poden ser generals per les proteïnes d'HP1 o bé específiques d'isoforma on HP1 α , β i γ presenten el seu propi grup específic d'interactors. A més a més, les interaccions poden dependre de les modificacions postraduccionals particulars d'HP1 (Taula I7). Per exemple, les tres isoformes d'HP1 interaccionen amb H3K9me3 i amb Suv39h1, i aquestes interaccions es troben implicades en el procés de formació de l'heterocromatina. Com a altre exemple, també ha estat descrita la interacció específica d'HP1 α amb el supressor de tumors pRb (proteïna del retinoblastoma), que té un paper a la repressió de la transcripció (Singh et al, 2003; Lomberk et al, 2006; Cann et al, 2011; Siddiqui et al, 2011; Sales-Gil & Vagnarelli, 2020; Kumar & Kono, 2020).

Protein	Hp-I variant	Domain
Transcriptional regulators or chromatin-modifying proteins		
Histone H1	HP1	ND
Histone H3	HP1, HP1 ^{Mmα} , HP1 ^{Mmβ} , HP1 ^{Mmγ}	CD
Methyl K9 Histone H3	Swi6, HP1, HP1 α , HP1 β , HP1 γ	CD
Histone H4	HP1, HP1 ^{Mmα}	CSD
SUV39H1	HP1, HP1 α , HP1 β , HP1 γ	CSD
Polycomb	HP1 ^{Hsα} , HP1 ^{Hsγ}	CSD
Dnmt3a	HP1 ^{Mmα}	ND
Dnmt3b	HP1 α , HP1 β	ND
Kap-1/Tif1 β	HP1 α , HP1 β , HP1 γ	CSD
Rb	HP1 ^{Hsγ}	ND
MITR	HP1 ^{Mmα}	Linker
BRG1	HP1 ^{Mmα}	CSD
ATRx	HP1 ^{Mmα} , HP1 ^{Mmβ}	CSD
TAF _{II} 130	HP1 ^{Hsα} , HP1 ^{Hsγ}	CSD
PIMI	HP1 ^{Hsγ}	CSD
RNA	HP1 ^{Mmα} , HP1 ^{Mmγ}	Linker
DNA replication and repair proteins		
CAF-1p150	HP1 α , HP1 β	CSD
Ku70	HP1 ^{Hsα} , phosphoS83- HP1 ^{Hsγ}	CSD, Linker
ORC1-6	HP1	CD, CSD
Other chromosome-associated proteins		
Psc3	Swi6	CD
INCENP	HP1 ^{Hsα} , HP1 ^{Hsγ}	Linker
Hsk1/CDC7	Swi6	ND
Ki-67	HP1 ^{Mmα} , HP1 ^{Mmβ} , HP1 ^{Mmγ}	CSD
SPI00	HP1 ^{Hsα} , HP1 ^{Hsβ} , HP1 ^{Hsγ}	CSD
Nuclear structure proteins		
Nuclear envelope	HP1 ^{Mmα} , HP1 ^{Mmβ} , HP1 ^{Mmγ}	CD
Lamin B receptor	HP1 ^{Hsα} , HP1 ^{Hsβ} , HP1 ^{Hsγ}	CSD
Lamin B	HP1 ^{Mmβ}	CD
LAP2 β	HP1 ^{Mmβ}	CD

Taula I7. Principals interactors de les isoformes d'HP1. HP1 es refereix a HP1 de *Drosophila*; HP1 α , HP1 β i HP1 γ es refereix tant a ratolí com a humà a no ser que s'especifiqui (Mm, ratolí o Hs, humà); ND, no determinat (Lomberk et al, 2006).

Pel que fa a la funcionalitat de les proteïnes HP1, aquestes juguen un paper important a l'estabilitat genòmica a través de les seves funcions a diversos processos com la formació i estructura de l'heterocromatina, la regulació de l'expressió gènica, la reparació de l'ADN, la replicació de l'ADN, la divisió cel·lular, la diferenciació cel·lular i el desenvolupament. Originalment, es considerava que el paper de les isoformes d'HP1 era bastant equivalent degut a la conservació en la seqüència aminoacídica, la seva similar localització i la seva redundància funcional en alguns processos. Aquesta visió però, va canviar degut al descobriment de que cada isoforma era susceptible de patir un conjunt de modificacions postraduccionalment específic, que cadascuna tenia els seus propis interactors, i que la deleció de les isoformes en ratolí produïa fenotips diferents. Actualment han estat descrites un gran nombre de funcions d'HP1, tant a nivell global de les tres isoformes, com a nivell específic d'isoforma (**Taula I8**) (Maison & Almouzni, 2004; Aucott et al, 2008; Juarez-Vicente et al, 2016; Bosch-Presegué et al, 2017; Kumar & Kono, 2020).

Funció	Isoforma HP1	Mecanisme implicat
Establiment heterocromatina	HP1 β	Interacció amb H3K9me3, i reclutament de Suv420h2 i d'ADN metiltransferases
Manteniment telòmers	HP1 γ	Interacció amb TIN2 i manteniment de la cohesió
Manteniment regions pericèntriques	HP1 α , HP1 γ	Interacció amb Suv39h1 i estabilització d'aquesta
Resposta a estrès	HP1 α	Unió de 53BP1 i RAD51 als DSB
	HP1 β	Interacció amb l'ADN danyat per irradiació
	HP1 γ	Efecte inhibitori a la reparació mitjançant recombinació homòloga
Replicació de l'ADN	HP1 α , HP1 β	Interacció amb CAF-1 i membres de la maquinària de reparació
Regulació de la transcripció	HP1 γ	Interacció amb l'ARN polimerasa II
Tumorigènesi	HP1 α , HP1 β , HP1 γ	Efectes en l'estabilitat genòmica

Taula I8. Funcions principals de les isoformes d'HP1. Taula que mostra les funcions de les isoformes d'HP1 i els mecanismes implicats.

Les proteïnes HP1 tenen un paper important a l'establiment i propagació de l'heterocromatina mitjanant la seva interacció específica amb H3K9me3 i Suv39h1. En aquest sentit, s'ha suggerit que HP1 β podria actuar com a pont a les fibres de cromatina riques en H3K9me3 (Bannister et al, 2001; Lachner et al, 2001; Munari et al, 2012). Estudis recents indiquen que les proteïnes HP1 actuen també com a

molècules adaptadores que uneixen factors a l'heterocromatina com ara Suv420h2 o ADN metiltransferases (Taula I8) (Fucks et al, 2003; Hahn et al, 2013).

El manteniment de l'estructura de telòmers també està regulat per HP1. En aquest sentit, HP1 γ sembla tenir un paper en l'estabilitat dels telòmers. S'ha demostrat que en fase S, HP1 γ es localitza a telòmers i interacciona amb la proteïna amb funció telomèrica TIN2 per tal de mantenir la cohesió d'aquests (Canudas et al, 2011).

Estudis recents del nostre grup descriuen que HP1 regula Suv39h1, especialment sota condicions d'estrès genotòxic, per tal de mantenir la integritat genòmica. Sota condicions d'estrès, principalment les isoformes HP1 α i HP1 γ interaccionen amb Suv39h1. Aquesta interacció evita la poliubiquitinació per part de la E3-ubiquitina ligasa MDM2 i com a conseqüència, es produeix l'estabilització de Suv39h1 i un augment del recanvi a l'HPC per tal d'assegurar el manteniment d'H3K9me3 i l'estabilitat genòmica (Raurell-Vila et al, 2017; Bosch-Presegué et al, 2017).

Les isoformes d'HP1 també participen a la resposta a estrès. Per exemple, la deleció d'HP1 α afecta a la unió de 53BP1 i RAD51 als *double strand-breaks* inhibint així la reparació de l'ADN per recombinació homòloga. La fosforilació d'HP1 β a la Thr51 augmenta la seva mobilitat a l'ADN danyat per IR. HP1 γ té un efecte inhibitori a la reparació del dany mitjançant recombinació homòloga (Taula I8) (Ayoub et al, 2009; Baldeyron et al, 2011; Raurell-Vila et al, 2017).

HP1 juga un paper a la replicació de l'ADN, tant HP1 α com HP1 β s'associen amb proteïnes implicades en aquest procés com el factor d'assemblatge de la cromatina CAF-1 i diversos membres de la maquinària de replicació. Aquesta associació és molt important per la replicació de la cromatina pericèntrica (Taula I8) (Moss & Wallrath, 2007; Kwon & Workman, 2011; Soria & Almouzni, 2013).

Una altra de les funcions associades a HP1 és la regulació transcripcional. S'ha demostrat que HP1 γ col·localitza i interacciona amb l'ARN polimerasa II (ARNpolII) als dominis de cromatina actius, i es troba relacionada amb la regulació de l'expressió gènica (Vakoc et al, 2005, Kwon & Workman, 2011).

Finalment, destacar que HP1 ha estat relacionada amb la tumorigènesi. Alguns estudis descriuen que la reducció dels nivells d'HP1 s'associa amb la progressió del càncer de mama degut al seu efecte en el manteniment de l'estabilitat genòmica. Altres estudis però, relacionen el increment de l'expressió d'HP1 β i HP1 γ amb la incidència de càncer de pròstata (Taula I8) (Dyalinas et al, 2008).

3.3. Suv420h2

Suv420h2 (*Suppressor of variegation 4-20 homolog 2*) és una KMT de la família que contenen dominis SET, que es troba dins de la subfamília SUV4-20.

Suv420h2 es molt important per la di i trimetilació d'H4K20 en mamífers i té un paper primordial a l'estructura de l'heterocromatina on es troba enriquida principalment a les regions pericèntriques i a telòmers. La unió estable de Suv420h2 i d'H4K20me3 a la cromatina és necessària per al correcte assamblatge d'una estructura d'heterocromatina compacta i per la cohesió de les cromàtides germanes (Schotta et al, 2004; Schotta et al, 2008; Dambacher et al, 2013; Jorgensen et al, 2013; Serrano et al, 2013; Hyun et al, 2017).

Aquesta proteïna té un pes molecular d'entorn als 52kDa i està formada per un únic domini SET localitzat a la regió N-terminal, seguit d'una regió postSET d'unió a Zn⁺². El domini SET, tal i com s'ha comentat anteriorment, és un domini molt conservat a eucariotes i és responsable de conferir l'activitat metiltransferasa a Suv42h2 (Figura I18) (Rea et al, 2000; Peters et al, 2001; Wu et al, 2013).



Figura I18. Estructura i dominis de Suv420h2 en humà. Representació esquemàtica de l'estructura de Suv420h2 formada per un únic domini SET localitzat la part N-terminal. Consta també d'una regió postSET (Adaptat de Wu et al, 2013).

Suv420h2 té un paper essencial en el manteniment de l'estabilitat genòmica a través dels seu rol a la compactació de l'heterocromatina, la replicació de l'ADN i la reparació del dany (Schotta et al, 2008; Jorgensen et al, 2013). Pel que fa al paper de Suv420h2 a l'estructura de l'heterocromatina, ha estat descrit que durant el procés de formació de l'HC a les regions telomèriques i a les regions pericèntriques, HP1 interacciona amb Suv420h2 i el recluta a la cromatina. Un cop reclutat Suv420h2, aquest catalitzarà la trimetilació d'H4K20 que és necessària per la formació d'una fibra compacta de 30nm (Schotta et al, 2004; Souza et al, 2009; Dambacher et al, 2013; Saksouk et al, 2015). Suv420h2 es troba també implicat en la regulació del cicle cel·lular, intervé al reclutament de les cohesines a través de els seves interaccions amb múltiples proteïnes i en la cohesió de les cromàtides germanes durant la mitosi. Ratolins deficientes en Suv420 mostren reducció de la cohesió entre cromàtides germanes i defectes en la segregació cromosòmica (Hahn et al, 2013). També s'ha relacionat Suv420h2 amb la reparació del dany a l'ADN. De fet, ha estat descrit que els ratolins deficientes en Suv420h presenten un augment de sensibilitat davant l'estrès i una reparació defectuosa del dany a l'ADN (Schotta et al, 2008). Estudis recents descriuen que Suv420h2 actua com a regulador epigenètic que promou la transició epitelial-mesenquimàtica en càncer pancreàtic i que es troba per tant implicat en el procés de metastasi (Viotti et al, 2018).

4. FORMACIÓ DE L'HPC

L'establiment d'heterocromatina a les regions pericèntriques, té lloc a partir d'un conjunt d'activitats seqüencials organitzadores de la cromatina que estableixen modificacions d'histones específiques i que porten al reclutament d'efectors que median la compactació i organització de la cromatina (Grewal et al, 2007; Dambacher, 2013).

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, les regions pericèntriques no tenen una gran conservació de seqüència, i no tenen característiques gèniques com elements promotors que podrien indicar on s'ha de dur a terme la formació d'heterocromatina. A nivell de seqüència, l'única característica conservada són els motius repetitius de seqüència. Aquestes repeticions són crítiques per la formació de l'HPC, ja que s'ha vist que aquests motius poden ser silenciats en diversos organismes tot i que no es coneix ben bé el mecanisme de reconeixement (Probst & Almouzni, 2008; Saksouk et al, 2015).

El procés de formació de l'HPC comença amb el reconeixement d'aquestes seqüències repetitives d'ADN, a les cèl·lules de ratolí anomenades *major satellites*, per part dels factors de transcripció Pax3 i Pax9 (Figura I19). L'associació d'ambdós factors de transcripció a l'ADN és necessària per reprimir la transcripció no codificant dels *major satellites* (Bulut-Karslioglu, 2012; Dambacher, 2013; Saksouk et al, 2015). Llavors, les HDACs desacetilen les cues de les histones per tal de catalitzar la formació d'una regió hipoacetilada. Encara que avui dia no es sap amb certesa quines són les HDACs implicades, hi ha estudis que suggereixen un paper de SirT1 al procés de desacetilació de l'HPC, ja que cèl·lules deficientes en SirT1 presenten alts nivells d'H4K16Ac i H3K9Ac a aquestes regions (Terranova et al, 2005; Bártoová et al, 2005, Dambacher et al, 2013). Al següent punt, les monometiltransferases d'histones catalitzen la deposició d'H3K9me1. Han estat identificats tres enzims implicats en la monometilació d'H3K9 a aquestes regions, G9a, GLP i SETDB1, tot i que hi ha controvèrsia sobre el grau de participació de cadascuna (Loyola et al, 2009; Shinkai & Tachibana, 2011; Rivera et al, 2015). Llavors, els factors de transcripció Pax3 i Pax9, juntament amb la desacetilació d'H3K9, ajuden al reclutament de Suv39h1 que és qui s'encarrega de di i trimetil·lar H3K9. (Schotta, 2004; Dambacher, 2013; Saksouk et al, 2015). Una vegada s'ha dipositat H3K9me3, les proteïnes HP1 reconeixen aquesta marca i s'uneixen. La sumoilació d'HP1 i la seva associació amb l'ARN estructural dels *major satellites* podrien tenir un paper en direccionar HP1 a les regions pericèntriques, on HP1 s'uniria a H3K9me3 (Maison et al, 2011, Grewal et al, 2015). Un cop HP1 s'uneix a H3K9me3, aquest recluta a la seva vegada més Suv39h1 que catalitzarà més H3K9me3 i així consecutivament actuant en cadena. Les proteïnes HP1 no només promouen la propagació de l'heterocromatina si no també el reclutament de complexos de proteïnes amb diverses activitats enzimàtiques essencials per la formació d'aquesta entre els que es troba el remodelador de la cromatina SMARCD1. Es va suggerir que la isoforma HP1β actuava com a pont a les fibres de

cromatina enriquides en H3K9me3 (Bannister, 2001; Lachner, 2001; Rowbotham et al, 2011; Grewal et al, 2015; Hiragami-Hamada et al, 2016). Les isoformes d'HP1 promouen també el reclutament de Suv420h2, que catalitzarà la trimetilació d'H4K20 necessària per la formació d'una fibra de cromatina compacta. Cèl·lules deficientes en Suv420h presenten defectes a la compactació de la cromatina i a la formació del cromocentre (Dambacher, 2013; Saksouk et al, 2015). Suv420h2 juntament amb Suv39h1, són crucials pel reclutament del complex de cohesines per a tingui lloc la cohesió de les cromàtides germanes i la correcta segregació cromosòmica durant la mitosi (Dambacher et al, 2013).

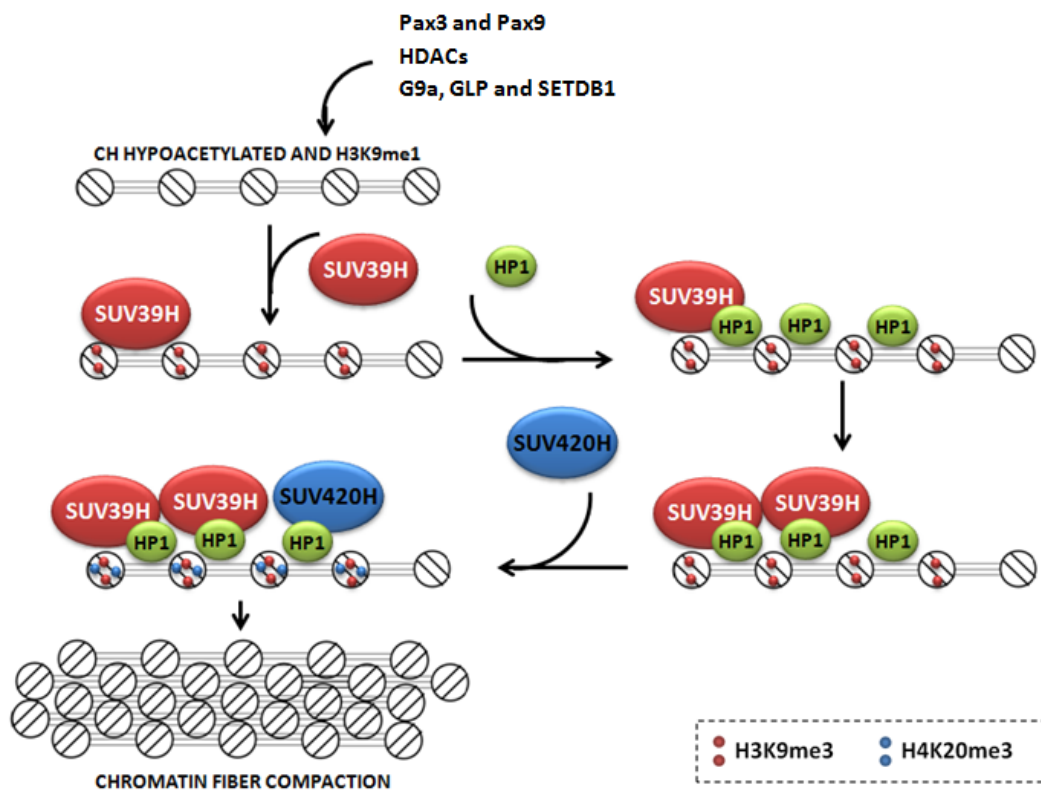


Figura 119. Esquema del procés de formació de l'HPC. Esquema de l'actuació seqüencial dels diferents enzims i factors necessaris per a la formació de l'heterocromatina constitutiva a les regions pericèntriques i pel reclutament del complex de cohesines. (Adaptat de Dambacher et al, 2013).

5. PAPER DE LES ISOFORMES D'HP1 A L'ESTRUCTURA DE L'HPC

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, les tres isoformes d'HP1, HP1 α , HP1 β i HP1 γ , es troben involucrades en una àmplia varietat de processos incloent la regulació de l'heterocromatina, la regulació de l'expressió gènica, la regulació del cicle cel·lular i la reparació del dany a l'ADN. Al llarg del temps s'ha considerat el paper de les isoformes d'HP1 bastant equivalent degut a la forta redundància

funcional d'aquestes proteïnes, a la conservada seqüència aminoacídica i a la seva similar localització. Actualment però, aquesta perspectiva ha canviat i, han estat descrites múltiples funcions específiques de les isoformes d'HP1 (Maison & Almouzni, 2004; Raurell-Vila et al, 2017; Kumar & Kono, 2020).

Les isoformes d'HP1 juguen papers diferencials en l'estabilitat genòmica, però el seu paper específic a l'estructura i organització de l'HPC no està clar. Estudis del nostre grup han descrit rols específics de les isoformes d'HP1 a l'HPC, on principalment les isoformes HP1 α i HP1 γ interaccionen amb Suv39h1 i l'estabilitzaven per mantenir l'integritat genòmica, especialment sota condicions d'estrès (Raurell-Vila et al, 2017; Bosch-Presegué et al, 2017). Pel que fa al patró de distribució de les tres isoformes d'HP1 a l'HPC, HP1 α i HP1 β es troben enriquides a regions similars, preferencialment al voltant del centre dels *foci*. Però la intensitat de la distribució no és idèntica. HP1 γ mostra menor grau de correlació amb les altres isoformes, i presenta una distribució més dispersa al *foci* (Figura I20) (Dyalinas et al, 2007; Bosch-Presegué et al, 2017).

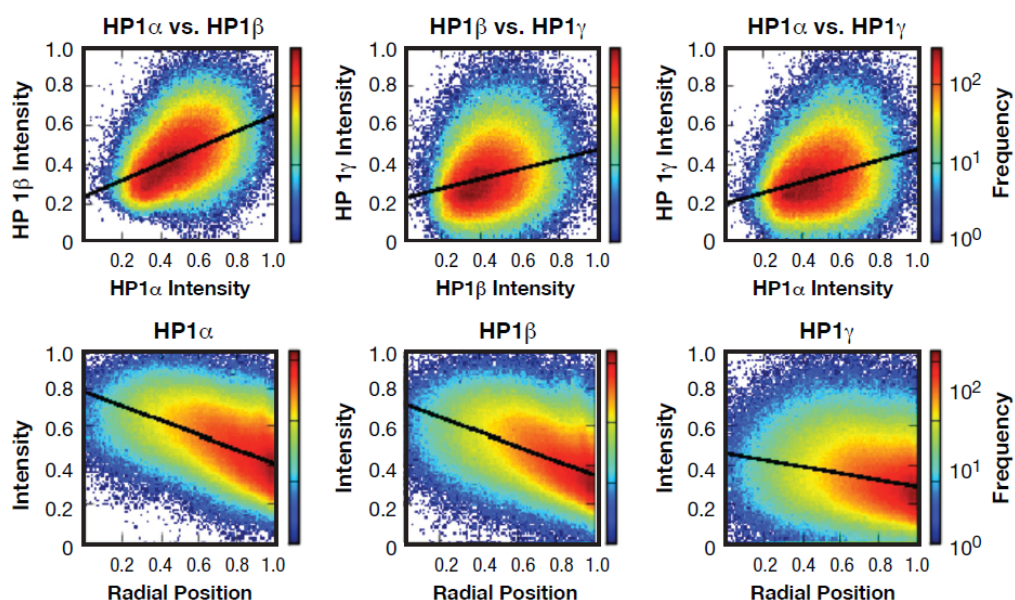


Figura I20. Localització d'HP1 α , β i γ als focis d'HPC. Histogrames 2D que mostren la intensitat de la distribució de les isoformes d'HP1. Els colors representen la freqüència observada en escala logarítmica, les línees negres mostren la regressió lineal de les dades. La comparació de la intensitat per parelles entre les isoformes indicades (a dalt) i la intensitat de cada isoforma d'HP1 representada enfront a la posició radial s'indiquen amb un valor de 0 (centre del chromocentre) i d'1 (perifèria) (Bosch-Presegué et al, 2017).

Resultats previs del nostre grup relacionen la pèrdua de la isoforma HP1 α , però no d'HP1 β ni d'HP1 γ en MEFS, amb un significant enriquiment de les marques associades a l'heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3 a l'HPC a totes les fases del cicle cel·lular (Bosch-Presegué et al, 2017). De manera interessant, la marca H4K20me3 ha estat directament relacionada amb els nivells de compactació als

focis d'HPC, de fet és necessària per a que es doni el correcte assamblatge de les fibres de cromatina (Dambacher, 2013; Saksouk et al, 2015). La pèrdua de cadascuna de les tres isoformes d'HP1 produeix una suau disminució d'H3K9me3, i un increment dels nivells de la marca associada a eucromatina H3K4me3 a l'HPC, confirmant d'aquesta manera que són redundants pel que fa a la deposició d'aquestes dues modificacions d'histona (Figura I21) (Bosch-Presegué et al, 2017).

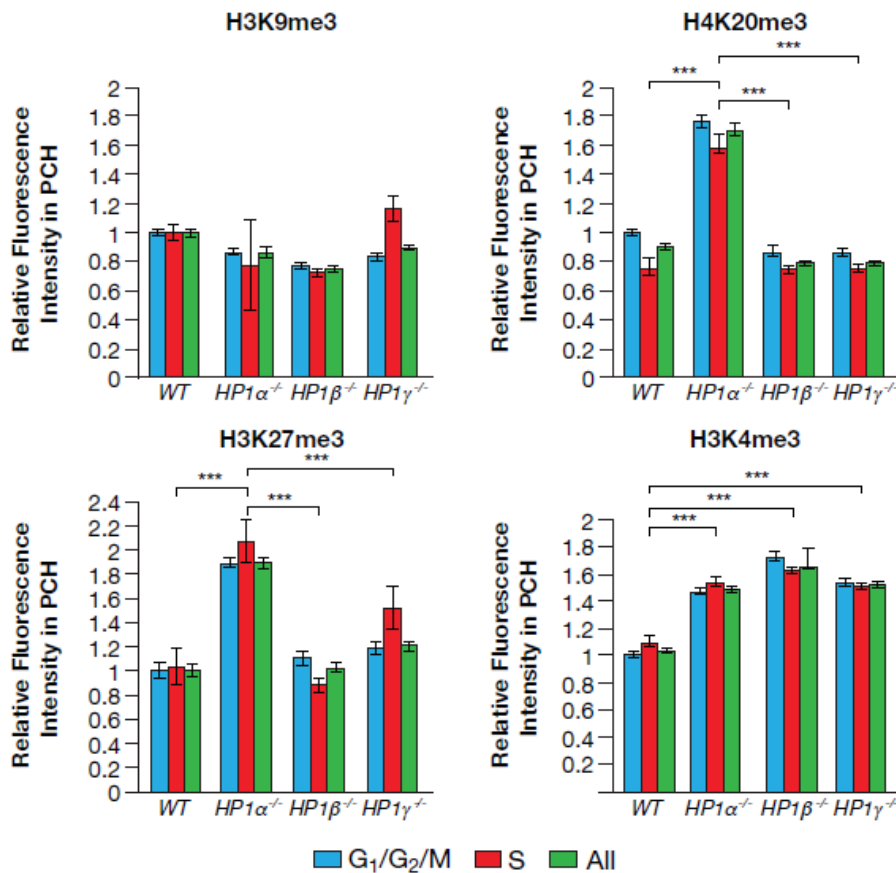


Figura I21. Relació entre les isoformes d'HP1 i les modificacions postraduccional d'histones a l'HPC. Gràfics de la quantificació de la intensitat de fluorescència de H3K9me3 (A), H4K20me3 (B), H3K27me3 (C) i H3K4me3 (D) en MEFS WT, HP1 α ^{-/-}, HP1 β ^{-/-} i HP1 γ ^{-/-} als focis de l'PCH per IF (Bosch-Presegué et al, 2017).

Assaigs de compactació de la cromatina per digestió amb nucleasa microccocal relacionen la pèrdua d'HP1 α en MEFS, amb una significant disminució de l'accessibilitat tant a nivell de focis d'HPC com a nivell global de la cromatina, indicant per tant un augment de la compactació. Mentre que, la pèrdua d'HP1 β i en menor mesura d'HP1 γ , indueix un suau increment de l'accessibilitat (Figura I22) (Bosch-Presegué et al, 2017).

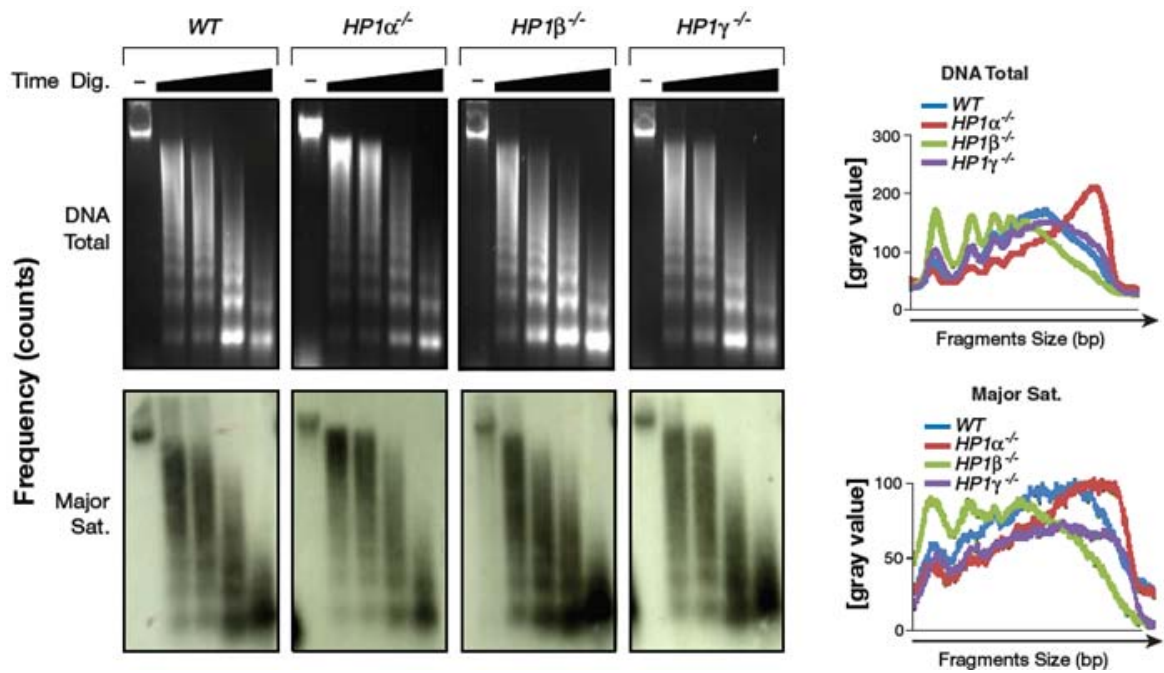


Figura I22. Anàlisi *in vitro* de la compactació de la cromatina en cèl·lules WT i HP1 KO. Imatge representativa de la digestió del genoma amb nucleasa micrococcal (MNase) a diferents temps en MEFS WT i HP1 KO (a dalt). Imatge representativa de Southern Blot incubat amb sonda de major satellites marcada amb [³²P] respectiva (a baix). Els gràfics mostren la quantificació de la intensitat entorn la mida dels fragments de 5 experiments (Bosch-Presegué et al, 2017).

Tot i que s'han establert aquestes relacions funcionals que apunten a un paper diferencial de cada isoforma a l'organització de l'HPC, on HP1 α es trobaria relacionada de manera més íntima amb les marques de l'heterocromatina H3K27me3 i H4K20me3, i tindria un paper a la compactació de la cromatina. Encara no entenem completament el mecanisme d'acció, les relacions funcionals amb els enzims implicats en la deposició d'aquestes marques ni la contribució de cadascuna de les isoformes a l'estructura de les regions d'HPC. La primera línia d'estudi del meu projecte s'ha centrat en aprofundir en el paper específic de les isoformes d'HP1 a l'estructura de l'HPC.

6. MANTENIMENT DE L'HPC SOTA CONDICIONS D'ESTRÈS: PAPER DE SIRT1

Un cop formades les regions d'HPC, les cèl·lules necessiten mantenir aquestes regions especialment sota condicions d'estrès per assegurar l'estabilitat genòmica, ja que l'acumulació d'alteracions al genoma és un factor clau al desenvolupament de tumorigènesi i envelliment. De manera que les cèl·lules han desenvolupat mecanismes de resposta a l'estrès per tal d'assegurar l'estabilitat genòmica i la

supervivència cel·lular (Papamichos-Chronaki & Peterson, 2013; Bosch-Presegué & Vaquero, 2014).

Durant els últims 20 anys, les sirtuïnes han emergit com a factors clau en el manteniment de la integritat genòmica. Poden actuar com a sensors de determinades formes d'estrès, com l'estrès oxidatiu, metabòlic i genotòxic ja que detecten canvis en la proporció de NAD⁺/NADH i coordinar respostes cel·lulars per fer-li front. La funció bàsica de les sirtuïnes és promoure la comunicació entre l'ambient i la cèl·lula per adaptar-se a estrès oxidatiu, metabòlic i genotòxic a través de la regulació tant a nivell d'estabilitat genòmica com d'adaptació metabòlica. A més també participen al sistema endocrí, promovent la comunicació entre cèl·lules a nivell sistèmic. Les sirtuïnes controlen principalment l'estabilitat genòmica mitjançant quatre mecanismes generals: el primer, la regulació de l'estructura de l'heterocromatina facultativa i constitutiva, que és el tema en que ens centrarem; el segon, el control de la progressió del cicle cel·lular; el tercer, la seva participació en la senyalització del dany a l'ADN i en reparació; i el quart, la regulació de funcions mitocondrials, al qual participen de manera més indirecta (Figura I23) (Guarente & Picard, 2005; Papamichos-Chronaki & Peterson, 2013; Bosch-Presegué & Vaquero, 2014).

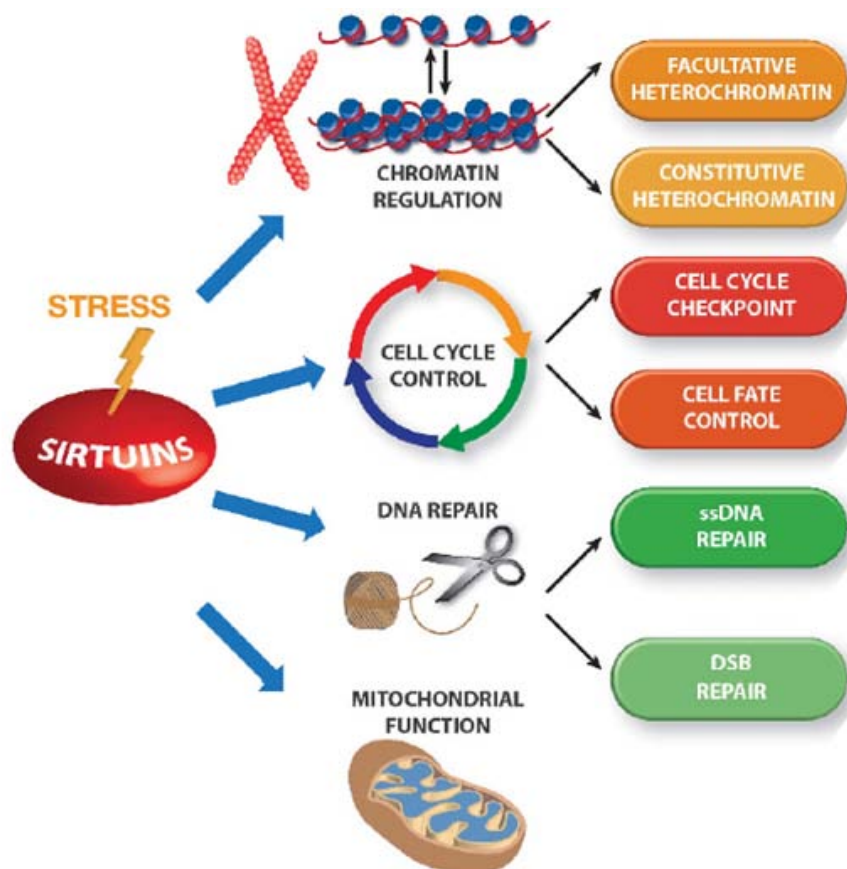


Figura I23. Sirtuïnes i mecanismes d'estabilitat genòmica en condicions d'estrès. Les sirtuïnes participen en múltiples mecanismes per mantenir l'estabilitat genòmica sota condicions d'estrès: 1. Regulació de l'estructura de la cromatina i dels nivells d'expressió; 2. Control del cicle cel·lular; 3.

Reparació de l'ADN; 4. Funcions mitocondrials que promouen protecció genòmica. Es representen els principals nivells regulatoris de cada mecanisme (Bosch-Presegué & Vaquero, 2014).

6.1. Estructura, regulació i funcions de SirT1

SirT1 és la sirtuïna millor descrita, interacciona amb una àmplia varietat de factors i es troba implicada en una gran diversitat de vies cel·lulars importants (Davenport et al, 2014).

SirT1 està codificada al cromosoma 10 tant en humà com en ratolí, i és una proteïna gran d'un pes molecular entorn als 110kDa, que està formada per: un domini catalític central dependent de NAD⁺ que es troba conservat a la resta de sirtuïnes, i dues extensions N-terminal i C-terminal que serveixen com a plataformes per interaccionar amb altres proteïnes reguladores i substrats. Tot i ser una proteïna nuclear, conté dos senyals de localització nuclear (NLS) i dos senyals d'exportació nuclear (NES). I el balanç d'aquestes senyals determinarà la seva localització que tot i ser majoritàriament nuclear, pot trobar-se a citoplasma segons el tipus cel·lular i les etapes del desenvolupament (Figura I24) (Guarente & Picard, 2005; Tanno et al, 2007; Cantó & Auwers, 2012; Davenport et al, 2014).

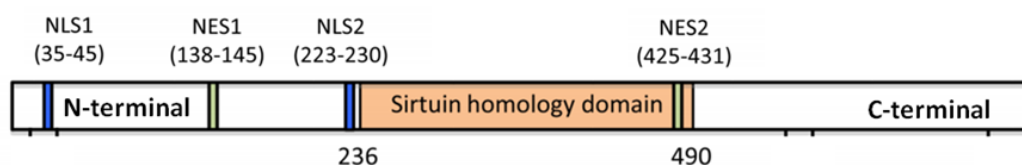


Figura I24. Dominis i senyals de localització de SirT1 en humà. Representació esquemàtica de l'estructura de SirT1 on s'indica la posició del domini catalític central conservat a les sirtuïnes *Sirtuin homology domain*, i les posicions de les dues senyals NLS i de les dues senyals NES (Adaptat de Cantó & Auwerx, 2012).

SirT1 es troba involucrada a una àmplia varietat de processos per tal de mantenir la integritat genòmica sota condicions d'estrès. Els principals processos es poden dividir en la regulació de l'estructura de la cromatina, el control de la progressió del cycle cel·lular, la reparació de d'ADN i la regulació de funcions mitocondrials, tot i que són molts altres els processos en els que es troba involucrada la sirtuïna més estudiada de totes (Saunders & Verdin, 2007; Bosch-Presegué & Vaquero, 2014).

A nivell d'estructura de la cromatina, SirT1 té un paper important a la formació de l'heterocromatina facultativa i al manteniment de l'heterocromatina constitutiva (Bosch-Presegué & Vaquero, 2014). Respecte al seu paper a la formació de l'HF, en condicions d'estrès, SirT1 és reclutada a regions d'eucromatina i desacetila les marques relacionades amb aquestes regions H4K16Ac i H3K9Ac. A més a més, SirT1 interacciona amb la histona H1 i la

desacetila a la K26, produint un increment dels nivells d'histona H1 als promotors, afavorint la compactació de la cromatina. Aquests efectes s'acompanyen de la propagació de les marques de les regions d'heterocromatina com serien H3K9me3 i H4K20me1, i d'una disminució dels nivells de la marca de cromatina activa H3K79me3. SirT1 promou l'*spreading* de H3K9me3 a través de Suv39h1, SirT1 interacciona directament amb Suv39h1 i el desacetila a la K226 del seu domini catalític SET, promovent un augment de l'activitat de Suv39h1, que trimetil·larà H3K9 a aquestes regions. H3K9me3 a la seva vegada reclutarà HP1, i es desencadenarà la propagació d'heterocromatina que resultarà en la formació de la fibra de cromatina compacta (Figura I25) (Vaquero et al, 2004; Vaquero et al, 2007; Vaquero, 2009; Bosch-Presegué & Vaquero, 2014). SirT1, través de la formació d'HF, ajuda a regular l'expressió en resposta a l'estrès de nombrosos factors de transcripció entre els quals es troben NF-kB, p53, HIF-1 α , E2F1, FOXOs, i HSF1 (Luo et al, 2001; Muth et al, 2001; Fulco et al, 2003; Takata et al, 2003). I promou el silenciament epigenètic de les dianes regulades per aquests factors en col·laboració amb altres enzims responsables de les modificacions postraduccional·s d'histones (Vaquero et al, 2004; Kuzmichev et al, 2004). L'exemple més estudiat és el cas de la formació d'HF induïda per SirT1 sota condicions d'estrès en gens ribosomals. D'aquesta manera es produeix la repressió de l'expressió d'aquests gens ribosomals i disminueix la producció cel·lular de proteïnes per tal de mantenir la integritat genòmica (Imai et al, 2000; Murayama et al, 2008).

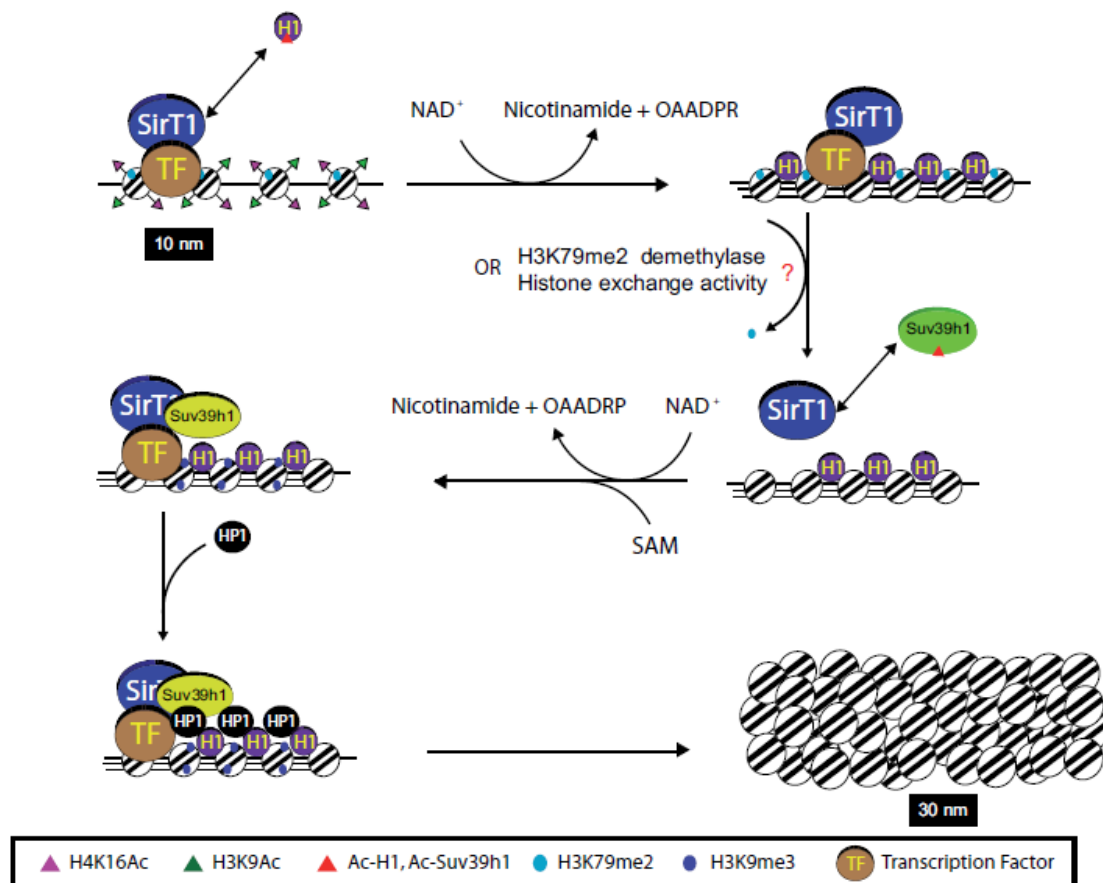


Figura I25. Model de la formació d'HF mediada per SirT1. Esquema del procés de propagació de l'HF iniciada pel reclutament de SirT1 per factors de transcripció, seguit de la desacetilació d'histones per part de SirT1 i el reclutament d'H1 i de Suv39h1. Suv39h1 promourà la trimetilació d'H3K9, que a la seva vegada serà reconegut per HP1 desencadenant d'aquesta manera la propagació de l'heterocromatina (Vaquero, 2009).

Respecte al seu paper en el manteniment de l'HC, SirT1 es troba implicada tant en el manteniment de l'heterocromatina constitutiva telomèrica com de la pericèntrica (Peters et al, 2001; García-Cao et al, 2004; Vaquero et al, 2007; Bosch-Presegué & Vaquero, 2014). El paper de SirT1 al manteniment dels telòmers en mamífer encara roman subjecte a controvèrsies: d'una banda, hi ha evidències que suggereixen que SirT1 inhibeix l'activitat de la telomerasa a través del seu paper a la regulació de l'estabilitat de la subunitat catalítica TERT (Narala et al, 2008). D'altra banda, la deleció de SirT1 es tradueix en un increment de la inestabilitat genòmica i de les aberracions telomèriques suggerint un paper estabilitzador de l'heterocromatina telomèrica (Harley et al, 1990; El ramy et al, 2009). El paper de SirT1 en les manteniment de les regions pericèntriques està ben definit i el comentarem amb detall al següent apartat.

A nivell de control de la progressió del cicle cel·lular, ha estat descrit que SirT1 actua a diferents nivells. D'una banda, SirT1 regula les proteïnes Rb (retinoblastoma) i E2F1, que es troben relacionades amb aquesta transició de fase G₁ a fase S i d'aquesta manera indueix la progressió del cicle cel·lular. SirT1 desacetila també Rb, cosa que promou la fosforilació d'aquest i la proliferació cel·lular (Wong & Weber, 2007) D'altra banda, SirT1 pot induir la parada del cicle cel·lular en lloc de l'apoptosi a través de la desacetilació de FOXO3 i FOXO4 (Furukawa-Hibi et al, 2005; Bosch-Presegué & Vaquero, 2011).

SirT1 també intervé a la reparació de dany a l'ADN, tant de SSB (*single-strand break*) com de DSB (*double-strand break*). SirT1 és reclutat als llocs de l'ADN on s'ha produït dany, i modula l'expressió de gens que intervenen en el procés de reparació de l'ADN. Com a exemple, SirT1 desacetila la proteïna Ku70, que està involucrada en la via de reparació de NHEJ promovent la reparació dels DSB de l'ADN (Wang et al, 2007). SirT1 també modula la senyalització dels DSB a través de la formació de γ -H2A.X, BRCA1, Rad51 i NBS1 sota γ -irradiació per que pugui activar-se la maquinària de reparació (Yuan & Seto, 2007; Yuan et al, 2007). I participa en la reparació de SSB a través de la via de reparació NER (reparació per excissió de nucleòtids) induïts per radiació UV (Fan & Luo, 2010; Ming et al, 2010).

A nivell de metabolisme, SirT1 s'ha relacionat amb efectes positius al metabolisme com una millora al metabolisme de la glucosa, la homeòstasi de lípids i la sensibilitat a la insulina (Boutant & Cantó, 2014). Alguns d'aquests beneficis són deguts, en part, a que SirT1 regula l'activitat de factors de transcripció i reguladors clau a través de la desacetilació d'aquests, entre els quals es troben LKB1 (Lan et al, 2008), AceCS1 (Hallows et al, 2006), FOXO1 (Frescas et al, 2005) i PPAR α (Picard et al, 2004). La rellevància de SirT1 a aquest nivell va més enllà ja

que també participa directament a la senyalització endocrina, com per exemple a la via IGF (*insulin like growth factor*) (Lemieux et al, 2005).

Entre els mecanismes moleculars que regulen l'activitat biològica de SirT1 es troben els relacionats amb el control de l'expressió gènica. L'expressió de SirT1 generalment és més elevada en situacions d'estrès, i està controlada per nombrosos factors de transcripció implicats a la regulació del cycle cel·lular i apoptosi, entre d'altres (Milner, 2009; Rajendran et al, 2011; Cantó & Auwers, 2012). Per exemple, el factor de transcripció E2F1, el qual indueix la progressió del cycle cel·lular de fase G₁ a fase S, s'uneix directament al promotor de SirT1 i incrementa la seva expressió. A la seva vegada, l'activitat de desacetilació de SirT1 inhibeix l'activitat transcripcional d'E2F1 (Wang et al, 2006; Rajendran et al, 2011). Com a altre exemple, l'associació dels repressors transcripcionals CtBP i HIT1, que es produeix en resposta a canvis metabòlics, promouen una reducció de CtBP al promotor de SirT1 i la derepressió de la seva expressió gènica (Kumar et al, 2002). Un altre cas interessant és, sota condicions de privació de nutrients, quan el factor de transcripció FOXO3a forma un complex amb el supressor tumoral p53, que s'uneix directament al promotor de SirT1 augmentant així la seva expressió (Nemoto et al, 2004; Cantó & Auwers, 2012).

Una altre manera de regular l'activitat biològica de SirT1 és a través del control de la seva activitat catalítica, que es pot donar mitjançant modificacions postraduccionals (Rajendran et al, 2011). Per exemple, SirT1 pot ser fosforilat per la quinasa JNK2 (*c-Jun N-terminal kinase 2*) i CK2 (*casein kinase 2*) relacionades amb la regulació de l'estabilitat de la proteïna. Ambdues són reguladors clau de funcions biològiques com la progressió del cycle cel·lular i la supervivència (Ford et al, 2008; Zschoerning & Mahlknecht, 2009). Múltiples residus conservats susceptibles de fosforilació han estat identificats en SirT1 els quals són dianes potencials d'una gran varietat de quinases entre les que destaquen ATM (*ATM serine/threonine kinase*), CK1 (*casein kinase 1*), DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*), ERK1 (*extracellular signal-regulated kinase*), GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) i MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Sasaki et al, 2008). Recentment ha estat descrit que dos membres de quinases regulades per fosforilació de tirosina DYRK1A i DYRK3, que juguen papers importants al creixement corporal i a la fisiologia cerebral, promouen la supervivència cel·lular mitjançant la fosforilació de SirT1 que augmenta l'activitat catalítica d'aquesta (Guo et al, 2008). Altre exemple seria el cas de la sumoilació de SirT1, que ha estat demostrat que indueix un augment de la seva activitat desacetilasa. L'exposició a diversos tipus d'estrès, com la irradiació UV o el peròxid d'hidrogen, resulten en la sumoilació de SirT1 mediada per la desumoilasa SENP1 (*sentrin-specific protease 1*) i en la inactivació de la seva activitat desacetilasa. Com a conseqüència es promou l'apoptosi cel·lular (Rajendran et al, 2011). No només es pot controlar l'activitat catalítica de SirT1 a partir de modificacions postraduccionals, si no que l'associació de SirT1 amb diferents complexos proteics també pot induir a un increment o a una disminució de la seva activitat. Com a exemple d'inhibició, la

proteïna DBC1 (*deleted in breast cancer-1*) forma un complex estable amb el domini catalític de SirT1 i inhibeix l'activitat de SirT1 (Milner, 2009). D'altra banda, l'associació de SirT1 amb AROS (*active regulator of SirT1*) augmenta l'activitat catalítica de SirT1 (Milner, 2009). Finalment, l'activitat catalítica de SirT1 pot ser regulada per la disponibilitat de NAD⁺ a les cèl·lules, ja que són enzims que requereixen NAD⁺ per realitzar les seves funcions. De manera que, la privació de glucosa i canvis en el metabolisme associats a la restricció calòrica alteren la proporció de NAD⁺/NADH incrementant l'activitat de SirT1 (Cantó & Auwerx, 2012).

6.2. Paper de SirT1 en el manteniment de l'HPC

El manteniment de l'HPC és crucial per la preservació de l'estabilitat genòmica, especialment sota condicions d'estrès. Alteracions de l'estructura de l'HPC es relacionen amb defectes en la segregació cromosòmica, amb aberracions cromosòmiques, i amb inestabilitat genòmica, que a última instància poden portar al desenvolupament de càncer (Eymery et al, 2009) i envelliment (Saksouk et al, 2015), entre d'altres.

Estudis del grup demostren que SirT1 té un paper clau en el manteniment de l'estructura de l'HPC a través de Suv39h1. Sota condicions d'estrès oxidatiu i metabòlic, les cèl·lules activen el programa de resposta a l'estrès i s'incrementen els nivells de SirT1. SirT1 interacciona per la seva regió N-terminal amb la regió N-terminal i el chromodomain de Suv39h1. Aquesta interacció evita la poliubiquitinació de la K87 del chromodomain de Suv39h1 per part d'MDM2, una E3-ubiquitina ligasa, prevenint així la seva degradació proteosòmica. Com a conseqüència, es produeix l'estabilització de Suv39h1, un increment considerable de la vida mitjana i un augment dels nivells de la proteïna. Aquest increment de la disponibilitat de Suv39h1 en el nucli, s'associa amb un augment del recanvi i de la mobilitat de Suv39h1 a l'HPC, assegurant el manteniment d'H3K9me3 i augmentant així la protecció genòmica a aquestes regions d'PCH (Figura I26) (Vaquero et al, 2007; Vaquero, 2009; Bosch-Presegué et al, 2011; Bosch-Presegué & Vaquero, 2014).

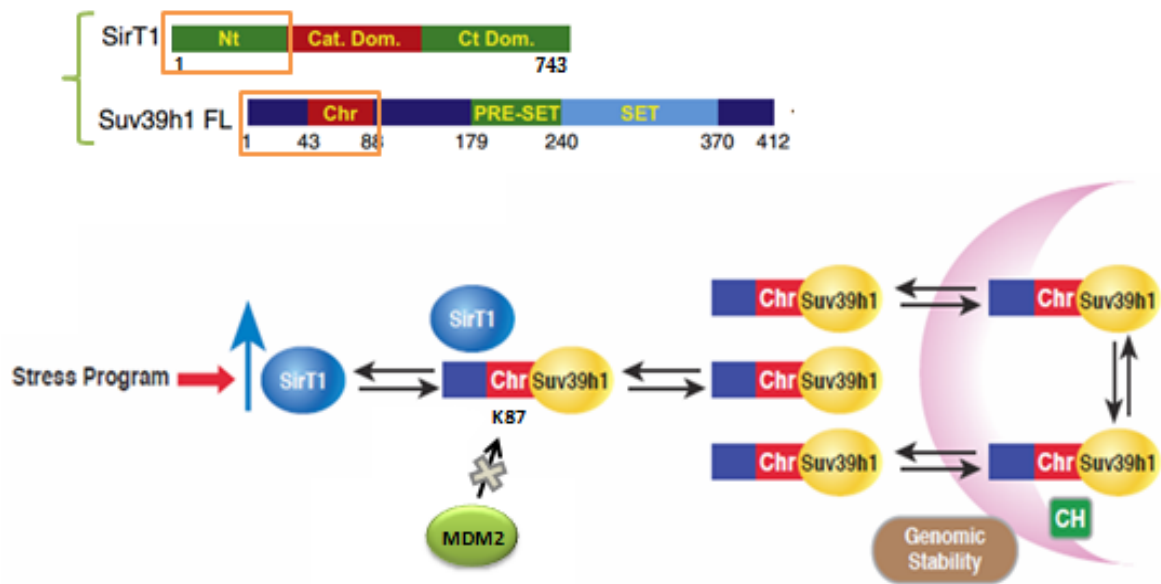


Figura I26. Model del manteniment de l'HPC mediat per SirT1. Esquema dels dominis de SirT1 i Suv39h1 que interactuen, i de la funcionalitat de SirT1 sota condicions d'estrès en el manteniment de les regions d'HPC per tal de preservar l'estabilitat genòmica (Adaptat de Bosch-Presegué et al, 2011).

D'aquesta manera, la pèrdua de SirT1 a cèl·lules embrionàries de ratolí (MEFs) es relaciona amb nivells més baixos de Suv39h1, amb una deslocalització d'H3K9me3 a les regions d'HPC, i degut a que la marca H3K9me3 recluta HP1 a l'HPC, també es relaciona amb la deslocalització d'HP1 a aquestes regions (Figura I27). Com a conseqüència d'aquests esdeveniments, en les MEFs *Sirt1*^{-/-} es produeix una condensació cromosòmica reduïda, inestabilitat genòmica, defectes en la segregació cromosòmica i aneuploidies (Vaquero et al, 2007; Wang et al, 2008; Bosch-Presegué et al, 2011).

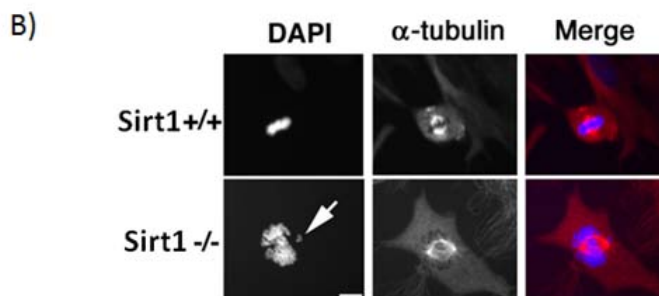
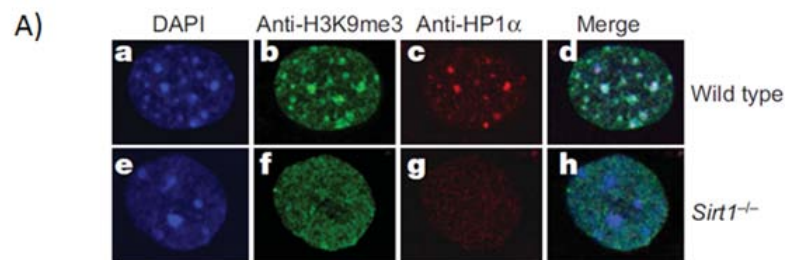


Figura I27. Alteració de l'organització de l'HPC en MEFs de SirT1^{-/-}. **A.** Comparació per IF de la localització d'H3K9me3 i d'HP1 α en MEFs SirT1^{-/-} i WT; **B.** IF de tubulina que mostra cromosomes incomplets i desigual segregació mitòtica en MEFs de SirT1^{-/-} en comparació amb les cèl·lules WT (Vaquero et al, 2007; Wang et al, 2008).

6.3. Estructura, regulació i funcions de PARP-1

PARP-1 és el membre fundador de la família de proteïnes PARP (*poly (ADP-ribose) polymerases*), i ha sigut el més estudiat. Aquesta família es troba molt conservada evolutivament en eucariotes i actualment, han estat descrit 17 membres en mamífer. La proteïnes PARP es troben implicades a la reparació dels trencaments de cadena de l'ADN (*DNA-strand breaks*) i al control de l'estructura i la integritat de la cromatina en resposta al dany a l'ADN, per tal de mantenir l'estabilitat genòmica. De manera que en resposta a *DNA-strand breaks*, les proteïnes PARP catalitzen la unió covalent de múltiples ADP-ribose al grup γ -carboxil de residus Glu de la proteïna acceptora, utilitzant com a cofactor NAD⁺. El polímer resultant consisteix en un polianió lineal o ramificat de longitud variable que també pot interaccionar de manera selectiva amb nombroses factors diana que participen en la resposta al dany a l'ADN i en el manteniment de la cromatina (Rouleau et al, 2004; Schneider et al, 2006; Quénet et al, 2009; Alemasova & Lavrik, 2019).

PARP-1 és una proteïna nuclear que té un pes molecular d'uns 116 kDa. Està formada per tres dominis: el domini N-terminal, que és el domini d'unió a l'ADN; el domini central, que és el domini d'automodificació; i el domini C-terminal, que és el domini catalític (Figura I28) (Schneider et al, 2006).

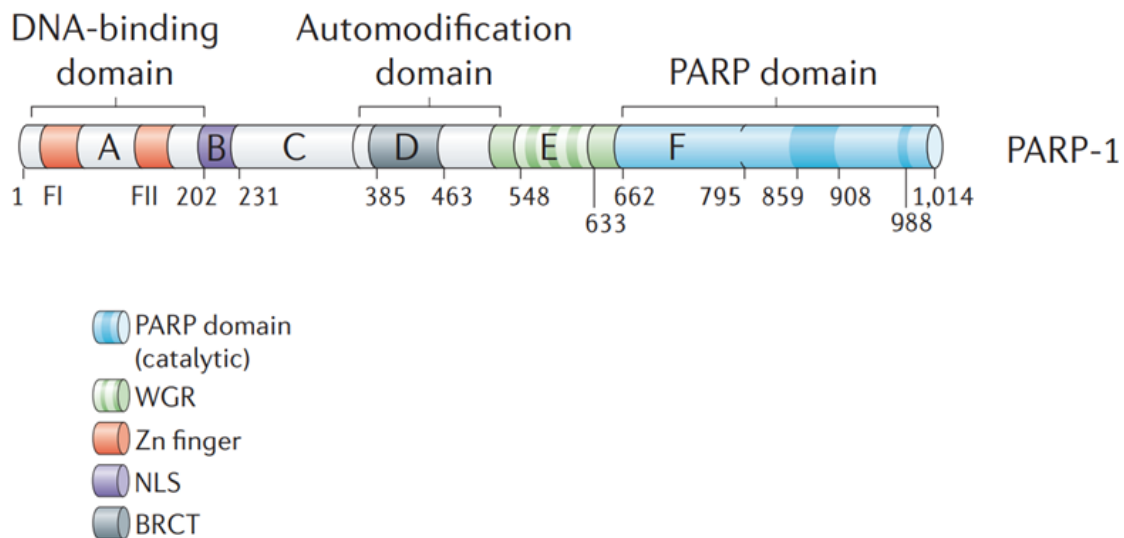


Figura I28. Estructura i dominis de PARP-1 en mamífer. Representació esquemàtica de l'estructura de PARP-1 on s'indica la posició dels seus tres dominis, el domini d'unió a l'ADN, el

domini d'automodificació i el domini PARP. Es mostra també la posició de diferents mòduls com el mòdul WGR, NLS, BRCT i els dits de Zn (Schneider et al, 2006).

El domini d'unió a l'ADN, es caracteritza per la presència de dos dits de zinc i d'una senyal de localització nuclear (NLS). Els dos dits de zinc formen l'anomenat motiu de detecció de trencaments d'ADN (*DNA-break-sensing motif*), que juga un paper crucial en el reconeixement dels trencaments de l'ADN. La interacció de PARP-1 amb l'ADN danyat és necessària per a que tingui lloc el plegament del domini catalític i per l'activació de la seva activitat enzimàtica de poli(ADP)ribosilació (Rouleau et al, 2004; Schneider et al, 2006; Alesmasova & Lavrik, 2019). El domini d'automodificació, conté un mòdul BRCT que està involucrat a la mediació de les interaccions de PARP-1 amb múltiples proteïnes. Aquest domini es troba també en nombroses proteïnes involucrades en la resposta al dany a l'ADN i als *checkpoints* del cicle cel·lular. L'automodificació de PARP-1 pot regular tant les interaccions entre PARP-1 i l'ADN com de PARP-1 i proteïnes, de manera que es podria considerar com un domini regulador (Quénet et al, 2009; Alesmasova & Lavrik, 2019). El domini catalític és un domini molt conservat a la família de proteïnes PARP i es troba a tots els membres que en formen part. Aquest domini és el responsable de dur a terme la reacció de poli(ADP)ribosilació a les proteïnes diana (Tulin et al, 2003; Rouleau et al, 2004; Alesmasova & Lavrik, 2019).

PARP-1 es troba implicat en nombrosos processos cel·lulars entre els quals es troben la reparació del dany a l'ADN, la regulació de la longitud dels telòmers, la regulació dels centròmers i formació del fus mitòtic, la regulació de la transcripció i el metabolisme energètic (Taula I9) (Rouleau et al, 2004; Schneider et al, 2006).

Funcions importants	Mecanisme implicat
Reparació de l'ADN	Detecció de SSBs, reclutament de XRCC1 i dels enzims de reparació del dany
Regulació de telòmers	ADP-ribosilació de telòmers i estabilització
Regulació de centròmers	Interacció amb CENP-A, CENP-B i Bub3, estabilització de cromàtides i formació del fus mitòtic
Regulació de la transcripció	Regulació del complex de pre-iniciació de l'ARN pol II
Metabolisme energètic	Interacció amb PPAR γ , FOXO1 i ER

Taula I9. Funcions importants de PARP-1. Taula que mostra funcions destacades de PARP-1 i els mecanismes implicats.

PARP-1 té un rol clau a l'organització espacial i temporal de la reparació del dany a l'ADN. És un sensor de *DNA-strand breaks* i al unir-se a aquests la seva activitat catalítica pot incrementar-se fins a 500 vegades. Un cop PARP-1 detecta SSBs (*single-strand-DNA breaks*), la síntesi de poli(ADP)ribosa a l'ADN danyat porta al reclutament immediat de la proteïna plataforma de reparació dels SSBs

(SSBR) anomenada XRCC1 i a la relaxació de la fibra de cromatina a través de la poli(ADP)ribosilació de les cues de les histones H1 i H2B. D'aquesta manera es facilita la unió a l'ADN danyat dels enzims implicats en la reparació que interactuen amb XRCC1 (Taula 19) (Ogata et al, 1980; Poirier et al, 1982; Ogata et al, 1990; Althaus et al, 1994; Okano et al, 2003; Schneider et al, 2006).

PARP-1 participa al manteniment de la integritat de les regions d'HC. Així doncs, PARP-1 està involucrat a la regulació de la longitud dels telòmers. Ha estat descrit que tant PARP-1 es localitza a telòmers i que la poli(ADP)ribosilació a aquestes regions ajuda a mantenir l'ADN telomèric. A més a més, s'ha trobat una seqüència d'unió a poli(ADP)ribosa dins del domini catalític de TERT, el component enzimàtic de la telomerasa responsable de l'elongació dels telòmers. S'ha especulat que PARP-1 podria unir-se i regular la seva activitat enzimàtica, tot i que encara no ha estat comprovat (Taula 19) (Pleschke et al, 2000; Cook et al, 2002; Chan & Blackburn, 2002). A més, PARP-1 també intervé en la regulació dels centròmers. Ha estat localitzat a centròmers, on interacciona amb les proteïnes centromèriques CENP-A, CENP-B i Bub3. Aquestes proteïnes centromèriques són poli(ADP)ribosilades per PARP-1 durant la inducció de dany a l'ADN per irradiació i ha estat descrit que promouen a una disminució dels trencaments de cromàtides centromèriques. No només això, tant PARP-1 com PARP-2 són requerits per l'organització del cinetocor i per la formació del fus mitòtic durant la divisió cel·lular (Rouleau et al, 2004; Schneider et al, 2006; Saxena et al, 2002; Saxena et al, 2012). PARP-1 es distribueix àmpliament no només pels centròmers si no també per les regions pericèntriques, i s'ha especulat que podria ajudar a mantenir l'estructura d'aquestes regions a través de les seves interaccions amb altres proteïnes (Taula 19) (Saxena et al, 2002; Ménissier de Murcia, 2003; Rouleau et al, 2004; Saxena et al, 2012).

L'activitat de PARP-1 pot ser regulada per modificacions postraduccionals i per interaccions amb proteïnes reguladores. Pel que fa a la regulació de l'activitat de PARP-1 per interacció amb proteïnes reguladores, han estat descrits múltiples casos. Per exemple, la interacció de la variant d'histona macroH2A1.1 amb PARP-1 produeix una disminució de la seva activitat catalítica com a mecanisme de regulació de la transcripció del gen Hsp70.1 i per al silenciament del cromosoma X inactiu (Ouararhni, 2006; Nusinow et al, 2007). La interacció del supressor tumoral p53 amb PARP-1 estimula l'activitat de PARP-1 i aquesta activació es troba relacionada amb la regulació de Cdck per l'arrest del cicle cel·lular (Masutani et al, 1999). Altre exemple és el cas de la interacció de la proteïna XPA, important en la reparació de dany a l'ADN a través de la via NER (*nucleotide excision repair*), i PARP-1 que incrementa l'activitat de PARP-1 durant el procés de NER (Fischer et al, 2014). Han estat descrites un gran nombre de modificacions postraduccionals que regulen l'activitat enzimàtica de PARP-1, incloses la mono(ADP)ribosilació, la fosforilació, la metilació i l'acetilació. La metilació de PARP-1 al seu residu K508 per SET7/9, estimula la seva activitat catalítica. Aquest residu es troba situat al domini d'automodificació i la seva modificació pot estabilitat aquest domini

catalític i estimular l'activitat d'auto(ADP)ribosilació (Alemasova & Lavrik, 2019). Altre exemple d'interès és el cas de la regulació de PARP-1 per la quinasa ERK2, que fosforila PARP-1 i l'activa de manera independent de la unió a l'ADN (Cohen-Armon, 2007).

6.4. Antagonisme funcional entre SirT1 i PARP-1 en el manteniment de l'HPC

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, SirT1 té un paper important en el manteniment de l'HPC sota condicions d'estrès. La pèrdua de SirT1 en MEFS afecta de manera dependent de Suv39h1 a la localització d'H3K9me3 als focis d'HPC, i això elimina també la localització d'HP1 a aquests focis. Aquests fenòmens condueixen a una alteració de l'organització de l'HPC i a defectes cromosòmics (Vaquero et al, 2007; Wang et al, 2007).

Ha estat descrit un antagonisme funcional entre les proteïnes SirT1 i PARP-1 en el control del manteniment de l'HPC. Aquests estudis mostren que, la pèrdua de SirT1 en MEFS produeix una localització anormal d' H3K9me3 als focis de l'HPC (Figura I29A), i la localització d'HP1 també es veu alterada als focis d'heterocromatina (Figura I29B), consistent amb les dades publicades. Curiosament, l'addicional pèrdua de PARP-1 en un al·lel o en ambdós sorprenentment rescata la localització d'H3K9me3 (Figura I29A) i d'HP1 (Figura I29B) observada a les cèl·lules WT(El ramy et al, 2009).

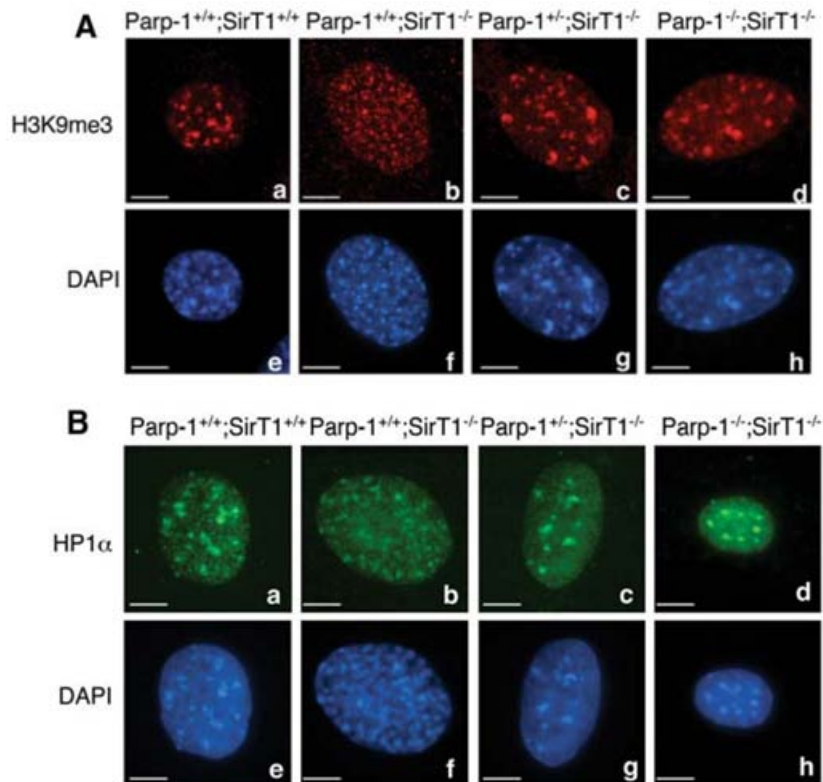


Figura I29. Antagonisme funcional entre SirT1 i PARP-1 en l'organització de l'HPC. Imatges representatives de la distribució (A) d'H3K9me3 i (B) d'HP1 α per IF en MEFs PARP-1^{+/+}, SirT1^{+/+}; PARP-1^{+/+}, SirT1^{-/-}; PARP-1^{+/-}, SirT1^{-/-}; i PARP-1^{-/-}, SirT1^{-/-} (El ramy et al, 2009).

En línia amb aquestes observacions, la pèrdua de SirT1 correlaciona amb una major incidència de figures mitòtiques anormals mostrant configuracions de metafases aberrants. Però, l'addicional deleció de PARP-1 en un al·lel o en ambdós, rescata el fenotip mitòtic normal (Figura I30) (El ramy et al, 2009).

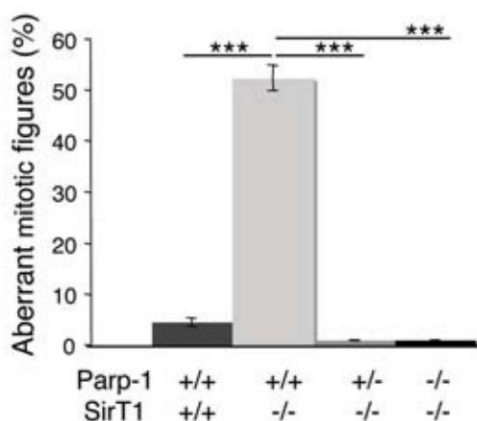


Figura I30. Antagonisme funcional entre SirT1 i PARP-1 en la regulació de la divisió mitòtica. Histograma que mostra el percentatge de mitosis aberrants als fenotips indicats (El ramy et al, 2009).

Aquests resultats suggereixen un antagonisme funcional entre SirT1 i PARP1 respecte H3K9me3 i HP1 a l'HPC. Però tot i haver-se descrit aquesta relació funcional, encara no es coneix el mecanisme d'acció ni les relacions funcionals entre els factors implicats. En funció de les dades que hi ha en aquest moment, una possibilitat seria que aquest antagonisme funcional entre SirT1 i PARP-1 fos degut a la regulació per part d'aquestes dues proteïnes respecte Suv39h1, degut a l'efecte de SirT1 dependent de Suv39h1 a les regions HPC. La segona línia d'estudi del meu projecte s'ha centrat en aprofundir en el coneixement d'aquest antagonisme funcional de SirT1-PARP1 a les regions d'PCH.

7. LIMITACIÓ DE L'EUCROMATINA I L'HETEROCROMATINA PER LES REGIONS FLANQUEJANTS

A la dècada 1950, va ser postulada l'existència de regions flanquejants anomenades *boundary elements*, *CTCF boundaries* o *insulators*, que limitaven les regions d'eucromatina i les d'heterocromatina per tal de mantenir-les separades i evitar la propagació de l'heterocromatina per preservar l'eucromatina adjacent.

Estudis més recents descriuen les tres funcions principals d'aquests *insulators*: la primera, fer de barrera o límit per evitar que l'heterocromatina repressiva es propagui al domini veí. La segona, permetre la formació de bucles tridimensionals de les regions genòmiques al promoure contactes entre *insulators*, per tal de d'organitzar la cromatina en glòbuls fractals. I la tercera, bloquejar la funció dels *enhancers* (potenciadors de la transcripció gènica) al situar-se entre aquest *enhancer* i el promotor, permetint que els *insulators* produeixin efectes oposats, ja sigui facilitant el manteniment de l'estat transcripcionalment actiu o inhibint l'acció dels *enhancers* (Herold et al, 2012; Wang et al, 2014; Kim et al, 2015; Arzate-Mejía, 2018).

Les primeres seqüències identificades com a flanquejants va ser les seqüències *scs i scs elements* que flanquejaven el gen Hsp70 de *Drosophila* (Udvardy et al, 1985). I les primeres que es van identificar en vertebrats van ser els *elements 5HS4* de pollastre, que es troben flanquejant el grup de gens de la β -globulina (Chung et al, 1993). Aquestes seqüències flanquejants tenen com a característiques comunes que són seqüències nucleotídiques curtes i que presenten el cor invariable CCnnnnGnnGGC (Ohlson et al, 2010; Herold et al, 2012, Kim et al, 2015).

A aquestes seqüències s'uneixen factors associats als boundary elements, que intervenen en la funció aïllant d'aquestes regions. La primera proteïna associada identificada en vertebrats va ser CTCF (*CCCTC-binding factor*) (Cuddapah et al, 2008). Posteriorment, es va demostrar que CTCF es troba molt conservada en diferents espècies eucariotes on actua com a regulador principal de l'arquitectura de la cromatina, definint els límits entre l'eucromatina i l'heterocromatina. CTCF s'uneix a les regions flanquejants i s'associa amb la làmina nuclear i amb H3K27me3 de les regions d'heterocromatina constitutiva que limita (Mukhopadhyay et al, 2004; Herold et al, 2012; Xiao et al, 2015). Molts altres factors s'associen als *boundary elements*, per exemple, aquestes regions són riques en cohesina. Ha estat ben demostrat que CTCF interacciona amb el complex proteic cohesina i el recluta (Rubio et al, 2008). Aquestes regions es caracteritzen també per una depleció de nucleosomes que podria estar regulada per la maquinària de remodelació de la cromatina i els pocs nucleosomes d'aquestes regions contenen normalment marques de cromatina activa com H4K3me3 o tenen incorporades variants d'histones com H2A.Z (**Figura I31**) (Ohlson et al, 2010; Herold et al, 2012; Bastiaan & Laat, 2013).

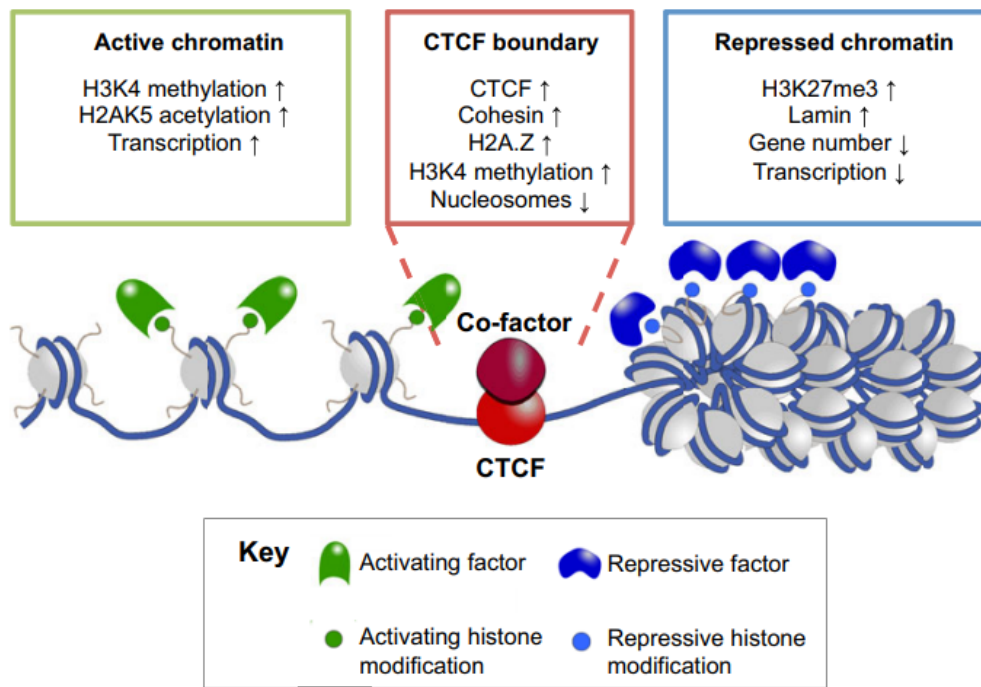


Figura I31. Característiques dels *boundary elements*. Els *boundary elements* o *CTCF elements* s'associen amb característiques específiques de la cromatina com: la depleció del nucleosomes; marques de cromatina activa com seria la metilació d'H3K4; la incorporació de variants d'histones com H2A.Z; i l'augment de cohesines. Aquests *boundary elements* es troben entre dominis amb patrons de modificacions contraries corresponents a estats de transcripció oposats (Herold et al, 2012).

CTCF, el mestre regulador de l'arquitectura tridimensional de la cromatina, és una proteïna nuclear gran d'aproximadament 130kDa. Aquesta proteïna està formada per tres dominis: el domini N-terminal, el domini C-terminal i el domini central que conté 11 dits de zinc (Figura I32) (Kim et al, 2015; Yin et al, 2017, Arzate-Mejía et al, 2018).

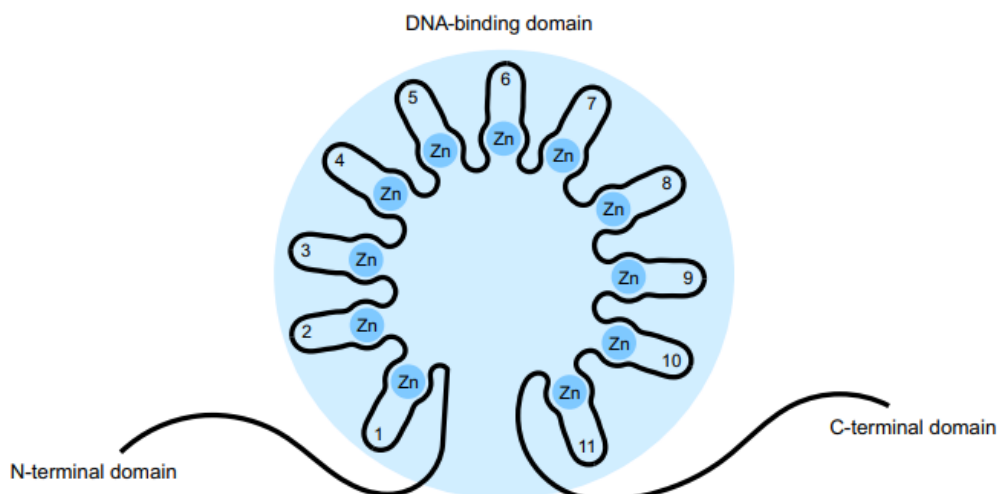


Figura I32. Estructura i dominis de CTCF. Representació esquemàtica dels dominis N-terminal, el domini C-terminal i el domini central que conté 11 dits de Zn (Arzate-Mejía et al, 2018).

Els 11 dits de zinc del domini central cooperen entre ells i són els responsables de la unió de CTCF a l'ADN. Aquests es troben altament conservats degut a la seva importància i confereixen a CTCF la capacitat d'unir-se a 55.000-75.000 seqüències flanquejants al genoma de mamífers, de les quals un 50% formen part de regions intergèniques, un 35% de regions intragèniques i un 15% de regions properes als promotors. Els dits de zinc permeten a CTCF unir-se a un nombre tant elevat d'elements de seqüència ja que li confereixen flexibilitat, dinàmica d'estructura i adaptabilitat. Tots tres dominis de CTCF poden interactuar amb una gran varietat de proteïnes estructurals, de remodeladors de la cromatina, i factors de transcripció, i també amb ARN, i són susceptibles de patir modificacions postraduccionals que poden modular la interacció de CTCF amb l'ADN, amb l'ARN o amb altres proteïnes (Ohlson et al, 2010; Kim et al, 2015; Yin et al, 2017; Arzate-Mejía et al, 2018).

La variant d'histona H2A.Z és molt abundant a les regions flanquejants i també intervé en la formació dels límits cromatínics. Ha estat descrit que H2A.Z (HTZ1 a llevat) es troba enriquida a regions d'eucromatina i que actua sinèrgicament amb les regions flanquejants per prevenir la propagació ectòpica de l'heterocromatina en *Saccharomyces*. De manera que, s'ha vist que es produeix la propagació ectòpica dels patrons de modificació d'histones associades a l'heterocromatina en cèl·lules que no tenen HTZ1 (Meneghini et al, 2003; Greaves et al, 2007). Un estudi molt recent descriu que, H2A.Z regula el desembolicament dels nucleosomes i la unió de CTCF a aquestes regions en ESC de ratolí. Els resultats d'aquest estudi mostren que H2A.Z està enriquit als nucleosomes desembolicats en comparació amb els nucleosomes canònics, i que podria tenir un paper en la regulació gènica i en la regulació de la unió de CTCF mitjançant la modulació dels estats de desenrotllament dels nucleosomes (Wen et al, 2020).

8. IMPORTÀNCIA DE L'ESTABILITAT GENÒMICA

El manteniment de les regions d'HPC és de vital importància especialment sota condicions d'estrès oxidatiu, genotòxic o metabòlic. Aquestes formes d'estrès poden alterar l'estructura i el grau de compactació de les regions d'HPC. I consegüentment amb aquesta relaxació de la cromatina, es produeix la inducció de la transcripció dels *major satellites* (Jolly et al, 2004; Rizzi et al, 2004; Bouzinba-Segal et al, 2006, Hall et al, 2012). Mentre que a les cèl·lules sense estrès es troben nivells basals de transcrits de *major satellites*, l'acumulació d'aquests transcrits porta a defectes mitòtics com malformacions del fus mitòtic, pèrdua de cohesió entre cromàtides germanes, aberracions cromosòmiques, defectes a la segregació dels cromosomes i aneuploidies (Bouzinba-Segal et al, 2006; Hall et al, 2012). L'alteració del grau de compactació de les regions d'HPC juntament amb l'expressió de *major satellites*, produeixen l'acumulació d'alteracions cel·lulars que

porten a inestabilitat genòmica, un factor clau en el desenvolupament de moltes patologies humanes com el càncer, les malalties neurodegeneratives, els trastorns cardiovasculars i els trastorns endocrins, entre d'altres. A més a més, la inestabilitat genòmica és una de les principals causes de l'envelliment (Bosch-Presegú & Vaquero, 2014; Yao & Dai, 2014; Ferguson et al, 2015; Andor et al, 2017; Fioriniello et al, 2020).

Un exemple interessant és el cas de la malaltia rara ICF1. El síndrome ICF1 (*type I immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies*) és una malaltia que encaixa en l'escenari de defectes relacionats amb l'HPC. Aquesta patologia és una malaltia que es manifesta com a autosòmica recessiva i es caracteritza per immunodeficiència severa, anomalies craniofacials i inestabilitat genòmica. El síndrome ICF1 està causat per mutacions a DNMT3B, responsable de l'hipometilació de satèl·lites II i III en humans (Matarazzo et al, 2009).

Un altre exemple és el cas del supressor tumoral KDM2A (*lysine-specific demethylase 2A*) que s'ha trobat *downregulada* al càncer de pròstata. La baixada de KDM2 resulta en la pèrdua d'HP1 a les regions d'HPC, i en una inducció de la transcripció de *major satellites* tant en cèl·lules humanes com de ratolí. És més, l'expressió de KDM2A a càncer de pròstata, és inversament proporcional al grau de severitat i pronòstic (Frescas et al, 2008; Iotti et al, 2011; Ting et al, 2011).

BRCA1 (*breast cancer 1*) és una proteïna que es troba mutada a determinats tipus de càncer de mama i d'ovari hereditaris. Recentment ha estat descobert que, BRCA1 participa en el manteniment de les regions pericèntriques i centromèriques. Quan es deleciona BRCA1, es produeix un increment global tant de *major satellites* com de *minor satellites* en cèl·lules de ratolí, i d'*alfa satellites* en cèl·lules humanes. I aquest increment es relaciona amb defectes del fus mitòtic i amb trencaments de l'ADN de cadena doble (Zhu et al, 2011; Ting et al, 2011; Hall et al, 2012).

Com a altre cas, la metilació dels *satellites* es troba relacionada amb l'estabilitat genòmica i amb la correcta segregació cromosòmica. En un gran nombre de càncers humans ha estat descrita la hipometilació dels *satellites* II del cromosoma 1 i 16 que s'associa al grau tumoral i al risc de recaiguda. Un dels tipus de càncers que presenten hipometilació i reordenaments dels satèl·lites II pericèntrics del cromosoma 1 són les neoplàsies hematològiques com és el cas del limfoma de no Hodgkin i de múltiples mielomes que tenen pertorbada l'organització nuclear de HPC del cromosoma 1 (Bacon et al, 2001; Barki-Celli et al, 2005).

L'estudi de l'estructura i manteniment de les regions d'HPC és clau per entendre com l'organització d'aquestes regions participa a l'estabilitat genòmica i ens permet avançar en el coneixement de com la seva desregulació intervé en l'aparició d'un gran nombre de malalties humanes, entre les quals es troben les dues malalties amb major taxa de mortalitat al món, les malalties cardiovasculars i el càncer. L'aprofundiment en aquest camp pot ampliar la visió sobre possibles

perspectives terapèutiques i la versatilitat de mètodes per millorar la teràpia gènica (Hall et al, 2012, Fioriniello et al, 2020).

OBJECTIUS

L'estudi de l'estructura i el manteniment de les regions d'HPC és vital per entendre els mecanismes que participen al manteniment de l'estabilitat genòmica (Hall et al, 2012). Tot i que s'ha avançat considerablement als últims 30 anys, encara no en tenim una perspectiva complerta dels components associats a la seva estructura, la seva regulació, la seva dinàmica estructural i la seva contribució funcional. Aquesta tesi ha intentat avançar en aquest coneixement mitjançant el desenvolupament d'alguns d'aquests aspectes específics que es detallen a continuació:

1. Determinar el paper específic de les isoformes d'HP1 a l'estructura i organització de l'HPC.

Al llarg del temps s'ha considerat el paper de les isoformes d'HP1 si més no equivalent degut a la forta redundància funcional d'aquestes proteïnes en alguns aspectes concrets, a la conservada seqüència aminoacídica i a la seva similar localització. Actualment però, aquesta perspectiva ha canviat, i han estat descrites múltiples funcions específiques de les isoformes d'HP1. Però tot i així, la contribució específica d'HP1 α , HP1 β i HP1 γ a l'HPC no està clara. Estudis previs del grup han relacionat la pèrdua de la isoforma HP1 α amb un significatiu enriquiment de les marques associades a heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3 a l'HPC, i amb un augment de la compactació de la cromatina. La primera part d'aquesta tesi s'ha centrat en l'estudi de la relació de les isoformes d'HP1 amb les principals marques històniques associades a l'heterocromatina, les seves relacions funcionals amb els enzims i proteïnes associades a aquestes regions, i el seu paper específic a l'estructura i organització de l'HPC, i com a conseqüència el seu impacte en l'estabilitat genòmica.

2. Estudiar el paper de PARP-1 en el control del manteniment de l'HPC mediat per SirT1 i Suv39h1.

Estudis del nostre grup descriuen que SirT1 té un paper clau al manteniment de l'estructura de l'HPC sota condicions d'estrès. La pèrdua de SirT1 afecta de manera dependent de Suv39h1 a la localització d'H3K9me3 als focis d'HPC, i afecta també la localització d'HP1 a aquests focis. Aquests fenòmens porten a una alteració de l'organització de l'HPC i a defectes cromosòmics que condueixen a la inestabilitat genòmica (Vaquero et al, 2007; Wang et al, 2007; Bosch-Presegué et al, 2011). Estudis recents suggereixen un antagonisme funcional entre SirT1 i PARP1 respecte el control d'H3K9me3 i d'HP1 a l'HPC (El Ramy et al, 2009). Però tot i haver-se descrit aquesta relació funcional, encara no es coneix el mecanisme d'acció ni les relacions entre els factors implicats. La segona part d'aquesta tesi s'ha centrat en aprofundir en el coneixement d'aquest antagonisme funcional de SirT1-PARP1 al manteniment de les regions d'HPC.

MATERIALS I MÈTODES

1. CULTIUS CEL·LULARS

1.1. Fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) immortalitzats

- Les MEFs HP1 WT, HP1 $\alpha^{-/-}$, HP1 $\beta^{-/-}$ i HP1 $\gamma^{-/-}$ provenen del laboratori del Dr. Singh Prim (Aucott et al, 2008; Brown et al, 2010; Maksakova et al, 2011).
- Les MEFs noKO i reKO d'HP1 α obtingudes a partir de la línia MEFs HP1 $\alpha^{-/-}$ provenen també del laboratori del Dr. Singh Prim (Brown et al, 2010). La sobreexpressió de la recombinasa Cre (R1) a les MEFs HP1 $\alpha^{-/-}$ delecta el *cassete* de Neomicina d'aquestes i restaura el gen d'HP1 α , donant lloc a les MEFs noKO (WT). Subseqüentment, la sobreexpressió de la recombinasa FLP (R2), resulta en una delectió parcial del gen d'HP1 α i en la generació d'una forma truncada curta, generant les MEFs reKO.
- Les MEFs SirT1 WT i KO van ser proporcionades pel grup del Dr. Fred Alt (Cheng et al, 2003; Planavila et al, 2012).
- Les MEFs PARP-1 WT i KO provenen del laboratori de la Dra. Françoise Dantzer (El Ramy et al, 2009).

Aquests tipus cel·lulars han estat crescuts i mantinguts en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (GIBCO) suplementat amb 100 unitats/ml penicil·lina/estreptomicina (GIBCO), aminoàcids no essencials (Glicina, L-Alanina, L-Asparagina, Àcid L-Aspàrtic, Àcid L-Glutàmic, L-Prolina, L-Serina) (GIBCO), 1mM piruvat sòdic (Sigma S8636) i 10% de sèrum boví fetal (GIBCO). Han estat cultivades a 37°C i 5%CO₂.

1.2. Línies cel·lulars

- HEK293F: Línia cel·lular derivada de cèl·lules renals embrionàries humanes.
- NIH3T3: Línia cel·lular establida a partir de fibroblasts embrionaris de ratolí.
- H3K293T: Línia que procedeix de les HEK293F i que conté l'antigen SV40 T. Utilitzada per la generació de lentivirus.

Aquestes línies cel·lulars han estat crescuts i mantinguts en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (GIBCO) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (GIBCO). Han estat cultivades a 37°C i 5%CO₂.

2. PROCEDIMENTS CEL·LULARS

2.1. Transfecció de plàsmids

Les cèl·lules van ser transfectades amb els diferents plàsmids d'expressió utilitzant polietilenimina (PEI) (Polysciences Inc 23966). Es va utilitzar una mescla de 4µl de PEI 1mg/ml per 1µg de DNA en DMEM sense sèrum i es va incubar 5 minuts a temperatura ambient abans d'afegir-les a les cèl·lules en cultiu. A les 6h es va substituir el medi de cultiu. Les cèl·lules van ser cultivades a 37°C i 5%CO₂ durant unes 24h-48h més.

Els plàsmids utilitzats en les transfeccions són els següents:

PLÀSMIDS EMPRATS
pEGFP-C1-HP1α/β/γ (cedit pel Dr. Peter Hemmerich)
pcDNA4/T0-HP1α/β/γ-RFP
pcDNA4/T0-HP1α/β/γ-HA
pcDNA4/T0-FLAG-HP1α/β/γ
pCl-Suv420h2-HA (cedit pel Dr. Alan Underhill)
pEGFP-C1-Suv420h2
pEGFP-N1-CTCF (cedit pel Dr. Victor. V. Lovanenkov)
pEGFP-C1-H2A.Z.1
pBOS-H2B-EGFP-N1 (cedit pel Dr. David Llères)
mCherry-C1-H2B (cedit pel Dr. David Llères)
pcDNA3.1-myc-Suv39h1
pcDNA4/T0-FLAG-SirT1
pEGFP-N1-PARP-1

Taula M1. Plàsmids utilitzats a les transfeccions cel·lulars.

2.2. Transfecció de siRNA

Les cèl·lules van ser transfectades amb els siRNA utilitzant lipofectamina 3000 (Invitrogen L3000-001). Es va utilitzar una mescla de 3µl de siRNA 20µM (per tenir una concentració final de 150nM) i de 3µl de lipofectamina 3000 en 200µl de DMEM sense sèrum. Es deixa 15 min a temperatura ambient i s'afegeix a les cèl·lules en cultiu. A les 6h es canvia el medi i es deixen cultivar a 37°C i 5%CO₂ durant unes 24h més.

Els siRNA emprats són els següents: siRNA *Universal Negative Control #1* (MISSION Millipore S1-001) i siRNA *H2AFZ Mouse* (Dharmacon M-042994-01-0005).

2.3. Infecció lentiviral

Les cèl·lules HEK293T van ser transfectades amb 7.5µg del plàsmid psPAX2, 2µg del plàsmid pMD2.G i 10µg del plàsmid d'interès utilitzant PEI (apartat 2.1). A les 24h de la transfecció es va recol·lectar el medi, es va substituir per medi nou i 24h més tard es va tornar a recol·lectar. La suspensió vírica recollida (medi de cultiu) va ser filtrada utilitzant un filtre de xeringa de 0,45µm de diàmetre. Les cèl·lules a infectar van ser incubades amb la suspensió vírica durant 48h. Les cèl·lules infectades es seleccionen amb 2µg/ml de puromicina durant 72h.

Els plàsmids utilitzats en les infeccions són: MSCV/LRL-mir30 shRNA scr, CTCF#1 i CTCF#2 cedits pel laboratori del Dr. Chris Wilson (Sekimata et al, 2009), PLKO.1-TRC shRNA scr, SirT1#1 (Sigma TRCN0000306512) i SirT1#2 (Sigma TRCN0000326966) i PLKO1.TRC shRNA PARP1#1 (Sigma TRCN0000353959) i PARP1#2 (Sigma TRCN0000305948).

2.4. Discriminació de la fase del cicle cel·lular

Es van sembrar les cèl·lules en cubres de grossor 1.5 (0.16-0.19mm) i es va permetre la seva adhesió durant 24h. Es varen tractar amb 10mM de BrdU (Bromodesoxiuridina) (Amersham) durant 10min, un anàleg de la timidina que s'incorpora a l'ADN acabat de sintetitzar i que permet detectar les cèl·lules en fase S. Seguidament les cèl·lules van ser fixades amb 4% paraformaldehid durant 10min a temperatura ambient. Es va seguir el protocol d'IF (apartat) utilitzant l'anticòs α-BrdU conjugat a FITC (BD Pharmigen) un temps de 30min.

2.5. Tractament amb ciclohexamida

Les cèl·lules van ser tractades a les 24h d'haver-les sembrat amb 200µg/ml de ciclohexamida (CHX) (Sigma 01810). La ciclohexamida interfereix en l'activitat peptidil transferasa de la subunitat ribosomal 60S i bloqueja l'elongació, inhibint d'aquesta manera la síntesi proteica. Les cèl·lules van ser recollides a les 0h, 2h, 6h, 8h i 24h.

3. PROCEDIMENTS AMB ADN I ARN

3.1. Tagging endògen per CRISPR/Cas9

El *tagging* endògen de Suv39h1 amb flag en cèl·lules NIH3T3 es va dur a terme a partir de la tècnica CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated endonucleases 9*). Es va seguir el protocol publicat pel Dr. Eric M. Mendenhall i del Dr. Richard M. Myers (Savic et al, 2015), que es basa en la utilització d'un sistema de dos vectors: el vector pSpCas9 (BB)-2A-GFP (PX458 Addgene) que codifica per la Cas9 i al qual se li va clonar la seqüència del gRNA. La Cas9 es direccionarà per el gRNA a la seqüència genòmica de Suv39h1 i indueix DSB. El segon vector és el vector donador (pFETCH_Donor Addgene) que codifica per un *linker* de Ser-Gly que permet donar flexibilitat, 3 còpies del *tag* FLAG, la seqüència P2A i un gen de resistència a Neomicina. Flankejant aquesta seqüència van ser clonats els braços d'homologia que corresponen a la part final de la seqüència genòmica de Suv39h1 (HOM1) i a la seqüència que hi ha darrera (HOM2). Aquest vector servirà com a donador de la reparació del DSB per recombinació homòloga (HDR). Com a resultat s'obtidria la proteïna Suv39h1 taggejada a la part C-terminal.

3.1.1. Clonatge del vector pSpCas9 (BB)-2A-GFP

El disseny de la seqüència del gRNA es va realitzar utilitzant el programa <http://crispr.dbcls.jp/>, al qual se li van introduir les seqüències de lligació al vector:

PRIMERS gRNA

5'-CACCGCTTCTAGCCCTGAGAAGTCT-3'
3'-CGAAGATCGGGACTCTTCAGACAAA-5'

Taula M2. Primers utilitzats per clonar el gRNA.

Es va procedir a l'*annealing* del gRNA a partir de la reacció següent: 5µl 10x tampó d'*annealing* (100mM Tris pH 7.5, 1M NaCl, 10mM EDTA), 5µl oligo sense 100µM, 5µl oligo antisense 100µM i 35µl d'aigua PCR grade. Es va deixar 5min a 95°C. El vector PX458 va ser digerit amb l'enzim BbsI (NEB, R0539S) en tampó NEB Buffer 2.1 i es va deixar 1h a 37°C. I es va realitzar la lligació del gRNA amb el vector PX458 utilitzant les instruccions de la casa comercial de la ligasa T4 (NEB). Es va amplificar el vector clonat en bacteris competents i es va purificar utilitzant el Kit de purificació de plàsmids d'ADN (Omega D6942). Es va seqüenciar per tal de comprovar que estigués ben incorporada la seqüència amb el primer PX458seq: 5'-GAGGGCCTATTTCCATGATTCC-3'.

3.1.2. Clonatge del vector pFETCH_Donor

El disseny dels primers per amplificar els 700pb dels braços d'homologia es va dur a terme seguint el protocol detallat a la publicació (Savic et al, 2015). I se li van afegir les seqüències de lligació al vector:

PRIMERS BRAÇOS D'HOMOLOGIA
HOM Arm1 <i>Forward</i> : 5'- TCCCCGACCTGCAGCCCAGCT CCTCCTTCACCTTCCTTGTTCTG-3'
HOM Arm1 <i>Reverse</i> : 5'- CCGGAACCTCCTCCGCTCCC GAAGAGATATTTTCGGCAAGCC-3'
HOM Arm2 <i>Forward</i> : 5'- AGTTCTTCTGATT CGAACATCCTGAAGGGGCCTGAAGCCACC-3'
HOM Arm2 <i>Reverse</i> : 5'- TGGAGAGGACTTTCCAAG CAGCCTTATCTCCCAGCTCTG-3'

Taula M3. Primers utilitzats per clonar els braços d'homologia.

Es va extreure l'ADN genòmic de les cèl·lules NIH3T3 (apartat 3.2) i es va realitzar una PCR per tal d'amplificar els braços d'homologia utilitzant els primers dels HOM Arm1 *fw* i *rv* i els de l'HOM Arm2 en la reacció que es detalla a continuació: 1.25µl del primer 10µM *fw*, 1.25µl del primer 10µM *rv*, 50ng de l'ADN genòmic i 12.5µl de la polimerasa *Phusion high Fidelity* (NEB M0531S). El resultat de la PCR es va córrer en un gel d'agarosa a l'1,5%, les bandes van ser tallades del gel i purificades amb el kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up* (Macherey-Nagel). A continuació es va procedir a la digestió del vector pFETCH_Donor amb els enzims BsaI i BbsI (NEB, R0539S) 2h a 37°C. I es va dur a terme la reacció d'ensamblatge dels braços d'homologia i el vector digerit utilitzant les instruccions de la casa comercial de la *Gibson Assembly Master Mix* (NEB E2611S). El vector clonat es va amplificar en bacteris competents DH5-α, que es van seleccionar amb antibiòtic. Després es va purificar el vector amplificar utilitzant el Kit de purificació de plàsmids d'ADN (Omega D6942). Es va seqüenciar per tal de comprovar que estigués ben incorporada la seqüència amb els primers SEQ.HA1: 5'-ACGCCTGTGAAACCGTACTA-3', SEQ.HA2: 5'-GGCCGCTTTTCTGGATTCAT-3', SEG.P2A: 5'-CAGCAGGCTGAAGTTAGTAGC-3' i SEQ.4: 5'-GACGGCCAGTGAATTGGAG-3'.

3.1.3. Selecció de les cèl·lules

Un cop obtinguts els dos vectors es van transfectar en proporció 1:1 seguint el protocol de transfecció de plàsmids (apartat 2.1). Es van tractar les cèl·lules amb 5µm de L755507 (Sigma), que augmenta l'eficiència de l'HDR. Es va seleccionar les possibles cèl·lules positives amb 1000µg/ml de G418 (Thermo Fisher) durant 7

dies, substituint el medi cada 48h. Amb el Sorter Moflo-XDP es van separar en p96 pous les cèl·lules individuals. Aquestes cèl·lules es van fer créixer durant 3 setmanes i es van analitzar els clons.

3.2. Obtenció de l'ADN genòmic

Es va obtenir el pellet de les cèl·lules NIH3T3 i de les NIH3T3 Suv39h1-flag obtingudes per CRISP/Cas9. Es va afegir a la mostra tampó de lisis (10mM Tris pH 8.0, 5mM EDTA, 100mM NaCl), un 1% d'SDS i 50µg de proteïnasa K (Thermo Scientific). Es va deixar incubar 1h a 65°C. Es va afegir NaCl a una concentració final de 1.5M i es va centrifugar a 13.000rpm 20min. L'ADN del sobrenedant es va precipitar amb 0.8V de isopropanol i es va centrifugar a 13.000rpm 10min. Es el pellet es va rentar amb etanol al 70% i es va centrifuga 5min. Després d'assecar es va resuspendre en aigua fins a obtenir una concentració de 100ng/µl. Posteriorment es va utilitzar com a substrat de la PCR.

3.3. PCR

La PCR (*polymerase chain reaction*) utilitzada per l'amplificació dels braços d'homologia (700pb) a partir de l'ADN genòmic de les cèl·lules NIH3T3 es va dur a terme utilitzant els primers dels HOM Arm1 *fw* i *rv* i els de l'HOM Arm2 detallats a la taula de primers (Taula M3). La reacció va ser la següent: 1.25µl del primer 10µM *fw*, 1.25µl del primer 10µM *rv*, 50ng de l'ADN genòmic i 12.5µl de la polimerasa *Phusion high Fidelity* (NEB M0531S) en les condicions detallades per la casa comercial de la polimerasa. El resultat de la PCR es va córrer a un gel d'agarosa al 1.5%.

Per l'amplificació de la part final de Suv39h1+Gly-Ser+3Xflag+P2A linker+la part inicial del gen de resistència a neomicina (400pb), a partir de l'ADN genòmic en les cèl·lules NIH3T3 Suv39h1-flag per CRISPR/Cas9 es van utilitzar els primers següents, primer *forward*: 5'-GGACATGGAGAGTACCCGAATGGAC-3' i primer *reverse*: 5'-CGATTGTCTGTTGTGCCAGTC-3', i la *Phusion high Fidelity*. El resultat de la PCR es va córrer a un gel d'agarosa al 1.5%.

3.4. Purificació de l'ARN i síntesi de cDNA

La purificació de l'ARN es va fer amb Trizol (Sigma). Les cèl·lules es van resuspendre en 1ml de Trizol i es va incubar 5min a temperatura ambient. Es va afegir 200µl de cloroform i es va barrejar i deixar incubar 5min més. Es va centrifugar a 12.000g a 4°C durant 15 min i es van obtenir tres fases. Es va recollir

la fase superior que contenia l'ARN i es va precipitar amb isopropanol. Després de dos rentats amb etanol al 75%, es va assecat el pellet i resuspendre en aigua. La qualitat de l'ARN va ser avaluada en un gel d'agarosa al 1.5%.

A partir de 1000ng d'ARN es va sintetitzar el cDNA mitjançant retrotranscripció utilitzant el Kit Transcriptor *First Strand cDNA Synthesis* (Roche) segons les seves especificacions i utilitzant primers hexamèrics aleatoris.

3.5. RT-qPCR

La PCR quantitativa a temps real (RT-qPCR) es va realitzar utilitzant la QuantStudio™ 5 *Real-Time PCR System* (Thermo Fisher) amb el reactiu *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Per la RT-qPCR a partir del cDNA sintetitzat de l'mRNA es va barrejar 0.2µl dels primers 10µM (Taula M4), 5µl de cDNA i 5µl de *SYBR Green MM* per pou. L'expressió gènica relativa es va determinar mitjançant el mètode del $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilitzant el software de la QuantStudio 5 (Thermo Fisher). Els resultats van ser normalitzats utilitzant primers pels gens *housekeeping* (HK) *EEF2*, *RPL38* i *HPRT1*, que s'expressen de manera constitutiva.

PRIMERS PER RT-qPCR		
RT-qPCR d'expressió		
Suv39h1	forward	5'-CTGTAGAGGGTTCTCAGC-3'
	reverse	5'-GCTGAGAACCCTCTACAG-3'
Suv39h1-flag	forward	5'-GCAGGTGTACAACGTATTCATAGAC-3'
	reverse	5'-TCATCCTTGTAATCTCCAGAACCAC-3'
EEF2	forward	5'-TGTCAGTCATCGCCATGTG -3'
	reverse	5'-CATCCTTGCGAGTGTCAAGTGA-3'
RPL38	forward	5'-AGGATGCCAAGTCTGTCAAGA-3'
	reverse	5'-TCCTTGTCTGTGATAACCAGGG-3'
HPRT1	forward	5'-AGCTACTGTAATGATCAGTGACG -3'
	reverse	5'-AGAGGTCCTTTTCACCAGCA-3'
RT-qPCR dels CHIPs		
MAJOR SAT	forward	5'-TGGAATATGGCGAGAAACTG-3'
	reverse	5'-AGGTCCTTCAGTGGGCATTT-3'
LINE L-1 Promoter	forward	5'-ACTGCGGTACATAGGGAAGC-3'
	reverse	5'-TGTGATCCACTCACCAGAGG-3'
LINE L-1 ORF2	forward	5'-ACCTGGACGAAATGGACAAA-3'
	reverse	5'-CATCTGGTCCTGGGCTTTT-3'
H19-ICR3	forward	5'-GCTGTTATGTGCAACAAGGG-3'
	reverse	5'-AAGTTGGCAGCATTTGGGC-
H19-ICR1	forward	5'-CGCAATCGATTTTGCTGCCACC-3'
	reverse	5'-AAGTTGGCAGCATTTGGGC-3'
H19-ICR-1Kb	forward	5'-CAATGGACGTACACAGAGGTG-3'

H19-ICR-2Kb	reverse	5'-GTCCCATCTAGGAGGCAGC-3'
	forward	5'-CAATGGACGTACACAGAGGTG-3'
	reverse	5'-GTCAGTGTCTATTGCTGTGG-3'

Taula M4. Llistat de primers utilitzats a les RT-qPCR. Pel disseny dels primers de les RT-qPCR d'expressió s'ha fet servir el mètode de l'*intron skipping* utilitzant el programa AmplifX. El disseny dels primers de les RT-qPCR dels CHiPs s'ha efectuat utilitzant el programa AmplifX.

Per la RT-qPCR a partir de la cromatina dels CHiPs es va barrejar 0.2µl dels primers 10µM (Taula 4), 5µl dels inputs del CHIP diluïts 1:10/5µl de les elucions del CHIP i 5µl de *SYBR Green MM* per pou. L'anàlisi es va realitzar utilitzant el software de la QuantStudio 5 (Thermo Fisher). Els resultats obtinguts de l'anàlisi es van ajustar de la següent manera: primerament es va calcular l'Input ajustat ($Cq_{inputs} - 6.644$) i després es va calcular el Percent input ($100 \cdot \text{eficiència del CHIP} \cdot (\text{Input ajustat} - Cq_{elució})$), que és el resultat final.

4. PROCEDIMENTS AMB PROTEÏNES

4.1. Extractes proteics totals i fraccionament subcel·lular

Per l'extracció total de proteïnes els pellets cel·lulars van ser directament resuspesos en Buffer Laemmli (60mM Tris pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 0.01% Blau de bromofenol) i van ser sonicats durant 30 segons al sonicador d'agulla UP50H *Ultrasonic Processor* (Biotech).

Els extractes citoplasmàtics i nuclears van ser preparats seguint una modificació del mètode estàndard Dignam (Dignam et al, 1983). El pellet cel·lular va ser resuspès en Buffer A (10mM Tris pH 7.8, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM DTT i 0.1mM PMSF) i incubat durant 10 min en gel. L'extracte va ser vortexat i centrifugat a 13.000rpm a 4°C durant 1min. El sobrenedant es va recollir com a fracció citoplasmàtica i el pellet va ser resuspès en Buffer C (10mM Tris pH 7.8, 1.25mM MgCl₂, 0.42mM NaCl, 25% glicerol, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT i 0.1mM PMSF) i incubat 20 min en gel. Es va vortexar i centrifugar l'extracte a 13.000rpm a 4°C durant 1min. Es va recollir el sobrenedant com a fracció soluble nuclear. Per obtenir l'extracte cromatínic de la fracció de proteïnes unides fortament a la cromatina, es va afegir 50U de Benzonasa (Millipore) per cada 5·10⁶ cèl·lules i es va incubar 4h en agitació a 4°C. Es va centrifugar a 13.000 5min i es va recollir el sobrenedant com a fracció cromatínica.

En l'assaig de *peptide pull-down* els pellets cel·lulars van ser resuspesos en buffer RIPA (150mM NaCl, 50mM Tris pH 7.8, 1% NP-40, 0.5% àcid deoxicòlic i 0.1% SDS) amb 50 U de Benzonasa per cada 5·10⁶ cèl·lules i es van incubar durant

4h a 4°C. Posteriorment es van centrifugar els extractes durant 5 minuts a 13.000rpm i es va guardar el sobrenedant com a extracte proteic total.

4.2. Western Blot

Els extractes proteics van ser mesclats amb Buffer Laemmli 5X suplementat amb un 10% de β -mercaptoetanol i bullits a 95°C durant 5min. Es va dur a terme la electroforesi de les mostres en gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE) de diferent percentatge d'acrilamida en funció del tamany de les proteïnes a detectar aplicant un voltatge de 200V. Després de l'electroforesi, les proteïnes van ser transferides del gel a la membrana de nitrocel·lulosa (GE Healthcare) en tampó de transferència (500mM glicina, 50mM Tris-HCl, 0.01% SDS, 20% metanol) a 400mM durant 1h. Les membranes es van bloquejar durant 30 minuts en 5% de llet desnatada en PBS-Tritó 0.1%. Es van rentar en tampó fosfat salí amb 0.1% Tween (PBS-Tween 0.1%) i van ser incubades amb l'anticòs primari adequat diluït en PBS-Tween 0.1% (Taula M5) durant 1h a temperatura ambient o durant la nit a 4°C. Les membranes es van rentar 3 cops amb PBS-Tween 0.1% durant 5 minuts, seguit de la incubació amb els anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa HRP (Horseradish peroxidase) (Taula M5) diluïts en PBS-Tween 0.1%, durant 30 minuts a temperatura ambient. Es van rentar les membranes 3 cops amb PBS-Tween 0.1% durant 5 minuts, i el marcatge va ser detectat amb Luminol o EMD Millipore Immobilon™ Western Chemiluminiscent HRP Substrate (ECL). Els anàlisis densiomètrics es van realitzar utilitzant el programa Quantity One de BIO-RAD.

Anticossos primaris	Dilució	Referència producte
α -HP1 α	1/1000	Euromedex 2HP-2G9
α -HP1 β	1/1000	Euromedex 1MOD-1A9
α -HP1 γ	1/1000	Euromedex 2MOD-1G6
α -H4K20me3	1/1000	Abcam ab9053
α -H3K9me3	1/1000	Millipore 07-523
α -H2A.Z	1/1000	Abcam ab4174
α -CTCF	1/1000	Abcam ab70303
α -H2A	1/3000	Cell Signaling D603A
α -H3	1/3000	Cell Signaling 9715
α -H4	1/3000	Cell Signaling 2935
α -Suv39h1	1/500	Millipore D11B6
α -SirT1	1/1000	Millipore 07-131
α -PARP-1	1/3000	Cell Signaling 46D11
α -actina	1/5000	Sigma A5316
α -HA	1/3000	Sigma H6908
α -myc	1/1000	Cell Signaling 9B11

α -Flag	1/1000	Sigma F7425
α -GFP	1/1000	Millipore MAB2510
Anticossos secundaris	Dilució	Referència producte
α -rabbit	1/10000	Sigma A0545
α -mouse	1/10000	Sigma A9044
α -rat	1/10000	Sigma A9037

Taula M5. Llistat d'anticossos primaris i secundaris emprats per Western Blot.

4.3. Co-immunoprecipitació de proteïnes i pull-downs

Les co-immunoprecipitacions es van realitzar amb extractes totals o amb extractes de les fraccions nuclears i cromatíniques obtinguts segons el mètode estàndard Dignam modificat (apartat 4.1). Aquests extractes es van incubar amb reïna d'agarosa α -HA (Sigma A2095) o α -Flag (Sigma A2220), o bé amb reïna magnètica de proteïna A/G (Pierce 26132) a les quals se li va unir l'anticòs endògen d'H2A.Z (4 μ l/10 μ l *beads*, Abcam ab4174), tota la nit en agitació suau a 4°C. Després de la incubació, la reïna va ser rentada tres cops amb BC100 (100mM KCl, 10mM Tris pH 7.8, 0.5mM EDTA, 10% glicerol, 0.1mM PMSF i 0.1mM DTT) i tres cops amb BC500 (500mM KCl, 10mM Tris pH 7.8, 0.5mM EDTA, 10% glicerol, 0.1mM PMSF i 0.1mM DTT). Les proteïnes unides a la reïna es van eluir mitjançant l'alteració del pH amb 0.2M de glicina a pH 2.3 durant 5 minuts a temperatura ambient. Les proteïnes eluïdes es van neutralitzar amb Tris-HCl 1.5M pH 8.7 i es van ser carregades en un gel d'electroforesi per a la seva detecció.

Els assajos de *peptide pull-down* es van realitzar en extractes nuclears obtinguts en dues condicions diferents, en la primera s'ha utilitzat el mètode Dignam i en la segona el tampó RIPA, molt més astringent. Aquests extractes es van incubar amb reïna H3K9me3 o H4K20me3-estreptavidina-agarosa-biotinilada, preparada a partir de la incubació de 100mg dels pèptids biotinilats que contenen els residus d'H4 1-2 (sense modificar o H4K20me3) o els residus d'H3 1-21 (sense modificar o H3K9me3)(Anaspec) amb reïna estreptavidina-agarosa (Pierce 26132). Les proteïnes unides a la reïna es van eluir i van ser carregades en un gel d'electroforesi per a la seva detecció.

4.4. CHiPs i reCHiPs

Per dur a terme els experiments de CHIP (*chromatin immunoprecipitation*) es van crosslinkar les cèl·lules amb 1% de formaldehid (VWR 15686) a temperatura ambient i en agitació durant 15 min, i es va parar la reacció afegint 125mM de glicina durant 10 min més. Es van rentar les cèl·lules amb PBS fred suplementat amb 10mM PMSF i 50mM DTT, i es van recollir. El pellet cel·lular va ser lisat amb

buffer de lisis 1 (5mM HEPES pH8, 85mM KCl i 0.5% NP-40) 5 minuts en gel, es va centrifugar a 4.000rpm durant 1 min i es va descartar el sobrenedant (extracte citoplasmàtic). El pellet obtingut es va resuspendre en buffer de lisis 2 (50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA i 1%SDS) i es va incubar 20 minuts en gel per trencar la membrana nuclear. Es va transferir el lisat en *milliTUBE 1ml AFA Fiber* (Covaris, 520130) i es va sonicar al Covaris M220 per tal de trencar la cromatina en fragments d'un rang de 250 a 1000pb. Les mostres van ser diluïdes 10 vegades en buffer de dilució (150mM NaCl, 20mM Tris pH 8.1, 2mM EDTA i 1% tritó) per facilitar les interaccions entre proteïna-anticòs. Es van utilitzar 60µg de la mostra de cromatina digerida per cada CHIP i es fa fer un pre-rentat afegint reïna magnètica de proteïna A/G *chip grade* (Pierce, 26162) 30 minuts en agitació a 4°C. Posteriorment, les mostres de cromatina pre-rentada van ser incubades amb els µg dels anticossos primaris especificats ([Taula M6](#)) durant tota la nit en agitació a 4°C, seguit d'una incubació de 2h amb 30µl de reïna magnètica de proteïna A/G. Es van rentar la reïna 5 cops amb buffer RIPA (500mM LiCl, 50mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA, 1%NP-40 i 0.7% na deoxicolat) i 2 cops amb buffer TE (10Mm Tris pH8 + 0.1mM EDTA). Les reïnes van ser eluïdes i *descrosslikades* amb RC buffer (NaHCO₃ 01M +1% SDS) a 65°C durant una nit. Es va degradar l'RNA afegint 40µg/ml de RNAsa (Merk 11119915001) i incubant 30 min a 37°C. Van ser afegits: 2µl EDTA 0.5M pH 8, 4µl Tris 1M pH 8 i 2µl de proteïnasa K 10mg/ml per tal de degradar la proteïna. Es va purificar el DNA utilitzant el Kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, 740609250) amb buffer NTB (Macherey-Nagel 740595150) i es va eluir la mostra amb aigua milliQ. El DNA purificat es va utilitzar per a dur a terme RT-qPCR tal i com es detalla a l'[apartat 3.2](#).

En els experiments de reCHIP (*sequential chromatin immunoprecipitation*) s'ha seguit el mateix protocol però el primer CHIP s'ha eluït amb 10mM Tris-EDTA i 20mM DTT i s'ha diluït 20 cops amb buffer de dilució (0.01% SDS, 1.1% Tritó X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl 8.1, 167 mM NaCl, i inhibidors de proteases) abans de realitzar el segon CHIP.

Els CHIPs de les cèl·lules NIH3T3 amb siRNA scr i d'H2A.Z, degut al baix nombre de cèl·lules disponibles, es van realitzar utilitzant el Kit de CHIP *LowCell* de proteïna A (Diagenode C01010072) seguint el protocol detallat del Kit.

Anticossos CHIP i reCHIP	µg/60µg cromatina	Referència
α-H3K9me3	5	Abcam ab8898
α-H4K20me3	10	Abcam ab9053
α-H3K27me3	7.5	Cell Signaling 9733
α-CTCF	25	Cell Signaling 2899
α-H2A.Z	7.5	Abcam ab4174
α-H2A	7.5	Cell Signaling D603A
α-HP1α	12.5	Abcam ab77256
α-HP1β	12.5	Abcam ab10478
α-HP1γ	12.5	Abcam ab10480

α -HA	7.5	Sigma H6908
α -Flag	7.5	Sigma F7425
Anticossos CHIP <i>LowCell</i> kit	$\mu\text{g}/100.000$ cèls	Referència
α -CTCF	10	Cell Signaling 2899
α -H4K20me3	4	Abcam ab9053
α -H3K27me3	3	Cell Signaling 9733
α -H3K9me3	2	Abcam ab8898
α -H3K4me3	2	Abcam ab8580

Taula M6. Llistat d'anticossos emprats en CHiPs i reCHiPs.

4.5. Purificació de Suv39h1-FLAG de cèl·lules NIH3T3 taggejades endògenament

La proteïna Suv39h1-FLAG va ser purificada de cèl·lules NIH3T3 taggejades endògenament per CRISP/Cas9. Es va seguir el protocol d'extracció de Dignam (apartat 4.1) per obtenir els extractes citoplasmàtics i nuclears. I es va afegir a l'extracte nuclear 50U de Benzonaasa per cada $5 \cdot 10^6$ cèl·lules (apartat 4.1) per tal d'obtenir la fracció cromatínica. Finalment es van ajuntar els extractes per tal d'obtenir l'extracte proteic total. L'extracte total es va incubar amb la reïna d'agarosa α -FLAG (Sigma A2220) durant tota la nit a 4°C. Posteriorment, la reïna es va rentar tres cops amb BC100 (100mM KCl, 10mM Tris pH 7.8, 0.5mM EDTA, 10% glicerol, 0.1mM PMSF i 0.1mM DTT) i cinc cops amb BC500 (500mM KCl, 10mM Tris pH 7.8, 0.5mM EDTA, 10% glicerol, 0.1mM PMSF i 0.1mM DTT). Les proteïnes van ser eluïdes per competició utilitzant 0.2mg/ml de pèptid FLAG i incubant 20 min en agitació a 4°C. La proteïna purificada es pot guardar a -80°C per a futurs experiments.

4.6. Assaig de metilació d'histones *in vitro*

Per l'assaig de metilació d'histones *in vitro* es va incubar 15-25 μ l de la metiltransferasa Suv39h1-FLAG purificada de cèl·lules NIH3T3 (apartat 4.5) amb 2 μ l del cofactor SAM fred (4 μ g/ml) i 2 μ l de *core histones* comercials en 3.5 μ l de buffer de metilació (500mM Tris pH 8.7, 50mM MgCl₂, 40mM DTT) en un volum final de 35 μ l, durant 1.5h a 30°C. La reacció es va parar amb PLB5X, i el resultat de la reacció es va carregar en gels d'acrilamida per analitzar-ho mitjançant Western Blot.

4.7. Immunofluorescència

Les cèl·lules es van sembrar en p12 pous amb un cobreobjectes de grossor 1.5 (0.16-0.19 μ m) per pou i es van deixar assentar durant 24h. Es van rentar dues vegades amb PBS i van ser fixades amb paraformaldehyd al 4% durant 7 minuts a temperatura ambient. Les cèl·lules fixades es van rentar dues vegades més amb PBS i van ser permeabilitzades amb Buffer B (3% BSA, 0.2% Tritó en PBS) durant 10 minuts i posteriorment bloquejades amb *Blocking Buffer* (PBS-BSA 3%) durant tota la nit en agitació a 4°C. Els cobreobjectes van ser incubats amb l'anticòs primari adequat diluït en Buffer B (**Taula M7**) en una cambra humida durant 1h a temperatura ambient. Després de tres rentats amb *Blocking Buffer*, els cobreobjectes van ser incubats amb l'anticòs secundari corresponent diluït en Buffer B (**Taula M7**) en la cambra humida durant 30 minuts a temperatura ambient i tapat de la llum. Després de tres rentats amb *Blocking Buffer*, les cèl·lules es van tenyir amb DAPI 1 μ g/ml durant 4 minuts. Es va rentar tres cops amb aigua i es va procedir al muntatge en Mowiol amb *antifading*. Les imatges de les immunofluorescències (IF) van ser adquirides en un Microscopi Confocal Leica TCS SP5 2 en *stacks* entre 0.2-0.5 μ m. Els *stacks* d'imatges adquirides van ser processades pel software de deconvolució Huygens (Scientific Volume Imaging), i les reconstruccions tridimensionals i la visualització generada per l'ordinador del senyal es va obtenir utilitzant el software Imaris (Bitplane, A.G.). Aquestes imatges van ser processades i analitzades amb el programa Fiji. Una barra d'escala de 5 μ m es va incloure en una imatge representativa de tots els anàlisi.

La discriminació de la fase del cicle cel·lular realitzat en determinades IF es va dur a terme tal i com s'ha explicat anteriorment (**apartat 2.4**).

En el cas de l'estudi de Suv39h1-flag en les cèl·lules NIH3T3 taggejades endògenament, el pas de permeabilització precedeix el de fixació i s'afegeix un pas addicional d'exposició d'antigen (*antigen retrieval*). Aquesta diferència és importada per a descartar la fracció soluble i només detectar la fracció unida a la cromatina, i per exposar els antígens que podrien trobar-se emmascarats i augmentar així la seva detecció a través dels anticossos. Després dels dos rentats inicials amb PBS fred, es va procedir a la permeabilització amb Buffer B durant 10 minuts a 4°C. L'*antigen retrieval* es va dur a terme tractant amb 1.5M (4.6%) d'HCl durant 10 minuts a 37°C. Seguidament, es va rentar dos cops amb PBS fred i la fixació es va realitzar amb paraformaldehyd al 4% durant 7 minuts. Els següents passos es van realitzar seguint el protocol d'IF general citat a dalt.

Anticossos primaris	Dilució	Referència producte
α -H4K20me3	1/300	Abcam ab9053
α -H3K27me3	1/500	Cell Signaling 9733
α -H3K9me3	1/500	Abcam ab8898
α -HP1 α	1/200	Euromedex 2HP-1H5
α -H2A.Z	1/100	Cell Signaling 2718

α -H2A	1/250	Cell Signaling D603A
α -CTCF	1/300	Cell Signaling 3418
α -BrdU-FITC	1/200	BD Pharmigen MAB3262F
α -CREST	1/500	Invitrogen PA5-30500
α -tubulina	1/500	Sigma DM1A
α -Flag	1/200	Sigma F7425
α -GFP	1/200	Millipore MAB2510
α -RFP	1/500	Invitrogen MA5-15257
Anticossos secundaris	Dilució	Referència producte
α -rabbit 488	1/1000	Alexa Fluor A11008
α -rabbit 555	1/1000	Alexa Fluor A21428
α -rabbit 647	1/1000	Alexa Fluor A21244
α -mouse 488	1/1000	Alexa Fluor A11001
α -mouse 555	1/1000	Alexa Fluor A21422
α -mouse 647	1/1000	Alexa Fluor A21236

Taula M7. Llistat d'anticossos primaris i secundaris emprats per IF.

4.8. Experiments de FRET

Els experiments de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) *in vivo* es basa en la transferència d'energia entre fluoròfors que es troben molt propers i es van portar a terme co-transfectant una proteïna amb EGFP que actuarà com a donadora i una altre amb RFP que actuarà com a acceptora (apartat 2.1). El mètode emprat és el de *acceptor photobleaching*, que consisteix en cremar l'acceptor, l'RFP, amb una intensitat de làser 561 del 100% sense cremar el donador. Si es produeix FRET a la zona cremada, el donador tindrà una intensitat més alta de la que tenia a l'inici ja que no hi haurà transferència d'energia degut a que l'acceptor ha estat cremat. Es va utilitzar un Microscopi Confocal Leica TCS SP5 2 i ser adquirides tres imatges: la imatge *pre-bleach* del donador (làser 488) i de l'acceptor (làser 561); la imatge *bleach* del donador i de l'acceptor, un cop s'ha cremat l'acceptor amb làser 561 al 100% realitzant 7 passades del làser a la regió d'interès (ROI); i la imatge *post-bleach* del donador i acceptor en les mateixes condicions que en *pre-bleach*. La quantificació de la intensitat de fluorescència de donador es va fer amb el programa Fiji i l'eficiència del FRET es va calcular segons la fórmula: $(F_{RFP\ post} - F_{RFP\ pre}) / F_{RFP\ post} \cdot 100$.

4.9. Experiments de FRAP

En els experiments de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) *in vivo* es van realitzar en cèl·lules NIH3T3 transfectades amb el plàsmid Suv420h2-

EGFP (**apartat 2.1**). Aquests experiments consisteixen en fotodestruir la regió d'interès, que en el nostre cas eren els focus d'HPC, i mitjançant la recuperació de la intensitat de EGFP a aquesta regió es pot quantificar el temps mitjà d'intercanvi de Suv420h2-EGFP, la fracció mòbil i la fracció immòbil. Es va utilitzar un Microscopi Confocal Zeiss LSM 510 Meta amb una càmera d'incubació a 37°C, 5% CO₂ i 95% d'humitat relativa (Carl Zeiss) per mantenir les cèl·lules ja transfectades vives. El *bleaching* es va realitzar en una àrea circular de 1µm de diàmetre utilitzant el làser 488 a una intensitat del 100% durant 25.6µs. La recuperació de la fluorescència es va mesurar amb un làser d'argó i el filtre AOTF al 2% a intervals de 500ms. A partir del programa Zeiss LSM510 es va analitzar tres regions: FRAP ROI, que és l'àrea d'interès on s'ha efectuat el *bleaching*; BASE ROI, que és el fons sense cèl·lules; i la REFERÈNCIA ROI, que és la disminució de la fluorescència a tot el nucli a causa del *photobleaching*. A partir d'aquests anàlisis es va aplicar una doble normalització als experiments de FRAP (Phair et al, 2004), i les intensitat de fluorescència relatives dins de l'àrea del *bleaching* es van representar en funció del temps produint les corbes de recuperació del FRAP. A partir de les corbes de recuperació es va calcular el valor de la vida mitjana (temps necessari per arribar a la meitat de la recuperació total) utilitzant una macro de càlcul FRAP (K_FRAPcalcV9.ipf, EMBL) que s'executa amb el programa IgorPro6.1 (WaveMetrics).

4.10. Experiments de FLIM-FRET

Els experiments de FLIM-FRET (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy-Fluorescence Resonance Energy Transfer*) *in vivo* permeten una elevada resolució tant temporal (nanosegons) com espacial (nanòmetres) i ens van permeten mesurar el grau de compactació als focus d'HPC a l'expressar la histona H2B fusionada a dos fluoròfors diferents, GFP i RFP. Així doncs, una major compactació de la cromatina correlaciona amb una major eficiència de FRET entre H2B-GFP (proteïna donadora) i H2B-RFP (proteïna acceptora), el que resulta en una vida mitja més baixa de la molècula donadora H2B-GFP (FLIM) (Llères et al, 2009). Es van transfectar les cèl·lules NIH3T3 amb els plàsmids H2B-GFP i H2B-RFP (**apartat 2.1**). Es va utilitzar un Microscopi Confocal Leica TCS SP5 2 equipat amb una plataforma de detecció de molècules individuals i electrònica de recompte de fotons individuals (PicoHarp 300, PicoQuant GmbH) i es va mesurar EL FLIM-FRET per recompte de fotons individuals correlacionat amb el temps (TCSPC). L'excitació de dos fotons de la molècula donadora (H2B-GFP) va ser realitzat a 950nm amb un làser Mai Tai Ti: Sapphire (Spectra Physics) amb una velocitat de repetició de 80MHz. Els fotos individuals van ser detectats amb conteig de fotons individuals fotodíodes (PicoQuant) amb un filtre de pas de banda de fluorescència de 500-550nm limitat a la detecció de la fluorescència del donant només. Es va realitzar en 10 camps diferents a partir dels quals es van extreure els ROI als focus de l'HPC i les corbes de desintegració de la fluorescència van ser analitzades amb el

software SymPhoTime píxel per píxel a una elevada resolució espacial. A partir de les corbes es va calcular la vida mitja del fluoròfor del donant i es van mapejar per pseudocolor píxel per píxel a tota la imatge. Els valors d'eficiència de FRET (E), es van calcular a partir de $E = 1 - (tAD/tD)$, on tAD és l'amplitud de la vida mitja de la fluorescència del donant (EGFP) en presència de l'acceptor (RFP) i tD és la vida mitja de la fluorescència del donant sol.

4.11. Anàlisis mitòtics

Es van cultivar les cèl·lules MEFS HP1 $\alpha^{-/-}$, $\beta^{-/-}$ i $\gamma^{-/-}$ en creixement exponencial i es van fixar amb paraformaldehid al 4%, permeabilitzar amb PBS-Tritó 0.5% i es van marcar amb els anticossos primaris α -CREST i α -tubulina, i contratenyits amb DAPI (apartat 4.7). Les imatges van ser adquirides amb un Microscopi Confocal LSM 510 Meta. Per la quantificació de les aberracions mitòtiques, les imatges es van adquirir utilitzant un objectiu PlanApochromat 20X 0.8NA i els camps es van seleccionar per contenir una mitosi al menys, amb un mínim de 100 camps analitzats. Per l'obtenció de les imatges representatives, es va utilitzar un objectiu C Achromat 63X 1.2NA.

5. ANÀLISI BIOINFORMÀTICS

5.1. Anàlisi de correlació de CHIP-seq

Les dades del CHIP-seq van ser descarregades de GEO dels següents estudis: HP1 α GEO:GSM13759 (Bulut-Karslioglu et al, 2014), HP1 β GEO:GSM1584767 (Matteout et al, 2015) i H4K20me3 GEO:GSM656527 (Biododeau and Young, 2010). Les dades van ser convertides a Fastq utilitzant *SRA toolkit*. Es va realitzar un test de qualitat i els adaptadors i seqüències sobrerrepresentades es van eliminar de les lectures sense processar. Les seqüències retallades es van mapejar al genoma de ratolí (compilació GRCm38/mm10) utilitzant el programa Bowtie2 v.2.0.5 agafant només les lectures alineades úniques amb no més d'un error. Aquests arxius es van processar encara més utilitzant el programa SAMTOOLS v.0.1.18. El *peak calling* es va realitzar amb MACS v.2 amb els paràmetres predeterminats. Finalment es van obtenir les regions de les subunitats d'HP1 que interactuen amb H4K20me3 utilitzant el programa Bedtools intersectBed v.2.25.0.

5.2. Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic es va realitzar utilitzant un test multivariant ANOVA (anàlisi de CHIP-seq i de FLIM-FRET) o un test T-Student (resta d'anàlisi). Els valors dels gràfics representen els valors mitjans de mínim tres experiments i inclouen l'error estàndard (SE) excepte en el cas del CHIP-seq que inclou la desviació estàndard (SD). Les n específiques i els p valors s'indiquen a les llegendes de les figures corresponents. L'anàlisi de correlació de CTCF i l'HPC s'ha efectuat amb el coeficient de correlació de Pearson.

RESULTATS

1. PAPER ESPECÍFIC DE LES ISOFORMES D'HP1 A L'ESTRUCTURA I ORGANITZACIÓ DE L'HPC

La contribució específica d'HP1 α , HP1 β i HP1 γ a l'estructura de l'HPC no està del tot clara. Considerant la importància d'aquestes regions a l'organització i a la integritat del genoma (Hall et al, 2012), l'estudi de la contribució diferencial de les isoformes d'HP1 a l'estructura de l'HPC és vital per entendre com aquestes regions participen al manteniment de l'estabilitat genòmica.

La primera part d'aquesta tesi s'ha centrat en aprofundir en l'estudi del paper específic de les isoformes d'HP1 a l'estructura i organització de l'HPC mitjançant l'estudi de la relació de les isoformes d'HP1 amb les principals marques històniques associades a l'heterocromatina, les seves relacions funcionals amb els enzims i proteïnes associades a aquestes regions, i el seu paper específic a l'estructura i organització de l'HPC, i com a conseqüència, el seu impacte en l'estabilitat genòmica.

1.1. HP1 α controla la propagació d'H4K20me3 i d'H3K27me3 als focis d'HPC

Tal i com he mencionat, estudis previs del nostre grup relacionaven la pèrdua de la isoforma HP1 α , però no d'HP1 β ni d'HP1 γ en MEFS, amb un significat enriquiment de les marques associades a l'heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3 als focis d'HPC a partir d'experiments d'immunofluorescència (IF), i de manera independent a la fase del cicle cel·lular. Amb la finalitat de confirmar aquests canvis en el patró de modificacions d'histones als focis d'HPC associats a la pèrdua de les isoformes d'HP1, vàrem realitzar experiments d'immunoprecipitació de la cromatina (CHIP) de les marques H3K9me3, H4K20me3 i H3K27me3 en MEFS HP1 WT, MEFS HP1 $\alpha^{-/-}$, $\beta^{-/-}$ i $\gamma^{-/-}$. Els resultats obtinguts mostren un enriquiment de les marques H4K20me3 i H3K27me3 als *major satellites* de l'HPC a les MEFS HP1 $\alpha^{-/-}$ en comparació amb les cèl·lules WT, mentre que es troben disminuïdes en el cas de les MEFS HP1 $\beta^{-/-}$ i $\gamma^{-/-}$. La pèrdua de cadascuna de les tres isoformes d'HP1 produeix una disminució d'H3K9me3 als *major satellites*, confirmant d'aquesta manera que són redundants pel que fa a la deposició d'aquesta modificació d'histones (Figura R1). Aquests resultats doncs, corroboren que la pèrdua d'HP1 α indueix un enriquiment d'H4K20me3 i d'H3K27me3 a l'HPC tal i com s'havia observat prèviament. No només això si no que mostren també que, la pèrdua tant d'HP1 β com d'HP1 γ , produeix una disminució dels nivells d'ambdues marques històniques a l'HPC. Semblaria doncs, que les isoformes d'HP1 tenen diferents papers pel que fa a la regulació de les marques de l'heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3 a les regions d'HPC, mentre que la pèrdua d'HP1 α produeix un enriquiment d'aquestes marques, HP1 β i HP1 γ

tindrien un efecte contrari. L'efecte d'HP1 en la deposició d'H4K20me3 ja havia estat definit en el procés de formació de l'HPC, on HP1 té un paper al reclutament de proteïnes amb diverses activitats enzimàtiques essencials per la formació d'aquesta com és el cas de Suv420h2, que trimetila H4K20 i promou d'aquesta manera la formació d'una fibra de cromatina compacta. A més a més, s'havia suggerit que podria ser la isoforma HP1 β qui actués en la deposició d'aquestes, estudis que es troben en línia amb els resultats que em obtingut (Rowbotham et al, 2011; Grewal et al, 2015; Hiragami-Hamada et al, 2016).

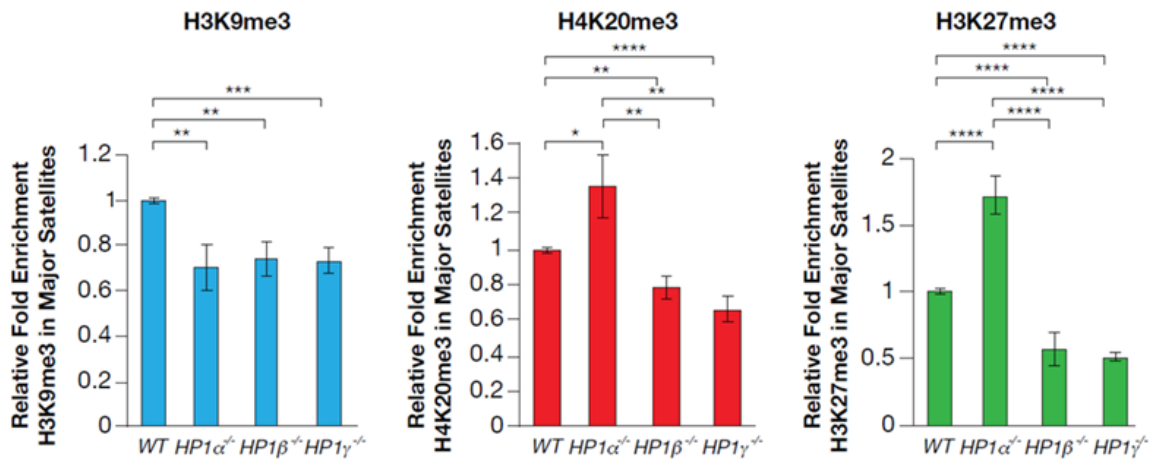


Figura R1. La pèrdua d'HP1 α indueix un enriquiment d'H4K20me3 i d'H3K27me3 a l'HPC. CHIP d'H3K9me3, H4K20me3 i H3K27me3 als *major satellites* en les a les MEFS HP1 α ^{-/-}, β ^{-/-} i γ ^{-/-}. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Per tal de demostrar que l'efecte d'HP1 α respecte aquestes dues modificacions, H4K20me3 i H3K27me3, era directe vàrem realitzar experiments d'IF d'ambdues marques a les línies cel·lulars MEFS HP1 α ^{-/-}(KO), noKO i reKO. Aquestes línies són obtingudes a partir de la línia MEFS HP1 α ^{-/-}, que té incorporat un *cassete* de neomicina al mig del gen HP1 α que impedeix l'expressió del gen. A partir de la sobreexpressió de la recombinasa Cre (R1) a aquesta línia cel·lular, es depleciona el *cassete* de Neomicina i es restaura l'expressió del gen d'HP1 α , donant lloc a la línia noKO (WT). Subseqüentment, la sobreexpressió de la recombinasa FLP (R2), resulta en una depleció parcial del gen d'HP1 α i en la generació d'una forma truncada curta d'HP1 α , que dona lloc a la línia reKO (Figura R2A i B). Els resultats d'aquests experiments mostren que, tal com esperàvem, la re-expressió d'HP1 α endògen a les cèl·lules noKO restaura els nivells basals d'ambdues marques als focis d'HPC. Curiosament, la re-deleció d'HP1 α a les cèl·lules reKO torna a induir un enriquiment d'H3K27me3 als focis d'HPC però no d'H4K20me3, suggerint que el mecanisme de deposició d'ambdues marques als focis d'HPC és diferent. Així mentre que en les cèl·lules KO, el KO ha estat present durant tot el desenvolupament adaptant-se a la falta d'HP1 α , el reKO és un KO que es fa al

moment a posteriori de la fase de desenvolupament (Figures R2C i D). Aquests experiments es van realitzar en cèl·lules a diferent fases del cicle cel·lular i mostren que HP1 α controla de manera directa l'enriquiment d'H4K20me3 i H3K27me3 als focis d'HPC de manera independent del cicle.

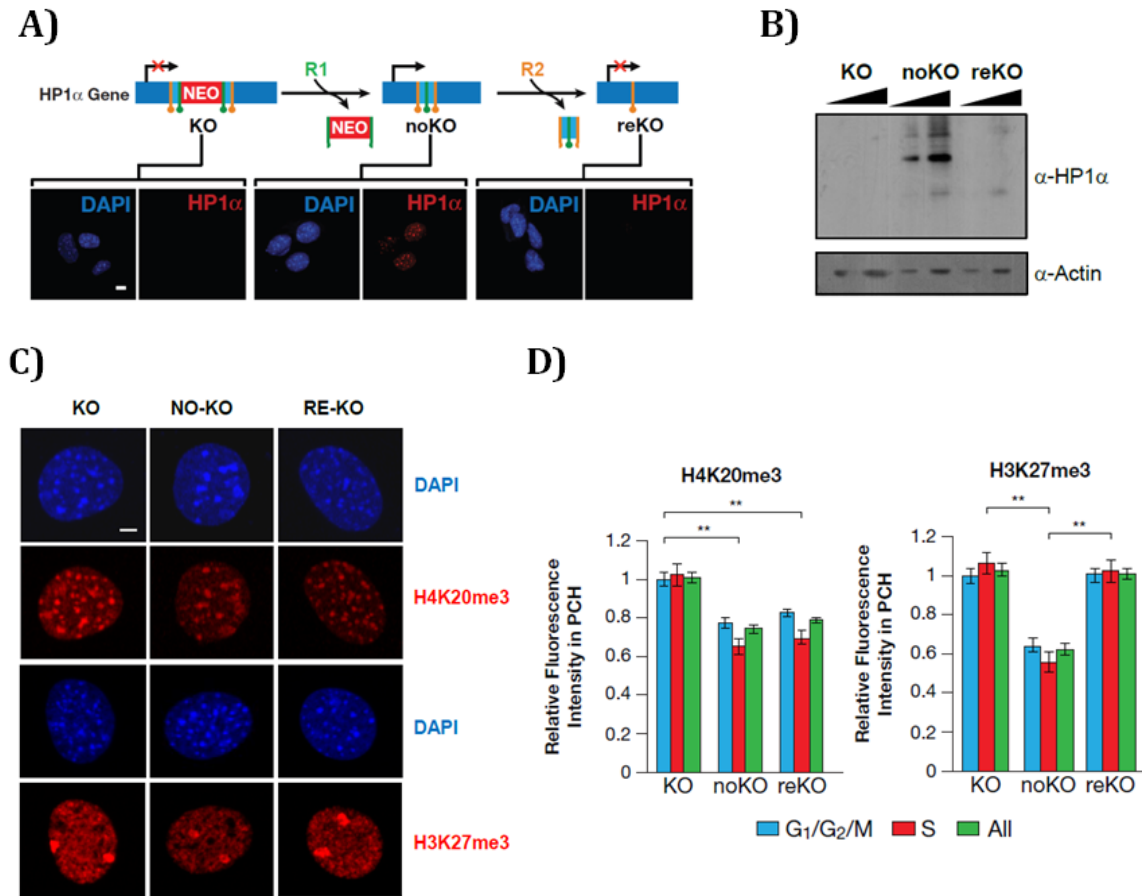


Figura R2. HP1 α regula directament l'enriquiment d'H4K20me3 i d'H3K27me3 a l'HPC. A) Generació de les línees noKO i reKO a partir de la línia MEFs HP1 α ^{-/-} (KO). Els nivells de proteïna s'han determinat a partir d'IF i de **B)** WB. **C)** IF d'H4K20me3 i H3K27me3 en les cèl·lules HP1 α KO, noKO i reKO. **D)** Quantificació de la intensitat de fluorescència relativa de les IF mostrades en C als focis d'HPC, **p<0.01.

Però tot i així, vàrem realitzar experiments d'IF d'ambdues marques H4K20me3 i H3K27me3 en MEFs HP1 α ^{-/-} i en MEFs HP1 α ^{-/-} on vàrem sobreexpressar ectòpicament HP1 α , per tal de corroborar aquests resultats. Els resultats obtinguts mostren que la sobreexpressió d'HP1 α restableix els nivells basals tant d'H4K20me3 (Figura R3A i C) com d'H3K27me3 (Figura R3B i C) als focis d'HPC. A partir d'aquests experiments, podem confirmar que HP1 α controla de manera directa l'*spreading* d'H4K20me3 i H3K27me3 als focis d'HPC.

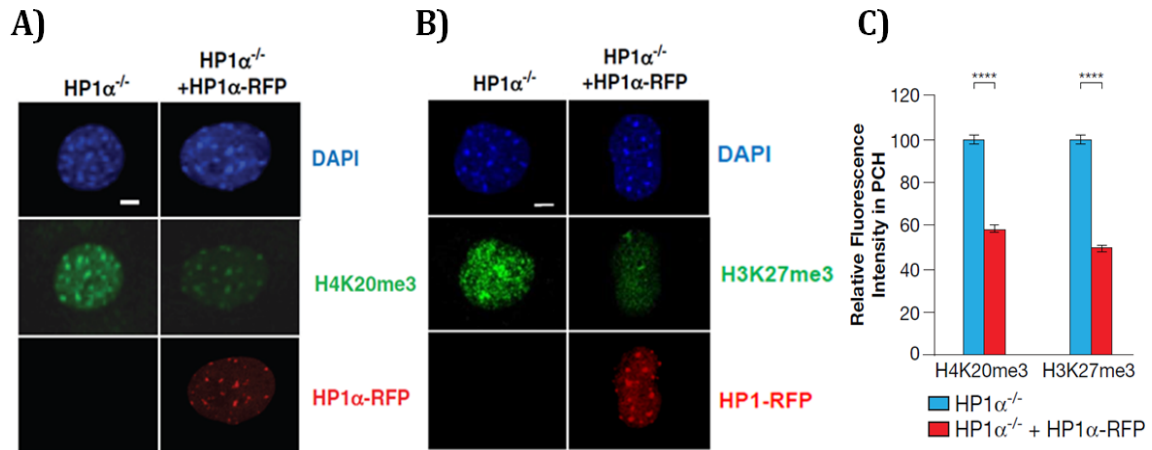


Figura R3. Efecte directe d'HP1α respecte H4K20me3 i d'H3K27me3 a l'HPC A) IF d'H4K20me3 en cèl·lules MEFS HP1α^{-/-} sota l'expressió ectòpica d'un vector buit o d'HP1-RFP. B) IF d'H3K27me3 a les mateixes cèl·lules. C) Quantificació de la intensitat de fluorescència relativa de les IF mostrades en A i B als focis d'HPC ****p<0.001.

1.2. HP1β es troba funcionalment vinculat a H4K20me3 i a Suv420h2 als focis d'HPC

Amb l'objectiu d'aprofundir en el paper de les isoformes d'HP1 respecte el control de les marques d'heterocromatina vàrem decidir estudiar la relació funcional d'aquestes isoformes d'HP1 amb la marca H4K20me3 i amb l'enzim Suv420h2, responsable de la deposició d'aquesta marca a les regions d'HPC.

De manera interessant, tot i que les tres isoformes d'HP1 interaccionen per igual amb Suv420h2 en fraccions nuclears solubles tal i com ha estat descrit (Hahn et al, 2013). Experiments de coimmunoprecipitació (coIP) en extractes nuclears enriquits en cromatina insoluble digerida, de Suv420h2 i d'HP1α,β,γ taggejat amb FLAG, mostren una interacció preferencial de Suv420h2 amb HP1β (Figura R4). Per tant, sota condicions estrictes en extractes nuclears enriquits amb cromatina digerida insoluble podem observar una unió específica de Suv420h2 i d'HP1β, tot i que també es detecta interacció amb HP1α en aquestes condicions. Aquesta coIP s'ha realitzat amb HP1α,β,γ taggejat amb FLAG que per tal de minimitzar l'efecte de l'ús d'anticossos diferents per detectar les isoformes d'HP1 i poder comparar el grau d'interacció entre elles.

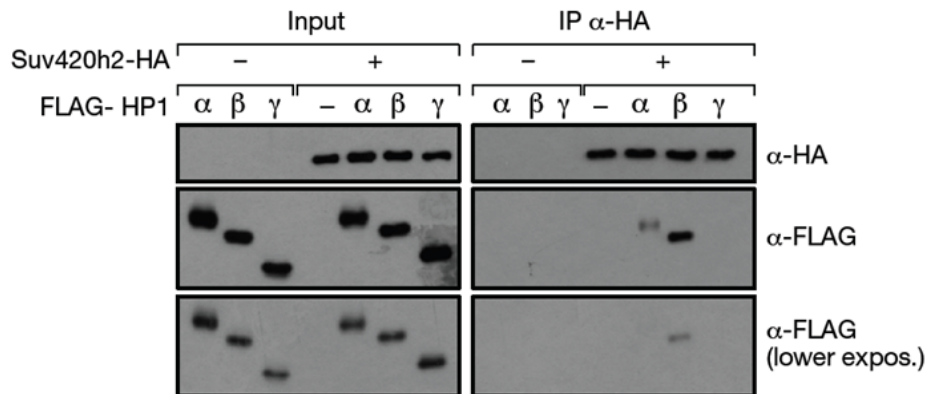


Figura R4. Interacció preferencial de Suv420h2 i HP1β en extractes nuclears enriquits en cromatina. Interacció entre Suv420h2-HA i les isoformes FLAG-HP1 a partir d'experiments de coIP amb reïna HA en cèl·lules HEK293F.

Amb l'objectiu de comprovar si la interacció preferencial entre Suv420h2 i HP1 tenia lloc a les regions d'HPC vàrem realitzar experiments *in vivo* de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) entre Suv420h2 i les isoformes d'HP1. Aquesta tècnica es basa en la transferència d'energia entre fluoròfors, que en el nostre cas són EGFP i RFP, emprant la proteïna de fusió Suv420h2-EGFP com a donador i les isoformes d'HP1-RFP com a acceptors. De manera que s'excita el donador i es van obtenint mesures de la transferència d'energia a l'acceptor a diferents temps. La transferència d'energia només pot passar quan les dues proteïnes es troben molt properes, a una distància inferior a 10nm, distància prou curta per que les interaccions moleculars succeeixin (Figura R5A). Per tal de posar a punt aquesta tècnica s'han d'efectuar controls negatius de FRET utilitzant només la proteïna donadora, Suv420h2-EGFP, o utilitzant una proteïna donadora que s'uneixi a la cromatina però que no interaccioni, com SirT6-EGFP i la proteïna acceptora HP1-RFP (Figures R5B i C). A partir de les observacions de FRET entre Suv420h2 i les isoformes d'HP1, podem confirmar la unió preferencial de Suv420h2 amb HP1β als focis d'HPC *in vivo* en comparació amb HP1α i HP1γ (Figures R5D i E). De manera que aquests resultats semblen indicar una relació més estreta entre Suv420h2 i HP1β, que respecte les altres isoformes. Tal i com he comentat, HP1 té un paper en el reclutament de proteïnes essencials per la formació d'aquesta, com és el cas de Suv420h2. El fet que la isoforma HP1β interactui preferencialment amb Suv420h2 als focis de l'HPC, podria indicar que aquesta isoforma és la que es troba més implicada al reclutament de Suv420h2 a les regions d'HPC per la formació d'una fibra de cromatina compacta, tal i com havia estat suggerit prèviament (Grewal et al, 2015).

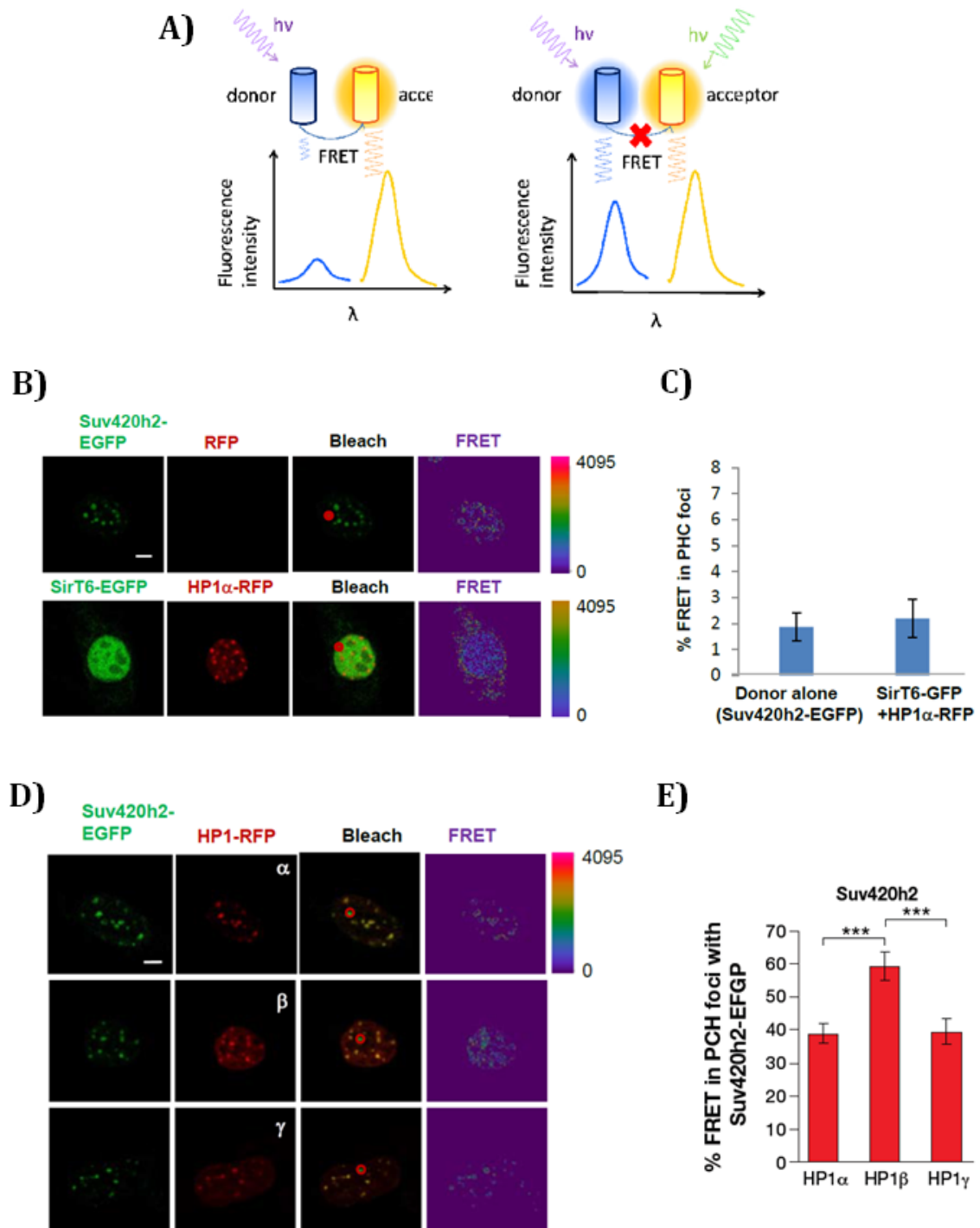
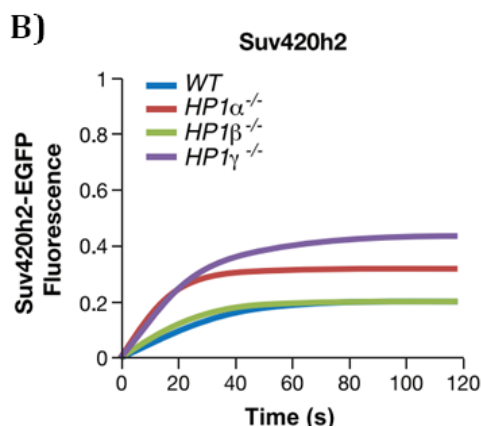
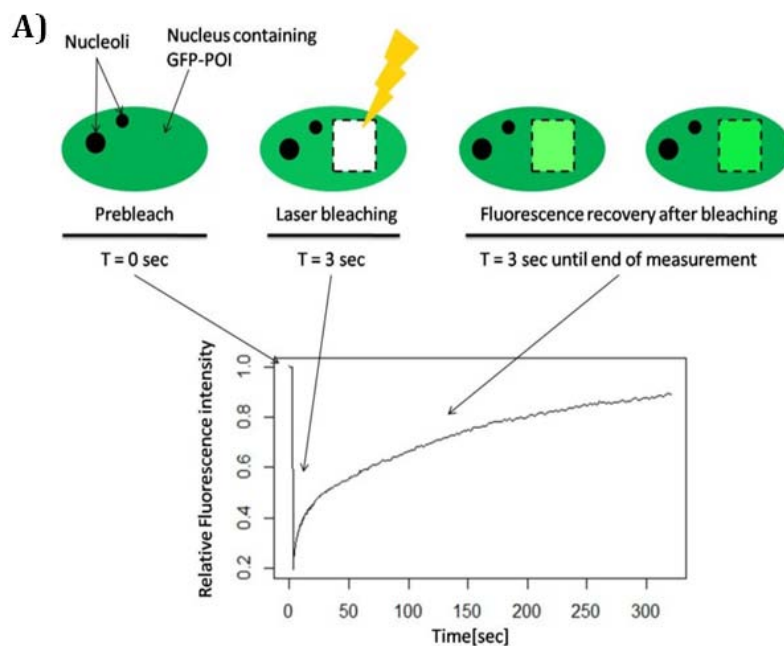


Figura R5. Interacció preferencial de Suv420h2 i HP1 β *in vivo* a l'HPC. **A)** Esquema del mecanisme de funcionament del FRET (Xu et al, 2013). **B)** Controls negatius de FRET utilitzant la molècula donadora Suv420h2-EGFP i la molècula donadora SirT6-EGFP que no interacciona amb HP1 als focis d'HPC en NIH3T3. **C)** Quantificació de n=3 de la intensitat de fluorescència relativa dels experiments de FRET com a B. **D)** FRET de Suv420h2-EGFP i d'HP1-RFP als focis d'HPC en NIH3T3. **E)** Quantificació de la intensitat de fluorescència relativa dels experiments de FRET mostrats a D.

Per tal d'estudiar si les isoformes d'HP1 modulen la dinàmica de Suv420h2 als focis d'HPC vam decidir realitzar experiments *in vivo* de FRAP (*fluorescence*

recovery after a photobleaching) en col·laboració amb el laboratori de la Dra. Lourdes Serrano. Els experiments de FRAP consisteixen en fotodestruir la regió d'interès, que en el nostre cas són els focis d'HPC, i mitjançant la recuperació de la intensitat de EGFP a aquesta regió es pot quantificar el temps mitjà d'intercanvi de Suv420h2-EGFP, la fracció mòbil i la fracció immòbil (Figura R6A). Els experiments de FRAP es van realitzar en les MEFs WT, $HP1\alpha^{-/-}$, $HP1\beta^{-/-}$ i $HP1\gamma^{-/-}$ on es va estudiar la dinàmica de Suv420h2-EGFP als focis d'HPC. Els resultats mostren que la pèrdua d' $HP1\beta$, disminueix el recanvi de Suv420h2 a l'HPC i no altera la fracció mòbil, mentre que la pèrdua d' $HP1\alpha$, augmenta l'intercanvi de Suv420h2 a l'HPC en comparació amb les cèl·lules WT. La pèrdua d' $HP1\gamma$ produeix un efecte intermig (Figura R6B i C). La disminució de l'intercanvi de Suv420h2 associat a la pèrdua d' $HP1\beta$ contrasta amb l'increment de l'intercanvi associat amb la pèrdua d' $HP1\alpha$, indicant un paper antagonista d' $HP1\alpha$ i d' $HP1\beta$ en el control de la dinàmica de Suv420h2. Tenint en compte el conjunt de resultats obtinguts, suggerim que probablement $HP1\beta$ tingui un efecte més directe en la dinàmica de Suv420h2. Una vinculació funcional estreta entre $HP1\beta$ i Suv420h2 podria també explicar la disminució dels nivells d'H4K20me3 observat en les MEFs $HP1\beta^{-/-}$.



C)

FRAP in PCH	Suv20h2 $t^{1/2}$ (s)	Suv20h2 Mobile (%)
MEFs WT	21.60 ± 1.4	23.4 ± 1.5
MEFs $HP1\alpha^{-/-}$	15.7 ± 1.2**	34.6 ± 2.6***
MEFs $HP1\beta^{-/-}$	30.8 ± 2.5**	26.6 ± 2.1
MEFs $HP1\gamma^{-/-}$	26.1 ± 1.3*	48.9 ± 2.0***

Figura R6. Modulació de la dinàmica de Suv420h2 específica d'isoforma d'HP1 *in vivo* a l'HPC. A) Esquema del mecanisme de funcionament de FRAP. B) Intensitat de fluorescència relativa dels experiments de FRAP als foci d'HPC de Suv420h2-EGFP en MEFS WT i HP1 α , β i γ KO. C) Quantificació dels anàlisis de FRAP mostrats en B del temps mitjà d'intercanvi de Suv420h2-EGFP (Suv420h2 $t^{1/2}$) i de la fracció mòbil (Suv420h2 Mobile) * <0.05 , ** <0.01 *** $p<0.001$.

En aquest punt, vàrem voler obtenir suport bioquímic de la relació entre les isoformes d'HP1 i H4K20me3. Per aquest motiu vam portar a terme experiments de purificació per afinitat d'hemaglutina (HA) de les isoformes HA-HP1 α , β , γ . Aquests assaigs han estat realitzats a partir de la transfecció d' HA-HP1 α , β , γ en cèl·lules HEK293F, es digereix la cromatina de la fracció nuclear amb benzonasa i es duu a terme la purificació per afinitat utilitzant reïna HA. Aquestes experiments mostren que la cromatina que immunoprecipita la isoforma HP1 β esà enriquida en H4K20me3 en comparació amb HP1 α i β , mentre que H3K9me3 es detecta a nivells similars amb les tres isoformes (Figura R7A i B). Així doncs, aquests resultats donen suport a la vinculació funcional d'HP1 β amb Suv420h2, ja que la cromatina que immunoprecipita sembla estar enriquida en H4K20me3.

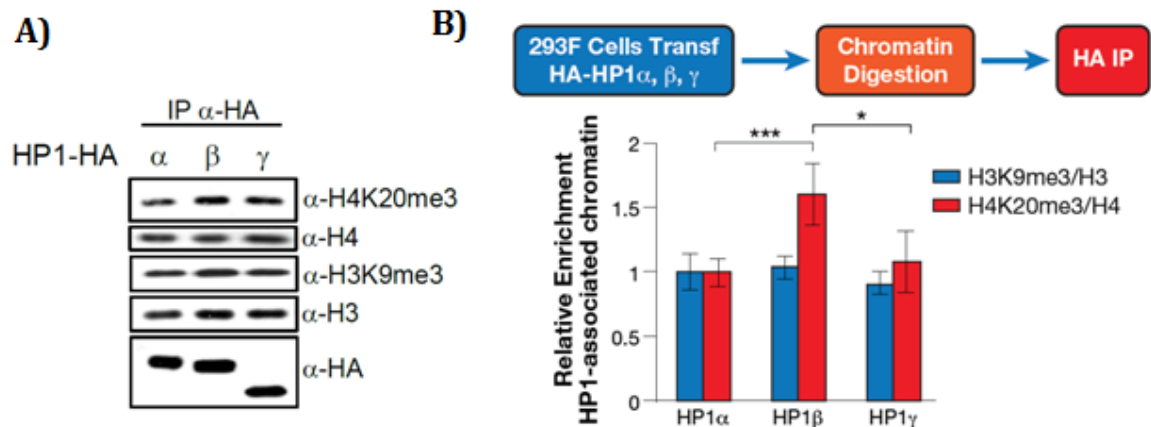


Figura R7. HP1 β s'associa amb cromatina enriquida amb H4K20me3. A) Nivells d'H4K20me3/H4 i d'H3K9me3/H3 de la purificació per afinitat d'HA de HA-HP1 α , β , γ en extractes cromatínics de HEK293F. B) Quantificació de n=3 experiments com en A i representació relativa a HP1 α * <0.05 , *** $p<0.001$.

A continuació vam estudiar la capacitat de cada isoforma per unir-se directament a H4K20me3 en comparació amb H3K9me3 en experiments de *peptide pull-down* utilitzant fraccions nuclears que contenen les isoformes d'HP1 marcades amb HA. Per realitzar aquests experiments vàrem transfectar cèl·lules HEK293F amb HA-HP1 α , β i γ , a continuació obtinguérem els extractes nuclears i es duu a terme el *peptide pull-down* a partir de la utilització de reïna H3K9me3 o H4K20me3-estreptavidina-agarosa-biotinilada. Els *pull-down* han estat realitzats sota dos condicions diferents, en la primera s'ha utilitzat el tampó Dignam que és un tampó suau, i en la segona el tampó RIPA que és molt astringent. En la primera

condició, amb tampó Dignam, vam observar que les tres isoformes d'HP1 s'unien fortament al pèptid H3K9me3 però que només HP1 β s'unia al pèptid H4K20me3. En canvi en la segona condició, amb tampó RIPA, només vàrem observar que les tres isoformes d'HP1 s'unien al pèptid H3K9me3. La unió d'HP1 β a H4K20me3 sembla ser més làbil que la unió a H3K9me3, ja que en condicions fortament astringents queda abolida (Figura R8). Aquests resultats suggereixen que HP1 β uneix H4K20me3.

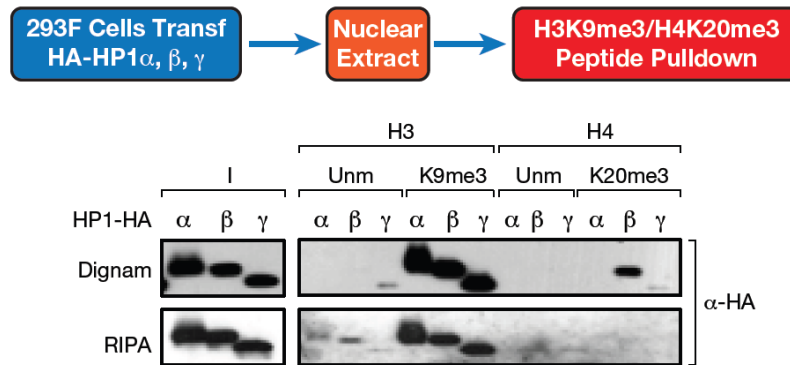


Figura R8. HP1 β presenta major afinitat d'unió per H4K20me3. Pull-down d'H3K9me3/H4K20me3-estreptavidina-agarosa-biotinilada en extractes nuclears de HEK293F que contenen HA-HP1 α, β, γ obtinguts en condicions suaus (Dignam) i en condicions astringents (RIPA).

A continuació, per comprovar aquesta relació específica entre H4K20me3 i HP1 β vam realitzar experiments de reCHIP de les isoformes d'HP1 endògenes (primer CHIP) i d'H3K9me3 o H4K20me3 (segon CHIP) als *major satellites* de l'HPC. A partir d'aquesta tècnica, podem estudiar si hi ha co-enriquiment a la cromatina de dues proteïnes mitjançant la realització de dos CHIPs consecutius contra les nostres dues proteïnes d'interès. Conseqüentment amb els resultats que havíem obtingut, els experiments de reCHIP mostren que el ràtio H4K20me3/H3K9me3 en el cas del reCHIP d'HP1 β és significativament major que en el cas d'HP1 α i γ (Figura R9). Aquests resultats indiquen que hi ha més co-enriquiment d'H4K20me3 i HP1 β als *major satellites* que d'H4K20me3 i les altres isoformes d'HP1. Per tant, H4K20me3 sembla estar més vinculat amb la isoforma HP1 β a nivell de foci d'HPC. Mentre que, la isoforma HP1 γ és la que presenta menor co-enriquiment amb H4K20me3 a aquestes regions.

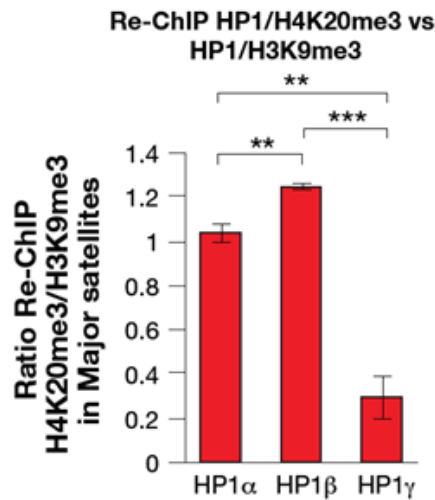


Figura R9. Enriquiment d'H4K20me3 i HP1 β a major satellites. Experiments de reCHIP de les isoformes d'HP1 endògenes (1r CHIP) i d'H3K9me3 o H4K20me3 (2n CHIP) als *major satellites* en cèl·lules NIH3T3. Es mostra el ràtio del reCHIP d'HP1-H4K20me3/HP1-H3K9me3 als *major satellites* per cada isoforma de n=3 experiments **p<0.01 ***p<0.001.

Aquesta major co-localització entre HP1 β i H4K20me3 no és exclusiva de les regions d'HPC. A partir d'experiments de seqüenciació de CHIP (CHIP-seq) en cèl·lules mare embrionàries de ratolí (ESCs) publicats, vàrem analitzar la correlació de co-localització d'HP1 α o HP1 β amb H4K20me3 a tot el genoma, i els resultats obtinguts confirmen una correlació més forta entre HP1 β i H4K20me3 en comparació amb HP1 α (Figura R10).

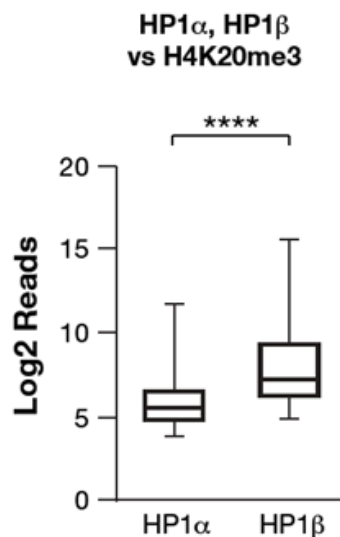


Figura R10. Correlació de la co-localització d'HP1 α o HP1 β amb H4K20me3 a tot el genoma en ESCs de ratolí. Boxplot del logaritme de *reads* d'H4K20me3 en regions ocupades per HP1 α o HP1 β d'experiments de CHIP-seq publicats prèviament.

1.3. HP1 α i CTCF cooperen en l'organització de l'HPC

La marca H4K20me3 ha estat directament relacionada amb els nivells de compactació als focis d'HPC, de fet és necessària per a que es doni el correcte ensamblatge de les fibres de cromatina (Dambacher, 2013; Saksouk et al, 2015). D'acord amb això, assaigs de compactació de la cromatina per digestió amb nucleasa microccocal per mesurar el grau de compactació associat a la pèrdua de les isoformes d'HP1, van demostrar que la pèrdua d'HP1 α en MEFS indueix una significant disminució de l'accessibilitat tant a nivell de focis d'HPC com a nivell global de la cromatina, indicant per tant un augment de la compactació.

L'efecte diferencial de la pèrdua d'HP1 α sobre H4K20me3 i sobre la compactació d'aquestes regions ens va portar a considerar un possible efecte d'HP1 α sobre el control de les regions flanquejants o *boundary elements* de l'heterocromatina pericentromèrica. Aquestes elements són regions que estableixen els límits entre els diferents dominis cromatínics per tal de mantenir-les separades i evitar la propagació de l'heterocromatina per preservar l'eucromatina adjacent (Arzate-Mejía, 2018). CTCF té un paper molt important a les regions flanquejants on actua com a regulador principal de l'arquitectura de la cromatina, definint els límits entre l'eucromatina i l'heterocromatina (Cuddapah et al, 2009). Ha estat descrit que CTCF s'associa a aquestes regions flanquejants però també es troba a les regions d'HPC enriquides en H3K27me3 properes a les regions flanquejants (Mukhopadhyay et al, 2004; Herold et al, 2012; Xiao et al, 2015).

A partir d'aquesta vinculació de CTCF a l'HPC, vam hipotetitzar que HP1 α podia tenir un paper conjuntament amb CTCF en el control de l'*spreading* de les marques d'heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3, i en organització de l'estructura interna de les regions d'HPC. Primerament, vàrem testar les interaccions entre CTCF i les isoformes d'HP1 a partir d'experiments de coIP d'HA en extractes de HEK293F que expressen HA-HP1 α , β i γ , per tal de poder comparar el grau d'interacció entre elles. Segons les dades obtingudes podem observar que, CTCF s'uneix específicament a HP1 α , però no a les altres isoformes en les nostres condicions d'estudi (Figura R11).

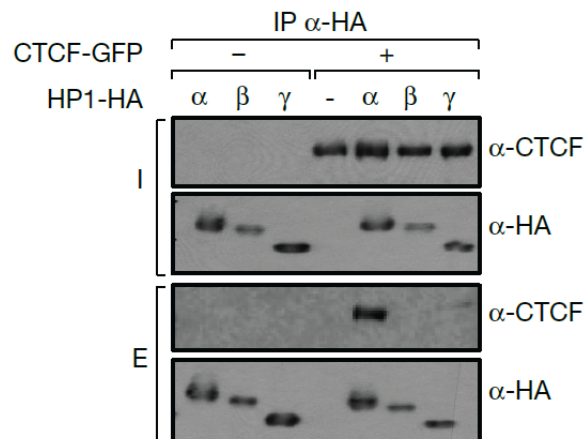


Figura R11. Interacció de CTCF i HP1 α a nivell global. Interacció entre CTCF-GFP i les isoformes HA-HP1 a partir d'experiments de coIP amb reïna HA en extractes de cèl·lules H3K293F.

A continuació vam estudiar si la unió entre CTCF i HP1 α tenia lloc a les regions d'HPC *in vivo* mitjançant experiments de FRET. Per realitzar els experiments de FRET hem utilitzat com a donador CTCF-EGFP i les isoformes d'HP1-RFP com a acceptors. Les observacions obtingudes ens mostren que el nivell de FRET entre CTCF i HP1 α és major que en cas de les altres isoformes, on arriba a ser dues vegades major que per CTCF i HP1 β (Figures R12A i B). Aquests resultats semblen indicar que la unió preferencial entre CTCF i la isoforma HP1 α té lloc no només a nivell global si no també a nivell de les regions d'HPC.

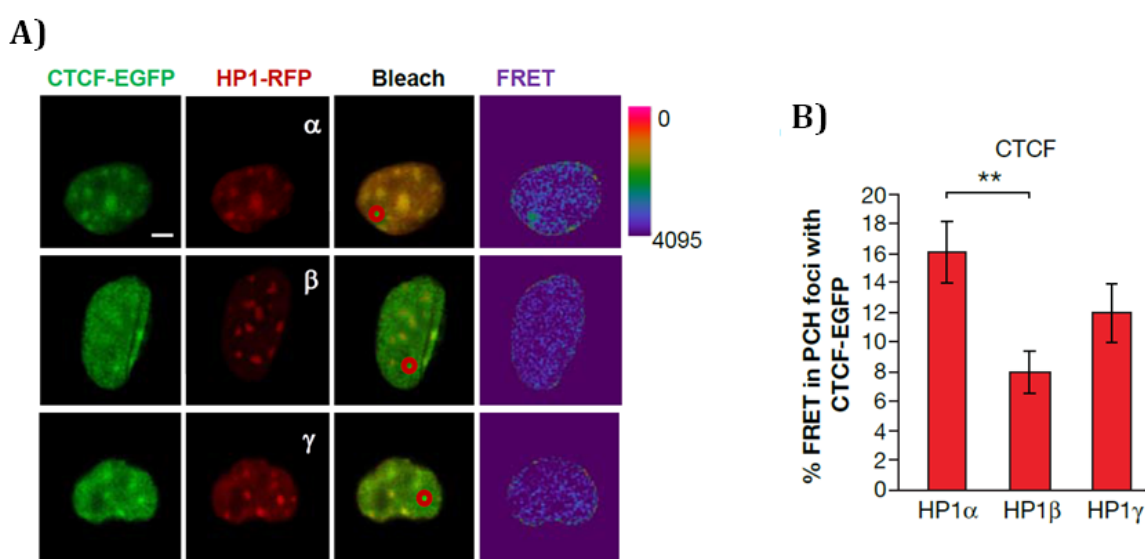


Figura R12. Interacció preferencial de CTCF i HP1 α *in vivo* a l'HPC. A) FRET de CTCF-EGFP i d'HP1-RFP als focis d'HPC en cèl·lules NIH3T3. B) Quantificació de la intensitat de fluorescència relativa dels experiments de FRET mostrats en A ****** $p < 0.01$.

Per tal d'estudiar si la pèrdua de les isoformes d'HP1 produïa algun canvi en la localització de CTCF, vàrem dur a terme experiments d'IF de CTCF-EGFP en MEFS HP1 WT, MEFS HP1 $\alpha^{-/-}$, $\beta^{-/-}$ i $\gamma^{-/-}$. Els resultats obtinguts mostren que CTCF és significativament més escàs als focis d'HPC a les MEFS HP1 $\alpha^{-/-}$ (Figura R13), suggerint que HP1 α es troba directament relacionada amb la localització de CTCF a les regions d'HPC. De manera contrària, la pèrdua d'HP1 β induïx, en un 45% de les cèl·lules analitzades, un enriquiment fortament pronunciat de CTCF a les regions d'HPC, el que suggereix que la pèrdua d'HP1 β produeix una propagació de CTCF més enllà dels seus llocs de localització habituals. Aquests resultats doncs, donen suport al paper antagonista d'HP1 α i d'HP1 β a les regions d'HPC.

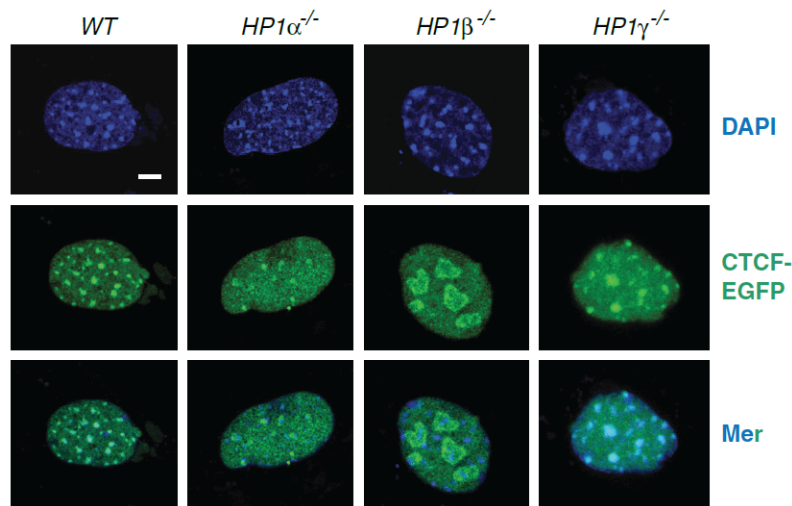


Figura R13. Paper de les isoformes d'HP1 en la localització de CTCF. IF de CTCF-EGFP als nuclis de les MEFS WT i HP1 KO.

Aquest enriquiment tant pronunciat de CTCF a les regions d'HPC associat a la pèrdua d'HP1 β en MEFS, correlaciona amb un augment global dels nivells de proteïna CTCF a aquestes mateixes cèl·lules en experiments de WB (Figura R14), sense alteració de la seva expressió gènica. Aquesta observació concorda amb una propagació de CTCF més enllà dels seus llocs de localització en les MEFS HP1 β ^{-/-}, i el fet de que no es vegin canvis en la seva expressió gènica pot portar a pensar que aquest augment dels nivells de CTCF podria ser degut a canvis en la estabilització de la proteïna.

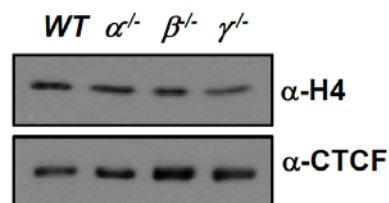


Figura R14. Paper de les isoformes d'HP1 en els nivells de CTCF. WB dels nivells de CTCF en les MEFS WT i HP1 KO.

Amb l'objectiu de corroborar el paper de les isoformes d'HP1 en la deposició de CTCF vàrem realitzar CHiPs de CTCF a les MEFS HP1 WT, MEFS HP1 α ^{-/-}, β ^{-/-} i γ ^{-/-}. Conseqüentment vam observar que, tot i que els nivells de CTCF als *major satellites* de l'HPC semblen molt baixos a les cèl·lules WT, α ^{-/-} i γ ^{-/-}, es va detectar un enriquiment significatiu, de més de set vegades, de CTCF a les MEFS HP1 β ^{-/-}, en concordança al que havíem observat en els resultats d'IF. En canvi no es va trobar enriquiment en *minor satellites*, que són les seqüències repetitives que formen part de les regions centromèriques (Figura R15A). Addicionalment, es va detectar enriquiment anormalment alt CTCF a la regió de control d'*imprinting* H19 (H19-

ICR) en les MEFS $HP1\beta^{-/-}$, que són regions on s'uneix CTCF per duu a terme el seu paper en el control de l'imprinting. Una altra dada rellevant a aquests estudis és que, es va detectar CTCF fora del lloc d'unió a H19-ICR en MEFS $HP1\beta^{-/-}$, entre 1 i 2 kb *downstream* del lloc d'unió 1 d' H19-ICR (ICR1) (Figura R15B). També es va observar un gran augment de CTCF als elements repetitius LINE-L1 (*long interspersed nuclear elements-L1*) en el cas de les cèl·lules $HP1\beta^{-/-}$ (Figura R15A). El conjunt d'aquestes evidències corroboren un paper antagònic d'HP1 α i d'HP1 β a la distribució de CTCF, on HP1 α es trobaria relacionat amb la deposició de CTCF a les regions d'HPC i HP1 β tindria un paper més relacionat amb evitar la propagació massiva de CTCF a les regions d'HPC i a altres regions del genoma.

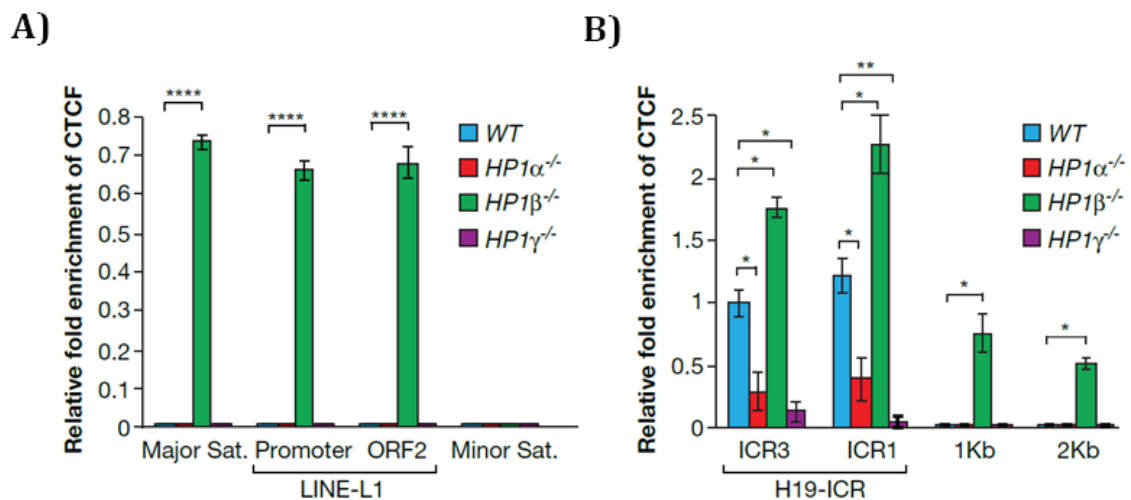


Figura R15. Paper de les isoformes d'HP1 a l'enriquiment de CTCF a diferents regions de la cromatina. A) CHIP de CTCF en *major satellites*, promotor de LINE-L1 i ORF2, i *minor satellites* a les MEFS WT i HP1 KO. Els gràfics representen l'enriquiment de CTCF relatiu als nivells de CTCF a H19-ICR de les MEFS WT mostrades en B de n=3 experiments **** $p < 0.0001$ **B)** CHIP de CTCF com en A dels llocs d'unió de CTCF a H19-ICR ICR1 i ICR3, i 1 i 2kb *downstream* de ICR1 * $p < 0.005$ ** $p < 0.001$.

Els nostres estudis clarament demostren que CTCF està present a l'HPC, sobretot en absència d'HP1 β . No obstant, la presència de CTCF a l'HPC en condicions normals no s'havia demostrat fins ara d'una forma convincent. Per donar suport a les nostres observacions, vam realitzar un anàlisi detallat de colocalització de la senyal endògena de CTCF a les regions d'HPC per tal de confirmar la presència de CTCF a aquestes regions (Figura R16). Els resultats obtinguts d'aquest anàlisi mostren un coeficient de correlació de *Pearson* de 0.8, el que indica que hi ha una correlació positiva entre CTCF-HPC. Aquests anàlisis són consistents amb les dades publicades que indicaven que CTCF es troba present a les regions d'HPC en nivells limitants o bé sota determinades condicions (Mukhopadhyay et al, 2004; Herold et al, 2012; Xiao et al, 2015).

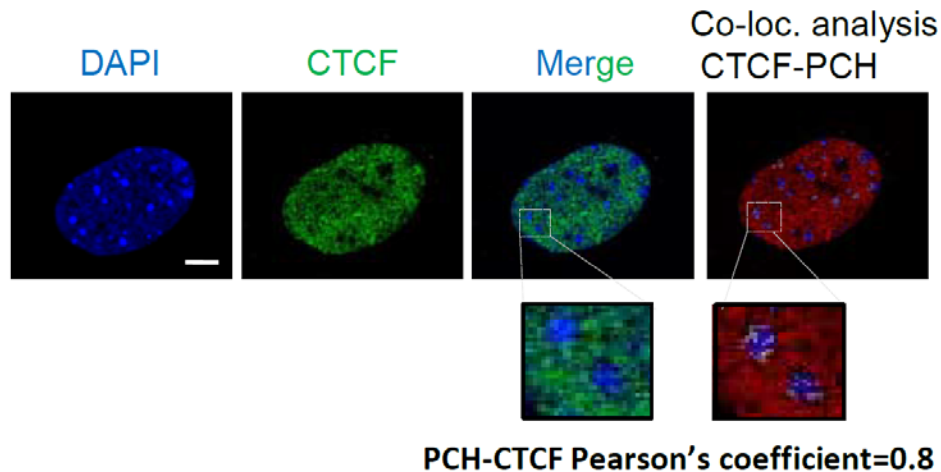


Figura R16. CTCF co-localitza a les regions d'HPC. IF de la distribució endògena de CTCF en cèl·lules MEFS WT. L'anàlisi de correlació de CTCF i HPC s'ha efectuat mitjançant el coeficient de correlació de Pearson que dona un valor de 0.8, la a co-localització positiva de la senyal de CTCF amb els focis d'HPC es mostra en blanc.

Per acabar de completar aquesta part, vàrem decidir estudiar l'efecte de la pèrdua de CTCF sobre les marques d'heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3 a les regions d'HPC. A partir de shRNA (*short hairpin RNA*) vàrem disminuir els nivells de CTCF, tal i com es mostra a la següent immunofluorescència (**Figura R17A**). A partir d'aquestes imatges podem observar que els shRNA de CTCF produeixen una baixada forta dels nivells de CTCF, i un aspecte interessant és que, aquesta disminució dels nivells de CTCF sembla no afectar a la localització d'HP1 α . Així doncs, mentre que HP1 α sembla tenir un paper en la deposició de CTCF a l'HPC, els nostres estudis indiquen que CTCF no afecta a la localització d'HP1 α . Mitjançant IF d'H4K20me3 i d'H3K27me3 en cèl·lules NIH3T3 amb shRNA scr o de CTCF vàrem observar que, com en el cas de la pèrdua d'HP1 α , la disminució de CTCF indueix un enriquiment significatiu d'H3K27me3 (2.6 vegades) als focis d'HPC. Però, en aquest cas, no s'observen canvis en els nivells d'H4K20me3 (**Figura R17B**). El conjunt de totes aquestes evidències suggereix que, HP1 α tindria un paper en la deposició de CTCF a l'HPC, i que ambdues proteïnes col·laborarien per tal de definir els dominis cromatínics i organitzar l'HPC.

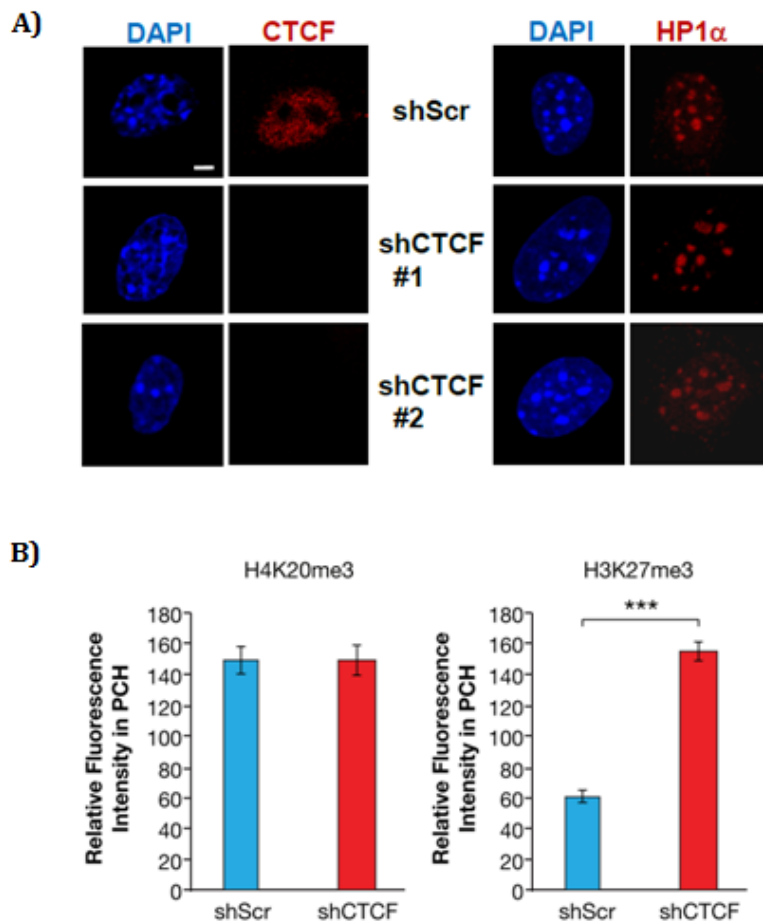


Figura R17. Efecte de CTCF respecte H4K20me3 i H3K27me3. A) IF de CTCF i d'HP1 α en cèl·lules NIH3T3 shRNAscr, shCTCF#1 i shCTCF#2. **B)** Quantificació de la intensitat de fluorescència relativa de les IF d'H4K20me3 i d'H3K27me3 als focs d'HPC en cèl·lules NIH3T3 shRNAscr i shCTCF *** $p < 0.0001$.

1.4. H2A.Z interactua preferentment amb HP1 β als focs d'HPC

La variant d'histona H2A.Z és una proteïna fonamental a les regions d'HPC. S'ha postulat que H2A.Z probablement actuï controlant la localització d'HP1 α a aquestes regions d'HPC i que és per tant, una proteïna necessària pel correcte assemblatge de la cromatina (Pusarla & Bhargava, 2005; Matsuda et al, 2010). En suport a això, la deleció d'H2A.Z.1 redueix la unió d'HP1 α a l'ADN tant a les regions pericèntriques com a les centromèriques (Meneghini et al, 2003; Greaves et al, 2007).

D'altra banda, H2A.Z també és molt important a les regions flanquejants on intervé en la formació dels límits cromatínics per prevenir la propagació ectòpica de l'heterocromatina (Meneghini et al, 2003). Un estudi molt recent descriu que, H2A.Z regula el desempaquetament dels nucleosomes i la unió de CTCF a aquestes regions en ESC de ratolí. Els resultats d'aquest estudi mostren que H2A.Z està

enriquit als nucleosomes desembolicats en comparació amb els nucleosomes canònics, i que podria tenir un paper a la regulació gènica i a la regulació de la unió de CTCF mitjançant la modulació dels estats de desenrotllament dels nucleosomes (Wen et al, 2020).

A partir d'aquestes evidències, vam hipotetitzar que H2A.Z podria trobar-se implicada en cooperació amb HP1 α i amb CTCF en l'estructura i organització de les regions d'HPC a partir del control de l'*spreading* de les marques heterocromatíniques. Així doncs, una possibilitat seria que H2A.Z controlés la localització d'HP1 α a les regions d'HPC tal i com han descrit estudis previs. HP1 α a la seva vegada controlaria la localització de CTCF a l'HPC, i d'aquesta manera controlarien l'organització de la cromatina com suggereixen els nostres estudis. A més a més, podria ser que H2A.Z també tingués un paper a la regulació de la localització de CTCF a aquestes regions d'HPC a través del desenrotllament dels nucleosomes tal i com han descrit estudis recents a les regions flanquejants.

Per tal de començar a aprofundir en la relació de les isoformes d'HP1 amb la variant d'histona H2A.Z, vàrem decidir estudiar si hi ha havia una interacció diferencial entre HP1 α,β,γ i H2A.Z tant a nivell global com a nivell d'HPC. Per estudiar la interacció a nivell global, vàrem realitzar experiments de coIP utilitzant reïna HA de HA- HP1 α , β i γ sobreexpressat per tal de poder comparar el grau d'interacció entre isoformes, i d'H2A.Z-GFP en extractes nuclears de cèl·lules HEK293F. Els resultats obtinguts mostren un major grau d'interacció d'H2A.Z amb HP1 β (Figura R18A). Experiments de coIP amb reïna HA de les isoformes HA-HP1 i H2A.Z endògen en extractes nuclears de la mateixa línia cel·lular confirmen aquests resultats on la isoforma que més interacciona amb H2A.Z és HP1 β , i en menor mesura HP1 γ i HP1 α (Figura R18B).

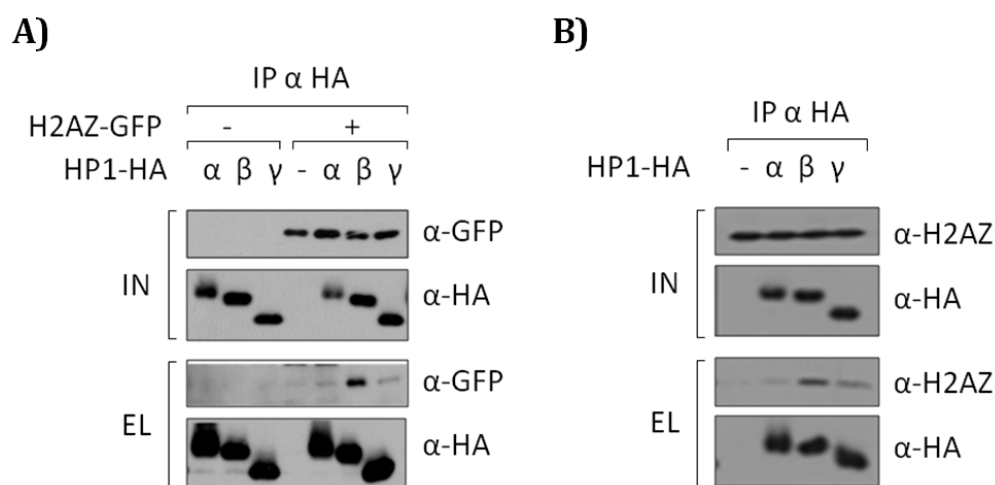


Figura R18. Interacció preferencial d'H2A.Z i HP1 β en extractes nuclears. **A)** Interacció entre H2A.Z-GFP i les isoformes HA-HP1 a partir d'experiments de coIP amb reïna HA en extractes nuclears de cèl·lules HEK293F. **B)** Interacció entre H2A.Z endògen i les isoformes HA-HP1 a partir d'experiments de coIP com a A.

També vàrem realitzar experiments de coIP de les isoformes d'HP1 endògenes i d'H2A.Z endògen utilitzant reïna crosslincada amb anticòs H2A.Z en extractes nuclears de cèl·lules H3K293F, per tal de comprovar si érem capaços de detectar la interacció de les proteïnes endògenes. A partir dels resultats obtinguts podem observar que H2A.Z mostra una clara interacció amb HP1 β i amb HP1 γ , i sembla interaccionar també amb HP1 α , confirmant que aquestes interaccions tenen lloc també a nivell endògen. Però en aquest cas, no podem ser categòrics amb el grau d'interacció entre elles degut a la utilització de diferents anticòs per detectar les isoformes d'HP1 (Figura R19). Aquest conjunt d'observacions suggereixen que H2A.Z interacciona preferencialment amb HP1 β a nivell global.

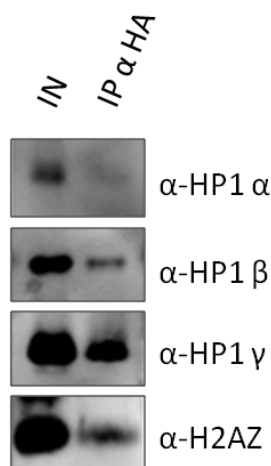
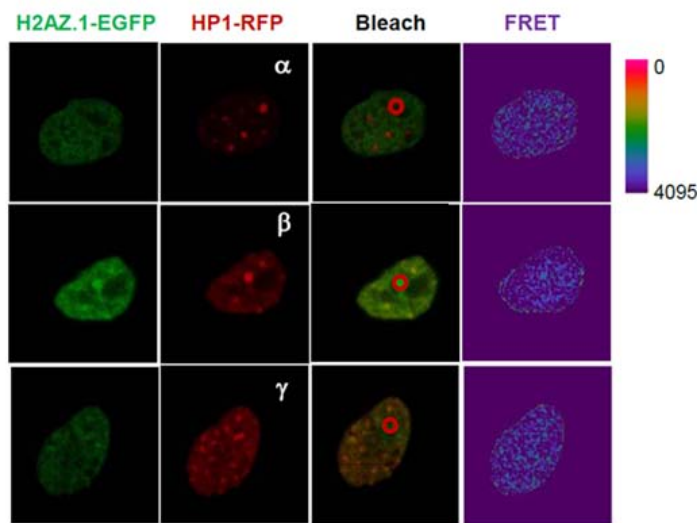


Figura R19. Interacció endògena d'H2A.Z amb les isoformes d'HP1 en extractes nuclears. Experiments de coIP amb reïna crosslincada amb H2A.Z d' H2A.Z i les isoformes d'HP1 a extractes nuclears de cèl·lules HEK293F.

Amb l'objectiu de comprovar si la interacció preferencial entre H2A.Z i HP1 β tenia lloc a les regions d'HPC vàrem realitzar experiments *in vivo* de FRET entre H2A.Z i les isoformes d'HP1 als focis de l'HPC en cèl·lules NIH3T3. Per realitzar aquests experiments de FRET vàrem utilitzar com a donador H2A.Z-EGFP i les isoformes d'HP1-RFP com a acceptors. Les observacions obtingudes ens mostren que el nivell de FRET entre H2A.Z i HP1 β és major que en cas de les altres isoformes (Figures R20A i B). Aquests resultats semblen indicar que la unió preferencial d'H2A.Z i la isoforma HP1 β té lloc no només a nivell global si no també a nivell de les regions d'HPC.

A)



B)

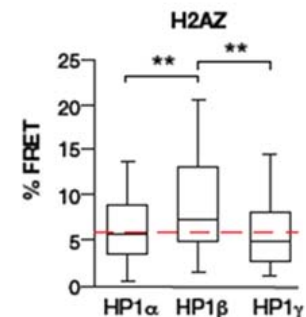
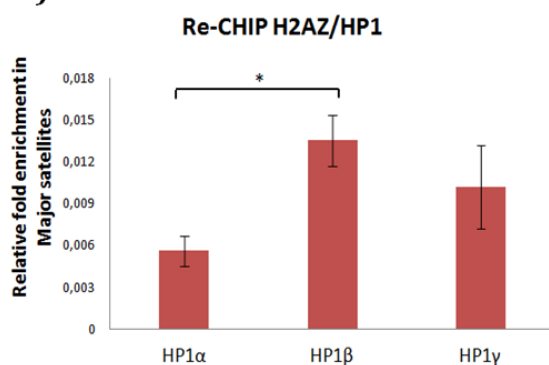


Figura R20. Interacció preferencial d'H2A.Z i HP1 β *in vivo* a l'HPC. A) FRET d'H2A.Z-EGFP i d'HP1-RFP als focis d'HPC en cèl·lules NIH3T3. **B)** Quantificació de la intensitat de fluorescència relativa dels experiments de FRET mostrats en D ******p<0.01.

Per confirmar la interacció preferencial d'H2A.Z i HP1 β a les regions d'HPC, vam realitzar experiments de reCHIP d'H2A.Z endògen (primer CHIP) i de les isoformes sobreexpressades HA-HP1 (segon CHIP) per estudiar el seu enriquiment als *major satellites* de l'HPC. Conseqüentment amb els resultats obtinguts mitjançant FRET, els experiments de reCHIP mostren que hi ha un enriquiment d'HP1 β i H2A.Z als *major satellites* de l'HPC (Figura R21A). Com a control de l'especificitat de l'enriquiment d'HP1 β i H2A.Z, s'ha realitzat reCHIP d'H2A endògen (primer CHIP) i de les isoformes sobreexpressades HA-HP1 (segon CHIP) i els resultats mostren que la histona canònica H2A es troba més enriquida juntament amb HP1 α a *major satellites* de l'HPC, corroborant l'especificitat d'HP1 β i d'H2A.Z a aquestes regions (Figura R21B). Aquests resultats corroboren doncs, la unió preferencial d'H2A.Z amb HP1 β a les regions d'HPC.

A)



B)

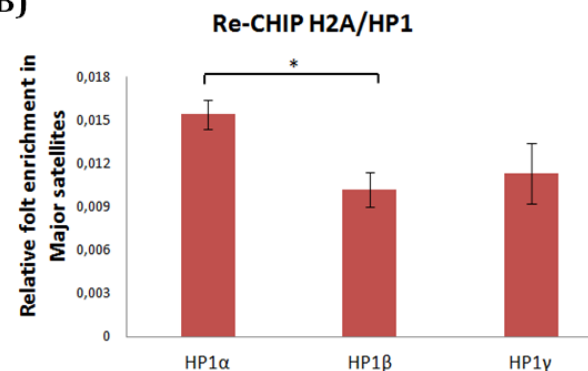


Figura R21. Enriquiment d'H2A.Z i HP1 β a major satellites de l'HPC. Experiments de reCHIP (A) d'H2A.Z endògen o (B) d'H2A (primer CHIP) i de les isoformes sobreexpressades HA-HP1 (2n CHIP) als major satellites en cèl·lules NIH3T3 *p<0.01.

1.5. HP1 α controla la propagació d'H2A.Z als focis d'HPC

Llavors vàrem decidir estudiar si la pèrdua de les isoformes d'HP1 produïa canvis en la localització d'H2A.Z a les regions d'HPC, per veure si estaven implicades en el control de la seva localització. Així doncs, vam dur a terme experiments d'IF d'H2A.Z-EGFP sobreexpressat en MEFS HP1 WT, MEFS HP1 $\alpha^{-/-}$, $\beta^{-/-}$ i $\gamma^{-/-}$. Els resultats obtinguts mostren un enriquiment d'H2A.Z als focis de l'HPC a les MEFS HP1 $\alpha^{-/-}$ en comparació amb les cèl·lules WT, similar al que es va observar en el cas d'H4K20me3 i d'H3K27me3 en aquesta mateixa línia cel·lular (Figura R22).

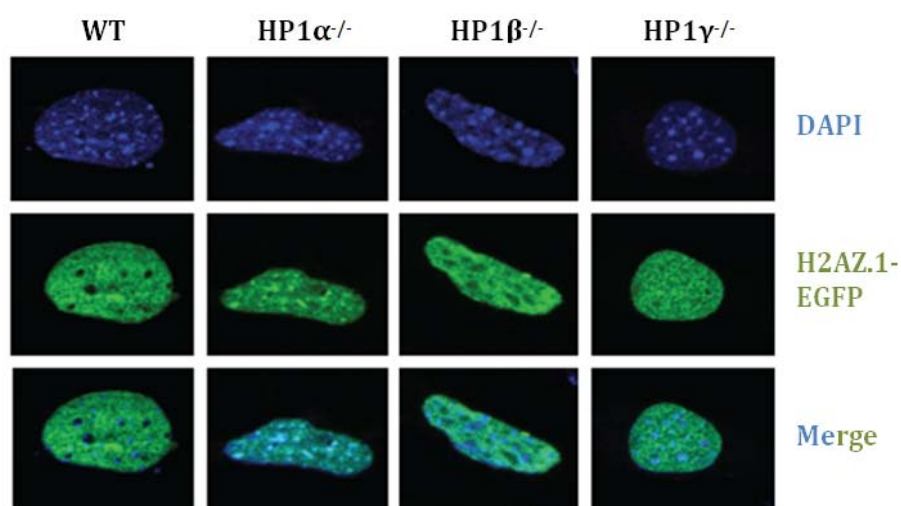


Figura R22. La pèrdua d'HP1 α induïx un enriquiment d'H2A.Z sobreexpressat a l'HPC. IF d'H2A.Z-EGFP en els nuclis de les MEFS HP1 WT, HP1 $\alpha^{-/-}$, $\beta^{-/-}$ i $\gamma^{-/-}$.

Vàrem passar a estudiar la localització endògena d'H2A.Z a les mateixes MEFS per IF (Figura R23A), i podem observar també un enriquiment d'H2A.Z a les regions d'HPC en el cas de les MEFS HP1 $\alpha^{-/-}$, però en aquest cas les diferències són més petites. Tot i així, al gràfic es mostra la quantificació d'H2A.Z als focis d'HPC en les diferents línies cel·lulars i podem veure que les diferències són molt reproduïbles i per tant, significatives (Figura R23B).

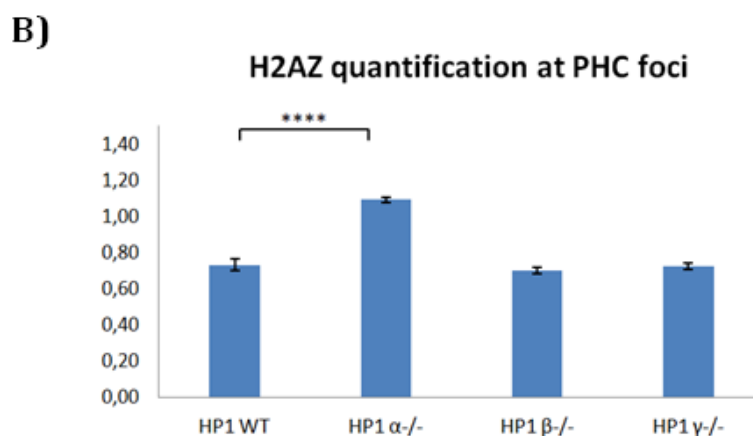
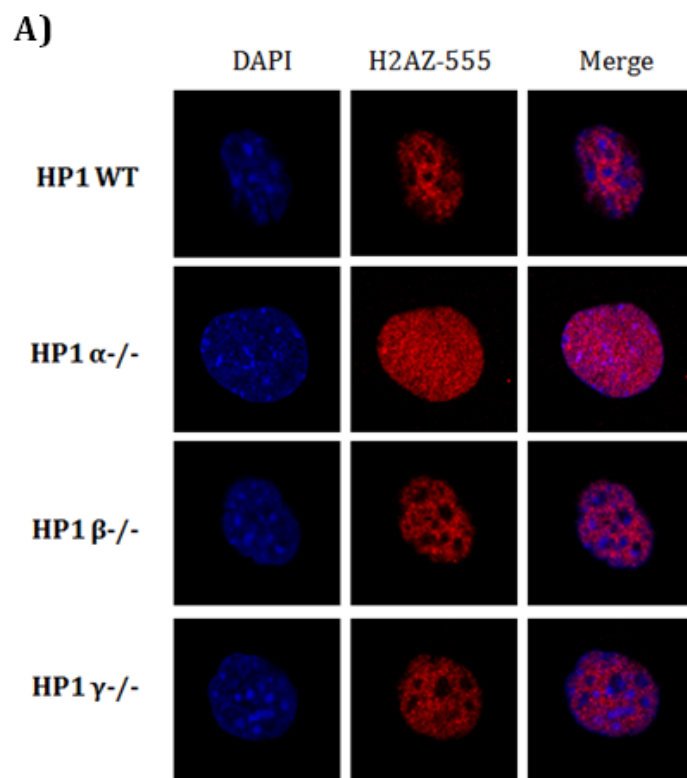


Figura R23. La pèrdua d'HP1 α indueix un enriquiment d'H2A.Z endògen a l'HPC. A) IF d'H2A.Z en els nuclis de les MEFS HP1 WT, HP1 $\alpha^{-/-}$, $\beta^{-/-}$ i $\gamma^{-/-}$. **B)** Gràfic que mostra la quantificació dels nivells de fluorescència relativa d'H2A.Z als foci d'HPC en les MEFS HP1 WT i KO. Es van analitzar 20 cèl·lules de cada condició ****p<0.0001.

Amb la finalitat de confirmar l'enriquiment d'H2A.Z endògen a les regions d'HPC associats a la pèrdua de la isoforma HP1 α , vàrem realitzar experiments de CHIP d'H2A.Z a les MEFS d'HP1. Conseqüentment, les dades obtingudes mostren un enriquiment important d'H2A.Z als *major satellites* de l'HPC en les MEFS HP1 $\alpha^{-/-}$ (2.1 vegades) en comparació amb les cèl·lules WT, i també s'observa un enriquiment suau en les MEFS HP1 $\gamma^{-/-}$ (Figura R24). Aquests resultats doncs,

suggereixen el paper d'HP1 α en el control de la propagació d'H2A.Z als focis de l'HPC, mostrant un paral·lelisme amb l'observat amb H4K20me3 i H3K27me3.

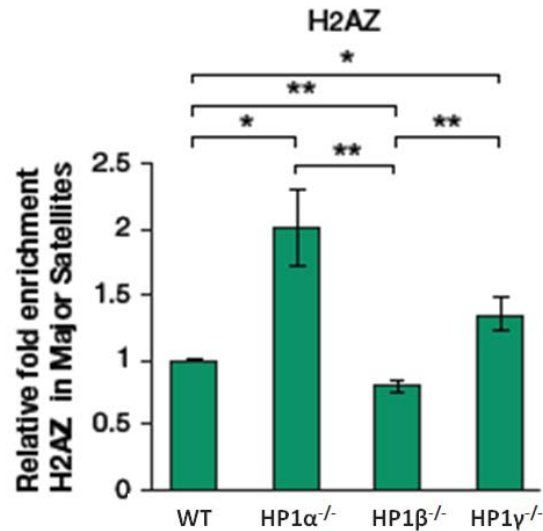
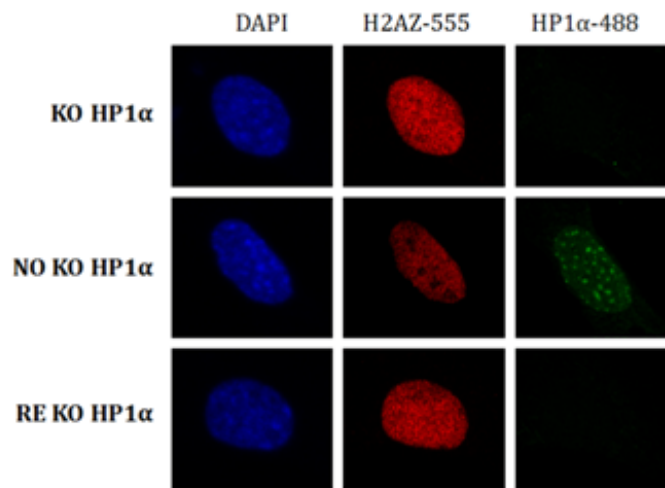


Figura R24. Paper d'HP1 α en l'enriquiment d'H2A.Z a l'HPC. CHIP d'H2A.Z als *major satellites* de l'HPC en les a les MEFS HP1 α ^{-/-}, β ^{-/-} i γ ^{-/-}. *p<0.05, **p<0.01.

Per tal de demostrar que l'efecte d'HP1 α respecte l'enriquiment d'H2A.Z era directe vàrem realitzar experiments d'IF d'H2A.Z a les línees cel·lulars MEFS HP1 α ^{-/-}(KO), noKO i reKO. Els resultats d'aquests experiments mostren que, tal com esperàvem, la re-expressió d'HP1 α endògen a les cèl·lules noKO restaura els nivells basals d'H2A.Z als focis d'HPC. Mentre que, la re-deleció d'HP1 α a les cèl·lules reKO torna a induir l'enriquiment d'H2A.Z als focis d'HPC (Figura R25A). El gràfic mostra la quantificació dels nivells de fluorescència relativa d'H2A.Z als focis d'HPC en les tres línees cel·lulars (Figura R25B). El conjunt d'aquests experiments demostren que HP1 α controla de manera directa l'enriquiment d'H2A.Z als focis d'HPC i que per tant, sembla estar implicada en el control de la propagació d'aquest, tal i com havíem vist per H4K20me3 i H3K27me3.

A)



B)

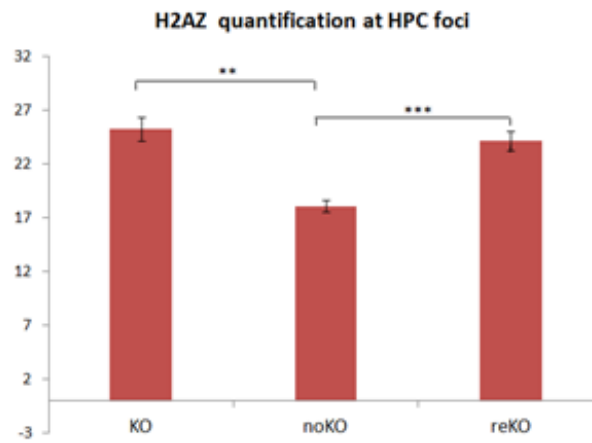


Figura R25. HP1α controla de manera directa l'enriquiment d'H2A.Z a l'HPC. A) IF d'H2A.Z en les cèl·lules HP1α KO, noKO i reKO. **B)** Quantificació de la intensitat de fluorescència relativa de les IF mostrades en A als foci d'HPC. Han estat analitzades 15 cèl·lules de cada condició, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

1.6. H2A.Z col·labora en el control de l'organització de l'HPC

A continuació vàrem estudiar si H2A.Z controlava la localització d'HP1α a les regions d'HPC tal i com havia estat descrit (Meneghini et al, 2003; Greaves et al, 2007; Matsuda et al, 2010), i indirectament participava doncs al control de la localització de CTCF a l'HPC, o bé directament mitjançant el control del desenrotllament dels nucleosomes com s'havia descrit recentment a les regions flanquejants (Wen et al, 020). Així doncs, H2A.Z col·laboraria juntament amb HP1α i amb CTCF en el control de l'*spreading* de les marques heterocromatíniques i en el l'organització de l'estructura de d'HPC.

Amb l'objectiu de comprovar si la pèrdua d'H2A.Z produïa canvis en la localització d'HP1 α i de CTCF a l'HPC, vàrem realitzar CHIP endògen d'HP1 α i de CTCF en cèl·lules NIH3T3 transfectades amb un siRNA (*small interfering RNA*) scr i d'H2A.Z (Figura R26A). Degut al baix nombre de cèl·lules de les que desponíem per l'ús dels siRNA, aquests CHIPs han estat realitzats a partir d'un Kit específic de CHIP per *LowCells* tal i com es detalla a l'apartat de materials i mètodes. Malauradament no vam aconseguir obtenir resultats del CHIP d'HP1 α , probablement degut a una baixa compatibilitat del Kit de CHIP fet servir amb l'anticòs d'HP1 α . Aquests resultats ens haguessin donat una visió més completa a l'hora d'analitzar els resultats, però tot i així s'estan realitzant experiments en aquesta direcció per tal de desxifrar si H2A.Z té un paper en la localització d'HP1 α en les regions d'HPC. Respecte el CHIP de CTCF, observem uns resultats diferents als que ens haguéssim imaginat on la pèrdua d'H2A.Z sembla produir un enriquiment de CTCF a *major satellites* suggerint no tant un paper d'H2A.Z a la regulació de la deposició de CTCF a l'HPC si no més bé un paper al control de la propagació de CTCF a aquestes regions (Figura R26B). Per tal de corroborar l'efecte d'H2A.Z en la localització d'HP1 α i de CTCF, s'estan posant a punt IF d'aquestes dues proteïnes en les NIH3T3 transfectades amb siRNA scr i d'H2A.Z per acabar de tenir una idea més clara. Encara però, queda molt per aprofundir en la relació d'aquestes tres proteïnes H2A.Z, HP1 α i CTCF a les regions pericèntriques.

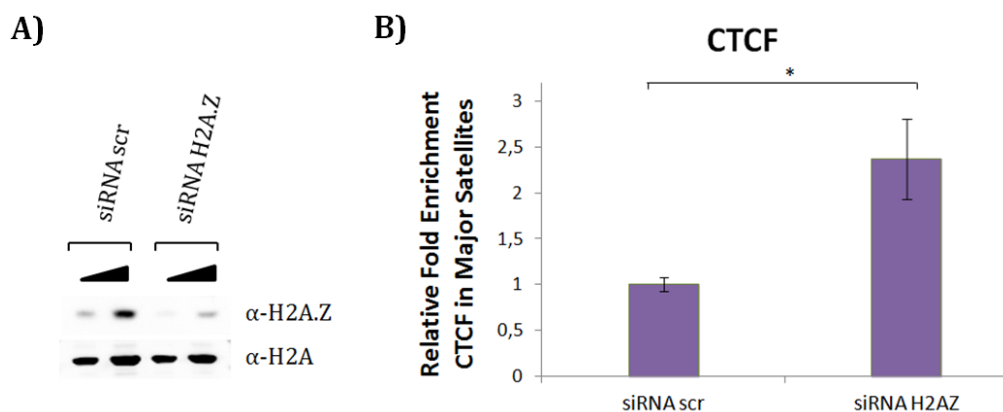


Figura R26. H2A.Z a la localització de CTCF a l'HPC. **A)** WB d'H2A.Z en NIH3T3 amb siRNA scr i d'H2A.Z on s'ha carregat dues quantitats creixents de proteïna total. **B)** CHIP de CTCF als *major satellites* de l'HPC en cèl·lules NIH3T3T siRNA scr i siRNA H2A.Z n=4 experiments independents *p<0.05.

Per tal d'estudiar si H2A.Z, com HP1 α i CTCF, està implicat en el control de la propagació de les marques heterocromatíniques a l'HPC vàrem realitzar CHIP de les marques associades a l'heterocromatina H4K20me3, H3K27me3 i H3K9me3, i de la marca relacionada amb activació de la transcripció H4K3me3 com a control a les línees cel·lulars NIH3T3 transfectades amb siRNA scr i d'H2A.Z. A la següent

figura podem veure que la baixada d'H2A.Z produeix un enriquiment de les marques específiques d'heterocromatina H4K20me3 (Figura R27A), H3K27me3 (Figura R27B) i H3K9me3 (Figura R27C) a *major satellites* de l'HPC. Cosa que no succeeix en marques no relacionades a l'heterocromatina com H3K4me3 (Figura R27D). Aquests resultats suggereixen que la baixada d'H2A.Z, produeix també l'*spreading* de l'HPC similar al que passava amb la pèrdua d'HP1 α , però en el cas d'H2A.Z no només es va observar la propagació d'H4K20me3 i H3K27me3 si no també d'H3K9me3. El conjunt d'aquests experiments ens indiquen que, tot i encara no estar del tot definida la relació d'H2A.Z respecte HP1 α i CTCF, aquesta variant d'histona sembla tenir un paper molt important i complex ja que sembla estar implicada també en el control de la propagació i de l'organització de les regions d'HPC.

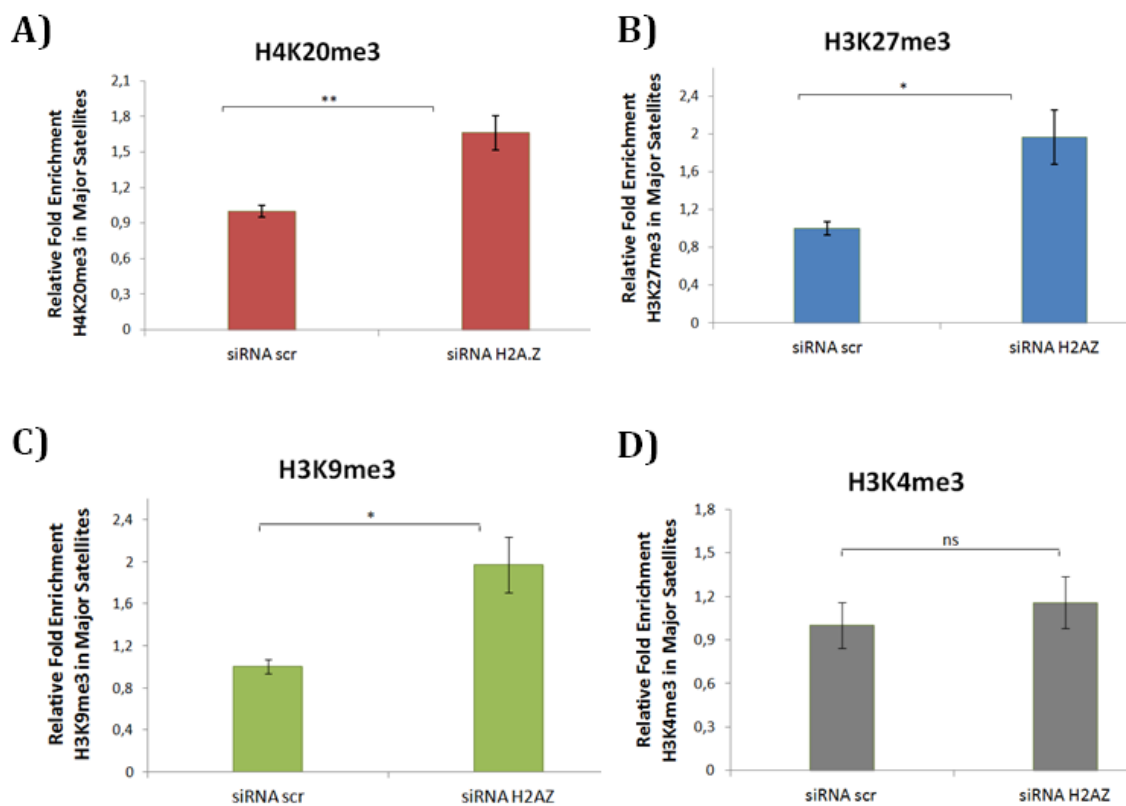


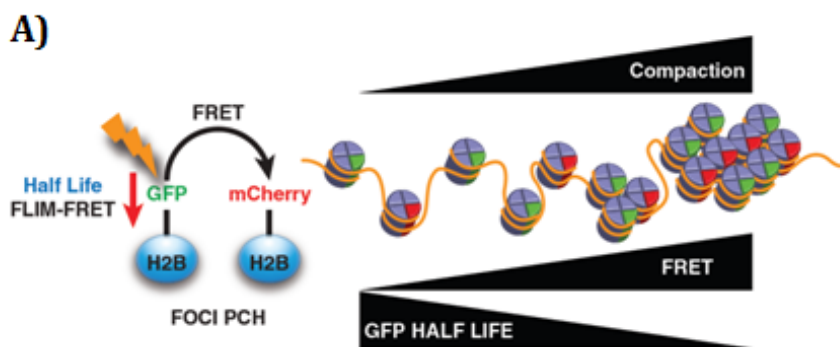
Figura R27. H2A.Z col·labora al control de l'*spreading* de l'HPC. **A)** CHIP d'H4K20me3 als *major satellites* en cèl·lules NIH3T3 siRNA scr i siRNA H2A.Z. **B)** CHIP d'H3K27me3 als *major satellites* com en A. **C)** CHIP d'H3K9me3 als *major satellites*. **D)** CHIP d'H4K3me3 als *major satellites*, n=4 experiments independents de cada *p<0.05, **p<0.01.

1.7. La pèrdua d'HP1 α induïx hipercompactació *in vivo* de l'HPC

La marca H4K20me3 es troba relacionada directament amb els nivells de compactació de les regions d'HPC (Hahn et al, 2013). D'altra banda, hem vist que

pèrdua d'HP1 α produeix la propagació d'H4K20me3 a aquestes regions. Per tant, un aspecte interessant era estudiar si es produïen canvis en els nivells de compactació de l'HPC associats a la pèrdua d'HP1 α . Assaigs de compactació de la cromatina *in vitro* realitzats pel grup relacionen la pèrdua d'HP1 α en MEFS, amb una significant disminució de l'accessibilitat tant a nivell d'HPC com a nivell global de la cromatina, indicant un augment de la compactació d'aquestes regions. Mentre que, la pèrdua d'HP1 β i en menor mesura d'HP1 γ , induïa un suau increment de l'accessibilitat.

A partir d'aquestes observacions ens vam adreçar a estudiar si la pèrdua d'HP1 α induïa un augment de la compactació de la cromatina *in vivo* a les regions d'HPC a partir d'assaigs FLIM-FRET (*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy-Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Aquesta tècnica proporciona una elevada resolució tant temporal (nanosegons) com espacial (nanòmetres), i ens va permetre mesurar el grau de compactació als focis d'HPC en cèl·lules vives a l'expressar la histona H2B fusionada a dos fluoròfors diferents, GFP i RFP. Així doncs, una major compactació de la cromatina correlaciona amb una major eficiència de FRET entre H2B-GFP (proteïna donadora) i H2B-RFP (proteïna acceptora), el que resulta en una vida mitja més baixa de la molècula donadora H2B-GFP (FLIM) (Llères et al, 2009) (Figura 28A). Els anàlisis obtinguts de FLIM-FRET demostren que la pèrdua d'HP1 α produeix una disminució en la vida mitja del GFP com a conseqüència d'un augment de FRET de 1.8 vegades. De manera contrària, la pèrdua d'HP1 β i d'HP1 γ no mostraven canvis en la vida mitja de GFP indicant que no es produeix FRET. Aquests resultats demostren que la pèrdua d'HP1 α indueix una hipercompactació *in vivo* de l'HPC, mentre que la pèrdua d'HP1 β i d'HP1 γ sembla produir una disminució de la compactació a aquestes regions (Figura R28B i C). Així doncs els resultats de FLIM-FRET confirmen els resultats obtinguts en estudis previs *in vitro*, i indiquen que HP1 α és una proteïna clau en l'organització global de l'HPC a través de la regulació del seu grau de compactació.



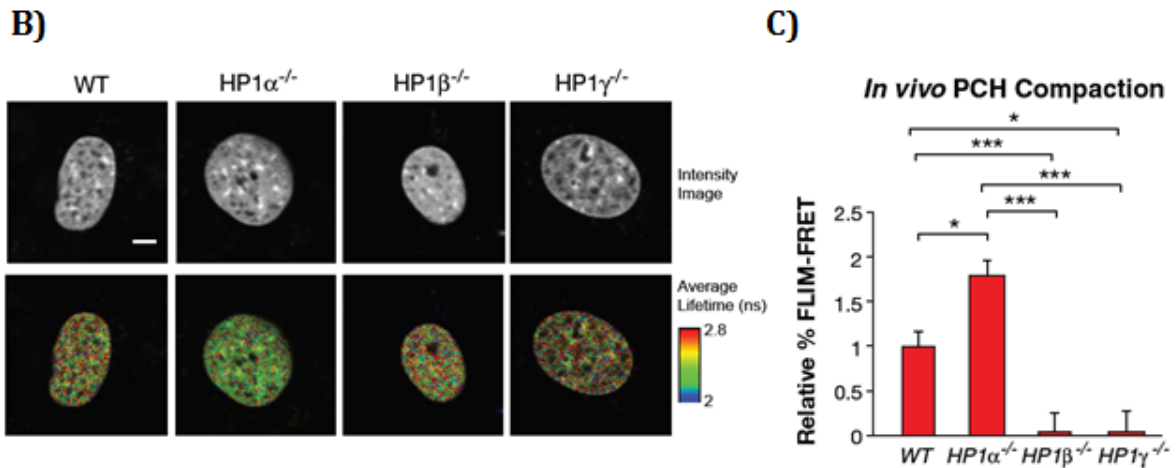


Figura R28. La pèrdua d'HP1 α induïx hipercompactació *in vivo* de l'HPC. **A)** Esquema de la metodologia del FLIM-FRET utilitzada per l'anàlisi de compactació de la cromatina *in vivo* basat en la co-expressió d'H2B-GFP i d'H2B-mCherry. Una vida mitja més curta de GFP significa un major nivell de FRET i una major compactació de la cromatina. **B)** FLIM-FRET a les MEFS HP1 WT, MEFS HP1 $\alpha^{-/-}$, $\beta^{-/-}$ i HP1 $\gamma^{-/-}$. Es mostren imatges de la intensitat del GFP i del promig de vida del fluoròfor GFP. **C)** Quantificació relativa de la compactació de la cromatina (%FLIM-FRET) a les MEFS d'HP1. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

1.8. Anormalitats mitòtiques associades a la pèrdua de les isoformes d'HP1

Els nostres resultats indiquen que, a part d'una funció redundant comú de les tres isoformes d'HP1, HP1 α i HP1 β tenen funcions úniques específiques d'isoforma implicades en l'estabilitat del genoma. Per tal de confirmar-ho vàrem estudiar la freqüència d'anomalies mitòtiques en MEFS HP1 WT, HP1 $\alpha^{-/-}$, $\beta^{-/-}$ i $\gamma^{-/-}$ en col·laboració amb el laboratori de la Dra. Lourdes Serrano. Aquests resultats mostren que les MEFS HP1 $\alpha^{-/-}$ i $\beta^{-/-}$ presenten una major freqüència d'aberracions mitòtiques en comparació amb les MEFS HP1 WT i $\gamma^{-/-}$. Les aberracions trobades a les MEFS HP1 $\alpha^{-/-}$ eren sorprenentment diferents a les trobades en les MEFS HP1 $\beta^{-/-}$, mentre que la pèrdua d'HP1 α va resultar en un augment del nombre de defectes d'unió merotèlica i sintètica, la pèrdua d'HP1 β va resultar en una augment de la formació de fus mitòtics multipolars. Curiosament, la pèrdua d'HP1 γ va resultar en una menor freqüència d'aberracions mitòtiques, que eren una barreja de les trobades en les MEFS HP1 $\alpha^{-/-}$ i $\beta^{-/-}$, el que indica que comparteix alguna redundància amb les altres isoformes (Figura R29A i B). De manera que, aquests resultats corroboren que HP1 α i HP1 β tenen funcions específiques implicades a l'estabilitat del genoma.

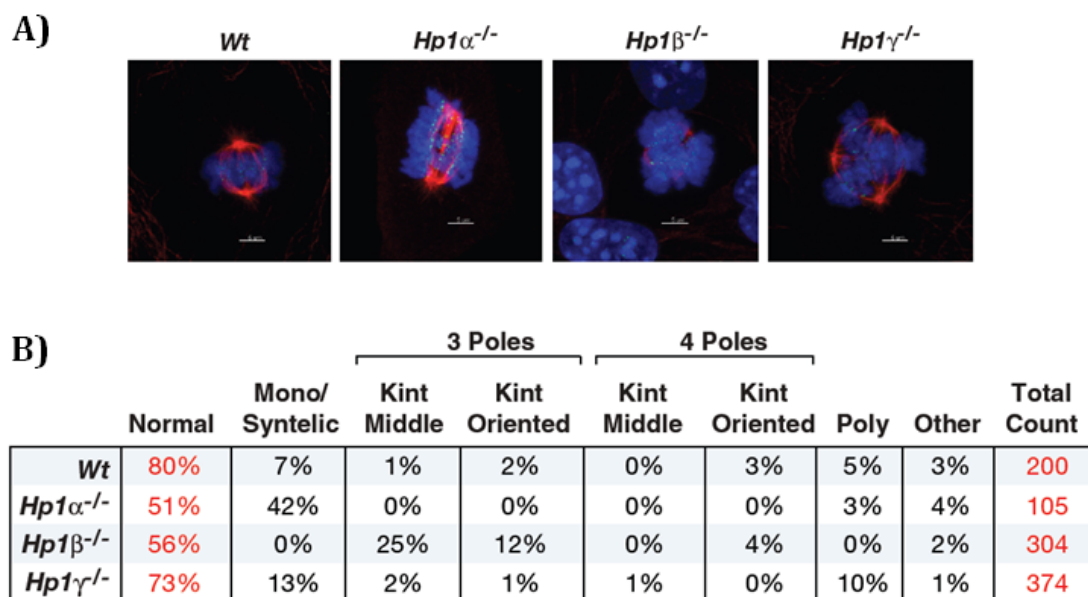


Figura R29. Anormalitats mitòtiques associades a la pèrdua de les isoformes d'HP1. A) IF representatives dels defectes mitòtics en les MEFS d'HP1. Es mostra DAPI (blau), marcador de centròmer CREST (verd) i tubulina (vermell). **B)** Anàlisi dels defectes mitòtics mostrats en A.

2. PAPER DE PARP-1 EN EL CONTROL DEL MANTENIMENT DE L'HPC MEDIAT PER SIRT1 I SUV39H1

Estudis previs del grup demostraven que SirT1 té un paper clau en el manteniment de l'estructura de l'HPC, especialment sota condicions d'estrès. En aquestes condicions, es produeix un increment dels nivells de SirT1, que interacciona amb Suv39h1 i l'estabilitza incrementant la seva vida mitjana i augmentant els nivells de proteïna. L'increment de la disponibilitat de Suv39h1 en el nucli, s'associa amb un augment del recanvi i de la seva mobilitat a l'HPC, assegurant el manteniment d'H3K9me3 i d'HP1, augmentant així la protecció genòmica a les regions d'PCH. Així doncs, la pèrdua de SirT1 en MEFS es relacionava amb nivells més baixos de Suv39h1 i amb una deslocalització d'H3K9me3 i d'HP1 a les regions d'HPC, que conduïa a inestabilitat genòmica, defectes en la segregació cromosòmica i aneuploidies (Vaquero et al, 2007; Wang et al, 2007; Bosch-Presegué et al, 2011).

Estudis posteriors suggereixen un antagonisme funcional entre SirT1 i PARP1 respecte el control d'H3K9me3 i d'HP1 a l'HPC. Sorprenentment, l'addicional pèrdua de PARP-1 en MEFS rescata la localització d'H3K9me3 i d'HP1 observada a les cèl·lules WT i el fenotip mitòtic normal (El Ramy et al, 2009). Però tot i haver-se descrit aquesta relació funcional, encara no es coneix el mecanisme d'acció ni les relacions entre els factors implicats.

La segona part d'aquesta tesi s'ha centrat en aprofundir en el coneixement d'aquest antagonisme funcional de SirT1-PARP1 al manteniment de les regions d'HPC.

2.1. Antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte H3K9me3 a l'HPC

Tal i com he mencionat, estudis previs a partir d'IF mostraven que la pèrdua de SirT1 en MEFS produeix una localització anormal d'H3K9me3 als focis de l'HPC, però que l'addicional pèrdua de PARP-1 en un al·lel o en ambdós rescatava la localització d'H3K9me3 observada a les cèl·lules WT (El ramy et al, 2009). Primerament, amb la finalitat de confirmar aquestes observacions, vàrem realitzar experiments d'IF d'H3K9me3 en MEFS WT i PARP-1^{-/-} amb shRNA scr i de SirT1 (Figura R30A). Els resultats obtinguts mostren que la baixada de SirT1 indueix una deslocalització al patró d'H3K9me3 als focis d'HPC en comparació amb les cèl·lules WT, mentre que l'addicional pèrdua de PARP-1 rescata la localització d'H3K9me3 als focis d'HPC. La pèrdua de PARP-1 per si sol no sembla produir cap efecte (Figura R30B). Així doncs, aquests resultats confirmen l'antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte el control d'H3K9me3 a l'HPC.

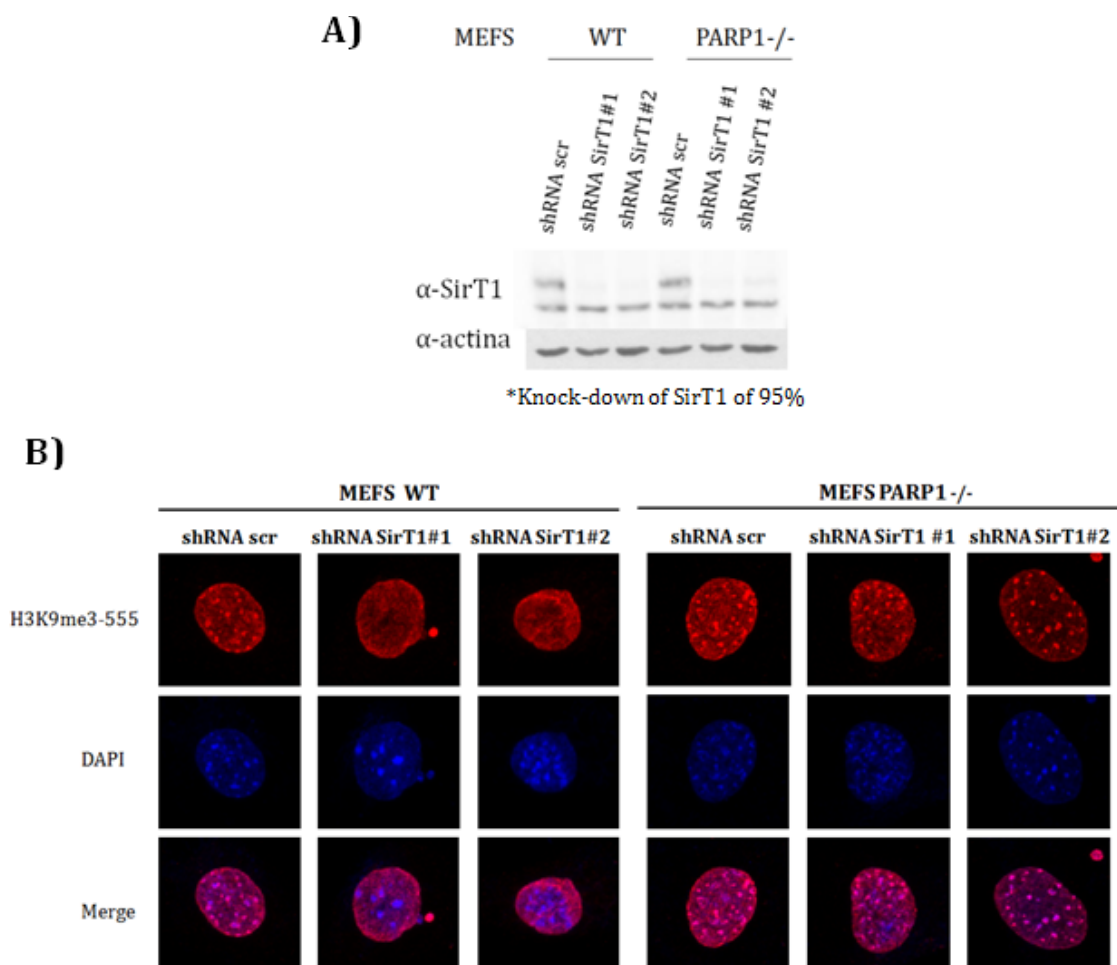


Figura R30. Antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte H3K9me3 a l'HPC. A) WB de SirT1 en les MEFS WT i PARP-1^{-/-} amb shRNA scr i de SirT1. **B)** IF d'H3K9me3 en les cèl·lules mostrades en A.

2.2. SirT1 i PARP-1 regulen de manera antagònica els nivells de Suv39h1

En funció d'aquests resultats, vam hipotetitzar que l'antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte H3K9me3 podria ser degut a una regulació per part d'aquestes dues proteïnes envers Suv39h1, ja que l'efecte de SirT1 sobre H3K9me3 a les regions d'HPC té lloc a través de Suv39h1. Per tal d'esbrinar si l'antagonisme d'aquestes dues proteïnes respecte H3K9me3 succeïa envers Suv39h1, vam realitzar experiments de sobreexpressió de Suv39h1, SirT1 i PARP1 en dues línies cel·lulars, en HEK293F i en NIH3T3. Aquests experiments mostren que la sobreexpressió de SirT1 produeix un increment en els nivells de Suv39h1, resultats que ja havien sigut observats pel nostre grup, però a més a més, observem que l'addicional sobreexpressió de PARP-1 neutralitza aquest increment de Suv39h1 causat per SirT1. La sobreexpressió de PARP-1 sol no sembla produir cap efecte significatiu en els nivells de Suv39h1 (Figura R31A i B). Aquestes resultats doncs, indiquen que SirT1 i PARP-1 regulen de manera antagònica els nivells de Suv39h1, SirT1 té un paper a l'estabilització i augment dels nivells de Suv39h1, mentre que PARP-1 sembla tenir un paper compensatori d'aquest increment causat per SirT1. Així doncs, l'antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte H3K9me3 sembla ser degut a la regulació per part d'aquestes dues proteïnes dels nivells de Suv39h1, l'HMT responsable de l'establiment d'H3K9me3 a les regions d'HPC.

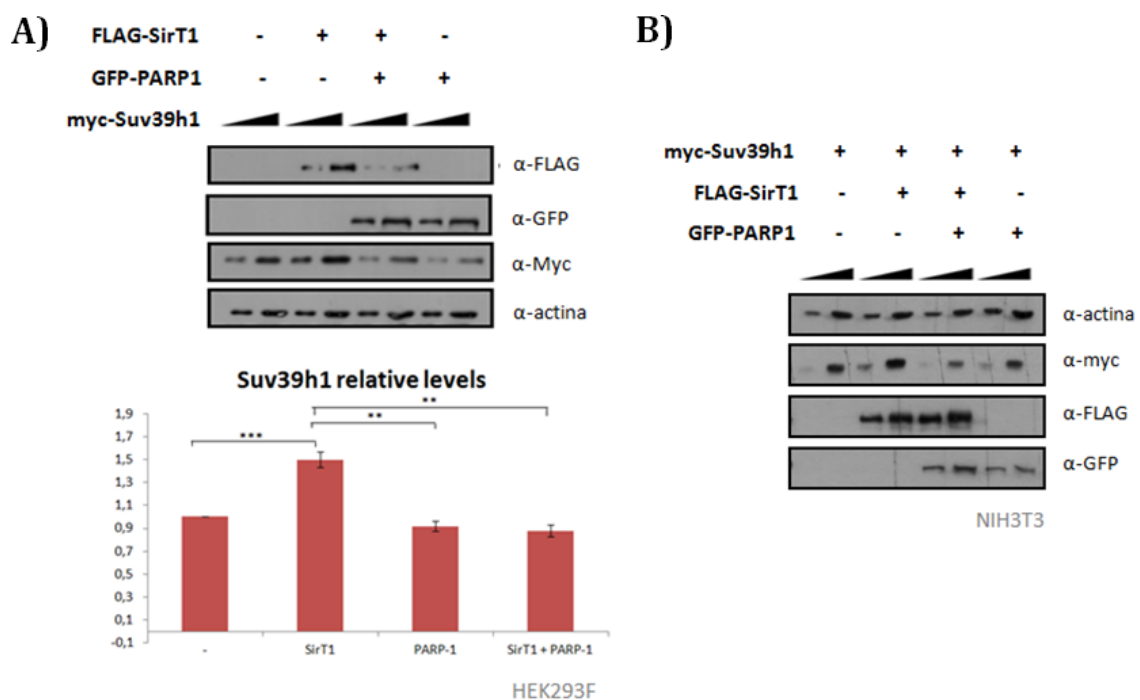


Figura R31. SirT1 i PARP-1 regulen de manera antagònica els nivells de Suv39h1. A) WB de myc, flag i GFP en cèl·lules HEK293F transfectades amb myc-Suv39h1, flag-SirT1 i GFP-PARP-1. Es mostren dues càrregues de la quantitat de proteïna total per cada. El gràfic indica la quantificació dels nivells relatius de myc-Suv39h1 en n=5 experiments independents. B) WB com en A en cèl·lules NIH3T3 **p<0.01, ***p<0.001.

Amb l'objectiu d'aprofundir en la relació de SirT1 i PARP-1 respecte Suv39h1, vàrem decidir estudiar els nivells endògens de Suv39h1 per WB en MEFS WT i SirT1^{-/-}, i en MEFS WT i PARP-1^{-/-}. És important comentar que les MEFS de SirT1 de les que desponíem provenen de ratolins amb background genètic C57Bl/6, mentre que les de PARP-1 vénen de ratolins amb background 129Sv/CD1, i per tant, no es poden comparar entre elles. Els resultats obtinguts mostren que a les MEFS SirT1^{-/-} els nivells de Suv39h1 són menors que a les cèl·lules WT (Figura R32A), tal com esperàvem degut a l'efecte estabilitzador de SirT1. Sorprenentment però, en les MEFS PARP-1^{-/-} els nivells de Suv39h1 són també menors que en el cas de les WT, i a més a més, els nivells de SirT1 semblen també més baixos (Figura R32B). Aquests resultats eren sorprenents tenint en compte les observacions anteriors, i suggereixen que la relació funcional entre SirT1 o PARP1 respecte Suv39h1 és més complicada del que pensàvem.

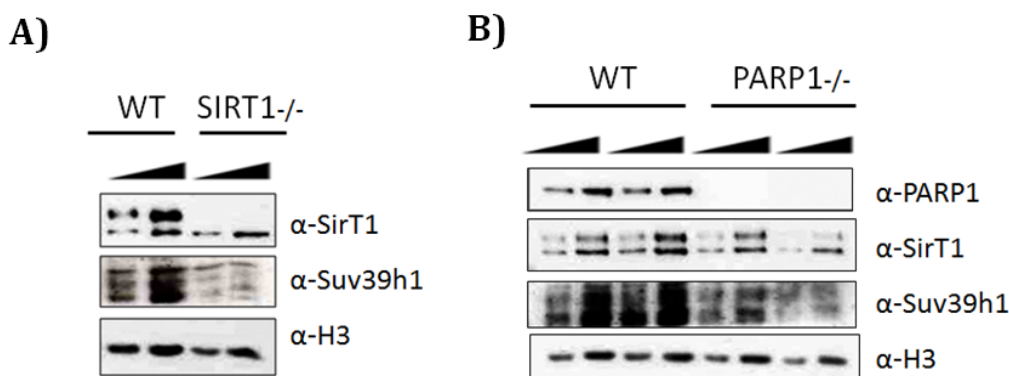


Figura R32. Nivells de Suv39h1 a les MEFS de SirT1 i de PARP-1. A) WB de Suv39h1 a les MEFS WT i SirT1^{-/-}. B) WB de Suv39h1 i SirT1 a les MEFS WT i PARP-1^{-/-}.

Per tal d'esbrinar si les diferències en els nivells de Suv39h1 que havíem vist a les MEFS de PARP-1 eren degudes a una diferent transcripció, vàrem estudiar els nivells de mRNA de Suv39h1 a aquestes cèl·lules per RT-PCR. Els resultats obtinguts indiquen que no hi ha diferències en els nivells de transcripció de Suv39h1 a les MEFS de SirT1 ni en les de PARP-1 (Figura R33A). Això ens va portar a pensar que les diferències en els nivells de Suv39h1 a les MEFS de PARP-1^{-/-} respecte les WT podien venir donades a una diferent estabilització de la proteïna, tal i com passava a les MEFS de SirT1. Per aquest motiu es van dur a terme estudis d'estabilitat proteica, on vàrem tracten les cèl·lules amb ciclohexamida (CHX), un inhibidor de la síntesi proteica, i vam estudiar els nivells de Suv39h1 endògen al

llarg del temps en les diferents MEFS. En aquests experiments es va corroborar que en les MEFS WT, Suv39h1 és més estable que a les MEFS SirT1^{-/-}. En concordança amb els nivells més elevats de Suv39h1 en les cèl·lules WT respecte les PARP1^{-/-}, vàrem observar que Suv39h1 sembla ser més estable en les WT (Figura R33B). El fet de no poder comparar les MEFS de SirT1 i de PARP-1 entre elles ens limitava, i també el fet de que no existeix cap anticòs fiable de Suv39h1 que funcioni per estudiar la localització mitjançant IF o l'enriquiment a la cromatina mitjançant CHIP. En aquest punt, vàrem decidir crear una nova línia cel·lular per sobrepassar aquests inconvenients.

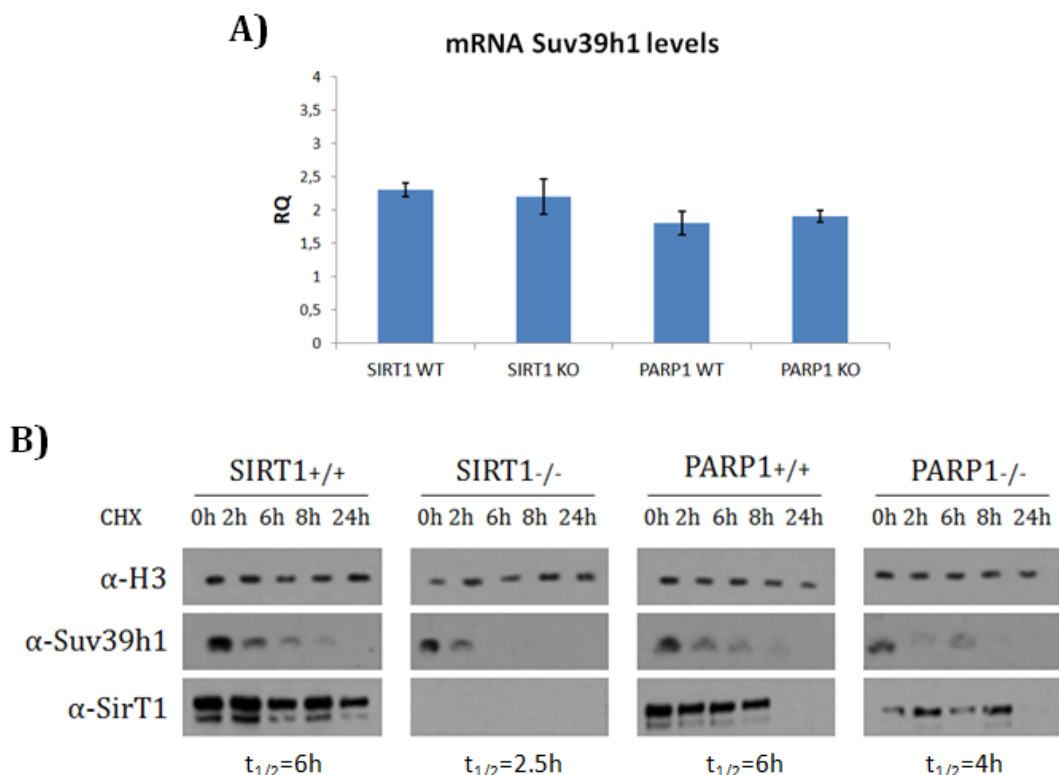
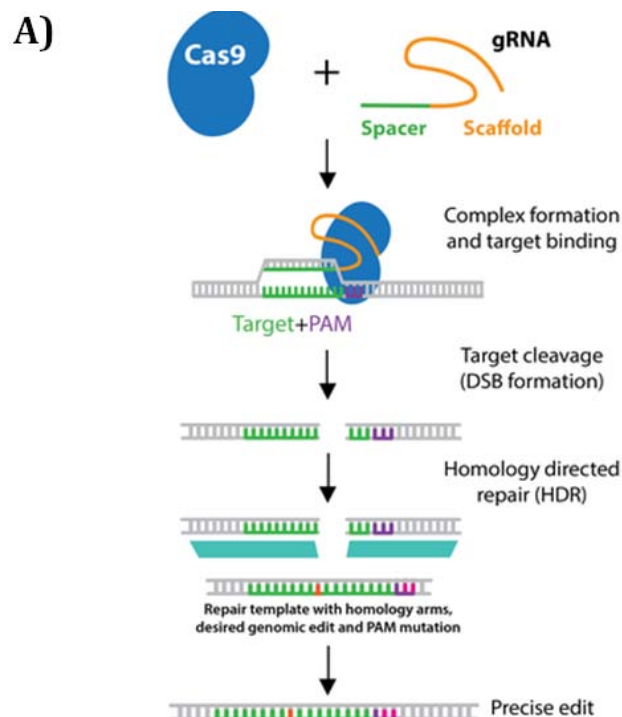


Figura R33. Transcripció i estabilitat de Suv39h1 a les MEFS de SirT1 i de PARP-1. **A)** RT-PCR dels nivells de transcripció de Suv39h1 en les MEFS de SirT1 i de PARP-1. **B)** Experiment de CHX de Suv39h1 a les mateixes cèl·lules. Es mostra el temps de vida mitja de Suv39h1 a les corresponents MEFS.

2.3. Generació del *tagging* endògen de Suv39h1 en cèl·lules NIH3T3 a partir de la tècnica CRISPR-Cas9

Per poder estudiar l'antagonisme de SirT1 i PARP-1 respecte Suv39h1 en detall necessitaríem poder mirar si aquest antagonisme produeix també canvis a la localització de Suv39h1 als focis de l'HPC a partir d'IF, o si produeix canvis en l'enriquiment de Suv39h1 als *major satellites* de l'HPC a partir de CHIP. Degut a que avui dia no existeix cap anticòs comercial de Suv39h1 que funcioni del tot bé, i encara no hi ha cap que funcioni per IF ni per CHIP, vam decidir crear una línia

cel·lular de ratolí que tingués *taggejat* el gen *Suv39h1*. Per aquest motiu vam realitzar un *tagging* endògen de *Suv39h1* amb flag en cèl·lules NIH3T3 utilitzant la tècnica de CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated endonucleases 9*). CRISPR-Cas9 va ser descobert originalment com a un mecanisme de resposta immunitària adaptativa que posseïen els procariotes per tal de protegir-se de les infeccions per bacteriòfags, a partir del qual reconeixien i tallaven els àcids nucleics dels virus invasors. Aquest sistema procariota es va adaptar per tal de donar lloc a la tècnica CRISPR-Cas9, que avui dia és una de les tècniques més potents d'edició del genoma, i que permet tant l'eliminació de gens, la incorporació de nous gens o seqüències, com l'activació o la repressió gènica. En el nostre cas vàrem utilitzar un sistema de dos vectors: un vector que contenia l'RNA guia (gRNA) i la endonucleasa associada al CRISPR (Cas9). El gRNA és una seqüència curta d'uns 20 nucleòtids necessària per que s'uneixi la Cas9 i que la direccionarà a la seqüència diana genòmica a modificar, per tal que aquesta produeixi un tall a la doble cadena d'ADN. El segon vector conté la plantilla de reparació de l'ADN, aquesta plantilla ha de contenir la seqüència homòloga *upstream* i *downstream* del lloc diana del tall així com la seqüència a incorporar. De manera que, quan es produeixi el DSB (*double-strand break*), en <10% dels casos es pot donar la reparació dirigida per homologia (HDR) utilitzant la plantilla de reparació de l'ADN i produir-se l'edició precisa (Figura R34A). A partir de la utilització d'aquesta tècnica, finalment hem aconseguit *taggejar* el gen *Suv39h1* en cèl·lules NIH3T3, hem incorporat a la part C-terminal de *Suv39h1* una seqüència *linker* de Gly-Ser per tal de donar flexibilitat i no impedir el correcte plegament de la proteïna, seguit de 3 còpies del *tag* FLAG, seguit d'un *linker* P2A per que es talli el polipèptid per aquesta regió, i finalment d'un gen de resistència a Neomicina per tal de poder seleccionar les cèl·lules *taggejades* (Figura R34B).



B)

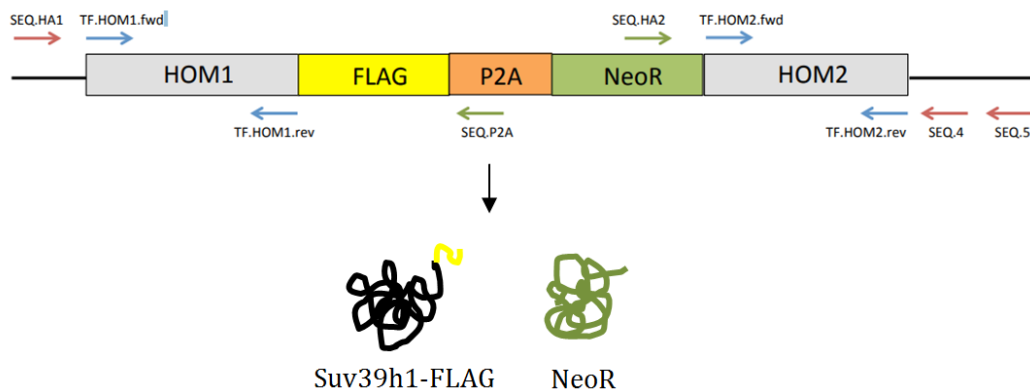


Figura R34. Generació del *tagging* endògen de Suv39h1 en NIH3T3 a partir de la tècnica CRISPR-Cas9. A) Representació esquemàtica del procés de CRISPR-Cas9 per l'obtenció d'un *tagging* per HDR. B) Representació esquemàtica de la seqüència incorporada.

Un cop generada aquesta nova línia cel·lular *taggejada* per Suv39h1 vàrem passar a caracteritzar-la. Primerament, vàrem realitzar una PCR amb primers que amplifiquen la part final de Suv39h1 i la seqüència incorporada incloent els 3xFLAG utilitzant l'ADN genòmic de NIH3T3 (com a control negatiu), de les NIH3T3 Suv39h1-FLAG i del vector pFETCH Donor (com a control positiu). Els nostres resultats mostren que hi ha amplificació d'aquest fragment a la nostra línia NIH3T3 Suv39h1-FLAG indicant que està *taggejada* (Figura R35). No només això si no que per estar segurs de que el gen de Suv39h1 estigués intacte i de que la seqüència s'hagués incorporat correctament, vam amplificar i seqüenciar tots els exons de Suv39h1 i del *tagging* en aquesta nova línia. A més a més, vàrem comprovar tots els possibles *off-targets*, per assegurar-nos que no hi havia hagut cap canvi en altres posicions del genoma.

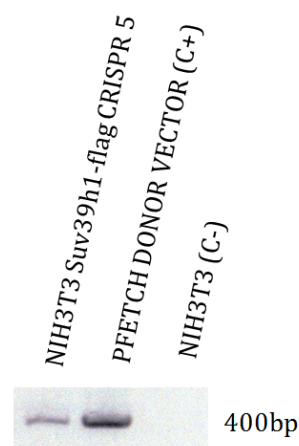


Figura R35. Caracterització a nivell genòmic de la línia cel·lular NIH3T3 Suv39h1-flag obtinguda mitjanant CRISPR/Cas9. PCR que mostra l'amplificació de la part final del gen Suv39h1

i de la seqüència incorporada en cèl·lules NIH3T3 Suv39h1-flag, NIH3T3 (control negatiu) i vector PFETCH Donor (control positiu).

Un cop estudiat a nivell genòmic, vàrem passar a comprovar si aquest gen *taggejat* es transcrivía. De manera que a partir de l'extracció de l'RNA i de la síntesi a cDNA, vàrem estudiar si hi havia hagut transcripció de Suv39h1-FLAG utilitzant primers que amplificaven la part final de Suv39h1 i els 3x-FLAG mitjançant RT-PCR. Els resultats obtinguts mostren que Suv39h1-FLAG es transcriu correctament (Figura R36).

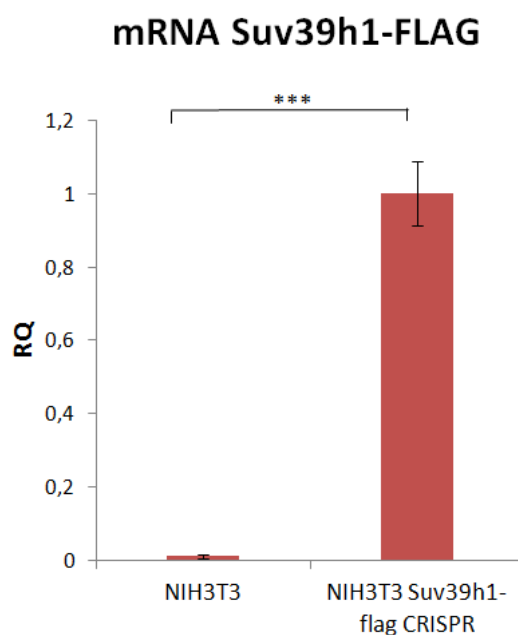


Figura R36. El gen Suv39h1-FLAG es transcriu correctament. Nivells d'RNA de Suv39h1-FLAG en cèl·lules NIH3T3 Suv39h1-flag i NIH3T3 com a control negatiu per RT-PCR, *** $p < 0.001$.

Per tal d'estudiar a nivell de proteïna l'expressió de Suv39h1-FLAG, vam realitzar WB utilitzant anticòs de Suv39h1 i de FLAG en cèl·lules NIH3T3 com a control i en les NIH3T3 Suv39h1-FLAG. Els resultats obtinguts utilitzant l'anticòs de Suv39h1 mostren que en la línia NIH3T3 Suv39h1-FLAG no desapareix la banda endògena de Suv39h1 (50kDa) si no que apareix una nova banda que concorda amb el pes molecular de Suv39h1 *taggejat* (Figura R37A), indicant que aquesta línia cel·lular sembla estar *taggejada* en un al·lel. Els resultats obtinguts utilitzant l'anticòs de flag mostren que en les NIH3T3 Suv39h1-FLAG apareix una banda que concorda amb el pes molecular de Suv39h1-FLAG que no es troba a les NIH3T3 (Figura R37B). De manera que, aquests experiments corroboren que la nostra línia cel·lular expressa Suv39h1-FLAG.

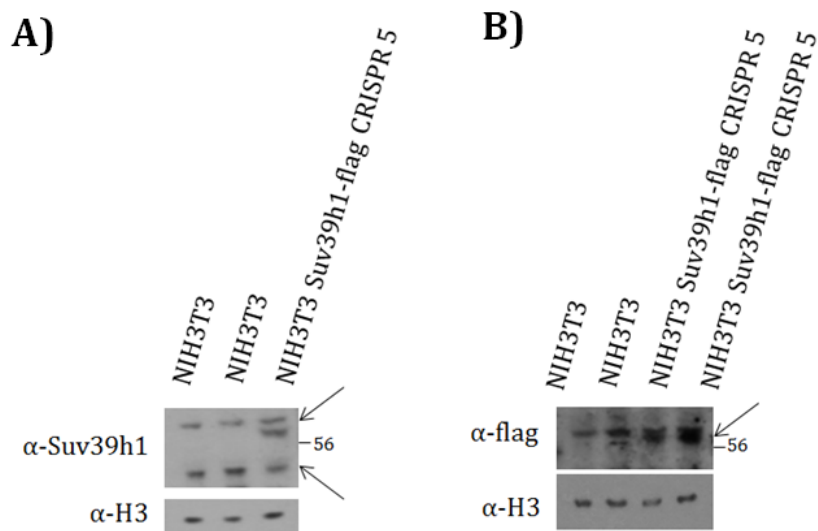


Figura R37. Caracterització a nivell proteic de la línia cel·lular NIH3T3 Suv39h1-FLAG obtinguda mitjanant CRISPR/Cas9. **A)** WB de Suv39h1 en cèl·lules NIH3T3 i en NIH3T3 Suv39h1-FLAG. **B)** WB de flag en les mateixes cèl·lules.

No només això si no que també vàrem comprovar si podíem immunoprecipitar Suv39h1 en la nostra línia, ja que els anticossos comercials de Suv39h1 descrits per IP no funcionen del tot bé. Vàrem realitzar experiments d'IP utilitzant reïna FLAG en cèl·lules NIH3T3 com a control i en la línia NIH3T3 Suv39h1-FLAG. Els resultats obtinguts mostren que ara sí podem immunoprecipitar Suv39h1 de manera senzilla a partir de la utilització de l'anticòs flag (**Figura R38**).

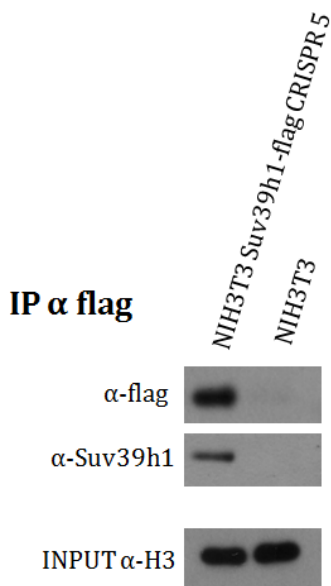


Figura R38. IP de flag en cèl·lules NIH3T3 i NIH3T3 Suv39h1-FLAG. S'ha utilitzat l'anticòs de flag i de Suv39h1 per detectar la proteïna immunoprecipitada.

Quan s'incorporen seqüències a una proteïna, a vegades aquestes poden afectar al correcte plegament i interferir d'aquesta manera a l'activitat catalítica de

la proteïna. A partir d'un assaig metiltransferasa d'histones *in vitro* utilitzant la nostre proteïna Suv39h1-FLAG purificada, *core histones* comercials i el cofactor SAM vàrem comprovar que la nostra proteïna Suv39h1-FLAG era activa, i que incrementava els nivells de metilació d'H3K9me3 (Figura R39).

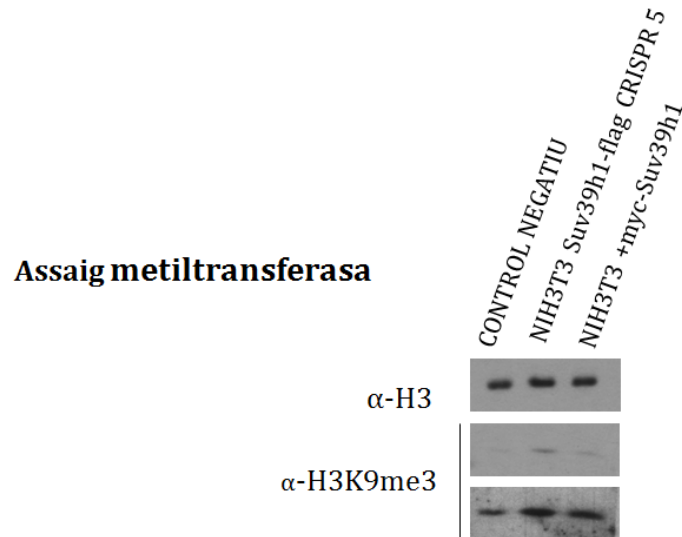


Figura R39. La proteïna Suv39h1-FLAG és catalíticament activa. Assaig metiltransferasa de la proteïna Suv39h1-flag purificada de les cèl·lules NIH3T3 *taggejades* i com a control positiu proteïna myc-Suv39h1 purificada en NIH3T3 sobreexpressades. S'han utilitzat core histones comercials i el cofactor SAM per dur a terme l'assaig.

Un dels principals motius pels que vàrem decidir generar una línia cel·lular que tingués *taggejat* Suv39h1 era poder estudiar canvis en la localització endògena de Suv39h1 per tal d'explorar l'antagonisme de SirT1 i PARP-1 respecte Suv39h1 a les regions d'HPC. Per comprovar que a la línia cel·lular NIH3T3 Suv39h1-FLAG poguéssim estudiar la localització de endògena de Suv39h1 vam realitzar IF utilitzant l'anticòs flag a aquesta línia i com a control a les NIH3T3. Els resultats obtinguts de la IF de FLAG mostren que aquesta línia *taggejada* ens permet detectar la localització de Suv39h1, que es localitza al nucli, principalment als foci d'HPC tal i com esperaríem (Figura R40). Així que, la línia cel·lular obtinguda on s'ha *taggejat* el gen Suv39h1 és un bon model per estudiar la localització endògena de Suv39h1 mitjançant IF de FLAG.

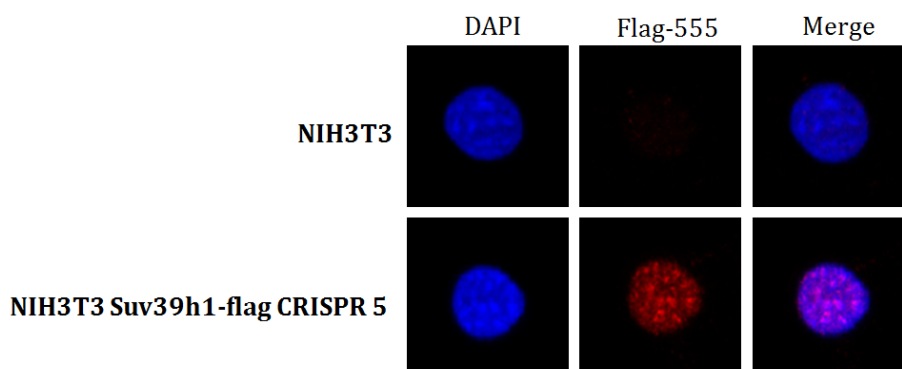


Figura R40. Les NIH3T3 Suv39h1-FLAG són un bon model per estudiar la localització endògena de Suv39h1. IF de flag en les cèl·lules NIH3T3 i NIH3T3 Suv39h1-FLAG obtingudes per CRISPR/Cas9.

Un altre dels motius principals pels que volíem *taggejar* Suv39h1 era per poder estudiar si es produïen canvis en l'enriquiment de Suv39h1 als *major satellites* de les regions d'HPC, deguts a la pèrdua o expressió ectòpica de SirT1 i PARP-1. Vàrem realitzar CHIP de FLAG a les cèl·lules NIH3T3 Suv39h1-FLAG i tal i com s'observa a la següent figura, es pot chipejar Suv39h1 i el trobem enriquit als *major satellites* de l'HPC a la nostra línia, tal i com esperaríem (Figura R41). La línia cel·lular obtinguda per tant, és també un bon model per estudiar enriquiment endògen de Suv39h1 a la cromatina mitjançant CHIP de FLAG.

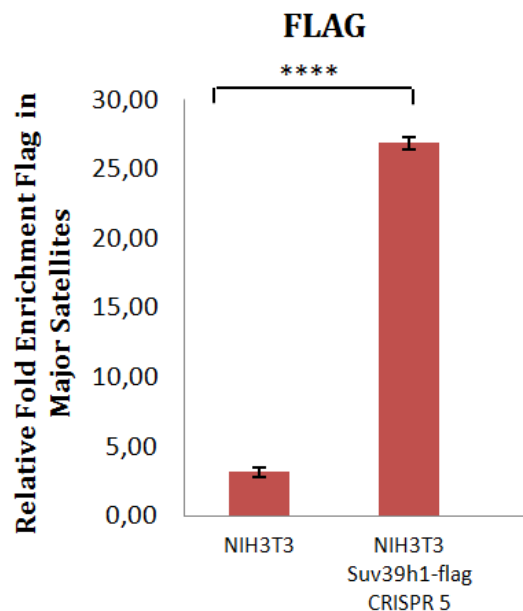


Figura R41. Les NIH3T3 Suv39h1-FLAG són un bon model per estudiar enriquiment endògen de Suv39h1 a la cromatina. CHIP de flag en les cèl·lules NIH3T3 i NIH3T3 Suv39h1-FLAG obtingudes per CRISPR/Cas9 als *major satellites*, n=4 experiments independents ****p<0.0001.

Així doncs la línia NIH3T3 Suv39h1-FLAG és una eina molt potent que ens permetrà estudiar aspectes que no haguéssim pogut investigar. Un cop generada i caracteritzada aquesta línia, vàrem intentar obtenir el KO de SirT1, de PARP-1 i el doble KO però no vam ser capaços d'obtenir el KO de SirT1. Per aquest motiu vàrem decidir utilitzar un shRNA de SirT1 i de PARP-1 per crear les nostres línies model a través del qual començar a estudiar en detall la relació antagònica de SirT1 i PARP-1 respecte Suv39h1 (Figura R42A). D'aquesta manera hem obtingut les quatre línies cel·lulars: NIH3T3 Suv39h1-FLAG, NIH3T3 Suv39h1-FLAG amb shRNA SirT1, NIH3T3 Suv39h1-FLAG amb shRNA PARP1 i NIH3T3 Suv39h1-FLAG amb shRNA SirT1 i PARP1, que seran el nostre model d'estudi i que ens permetran

estudiar en detall la relació de SirT1 i de PARP-1 envers Su39h1 (Figura R42B). Malauradament, no hem tingut temps d'obtenir resultats encara però hi ha experiments en marxa encaminats a estudiar l'antagonisme entre SirT1 i PARP-1, entre d'altres tenim a punt experiments de WB per comprovar els nivells de Suv39h1, la seva localització a les regions d'HPC i l'enriquiment a *major satellites* a les nostres línies model.

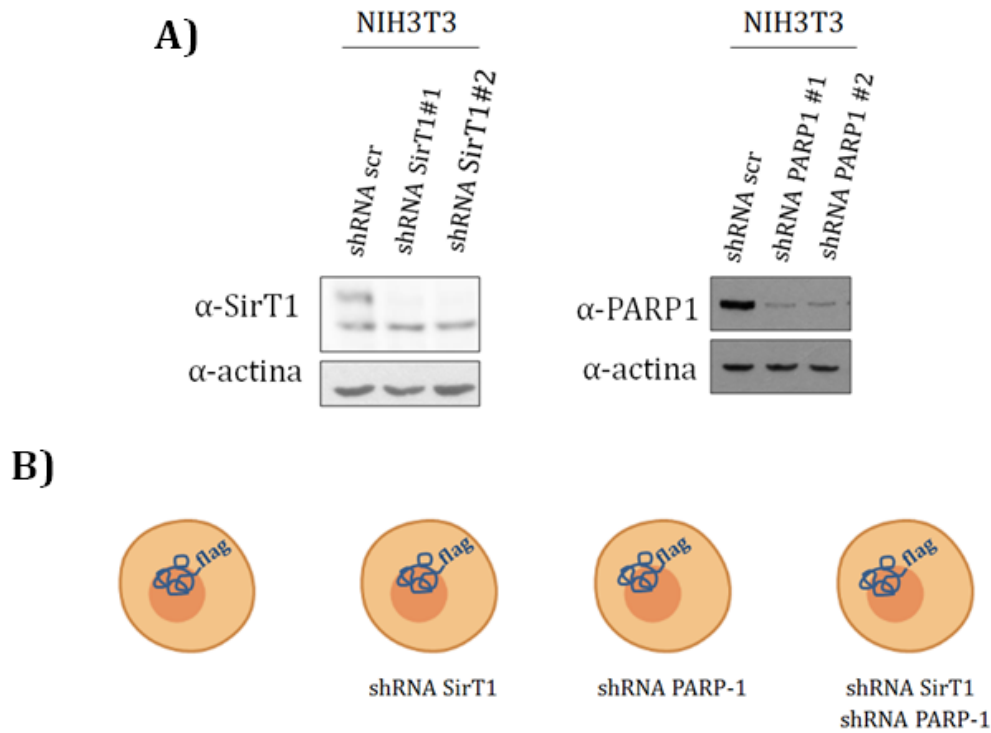


Figura R42. Obtenció de les línies cel·lulars model per a l'estudi de l'antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte Suv39h1. A) WB de SirT1 en les línies cel·lulars NIH3T3 scr, shRNA SirT1#1 i shRNA SirT1#2 i WB de PARP-1 en les línies cel·lulars NIH3T3 scr, shRNA PARP-1#1 i shRNA PARP-1#2. B) Representació esquemàtica de les línies cel·lulars model.

DISCUSSIÓ

1. PAPER ESPECÍFIC DE LES ISOFORMES D'HP1 A L'ESTRUCTURA I ORGANITZACIÓ DE L'HPC

Al llarg del temps s'ha considerat el paper de les isoformes d'HP1 si més no equivalent degut a la forta redundància funcional d'aquestes proteïnes en alguns aspectes concrets. Actualment però, aquesta perspectiva ha canviat, i han estat descrites múltiples funcions específiques de les isoformes d'HP1. HP1 és una proteïna estructural fonamental a les regions d'HPC, però tot i la seva importància, quan es va iniciar aquest projecte la contribució específica de les seves isoformes HP1 α , HP1 β i HP1 γ a les regions d'HPC no estava encara definida. Els resultats de la primera part d'aquesta tesi indiquen que cada isoforma d'HP1 té una contribució distintiva en l'estructura i organització de l'HPC. HP1 α sembla tenir un paper directe en la restricció de les marques d'heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3. El nostre treball suggereix un paper d'aquesta isoforma en l'establiment dels dominis cromatínics per tal d'evitar la propagació de l'heterocromatina a l'eucromatina adjacent, en conjunció amb CTCF i amb H2A.Z. Mentre que HP1 β actua de manera contrària pel que fa a les marques H4K20me3 i H3K27me3. Aquesta isoforma es troba directament relacionada amb Suv420h2, interacciona preferentment amb ella i regula la seva dinàmica. HP1 γ sembla tenir un efecte intermig entre les altres isoformes, el que suggereix una funció més redundant. Una de les observacions més sorprenents del nostre treball és que la pèrdua d'HP1 α indueix una hipercompactació de l'HPC, mentre que la pèrdua d'HP1 β i d'HP1 γ sembla produir una disminució de la compactació a aquestes regions. Així doncs, els nostres estudis generen diversos resultats que es discuteixen a continuació.

1.1. Paper de la isoforma HP1 α a l'estructura de l'HPC

Els nostres resultats mostren que la pèrdua de la isoforma HP1 α produeix un enriquiment significatiu de les marques associades a l'heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3 als focis d'HPC, de manera independent a la fase del cicle cel·lular (Figura R1). A partir d'estudis en cèl·lules KO d'HP1 α , noKO i reKO i en cèl·lules KO d'HP1 α sobreexpressades ectòpicament amb HP1 α (Figura R2 i R3) hem vist que la relació entre la pèrdua d'HP1 i l'enriquiment d'aquestes marques és directe. Els nostres resultats indiquen doncs, que HP1 α té un paper directe en la restricció d'H4K20me3 i d'H3K27me3 a l'HPC.

A més, el nostre treball indica que la relació entre H4K20me3 i H3K27me3 amb HP1 α és diferent. L'augment dels nivells d'H3K27me3, però no d'H4K20me3, que vam observar al re-delecionar HP1 α a les cèl·lules reKO suggereix que la regulació específica d'H4K20me3 es pot restringir a una fase de desenvolupament

anterior abans de l'especificació del llinatge dels fibroblasts (Figura R2). En suport a aquesta idea, l'establiment d'HP1 α i d'H4K20me3 sembla tenir lloc al mateix moment durant el desenvolupament tardà (Wong-tawan et al, 2011). Altres estudis suggereixen que HP1 α té un paper més significatiu en l'establiment d'H3K9me3 que en el seu manteniment (Hathaway et al, 2012). El mateix podria passar per H4K20me3, ja que la re-expressió d'HP1 α a les cèl·lules KO d'HP1 α restableix els nivells basals d'H4K20me3, però la seva re-deleció no produeix cap efecte clar (Figura R2 i R3).

Hem observat que la pèrdua d'HP1 α , però també d'HP1 β i d'HP1 γ , produeix una disminució d'H3K9me3 a l'HPC, suggerint d'aquesta manera que les tres isoformes són redundants pel que fa a la deposició d'aquesta modificació d'histones (Figura R1). Estudis recents del grup mostren que, tot i que les tres isoformes d'HP1 semblen tenir papers força redundants pel que fa a la deposició d'H3K9me3 dependent de Suv39h1 als focis d'HPC, HP1 α i HP1 γ tenen una relació funcional més propera amb Suv39h1 en comparació amb HP1 β . HP1 α i HP1 γ interaccionen preferencialment amb Suv39h1, eviten que Suv39h1 es poliubiquitinizi per MDM2 i incrementen el recanvi de Suv39h1 a l'HPC, assegurant la deposició d'H3K9me3 (Raurell-Vila et al, 2017). Aquests estudis doncs, podrien explicar que la pèrdua de cadascuna de les isoformes d'HP1 produeixi una disminució de la deposició d'H3K9me3 similar, ja que la pèrdua d'una isoforma es podria compensar tot i que no del tot, amb l'actuació de les altres. Aquesta hipòtesi es troba recolzada pel fet que als ratolins KO de cadascuna de les isoformes no s'observen grans canvis respecte al WT, suggerint que la seva funció podria ser compensada per les altres (Brown et al, 2010; Mosch et al, 2011).

Els nostres resultats indiquen que la pèrdua d'HP1 α produeix també un enriquiment d'H2A.Z als focis d'HPC (Figura R22, R23 i R24), mostrant un paral·lisme a l'observat en el cas d'H4K20me3 i d'H3K27me3 a cèl·lules deficientes en HP1 α . Els experiments en les cèl·lules KO d'HP1 α , noKO i reKO indiquen que la relació entre la pèrdua d'HP1 α i l'enriquiment d'H2A.Z a l'HPC és directa, ja que la re-expressió d'HP1 α endògen a les cèl·lules noKO restaura els nivells basals d'H2A.Z als focis d'HPC i, la re-deleció d'HP1 α a les cèl·lules reKO torna a induir l'enriquiment d'H2A.Z als focis d'HPC (Figura R25).

Un altre aspecte important d'aquest treball és la connexió entre HP1 α i les regions flanquejants de l'heterocromatina pericentromèrica. Les nostres dades mostren la unió preferencial de CTCF i HP1 α , respecte les altres isoformes, tant a nivell global com a les regions d'HPC (Figura R11 i R12). Addicionalment, els nostres resultats suggereixen que HP1 α podria reclutar CTCF a regions específiques dins de l'HPC, perquè la pèrdua d'HP1 α produeix una deslocalització significant de CTCF a aquestes regions (Figura R13). Tot i que no vàrem ser capaços de detectar CTCF als *major satellites* de l'HPC per CHIP a les cèl·lules WT, HP1 $\alpha^{-/-}$ i HP1 $\gamma^{-/-}$, probablement degut a uns nivells molt baixos de CTCF, els nostres anàlisis de co-localització de CTCF endògen a les regions d'HPC (Figura

R16) ens confirmaven la presència de CTCF a aquestes regions juntament amb els anàlisis de FRET i els estudis de la distribució de GFP-CTCF. Aquestes evidències són molt rellevants perquè fins ara això no s'havia demostrat d'una forma convincent. Aquests anàlisis són consistents amb les dades publicades que indicaven que CTCF es troba present a les regions d'HPC en nivells limitants o bé sota determinades condicions (Mukhopadhyay et al, 2004; Rubio et al, 2008). De manera interessant, les nostres mostren que la disminució de CTCF a partir d'experiments amb shRNA de CTCF, sembla no afectar a la localització d'HP1 α (Figura R17). Així doncs, mentre que HP1 α sembla tenir un paper en la deposició de CTCF a l'HPC, els nostres estudis indiquen que CTCF no afecta a la localització d'HP1 α . Tot i que un estudi ha descrit que en cèl·lules humanes, la reducció de la unió de vigilina a les repeticions pericentromèriques mediada per CTCF, redueix la unió d'HP1 α als satellites 2 però no als satellites β (Shen et al, 2014), aquesta relació indirecta podria no trobar-se conservada a cèl·lules de ratolí. Finalment, els nostres estudis confirmen que, com en el cas de la pèrdua d'HP1 α la disminució de CTCF indueix un enriquiment significatiu d'H3K27me3 als focus d'HPC. Però, en aquest cas, no s'observen canvis en els nivells d'H4K20me3 (Figura R17). El conjunt de les nostres evidències suggereix que, HP1 α tindria un paper en la deposició de CTCF a l'HPC, i que ambdues proteïnes col·laborarien per tal de definir els dominis cromatínics i organitzar l'HPC.

Estudis previs indiquen que H2A.Z controla la localització d'HP1 α a les regions d'HPC (Pusarla & Bhargava, 2005; Matsuda et al, 2010). I que, H2A.Z és també important en la regulació de la unió de CTCF a les regions flanquejants, on intervé en la formació dels límits cromatínics (Meneghini et al, 2003; Wen et al, 2020). A partir d'aquestes treballs, vàrem hipotetitzar que H2A.Z podria trobar-se implicada en cooperació amb HP1 α i amb CTCF en l'estructura i organització de les regions d'HPC mitjançant l'establiment de les regions flanquejants per prevenir la propagació de les marques heterocromatíniques. Els nostres resultats ens indiquen que, la pèrdua d'H2A.Z sembla produir un enriquiment de CTCF als *major satellites*, suggerint no tant un paper d'H2A.Z a la deposició de CTCF a l'HPC si no més bé un paper al control de la propagació de CTCF a aquestes regions (Figura R26). Aquests resultats, són sorprenents tenint en compte els estudis prèviament publicats. Malauradament no vàrem aconseguir obtenir resultats del CHIP d'HP1 α en cèl·lules amb baixada dels nivells de proteïna H2A.Z, probablement degut a una baixa compatibilitat del kit de CHIP fet servir amb l'anticòs HP1 α . Aquests resultats ens haguessin donat una visió més complerta a l'hora d'analitzar els resultats. Actualment s'estan realitzant experiments en aquesta direcció al laboratori per tal de desxifrar si H2A.Z té un paper a la localització d'HP1 α a les regions d'HPC. Encara però, queda molt per aprofundir a la relació d'aquestes tres proteïnes H2A.Z, HP1 α i CTCF a les regions pericèntriques. Els nostres resultats ens indiquen que, tot i no estar del tot definida encara la relació d'H2A.Z respecte HP1 α i CTCF, aquesta variant d'histona té un paper molt important i complex ja que sembla estar implicada també al control de la propagació i de l'organització de les regions

d'HPC. Així doncs, la disminució d'H2A.Z produeix un enriquiment de les marques específiques d'heterocromatina H4K20me3, H3K27me3 i H3K9me3 a l'HPC però no de la marca relacionada amb cromatina activa H3K4me3 (Figura R27). És interessant destacar que tot i que sembla haver un paral·lelisme en la propagació d'H4K20me3 i d'H3K27me3 entre la pèrdua d'H2A.Z i HP1 α , en el cas d'H2A.Z també es produeix la propagació d'H3K9me3. Això suggereix que H2A.Z juga un paper addicional a la regulació epigenètica de l'HPC independent d'HP1.

L'anàlisi complet de totes les nostres dades ens ha permès proposar un model de regulació de l'estructura de l'HPC per part de la isoforma HP1 α (Figura D1). Segons el nostre model, HP1 α reclutaria CTCF a regions específiques dins de l'HPC. Aquestes dues proteïnes HP1 α i CTCF actuarien en conjunció amb H2A.Z en l'establiment de les regions flanquejants de les regions d'HPC, establint els límits

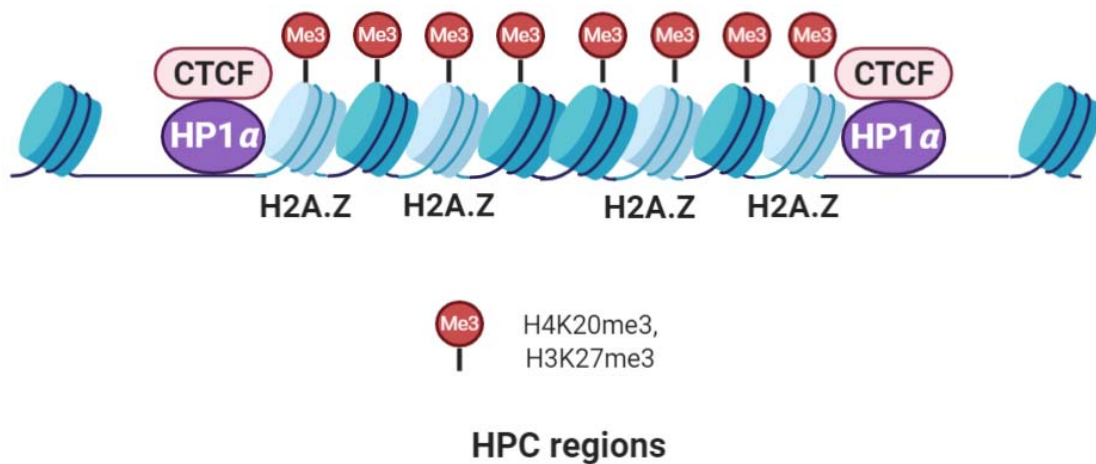


Figura D1. Model proposat per a la regulació de l'estructura de l'HPC per part d'HP1 α . HP1 α reclutaria CTCF a regions determinades de l'HPC, aquestes dues proteïnes en conjunció amb la variant d'histona H2A.Z tindrien un paper en l'establiment de les regions flanquejants de l'HPC, establint els límits entre els diferents dominis cromatínics per tal d'evitar la propagació de les marques H4K20me3 i H3K27me3, i de la variant H2A.Z a les regions adjacents.

entre els diferents dominis cromatínics i evitant així la propagació de les marques l'heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3, i de la variant d'histona relacionada amb les regions pericèntriques H2A.Z, per tal de preservar l'eucromatina adjacent. És important clarificar que aquest paper estabilitzador d'HP1 α és dut a terme per una subpoblació d'aquesta isoforma. La resta d'HP1 α es trobaria a la resta de les regions d'HPC on tindria un paper redundant amb HP1 γ i en part amb HP1 β .

1.2. Paper de la isoforma HP1 β a l'estructura de l'HPC

Malgrat la redundància funcional establerta entre les isoformes d'HP1 a les regions d'HPC (Maison & Almouzni, 2014), a partir dels nostres estudis proposem

que HP1 β té un rol oposat a HP1 α pel que fa a l'estructura i organització de l'HPC. Les nostres dades suggereixen que HP1 β actua en oposició a HP1 α pel que fa a la regulació de les marques H4K20me3 i H3K27me3 als focis d'HPC, ja que hem vist que la pèrdua de la isoforma HP1 β produeix una disminució dels nivells d'ambdues marques històniques a l'HPC (Figura R1), de manera contrària a l'observat en el cas de la pèrdua d'HP1 α . La relació funcional de les isoformes d'HP1 amb Suv39h1 també dóna suport a aquest rol oposat d'HP1 β respecte HP1 α (Raurell-Vila et al, 2017).

Els nostres estudis han revelat una vinculació funcional entre HP1 β i Suv420h2 inesperada. Tot i que les tres isoformes d'HP1 interaccionen per igual amb Suv420h2 en fraccions nuclears solubles tal i com ha estat descrit (Hahn et al, 2013). Experiments de coimmunoprecipitació en extractes nuclears enriquits en cromatina insoluble digerida (Figura R4) i anàlisis de FRET (Figura R5), mostren una interacció preferencial de Suv420h2 amb HP1 β a les regions d'heterocromatina pericentromèrica. Està plenament acceptat que HP1 té un paper al reclutament de proteïnes amb diverses activitats enzimàtiques essencials per la formació de l'HPC com és el cas de Suv420h2, que trimetila H4K20 i promou d'aquesta manera la formació d'una fibra de cromatina compacta (Rowbotham et al, 2011). A més a més, s'havia suggerit que podria ser la isoforma HP1 β qui actués a la deposició d'aquestes (Grewal et al, 2015; Hiragami-Hamada et al, 2016). El fet que la isoforma HP1 β interactuï preferentment amb Suv420h2 als focis de l'HPC, podria indicar que aquesta isoforma és la que es troba més implicada en el reclutament de Suv420h2 a les regions d'HPC per la formació d'una fibra de cromatina compacta en línia amb les dades publicades, i podria explicar la disminució dels nivells d'H4K20me3 associats a la pèrdua d'HP1 β . De manera interessant, els nostres resultats mostren que HP1 β modula la dinàmica de Suv420h2 *in vivo* als focis d'HPC (Figura R6). La disminució de l'intercanvi de Suv420h2 associat a la pèrdua d'HP1 β contrasta amb l'increment de l'intercanvi associat amb la pèrdua d'HP1 α , corroborant un paper antagonista d'HP1 β respecte d'HP1 α al control de la dinàmica de Suv420h2. Tenint en compte els resultats obtinguts, suggerim que probablement HP1 β tingui un efecte més directe en la dinàmica de Suv420h2 degut a la vinculació funcional més estreta entre HP1 β i Suv420h2.

De manera consistent, hem observat que la cromatina que immunoprecipita HP1 β està enriquida en H4K20me3 en comparació amb les altres isoformes (Figura R7) i que HP1 β s'uneix als pèptids metilats H4K20me3 en condicions de força iònica moderada (Dignam) però no en condicions més astringents (RIPA) (Figura R8). La unió d'HP1 β a H4K20me3 sembla doncs ser específica però làbil (Figura R8). Aquests resultats suggereixen que HP1 β té capacitat d'unir-se a H4K20me3. Un gran nombre de les nostre dades, donen suport a una relació funcional directa entre HP1 β i Suv420h2/H4K20me3: Primer, hem vist que HP1 β tendeix a localitzar-se amb H4K20me3 als *major satellites* de l'HPC comparat amb

les altres isoformes a partir d'experiments de reCHIP (Figura R9). Segon, els nostres anàlisi de CHIP-seq mostren una major correlació a tot el genoma en ESC entre HP1 β i H4K20me3 en comparació amb HP1 α (Figura R10). De manera que, revelem un vincle entre HP1 β i H4K20me3 tant a nivell de foci d'HPC com a tot el genoma, que dóna suport a la vinculació funcional d'HP1 β amb Suv420h2.

En suport al paper antagonista d'HP1 α i d'HP1 β a l'organització de l'HPC, mentre que la pèrdua d'HP1 α s'associa amb una deslocalització de CTCF a l'HPC, les nostres dades mostren que la pèrdua d'HP1 β indueix un enriquiment global de CTCF en grans regions del genoma incloent els focis d'HPC (Figures R13 i R15), suggerint així un paper d'HP1 β en la restricció de la localització d'HP1 β a locus específics, i per tant, probablement controlant els límits de la cromatina. Aquest paper es recolza per les observacions on la pèrdua d'HP1 β resulta en un enriquiment de CTCF més enllà dels seus llocs normals de localització. Concretament, es va detectar CTCF fora del seu lloc d'unió a la regió de control d'*imprinting* H19 (H19-ICR), entre 1 i 2 kb *downstream* del lloc d'unió 1 d' H19-ICR (ICR1) a les MEFS HP1 β ^{-/-} (Figura R15). Aquest resultat es troba en línia amb un estudi que suggereix que HP1 β pot regular l'imprinting genòmic (Singh, 2016). Un efecte similar es va observar al promotor i a 2kb de distància, a l'ORF2, dels elements LINE-L1, on es va detectar un espectacular augment dels nivells de CTCF a les cèl·lules HP1 β ^{-/-} (Figura R15). Degut a que sembla que no hi hagi cap motiu canònic de CTCF *downstream* d'H19-ICR1 ni als elements repetitius LINE-L1s, la propagació observada de CTCF és poc probable que estigui relacionada amb una unió directa de CTCF a l'ADN, si no que probablement depengui d'altres factors. Aquest enriquiment de CTCF a grans regions del genoma observat en les cèl·lules HP1 β ^{-/-} correlaciona amb un increment global dels nivells de proteïna CTCF (Figura R14), sense alteració de la seva expressió gènica. Totes aquestes evidències corroboren que HP1 α i d'HP1 β juguen papers oposats en la distribució de CTCF.

Les nostres dades mostren la unió preferencial d'H2A.Z a HP1 β , respecte les altres isoformes, tant a nivell global (Figures R18 i R19) com a les regions d'HPC (Figures R20 i R21). Així doncs, aquestes observacions indicarien una vinculació entre aquestes dues proteïnes a nivell estructural dels focis d'HPC. L'observació de que la pèrdua d'HP1 β indueix un enriquiment global de CTCF a grans regions del genoma incloent els focis d'HPC (Figures R13 i R15) i de que la pèrdua d'H2A.Z semblaria produir també un enriquiment de CTCF als *major satellites* (Figura R26), suggereix que degut a la vinculació tant estreta entre les proteïnes H2A.Z i HP1 β , aquestes podrien actuar juntes en el control de la restricció de la localització de CTCF a l'HPC.

Totes aquestes dades juntes ens han permès proposar un model de regulació de l'estructura de l'HPC per part de la isoforma HP1 β (Figura D2). Segons el nostre model, HP1 β tindria un rol oposat a HP1 α pel que fa a la regulació de l'estructura a aquestes regions. Així doncs, HP1 β estaria vinculada funcionalment amb

Suv420h2, i podria ser la isoforma més implicada en el reclutament d'aquesta a les regions d'HPC per la formació d'una fibra de cromatina compacta. Conseqüentment, HP1 β es trobaria estretament relacionada amb la deposició d'H4K20me3 a aquestes regions. A més a més, HP1 β es vincularia amb H2A.Z als focis de l'HPC, on actuarien en el control de la restricció de la localització de CTCF a posicions específiques del genoma.

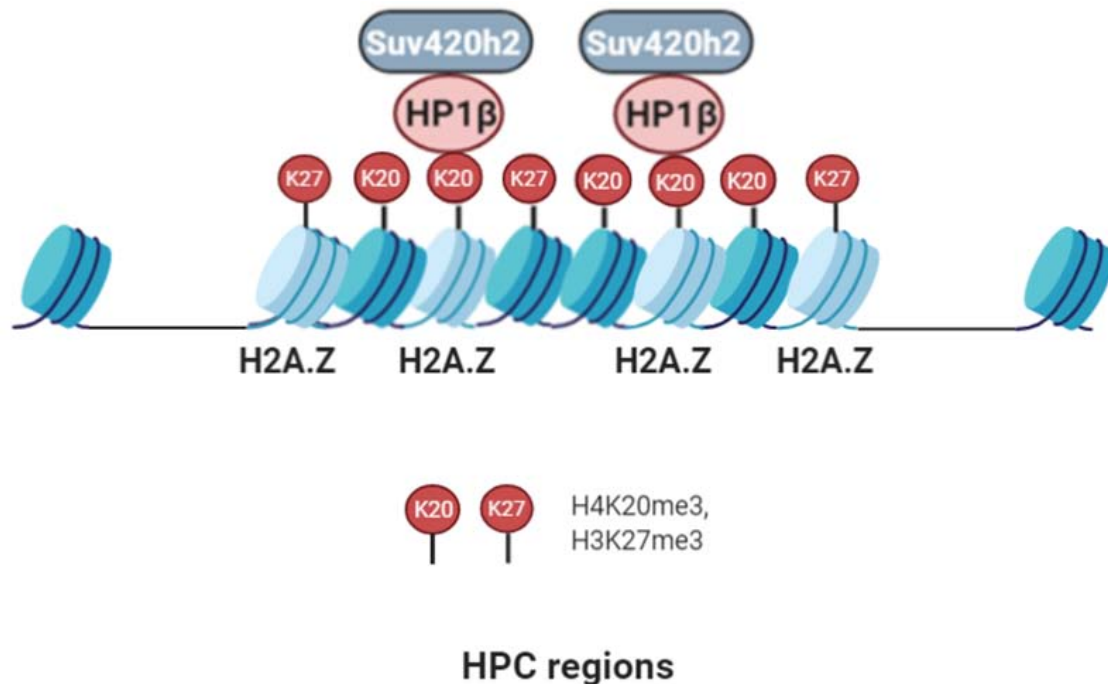


Figura D2. Model proposat per a la regulació de l'estructura de l'HPC per part d'HP1 β . HP1 β tindria un rol oposat a HP1 α pel que fa a la regulació de l'estructura d'aquestes regions. Aquesta isoforma estaria vinculada funcionalment amb Suv420h2 i amb H4K20me3, i podria ser la isoforma més destacada en el reclutament de Suv42h2 a l'HPC per a la formació d'una fibra de cromatina compacta. A la seva vegada, HP1 β es vincularia amb H2A.Z, on actuarien en el control de la localització de CTCF a determinades posicions específiques al genoma.

1.3. Paper de la isoforma HP1 γ a l'estructura de l'HPC

Els nostres estudis indiquen que HP1 γ té un paper a mig camí a les altres dues isoformes, el que suggereix una funció més redundat. Les nostres dades indiquen que la pèrdua HP1 γ produeix una disminució dels nivells d'H4K20me3 i H3K27me3 als focis d'HPC similar l'observat en el cas d'HP1 β (Figura R1). Mentre que, respecte la relació funcional de les isoformes d'HP1 amb Suv39h1, el comportament d'HP1 γ s'assimila més a HP1 α . Tot això és molt complex en part, perquè les isoformes d'HP1 heterodimeritzen i podem tenir un gradient d'efectes degut a que tenim diverses possibles combinacions entre elles. Encara no entenem gaire bé que determina aquesta variabilitat de dímers tot i que ha d'estar molt

regulat degut a aquests papers específics d'HP1 α i d'HP1 β . En conseqüència amb el paper redundat d'HP1 γ , hem observat que, mentre que la pèrdua d'HP1 β s'associa amb una disminució de l'intercanvi de Suv420h2 i la pèrdua d'HP1 α s'associa amb un increment de l'intercanvi, la pèrdua d'HP1 γ produeix un efecte intermig (Figura R6). De la mateixa manera, sembla que l'enriquiment d'HP1 γ amb CTCF (Figura R12) i H2A.Z (Figura R24) a l'HPC es trobaria entre l'observat per HP1 α i per HP1 γ . El conjunt dels resultats obtinguts indicaria un paper intermig d'HP1 γ pel que fa al control de l'estructura de l'HPC, on estaria relacionada amb les altres isoformes i tindria funcions més redundants.

1.4. Efecte diferencial de les isoformes d'HP1 a la compactació de les regions d'HPC

Una de les observacions més sorprenents del nostre treball és la hipercompactació de l'estructura de l'HPC en cèl·lules deficientes d'HP1 α tant *in vitro* com *in vivo* (Figura R28). La marca H4K20me3 es troba relacionada directament amb els nivells de compactació de les regions d'HPC (Hahn et al, 2013). De fet, ha estat demostrat que H4K20me3 és necessària per la formació d'una fibra de cromatina compacta (Dambacher, 2012; Saksouk et al, 2015). De manera que, l'augment de compactació en les cèl·lules deficientes en HP1 α podria ser degut a l'expansió de les marques d'heterocromatina d'H4K20me3 i d'H3K27me3 observat en aquestes cèl·lules (Figura R1). A més, estudis del grup mostraven que la pèrdua d'HP1 α resulta també en un increment de la longitud de l'ADN enllaçador (*linker DNA*) en comparació amb les cèl·lules WT, el qual s'associa també amb una major compactació de la cromatina (Szerlong & Hansen, 2011). Els nostres resultats eren inesperats perquè un estudi previ havia descrit que la unió artificial d'HP1 α o d'HP1 β taggejat amb LacR als transgens regulats per l'operó Lac resultava en compactació de la cromatina (Verschure et al, 2005). Aquestes observacions aparentment conflictives es podrien conciliar si una població de les molècules d'HP1 α participés a la compartimentació de l'HPC, mentre que una altra tingués, juntament amb les altres isoformes, un paper més redundat.

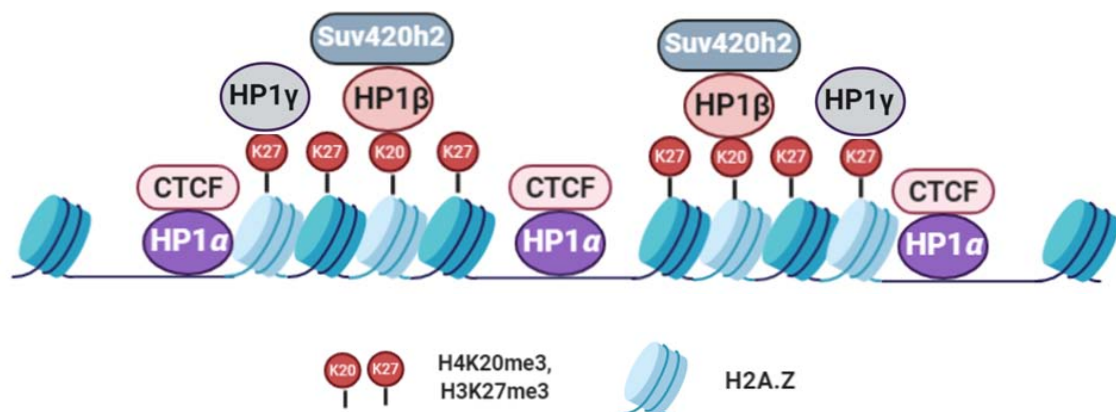
En conseqüència amb el paper antagònic d'HP1 α i d'HP1 β en la regulació de l'estructura de l'HPC, els nostres estudis mostren que la pèrdua d'HP1 β produeix una disminució de la compactació de les regions d'HPC tant *in vitro* com *in vivo* (Figura R28). La disminució de la compactació en cèl·lules deficientes en HP1 β són coherents amb la disminució en els nivells d'H4K20me3 i d'H3K27me3 observat als focis d'HPC en aquestes cèl·lules (Figura R1), i recolzaria el paper d'HP1 β com a la isoforma més vinculada amb Suv420h2 i la més implicada en el reclutament de Suv420h2 a les regions d'HPC per la formació d'una fibra de cromatina compacta. Un treball dut a terme per altres autors recolza també el paper d'HP1 β en la

compactació de l'HPC, i descriu que les regions on s'acumula la isoforma HP1 β són sempre compactes i de forma ovoide (Dyalinas et al, 2007).

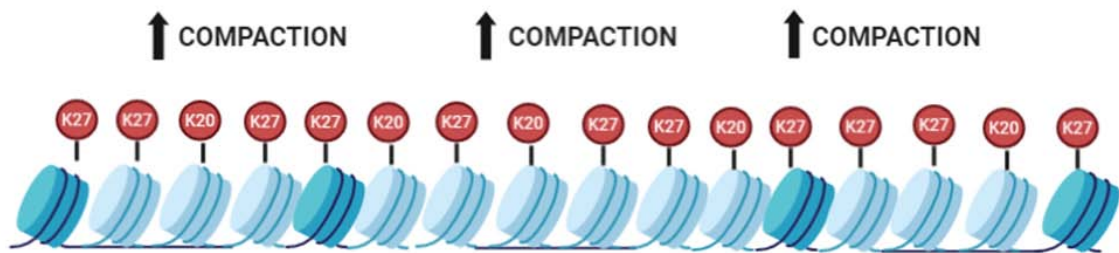
Pel que fa a la isoforma HP1 γ , hem observat que la pèrdua d'aquesta indueix una suau disminució de la compactació en estudis de compactació *in vitro*, i una disminució del grau de compactació similar a l'observada en les cèl·lules deficientes en HP1 β (Figura R28), aquestes observacions es troben en línia amb un paper intermig d'HP1 γ que sembla assimilar-se més en funcionalitat a HP1 β en aquest aspecte.

El conjunt de totes aquestes troballes ens ha permès proposar un model englobant la regulació per part de les isoformes HP1 α , HP1 β i HP1 γ a l'estructura i organització de l'HPC (Figura D3), on malgrat la redundància funcional ben establerta entre les isoformes d'HP1 a aquestes regions, una subpoblació d'HP1 α i d'HP1 β jugarien papers diferents a l'organització de l'HPC. Segons el nostre model d'organització de l'heterocromatina, HP1 α manté en conjunció amb CTCF i H2A.Z l'estructura interna i la compactació de l'HPC al restringir la distribució d'H4K20me3, d'H3K27me3, i de la variant d'histona H2A.Z. HP1 β tindria un paper oposat a HP1 α , on seria la isoforma més vinculada amb Suv420h2/H4K20me3 i possiblement la més implicada en el seu reclutament a les regions d'HPC per la formació d'una fibra de cromatina compacta. HP1 β també es vincularia amb H2A.Z als focis de l'HPC, i actuarien en el control de la restricció de la localització de CTCF a posicions específiques del genoma. La pèrdua d'HP1 α produiria una deslocalització de CTCF a les regions de l'HPC, i es produiria la propagació de les marques d'heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3, i de la variant d'histona H2A.Z a les regions adjacents, produint un increment en el grau de compactació de l'HPC. La pèrdua d'HP1 β en canvi, es vincularia amb un menor reclutament de Suv420h2 a l'HPC, en una disminució de les marques H4K20me3 i H3K27me3 i en una disminució del grau de compactació de l'HPC. Això també acompanyat de l'enriquiment de CTCF més enllà dels seus llocs habituals tant a nivell d'HPC com a nivell d'altres regions genòmiques.

WT HPC regions



HP1 α ^{-/-} HPC regions



HP1 β ^{-/-} HPC regions

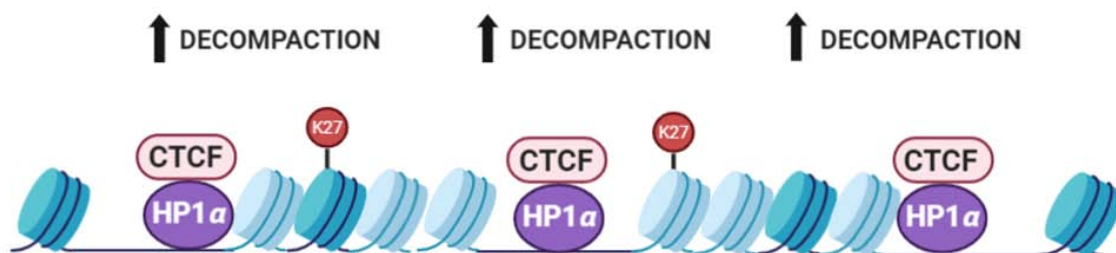


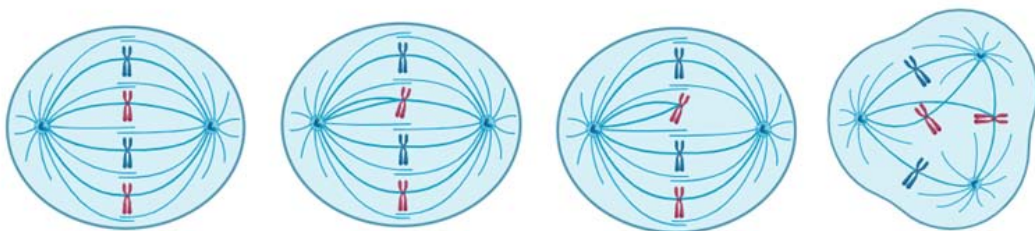
Figura D3. Model global proposat per a la regulació de les isoformes d'HP1 a l'estructura de l'HPC. Segons el nostre model en les regions d'HPC WT, HP1 α en conjunció amb CTCF i H2A.Z intervenen en l'establiment dels límits cromatínics per tal de mantenir l'estructura interna i la compactació de l'HPC al restringir la propagació d'H4K20me3, H3K27me3 i d'H2A.Z. HP1 β té un paper oposat a HP1 α , on es troba més relacionada amb Suv420h2/H4K20me3 i seria la més implicada al seu reclutament per a la formació d'una fibra de cromatina compacta. Aquesta isoforma també actua en la restricció de la localització de CTCF probablement en conjunció amb H2A.Z. HP1 γ té un rol més redundat i el seu paper estaria més relacionat amb la isoforma amb la que heterodimeritzi. La pèrdua d'HP1 α a les regions d'HPC, produiria la deslocalització de CTCF a aquestes regions i es produiria la propagació de les marques d'heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3, i de la proteïna H2A.Z. Com a conseqüència, es produiria una hipercompactació de les regions d'HPC. De manera contrària, la pèrdua d'HP1 β a les regions d'HPC produiria un menor reclutament de Suv420h2 a l'HPC, una disminució de les marques H4K20me3 i H3K27me3, i una descompactació d'aquestes regions.

1.5. Importància de les isoformes d'HP1 a l'estabilitat genòmica

Els nostres estudis indiquen que les tres isoformes d'HP1 es troben implicades al manteniment de l'estabilitat genòmica a partir de les seves funcions específiques en la regulació de l'organització i compactació de les regions d'HPC. El paper específic de les isoformes d'HP1 en l'estabilitat del genoma s'observa clarament en les MEFs HP1 α ^{-/-}, β ^{-/-} i γ ^{-/-}, on la deleció de cadascuna de les isoformes resulta en un conjunt d'anomalies cromosòmiques específiques. Així doncs, els anàlisis mitòtics que varem dur a terme mostren que, les cèl·lules HP1 α

$\gamma^{-/-}$ i $\text{HP1}\beta^{-/-}$ presentaven una major freqüència d'aberracions mitòtiques en comparació amb les MEFs $\text{HP1}\gamma^{-/-}$ o WT (Figura D4). Les aberracions trobades a les MEFs $\text{HP1}\alpha^{-/-}$ son sorprenentment diferents a les trobades en les MEFs $\text{HP1}\beta^{-/-}$. La pèrdua d' $\text{HP1}\alpha$ va produir un augment del nombre de defectes d'adhesió merotèlica i sintèlica, els defectes merotèlics són generats quan es produeix la unió simultània d'un únic cinetocor als dos pols del fus mitòtic, aquesta situació genera tensió centromèrica i si no es corregeix pot generar aneuploidies; els defectes sintèlics es produeixen quan les dues cromàtides germanes s'uneixen al mateix pol del fus mitòtic i genera de la mateixa manera aneuploidies (Baudoin & Cimini, 2018). Aquests defectes merotèlics podrien ser deguts als canvis de compactació observat en aquestes cèl·lules i ja havien estat associats prèviament a una funció deficient de Clr4 (Suv391 en mamífers) o Swi6 (HP1 en mamífers) en *Schizosaccharomyces pombe* (Gregan et al, 2007). Mentre que la pèrdua d' $\text{HP1}\beta$ va resultar en una major freqüència de la formació de fus mitòtics multipolars (Baudoin & Cimini, 2018), que podria estar relacionat amb el fenotip descondensat degut a la reducció dels nivells d' H4K20me3 i d' H3K27me3 observat en aquests cromosomes. De fet, ha estat descrit que en cèl·lules deficientes en Suv420h2, es produeix una descompactació de l'heterocromatina i es mostren nivells substancialment reduïts de cohesina a l'heterocromatina pericèntrica, el que porta a defectes de segregació cromosòmica durant el procés de mitosis degut a una baixa cohesió de les cromàtides germanes (Hahn et al, 2013). Curiosament, la pèrdua d' $\text{HP1}\gamma$ va resultar en una menor freqüència d'aberracions mitòtiques, que eren una barreja de les trobades en les MEFs $\text{HP1}\alpha^{-/-}$ i $\text{HP1}\beta^{-/-}$, en suport a que $\text{HP1}\gamma$ comparteix alguna redundància amb les altres isoformes. De manera que, aquests resultats corroboren que $\text{HP1}\alpha$ i $\text{HP1}\beta$ tenen funcions específiques implicades en l'estabilitat del genoma.

A) Normal mitosis Merotelic attachment Sintelic attachment Multipolar spindle



B)

	Normal	Mono/ Syntelic	3 Poles		4 Poles		Poly	Other	Total Count
			Kint Middle	Kint Oriented	Kint Middle	Kint Oriented			
Wt	80%	7%	1%	2%	0%	3%	5%	3%	200
$\text{Hp1}\alpha^{-/-}$	51%	42%	0%	0%	0%	0%	3%	4%	105
$\text{Hp1}\beta^{-/-}$	56%	0%	25%	12%	0%	4%	0%	2%	304
$\text{Hp1}\gamma^{-/-}$	73%	13%	2%	1%	1%	0%	10%	1%	374

Figura D4. Anormalitats mitòtiques associades a la pèrdua de les isoformes d'HP1. A) Esquema d'una mitosi normal i de les anormalitats mitòtiques produïdes per defectes d'adhesió merotèlics, per defectes d'adhesió sintètics i per formació de fusos mitòtics multipolars. B) Anàlisi dels defectes mitòtics observats en les MEFs delecionades de les isoformes d'HP1 i WT.

1.6. Malalties associades a la inestabilitat genòmica

L'estructura i manteniment de les regions d'HPC és de vital importància especialment sota condicions d'estrès oxidatiu, genotòxic o metabòlic per tal de preservar la integritat genòmica (Hall et al, 2012). El paper diferencial de les isoformes d'HP1 a l'estructura de l'HPC, i el ventall de defectes mitòtics observats, clarament indica que la contribució de les tres isoformes al manteniment de la inestabilitat genòmica és diferent. La inestabilitat genòmica, és un factor clau al desenvolupament de moltes patologies humanes com el càncer, les malalties neurodegeneratives, els trastorns cardiovasculars i els trastorns endocrins, entre d'altres. A més a més, la inestabilitat genòmica és una de les principals causes de l'envelliment (Bosch-Presegué & Vaquero, 2014; Yao & Dai, 2014; Ferguson et al, 2015; Andor et al, 2017; Fioriniello et al, 2020). L'aprofunditzament en aquest camp pot ampliar la visió sobre possibles perspectives terapèutiques i la versatilitat de mètodes per millorar la teràpia gènica (Hall et al, 2012, Fioriniello et al, 2020).

Tot i això, actualment, no s'ha associat cap malaltia humana amb mutacions als gens que codifiquen per les isoformes d'HP1. No obstant, la reducció dels nivells d'expressió de les isoformes d'HP1 s'ha vinculat amb la progressió de molts càncers en humans (**Taula D1**) (Dyalinas et al, 2008). La reducció d'HP1 a les regions pericèntriques s'ha associat amb inestabilitat genòmica generalitzada i amb una major incidència de limfomes (Peters et al, 2001). Estudis de perfils d'expressió gènica revelaven nivells reduïts de mRNA d'HP1 α en carcinomes papil·lars de tiroïdes en comparació al teixit tiroide normal (Wasenius et al, 2003). De la mateixa manera, els nivells de mRNA d'HP1 α es troben reduïts en tumors cerebrals embrionaris d'individus amb pitjor pronòstic, en comparació a aquells amb un pronòstic més favorable (Pomeroy et al, 2002), de fet nivells reduïts de mRNA d'HP1 α són uns dels millors marcadors de fracàs del tractament pel càncer de cervell embrionari. Consistent amb la reducció dels nivells d'HP1 amb un pitjor pronòstic, nivells incrementats d'HP1 α correlacionen amb una reducció de la metastasi en càncer de colon (Ruginis et al, 2006). HP1 també sembla tenir un paper important a la progressió del càncer d'ovari, anàlisis de proteïnes han mostrat un increment dels nivells d'HP1 γ en cèl·lules tractades amb quimioteràpia, consistent amb el paper anticancerígen d'HP1 γ (Maloney et al, 2007). Mentre que en altres estudis s'ha demostrat una correlació entre les alteracions dels nivells d'HP1 i la progressió del càncer, estudis en càncer de mama han demostrat el paper d'HP1 α a la regulació de la invasió de les cèl·lules de càncer de mama. HP1 α

està *downregulat* en cèl·lules altament invasives/metastàtiques en comparació amb les menys invasives (Kirschmann et al, 2000).

Tipus de càncer	Isoforma d'HP1	Nivell alterat	Tipus cel·lular
Càncer de mama	HP1 α	Disminució	MDA-MB-231 i MCF7
Càncer cerebral	HP1 α	Disminució	Múltiples tumors cerebrals embrionaris
Càncer de colon	HP1 α	Disminució	HCT116, Caco-2 i Ht-29
Leucèmia	HP1 α , β i γ	Disminució	Leucòcits de sang perifèrica
Càncer d'ovari	HP1 γ	Disminució	A2780
Carcinoma papil·lar de tiroide	HP1 α	Disminució	Teixit de carcinoma papil·lar de tiroide

Taula D1. Relació entre les isoformes d'HP1 i la progressió del càncer. Taula on es representa el tipus de càncer en el que estan involucrades les isoformes d'HP1, el tipus d'alteració que es produeix i la línia cel·lular on ha estat descrit (Adaptat de Dyalinas et al, 2008).

2. PAPER DE PARP-1 EN EL CONTROL DEL MANTENIMENT DE L'HPC MEDIAT PER SIRT1 I SUV39H1

Estudis del nostre grup van establir que SirT1 té un paper clau en el manteniment de l'estructura de l'HPC, especialment sota condicions d'estrès. En aquestes condicions, es produeix un increment dels nivells de SirT1, aquest interacciona amb Suv39h1 i l'estabilitza evitant la poliubiquitinització mediada per MDM2 a la lisina 87 del domini *chromo* de Suv39h1, incrementant la seva vida mitjana i augmentant els nivells de proteïna. L'increment de la disponibilitat de Suv39h1 en el nucli, s'ha associat amb un augment del recanvi i de la seva mobilitat a l'HPC, assegurant el manteniment d'H3K9me3 i d'HP1, augmentant així la protecció genòmica a les regions d'PCH (Bosch-Presegué et al, 2011; Phair et al, 2004). De manera que, la pèrdua de SirT1 en MEFS s'ha relacionat amb nivells més baixos de Suv39h1 i amb una deslocalització d'H3K9me3 i d'HP1 a les regions d'HPC, que conduïa a inestabilitat genòmica, defectes en la segregació cromosòmica i aneuploïdies (Vaquero et al, 2007; Wang et al, 2007; Bosch-Presegué et al, 2011). Treballs d'altres autors suggerien un antagonisme funcional entre SirT1 i PARP1 respecte el control d'H3K9me3 i d'HP1 a l'HPC. Sorprenentment, l'addicional pèrdua de PARP-1 en MEFS rescatava la localització d'H3K9me3 i d'HP1 observada a les cèl·lules WT i el fenotip mitòtic normal (El Ramy et al, 2009). Però tot i haver-se descrit aquesta relació funcional, encara no es coneixia el mecanisme d'acció ni les relacions entre els factors implicats. Els resultats de la segona part d'aquesta tesi han corroborat l'antagonisme funcional

de SirT1 i PARP-1 respecte els nivells d'H3K9me3 a les regions de l'HPC, i mostren que aquest antagonisme funcional entre SirT1 i PARP-1 respecte H3K9me3 és degut a una regulació per part d'aquestes dues proteïnes dels nivells de Suv39h1, l'HMT responsable de l'establiment d'H3K9me3 a les regions d'HPC. Per poder aprofundir en l'estudi d'aquesta relació i degut a que avui dia no existeix cap anticòs fiable de Suv39h1 que funcioni per estudiar la seva localització o el seu enriquiment a la cromatina, en aquest treball hem generat i caracteritzat una línia cel·lular de ratolí que té el gen Suv39h1 taggejat mitjançant la tècnica CRISPR/Cas9. A continuació es discutiran alguns aspectes particularment rellevants dels nostres estudis.

2.1. Antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 en la regulació dels nivells de Suv39h1

El nostre treball ha confirmat l'antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte els nivells d'H3K9me3 a les regions de l'HPC. La baixada de SirT1 induïx una deslocalització del patró d'H3K9me3 als focis d'HPC en comparació amb les cèl·lules WT, mentre que l'addicional pèrdua de PARP-1 rescata la localització d'H3K9me3 als focis d'HPC en experiments d'IF en MEFs WT i PARP-1^{-/-} amb shRNA scr i de SirT1 (Figura R30), corroborant l'antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte el control d'H3K9me3 a l'HPC.

Vam hipotetitzar que l'antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte H3K9me3 podria ser degut a una regulació per part d'aquestes dues proteïnes envers Suv39h1, ja que l'efecte de SirT1 sobre H3K9me3 a les regions d'HPC té lloc mitjançant la regulació de Suv39h1. Els nostres experiments de sobreexpressió de Suv39h1, SirT1 i PARP1 en diferents línies cel·lulars mostren que la sobreexpressió de SirT1 produeix un increment en els nivells de Suv39h1, en suport al paper estabilitzador de SirT1 dels nivells de la proteïna Suv39h1 (Bosch-Presegué et al, 2011), però a més a més, observem que l'addicional sobreexpressió de PARP-1 neutralitza l'increment de Suv39h1 causat per SirT1. La sobreexpressió de PARP-1 per si sol no sembla produir cap efecte significatiu en els nivells de Suv39h1 (Figura R31). Aquests resultats indiquen que SirT1 i PARP-1 regulen de manera antagonica els nivells de Suv39h1, SirT1 té un paper a l'estabilització i augment dels nivells de Suv39h1, mentre que PARP-1 sembla tenir un paper contrari compensatori d'aquest increment causat per SirT1. Aquest possible efecte compensatori explicaria per què la sobreexpressió de només PARP-1 no produeix cap efecte. El conjunt d'aquests resultats indica que l'antagonisme funcional entre SirT1 i PARP-1 respecte H3K9me3 es deu a una regulació per part d'aquestes dues proteïnes dels nivells de Suv39h1, l'HMT responsable de l'establiment d'H3K9me3 a les regions d'HPC.

Els nostres estudis dels nivells endògens de Suv39h1 a MEFs WT i SirT1^{-/-} (background genètic C57Bl/6), i a MEFs WT i PARP-1^{-/-} (background 129Sv/CD1)

van ser sorprenents tenint en compte les observacions anteriors i no ens van ajudar a obtenir conclusions coherents (Figures R32 i R33). Aquestes estudis mostraven que a les MEFs SirT1^{-/-}, els nivells de Suv39h1 es troben disminuïts en comparació amb les cèl·lules WT tal com esperàvem. Sorprenentment però, a les MEFs PARP-1^{-/-} els nivells de Suv39h1 són també menors que en el cas de les WT, i a més a més, els nivells de SirT1 semblen també més baixos (Figura R32). Els canvis en els nivells de Suv39h1 observat en aquestes MEFs no són deguts a una alteració dels nivells de transcripció si no que es deuen a canvis a l'estabilització dels nivells de proteïna (Figura R33). Una dificultat afegida en l'anàlisi d'aquests experiments és que no podíem comparar les MEFs de SirT1 i de PARP-1 entre elles.

La relació antagonica entre SirT1 i PARP-1 respecte Suv39h1 podria actuar en la resposta a l'estrès oxidatiu per tal de d'assegurar la protecció genòmica de les regions d'HPC. De manera que SirT1, a través d'un seguit de mecanismes promouria l'increment dels nivells d'aquesta proteïna per tal d'assegurar el manteniment d'H3K9me3 i d'HP1, i mantenir l'estabilitat del genoma. Especulem que el paper de PARP-1 podria estar relacionat amb la compensació o tornada als nivells de Suv39h1 basals un cop finalitzada la situació d'estrès, i tenint en compte que PARP-1 actua, de la mateixa manera que SirT1, com a sensor d'estrès a les cèl·lules. Així doncs, les nostres observacions podrien reflectir un vincle directe entre la resposta a l'estrès oxidatiu i Suv39h1, i donarien suport a una visió dinàmica de la cromatina, on la seva estructura s'adapta a la fisiologia cel·lular.

2.2. Tagging endògen de Suv39h1 en cèl·lules NIH3T3 com a model d'estudi

Per poder aprofundir en l'estudi de la relació de SirT1 i PARP-1 respecte Suv39h1, hauríem d'estudiar si aquestes dues proteïnes produeixen canvis a la localització de Suv39h1 als focus de l'HPC per IF, o si produeixen canvis en l'enriquiment de Suv39h1 als *major satellites* de l'HPC per CHIP. Degut a que avui dia no existeix cap anticòs fiable de Suv39h1 que funcioni per estudiar la seva localització o el seu enriquiment a la cromatina, en aquest treball hem generat i caracteritzat, tant a nivell genòmic, a nivell de transcrit i a nivell proteic, una línia cel·lular de ratolí que té el gen Suv39h1 taggejat amb FLAG mitjançant la tècnica CRISPR/Cas9 (Figura R34-R41). Els nostres resultats indiquen que la nova línia cel·lular obtinguda NIH3T3 Suv39h1-FLAG sembla estar taggejada en un al·lel, ja que en experiments de WB utilitzant anticòs α -Suv39h1 observem que no desapareix la banda endògena de Suv39h1 si no que apareix una nova banda que concorda amb el pes molecular de Suv39h1 *taggejat* (Figura R37), aquest és el principal desavantatge del nostre model. Però tot i que presenti aquest punt en contra, el nostre model d'estudi presenta també molts altres punts a favor com els següents: Primer, hem comprovat que tot i haver incorporat una seqüència a la

proteïna Suv39h1, aquesta no interfereix al correcte plegament de la proteïna i l'activitat catalítica de la proteïna es troba intacta (Figura R39). Segon, ens permet estudiar canvis a la localització endògena de Suv39h1 mitjançant IF per tal d'explorar l'antagonisme de SirT1 i PARP-1 respecte Suv39h1 a les regions d'HPC, que és un dels principals motius pels que vàrem generar aquesta línia (Figura R40). Tercer, ens permet estudiar l'enriquiment endògen de Suv39h1 a la cromatina mitjançant CHIP, que ens permetrà estudiar si la pèrdua o expressió ectòpica de SirT1 i PARP-1 produeix canvis a l'enriquiment de Suv39h1 als *major satellites* de l'HPC, un altre dels motius principals per els que vàrem generar la línia (Figura R41). Així doncs, sospesant els principals punts en contra i a favor, podem concloure que la línia cel·lular generada NIH3T3 Suv39h1-FLAG és una eina molt potent que ens permetrà estudiar aspectes de la relació de SirT1 i PARP-1 envers Suv39h1 que no haguéssim pogut investigar, degut a la falta d'un anticòs fiable de Suv39h1. Però no només això si no que serà un eina per utilitzar al nostre laboratori per a l'abordatge d'altres projectes que tinguin relació amb Suv39h1.

Tot i que encara queda molt per aprofundir a aquesta segona part de la tesi, ja que la generació i posterior caracterització d'aquesta nova línia cel·lular ha portat molt de temps, hi ha experiments en marxa al laboratori encaminats a estudiar l'antagonisme entre SirT1 i PARP-1.

2.3. Importància de l'estabilització dels nivells de Suv39h1 a l'estabilitat genòmica

El manteniment de les regions d'HPC és de vital importància especialment sota condicions d'estrès oxidatiu, genotòxic o metabòlic, ja que aquestes formes d'estrès poden alterar l'estructura i el grau de compactació de les regions d'HPC i portar a inestabilitat genòmica (Hall et al, 2012). En aquest treball hem confirmat el paper de SirT1 en l'estabilització dels nivells de Suv39h1, l'HMT responsable de l'establiment de la marca de l'heterocromatina H3K9me3. Basat en els nostres resultats, postulem un paper contrari de PARP-1 compensatori de l'efecte de SirT1. El conjunt de les nostres dades juntament amb evidències anteriors del nostre grup ens han permès postular un model de regulació de les regions d'HPC per part de SirT1 i PARP-1 (Figura D5). L'increment de la disponibilitat de Suv39h1 en el nucli, s'ha associat amb un augment del recanvi i de la seva mobilitat a l'HPC, assegurant el manteniment d'H3K9me3, augmentant així la protecció genòmica a les regions d'PCH (Bosch-Presegué et al, 2011). Així doncs, la pèrdua de SirT1 en MEFS es relaciona amb nivells menors de Suv39h1 i amb una deslocalització d'H3K9me3 a les regions d'HPC, que conduiria a inestabilitat genòmica, defectes en la segregació cromosòmica i aneuploïdies (Vaquero et al, 2007; Wang et al, 2007; Bosch-Presegué et al, 2011). Tot i que les dades que tenim encara són molt preliminars, proposem que PARP-1 podria tenir un paper antagònic a SirT1 i encarregar-se de controlar l'increment dels nivells Suv39h1 induït per SirT1, per

tal d'aconseguir un balanç adequat dels nivells d'aquesta proteïna. Aquest paper antagonic per part de PARP-1 és coherent amb les observacions que mostren que l'addicional pèrdua de PARP-1 en MEFS delecionades de SirT1, rescata la localització d'H3K9me3 observada a les cèl·lules WT i el fenotip mitòtic normal (El Ramy et al, 2009).

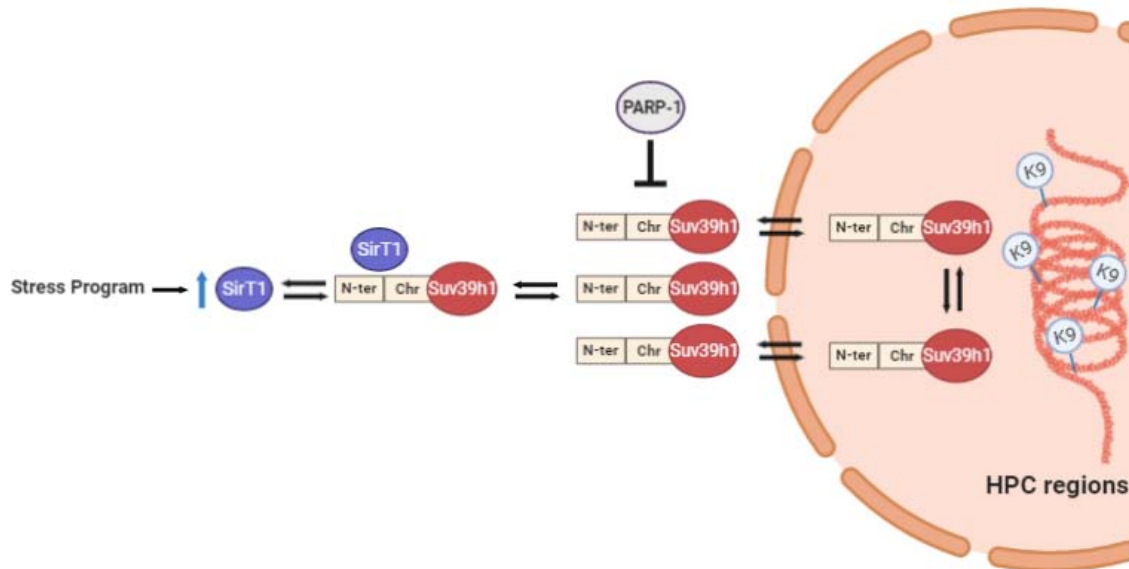


Figura D5. Model proposat per a la regulació de l'estructura de l'HPC per part de SirT1 i PARP-1. Segons aquest model, SirT1 té un paper clau al manteniment de l'estructura de l'HPC, especialment sota condicions d'estrès. En aquestes condicions es produeix un increment dels nivells de SirT1, aquest interacciona amb la part N-terminal i el domini cromosòmic de Suv39h1 i l'estabilitza evitant la poliubiquitinització mediada per MDM2 a la Lys87 del domini cromosòmic, incrementant la seva vida mitjana i augmentant els nivells de proteïna. L'increment de la disponibilitat de Suv39h1 al nucli, assegura el manteniment d'H3K9me3 augmentant així la protecció genòmica a aquestes regions. Proposem que PARP-1 podria tenir un paper compensatori de l'increment dels nivells de Suv39h1 per tornar als nivells basals, un cop finalitzada la situació d'estrès.

Suv39h1 és la principal metiltransferasa d'H3K9me3 a mamífers de manera que té un paper molt important a l'estructura i a la integritat de l'HPC i, és per tant, un enzim clau en l'organització del genoma. Aquesta proteïna es troba involucrada en múltiples processos cel·lulars claus com a la segregació cromosòmica i la progressió mitòtica (Rea et al, 2000; O'carrol et al, 2000). D'aquesta manera, l'estabilització dels nivells de Suv39h1 és molt important per a la preservació de l'estabilitat genòmica. Tot i que alguns autors han suggerit que la sobreexpressió de Suv39h1 indueix alteracions de la proliferació i diferenciació en ratolins (Czvitkovich, 2001), sabem que la seva absència també està associada amb inestabilitat genòmica (Peters et al, 2001). Estudis previs del grup semblen suggerir un gran valor a l'estabilització de Suv39h1, ja que s'ha vist que és crucial per l'increment de la dinàmica i posterior manteniment de l'estructura de

l'heterocromatina i la integritat genòmica especialment sota condicions d'estrès (Bosch-Presegué et al, 2011). Altres estudis donen també suport a la importància de l'estabilització dels nivells de Suv39h1 per prevenir la inestabilitat genòmica. Ha estat descrit que la làmina A, un dels principals components de la làmina nuclear, interactua amb Suv39h1 protegint-lo de la degradació proteosomal. Aquesta estabilització de Suv39h1 sembla estar implicada en la protecció del síndrome de progèria Hutchinson-Gilford causat predominantment per una mutació al gen de la làmina A (Liu et al, 2013). Així doncs, aquests treballs relacionen l'augment dels nivells de Suv39h1 amb l'estabilitat genòmica.

CONCLUSIONS

1. PAPER ESPECÍFIC DE LES ISOFORMES D'HP1 A L'ESTRUCTURA I ORGANITZACIÓ DE L'HPC

1. Les isoformes d'HP1 tenen papers distintius a l'estructura i organització de les regions d'HPC.
2. HP1 α és el gran element estructural de les regions d'HPC en contrast amb les altres dues isoformes.
3. HP1 α té un paper directe en la restricció de les marques d'heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3 als focis.
4. El nostre treball suggereix que la relació d'HP1 α amb H4K20me3 i H3K27me3 és diferent, on la regulació específica d'H4K20me3 sembla estar restringida a una fase concreta del desenvolupament.
5. HP1 α té un paper directe al control de la propagació d'H2A.Z a les regions d'HPC, similar a l'observat per les marques H4K20me3 i H3K27me3.
6. HP1 α col·labora amb CTCF, el regulador principal de l'arquitectura de la cromatina, en l'establiment dels límits entre els diferents dominis cromatínics per tal d'evitar la propagació de les marques d'heterocromatina H4K20me3, H3K27me3 i H2A.Z, per tal de preservar l'eucromatina adjacent.
7. HP1 α interactua amb CTCF i el recluta a regions específiques dins de l'HPC.
8. Tot i encara no estar del tot definida la relació d'H2A.Z respecte HP1 i CTCF, H2A.Z sembla estar implicada en l'establiment dels límits entre els dominis cromatínics.
9. H2A.Z té un paper directe a la restricció de les marques d'heterocromatina H4K20me3, H3K27me3 i H3K9me3 als focis d'HPC.
10. HP1 β sembla tenir un rol oposat a HP1 α a les regions d'HPC.
11. HP1 β es troba més vinculada funcionalment a Suv420h2 que les altres isoformes. És la isoforma que hi interacciona preferencialment i modula la seva dinàmica als foci de l'HPC.
12. HP1 β podria ser la isoforma més implicada al reclutament de Suv420h2 a les regions d'HPC per la formació d'una fibra de cromatina compacta.

13. HP1 β es troba associada funcionalment amb H4K20me3.
14. Els nostres resultats suggereixen un paper d'HP1 β a la restricció de la localització de CTCF a locus específics al genoma.
15. HP1 β és la isoforma que interactua preferencialment amb H2A.Z.
16. HP1 γ sembla tenir un paper més redundat a les altres isoformes amb una funcionalitat a mig camí entre HP1 α i HP1 β a les regions l'HPC.
17. Les tres isoformes d'HP1 semblen tenir papers redundants en relació amb la marca d'heterocromatina H3K9me3 als focis de l'HPC.
18. La pèrdua d'HP1 α indueix una hipercompactació de la cromatina a les regions d'HPC, mentre que la pèrdua d'HP1 β i d'HP1 γ sembla produir una disminució de la compactació.
19. Les isoformes d'HP1 es troben implicades al manteniment de l'estabilitat genòmica a partir de les seves funcions específiques en l'organització de l'HPC.
20. La deleció de cadascuna de les isoformes resulta en un conjunt d'anomalies cromosòmiques determinades. La pèrdua d'HP1 α produeix un augment dels defectes d'adhesió merotèlica i sintèlica, mentre que la pèrdua d'HP1 β resulta en un increment de la formació de fus mitòtics multipolars. La pèrdua d'HP1 γ produeix una barreja de les anomalies trobades a les cèl·lules deficientes en HP1 α i HP1 β .

2. PAPER DE PARP-1 EN EL CONTROL DEL MANTENIMENT DE L'HPC MEDIAT PER SIRT1 I SUV39H1

1. El nostre treball confirma l'antagonisme funcional de SirT1 i PARP-1 respecte els nivells d'H3K9me3 a les regions d'HPC.
2. SirT1 i PARP-1 regulen de manera antagònica els nivells de SirT1, SirT1 té un paper en l'estabilització i increment dels nivells Suv39h1, mentre que PARP-1 sembla tenir un paper contrari compensatori de increment causat per SirT1.

3. La línia cel·lular generada on s'ha *taggejat* el gen Suv39h1 amb flag és una eina molt potent que ens permetrà estudiar en detall la relació de SirT1 i PARP-1 envers Suv39h1.
4. Aquesta línia cel·lular és un bon model per estudiar la localització de Suv3h1 endògen per assaigs d'IF.
5. De la mateixa manera és també un bon model per estudiar l'enriquiment a la cromatina de Suv39h1 endògen a partir de CHIP.

BIBLIOGRAFIA

A

Achrem, M., Szucko, I., & Kalinka, A. (2020). The epigenetic regulation of centromeres and telomeres in plants and animals. *Comp Cytogenet*, *14*(2), 265-311. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v14i2.51895>

Albert, M., & Helin, K. (2010). Histone methyltransferases in cancer. *Semin Cell Dev Biol*, *21*(2), 209-220. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2009.10.007>

Alemasova, E. E., & Lavrik, O. I. (2019). Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucleic Acids Res*, *47*(8), 3811-3827. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz120>

Ali, M., Yan, K., Lalonde, M. E., Degerny, C., Rothbart, S. B., Strahl, B. D., Cote, J., Yang, X. J., & Kutateladze, T. G. (2012). Tandem PHD fingers of MORF/MOZ acetyltransferases display selectivity for acetylated histone H3 and are required for the association with chromatin. *J Mol Biol*, *424*(5), 328-338. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.10.004>

Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat Rev Genet*, *17*(8), 487-500. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>

Allshire, R. C., & Madhani, H. D. (2018). Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *19*(4), 229-244. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.119>

Andor, N., Maley, C. C., & Ji, H. P. (2017). Genomic Instability in Cancer: Teetering on the Limit of Tolerance. *Cancer Res*, *77*(9), 2179-2185. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1553>

Arzate-Mejia, R. G., Recillas-Targa, F., & Corces, V. G. (2018). Developing in 3D: the role of CTCF in cell differentiation. *Development*, *145*(6). <https://doi.org/10.1242/dev.137729>

Aucott, R., Bullwinkel, J., Yu, Y., Shi, W., Billur, M., Brown, J. P., Menzel, U., Kioussis, D., Wang, G., Reiser, I., Weimer, J., Pandita, R. K., Sharma, G. G., Pandita, T. K., Fundele, R., & Singh, P. B. (2008). HP1-beta is required for development of the cerebral neocortex and neuromuscular junctions. *J Cell Biol*, *183*(4), 597-606. <https://doi.org/10.1083/jcb.200804041>

Ausio, J. (2006). Histone variants--the structure behind the function. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 5(3), 228-243. <https://doi.org/10.1093/bfgp/ell020>

Avvakumov, N., Lalonde, M. E., Saksouk, N., Paquet, E., Glass, K. C., Landry, A. J., Doyon, Y., Cayrou, C., Robitaille, G. A., Richard, D. E., Yang, X. J., Kutateladze, T. G., & Cote, J. (2012). Conserved molecular interactions within the HBO1 acetyltransferase complexes regulate cell proliferation. *Mol Cell Biol*, 32(3), 689-703. <https://doi.org/10.1128/MCB.06455-11>

Ayoub, N., Jeyasekharan, A. D., Bernal, J. A., & Venkitaraman, A. R. (2009). Paving the way for H2AX phosphorylation: chromatin changes in the DNA damage response. *Cell Cycle*, 8(10), 1494-1500. <https://doi.org/10.4161/cc.8.10.8501>

B

Bai, L., & Morozov, A. V. (2010). Gene regulation by nucleosome positioning. *Trends Genet*, 26(11), 476-483. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.08.003>

Baldeyron, C., Soria, G., Roche, D., Cook, A. J., & Almouzni, G. (2011). HP1alpha recruitment to DNA damage by p150CAF-1 promotes homologous recombination repair. *J Cell Biol*, 193(1), 81-95. <https://doi.org/10.1083/jcb.201101030>

Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, 21(3), 381-395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>

Bartova, E., Pachernik, J., Harnicarova, A., Kovarik, A., Kovarikova, M., Hofmanova, J., Skalnikova, M., Kozubek, M., & Kozubek, S. (2005). Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J Cell Sci*, 118(Pt 21), 5035-5046. <https://doi.org/10.1242/jcs.02621>

Baudoin, N. C., & Cimini, D. (2018). A guide to classifying mitotic stages and mitotic defects in fixed cells. *Chromosoma*, 127(2), 215-227. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0660-2>

Begin, P., & Nadeau, K. C. (2014). Epigenetic regulation of asthma and allergic disease. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 10(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-10-27>

Benayoun, B. A., Pollina, E. A., & Brunet, A. (2015). Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(10), 593-610. <https://doi.org/10.1038/nrm4048>

- Beneke, S., Cohausz, O., Malanga, M., Boukamp, P., Althaus, F., & Burkle, A. (2008). Rapid regulation of telomere length is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nucleic Acids Res*, *36*(19), 6309-6317. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn615>
- Bhaumik, S. R., Smith, E., & Shilatifard, A. (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol*, *14*(11), 1008-1016. <https://doi.org/10.1038/nsmb1337>
- Binda, O. (2013). On your histone mark, SET, methylate! *Epigenetics*, *8*(5), 457-463. <https://doi.org/10.4161/epi.24451>
- Biterge, B., & Schneider, R. (2014). Histone variants: key players of chromatin. *Cell Tissue Res*, *356*(3), 457-466. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1862-4>
- Black, J. C., & Whetstine, J. R. (2013). Tipping the lysine methylation balance in disease. *Biopolymers*, *99*(2), 127-135. <https://doi.org/10.1002/bip.22136>
- Blanc, R. S., & Richard, S. (2017). Arginine Methylation: The Coming of Age. *Mol Cell*, *65*(1), 8-24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.003>
- Bosch-Presegue, L., Raurell-Vila, H., Marazuela-Duque, A., Kane-Goldsmith, N., Valle, A., Oliver, J., Serrano, L., & Vaquero, A. (2011). Stabilization of Suv39H1 by SirT1 is part of oxidative stress response and ensures genome protection. *Mol Cell*, *42*(2), 210-223. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.034>
- Bosch-Presegue, L., & Vaquero, A. (2011). The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer*, *2*(6), 648-662. <https://doi.org/10.1177/1947601911417862>
- Bosch-Presegue, L., & Vaquero, A. (2014). Sirtuins in stress response: guardians of the genome. *Oncogene*, *33*(29), 3764-3775. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.344>
- Boutant, M., & Canto, C. (2014). SIRT1 metabolic actions: Integrating recent advances from mouse models. *Mol Metab*, *3*(1), 5-18. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.10.006>
- Bulut-Karslioglu, A., Perrera, V., Scaranaro, M., de la Rosa-Velazquez, I. A., van de Nobelen, S., Shukeir, N., Popow, J., Gerle, B., Opravil, S., Pagani, M., Meidhof, S., Brabletz, T., Manke, T., Lachner, M., & Jenuwein, T. (2012). A transcription factor-based mechanism for mouse heterochromatin formation. *Nat Struct Mol Biol*, *19*(10), 1023-1030. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2382>
- Bungard, D., Fuerth, B. J., Zeng, P. Y., Faubert, B., Maas, N. L., Viollet, B., Carling, D., Thompson, C. B., Jones, R. G., & Berger, S. L. (2010). Signaling kinase AMPK

activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation. *Science*, 329(5996), 1201-1205. <https://doi.org/10.1126/science.1191241>

Buschbeck, M., & Hake, S. B. (2017). Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(5), 299-314. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.166>

C

Canto, C., & Auwerx, J. (2012). Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)? *Pharmacol Rev*, 64(1), 166-187. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003905>

Canudas, S., Houghtaling, B. R., Bhanot, M., Sasa, G., Savage, S. A., Bertuch, A. A., & Smith, S. (2011). A role for heterochromatin protein 1gamma at human telomeres. *Genes Dev*, 25(17), 1807-1819. <https://doi.org/10.1101/gad.17325211>

Carone, D. M., & Lawrence, J. B. (2013). Heterochromatin instability in cancer: from the Barr body to satellites and the nuclear periphery. *Semin Cancer Biol*, 23(2), 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.06.008>

Chakravarthy, S., & Luger, K. (2006). The histone variant macro-H2A preferentially forms "hybrid nucleosomes". *J Biol Chem*, 281(35), 25522-25531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602258200>

Chalkiadaki, A., & Guarente, L. (2015). The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nat Rev Cancer*, 15(10), 608-624. <https://doi.org/10.1038/nrc3985>

Chantalat, S., Depaux, A., Hery, P., Barral, S., Thuret, J. Y., Dimitrov, S., & Gerard, M. (2011). Histone H3 trimethylation at lysine 36 is associated with constitutive and facultative heterochromatin. *Genome Res*, 21(9), 1426-1437. <https://doi.org/10.1101/gr.118091.110>

Cheema, M. S., Good, K. V., Kim, B., Soufari, H., O'Sullivan, C., Freeman, M. E., Stefanelli, G., Casas, C. R., Zengeler, K. E., Kennedy, A. J., Eirin Lopez, J. M., Howard, P. L., Zovkic, I. B., Shabanowitz, J., Dryhurst, D. D., Hunt, D. F., Mackereth, C. D., & Ausio, J. (2020). Deciphering the Enigma of the Histone H2A.Z-1/H2A.Z-2 Isoforms: Novel Insights and Remaining Questions. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051167>

Choo, J. H., Kim, J. D., Chung, J. H., Stubbs, L., & Kim, J. (2006). Allele-specific deposition of macroH2A1 in imprinting control regions. *Hum Mol Genet*, *15*(5), 717-724. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi485>

Chowdhury, D., Xu, X., Zhong, X., Ahmed, F., Zhong, J., Liao, J., Dykxhoorn, D. M., Weinstock, D. M., Pfeifer, G. P., & Lieberman, J. (2008). A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Mol Cell*, *31*(1), 33-46. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.016>

Chu, L., Zhu, T., Liu, X., Yu, R., Bacanamwo, M., Dou, Z., Chu, Y., Zou, H., Gibbons, G. H., Wang, D., Ding, X., & Yao, X. (2012). SUV39H1 orchestrates temporal dynamics of centromeric methylation essential for faithful chromosome segregation in mitosis. *J Mol Cell Biol*, *4*(5), 331-340. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs023>

Clapier, C. R., & Cairns, B. R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem*, *78*, 273-304. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223>

Cloos, P. A., Christensen, J., Agger, K., & Helin, K. (2008). Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev*, *22*(9), 1115-1140. <https://doi.org/10.1101/gad.1652908>

Cohen-Armon, M., Visochek, L., Rozensal, D., Kalal, A., Geistrikh, I., Klein, R., Bendetz-Nezer, S., Yao, Z., & Seger, R. (2007). DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol Cell*, *25*(2), 297-308. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.012>

Cook, B. D., Dynek, J. N., Chang, W., Shostak, G., & Smith, S. (2002). Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol*, *22*(1), 332-342. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.1.332-342.2002>

Corujo, D., & Buschbeck, M. (2018). Post-Translational Modifications of H2A Histone Variants and Their Role in Cancer. *Cancers (Basel)*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/cancers10030059>

Cuddapah, S., Jothi, R., Schones, D. E., Roh, T. Y., Cui, K., & Zhao, K. (2009). Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res*, *19*(1), 24-32. <https://doi.org/10.1101/gr.082800.108>

D

Dambacher, S., Hahn, M., & Schotta, G. (2013). The compact view on heterochromatin. *Cell Cycle*, *12*(18), 2925-2926. <https://doi.org/10.4161/cc.26179>

Davenport, A. M., Huber, F. M., & Hoelz, A. (2014). Structural and functional analysis of human SIRT1. *J Mol Biol*, *426*(3), 526-541. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.009>

Di Lorenzo, A., & Bedford, M. T. (2011). Histone arginine methylation. *FEBS Lett*, *585*(13), 2024-2031. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.010>

Dialynas, G. K., Terjung, S., Brown, J. P., Aucott, R. L., Baron-Luhr, B., Singh, P. B., & Georgatos, S. D. (2007). Plasticity of HP1 proteins in mammalian cells. *J Cell Sci*, *120*(Pt 19), 3415-3424. <https://doi.org/10.1242/jcs.012914>

Dialynas, G. K., Vitalini, M. W., & Wallrath, L. L. (2008). Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression. *Mutat Res*, *647*(1-2), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.09.007>

Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C., & Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol*, *6*(8), 227. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-227>

Dixon, J. R., Gorkin, D. U., & Ren, B. (2016). Chromatin Domains: The Unit of Chromosome Organization. *Mol Cell*, *62*(5), 668-680. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.018>

Douglas, P., Zhong, J., Ye, R., Moorhead, G. B., Xu, X., & Lees-Miller, S. P. (2010). Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Mol Cell Biol*, *30*(6), 1368-1381. <https://doi.org/10.1128/MCB.00741-09>

Doyon, Y., & Cote, J. (2004). The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr Opin Genet Dev*, *14*(2), 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.02.009>

Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., & Cote, J. (2004). Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol*, *24*(5), 1884-1896. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.5.1884-1896.2004>

Draizen, E. J., Shaytan, A. K., Marino-Ramirez, L., Talbert, P. B., Landsman, D., & Panchenko, A. R. (2016). HistoneDB 2.0: a histone database with variants--an integrated resource to explore histones and their variants. *Database (Oxford)*, 2016. <https://doi.org/10.1093/database/baw014>

Dryhurst, D., Ishibashi, T., Rose, K. L., Eirin-Lopez, J. M., McDonald, D., Silva-Moreno, B., Veldhoen, N., Helbing, C. C., Hendzel, M. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., & Ausio, J. (2009). Characterization of the histone H2A.Z-1 and H2A.Z-2 isoforms in vertebrates. *BMC Biol*, 7, 86. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-86>

Duan, R., Du, W., & Guo, W. (2020). EZH2: a novel target for cancer treatment. *J Hematol Oncol*, 13(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00937-8>

Dunn, C. J., Sarkar, P., Bailey, E. R., Farris, S., Zhao, M., Ward, J. M., Dudek, S. M., & Saha, R. N. (2017). Histone Hypervariants H2A.Z.1 and H2A.Z.2 Play Independent and Context-Specific Roles in Neuronal Activity-Induced Transcription of Arc/Arg3.1 and Other Immediate Early Genes. *eNeuro*, 4(4). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0040-17.2017>

E

Eirin-Lopez, J. M., Gonzalez-Romero, R., Dryhurst, D., Ishibashi, T., & Ausio, J. (2009). The evolutionary differentiation of two histone H2A.Z variants in chordates (H2A.Z-1 and H2A.Z-2) is mediated by a stepwise mutation process that affects three amino acid residues. *BMC Evol Biol*, 9, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-31>

Eissenberg, J. C., & Shilatifard, A. (2006). Leaving a mark: the many footprints of the elongating RNA polymerase II. *Curr Opin Genet Dev*, 16(2), 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.02.004>

Ekwall, K. (2005). Genome-wide analysis of HDAC function. *Trends Genet*, 21(11), 608-615. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.08.009>

El Ramy, R., Magroun, N., Messadecq, N., Gauthier, L. R., Boussin, F. D., Kolthur-Seetharam, U., Schreiber, V., McBurney, M. W., Sassone-Corsi, P., & Dantzer, F. (2009). Functional interplay between Parp-1 and SirT1 in genome integrity and chromatin-based processes. *Cell Mol Life Sci*, 66(19), 3219-3234. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0105-4>

Enukashvily, N. I., Donev, R., Waisertreiger, I. S., & Podgornaya, O. I. (2007). Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cells. *Cytogenet Genome Res*, 118(1), 42-54. <https://doi.org/10.1159/000106440>

Erdel, F., Krug, J., Langst, G., & Rippe, K. (2011). Targeting chromatin remodelers: signals and search mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1809(9), 497-508. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.06.005>

Eymery, A., Horard, B., El Atifi-Borel, M., Fourel, G., Berger, F., Vitte, A. L., Van den Broeck, A., Brambilla, E., Fournier, A., Callanan, M., Gazzeri, S., Khochbin, S., Rousseaux, S., Gilson, E., & Vourc'h, C. (2009). A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res*, 37(19), 6340-6354. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp639>

F

Fahie, K., Hu, P., Swatkoski, S., Cotter, R. J., Zhang, Y., & Wolberger, C. (2009). Side chain specificity of ADP-ribosylation by a sirtuin. *FEBS J*, 276(23), 7159-7176. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07427.x>

Fan, J. Y., Rangasamy, D., Luger, K., & Tremethick, D. J. (2004). H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1alpha-mediated chromatin fiber folding. *Mol Cell*, 16(4), 655-661. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.023>

Fan, W., & Luo, J. (2010). SIRT1 regulates UV-induced DNA repair through deacetylating XPA. *Mol Cell*, 39(2), 247-258. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.006>

Feil, R., & Berger, F. (2007). Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends Genet*, 23(4), 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.004>

Feldman, J. L., Dittenhafer-Reed, K. E., & Denu, J. M. (2012). Sirtuin catalysis and regulation. *J Biol Chem*, 287(51), 42419-42427. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.378877>

Ferguson, L. R., Chen, H., Collins, A. R., Connell, M., Damia, G., Dasgupta, S., Malhotra, M., Meeker, A. K., Amedei, A., Amin, A., Ashraf, S. S., Aquilano, K., Azmi, A. S., Bhakta, D., Bilsland, A., Boosani, C. S., Chen, S., Ciriolo, M. R., Fujii, H., Guha, G., Halicka, D., Helferich, W. G., Keith, W. N., Mohammed, S. I., Niccolai, E., Yang, X., Honoki, K.,

Parslow, V. R., Prakash, S., Rezazadeh, S., Shackelford, R. E., Sidransky, D., Tran, P. T., Yang, E. S., & Maxwell, C. A. (2015). Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Semin Cancer Biol*, *35 Suppl*, S5-S24. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.005>

Fischer, J. M., Popp, O., Gebhard, D., Veith, S., Fischbach, A., Beneke, S., Leitenstorfer, A., Bergemann, J., Scheffner, M., Ferrando-May, E., Mangerich, A., & Burkle, A. (2014). Poly(ADP-ribose)-mediated interplay of XPA and PARP1 leads to reciprocal regulation of protein function. *FEBS J*, *281*(16), 3625-3641. <https://doi.org/10.1111/febs.12885>

Fischle, W., Franz, H., Jacobs, S. A., Allis, C. D., & Khorasanizadeh, S. (2008). Specificity of the chromodomain Y chromosome family of chromodomains for lysine-methylated ARK(S/T) motifs. *J Biol Chem*, *283*(28), 19626-19635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802655200>

Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Funabiki, H., & Allis, C. D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, *438*(7071), 1116-1122. <https://doi.org/10.1038/nature04219>

Ford, J., Ahmed, S., Allison, S., Jiang, M., & Milner, J. (2008). JNK2-dependent regulation of SIRT1 protein stability. *Cell Cycle*, *7*(19), 3091-3097. <https://doi.org/10.4161/cc.7.19.6799>

Fortuny, A., & Polo, S. E. (2018). The response to DNA damage in heterochromatin domains. *Chromosoma*, *127*(3), 291-300. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0669-6>

Foster, E. R., & Downs, J. A. (2005). Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J*, *272*(13), 3231-3240. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04741.x>

Frescas, D., Valenti, L., & Accili, D. (2005). Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem*, *280*(21), 20589-20595. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412357200>

Fritsch, L., Robin, P., Mathieu, J. R., Souidi, M., Hinaux, H., Rougeulle, C., Harel-Bellan, A., Ameyar-Zazoua, M., & Ait-Si-Ali, S. (2010). A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 participate in a

multimeric complex. *Mol Cell*, 37(1), 46-56.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.017>

Fuks, F., Hurd, P. J., Deplus, R., & Kouzarides, T. (2003). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, 31(9), 2305-2312.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg332>

Fukuto, A., Ikura, M., Ikura, T., Sun, J., Horikoshi, Y., Shima, H., Igarashi, K., Kusakabe, M., Harata, M., Horikoshi, N., Kurumizaka, H., Kiuchi, Y., & Tashiro, S. (2018). SUMO modification system facilitates the exchange of histone variant H2A.Z-2 at DNA damage sites. *Nucleus*, 9(1), 87-94.
<https://doi.org/10.1080/19491034.2017.1395543>

Fulco, M., Schiltz, R. L., Iezzi, S., King, M. T., Zhao, P., Kashiwaya, Y., Hoffman, E., Veech, R. L., & Sartorelli, V. (2003). Sir2 Regulates Skeletal Muscle Differentiation as a Potential Sensor of the Redox State. *Molecular Cell*, 12(1), 51-62.
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00226-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00226-0)

G

Garcia-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A. H., Jenuwein, T., & Blasco, M. A. (2004). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet*, 36(1), 94-99.
<https://doi.org/10.1038/ng1278>

Gaiimo, B. D., Ferrante, F., Herchenrother, A., Hake, S. B., & Borggreffe, T. (2019). The histone variant H2A.Z in gene regulation. *Epigenetics Chromatin*, 12(1), 37.
<https://doi.org/10.1186/s13072-019-0274-9>

Gillette, T. G., & Hill, J. A. (2015). Readers, writers, and erasers: chromatin as the whiteboard of heart disease. *Circ Res*, 116(7), 1245-1253.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303630>

Gonzalo, S., Jaco, I., Fraga, M. F., Chen, T., Li, E., Esteller, M., & Blasco, M. A. (2006). DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 8(4), 416-424. <https://doi.org/10.1038/ncb1386>

Gorisch, S. M., Wachsmuth, M., Toth, K. F., Lichter, P., & Rippe, K. (2005). Histone acetylation increases chromatin accessibility. *J Cell Sci*, 118(Pt 24), 5825-5834.
<https://doi.org/10.1242/jcs.02689>

Greer, E. L., & Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet*, 13(5), 343-357. <https://doi.org/10.1038/nrg3173>

Gregan, J., Riedel, C. G., Pidoux, A. L., Katou, Y., Rumpf, C., Schleiffer, A., Kearsey, S. E., Shirahige, K., Allshire, R. C., & Nasmyth, K. (2007). The kinetochore proteins Pcs1 and Mde4 and heterochromatin are required to prevent merotelic orientation. *Curr Biol*, 17(14), 1190-1200. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.044>

Grewal, S. I., & Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*, 8(1), 35-46. <https://doi.org/10.1038/nrg2008>

Guarente, L., & Picard, F. (2005). Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell*, 120(4), 473-482. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.029>

Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*, 130(1), 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.042>

Guo, X., Williams, J. G., Schug, T. T., & Li, X. (2010). DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1. *J Biol Chem*, 285(17), 13223-13232. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.102574>

H

Hahn, M., Dambacher, S., Dulev, S., Kuznetsova, A. Y., Eck, S., Worz, S., Sadic, D., Schulte, M., Mallm, J. P., Maiser, A., Debs, P., von Melchner, H., Leonhardt, H., Schermelleh, L., Rohr, K., Rippe, K., Storchova, Z., & Schotta, G. (2013). Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin. *Genes Dev*, 27(8), 859-872. <https://doi.org/10.1101/gad.210377.112>

Hahn, M., Dambacher, S., Dulev, S., Kuznetsova, A. Y., Eck, S., Worz, S., Sadic, D., Schulte, M., Mallm, J. P., Maiser, A., Debs, P., von Melchner, H., Leonhardt, H., Schermelleh, L., Rohr, K., Rippe, K., Storchova, Z., & Schotta, G. (2013). Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin. *Genes Dev*, 27(8), 859-872. <https://doi.org/10.1101/gad.210377.112>

Hahn, M., Dambacher, S., Dulev, S., Kuznetsova, A. Y., Eck, S., Worz, S., Sadic, D., Schulte, M., Mallm, J. P., Maiser, A., Debs, P., von Melchner, H., Leonhardt, H., Schermelleh, L., Rohr, K., Rippe, K., Storchova, Z., & Schotta, G. (2013). Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin. *Genes Dev*, 27(8), 859-872. <https://doi.org/10.1101/gad.210377.112>

Haigis, M. C., Mostoslavsky, R., Haigis, K. M., Fahie, K., Christodoulou, D. C., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Karow, M., Blander, G., Wolberger, C., Prolla, T. A., Weindruch, R., Alt, F. W., & Guarente, L. (2006). SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*, 126(5), 941-954. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.057>

Haldar, S., Saini, A., Nanda, J. S., Saini, S., & Singh, J. (2011). Role of Swi6/HP1 self-association-mediated recruitment of Clr4/Suv39 in establishment and maintenance of heterochromatin in fission yeast. *J Biol Chem*, 286(11), 9308-9320. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143198>

Hall, L. E., Mitchell, S. E., & O'Neill, R. J. (2012). Pericentric and centromeric transcription: a perfect balance required. *Chromosome Res*, 20(5), 535-546. <https://doi.org/10.1007/s10577-012-9297-9>

Hansen, J. C. (2002). Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31, 361-392. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.31.101101.140858>

Hargreaves, D. C., & Crabtree, G. R. (2011). ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res*, 21(3), 396-420. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.32>

Harmeyer, K. M., Facompre, N. D., Herlyn, M., & Basu, D. (2017). JARID1 Histone Demethylases: Emerging Targets in Cancer. *Trends Cancer*, 3(10), 713-725. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.08.004>

Hassan, A. H., Awad, S., Al-Natour, Z., Othman, S., Mustafa, F., & Rizvi, T. A. (2007). Selective recognition of acetylated histones by bromodomains in transcriptional co-activators. *Biochem J*, 402(1), 125-133. <https://doi.org/10.1042/BJ20060907>

Hawse, W. F., & Wolberger, C. (2009). Structure-based mechanism of ADP-ribosylation by sirtuins. *J Biol Chem*, 284(48), 33654-33661. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024521>

Hayakawa, T., Haraguchi, T., Masumoto, H., & Hiraoka, Y. (2003). Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase. *J Cell Sci*, 116(Pt 16), 3327-3338. <https://doi.org/10.1242/jcs.00635>

Hayakawa, T., & Nakayama, J. (2011). Physiological roles of class I HDAC complex and histone demethylase. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 129383. <https://doi.org/10.1155/2011/129383>

He, W., Newman, J. C., Wang, M. Z., Ho, L., & Verdin, E. (2012). Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 23(9), 467-476. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.07.004>

He, Y., Korboukh, I., Jin, J., & Huang, J. (2012). Targeting protein lysine methylation and demethylation in cancers. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 44(1), 70-79. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr109>

Henikoff, S., & Smith, M. M. (2015). Histone variants and epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(1), a019364. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019364>

Herold, M., Bartkuhn, M., & Renkawitz, R. (2012). CTCF: insights into insulator function during development. *Development*, 139(6), 1045-1057. <https://doi.org/10.1242/dev.065268>

Hiragami-Hamada, K., Shinmyozu, K., Hamada, D., Tatsu, Y., Uegaki, K., Fujiwara, S., & Nakayama, J. (2011). N-terminal phosphorylation of HP1{alpha} promotes its chromatin binding. *Mol Cell Biol*, 31(6), 1186-1200. <https://doi.org/10.1128/MCB.01012-10>

Hiragami-Hamada, K., Soeroes, S., Nikolov, M., Wilkins, B., Kreuz, S., Chen, C., De La Rosa-Velazquez, I. A., Zenn, H. M., Kost, N., Pohl, W., Chernev, A., Schwarzer, D., Jenuwein, T., Lorincz, M., Zimmermann, B., Walla, P. J., Neumann, H., Baubec, T., Urlaub, H., & Fischle, W. (2016). Dynamic and flexible H3K9me3 bridging via HP1beta dimerization establishes a plastic state of condensed chromatin. *Nat Commun*, 7, 11310. <https://doi.org/10.1038/ncomms11310>

Holliday, R. (2006). Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*, 1(2), 76-80. <https://doi.org/10.4161/epi.1.2.2762>

Holwerda, S. J., & de Laat, W. (2013). CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368(1620), 20120369. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0369>

Hood, L., & Galas, D. (2003). The digital code of DNA. *Nature*, 421(6921), 444-448. <https://doi.org/10.1038/nature01410>

Huang, H., Sabari, B. R., Garcia, B. A., Allis, C. D., & Zhao, Y. (2014). SnapShot: histone modifications. *Cell*, 159(2), 458-458 e451. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.037>

Hubner, M. R., Eckersley-Maslin, M. A., & Spector, D. L. (2013). Chromatin organization and transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 23(2), 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.11.006>

Hubner, M. R., Eckersley-Maslin, M. A., & Spector, D. L. (2013). Chromatin organization and transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 23(2), 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.11.006>

Husmann, D., & Gozani, O. (2019). Histone lysine methyltransferases in biology and disease. *Nat Struct Mol Biol*, 26(10), 880-889. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0298-7>

Hyun, K., Jeon, J., Park, K., & Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp Mol Med*, 49(4), e324. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>

I

Iwahara, T., Bonasio, R., Narendra, V., & Reinberg, D. (2012). SIRT3 functions in the nucleus in the control of stress-related gene expression. *Mol Cell Biol*, 32(24), 5022-5034. <https://doi.org/10.1128/MCB.00822-12>

Iwase, S., Xiang, B., Ghosh, S., Ren, T., Lewis, P. W., Cochrane, J. C., Allis, C. D., Picketts, D. J., Patel, D. J., Li, H., & Shi, Y. (2011). ATRX ADD domain links an atypical histone methylation recognition mechanism to human mental-retardation syndrome. *Nat Struct Mol Biol*, 18(7), 769-776. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2062>

Izzo, A., & Schneider, R. (2016). The role of linker histone H1 modifications in the regulation of gene expression and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta*, 1859(3), 486-495. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.09.003>

J

Janssen, A., Colmenares, S. U., & Karpen, G. H. (2018). Heterochromatin: Guardian of the Genome. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 34, 265-288. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062653>

Jiang, G., Yang, F., Sanchez, C., & Ehrlich, M. (2004). Histone modification in constitutive heterochromatin versus unexpressed euchromatin in human cells. *J Cell Biochem*, 93(2), 286-300. <https://doi.org/10.1002/jcb.20146>

Jiang, W., Zhang, X., Hao, J., Shen, J., Fang, J., Dong, W., Wang, D., Zhang, X., Shui, W., Luo, Y., Lin, L., Qiu, Q., Liu, B., & Hu, Z. (2014). SIRT1 protects against apoptosis by promoting autophagy in degenerative human disc nucleus pulposus cells. *Sci Rep*, 4, 7456. <https://doi.org/10.1038/srep07456>

Jolly, C., Metz, A., Govin, J., Vigneron, M., Turner, B. M., Khochbin, S., & Vourc'h, C. (2004). Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol*, 164(1), 25-33. <https://doi.org/10.1083/jcb.200306104>

Jorgensen, S., Schotta, G., & Sorensen, C. S. (2013). Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res*, 41(5), 2797-2806. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt012>

Juarez-Vicente, F., Luna-Pelaez, N., & Garcia-Dominguez, M. (2016). The Sumo protease Senp7 is required for proper neuronal differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1863(7 Pt A), 1490-1498. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.03.028>

K

Kadamb, R., Mittal, S., Bansal, N., Batra, H., & Saluja, D. (2013). Sin3: insight into its transcription regulatory functions. *Eur J Cell Biol*, 92(8-9), 237-246. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.09.001>

Kalhor, R., Tjong, H., Jayathilaka, N., Alber, F., & Chen, L. (2011). Genome architectures revealed by tethered chromosome conformation capture and population-based modeling. *Nat Biotechnol*, 30(1), 90-98. <https://doi.org/10.1038/nbt.2057>

Kanwal, R., & Gupta, S. (2012). Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet*, 81(4), 303-311. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01809.x>

Kaustov, L., Ouyang, H., Amaya, M., Lemak, A., Nady, N., Duan, S., Wasney, G. A., Li, Z., Vedadi, M., Schapira, M., Min, J., & Arrowsmith, C. H. (2011). Recognition and specificity determinants of the human cbx chromodomains. *J Biol Chem*, *286*(1), 521-529. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.191411>

Kellum, R. (2003). Is HP1 an RNA detector that functions both in repression and activation? *J Cell Biol*, *161*(4), 671-672. <https://doi.org/10.1083/jcb.200304145>

Kim, S., Yu, N. K., & Kaang, B. K. (2015). CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. *Exp Mol Med*, *47*, e166. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.33>

Kind, J., Pagie, L., de Vries, S. S., Nahidiazar, L., Dey, S. S., Bienko, M., Zhan, Y., Lajoie, B., de Graaf, C. A., Amendola, M., Fudenberg, G., Imaev, M., Mirny, L. A., Jalink, K., Dekker, J., van Oudenaarden, A., & van Steensel, B. (2015). Genome-wide maps of nuclear lamina interactions in single human cells. *Cell*, *163*(1), 134-147. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.040>

Klose, R. J., Kallin, E. M., & Zhang, Y. (2006). JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet*, *7*(9), 715-727. <https://doi.org/10.1038/nrg1945>

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, *128*(4), 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

Krouwels, I. M., Wiesmeijer, K., Abraham, T. E., Molenaar, C., Verwoerd, N. P., Tanke, H. J., & Dirks, R. W. (2005). A glue for heterochromatin maintenance: stable SUV39H1 binding to heterochromatin is reinforced by the SET domain. *J Cell Biol*, *170*(4), 537-549. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502154>

Kruithof, M., Chien, F. T., Routh, A., Logie, C., Rhodes, D., & van Noort, J. (2009). Single-molecule force spectroscopy reveals a highly compliant helical folding for the 30-nm chromatin fiber. *Nat Struct Mol Biol*, *16*(5), 534-540. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1590>

Kumar, A., & Kono, H. (2020). Heterochromatin protein 1 (HP1): interactions with itself and chromatin components. *Biophys Rev*, *12*(2), 387-400. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00663-y>

Kwon, S. H., & Workman, J. L. (2011). HP1c casts light on dark matter. *Cell Cycle*, *10*(4), 625-630. <https://doi.org/10.4161/cc.10.4.14796>

L

Lan, F., Cacicedo, J. M., Ruderman, N., & Ido, Y. (2008). SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, *283*(41), 27628-27635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805711200>

Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Noh, K. M., Stadler, S. C., & Allis, C. D. (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(32), 14075-14080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008850107>

Li, X. (2013). SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, *45*(1), 51-60. <https://doi.org/10.1093/abbs/gms108>

Li, Z., Chen, L., Kabra, N., Wang, C., Fang, J., & Chen, J. (2009). Inhibition of SUV39H1 methyltransferase activity by DBC1. *J Biol Chem*, *284*(16), 10361-10366. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900956200>

Lin, Z., & Fang, D. (2013). The Roles of SIRT1 in Cancer. *Genes Cancer*, *4*(3-4), 97-104. <https://doi.org/10.1177/1947601912475079>

Liu, B., Wang, Z., Zhang, L., Ghosh, S., Zheng, H., & Zhou, Z. (2013). Depleting the methyltransferase Suv39h1 improves DNA repair and extends lifespan in a progeria mouse model. *Nat Commun*, *4*, 1868. <https://doi.org/10.1038/ncomms2885>

Llères, D., James, J., Swift, S., Norman, D. G., & Lamond, A. I. (2009). Quantitative analysis of chromatin compaction in living cells using FLIM-FRET. *J Cell Biol*, *187*(4), 481-496. <https://doi.org/10.1083/jcb.200907029>

Lombard, D. B., Alt, F. W., Cheng, H. L., Bunkenborg, J., Streeper, R. S., Mostoslavsky, R., Kim, J., Yancopoulos, G., Valenzuela, D., Murphy, A., Yang, Y., Chen, Y., Hirschey, M. D., Bronson, R. T., Haigis, M., Guarente, L. P., Farese, R. V., Jr., Weissman, S., Verdin, E., & Schwer, B. (2007). Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol*, *27*(24), 8807-8814. <https://doi.org/10.1128/MCB.01636-07>

Lomberk, G., Bensi, D., Fernandez-Zapico, M. E., & Urrutia, R. (2006). Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nat Cell Biol*, *8*(4), 407-415. <https://doi.org/10.1038/ncb1383>

Lomberk, G., Wallrath, L., & Urrutia, R. (2006). The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol*, 7(7), 228. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-7-228>

Loyola, A., Tagami, H., Bonaldi, T., Roche, D., Quivy, J. P., Imhof, A., Nakatani, Y., Dent, S. Y., & Almouzni, G. (2009). The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep*, 10(7), 769-775. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.90>

M

Macurek, L., Lindqvist, A., Voets, O., Kool, J., Vos, H. R., & Medema, R. H. (2010). Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene*, 29(15), 2281-2291. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.501>

Maeshima, K., Imai, R., Tamura, S., & Nozaki, T. (2014). Chromatin as dynamic 10-nm fibers. *Chromosoma*, 123(3), 225-237. <https://doi.org/10.1007/s00412-014-0460-2>

Maison, C., & Almouzni, G. (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(4), 296-304. <https://doi.org/10.1038/nrm1355>

Maison, C., Bailly, D., Peters, A. H., Quivy, J. P., 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. *Nat Genet*, 30(3), 329-334. <https://doi.org/10.1038/ng843>

Maison, C., Bailly, D., Roche, D., Montes de Oca, R., Probst, A. V., Vassias, I., Dingli, F., Lombard, B., Loew, D., Quivy, J. P., & Almouzni, G. (2011). SUMOylation promotes de novo targeting of HP1alpha to pericentric heterochromatin. *Nat Genet*, 43(3), 220-227. <https://doi.org/10.1038/ng.765>

Martens, J. H., O'Sullivan, R. J., Braunschweig, U., Opravil, S., Radolf, M., Steinlein, P., & Jenuwein, T. (2005). The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J*, 24(4), 800-812. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600545>

Martin, C., & Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(11), 838-849. <https://doi.org/10.1038/nrm1761>

Martinez-Redondo, P., & Vaquero, A. (2013). The diversity of histone versus nonhistone sirtuin substrates. *Genes Cancer*, 4(3-4), 148-163. <https://doi.org/10.1177/1947601913483767>

Marzluff, W. F., Gongidi, P., Woods, K. R., Jin, J., & Maltais, L. J. (2002). The Human and Mouse Replication-Dependent Histone Genes. *Genomics*, 80(5), 487-498. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6850>

Maslov, A. Y., & Vijg, J. (2009). Genome instability, cancer and aging. *Biochim Biophys Acta*, 1790(10), 963-969. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.020>

Matarazzo, M. R., De Bonis, M. L., Vacca, M., Della Ragione, F., & D'Esposito, M. (2009). Lessons from two human chromatin diseases, ICF syndrome and Rett syndrome. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(1), 117-126. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.07.026>

Matsuda, R., Hori, T., Kitamura, H., Takeuchi, K., Fukagawa, T., & Harata, M. (2010). Identification and characterization of the two isoforms of the vertebrate H2A.Z histone variant. *Nucleic Acids Res*, 38(13), 4263-4273. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq171>

McGinty, R. K., & Tan, S. (2015). Nucleosome structure and function. *Chem Rev*, 115(6), 2255-2273. <https://doi.org/10.1021/cr500373h>

Meder, V. S., Boeglin, M., de Murcia, G., & Schreiber, V. (2005). PARP-1 and PARP-2 interact with nucleophosmin/B23 and accumulate in transcriptionally active nucleoli. *J Cell Sci*, 118(Pt 1), 211-222. <https://doi.org/10.1242/jcs.01606>

Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Muller, J. M., Schneider, R., Peters, A. H., Gunther, T., Buettner, R., & Schule, R. (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*, 437(7057), 436-439. <https://doi.org/10.1038/nature04020>

Metzger, E., Yin, N., Wissmann, M., Kunowska, N., Fischer, K., Friedrichs, N., Patnaik, D., Higgins, J. M., Potier, N., Scheidtmann, K. H., Buettner, R., & Schule, R. (2008). Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation. *Nat Cell Biol*, 10(1), 53-60. <https://doi.org/10.1038/ncb1668>

Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T. K., Koche, R. P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C., Lander, E. S., & Bernstein, B. E. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in

pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 448(7153), 553-560. <https://doi.org/10.1038/nature06008>

Mishima, Y., Watanabe, M., Kawakami, T., Jayasinghe, C. D., Otani, J., Kikugawa, Y., Shirakawa, M., Kimura, H., Nishimura, O., Aimoto, S., Tajima, S., & Suetake, I. (2013). Hinge and chromoshadow of HP1alpha participate in recognition of K9 methylated histone H3 in nucleosomes. *J Mol Biol*, 425(1), 54-70. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.10.018>

Mobley, A. S. (2019). Induced Pluripotent Stem Cells. In *Neural Stem Cells and Adult Neurogenesis* (pp. 67-94). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811014-0.00004-4>

Morishita, M., & di Luccio, E. (2011). Cancers and the NSD family of histone lysine methyltransferases. *Biochim Biophys Acta*, 1816(2), 158-163. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.05.004>

Mosch, K., Franz, H., Soeroes, S., Singh, P. B., & Fischle, W. (2011). HP1 recruits activity-dependent neuroprotective protein to H3K9me3 marked pericentromeric heterochromatin for silencing of major satellite repeats. *PLoS One*, 6(1), e15894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015894>

Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M. M., Mills, K. D., Patel, P., Hsu, J. T., Hong, A. L., Ford, E., Cheng, H. L., Kennedy, C., Nunez, N., Bronson, R., Frendewey, D., Auerbach, W., Valenzuela, D., Karow, M., Hottiger, M. O., Hursting, S., Barrett, J. C., Guarente, L., Mulligan, R., Demple, B., Yancopoulos, G. D., & Alt, F. W. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, 124(2), 315-329. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.044>

Mozzetta, C., Pontis, J., Fritsch, L., Robin, P., Portoso, M., Proux, C., Margueron, R., & Ait-Si-Ali, S. (2014). The histone H3 lysine 9 methyltransferases G9a and GLP regulate polycomb repressive complex 2-mediated gene silencing. *Mol Cell*, 53(2), 277-289. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.005>

Munari, F., Soeroes, S., Zenn, H. M., Schomburg, A., Kost, N., Schroder, S., Klingberg, R., Rezaei-Ghaleh, N., Stutzer, A., Gelato, K. A., Walla, P. J., Becker, S., Schwarzer, D., Zimmermann, B., Fischle, W., & Zweckstetter, M. (2012). Methylation of lysine 9 in histone H3 directs alternative modes of highly dynamic interaction of heterochromatin protein hHP1beta with the nucleosome. *J Biol Chem*, 287(40), 33756-33765. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.390849>

Murakami, Y. (2013). Histone deacetylases govern heterochromatin in every phase. *EMBO J*, 32(17), 2301-2303. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.154>

Murayama, A., Ohmori, K., Fujimura, A., Minami, H., Yasuzawa-Tanaka, K., Kuroda, T., Oie, S., Daitoku, H., Okuwaki, M., Nagata, K., Fukamizu, A., Kimura, K., Shimizu, T., & Yanagisawa, J. (2008). Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell*, 133(4), 627-639. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.030>

N

Nagy, Z., & Tora, L. (2007). Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene*, 26(37), 5341-5357. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210604>

Narala, S. R., Allsopp, R. C., Wells, T. B., Zhang, G., Prasad, P., Coussens, M. J., Rossi, D. J., Weissman, I. L., & Vaziri, H. (2008). SIRT1 acts as a nutrient-sensitive growth suppressor and its loss is associated with increased AMPK and telomerase activity. *Mol Biol Cell*, 19(3), 1210-1219. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-09-0965>

Nekrasov, M., Amrichova, J., Parker, B. J., Soboleva, T. A., Jack, C., Williams, R., Huttley, G. A., & Tremethick, D. J. (2012). Histone H2A.Z inheritance during the cell cycle and its impact on promoter organization and dynamics. *Nat Struct Mol Biol*, 19(11), 1076-1083. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2424>

Nishibuchi, G., & Dejardin, J. (2017). The molecular basis of the organization of repetitive DNA-containing constitutive heterochromatin in mammals. *Chromosome Res*, 25(1), 77-87. <https://doi.org/10.1007/s10577-016-9547-3>

Nowak, S. J., & Corces, V. G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet*, 20(4), 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.02.007>

Nusinow, D. A., Hernandez-Munoz, I., Fazzio, T. G., Shah, G. M., Kraus, W. L., & Panning, B. (2007). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 is inhibited by a histone H2A variant, MacroH2A, and contributes to silencing of the inactive X chromosome. *J Biol Chem*, 282(17), 12851-12859. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610502200>

O

Oehme, I., Linke, J. P., Bock, B. C., Milde, T., Lodrini, M., Hartenstein, B., Wiegand, I., Eckert, C., Roth, W., Kool, M., Kaden, S., Grone, H. J., Schulte, J. H., Lindner, S., Hamacher-Brady, A., Brady, N. R., Deubzer, H. E., & Witt, O. (2013). Histone deacetylase 10 promotes autophagy-mediated cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(28), E2592-2601. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300113110>

Ohlsson, R., Lobanenkov, V., & Klenova, E. (2010). Does CTCF mediate between nuclear organization and gene expression? *Bioessays*, *32*(1), 37-50. <https://doi.org/10.1002/bies.200900118>

Okano, S., Lan, L., Caldecott, K. W., Mori, T., & Yasui, A. (2003). Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Mol Cell Biol*, *23*(11), 3974-3981. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.11.3974-3981.2003>

Ouararhni, K., Hadj-Slimane, R., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Mietton, F., Harel-Bellan, A., Dimitrov, S., & Hamiche, A. (2006). The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity. *Genes Dev*, *20*(23), 3324-3336. <https://doi.org/10.1101/gad.396106>

P

Paik, W. K., Paik, D. C., & Kim, S. (2007). Historical review: the field of protein methylation. *Trends Biochem Sci*, *32*(3), 146-152. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.01.006>

Papamichos-Chronakis, M., & Peterson, C. L. (2013). Chromatin and the genome integrity network. *Nat Rev Genet*, *14*(1), 62-75. <https://doi.org/10.1038/nrg3345>

Peters, A. H., Mermoud, J. E., O'Carroll, D., Pagani, M., Schweizer, D., Brockdorff, N., & Jenuwein, T. (2002). Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet*, *30*(1), 77-80. <https://doi.org/10.1038/ng789>

Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., McBurney, M. W., & Guarente, L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*, *429*(6993), 771-776. <https://doi.org/10.1038/nature02583>

Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S. K., Cao, R., Worringer, K. A., Wang, H., de la Cruz, C. C., Otte, A. P., Panning, B., & Zhang, Y. (2003). Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*, *300*(5616), 131-135. <https://doi.org/10.1126/science.1084274>

Pleschke, J. M., Kleczkowska, H. E., Strohm, M., & Althaus, F. R. (2000). Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem*, *275*(52), 40974-40980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006520200>

Pokholok, D. K., Harbison, C. T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N. M., Lee, T. I., Bell, G. W., Walker, K., Rolfe, P. A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D. K., & Young, R. A. (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, *122*(4), 517-527. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.026>

Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*, *28*(10), 1057-1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>

Probst, A. V., & Almouzni, G. (2008). Pericentric heterochromatin: dynamic organization during early development in mammals. *Differentiation*, *76*(1), 15-23. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00220.x>

Pusarla, R. H., & Bhargava, P. (2005). Histones in functional diversification. Core histone variants. *FEBS J*, *272*(20), 5149-5168. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04930.x>

Q

Quenet, D., El Ramy, R., Schreiber, V., & Dantzer, F. (2009). The role of poly(ADP-ribosyl)ation in epigenetic events. *Int J Biochem Cell Biol*, *41*(1), 60-65. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.07.023>

Quenet, D., Gasser, V., Fouillen, L., Cammas, F., Sanglier-Cianferani, S., Losson, R., & Dantzer, F. (2008). The histone subcode: poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor TIF1beta and the heterochromatin protein HP1alpha. *FASEB J*, *22*(11), 3853-3865. <https://doi.org/10.1096/fj.08-113464>

R

Rajendran, R., Garva, R., Krstic-Demonacos, M., & Demonacos, C. (2011). Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 368276. <https://doi.org/10.1155/2011/368276>

Rangasamy, D., Greaves, I., & Tremethick, D. J. (2004). RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol*, 11(7), 650-655. <https://doi.org/10.1038/nsmb786>

Rardin, M. J., He, W., Nishida, Y., Newman, J. C., Carrico, C., Danielson, S. R., Guo, A., Gut, P., Sahu, A. K., Li, B., Uppala, R., Fitch, M., Riiff, T., Zhu, L., Zhou, J., Mulhern, D., Stevens, R. D., Ilkayeva, O. R., Newgard, C. B., Jacobson, M. P., Hellerstein, M., Goetzman, E. S., Gibson, B. W., & Verdin, E. (2013). SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks. *Cell Metab*, 18(6), 920-933. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.013>

Raurell-Vila, H., Bosch-Presegue, L., Gonzalez, J., Kane-Goldsmith, N., Casal, C., Brown, J. P., Marazuela-Duque, A., Singh, P. B., Serrano, L., & Vaquero, A. (2017). An HP1 isoform-specific feedback mechanism regulates Suv39h1 activity under stress conditions. *Epigenetics*, 12(2), 166-175. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1278096>

Rivera, C., Saavedra, F., Alvarez, F., Diaz-Celis, C., Ugalde, V., Li, J., Forne, I., Gurard-Levin, Z. A., Almouzni, G., Imhof, A., & Loyola, A. (2015). Methylation of histone H3 lysine 9 occurs during translation. *Nucleic Acids Res*, 43(19), 9097-9106. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv929>

Rizzi, N., Denegri, M., Chiodi, I., Corioni, M., Valgardsdottir, R., Cobiauchi, F., Riva, S., & Biamonti, G. (2004). Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock. *Mol Biol Cell*, 15(2), 543-551. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-07-0487>

Rodriguez, A., & Bjerling, P. (2013). The links between chromatin spatial organization and biological function. *Biochem Soc Trans*, 41(6), 1634-1639. <https://doi.org/10.1042/BST20130213>

Rouleau, M., Aubin, R. A., & Poirier, G. G. (2004). Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J Cell Sci*, 117(Pt 6), 815-825. <https://doi.org/10.1242/jcs.01080>

Rowbotham, S. P., Barki, L., Neves-Costa, A., Santos, F., Dean, W., Hawkes, N., Choudhary, P., Will, W. R., Webster, J., Oxley, D., Green, C. M., Varga-Weisz, P., & Mermoud, J. E. (2011). Maintenance of silent chromatin through replication requires SWI/SNF-like chromatin remodeler SMARCAD1. *Mol Cell*, *42*(3), 285-296. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.036>

Ryan, D. P., & Tremethick, D. J. (2018). The interplay between H2A.Z and H3K9 methylation in regulating HP1alpha binding to linker histone-containing chromatin. *Nucleic Acids Res*, *46*(18), 9353-9366. <https://doi.org/10.1093/nar/gky632>

S

Sales-Gil, R., & Vagnarelli, P. (2020). How HP1 Post-Translational Modifications Regulate Heterochromatin Formation and Maintenance. *Cells*, *9*(6). <https://doi.org/10.3390/cells9061460>

Santenard, A., Ziegler-Birling, C., Koch, M., Tora, L., Bannister, A. J., & Torres-Padilla, M. E. (2010). Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat Cell Biol*, *12*(9), 853-862. <https://doi.org/10.1038/ncb2089>

Sasaki, T., Maier, B., Koclega, K. D., Chruszcz, M., Gluba, W., Stukenberg, P. T., Minor, W., & Scoble, H. (2008). Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoS One*, *3*(12), e4020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004020>

Saunders, L. R., & Verdin, E. (2007). Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*, *26*(37), 5489-5504. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210616>

Savic, D., Partridge, E. C., Newberry, K. M., Smith, S. B., Meadows, S. K., Roberts, B. S., Mackiewicz, M., Mendenhall, E. M., & Myers, R. M. (2015). CETCh-seq: CRISPR epitope tagging ChIP-seq of DNA-binding proteins. *Genome Res*, *25*(10), 1581-1589. <https://doi.org/10.1101/gr.193540.115>

Saxena, A., Saffery, R., Wong, L. H., Kalitsis, P., & Choo, K. H. (2002). Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *J Biol Chem*, *277*(30), 26921-26926. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200620200>

Schmiedeberg, L., Weisshart, K., Diekmann, S., Meyer Zu Hoerste, G., & Hemmerich, P. (2004). High- and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin of mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 15(6), 2819-2833. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-11-0827>

Schmiedeberg, L., Weisshart, K., Diekmann, S., Meyer Zu Hoerste, G., & Hemmerich, P. (2004). High- and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin of mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 15(6), 2819-2833. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-11-0827>

Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., & Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev*, 18(11), 1251-1262. <https://doi.org/10.1101/gad.300704>

Schotta, G., Sengupta, R., Kubicek, S., Malin, S., Kauer, M., Callen, E., Celeste, A., Pagani, M., Opravil, S., De La Rosa-Velazquez, I. A., Espejo, A., Bedford, M. T., Nussenzweig, A., Busslinger, M., & Jenuwein, T. (2008). A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes Dev*, 22(15), 2048-2061. <https://doi.org/10.1101/gad.476008>

Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J. C., & de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(7), 517-528. <https://doi.org/10.1038/nrm1963>

Sekimata, M., Perez-Melgosa, M., Miller, S. A., Weinmann, A. S., Sabo, P. J., Sandstrom, R., Dorschner, M. O., Stamatoyannopoulos, J. A., & Wilson, C. B. (2009). CCCTC-binding factor and the transcription factor T-bet orchestrate T helper 1 cell-specific structure and function at the interferon-gamma locus. *Immunity*, 31(4), 551-564. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.021>

Serrano, L., Martinez-Redondo, P., Marazuela-Duque, A., Vazquez, B. N., Dooley, S. J., Voigt, P., Beck, D. B., Kane-Goldsmith, N., Tong, Q., Rabanal, R. M., Fondevila, D., Munoz, P., Kruger, M., Tischfield, J. A., & Vaquero, A. (2013). The tumor suppressor SirT2 regulates cell cycle progression and genome stability by modulating the mitotic deposition of H4K20 methylation. *Genes Dev*, 27(6), 639-653. <https://doi.org/10.1101/gad.211342.112>

Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(4), a018713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>

Shammas, M. A. (2011). Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 14(1), 28-34. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834121b1>

Shen, W. Y., Liu, Q. Y., Wei, L., Yu, X. Q., Li, R., Yang, W. L., Xie, X. Y., Liu, W. Q., Huang, Y., & Qin, Y. (2014). CTCF-mediated reduction of vigilin binding affects the binding of HP1alpha to the satellite 2 locus. *FEBS Lett*, 588(9), 1549-1555. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.013>

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A., & Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119(7), 941-953. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012>

Shinkai, Y., & Tachibana, M. (2011). H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. *Genes Dev*, 25(8), 781-788. <https://doi.org/10.1101/gad.2027411>

Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W. M., Petrini, J. H., Haber, J. E., & Lichten, M. (2004). Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr Biol*, 14(19), 1703-1711. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.047>

Simon, J. A., & Lange, C. A. (2008). Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res*, 647(1-2), 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.07.010>

Soria, G., & Almouzni, G. (2013). Differential contribution of HP1 proteins to DNA end resection and homology-directed repair. *Cell Cycle*, 12(3), 422-429. <https://doi.org/10.4161/cc.23215>

Souza, P. P., Volkel, P., Trinel, D., Vandamme, J., Rosnoblet, C., Heliot, L., & Angrand, P. O. (2009). The histone methyltransferase SUV420H2 and Heterochromatin Proteins HP1 interact but show different dynamic behaviours. *BMC Cell Biol*, 10, 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-41>

Spensberger, D., & Delwel, R. (2008). A novel interaction between the proto-oncogene Evi1 and histone methyltransferases, SUV39H1 and G9a. *FEBS Lett*, 582(18), 2761-2767. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.06.056>

Stehr, R., Kepper, N., Rippe, K., & Wedemann, G. (2008). The effect of internucleosomal interaction on folding of the chromatin fiber. *Biophys J*, 95(8), 3677-3691. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120543>

Straub, T. (2003). Heterochromatin dynamics. *PLoS Biol*, 1(1), E14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000014>

Swygert, S. G., & Peterson, C. L. (2014). Chromatin dynamics: interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochim Biophys Acta*, 1839(8), 728-736. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.02.013>

T

Takata, T., & Ishikawa, F. (2003). Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(1), 250-257. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)03020-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)03020-6)

Talbert, P. B., & Henikoff, S. (2010). Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(4), 264-275. <https://doi.org/10.1038/nrm2861>

Talbert, P. B., & Henikoff, S. (2017). Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(2), 115-126. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.148>

Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., & Horio, Y. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem*, 282(9), 6823-6832. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609554200>

Tasselli, L., Xi, Y., Zheng, W., Tennen, R. I., Odrowaz, Z., Simeoni, F., Li, W., & Chua, K. F. (2016). SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence. *Nat Struct Mol Biol*, 23(5), 434-440. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3202>

Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D., & Patel, D. J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol*, 14(11), 1025-1040. <https://doi.org/10.1038/nsmb1338>

Terranova, R., Sauer, S., Merckenschlager, M., & Fisher, A. G. (2005). The reorganisation of constitutive heterochromatin in differentiating muscle requires HDAC activity. *Exp Cell Res*, 310(2), 344-356. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.07.031>

Tremethick, D. J. (2007). Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell*, 128(4), 651-654. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.008>

Trojer, P., & Reinberg, D. (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell*, 28(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.011>

Tsai, M. C., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J. K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., & Chang, H. Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*, 329(5992), 689-693. <https://doi.org/10.1126/science.1192002>

Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P., & Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, 439(7078), 811-816. <https://doi.org/10.1038/nature04433>

Tyagi, M., Imam, N., Verma, K., & Patel, A. K. (2016). Chromatin remodelers: We are the drivers!! *Nucleus*, 7(4), 388-404. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1211217>

V

Vakoc, C. R., Mandat, S. A., Olenchock, B. A., & Blobel, G. A. (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell*, 19(3), 381-391. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.06.011>

Vakoc, C. R., Sachdeva, M. M., Wang, H., & Blobel, G. A. (2006). Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Mol Cell Biol*, 26(24), 9185-9195. <https://doi.org/10.1128/MCB.01529-06>

Vaquero, A. (2009). The conserved role of sirtuins in chromatin regulation. *Int J Dev Biol*, 53(2-3), 303-322. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082675av>

Vaquero, A., Scher, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Serrano, L., & Reinberg, D. (2007). SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature*, 450(7168), 440-444. <https://doi.org/10.1038/nature06268>

Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Reinberg, D. (2004). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell*, *16*(1), 93-105. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.031>

Vaquero, A., Sternglanz, R., & Reinberg, D. (2007). NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene*, *26*(37), 5505-5520. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210617>

Varga-Weisz, P. D. (2014). Chromatin remodeling: a collaborative effort. *Nat Struct Mol Biol*, *21*(1), 14-16. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2748>

Viotti, M., Wilson, C., McClelland, M., Koeppen, H., Haley, B., Jhunjhunwala, S., Klijn, C., Modrusan, Z., Arnott, D., Classon, M., Stephan, J. P., & Mellman, I. (2018). SUV420H2 is an epigenetic regulator of epithelial/mesenchymal states in pancreatic cancer. *J Cell Biol*, *217*(2), 763-777. <https://doi.org/10.1083/jcb.201705031>

W

Wang, C., Chen, L., Hou, X., Li, Z., Kabra, N., Ma, Y., Nemoto, S., Finkel, T., Gu, W., Cress, W. D., & Chen, J. (2006). Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol*, *8*(9), 1025-1031. <https://doi.org/10.1038/ncb1468>

Wang, J., Lawry, S. T., Cohen, A. L., & Jia, S. (2014). Chromosome boundary elements and regulation of heterochromatin spreading. *Cell Mol Life Sci*, *71*(24), 4841-4852. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1725-x>

Wang, J., Qiao, M., He, Q., Shi, R., Loh, S. J., Stanton, L. W., & Wu, M. (2015). Pluripotency Activity of Nanog Requires Biochemical Stabilization by Variant Histone Protein H2A.Z. *Stem Cells*, *33*(7), 2126-2134. <https://doi.org/10.1002/stem.2011>

Wang, R. H., Sengupta, K., Li, C., Kim, H. S., Cao, L., Xiao, C., Kim, S., Xu, X., Zheng, Y., Chilton, B., Jia, R., Zheng, Z. M., Appella, E., Wang, X. W., Ried, T., & Deng, C. X. (2008). Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell*, *14*(4), 312-323. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.09.001>

Wang, T., Xu, C., Liu, Y., Fan, K., Li, Z., Sun, X., Ouyang, H., Zhang, X., Zhang, J., Li, Y., Mackenzie, F., Min, J., & Tu, X. (2012). Crystal structure of the human SUV39H1 chromodomain and its recognition of histone H3K9me_{2/3}. *PLoS One*, 7(12), e52977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052977>

Webster, B. R., Lu, Z., Sack, M. N., & Scott, I. (2012). The role of sirtuins in modulating redox stressors. *Free Radic Biol Med*, 52(2), 281-290. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.484>

Wen, Z., Zhang, L., Ruan, H., & Li, G. (2020). Histone variant H2A.Z regulates nucleosome unwrapping and CTCF binding in mouse ES cells. *Nucleic Acids Res*, 48(11), 5939-5952. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa360>

Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T., & Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett*, 277(1), 8-21. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.08.016>

Wong, S., & Weber, J. D. (2007). Deacetylation of the retinoblastoma tumour suppressor protein by SIRT1. *Biochem J*, 407(3), 451-460. <https://doi.org/10.1042/BJ20070151>

Wu, H., Siarheyeva, A., Zeng, H., Lam, R., Dong, A., Wu, X. H., Li, Y., Schapira, M., Vedadi, M., & Min, J. (2013). Crystal structures of the human histone H4K20 methyltransferases SUV420H1 and SUV420H2. *FEBS Lett*, 587(23), 3859-3868. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.020>

Wu, J. I. (2012). Diverse functions of ATP-dependent chromatin remodeling complexes in development and cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 44(1), 54-69. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr099>

X

Xiao, T., Wongtrakoongate, P., Trainor, C., & Felsenfeld, G. (2015). CTCF Recruits Centromeric Protein CENP-E to the Pericentromeric/Centromeric Regions of Chromosomes through Unusual CTCF-Binding Sites. *Cell Rep*, 12(10), 1704-1714. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.005>

Xu, F., Wei, L., Chen, Z., & Min, W. (2013). Frustrated FRET for high-contrast high-resolution two-photon imaging. *Opt Express*, 21(12), 14097-14108. <https://doi.org/10.1364/OE.21.014097>

Xu, Y., Ayrapetov, M. K., Xu, C., Gursoy-Yuzugullu, O., Hu, Y., & Price, B. D. (2012). Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol Cell*, 48(5), 723-733. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.026>

Y

Yang, Y., & Bedford, M. T. (2013). Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer*, 13(1), 37-50. <https://doi.org/10.1038/nrc3409>

Yankulov, K. (2015). Book review: Epigenetics (second edition, eds. Allis, Caparros, Jenuwein, Reinberg). *Frontiers in Genetics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00315>

Yao, Y., & Dai, W. (2014). Genomic Instability and Cancer. *J Carcinog Mutagen*, 5. <https://doi.org/10.4172/2157-2518.1000165>

Yin, M., Wang, J., Wang, M., Li, X., Zhang, M., Wu, Q., & Wang, Y. (2017). Molecular mechanism of directional CTCF recognition of a diverse range of genomic sites. *Cell Res*, 27(11), 1365-1377. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.131>

Yu, C., & Zhuang, S. (2019). Histone Methyltransferases as Therapeutic Targets for Kidney Diseases. *Front Pharmacol*, 10, 1393. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01393>

Yuan, H., & Marmorstein, R. (2012). Structural basis for sirtuin activity and inhibition. *J Biol Chem*, 287(51), 42428-42435. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.372300>

Yuan, Y., Cruzat, V. F., Newsholme, P., Cheng, J., Chen, Y., & Lu, Y. (2016). Regulation of SIRT1 in aging: Roles in mitochondrial function and biogenesis. *Mech Ageing Dev*, 155, 10-21. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.02.003>

Yuan, Z., & Seto, E. (2007). A functional link between SIRT1 deacetylase and NBS1 in DNA damage response. *Cell Cycle*, 6(23), 2869-2871. <https://doi.org/10.4161/cc.6.23.5026>

Yuan, Z., Zhang, X., Sengupta, N., Lane, W. S., & Seto, E. (2007). SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein. *Mol Cell*, 27(1), 149-162. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.029>

Yun, M., Wu, J., Workman, J. L., & Li, B. (2011). Readers of histone modifications. *Cell Res*, 21(4), 564-578. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.42>

Z

Zhang, Q., Chakravarty, S., Ghersi, D., Zeng, L., Plotnikov, A. N., Sanchez, R., & Zhou, M. M. (2010). Biochemical profiling of histone binding selectivity of the yeast bromodomain family. *PLoS One*, 5(1), e8903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008903>

Zhang, T., Cooper, S., & Brockdorff, N. (2015). The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep*, 16(11), 1467-1481. <https://doi.org/10.15252/embr.201540945>

Zhang, Y., & Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*, 15(18), 2343-2360. <https://doi.org/10.1101/gad.927301>

Zheng, H., Chen, L., Pledger, W. J., Fang, J., & Chen, J. (2014). p53 promotes repair of heterochromatin DNA by regulating JMJD2b and SUV39H1 expression. *Oncogene*, 33(6), 734-744. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.6>

Zschoernig, B., & Mahlknecht, U. (2009). Carboxy-terminal phosphorylation of SIRT1 by protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun*, 381(3), 372-377. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.085>

