

TESI DOCTORAL

REGULACIÓ DE LES ACTIVITATS ACETILTRANSFERASA I
DESACETILASA D'HISTONES EN RESPOSTA A SENYALS
INTRACEL·LULARS I EXTRACEL·LULARS

Ester Valls Jordana

Barcelona, Desembre de 2005

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Programa de Doctorat de Biomedicina
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona
Bienni 2001-2003

REGULACIÓ DE LES ACTIVITATS ACETILTRANSFERASA I
DESACETILASA D'HISTONES EN RESPOSTA A SENYALS
INTRACEL·LULARS I EXTRACEL·LULARS

Memòria presentada per

Ester Valls Jordana

Per optar al grau de Doctora en Biologia

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció de la Dra. M^a Ángeles Martínez-Balbás al
Departament de Biologia Molecular i Cel·lular de l'Institut de Biologia Molecular de
Barcelona (IBMB-CSIC)

La Directora,

El Tutor,

M^a Ángeles Martínez-Balbás

Antonio Zorzano Olarte

L'Autora,

Ester Valls Jordana

Barcelona, Desembre de 2005

Bé doncs, arribats en aquest punt, només queda una cosa: els AGRAÏMENTS!!!

Com totes les etapes de la nostra vida, que tenen un inici i un final, aquesta no n'és una excepció, i sembla que ja ha arribat a la seva fi. Durant tot aquest llarg temps -encara que no m'ho sembli han estat 5 anys!!!-, hi ha hagut moments de tot i per tot, bons i no tan bons, però en definitiva necessaris per què tot això hagi tingut un sentit, i hagi sortit com ha sortit!

És molta la gent que forma part d'aquesta tesi, per diferents raons, però a tots vosaltres us vull dir d'entrada i de manera general: MOLTES GRÀCIES.

Primer de tot a tu Marian, la meva directora de Tesi, moltes gràcies per la confiança dipositada en mi i la possibilitat que em vas donar de començar en el teu lab, tot just quan aterrades d'Anglaterra. Varem començar totes dues, amb quatre cosetes, en un laboratori a la sisena planta del CID que no tenia res a veure amb l'actual, i que per cert, ja no hi és. La veritat és que has estat una molt bona directora, i la responsable d'haver-me encomanat aquesta passió per les modificacions de les histones. Gràcies per haver-me transmès aquest optimisme i aquesta energia inacabables. I per haver-me ensenyat tot el que sé. Per haver compaginat la teva qualitat científica i els bons consells amb una bona dosi d'humor. Gràcies també per ser més que una "jefa", per què he pogut comptar amb tu tan en els bons moments com en els no tan bons. Amb tu he après que en els moments difícils no ens hem d'ensorrar i hem de saber trobar la via alternativa. Sempre m'has animat a continuar endavant, i també ho has fet ara en impulsar-me en aquesta nova etapa. La veritat és que estic molt contenta d'haver pogut treballar amb tu.

A les meves companyes de grup. A tu Sara, primer de tot per ser una bona amiga. Varem estar força temps totes dues soles, al lab de la sisena planta, i hem compartit molt bons moments: que si rialles, dins i fora del lab en els memorables sopars i festes, també moltes converses, i les esquiades!!! En guardo molt bon record, i ho enyoraré. En els moments més baixos també has sabut estar allà, i he après a "no rallar-me" tant! Et trobaré a faltar molt. A qui podré atabalar ara amb les meves cabòries? Ara et tocarà a tu, molts ànims que ja estàs a la recta final! Als nous fitxatges del grup: a la Noemí, per ser tan maca i encantadora, i sempre estar a punt per ajudar a qui faci falta, molts ànims i molta sort! I a la Naiara, que tot i que

hem coincidit molt poc, sempre transmetes molt bon rotllo amb la teva alegria i bon humor, molts ànims i molta sort!!

Als inicis d'aquesta etapa al CID vaig poder comptar amb molta gent. Gràcies Sara Pagans per ser tan comprensiva i donar tan bons consells, i sobretot per ser una bona amiga (tu si que estàs bé a San Francisco!). A l'Ivan, gràcies per resoldre els meus dubtes amb els ChIP's, des de tan lluny!, els teus consells i opinions m'han estat molt útils. A tu Carles, que em vas treure les castanyes del foc en més d'una ocasió, gràcies per haver-me ajudat en els meus inicis. També vull agrair a l'Ana Kosoy i la Sílvia Canudes el seu suport.

A la gent amb qui he passat la major part del temps, dins i fora del laboratori, també us vull donar les gràcies. A l'Olga per ser una bona amiga, i per haver compartit tantes xerrades de feina (o no), en cada dinar -i han estat molts dinars!-. Molts ànims per l'escriptura! Moltes gràcies a tu Lorena, "por unas risas" en aquelles hores on al lab només quedem quatre gats, i també pels tants sopars amb farres incloses que has organitzat (i molt ben organitzades, per si no t'ho diu ningú!). A en Joan, per amenitzar l'ambient del lab amb la música, que porta tanta polèmica... (i no sé per què m'ho sembla, però crec que en seguirà portant). Pel teu sentit de l'humor i els teus comentaris científics sempre interessants. A en Xavi "Dorito", l'assessor informàtic del grup. Gràcies per ajudar-me a resoldre tots els dubtes que he tingut amb la informàtica, que no han estat pocs!

També vull agrair tot el suport rebut per part d'en Ferran i el seu grup: la Mònica, la Dori, l'Antonio, la Marta Batlle, i també a les noves incorporacions, l'Àlex i l'Elena. Al grup d'en Jordi Bernués, a en Xavi Aran (que també és de la meua quinta) molta sort i molts ànims. Gràcies també a en David i la Marta. Al grup d'en Josep Portugal, amb qui he coincidit molt a cultius, la Sylvia, i en Marc. La Silvia Marín, amb qui varem passar totes les trifulgues del Màster, i la Marta Rojas. També a tu Lluïsa, per ser una persona excel·lent, sempre de bon humor i a les noies del teu grup, la Sílvia Pérez i la Bet, companyes de la U, per compartir aquest espai que de vegades se'ns fa petit... I a la Gemma, l'Alicia i l'Esther F., les tècniques del laboratori, per la feina tant important que fan pel grup!

No puc oblidar-me de la gent de la sisena planta del CID amb qui varem compartir laboratori, l'Elisa Martí i el seu grup: la Iria, en Jordi C. i la Lúcia per haver

passat tan bons moments al 604! També a en Raül per haver-me donat consells per les “estables”. També varem passar molt bons moments (com els berenars del Paul...) amb la Raquel Torras i la Mar, moltes gràcies a totes dues i molta sort!

Seguint amb aquesta línia haig d'agrair als nostres veïns del 604, el grup d'en Pep Casacuberta, amb en Néstor i l'Enric, haver pogut comptar amb ells per les peripècies del dos-híbrids. També vull agrair-li l'ajuda i suport rebuts a en Benjamí i a la gent del seu grup, especialment a la Tània i la Sue, per haver-me ajudat amb el famós “dos-híbrids”, i per haver-me ensenyat tantes coses del món dels llevats!

Moltes gràcies també a la resta de la gent del Departament: Maite i Javi (pel seu salero), Jenny, la gent del grup d'en Jordi Casanovas: Marc, Marta Ll., Carol, Gemma, Veronique, Oliver, Nico, Jose, Xavi F. Al David C, a la Natàlia, la Laia, la Rosa, l'Eva. A en Joaquim Roca i la gent del seu laboratori: la Sònia T., en Nacho. Als cristal·lògrafs, tant els que s'han quedat al CID com els que han vingut al Parc: en Dani, l'Alex, la Raquel A., en Xavi G., la Raquel G., en Miquel C., la Núria V., en Xavi C., la Cristina, la Rosa, l'Ignasi F, l'Albert, l'Alicia. A en Gerardo, en Sergi G., en Sergi A., la Lara, l'Erica, l'Enrique M., la Flora i en Niclòlai.

També vull agrair el suport, ajuda i ànims rebuts per part del meu tutor, l'Antonio Zorzano, i la coordinadora de Doctorat del Departament de Bioquímica, la Marta Giralt, sobretot a la recta final d'aquesta Tesi.

Per anar acabant, no puc oblidar-me de la gent que fora de l'ambient de feina m'ha recolzat, animat i suportat! Les meves amigues que són fantàstiques, amb les qui he compartit pis, i han viscut des de primera línia tot el procés: Emma, Santi (tu més que cap altra saps què és tot això! Molts ànims per tu també!!!), Marta N., Laura C., Montse, Ester Vaqué, Eva, Míriam, Anna M. I amb les que no he compartit pis, però he compartit els cafès del dissabte: Marta F., Anna R., Laia, Mari, Laura A. Moltes gràcies a totes, per tot!

A la meva família, els meus pares i el meu germà, us vull dir que sense el vostre suport incondicional això no hauria estat possible, no hauria tirat endavant. Moltes gràcies per haver-me entès i haver-me donat tota la confiança necessària per portar a terme aquest somni. Ja sé que aquesta feina no és massa convencional, però és el que m'agrada fer, i gràcies a vosaltres ho he aconseguit.

Per últim, a una persona molt especial i important, a tu David. Durant tot aquest temps m'has ajudat moltíssim i sempre has sabut estar al meu costat. És massa difícil de resumir i expressar tot el que sento en aquests moments. Sense tu, segurament tot hauria set molt diferent. Moltes gràcies per tot...

Moltes gràcies a tothom, per haver fet de tot aquest temps una experiència molt agradable i irrepètible. M'ho he passat molt bé!

A reveure!

ÍNDIX

ÍNDIX	i
ÍNDIX DE FIGURES	v
ABREVIACIONS	vii
INTRODUCCIÓ	9
1. Cromatina eucariota	9
1.1. Histones	9
1.2. Nucleosoma	10
1.3. La fibra cromatínica	12
2. Complexes reguladors de la cromatina	13
2.1. Complexes de remodelació de la cromatina dependents d'ATP	13
2.1.1. Mecanismes de la remodelació de la cromatina	14
2.2. Modificacions posttraduccionals de les histones	16
2.2.1. Acetilació i desacetilació d'histones	17
2.2.1.1. Acetiltransferases d'histones	19
HAT-B	20
HAT-A	20
Membres de la família GNAT	21
Estructura del domini HAT	22
El bromodomini	23
PCAF	24
Família d'acetiltransferases relacionades amb GNAT	25
Família de CBP	26
CBP	26
Família MYST	28
2.2.1.2. Desacetilases d'histones	29
HDAC1	30
2.2.2. Fosforilació	32

2.2.3. Metilació	34
2.2.3.1. Metiltransferases d'histones	36
Domini SET	37
SET1	37
2.2.4. Ubiquïtinació i Sumoilació	38
2.3. El codi de les histones	40
3. El Virus SV40	44
3.1. Antigen T	46
3.2. SV40 i la Transformació cel·lular	50
4. El Cicle Cel·lular	51
4.1. Fases del Cicle Cel·lular	51
4.1.1. La Mitosi	53
4.2. Transcripció i mitosi	56
4.3. Modificacions posttraduccional de les histones a mitosi	58
OBJECTIUS	61
RESULTATS	63
CAPÍTOL 1:	
L'antigen T de SV40 modula les activitats HAT i HDAC cel·lulars	63
CAPÍTOL 1A:	
L'antigen T de SV40 modula l'activitat actiltransferasa d'histones de CBP	63
CAPÍTOL 1B:	
L'antigen T de SV40 reprimeix la transcripció mitjançant la seva interacció amb HDAC1	73
CAPÍTOL 2:	
Paper de les modificacions de les histones en el marcatge i	

l'activació dels gens durant mitosi	101
CAPÍTOL 3:	
Mecanismes de l'autoacetilació de PCAF	111
RESUM DELS RESULTATS	119
DISCUSSIÓ	125
CAPÍTOL 1:	
L'antigen T de SV40 modula les activitats HAT i HDAC cel·lulars	125
1. L'antigen T de SV40 modula positivament l'activitat HAT global cel·lular	126
2. L'activitat HAT de CBP és regulada positivament per l'antigen T	129
2.1. A través de quins mecanismes l'antigen T augmenta l'activitat HAT de CBP?	129
3. L'antigen T modula l'activitat transcripcional de CBP de manera dependent de promotor	130
3.1. Com podria explicar-se l'efecte diferencial en la regulació dels promotors?	134
4. Interacció de l'antigen T amb la desacetilasa d'histones HDAC1	135
4.1. Per quins motius l'antigen T interaccionaria amb dues proteïnes amb activitats oposades?	136
CAPÍTOL 2:	
Paper de les modificacions de les histones en el marcatge i l'activació dels gens durant la mitosi	139
1. Comportament de les activitats HAT i HDAC globals en interfase i mitosi	140
2. Qui senyalitza els gens actius (constitutius i induïbles) durant la mitosi?	141
2.1. Diferències en els nivells de modificacions entre regions promotores i regions codificadores dels gens	142
2.2. L'acetilació de H3 i H4 i la fosforilació de H3 són senyals d'activació de la transcripció del gen Hsp70	143

2.3. Tindrien un paper comú aquestes marques de memòria cel·lular?	144
3. Un cas especial, l'acetilació de la lisina 12 de la histona H4	145
4. Regulació transcripcional de la Ciclina B1: Com es regula la seva expressió durant la mitosi?	145
CAPÍTOL 3:	
Mecanismes de l'autoacetilació de PCAF	148
1. PCAF s'acetila <i>in vivo</i>	148
2. Conseqüències funcionals de l'acetilació de PCAF	149
CONCLUSIONS	151
BIBLIOGRAFIA	153
ANNEX 1	179

ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

Figura I1: Estructura cristal·logràfica del nucleosoma	11
Figura I2: Esquema de la fibra cromatínica	12
Figura I3: Esquema dels mecanismes de remodelació de la cromatina	16
Figura I4: Esquema de les modificacions posttraduccionals de les histones	17
Figura I5: Reacció d'acetilació i desacetilació de les lisines	17
Figura I6: Bromodomini de TAFII250	24
Figura I7: Esquema de la proteïna PCAF	25
Figura I8: Esquema de la proteïna CBP	28
Figura I9: Esquema de la proteïna HDAC1	32
Figura I10: Processos cel·lulars on participa la fosforilació de la serina 10 de la histona H3	34
Figura I11: Reacció de metilació en lisines	35
Figura I12: Esquema de la proteïna SET1	38
Figura I13: Model d'atenuació de la transcripció per sumoilació	39
Figura I14: Codi de les histones	43
Figura I15: Esquema del genoma del virus SV40	46
Figura I16: Efecte de l'antigen T en la transformació cel·lular a través pRb	47
Figura I17: Esquema de l'antigen T	49
Figura I18: Fases del cicle cel·lular i punt de restricció	52
Figura I19: Imatge microscòpica de les diferents fases de la mitosi	55
Figura RR1: Resum de les modificacions posttraduccionals senyalitzadores d'activació transcripcional que es mantenen durant la mitosi	122
Figura D1: Esquema de tres possibles mecanismes d'activació de la transcripció del promotor HSP70	132
Figura D2: Esquema de dos possibles mecanismes de repressió de la Transcripció del promotor Timidina Quinasa	133
Figura D3: Esquema de l'estructura cromatínica del promotor Timidina Quinasa	138
Figura D4: Model de distribució dels enzims HAT i HDAC durant la progressió del cicle cel·lular	141

Taula I: Classificació dels enzims de remodelació de la cromatina segons la seva subunitat d'hidròlisi d'ATP	14
Taula II: Relació de les modificacions de les histones i dels enzims que les produeixen	179
Taula III: Classificació de les diferents famílies d'acetiltransferases	182
Taula IV: Classificació de les diferents famílies de desacetilases	184
Taula V: Classificació dels enzims metiltransferasa segons els residu que modifiquen	186

ABREVIACIONS

Aa	<u>a</u> mino <u>à</u> cid
Acetil-CoA	<u>A</u> cetil <u>C</u> oenzim <u>A</u> ,
ACF	Factor de remodelació i assemblatge de cromatina. <u>A</u> TP-utilizing, <u>c</u> hromatin assembly and remodeling <u>f</u> actor
ACTR	<u>A</u> ctivator of <u>T</u> h thyroid and <u>R</u> A receptor
CBB	<u>C</u> oomassie <u>B</u> lue <u>B</u> rilliant
CBP	Proteïna d'unió al factor CREB. <u>C</u> REB- <u>B</u> inding <u>P</u> rotein
CHRAC	Complex d'accessibilitat a la cromatina. <u>C</u> hromatin <u>a</u> ccessibility <u>c</u> omplex
Ct	domini Carboxiterminal
DNA	Àcid desoxiribonucleic. <u>D</u> eoxiribo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid
FRET	<u>F</u> luorescence <u>R</u> esonance <u>E</u> nergy <u>T</u> ransfer
FT	<u>F</u> actor de <u>T</u> ranscripció
GNAT	<u>G</u> cn5-related <u>N</u> -acetyl <u>t</u> ransferase
HDAC1	Histona Desacetilasa 1
HDACs	Desacetilases d'histones
IVT	<i>In vitro</i> transcripció i traducció
KDa	<u>K</u> ilo <u>D</u> alton
mRNA	RNA missatger
MYST	Família d'acetiltransferases: <u>M</u> OZ, <u>Y</u> bf2/ <u>S</u> as3, <u>S</u> as2 i <u>T</u> ip60
NURF	Factor de remodelació de nucleosomes. <u>N</u> ucleosome <u>r</u> emodeling <u>f</u> actor
Nt	domini Aminoterminal
PCAF	Factor d'associació a p300/CBP. <u>p</u> 300/ <u>C</u> BP <u>A</u> ssociated <u>F</u> actor
PM	<u>P</u> es <u>M</u> olecular
pRb	proteïna del Retinoblastoma
RRM	Motiu de reconeixement de RNA. <u>R</u> NA <u>R</u> ecognition <u>M</u> otif
RNA	Àcid ribonucleic. <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid

RNAi	<u>R</u> NA d' <u>i</u> nterferència
RSC	<u>R</u> emodells the <u>S</u> tructure of <u>C</u> hromatin
RSF	<u>R</u> emodeling and <u>S</u> pacing <u>F</u> actor
sRNA	<u>s</u> mall <u>R</u> NA
siRNA	<u>s</u> mall <u>i</u> nterference <u>R</u> NA
SRC-1	<u>S</u> teroid <u>R</u> eceptor <u>C</u> ofactor 1
SUMO	<u>S</u> mall <u>U</u> biquitin-related <u>M</u> odifier
SWI/SNF	mating-type <u>s</u> witching i <u>s</u> ucrose <u>n</u> on- <u>f</u> ermenting
T.A.	<u>T</u> emperatura <u>A</u> mbient
TAFs	Factors d'associació a factors de transcripció: TF _{II} D. <u>T</u> ranscription factor <u>A</u> ssociation <u>F</u> actor.
Tip60	<u>T</u> AT- <u>I</u> nteractive <u>P</u> rotein <u>60</u> KDa

I. INTRODUCCIÓ

1. Cromatina Eucariota

El genoma eucariota està constituït entre $1'3 \cdot 10^7$ parells de bases (pb) de DNA en llevat, i $3'3 \cdot 10^9$ pb de DNA en humans. El trobem en cada cèl·lula d'un organisme i conté tota la informació genètica necessària per la seva viabilitat. El DNA ha d'estar empaquetat d'una manera molt ordenada i compacta dins el nucli cel·lular - es podria dir que si estiréssim tot el contingut DNA d'una cèl·lula aquest podria assolir una longitud de més de 2 metres-. Aquesta compactació del DNA s'aconsegueix gràcies a la col·laboració imprescindible d'unes proteïnes estretament lligades al DNA, les histones. Les histones estan carregades positivament i s'uneixen per atracció de càrrega al DNA, aquesta estructura és la cromatina. La cromatina no és rígida, ni molt menys estàtica, sinó que és molt dinàmica i adaptable. Bàsicament podem trobar-la en dos estats ben diferents i característics:

- **Euromatina** –que és la forma descondensada i fins i tot relaxada, la qual cosa li permet una llibertat de moviment i una accessibilitat a factors externs- i,
- **Heterocromatina** –que és la forma més condensada que li confereix, generalment, una inaccessibilitat estructural i funcional a factors externs-.

1.1. Histones

Les histones van ser descobertes el segle XIX per Kossel (Kossel, 1884). Però va ser el 1965 quan Philips i Johns van aïllar i descriure cinc de les histones conegudes actualment, i que van ser designades com: H1, H2A, H2B, H3 i H4 (Phillips and Johns, 1965). Les histones consten essencialment de dos dominis funcionals:

- **El domini carboxiterminal (Ct):** és la cadena polipeptídica plegada i estructurada. Constitueix el que s'anomena histona plegada (*histone fold*), i és una estructura globular que consisteix en una hèlix d'11 residus (Hèlix I), seguida per un llaç curt i una cadena β (Cadena A), una hèlix llarga de 27 residus (Hèlix II), un altre llaç curt i una cadena β (Cadena B), finalment una hèlix d'11 residus (Hèlix III). En aquest domini es distingeix un tàndem amb dos motius similars i contigus de hèlix-

cadena-hèlix (HSH): HSH1, que es trobaria a la part aminoterminal de la histona, i HSH2 que s'ubicaria a la part carboxiterminal, -aquests motius tenen capacitat per interaccionar amb el DNA (Arents and Moudrianakis, 1995)-. És en aquest domini on es produeix la dimerització entre histones i la interacció d'aquestes amb el DNA. Aquesta regió està constituïda aproximadament pel 75% dels aminoàcids de la proteïna, i presenta una alta conservació entre espècies, tan és així, que els estudis que s'han fet fins el moment revelen que totes les histones provindrien d'un mateix ancestre comú.

- **El domini aminoterminal (Nt):** és la cadena polipeptídica protuberant, no estructurada i altament bàsica de la histona, -ens hi referim com a cua de la histona-. És la part més exposada a l'exterior del nucleosoma, i on es duren a terme les modificacions posttraduccionals de la proteïna. La constitueixen aproximadament un 25% dels aminoàcids de la proteïna.

Les histones no actuen soles -excepte H1 que es troba de manera independent fent de pont d'unió entre dos nucleosomes (Kornberg and Thomas, 1974)-, sinó que ho fan de manera organitzada formant un octàmer que està constituït per dues molècules de: H2A, H2B, H3 i H4. A la part central de l'octàmer s'hi col·loca un tetràmer compost per $(H3-H4)_2$ (Kornberg and Thomas, 1974; Roark *et al.*, 1974). Flankejant aquest tetràmer s'hi col·loquen dos heterodímers de H2A-H2B (Kelley, 1973).

1.2. Nucleosoma

La unitat repetitiva i fonamental de la cromatina és el nucleosoma. Es tracta d'una estructura nucleoproteica composta per l'octàmer d'histones i 145-147 pb de DNA que l'emboliquen (Kornberg, 1974; Lohr and Van Holde, 1975; Noll and Kornberg, 1977).

Com hem mencionat abans, l'octàmer d'histones està compost per dos tetràmers. Al nucli s'hi situa el tetràmer format per $(H3-H4)_2$, de manera que interacciona a través del domini HSH2 de les histones H3 amb un caràcter fortament hidrofòbic. Acotant el tetràmer hi trobem els heterodímers formats per H2A-H2B, el tipus d'interaccions que es donen entre aquestes molècules són molt menys hidrofòbiques, i com a conseqüència, la interfase de dímers a tetràmers és molt

dinàmica i pot donar-se fins i tot a causa de subtils pertorbacions a l'ambient que els envolta (Eickbush and Moudrianakis, 1978).

No va ser fins el 1997, quan Luger i els seus col·laboradors van obtenir l'estructura cristal·logràfica del nucleosoma (Luger *et al.*, 1997). Aquesta resolució va permetre desxifrar moltes incògnites, observant-se el plegament de les quatre histones que formen l'octàmer i com es disposaven els extrems Nt protuberants a l'exterior del centre (*core*) nucleosomal. Deixava al descobert com es donen les interaccions entre les histones i el DNA. Aquestes són entre els esquelets fosfodiester de les cadenes de DNA i la superfície interior de la superhèlix. Els contactes es donen cada 10 pb on el solc menor de la doble hèlix de DNA queda a la cara interior. També s'observen les interaccions electrostàtiques i els ponts d'hidrogen amb els fosfats del DNA, així com els contactes no polars amb els grups desoxiribosa (veure Figura I1).

L'estructura cristal·logràfica mostra que els residus 16-25 de la histona H4 s'estenen fins al nucleosoma adjacent en un feix de nucleosomes cristal·litzats per poder interaccionar amb una cara altament carregada de manera negativa del complex H2A-H2B. Això suggereix que les cues de les histones podrien mitjançar estructures de cromatina d'alt ordre i ajudar en el plegament de la cromatina.



Figura I1: Estructura cristal·logràfica del nucleosoma. S'observa el plegament de les quatre histones, formant l'octàmer, i les cues protuberants disposades a l'exterior del centre nucleosomal. Es poden veure també les interaccions histona-DNA,(Luger *et al.*, 1997).

1.3. La fibra cromatínica

Si la unitat fonamental de la cromatina és el nucleosoma, la fibra cromatínica consisteix en feixos de nucleosomes espaiats cadascun uns 160 pb (llevats) i uns 200 pb (eucariotes superiors) al llarg del DNA cromosòmic per formar els feixos de nucleosomes. Així doncs, les fibres de cromatina contenen a més d'aquests feixos de nucleosomes, proteïnes addicionals com són les histones d'unió (*linker*) i factors que són externs a la fibra (o que actuen en *trans*). Una fibra cromatínica té una alçada d'uns 10 nm. Tal i com s'observa a la Figura I2, la cromatina s'estructura a partir de fibres de cromatina que s'apilen unes sobre altres adoptant estructures d'alt ordre. La següent escala en el plegament de la cromatina la té el "solenoid" o el conjunt de fibres de 30 nm. La màxima condensació s'assoleix en estructures altament condensades com la dels cromosomes metafàsics, on es poden obtenir gruixos de fibra de fins a 700 nm.

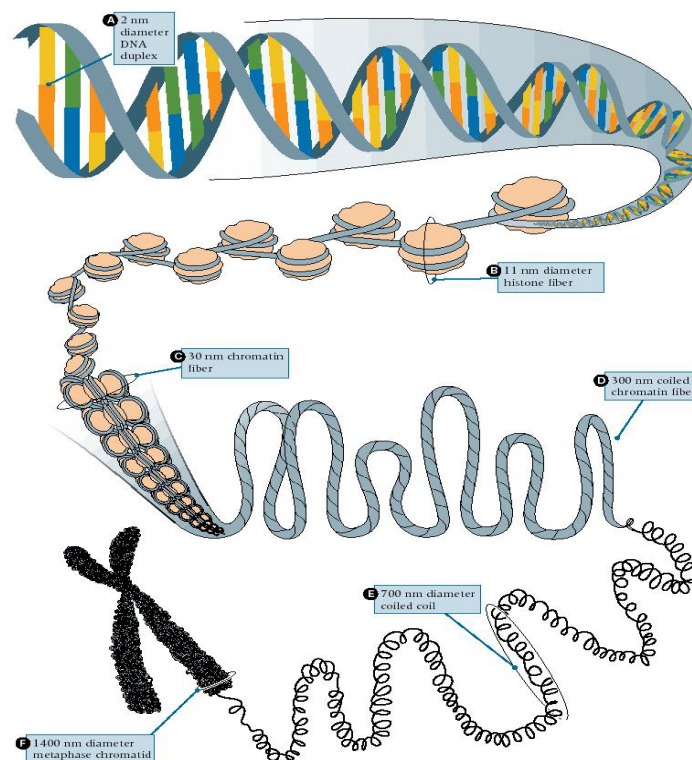


Figura I2: Esquema de la fibra de cromatina. Pot observar-se des que el DNA embolcalla l'octàmer d'histones individualment, obtenint una estructura anomenada de collaret (*beads-on-a-string*), la fibra de 11nm de diàmetre, fins a estructures de més alt ordre.

Tant la histona H1 d'unió com altres proteïnes associades a la cromatina s'uneixen a la part exterior dels nucleosomes i estableixen enèrgicament els estats altament condensats de les fibres. Estudis realitzats per Carruthers i Hansen (Carruthers and Hansen, 2000), han demostrat el paper importantíssim que juguen els extrems Nt protuberants de les histones en la formació de contactes entre fibres de cromatina. Aquests estudis evidencien que les cues de les histones són totalment necessàries en les interaccions entre nucleosomes que es donen durant el procés de condensació de la cromatina. També mostren que el paper de la histona H1 d'unió és independent al de les cues de les histones del *core* (Hayes and Hansen, 2001).

2. Complexes Reguladors de la Cromatina

L'empaquetament del genoma eucariota als nuclis de les cèl·lules no té un paper merament estructural, sinó que també s'ha vist que és funcional. Encara que la cromatina ajudi a l'empaquetament del DNA en el nucli, també presenta un impediment per qualsevol procés que requereixi tenir accés a la informació genètica. Actualment, sembla clar que la regulació de l'estructura de la cromatina representa un estadi clau en la funció gènica i, per tant, el grau del modelatge és un estadi destacat en les vies reguladores de la cèl·lula.

Aquest procés pot portar-se a terme de diverses maneres, i segons el context de cada gen poden donar-se múltiples vies d'alteració de la cromatina. Podríem parlar de dos grans complexos proteics que modifiquen l'estructura de la cromatina (i) els complexos de remodelació de la cromatina dependents d'ATP, i (ii) els complexos que modifiquen covalentment les histones.

2.1. Complexes de remodelació de la cromatina dependents d'ATP

Un dels tipus de remodelació de la cromatina que podem trobar a la cèl·lula és la que porten a terme diferents complexos que utilitzen l'energia de la hidròlisi de l'ATP per alterar l'estructura de la cromatina. Podem trobar múltiples complexos a la cèl·lula, i se n'han descrit tant a llevats, a *Drosophila*, com en humans. Aquí, els hem classificat segons el tipus de subunitat catalitzadora d'ATP que tenen, i es poden dividir en tres grups: SWI2, ISWi i Mi2 (Veure Taula I) (Aalfs and Kingston, 2000).

Una de les característiques principals que diferencia aquests complexos, a part de la seva subunitat catalítica és la seva mida. Pel què fa als complexos de la família de SWI2 podríem dir que cada complex conté entre 8 i 16 pèptids diferents. A diferència dels de la família de ISWi que són molt més petits i contenen de 2 a 6 pèptids.

2.1.1. Mecanismes de remodelació de la cromatina

La remodelació de la cromatina pot anar des de l'alteració de les interaccions histona-DNA, fins al desplaçament dels nucleosomes en el DNA sense alterar-ne la seva conformació, o bé totes dues accions. A continuació es detallen els mecanismes d'alteració de l'estructura de la cromatina dels diferents complexos de remodelació (també poden veure's resumits a la Taula I):

Subunitat catalítica ATPasa	Complexos de remodelació	Procés de remodelació	Organisme
SWI 2	ySWI/SNF ³	Sliding Transferència d'octàmer	Llevat
	yRSC	Sliding Transferència d'octàmer	Llevat
	Brahma	Sliding Transferència d'octàmer	<i>Drosophila</i>
	hSWI/SNF	Sliding Transferència d'octàmer	Humà
ISWi	ISW1 ²	Sliding	Llevat
	ISW12	Sliding	Llevat
	INO80	Sliding	?
	dNURF ¹	Sliding	<i>Drosophila</i>
	dCHRAC	Sliding	<i>Drosophila</i>
	dACF	Sliding	<i>Drosophila</i>
	hRSF	Sliding	Humà
	xACF	Sliding	<i>Xenopus laevis</i>
Mi2	hNURD		Humà
	xMi2		<i>Xenopus laevis</i>

¹(Hamiche *et al.*, 1999); ² (Langst *et al.*, 1999); ³ (Whitehouse *et al.*, 1999)

Taula I. Classificació dels enzims de remodelació de la cromatina segons la seva subunitat d'hidròlisi d'ATP.

- **Desplaçament del nucleosoma o *Sliding***: Procés que es dona a les famílies de complexos SWI2 i ISWi. La característica principal i comú a tots és que l'estructura del nucleosoma no canvia i el desplaçament del nucleosoma es fa dins la mateixa cadena del DNA (o en *cis*) (Meersseman *et al.*, 1992; Hamiche *et al.*, 1999; Langst *et al.*, 1999; Whitehouse *et al.*, 1999). El desplaçament del nucleosoma d'aquesta manera no incrementarà mai el DNA exposat, simplement canviarà la localització d'aquest DNA exposat. Aquest no és només l'únic mecanisme d'acció, donat que diferents experiments de restricció enzimàtica, agregació (o *crosslink*) del DNA amb les histones, o bé de tipus topològic han demostrat que el complex SWI/SNF independentment del desplaçament en *cis*, pot remodelar la cromatina mitjançant altres mecanismes.

- **Transferència de l'octàmer o desplaçament en *trans***: Aquest procés només s'ha observat *in vitro* en el complex SWI/SNF. Consisteix en la translocació d'un nucleosoma d'una fibra de cromatina a una altra que estigui per sobre en una estructura ordenada de cromatina (Lorch *et al.*, 1999). En els experiments realitzats amb aquest complex es va poder apreciar que les eficiències del procés de desplaçament en *cis* i el desplaçament en *trans* són diferents.

- **Canvis conformacionals al nucleosoma**: Aquests canvis són molt més elaborats en el sentit que no només es requereix un moviment del nucleosoma per sobre del DNA, sinó que impliquen canvis en l'estructura del propi nucleosoma, i un canvi en la topologia del feix de nucleosomes. Aquests mecanismes s'han observat en el complex SWI/SNF, i alteren de manera significativa els contactes histona-DNA, permetent un canvi de la conformació de la fibra de cromatina molt més estable. Aquest darrers mecanismes no es donen en els complexos de la família de ISWI (Lorch *et al.*, 1998).

És evident doncs, que els enzims que catalitzen la fluïdesa de la cromatina, tenen un paper molt important en el control de la cèl·lula, i s'ha demostrat que participen en processos de proliferació i desenvolupament cel·lulars (Kingston and Narlikar, 1999). La següent figura il·lustra els tres mecanismes de remodelació de la cromatina esmentats a dalt (Figura I3).

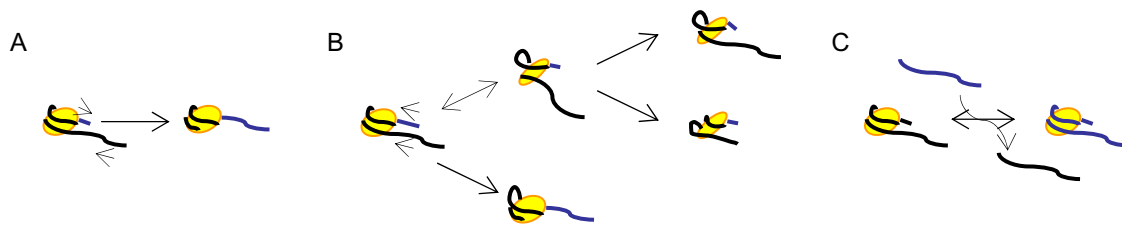


Figura I3: Esquema dels tres mecanismes de remodelació de la cromatina. A) Mecanisme de desplaçament en *cis* del nucleosoma. B) Mecanisme de canvi conformacional del DNA, de les histones o de tots dos. C) Transferència de l'octàmer entre dues cadenes de DNA diferents. Adaptat de (Narlikar *et al.*, 2002).

2.2. Modificacions posttraduccionals de les histones.

Un dels altres mecanismes que modulen l'activitat de la cromatina és portat a terme pels enzims que produeixen modificacions posttraduccionals a les histones. La majoria d'aquestes modificacions covalents es donen als extrems aminoterminals de les histones. No obstant, cada vegada més es donen exemples de modificacions en el domini globular (Peterson and Laniel, 2004). Entre les modificacions més conegudes hi ha l'acetilació, la fosforilació, la metilació, la ubiquïtinació, la sumoilació i l'ADP-ribosilació. Aquestes modificacions han estat correlacionades amb un ampli ventall de processos cel·lulars, el principal i més estudiat és la transcripció, però també participen en processos de replicació, reparació del DNA, assemblatge de la cromatina, etc (Strahl and Allis, 2000; Berger, 2002; Peterson and Laniel, 2004).

Es parlarà bàsicament de l'acetilació i la metilació, tot i que també es farà esment de les altres modificacions. I com es veurà més endavant, també es tractaran les interrelacions que s'observen entre diferents modificacions. La Figura I4 mostra un esquema de les diferents modificacions que es coneixen i que es produeixen als diferents residus Nt de les histones.



Figura 14: Esquema de les diferents modificacions que hi ha en diferents residus dels extrems aminoterminals protuberants de les histones. Cal remarcar que algunes d'aquestes modificacions comparteixen un mateix residu i per tant no poden coexistir (Peterson and Laniel, 2004).

2.2.1. Acetilació i desacetilació d'histones

L'acetilació dels residus lisina als extrems ϵ -aminoterminals (Nt) de les quatre histones del centre nucleosomal va ser observada per primera vegada per Vincent Allfrey i els seus col·laboradors el 1964 (Allfrey *et al.*, 1964). Aquesta reacció es basa en la transferència d'un grup acetil, provinent del cofactor acetil-CoA, a un residu lisina dels extrems ϵ -aminoterminals de les histones, i està catalitzada per les acetiltransferases d'histones (HATs) (Vidali *et al.*, 1968). Es tracta d'una reacció molt dinàmica i reversible; el procés invers està mitjançat per les desacetilases d'histones (HDACs) (Rice and Allis, 2001). A continuació, a la Figura 15 es mostra la reacció d'acetilació de les lisines.

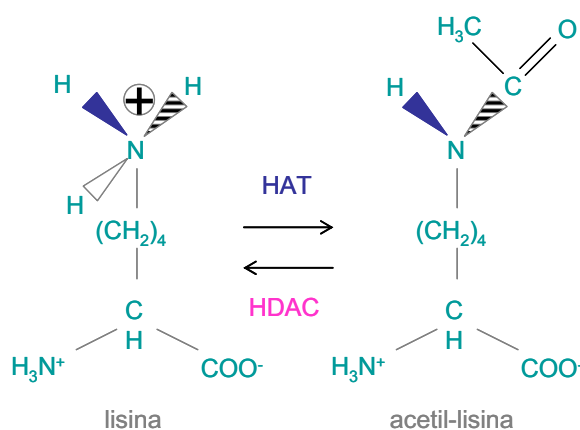


Figura 15: Reacció d'acetilació i desacetilació de les lisines. A la dreta hi ha representada una lisina carregada positivament. A l'esquerra una lisina acetilada, el grup acetil ha estat incorporat per una acetiltransferasa (HAT), mentre que la reacció inversa d'extracció del grup acetil és duta a terme per una desacetilasa (HDAC) Adaptat de Rice i Allis (Rice and Allis, 2001).

L'acetilació es dona a determinats residus lisina de les histones, però sobretot en els que es troben situats als extrems Nt. En la majoria d'espècies, la histona H3 té com a principals residus susceptibles de ser acetilats les lisines 9, 14, 18 i 23 en el seu extrem Nt protuberant (Thorne *et al.*, 1990). Pel què fa a la histona H4, aquesta s'acetila principalment als residus lisina de les posicions 5, 8, 12 i 16 (Grunstein, 1997).

Aquesta modificació es veu implicada en múltiples processos biològics, entre els quals hi ha la regulació de la transcripció, la reparació, la replicació del DNA, mecanismes de remodelació, l'assemblatge de nucleosomes, l'apoptosi, etc. Cal recordar també, que els enzims catalitzadors de la reacció poden utilitzar diferents substrats. Aquí ens referirem bàsicament al de les histones, però hi ha enzims que tenen com a substrat proteïnes no histona com p53, E2F1, etc (Sakaguchi *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Martinez-Balbas *et al.*, 2000).

La idea que es tenia antigament era que l'acetilació tenia una influència única i directament sobre el plegament de la cromatina i en la dinàmica dels nucleosomes, és a dir, un paper merament estructural. Es pensava doncs, que la cromatina que esdevenia acetilada, al eliminar la càrrega positiva, debilitava la interacció dels extrems Nt de les histones amb el DNA, provocant-ne la seva relaxació, i quedant d'una forma desplegada i més accessible als factors de transcripció. És per això que, en general, l'acetilació de les histones s'ha correlacionat amb regions del genoma transcripcionalment actives. La prova definitiva del seu paper en la transcripció va ser el descobriment que el primer enzim que presentava activitat HAT també tenia capacitat coactivadora de la transcripció (Brownell *et al.*, 1996).

Recentment, estudis de *cosslink* en làser *in vivo* han evidenciat que l'acetilació no provoca uns canvis d'exposició dels extrems Nt de les histones a l'exterior del nucleosoma com semblava. És a dir, que aquests senyals d'acetilació en les histones no alteren la dinàmica del nucleosoma per si mateixes (Peterson and Laniel, 2004). S'han trobat proteïnes que contenen uns dominis específics que reconeixen les lisines acetilades de les histones, els anomenats bromodominis (Haynes *et al.*, 1992). Aquest fet, doncs, obre les portes a nous plantejaments i models que posarien de manifest la importància d'aquests dominis en el reconeixement de l'acetilació de les lisines i en augmentar el grau de complexitat en la regulació de la cromatina. En la mateixa línia, cada vegada s'aïllen més proteïnes que contenen dominis de reconeixement de

modificacions en les histones, i no només l'acetilació, sinó d'altres com els cromodominis que reconeixen les lisines metilades, o el domini SANT que es caracteritza pel reconeixement de lisines no modificades. Aquests dominis doncs, podrien participar en la dinàmica del nucleosoma.

Podríem dir que els residus lisina més destacats que tenen un paper important en l'activació transcripcional són les lisines 9 i 14 de la histona H3 i les lisines 8 i 16 de la histona H4. S'ha vist que la lisina 9 de la histona H3 és el lloc preferit d'acetilació de Gcn5p *in vivo*, però Gcn5p també pot acetilar *in vitro* les lisines 8 i 16 de la histona H4 (Kuo *et al.*, 1996). A la Taula II de l'annex 1 s'han resumit les modificacions més importants, i els enzims que les porten a terme, així com les conseqüències funcionals que se'n deriven (Struhl, 1998; Strahl and Allis, 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Berger, 2002).

Un altre dels processos importants perquè la cèl·lula pugui continuar endavant sense problemes el seu cicle és la replicació del DNA. Durant el procés de replicació de la cromatina s'estan sintetitzant ràpidament les histones; les histones H3 i H4 es dipositen al DNA en un estat preacetilat que és mantingut durant un període curt de temps fins que la cromatina esdevé madura, un cop assemblada, aquesta acetilació és eliminada (Turner and O'Neill, 1995). L'estat diacetilat de la histona H4 a les lisines 5 i 12 (K5 i K12) és molt important en aquest procés, i s'ha vist que està molt conservat al llarg de les espècies (Allis *et al.*, 1985; Sobel *et al.*, 1995). També s'ha descrit que la histona H4 acetilada a K5 i K12 forma part d'un complex d'assemblatge de la cromatina de *Drosophila* (Tyler *et al.*, 1999). L'acetiltransferasa de llevat Hat1 és la responsable d'aquesta acetilació a la histona H4 (Dutnall *et al.*, 1998). Pel què fa a la deposició de la histona H3 la cosa està menys clara (Sobel *et al.*, 1995), no obstant, sembla que l'acetilació de la lisina 9 de la histona H3 té un paper dominant en aquest procés en organismes com el llevat o *Tetrahymena* (Sobel *et al.*, 1995; Turner and O'Neill, 1995; Kuo *et al.*, 1996).

2.2.1.1. Acetiltransferases d'histones

La reacció d'acetilació està catalitzada pels enzims acetiltransferasa d'histones (HAT), els quals transfereixen el grup acetil provinent del cofactor acetil coenzim A (acetil-CoA) al grup ϵ -aminoterminal de la lisina específica. Aquesta reacció

és revertida per les desacetilases d'histones (HDACs). *In vivo*, els dos tipus d'enzims es troben formant part de complexos multiproteics.

Els enzims HAT estan agrupats segons el seu origen cel·lular i les seves funcions, i es classifiquen en HAT de tipus A i de tipus B:

Les HAT del tipus B són acetiltransferases citoplasmàtiques i catalitzen l'acetilació lligada al transport d'histones de nova síntesi, des del citoplasma fins al nucli, on seran dipositades al DNA replicat de nou (Ruiz-Carrillo *et al.*, 1975; Allis *et al.*, 1985; Roth *et al.*, 2001).

Les acetiltransferases de tipus A són nuclears i catalitzen les acetilacions lligades a processos de transcripció (Brownell and Allis, 1996).

HAT-B

Es va identificar la primera subunitat catalítica d'una HAT-B, la Hat1, a través d'estudis realitzats a llevat (Kleff *et al.*, 1995; Parthun *et al.*, 1996). Posteriorment es va saber que aquesta subunitat era la responsable de l'acetilació de les lisines 5 i 12 de la histona H4 sintetitzada *de novo* en les cèl·lules i necessària per la deposició de nucleosomes (Chicoine *et al.*, 1986; Sobel *et al.*, 1995). Les proteïnes Hat2 i el complex CAF1 són altres components que formen part del mateix complex que Hat1, aquestes interaccionen amb les histones, i poden desencadenar funcions de remodelació i assemblatge de la cromatina, respectivament (Kaufman *et al.*, 1995; Verreault *et al.*, 1998; Imhof and Wolffe, 1999).

HAT-A

p55 va ser la primera subunitat catalítica d'una acetiltransferasa de tipus A en ser identificada a *Tetrahymena* l'any 1996 al laboratori del Dr. David C. Allis. El més sorprenent d'aquest descobriment fou la semblança que presentava la proteïna amb Gcn5, un coactivador transcripcional de llevat. Gcn5 pot ser reclutada als promotors específics que regula mitjançant la seva associació amb proteïnes Ada, les quals poden interaccionar amb activadors transcripcionals d'unió al DNA. El complex que formen Gcn5 i Ada també pot interaccionar amb la maquinària transcripcional (Brown *et al.*, 2000; Sterner and Berger, 2000). Aquest descobriment era un lligam directe

entre l'acetilació de les histones i la regulació de la transcripció (Brownell *et al.*, 1996). Amb tota aquesta informació es va poder acabar de donar forma a un model que proposava el reclutament de les acetiltransferases d'histones a regions específiques de promotors mitjançant proteïnes que s'uneixen al DNA (Brownell and Allis, 1996; Wolffe and Pruss, 1996). Posteriorment van venir molts experiments d'identificació de proteïnes coactivadores amb activitat HAT intrínseca com: GCN5 de mamífer i el seu ortòleg PCAF (p300/CBP Associated Factor) (Yang *et al.*, 1996), CBP (CREB-Binding Protein) (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996), p300 (Ogryzko *et al.*, 1996), el factor de transcripció TAF_{II}250 (Mizzen *et al.*, 1996; Dunphy *et al.*, 2000) i Nut1 (Lorch *et al.*, 2000), els coactivadors de receptors d'hormones nuclears com SRC1 (Steroid Receptor Cofactor 1) i ACTR (Activator of Thyroid and RA receptor) (Chen *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1997). Com hem mencionat anteriorment, les primeres proteïnes identificades com a HATs ho havien estat com a coactivadores de la transcripció, és a dir, feien de proteïnes pont entre proteïnes d'unió al DNA i activadors de la transcripció. No obstant, existeixen proteïnes d'unió al DNA que, a més, tenen activitat HAT intrínseca com ATF2 (Kawasaki *et al.*, 2000).

Les acetiltransferases d'histones estan classificades en cinc famílies diferents segons les seves semblances estructurals i els dominis que contenen. Cada família es caracteritza pel tipus de seqüència; els membres d'una mateixa família tenen una altíssima similitud de seqüència (Kuo and Allis, 1998). Cada família de HATs té preferències per a substrats diferents, i també s'especialitzen en diferents processos cel·lulars. A continuació s'especifiquen algunes de les característiques principals d'aquestes famílies que trobem resumides a la Taula III de l'annex 1.

Membres de la família GNAT

El nom de GNAT prové de Gcn5 N-acetiltransferasa (Gcn5-related N-acetyltransferase) (Neuwald and Landsman, 1997). Membres destacats d'aquesta superfamília són Gcn5, PCAF (Yang *et al.*, 1996), o Hat1 –l'acetiltransferasa citoplasmàtica- (Kleff *et al.*, 1995; Parthun *et al.*, 1996). Tant els membres de la **família de GCN5 i PCAF** com els de la **família d'acetiltransferases relacionades amb GNAT (GNAT-related)** tenen quatre motius estructurals molt ben conservats, que s'anomenen de A-D, això és el que permet que aquestes dues famílies d'acetiltransferases puguin ser agrupades en una superfamília. El motiu A és el que està més conservat i conté Arg/Gln-X-X-Gly-X-Gly/Ala, una seqüència molt important pel reconeixement i unió de

l'acetil-CoA (Grunstein, 1997; Dutnall *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1998). Els membres d'aquesta família tenen en comú: un domini aminoterminal que és variable en longitud, el domini HAT que està molt conservat, un domini d'interacció amb Ada2 i el bromodomini a la regió carboxiterminal. Per últim, en qüestió d'especificitat, cal dir que Gcn5 i PCAF són força més específiques de la histona H3 que no pas de la histona H4, concretament mostren una preferència per la lisina 14 de la histona H3 (Kuo *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998).

A continuació es descriuen breument les característiques dels dominis HAT i bromo d'aquesta família d'acetiltransferases:

Estructura del domini HAT

Estudis estructurals del domini catalític de PCAF humà (Clements *et al.*, 1999) i de Gcn5 de llevat i *Tetrahymena* (Rojas *et al.*, 1999) han destapat el contingut d'aquest domini, el qual està constituït per cinc hèlix α i sis cadenes β . El centre conservat, constitueix el lloc d'unió a l'acetil-CoA, conté Arg/Gln-X-X-Gly-X-Gly/Ala, una seqüència molt important pel reconeixement i unió de l'acetil-CoA (Grunstein, 1997; Dutnall *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 1998). Estudis en la mateixa línia, també han suggerit que la seqüència del pèptid H3 s'uneix a l'enzim a través d'una seqüència que envolta la lisina 14 de la histona H3, Gly-Lys14-X-Pro (Kuo *et al.*, 1996). El grup de Clements (Clements *et al.*, 2003) va resoldre l'estructura de tGcn5 junt a l'acetil-CoA i a un pèptid que està fosforilat a la serina 10 de la histona H3, i van veure que el cofactor es troba col·locat a la superfície de l'acetiltransferasa, de manera que està molt pròxim a la lisina 14 de la histona H3. Això explica els experiments realitzats l'any 2000 per Cheung, on es veu que la serina 10 de la histona H3 participa en la senyalització de la lisina 14 de la mateixa histona (Cheung *et al.*, 2000).

Estudis de cinètica i enzimàtics, d'altra banda, evidencien que l'existència d'un complex ternari entre l'acetiltransferasa, l'acceptor acetil-CoA i el pèptid H3 és necessària abans que es produeixi la reacció catalítica (Tanner *et al.*, 1999; Lau *et al.*, 2000; Tanner *et al.*, 2000; Tanner *et al.*, 2000).

El Bromodomini

El bromodomini es troba en moltes proteïnes associades a la cromatina, i és un mòdul d'uns 110 aminoàcids aproximadament. La proteïna Brahma de *Drosophila* és la que li dóna aquest nom, donat que fou la primera proteïna on es va identificar aquest domini (Tamkun *et al.*, 1992). Podem trobar tres famílies de proteïnes diferents que contenen dominis bromo: (i) les acetiltransferases d'histones, les quals inclouen Gcn5, PCAF i TAF_{II}250 (veure Figura I6); (ii) els complexos de remodelació de la cromatina que utilitzen l'energia de la hidròlisi de l'ATP, que inclouen Brahma, Swi2, Snf2 i Brg1; (iii) la família BET (Bromodomain and ET domain), que inclou Bdf1, Bdf2, Brd4 i Brd2, i la qual és la menys ben caracteritzada de totes (de la Cruz *et al.*, 2005).

Els primers estudis *in vitro* que identificaven el primer domini bromo, van ser realitzats per Dhalluin l'any 1999. Es va resoldre l'estructura per ressonància magnètica nuclear (RMN) de PCAF, i es va veure que s'unia a les histones que tenien les lisines acetilades (Dhalluin *et al.*, 1999) (Veure Figura I6).

Més recentment, el grup de la doctora Ozato, mitjançant la tècnica de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), ha observat que els bromodominis de les proteïnes que analitzen, Brd2, TAF_{II}250 i PCAF reconeixen selectivament les lisines acetilades de les histones, essent selectives per: la lisina 12 de la histona H4, les lisines 9 i 14 de la histona H3 i les lisines 8, 12 i 16 de la histona H4 respectivament; per últim, veuen que l'especificitat de PCAF és per les histones H3 i H4, però no per les histones H2A i H2B (Kanno *et al.*, 2004). D'altra banda, estudis realitzats amb el bromodomini de Gcn5 de llevat, demostren que hi ha una especificitat per les lisines de les histones que reconeixen (Owen *et al.*, 2000). Mentre que el que determina l'especificitat de la unió de la lisina al domini bromo és la pròpia lisina acetilada, el que acaba de fer possible aquesta unió són els residus que envolten la modificació. S'han publicat diferents treballs on es descriuen altres residus propers a la lisina acetilada de la histona que també estableixen contactes amb el bromodomini. Per exemple, l'acetiltransferasa Gcn5 de llevat interacciona específicament amb la lisina 16 de la histona H4, però no únicament això, també reconeix la histidina 18 i l'arginina 19 properes a la lisina 16 (Hudson *et al.*, 2000; Owen *et al.*, 2000).

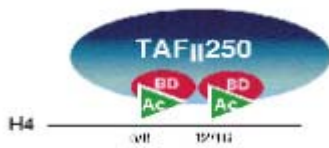


Figura I6: Bromodomini de TAF_{II}250. Aquesta acetiltransferasa reconeix dos residus lisina acetilats a través del seu doble bromodomini.

A aquest domini se li poden atribuir diverses funcions. Entre els efectes que té la interacció del bromodomini d'una proteïna amb les lisines acetilades de les histones s'inclouen: l'activació de la transcripció, el manteniment de l'acetilació en la cromatina, l'assemblatge i organització en estructures d'alt ordre de la cromatina, fins al manteniment de la memòria cel·lular (Fry and Peterson, 2001; Agalioti *et al.*, 2002; Hassan *et al.*, 2002; Kanno *et al.*, 2004).

PCAF

PCAF (p300/CBP Associated Factor), tal i com indica el seu nom, és una acetiltransferasa d'histones associada als coactivadors transcripcionals CBP i p300, així va ser descrita pel Dr. Yang i es seus col·laboradors l'any 1996 (Yang *et al.*, 1996). Al seu extrem Ct, d'alta homologia amb la proteïna de llevat Gcn5, és on posseeix l'activitat HAT tant en llevats com en humans (Yang *et al.*, 1996), i acetila amb prioritat la histona H3 a nucleosomes. A més de tenir alta homologia amb GCN5 de llevat, també és homòloga a p55 de *Tetrahymena*, la qual va ser la primera HAT identificada (Brownell *et al.*, 1996). A través de la seva regió Nt s'uneix a p300/CBP i pot coactivar diferents activadors transcripcionals com MyoD o receptors d'hormones nuclears (Yang *et al.*, 1996; Puri *et al.*, 1997; Blanco *et al.*, 1998) i s'ha mostrat que és essencial per a la inducció de la diferenciació muscular (Puri *et al.*, 1997). PCAF, tal i com es mostra a la Figura I7, és una proteïna de 832 aminoàcids, que té un pes molecular d'uns 90 KDa. Presenta diferents dominis funcionals: a l'extrem Nt s'uneix al coactivador CBP (Ogryzko *et al.*, 1996); a l'extrem Ct presenta el Bromodomini; té una regió HAT que comprèn els aminoàcids 352-658; i la regió ADA2 adjacent a la regió HAT, que és un lloc d'unió a moltes proteïnes, entre les quals hi ha E1A -que bloqueja la seva interacció amb CBP, alterant la regulació transcripcional-, així com factors de transcripció com E2F i MyoD.

Al medi cel·lular es pot trobar formant part de complexos grans amb més de 20 polipèptids associats (Ogryzko *et al.*, 1998). En aquest complex hi ha els homòlegs humans dels cofactors transcripcionals: yADA2, yADA3, ySPT3 i diferents TAFs (Factors d'associació a factors de transcripció: TF_{II}D) en humans. S'ha vist que alguns d'aquests TAF tenen alta homologia amb les histones H3, H4 i H2B, cosa que fa pensar en la presència d'una subestructura que imitaria un octàmer d'histones (Hoffmann *et al.*, 1996).

Si s'havia descrit primerament PCAF com un coactivador de CBP; el grup del Dr. Kouzarides l'any 1998 va mostrar que la proteïna PCAF per si sola podia regular al transcripció independentment de CBP però depenent directament de la seva activitat HAT (Reid *et al.*, 1998). També mostraven que podia unir-se a la proteïna de l'adenovirus E1A, i que aquesta unió també era independent de CBP, i que això impedia la transcripció mitjançada per PCAF.

Recentment, s'ha descrit la interacció de PCAF amb HDAC1, la qual cosa dóna suport a la idea que les acetiltransferases poden controlar la transcripció reclutant activitats desacetilasa (o a l'inversa), i augmentar el grau de complexitat en el mecanisme de regulació transcripcional per acetilació/desacetilació (Yamagoe *et al.*, 2003). En la mateixa línia, hi ha altres treballs que relacionen les acetiltransferases amb desacetilases com l'associació entre CBP i Sir2 (Newman *et al.*, 2002), o p300 i HDAC6 (Girdwood *et al.*, 2003).



Figura 17: Esquema de la proteïna PCAF. Es representen els dominis més importants, s'indiquen algunes proteïnes implicades en diferents processos funcionals que realitza, i els seus llocs d'interacció.

Família d'acetiltransferases relacionades amb GNAT

Aquesta família de N-acetiltransferases, presenta una alta homologia amb la família de GCN5/PCAF. Membres destacats d'aquesta família són Hat1, l'acetiltransferasa citoplasmàtica que està relacionada amb el procés de deposició de nucleosomes en la cromatina de nova síntesi, i podem trobar-la des de llevats fins a humans (Kleff *et al.*, 1995; Parthun *et al.*, 1996). Una altra acetiltransferasa relacionada amb el procés de transcripció, es tracta de Elp3 la qual pertany a un complex que participa en el procés d'elongació de la transcripció és Elp3 de llevats (Wittschieben *et al.*, 1999).

Família CBP

CBP i p300 són els membres d'aquesta família, i encara que tenen una extensa homologia entre elles, anàlisis genètics i moleculars suggereixen que a més de tenir moltes funcions solapades, també en tenen d'exclusives. En aquest treball es descriurà únicament CBP, tot i que moltes de les seves característiques poden ser compartides amb p300.

CBP

CBP (CREB Binding Protein) va ser identificada com una proteïna que s'uneix a la proteïna E1A de l'adenovirus i al factor de transcripció (FT) CREB quan està fosforilat (Chrivia *et al.*, 1993; Eckner *et al.*, 1994). CBP no s'uneix directament al DNA, però és reclutada als promotors a partir de factors de transcripció d'unió al DNA. És una molècula de 2441 aminoàcids amb un pes molecular d'uns 200 KDa. A la Figura 18, es mostren els diferents dominis funcionals de la proteïna. Podria dividir-se en tres regions clarament diferenciades, els dos extrems, l'amino- i el carboxiterminal són dominis de transactivació, mentre que la regió central és on es concentra l'activitat acetiltransferasa de la proteïna. Concretament, l'extrem Nt té una regió d'unió a receptors d'hormones nuclears. L'extrem Ct és una regió rica en glutamines, que actua com a domini d'activació, també és el lloc d'unió a la proteïna supressora de tumors p53. CBP conté tres dominis dit de zinc, rics en cisteïna, que s'uneixen a múltiples factors, tal i com es mostra en el mapa de la proteïna (Figura 18): c-jun (Bannister *et al.*, 1995), c-Myb (Dai *et al.*, 1996; Oelgeschlager *et al.*, 1996), c-fos (Janknecht, 1995),

TF_{II}D (Ferrerri *et al.*, 1994), MyoD (Yuan *et al.*, 1996; Sartorelli *et al.*, 1997), PCAF (Yang *et al.*, 1996), receptors d'hormones nuclears (Janknecht and Hunter, 1996; Kamei *et al.*, 1996), E2F (Martinez-Balbas *et al.*, 2000), RNA Helicasa A, oncoproteïnes virals com E1A de l'adenovirus, l'antigen T de SV40 i E6 de HPV papillomavirus humà (Eckner *et al.*, 1994; Eckner *et al.*, 1996).

CBP posseeix activitat HAT (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996). És capaç d'acetilar les quatre histones del *core* nucleosomal. S'ha vist que l'activitat HAT de CBP és requerida per les funcions d'activació transcripcional (Roth *et al.*, 2001) i que el domini HAT de CBP pot estimular la transcripció quan és dirigit a un promotor, aquest procés és específic de promotor i depèn de l'activitat acetiltransferasa (Martinez-Balbas *et al.*, 1998).

CBP acetila altres substrats diferents a les histones com els reguladors transcripcionals EKLF, GATA-1, p53 i E2F1. Aquesta acetilació incrementa la capacitat d'E2F, p53 i GATA1 d'unir-se al DNA, estimulant per tant, l'activitat transcripcional. També promou l'activació transcripcional EKLF (Imhof *et al.*, 1997; Boyes *et al.*, 1998; Sakaguchi *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999). També s'ha vist que CBP pot co-immunoprecipitar junt a una activitat metiltransferasa d'histones, que metila la histona H3 a les lisines 4 i 9 (Vandel and Trouche, 2001). CBP és fosforilat per la quinasa CDK2, present en la transició G1/S del cicle cel·lular (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998). La fosforilació de CBP incrementa la seva activitat HAT *in vitro*. Aquest canvi pot activar l'expressió de gens en fase S, que en principi estan reprimits en fase G1 (Goodman and Smolik, 2000).

CBP és un coactivador transcripcional que s'uneix a varis factors de transcripció (Chan and La Thangue, 2001). Aquesta característica li confereix la capacitat de participar en múltiples esdeveniments transcripcionals dependents de senyals. El fet de participar en diferents vies d'expressió gènica controlades per senyals cel·lulars comporta que hi hagi un gran control de CBP; aquest pot donar-se a diferents nivells: mRNA, degradació de proteïna, o bé des de la mateixa activitat de la proteïna.

Estudis en ratolins *Knockout* per p300 i CBP, és a dir, nuls per l'expressió d'aquestes dues proteïnes, mostren que aquestes són molt importants per la regulació del cicle cel·lular i la diferenciació (Yao *et al.*, 1998). El locus de CBP humà es troba a

la regió cromosòmica 16p13.3 (Wydner *et al.*, 1995). Aquesta regió està implicada en la Síndrome de Rubinstein-Taybi (Petrij *et al.*, 1995) i en alguns tipus de leucèmies (Borrow *et al.*, 1996). En aquest sentit, les interaccions que té CBP amb diferents factors cel·lulars com p53, mdm2 i la subunitat p65 NF-K β fa que estigui implicat en múltiples funcions i tingui una influència en el creixement i en la transformació cel·lulars (Goodman and Smolik, 2000). L'associació de p300/CBP amb p53 pot desencadenar en dues respostes paradoxals, però dependents del moment cel·lular en el qual es trobin. D'altra banda, l'associació de p300/CBP amb les proteïnes virals E1A i antigen T sembla que és important perquè aquestes puguin desenvolupar les seves propietats transformadores. Estudis realitzats amb proteïnes virals mutades per la seva associació a CBP demostren que queda obstaculitzada la seva capacitat estimuladora de creixement (Ali and DeCaprio, 2001).

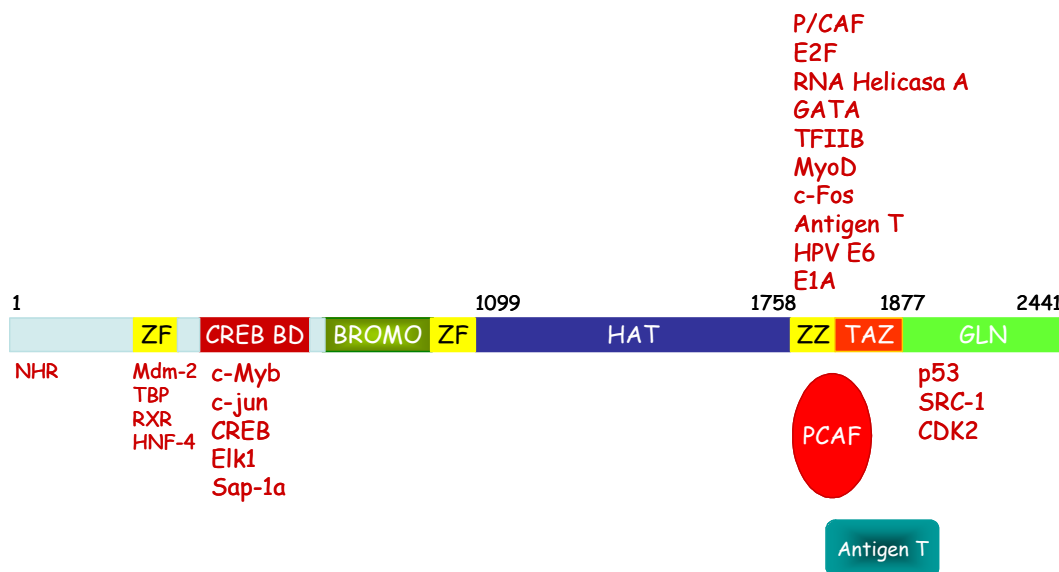


Figura 18: Esquema de la proteïna CBP. Es representen els dominis més importants, s'indiquen algunes proteïnes implicades en diferents processos funcionals que realitza, i els seus llocs d'interacció. NHR: Nuclear Hormone Receptor, regió on s'uneixen receptors d'hormones nuclears. Es representa el lloc on interacciona l'antigen T.

Família MYST

Els membres de la família MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 i Tip60), participen en funcions cel·lulars molt diverses. El primer membre d'aquesta família que va

demostrar-se que tenia activitat HAT en humans, va ser Tip60 (TAT-Interactive Protein 60 KDa) (Kamine *et al.*, 1996). Sas 2 i Sas3 juguen papers clau en el silenci gènic (Reifsnnyder *et al.*, 1996) i Esa 1 ho fa per la regulació del cicle cel·lular de llevat (Smith *et al.*, 1998; Clarke *et al.*, 1999). MOF (Male absent On First) està implicada en el mecanisme de compensació de dosi a *Drosophila* (Smith *et al.*, 1998; Clarke *et al.*, 1999; Akhtar *et al.*, 2000). La majoria dels membres d'aquesta família, exceptuant Sas2, tenen preferència per acetilar la histona H4 (concretament MOF acetila la lisina 16 de la histona H4), i contenen un cromodomini del qual s'ha demostrat la seva capacitat d'unió a l'RNA (Akhtar *et al.*, 2000). La única semblança que presenta respecte la família anterior és la presència del motiu A, al qual se li ha atribuït la funció d'unió del cofactor acetil-CoA.

2.2.1.2. Desacetilases d'histones

La reacció que s'oposa a l'acetilació de les histones és la desacetilació. Les desacetilases d'histones (HDACs) eliminen el grup acetil de les lisines de les cues de les histones, induint de manera general la repressió transcripcional a través de la condensació de la cromatina.

S'han identificat 18 gens humans que codifiquen per diferents HDACs, les quals s'han classificat en tres famílies diferents i es resumeixen a la Taula III de l'annex 1 (Gray and Ekstrom, 2001).

S'han caracteritzat de manera més profunda les desacetilases HDAC1 i HDAC2, les quals són les protagonistes per excel·lència dels complexos multiproteics SIN3-HDAC –complex repressor de la transcripció-, i NuRD-Mi2-NRD –complex de remodelació de nucleosomes i desacetilasa d'histones-, respectivament (Khochbin *et al.*, 2001).

Els complexos que contenen les desacetilases de classe I (HDAC1, 2, 3, i 8) s'uneixen a múltiples factors de transcripció, ja sigui de manera directa o indirecta, mitjançant els corepressors d'hormones nuclears NCoR (Nuclear-receptor Corepressor) i SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Th thyroid hormone receptors). Un cop portades a la cromatina, les desacetilases de classe I desacetilen les cues de les histones i indueixen la repressió transcripcional. Encara que les desacetilases de classe I s'expressin de manera exclusiva al nucli, les desacetilases de classe II

(HDAC4, 5, 6, 7, 9, 10 i 11) poden trobar-se tant al nucli com al citoplasma. Aquesta classe de desacetilases no formen part dels mateixos complexos que les de classe I, sinó que s'uneixen a corepressors d'hormones i factors de transcripció com MEF2 (Mycocyte Enhancer Factor 2), i regulen la repressió transcripcional (Fischle *et al.*, 2001).

Per últim, la tercera família de desacetilases, les Sirtuïnes, són homòlogues de Sir2, un repressor de la transcripció de llevat que requereix el cofactor NAD⁺ per a dur a terme la seva activitat desacetilasa (Imai *et al.*, 2000).

Pel que fa a llevat, s'han descrit fins a 10 tipus de desacetilases diferents. Cinc d'aquests enzims s'assemblen en la seqüència i són: Rpd3, Hda1p, Hos1p, Hos2p i Hos3p. Cal dir que Rpd3 és l'homòleg de les desacetilases de classe I, i Hda1p ho és de les desacetilases de classe II. Per últim, el grup constituït per Hst1p, 2p, 3p i 4p estan relacionades amb les desacetilases dependents de NAD⁺, les Sir2p, homòlogues de la família de classe III de desacetilases de mamífers.

HDAC1

Van ser Taunton i els seus col·legues, els qui en el seu treball publicat a *Nature* l'any 1996 van descobrir la primera desacetilasa en mamífers, la qual estava relacionada amb el corepressor Rpd3, que ja havia estat descrit bastant abans a llevat (Taunton *et al.*, 1996). La desacetilasa HDAC1 és un polipèptid de 55 KDa que presenta un 60% d'identitat de seqüència amb Rpd3 (Vidal and Gaber, 1991; Taunton *et al.*, 1996). Aquesta proteïna es troba juntament amb altres proteïnes formant complexos; un dels components d'aquests complexos és la proteïna RbAp48 (Qian *et al.*, 1993; Taunton *et al.*, 1996), la qual no sembla tenir activitat enzimàtica, però semblaria actuar de proteïna pont entre enzims modificadors d'histones i les histones del *core* nucleosomal (Parthun *et al.*, 1996; Verreault *et al.*, 1996). HDAC1 forma part del complex Sin3 de mamífers, el qual pot interaccionar amb proteïnes que s'uneixen al DNA i té un paper en la regulació transcripcional. En el grup del Dr. D. Reinberg, es va purificar i caracteritzar el complex de Sin3 en cèl·lules humanes. Van trobar que Sin3 interaccionava amb diverses proteïnes: les desacetilases HDAC1 i HDAC2, així com RbAp48 i RbAp46, i dos polipèptids nous SAP30 i SAP18, els quals van demostrar que eren importants per la repressió de la transcripció realitzada per Sin3

(Zhang *et al.*, 1997). També s'ha descrit que HDAC1 recluta a pRb per reprimir la transcripció (Brehm *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998). HDAC1 té un motiu conservat, la seqüència consens **IACEE**, per on interacciona amb pRb –per el seu domini butxaca A/B- (veure Figura I9). Cal fer notar que aquesta seqüència presenta un grau de semblança molt elevat a la que tenen algunes proteïnes virals (LXCXE) que també interaccionen amb pRb. S'han relacionat doncs, algunes proteïnes virals com E7 amb l'estimulació de promotors regulats per E2F, competint amb HDACs per a establir una interacció amb la pRb (Brehm *et al.*, 1998). D'altra banda, també s'ha observat que la seqüència LXCXE de l'antigen T de SV40 competeix amb la de HDAC1 per interaccionar amb pRb (Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998). Així doncs s'ha suggerit que algunes proteïnes virals podrien actuar sobre els complexos formats pRb-HDAC per tal de poder interferir en processos tant importants del cicle cel·lular (i que regulen ells mateixos) com són la proliferació o la diferenciació cel·lulars.

D'altra banda, s'ha descrit que HDAC1 és una fosfoproteïna susceptible de ser fosforilada per CK2 als residus serina 421 i 423. Aquesta modificació posttraduccional pot alterar la seva conformació o bé augmentar la seva capacitat d'interacció amb proteïnes del complex, la qual cosa es tradueix en un increment en l'activitat enzimàtica (Pflum *et al.*, 2001).

També s'han descrit interaccions directes entre proteïnes virals i desacetilases d'histones. Concretament, el grup del Dr. T. Kouzarides, el 1999, va identificar que la oncoproteïna E7 de HPV16 s'associava amb Mi2, HDAC1 i HDAC2, i que aquestes interaccions tenien com a resultat la promoció del cicle cel·lular en alguns promotors (Brehm *et al.*, 1999).

Però no és només la interacció entre proteïnes virals i HDACs la que pot comprometre l'expressió dels gens implicats en el creixement i la diferenciació cel·lulars. Recentment, s'ha publicat que la desacetilasa HDAC1 pot interaccionar amb p300 a través del seu tercer dit de zinc (Simone *et al.*, 2004). Aquesta interacció té com a resultat la repressió de gens regulats per p300, com p53 i MyoD. S'havien descrit anteriorment altres interaccions entre desacetilases i acetiltransferases, concretament el grup de K. Ozato l'any 2003 va veure que HDAC1 també podia interaccionar amb PCAF (Yamagoe *et al.*, 2003). Podria establir-se un complex on estiguessin implicades les tres proteïnes, donat que totes elles tenen capacitat per

interaccionar les unes amb les altres, d'aquesta manera, la interacció entre PCAF i p300/CBP podria mitjançar el reclutament de HDAC1. Això ens dona noves eines que permetrien augmentar el grau de complexitat existent en la regulació de la transcripció d'alguns promotors, podent establir-se mecanismes més acurats alhora de regular la transcripció. D'altra banda, donat que és molt important un manteniment de l'equilibri entre acetilació i desacetilació de les histones, i que petits canvis es produeixen en molt poc temps, és de gran valor el fet de poder trobar aquestes dues activitats, aparentment contraposades en un mateix complex, ja que així poden actuar coordinadament en la mesura que sigui necessari.

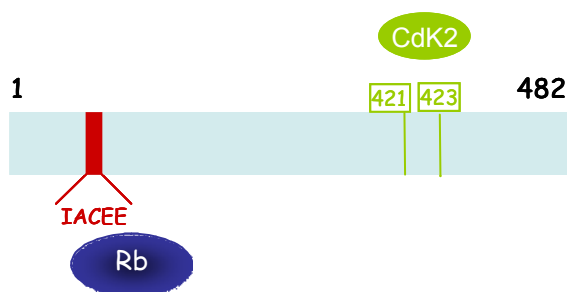


Figura I9: Esquema de la proteïna HDAC1. Pot observar-se el motiu d'interacció de la proteïna a pRb, motiu també d'interacció amb diverses proteïnes virals. S'observen dos possibles llocs de fosforilació, les serines 421 i 423, susceptibles de ser fosforilades per CK2 (Pflum *et al.*, 2001).

2.2.2. Fosforilació

La fosforilació de serines o treonines als extrems aminoterminals protuberants de les histones s'ha vist implicada en diversos processos cel·lulars. La modificació més ben caracteritzada és la que es dona a la serina 10 de la histona H3 (H3S10), la qual participaria tant en processos d'activació transcripcional com en la condensació de cromosomes durant la mitosi (Cheung *et al.*, 2000). El fet de trobar que una mateixa modificació pugui participar en dos processos *a priori* antagònics, fa pensar que les modificacions van molt més enllà d'una simple alteració estructural de la fibra cromatínica, i que probablement la participació d'altres modificacions, juntament amb l'ambient cel·lular en el qual es troben, són els que realment determinen quin procés es dona.

Uns estudis inicials, realitzats l'any 1991 per Mahadevan i els seus col·laboradors, mostraven que la fosforilació de les histones té un paper en la inducció

transcripcional dels gens de resposta immediata en cèl·lules de mamífer, com c-fos. Van trobar que la histona H3 i HMG14 eren fosforilades de manera ràpida i transitòria després de sotmetre les cèl·lules a diferents estímuls (estrès, factors de creixement) (Mahadevan *et al.*, 1991). A més, les famílies de quinases Rsk/Msk poden produir la fosforilació d'aquest residu (H3S10) de manera directa, i s'ha demostrat que la quinasa Rsk2 està implicada únicament en processos d'activació transcripcional (Sassone-Corsi *et al.*, 1999; Thomson *et al.*, 1999). En la mateixa línia, estudis realitzats a *Drosophila*, demostren que la inducció produïda en els gens del xoc tèrmic (HS) estaria relacionada amb un increment de la fosforilació de H3S10 (Nowak and Corces, 2000). Pel que fa a *S. cerevisiae*, la quinasa Snf1 actuaria en concert amb l'acetiltransferasa Gcn5 per tal de modificar el promotor del gen INO1 fosforilant H3S10 i acetilant H3K14 (Lo *et al.*, 2001). Les quinases, que anteriorment es coneixien com factors associats a la transcripció, actualment es creu que estan reclutades a regions promotores actuant com a coactivadors de la transcripció com les HATs i els complexos de remodelació de la cromatina (Berger, 2002).

Paral·lelament, Bradbury i Koshland descriuen que la fosforilació de les histones H1 i H3 (H3S10) està implicada en el procés de condensació dels cromosomes que es dona durant la mitosi (Bradbury, 1992; Koshland and Strunnikov, 1996; Strahl and Allis, 2000). També s'ha vist que H3S28 està fosforilada durant mitosi (Goto *et al.*, 1999). La fosforilació de la serina 10 comença durant la transició G2/M del cicle cel·lular, a l'inici es localitza a la regió pericentromèrica de la heterocromatina de cada cromosoma (Hendzel *et al.*, 1997). A la metafase, aquesta modificació s'expandeix al llarg de tots els cromosomes. Una mutació de substitució de la serina 10 per alanina (S10A) a *Tetrahymena* condueix a uns patrons alterats de segregació cromosòmica (Wei *et al.*, 1999), cosa que suggereix una estreta relació entre aquesta modificació i el procés de mitosi (veure Figura 110). S'han identificat les quinases Ipl1/AIR-2 de llevat i de nemàtode, i la quinasa NIMA (Never In Mitosis A) de *A. nidulans* com a quinases reguladores del procés de mitosi (De Souza *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2000). La quinasa Nek2 de mamífer, que està relacionada amb NIMA, s'ha vist que està formant complexos amb la proteïna fosfatasa 1 (PP1) (Helps *et al.*, 2000), i que l'homòleg de llevat de PP1, el Glc7 desfosforila H3 als cromosomes postmitòtics (Hsu *et al.*, 2000). Així doncs, en aquest cas també es mantindria un balanç en la fosforilació donat per aquestes proteïnes, cosa que ens indica una regulació d'aquest procés en la mitosi.

També s'ha proposat que la fosforilació participa en processos de resposta al dany al DNA (Rogakou *et al.*, 1998; Rogakou *et al.*, 1999).

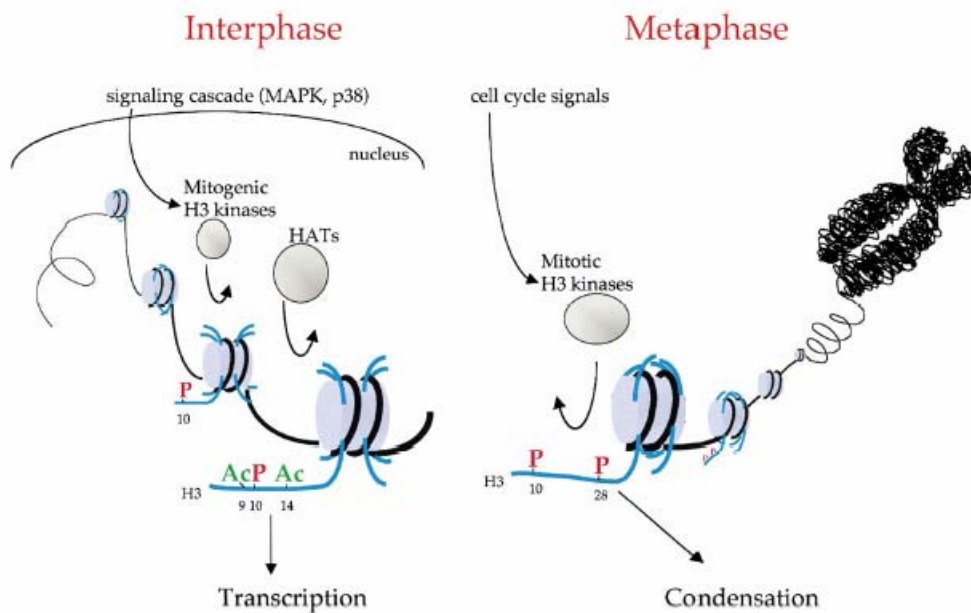


Figura I10: Exemple de com una mateixa modificació, en aquest cas la fosforilació de H3S10, pot participar en dos processos biològics totalment diferents, segons les combinacions que s'estableixin amb altres modificacions (Cheung *et al.*, 2000).

2.2.3. Metilació

La metilació de les histones va ser descrita per primera vegada el 1964 (Murray, 1964). Es caracteritza, entre d'altres coses, perquè es pot donar en dos tipus de residus, les arginines (R), i les lisines (K). És possible que la metilació indueixi alteracions en l'arquitectura de la cromatina, ja sigui condensant o relaxant la seva estructura. No obstant, el grup metil és relativament petit i la seva aportació a la càrrega global de la lisina o l'arginina no neutralitza la seva càrrega, així doncs, semblaria improbable que la metilació per si sola pugui afectar de manera significativa l'estructura de la cromatina. Sembla molt més probable que generi llocs d'unió per a proteïnes reguladores que continguin dominis d'unió especialitzats (Bannister and Kouzarides, 2005).

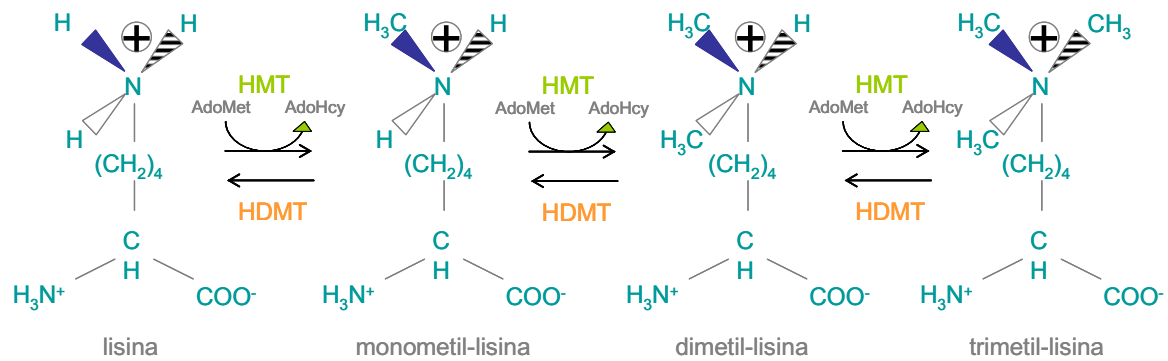


Figura I11: Reaccions de mono, di- i trimetilació en un residu lisina. Adaptat de Zhang i Reinberg (Zhang and Reinberg, 2001).

Les lisines poden estar mono-, di- o trimetilades, mentre que les arginines només poden estar monometilades o dimetilades (simètrica- o asimètricament) (Bannister *et al.*, 2002; Margueron *et al.*, 2005), això converteix la metilació en una modificació molt més atractiva que les altres, donat que n'augmenta el grau de complexitat a l'hora de ser interpretada (veure Figura I11). Els enzims que catalitzen aquestes reaccions també són diferents, les metiltransferases d'arginines i les metiltransferases de lisines. De manera general, es donen dos tipus de metilació a les histones, la metilació que es troba en regions d'heterocromatina, transcripcionalment silents, i la que es troba en regions d'eucromatina, transcripcionalment actives. Pel que fa a les primeres es pot parlar de formació de l'heterocromatina o del silenci gènic, els residus lisina típics d'aquestes regions són H3K9, H3K27, H3K79 i H4K20, i es troben metilats de maneres diferents segons la regió en la qual es troben. Per exemple, les lisines H3K9 i H4K20 trimetilades es troben enriquides en regions d'heterocromatina pericentromèrica, mentre que la histona H3K27 trimetilada està enriquida al cromosoma X inactiu (Rougeulle *et al.*, 2004; Schotta *et al.*, 2004; Bannister and Kouzarides, 2005). L'any 1999 Strahl i el seu grup donen una visió de la metilació alternativa a la que hi havia fins aquell moment. Van trobar la metilació en llocs de cromatina activa de *Tetrahymena*, cosa que comporta de manera inherent un cert dinamisme en la modificació. Es va haver de començar a canviar d'idea, ja no només es tractava d'una modificació molt estable, sinó que es trobava en cromatina activa, la qual cosa requeria cert dinamisme (Strahl *et al.*, 1999). A les regions transcripcionalment actives, també hi ha diferents residus que esdevenen metilats depenent dels gens que regulen, són principalment les lisines de les histones H3K4 i H3K36. Els estudis realitzats per Santos-Rosa i els seus col·legues l'any 2002 revelaven que la dimetilació a la lisina 4 de la histona H3 era present, de manera

general, en gens inactius -però amb potencial per activar-se- de llevat, mentre que la trimetilació de la mateixa lisina s'observava només en els gens actius (Santos-Rosa *et al.*, 2002). Posteriorment, hi ha hagut més estudis en eucariotes superiors que reafirmen l'acció d'aquesta modificació. Un estudi realitzat al mateix grup liderat pel Dr. T. Kouzarides, detallava el que passava en diferents gens de pollastre que s'expressen diferencialment durant el desenvolupament, i va permetre establir nous patrons per aquesta modificació en eucariotes superiors i diferenciar-los dels ja descrits per a llevats. Es va observar la presència de la trimetilació de la lisina 4 a les regions promotores i codificadores de gens actius, i l'absència d'aquesta mateixa modificació en els gens que no s'expressen en el mateix moment del desenvolupament. No obstant, també s'establiren grans diferències respecte els resultats observats a *S. cerevisiae*, donat que també observaren aquesta modificació en gens inactius d'un locus determinat de la β -globina, de manera que es relacionava aquesta modificació amb el manteniment d'un estat de la cromatina més "relaxat". A diferència de la distribució global observada a llevat pel què fa a la dimetilació de la lisina 4 de la histona H3, en eucariotes superiors aquesta modificació es concentra de manera diferenciada a les regions codificadores dels gens, donat que a les regions reguladores dels gens s'observa una disminució o fins i tot una manca de la modificació (Schneider *et al.*, 2004). El que sí queda clar, és que tant la di- com la trimetilació, estan lligades a la transcripció activa dels gens.

2.2.3.1 Metiltransferases d'histones

La metilació és una reacció catalitzada per proteïnes metiltransferasa d'histones (HMTs). Aquesta reacció té dos residus principals que actuen com a substrats, i són els que diferencien les dues principals classes de metiltransferases: les metiltransferasa d'arginines (PRMTs) i les metiltransferases de lisines. Les HMTs de lisines contenen un domini comú, el domini SET. Cal dir però, que existeix una família de HMT que no contenen el domini SET, entre les quals hi ha la metiltransferasa de lisines Dot1 (Ng *et al.*, 2002; van Leeuwen *et al.*, 2002), la qual és específica per el substrat H3K79, una modificació lligada a regions d'euromatina (Ng *et al.*, 2003). Fins fa molt poc es creia que la metilació era una modificació bastant estable, donat que no es coneixia cap activitat catalítica capaç de revertir-ne la seva acció. Però a finals de l'any 2004, els descobriments de Shi i els seus col·laboradors van deixar enrere tota mena de dubtes al revelar l'existència d'una desmetilasa de lisines d'histones capaç de revertir la metilació de H3K4 (Shi *et al.*, 2004). Recentment, s'ha pogut veure que

aquesta mateixa desmetilasa, LSD1, també tindria capacitat per desmetilar la histona H3K9 de manera dependent de la transcripció en el promotor del receptor d'andrògens (Metzger *et al.*, 2005).

Domini SET

El nom de domini SET prové de tres proteïnes on s'ha trobat aquest domini: S(var)3-9, E_z i Tritorax. Aquest domini pot dividir-se en tres regions SET-N, SET-I i SET-C, que van de la regió Nt fins a la Ct. La regió central, està constituïda per 130 residus aproximadament. És a la regió SET-C on es produeix la transferència del grup metil, que prové del cofactor S-adenosilmetionina, a la lisina diana. Una diferència rellevant respecte el domini HAT, és que en aquest cas, la histona i el cofactor s'uneixen a les dues cares oposades del domini SET, de manera que el contacte entre substrat i donador es dona a través d'un porus de l'enzim conservat, el canal d'accés a la lisina. Això indica també que la histona pot romandre unida al domini SET mentre les molècules del cofactor es reciclen fins que s'adquireix el grau de metilació de les lisines (mono-, di- o trimetilació) (Bottomley, 2004).

SET1

Aquí ens centrarem en la metiltransferasa que catalitza la modificació del residu H3K4, per tant es farà una breu descripció de les característiques principals de la proteïna responsable d'aquesta modificació, SET1. Aquesta proteïna pertany a la família SET1 la qual està composta per les proteïnes hSET1 (A i B) i ySET1, que es caracteritzen per què metilen la histona H3 al residu lisina 4. No obstant, membres d'aquesta família tenen funcions lligades a la regulació epigenètica de gens regulats durant el desenvolupament, proteïnes del grup tritorax (trx): EZH1, EZH2, MLL, etc. Una de les característiques més rellevants d'aquesta família és que a més del domini catalític SET, contenen un domini ric en cisteïnes adjacent al domini SET a la regió més carboxiterminal de la proteïna, el qual s'anomena POST-SET (Kouzarides, 2002).

De metiltransferases se n'han descrit moltes i probablement se'n continuaran descrivint moltes més -al igual que passa amb les HATs i HDACs-. Cadascuna té preferències de substrat ben distingides, la qual cosa implica diferents conseqüències en la varietat de processos en els que participen. No obstant, en aquest treball s'ha

analitzat únicament la metilació de la histona H3 a la lisina 4, és per això que ens centrarem només en la metiltransferasa responsable d'aquesta modificació, tot i que a la Taula IV de l'annex 1 es resumeixen les característiques principals de metiltransferases existents.

La metiltransferasa Set1 consta de 1709 aa i té un pes molecular aproximat d'uns 185 KDa en humans. El domini SET es localitza a l'extrem Ct de la proteïna i adjacent a aquest es troba el domini POST-SET. A la regió aminoterminal presenta un domini RRM (RNA Recognition Motif) (veure Figura I12). Com la majoria d'enzims existents en eucariotes no actuen en solitari, sinó que ho fan en companyia d'altres proteïnes formant complexos. Així doncs, la proteïna Set1 s'ha vist en el mateix complex que conté la proteïna Ash2 -component del grup Trithorax de *Drosophila* (LaJeunesse and Shearn, 1995)- i WDR5 -proteïna que presenta repeticions de WD40 i es postula que serveix com a mòdul de reconeixement de H3K4 di- i trimetilada (Wysocka *et al.*, 2005)-.



Figura I12: Esquema de la proteïna SET1. Es mostren el domini catalític SET a la regió carboxitèrminal, i adjacent a aquest, el domini POST-SET més a l'extrem carboxitèrminal. A la part més aminotèrminal s'observa un motiu RRM, motiu que es caracteritza per reconèixer l'RNA.

2.2.4. Ubiquïtinació i Sumoilació

Tant la ubiquïtinació com la sumoilació són modificacions posttraduccionals que es donen en les proteïnes, i concretament en les lisines de les histones. La reacció que es dona és reversible i les funcions que se'ls atribueixen són tant diverses com: la regulació de la transcripció, l'estructura de la cromatina i la reparació del DNA. Possiblement els efectes de la ubiquïtinació i sumoilació són deguts a la unió de

proteïnes que tenen dominis d'unió específics per al seu reconeixement (Nathan *et al.*, 2003).

La ubiquïtina és un polipèptid de 76 aminoàcids que s'uneix als residus lisina a través de la seqüència de reaccions mitjançades per tres enzims que conjuguen la ubiquïtina: E1 (enzim activador de la ubiquïtina), E2 (enzim que conjuga la ubiquïtina) i E3 (ubiquïtina lligasa). El domini RING és el responsable d'aquesta reacció, i es coneix des de fa relativament poc. Estudis realitzats l'any 2003 han identificat el domini RING de Bre1 com la ubiquïtina lligasa que actua a H2B (Hwang *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2003). Treballs desenvolupats a *S. cerevisiae* mostren que la lisina 123 -situada a la regió Ct de la histona H2B- pot estar ubiquïtinada per la ubiquïtina lligasa Rad6. El significat biològic que se li atribueix és una participació crítica a la mitosi i la meiosi (Robzyk *et al.*, 2000). Estudis realitzats a *Drosophila* d'un enzim que està implicat en el procés transcripció TAF₁₂₅₀, indiquen que també té capacitat per ubiquïtinar la histona H1. Per tant, donades les seves activitats quinasa i acetiltransferasa addicionals, es creu que d'aquesta manera l'activitat ubiquïtina lligasa també estaria implicada en la transcripció (Pham and Sauer, 2000; Berger, 2002). Aquesta és una reacció reversible, i els enzims UBPs (Ubiquïtina proteases), són els responsables de la reacció oposada, la desubiquïtinació.

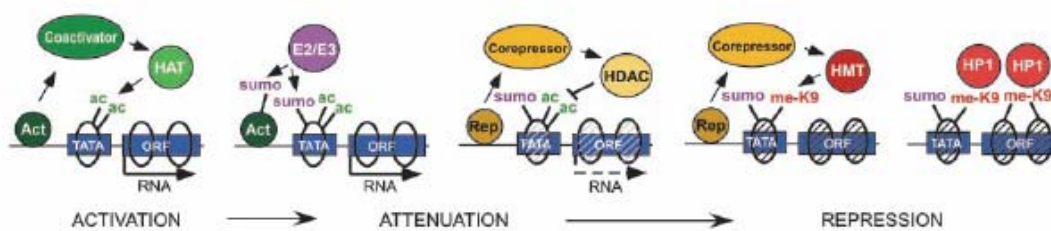


Figura I13: Model proposat per Nathan sobre la regulació de la transcripció mitjançant la sumoïlació (Nathan *et al.*, 2003). El pas d'un gen en estat actiu, un cop s'ha transcrit a un estat reprimat, requeriria una atenuació de la seva activitat. Es necessitaria la desacetilació dels residus lisina per HDACs, i una posterior captació dels enzims responsables de la sumoïlació que reclutarien el complexes necessaris per poder reprimir el gen.

D'altra banda, la sumoïlació o SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) és una reacció capaç d'introduir polipèptids tan grans com els de l'ubiquïtina en les proteïnes. Estudis realitzats per Shio i Eisenman indiquen que la sumoïlació de la histona H4 es

correlaciona amb una repressió de la transcripció. Demostraven que SUMO-H4 s'associa amb la cromatina, amb HDAC1 i HP1 (Shiio and Eisenman, 2003). En el treball de Nathan i els seus col·legues es proposa un model basat en els estudis de Shiio i Eisenmann, que esquematitza el pas d'un estat transcripcionalment actiu a un de reprimat, Figura I13.

S'ha descrit un enzim involucrat en aquesta reacció, és UBC9, el qual es troba des de llevats a humans. Pel què fa a la reacció inversa, aquesta està catalitzada per els enzims ULP-related proteases.

2.3. El Codi de les Histones

Si una cosa hauria de quedar clara d'una manera global és que la cromatina no és només un suport de la informació genètica codificada en el DNA, sinó que juga un paper molt actiu mitjançant canvis dinàmics en la funció i l'expressió gènica. Aquest polímer està preparat per integrar una gran varietat de senyals endògens i exògens cosa que li permet actuar com una plataforma de senyalització per la cèl·lula. És en les histones on convergeixen aquests senyals i ho fan concretament mitjançant les modificacions dels diferents residus en els extrems ϵ -aminoterminals protuberants, aquestes són les principals responsables d'emmagatzemar, fomentar i heretar la informació biològica.

S'ha proposat que les modificacions de les histones constitueixen un codi, l'anomenat **codi de les histones**, en el sentit d'un conjunt de modificacions col·locades de manera seqüencial o en combinació que poden exercir diferents significats biològics a la cèl·lula. La idea sorgeix de l'observació que moltes de les modificacions es donen en un mateix residu, i sovint el significat que se'ls ha atribuït és contraposat, és a dir, que moltes d'aquestes modificacions s'exclouen entre elles. De la mateixa manera, s'ha vist que una mateixa modificació quan actua en conjunció amb una altra o quan actua sola no exerceix el mateix tipus de funció.

Un dels primers protagonistes a l'hora de parlar de codi són els enzims que catalitzen les diferents modificacions. Aquestes proteïnes han de ser suficientment específiques a l'hora d'atribuir els senyals als residus receptors. Podem posar com a exemple l'especificitat de substrat que tenen els enzims HAT, com a indicatiu que no

es tracta d'una modificació que es doni a l'atzar. A la Taula II, on es resumeixen les acetiltransferases, s'assenyalen les diferents modificacions de les histones i els corresponents enzims que les catalitzen (Peterson and Laniel, 2004). Així doncs, les preferències que manifesta cada enzim són les que determinen els diferents patrons d'activació de la transcripció que s'observen. La família de HATs GCN5, catalitza la reacció acetilant preferentment la lisina 14 de la histona H3 *in vitro* (Kuo *et al.*, 1996), mentre que experiments realitzats *in vivo* mostren una acció més ampla d'aquest enzim, podent acetilar més residus que probablement també seran necessaris en aquest procés. Estudis realitzats l'any 1997, demostren que GCN5 de llevat pot acetilar específicament H3K14, H4K8 i H4K16 (Neuwald and Landsman, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Grant *et al.*, 1999; Strahl and Allis, 2000).

El pas següent a l'adjudicació d'una modificació determinada i específica de residu és la interpretació d'aquesta, a fi que aquesta interpretació es faci seguint els patrons d'un codi, cal que hi hagi una interrelació entre diferents modificacions. Tal i com s'exemplifiquen més endavant a la Figura I14 hi ha diferents tipus d'interrelacions: (i) **les que es donen a la mateixa cua de la histona** (actuació en *cis*): una combinació excloent de residus de la histona H3 ens mostra com la metilació de la lisina 9 de la histona H3 impedeix que s'acetilin les lisines 14, 18 i 23 (i òbviament la 9), i que es metili la lisina 4 de la histona H3 (Wang *et al.*, 2001). Una altra combinació implica que la fosforilació de la serina 10 de la histona H3 promouria l'acetilació de la lisina 14 de la mateixa histona, i a la vegada també impediria la metilació de la lisina 9. Una lectura inversa la tenim quan primer es metila la lisina 9, que té un paper inhibitor de la fosforilació de la serina 10 i l'acetilació de la lisina 14 de la histona H3 (Cheung *et al.*, 2000; Rea *et al.*, 2000). (ii) **Les que es donen entre histones diferents** (actuació en *trans*); en aquest sentit la metilació de la lisina 4 de la histona H3 promou l'acetilació general de les histones H3 i H4 (Wang *et al.*, 2001), o bé la ubiquitinació de la lisina 120 de la histona H2B (la 123 en llevat) promou la metilació de les lisines 4 i 79 de la histona H3 (Strahl and Allis, 2000; Briggs *et al.*, 2002; Dover *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2002; Sun and Allis, 2002). Darrerament s'ha matisat la idea de codi i s'han introduït dos nous conceptes: el **tàndem binari** de modificacions (o switch binary) i els **cassets de modificacions**. El concepte de tàndem binari s'entén com que hi hauria modificacions adjacents que actuarien de manera interdependent les unes de les altres per a establir una via de senyalització concreta. Per exemple, la metilació-fosforilació que es dona entre la lisina 9 i la serina 10 de la histona H3 respectivament, les quals no compartrien escena, seria un mecanisme local excloent d'actuació (Fischle *et al.*,

2003). Segonament, el concepte dels cassets proposa l'existència de regions o motius conservats a les cues de les histones que poden estar modificats de manera diferencial, la qual cosa podria desencadenar respostes i/o lectures diferents -sovint contraposades-, depenent del tipus de modificació present (Fischle *et al.*, 2003).

Per establir un codi, cal que hi hagi doncs, uns senyals -que en aquest cas són les modificacions en les histones-, i un reconeixement d'aquests senyals per part de proteïnes. S'ha descrit l'existència de dominis específics per reconèixer aquests senyals. Com s'ha explicat anteriorment en l'apartat de les acetiltransferases d'histones, el **bromodomini** reconeix les lisines acetilades. De bromodominis se'n troben en una gran varietat de proteïnes. És d'especial interès l'existència d'un grup de proteïnes, pertanyents a la família BET, les quals es caracteritzen perquè estan constituïdes per dominis bromo col·locats l'un al costat de l'altre, i que presenten diferents especificitats per diferents lisines acetilades en diferents histones (Kanno *et al.*, 2004). Un altre domini, el **cromodomini**, s'ha vist que és el lector de les lisines metilades en les histones. Aquest domini es va identificar per primera vegada en dues proteïnes reguladores amb propietats diferents a *Drosophila*, HP1 i Polycomb (Paro and Hogness, 1991). Posteriorment, aquestes estructures s'han identificat en diversos reguladors de la cromatina com factors de remodelació de la cromatina, acetiltransferases d'histones i metiltransferases d'histones (Jones *et al.*, 2000; Eissenberg, 2001; de la Cruz *et al.*, 2005). A part d'unir-se a histones, s'ha vist que hi ha cromodominis que únicament s'uneixen a l'RNA i/o al DNA (Akhtar *et al.*, 2000; Bouazoune *et al.*, 2002). Per últim, el **domini SANT**, que s'uneix a histones no modificades, va ser identificat en corepressors de receptors nuclears. Es tracta d'un motiu petit, de tan sols 50 aminoàcids, i que posseeix una forta semblança amb el domini d'unió al DNA de les proteïnes relacionades amb c-Myb (Aasland *et al.*, 1996). Aquest domini el podem trobar en complexos d'enzims de remodelació de la cromatina dependents d'ATP, en metiltransferases d'histones (HMTs) i en diverses proteïnes que formen part de complexos HAT i HDAC (de la Cruz *et al.*, 2005). La principal funció d'aquest domini és estabilitzar, a través d'una unió directa, els extrems Nt de les histones en una conformació que afavoreixi la seva unió als enzims modeladors i es pugui donar la subseqüent catàlisi (Strahl and Allis, 2000; Jenuwein and Allis, 2001).

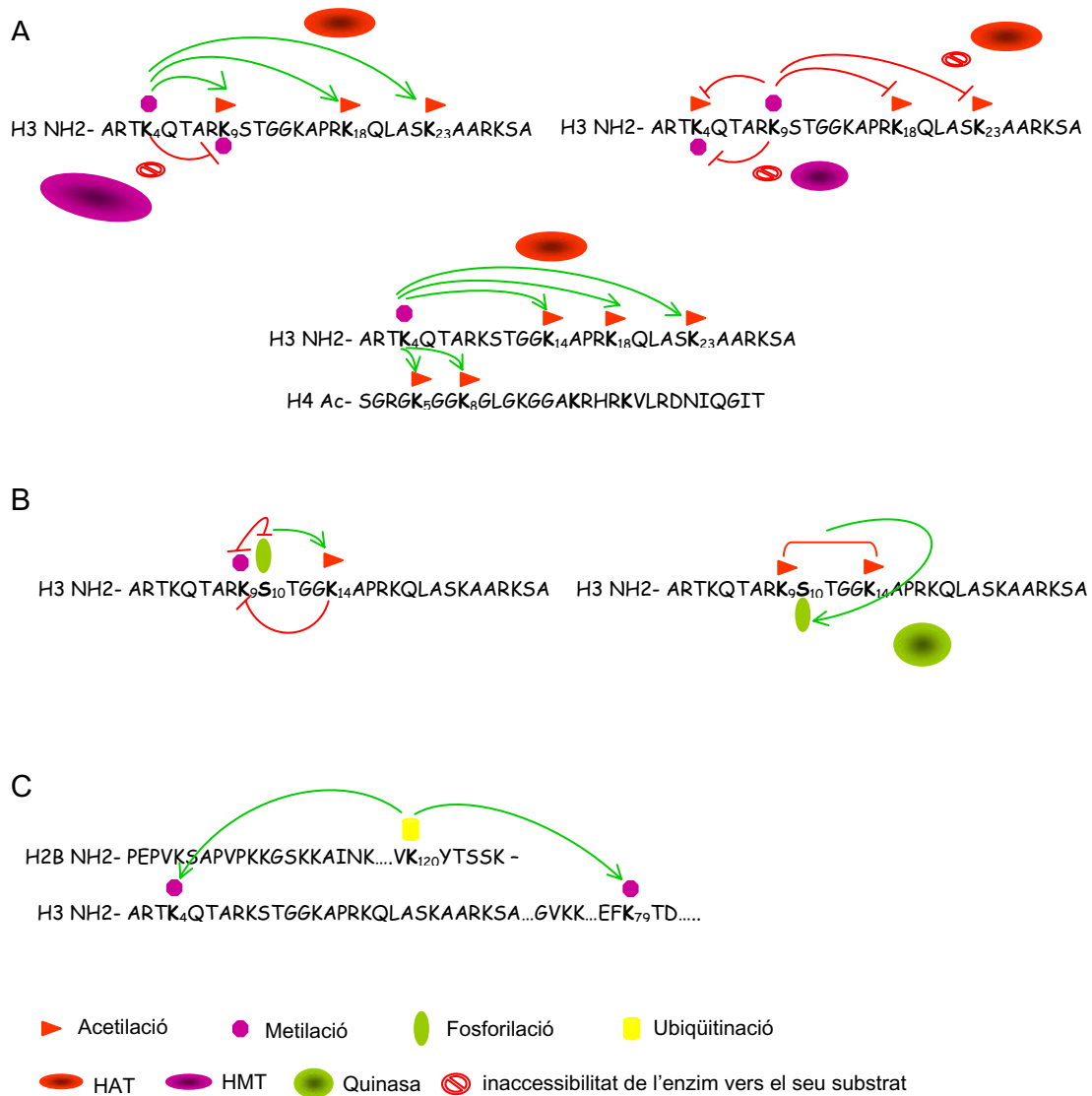


Figura I14: Codi de les histones. Interrelació de les diferents modificacions de les histones que estableixen diverses combinacions per definir un codi que serà interpretat per enzims que reconeixen les modificacions i traduït en significats biològics diversos. A) Una mateixa modificació en un mateix residu pot tenir respostes diferents segons les modificacions que s'estableixin al seu costat o bé segons la prioritat i ordre en què s'estableixin. Per exemple, la metilació de H3K4 pot afavorir una acetilació per part de p300 de les lisines 9, 18 i 23 de la histona H3, i fent més extensiva la resposta, les histones properes a H3, com la histona H4 també pot esdevenir acetilada als residus lisina 5 i 8; no obstant, si primer es produeix la metilació de la lisina 9 de la histona H3, queda impedita l'acetilació dels residus lisina adjacents i també la metilació de H3K4 (Wang *et al.*, 2001). B) La fosforilació de la serina 10 de la histona H3 pot afavorir l'acetilació de la lisina 14 de la histona H3 (i a l'inversa), i inhiuix la metilació de la lisina 9 de la histona H3 (Cheung *et al.*, 2000; Rea *et al.*, 2000). C) La ubiquitinació de la lisina 120 de la histona H2B s'ha vist implicada en l'establiment de la metilació de les lisines 4 i 79 de la histona H3 (Briggs *et al.*, 2002; Dover *et al.*, 2002; Sun and Allis, 2002; Ng *et al.*, 2003).

3. El Virus SV40

Encara que només una petita part dels càncers humans tenen una etiologia viral, l'estudi dels tumors provocats per virus de DNA que transformen cèl·lules de rosegadors i humanes ha permès avançar en el coneixement dels esdeveniments moleculars que participen en la programació d'un fenotip maligne. En aquest sentit, ha esdevingut rellevant la investigació de les oncoproteïnes codificades per virus. Aquestes s'han vist relacionades amb la pertorbació de certes vies regulades per proteïnes crucials en el control de la proliferació i supervivència cel·lulars per a establir la transformació cel·lular (Chen and Hahn, 2003). Dins la família dels papovavirus, que són virus de DNA, hi podem trobar SV40 (Simian Virus 40) (Melnick and Stinebaugh, 1962). Aquest virus va ser aïllat el 1960 quan s'experimentava per obtenir vacunes contra la poliomielitis (Sweet and Hilleman, 1960).

Els virus poden tenir dos tipus de cicles vitals, segons es trobin infectant un tipus cel·lular permissiu o no permissiu. Un tipus cel·lular permissiu es caracteritza per què produeix determinades proteïnes o factors que l'ajuden a replicar el seu DNA i a fabricar les partícules virals filles per poder ser alliberades de la cèl·lula, l'objectiu del virus en aquest ambient permissiu és la infecció i destrucció de la cèl·lula, es diu que el virus realitza un cicle lític. D'altra banda, un tipus cel·lular no permissiu, no presenta aquests factors, el DNA viral s'integra de manera latent en el genoma eucariota i es desencadena un procés de transformació cel·lular, el virus entra en un cicle lisogènic.

L'hoste natural (tipus cel·lular permissiu) de SV40 són les cèl·lules de ronyó de mono verd Africà. El seu cicle lític s'inicia quan aquest virus infecta una cèl·lula permissiva i el genoma víric accedeix al nucli cel·lular, és transportat fins al nucli on es desfà de la càpside i s'allibera el contingut genètic. Durant les primeres 10-12 hores s'esdevé l'expressió de les proteïnes primerenques virals, les quals necessiten i utilitzen la maquinària basal de la cèl·lula hoste per realitzar aquest procés, reconduint les cèl·lules a la seva fase S. L'antigen T pot regular negativament els seus nivells d'expressió quan aquests han assolit un llindar determinat, que normalment succeeix a les 16 hores posteriors a la infecció, immediatament després d'això comença el procés de replicació del seu DNA, el qual es dona fins a les 36 hores després de la infecció. Paral·lelament es donen altres esdeveniments, i no menys importants per al virus, com són l'expressió de les proteïnes tardanes VP1, VP2 i VP3 (Viral Protein), les

responsables de l'encapsidació, i la proteïna agno, que semblen participar en algun moment de l'assemblatge del virus i de la seva sortida de la cèl·lula hoste respectivament. A les 48 hores posteriors a la infecció, el minicromosoma -així se l'anomena donada la seva estructura i composició- comença a associar-se a les proteïnes de la càpside per tal de formar-se els virions. Es produeix una lisi cel·lular i les partícules víriques s'expandeixen cap a les cèl·lules circumdants, això es dona durant els últims moments de la infecció, entre les 60 i 70 hores postinfectives.

El virió de SV40 té 45 nm de diàmetre i el seu genoma està constituït per 5243 pb (Fiers *et al.*, 1978); Tooze, 1980). El seu DNA és circular i de doble cadena, i adopta una estructura superenrotllada (Vinograd *et al.*, 1965).

S'associa a les histones de l'hoste H2A, H2B, H3 i H4 -no s'ha vist associat a la histona H1- (Varshavsky *et al.*, 1976) generant-se el que seria la cromatina vírica (Kornberg, 1974; Kasamatsu and Wu, 1976), la qual s'estructura en 26 nucleosomes, envoltats cadascun per 200 pb de DNA (Tooze J, 1980). Aquesta estructura genòmica del DNA de SV40 s'anomena minicromosoma, degut a la semblança estructural que té amb la cromatina eucariota.

SV40 optimitza al màxim la poca quantitat d'informació genètica de què disposa. L'estratègia que segueix és la de col·locar els gens de manera sobreposada i fent-los compartir una única regió reguladora -d'uns 400 pb aproximats-, que no es tradueix i que conté els elements de control de la transcripció i la replicació. Aquesta regió de control es divideix en l'origen de replicació, que és únic, un domini ric en G i C i que conté llocs d'unió a Sp1 i comprèn part del promotor primari, i una àrea potenciadora (o *enhancer*) de 72 pb (Butel and Lednický, 1999). El genoma víric codifica per dos tipus de proteïnes, que es distingeixen segons el seu moment d'expressió, són les proteïnes primerenques i tardanes.

Les proteïnes primerenques són: l'antigen T, l'antigen t, i l'antigen 17K T. Aquestes participen tant en processos d'infecció com de transformació. Tant els antigens T gran com t petit són actives en la inducció d'un fenotip neoplàsic en cèl·lules de cultiu, però T és essencial en aquest procés (Sleigh *et al.*, 1978; Lewis and Martin, 1979; Kriegler *et al.*, 1984; Brown *et al.*, 1986; Jat *et al.*, 1986; Bikel *et al.*, 1987). Tant l'antigen T com l'antigen t són essencials per què es doni la replicació del DNA viral, així com per induir transformació cel·lular. L'antigen T i les seves

DNA víric unint-se a l'origen de replicació (això ho fa a través d'un domini d'unió específic de seqüència), es responsabilitza d'iniciar les rondes de replicació (Tegtmeyer, 1972). De la mateixa manera, estableix la transcripció de gens que tenen una expressió a la fase tardana (Brady *et al.*, 1984), i coordina la regulació negativa de la transcripció de gens de la fase primerenca, quan s'assoleixen uns determinats nivells de proteïna (Rio *et al.*, 1980; Tjian, 1981). Té la capacitat d'unir-se a AP2 (Mitchell *et al.*, 1987), a la DNA pol α , a l'adenina, i de manera inespecífica al DNA. També s'ha vist que pot ser acetilada principalment per CBP al residu lisina 697 (Poulin *et al.*, 2004).

Se li atribueixen múltiples activitats bioquímiques com són l'activitat helicasa i ATPasa (Wiekowski *et al.*, 1987) i totes elles actuen independentment (Gluzman *et al.*, 1977). A la Figura I16 s'esquematitzen els dominis que constitueixen l'antigen T.

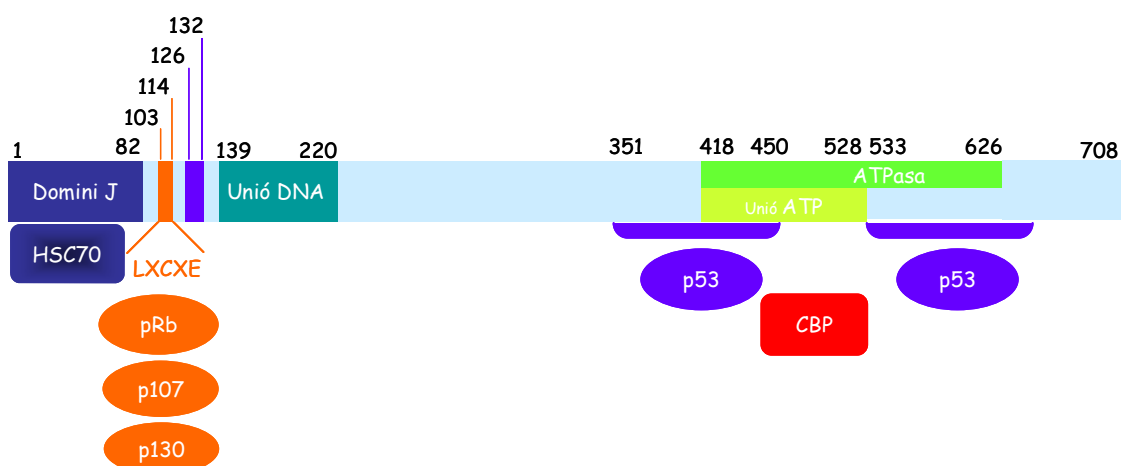


Figura I16: Esquema de la proteïna antigen T del virus SV40. Se'n detallen els diferents dominis descrits. Els dominis responsables de la transformació cel·lular: Domini J (1-82), de color blau fosc; la regió conservada LXCXE d'interacció amb les proteïnes de la família de Retinoblastoma (pRB) (103-114), de color taronja; la regió bipartida d'unió a p53 (351-450 i 533-626), de color blau. Cal destacar la interacció de l'acetiltransferasa CBP, representada amb el color vermell, localitzada aproximadament a la regió on interacciona p53. Altres dominis importants per a la proteïna són: la regió de localització nuclear NLS (Nuclear Localisation Signaling) (126-132), de color blau; la regió d'unió al DNA (139-220), de color verd fosc; la regió d'unió a l'ATP (418-528) i la d'activitat catalítica ATPasa (418-626).

Durant el procés de transformació viral és necessària una reprogramació dels processos habituals que es donen a la cèl·lula, i les proteïnes virals adopten papers

protagonistes al fer-se càrrec dels comandaments de la cèl·lula. D'aquesta manera l'antigen T estimula la transcripció de gens de la cèl·lula hoste necessaris per al procés de transformació (Tegtmeyer, 1972; Tegtmeyer, 1975). Per aquest procés hi ha tres dominis essencials:

A) A la regió Nt hi ha dos dominis bàsics per a la transformació cel·lular, que a més es complementen. D'una banda, el **Domini J** que comprèn els primers 82 aminoàcids -s'anomena així degut a la homologia que té amb la família de xaperones DnaJ- i, per l'altra, el **motiu LXCXE** que comprèn els aminoàcids 103-107. El domini J conté tres residus altament conservats, HPD (Histidina-Prolina-Aspartat, 42-44), que són essencials per la correcta fosforilació de p130 (proteïna supressora de creixement de la família de la proteïna del Retinoblastoma, pRb) (DeCaprio, 1999). Aquest domini coopera amb el motiu LXCXE (Lisina-X-Cisteïna-X-Glutàmic, on X és un aminoàcid qualsevol), que és el lloc d'unió de les proteïnes de la família de pRb (DeCaprio, 1999). Es tracta de proteïnes cel·lulars crucials en diferents processos que regulen el cicle de la cèl·lula, ja que participen en la transició de les fases G1/S del cicle, i estan regulades per processos de fosforilació. També se les ha anomenat proteïnes supressores de tumors donat que la seva absència pot conduir a processos cancerosos. A la Figura I17 s'esquemmatitza el paper de pRb en el cicle cel·lular durant la transició G1/S. Durant la fase G1, un grup de gens regulats per E2F, i que s'expressen durant la fase S estan reprimits per la proteïna pRb, aquesta repressió pot ser deguda a la interacció de pRb amb HDAC1 (Brehm *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998), la qual es dona a través del domini IACEE de HDAC1 (Taya, 1997) i el domini butxaca de pRb. En la transició de G1/ S s'activa una quinasa, cdk2, i es produeix la fosforilació de la pRb, de manera que s'allibera dels promotors que reprimia i permet que un complex activador s'instal·li sobre aquests promotors per activar-los i es pugui donar una correcta expressió dels gens necessaris per la proliferació cel·lular (Eckner *et al.*, 1996). Si s'altera aquest nivell de regulació podem tenir casos d'aturada del cicle cel·lular, cosa que es dona si la pRb esdevé no funcional. La interacció de l'antigen T amb la pRb provoca una imitació de l'estat fosforilat de la proteïna, alliberant permanentment els promotors regulats per E2F i permetent que aquests gens s'expressin alterant el cicle cel·lular (Zalvide and DeCaprio, 1995).

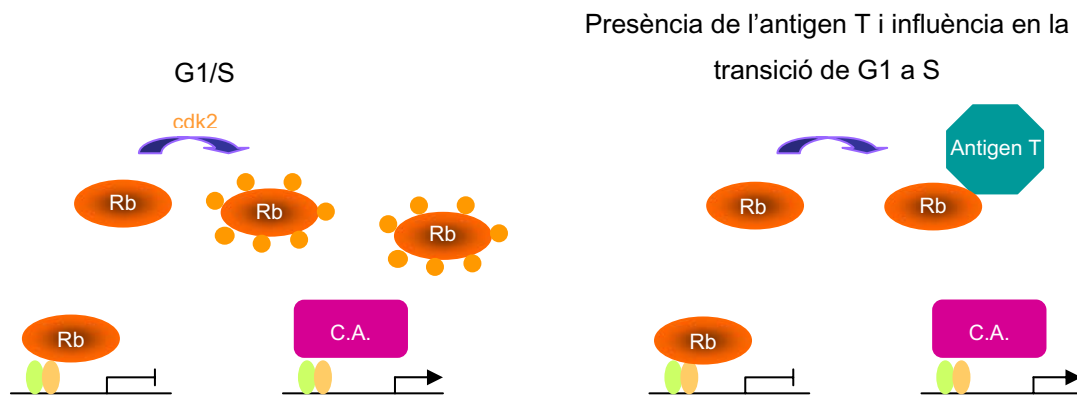


Figura 117: A l'esquerra de la figura es representa un esquema del cicle cel·lular en la transició G1/S, on actua una quinasa (cdk2) encarregada de fosforilar la proteïna del Retinoblastoma. A la fase G1, pRb no està fosforilada, i s'uneix a E2F1-DP1 (de color verd i taronja respectivament) reprimint la transcripció. A la fase S, es troba fosforilada i és desplaçada del complex activador (C.A.), permetent l'accés al complex activador i per tant l'expressió de gens de fase S. L'esquema de la dreta postula un possible rol de l'antigen T en aquest punt, actuant sobre la proteïna del Rb, i imitant l'efecte produït per la fosforilació.

B) La **regió Ct bipartida** compren els aminoàcids 351-450 i 533-626, i és la regió responsable de la unió per establir i inactivar a **p53** (Kierstead and Tevethia, 1993). Aquesta proteïna és molt important a nivell de regulació del cicle cel·lular, donat que participa en processos de dany al DNA i apoptosi. p53 està altament regulada durant el cicle cel·lular per altres proteïnes que en controlen el seu nivell d'expressió i la seva estabilitat, i generalment actua com a factor de transcripció quan s'activa algun procés de dany a la cèl·lula (Pipas and Levine, 2001). Aquesta va ser una de les primeres proteïnes cel·lulars identificada que interaccionava amb l'antigen T (Carroll and Gurney, 1982), cosa que explica el fet que mutacions a les regions d'interacció de p53 i pRb afecten la capacitat transformadora de l'antigen T (Ali and DeCaprio, 2001).

C) Una altra interacció essencial per a induir la transformació cel·lular és la que es produeix amb els coactivadors transcripcionals **p300/CBP**. Sembla que el lloc d'interacció de p300/CBP amb l'antigen T és a la regió bipartida on també s'hi uneix p53. Aquesta regió d'interacció es veu reforçada per l'efecte que té el domini LXCXE en la qualitat de la interacció, i en la fosforilació de p300/CBP per reprimir-ne la transactivació (Eckner *et al.*, 1996). S'ha observat que aquesta interacció pot alterar la fosforilació de p300/CBP, però també podria donar-se una activació de la fosfatasa que desfosforila p300. La interacció de p300/CBP amb l'antigen T antagonitza la seva

funció de transactivació en determinats promotors (Avantaggiati *et al.*, 1996; Eckner *et al.*, 1996). Sembla probable doncs, que els complexos formats per antigen T-CBP estimulen el creixement cel·lular alterant els programes d'expressió gènica. Un d'aquests programes que esdevé alterat és el de la diferenciació, hi ha estudis que demostren que la infecció de SV40 en cèl·lules diferenciades provocaria un desbloqueig de les vies de proliferació induint la transcripció de gens com MyoD (Halevy *et al.*, 1995). L'activació d'un grup de gens pot ser tant important com la repressió d'un altre grup. Eckner i els seus col·laboradors han trobat que la interacció que s'estableix entre l'antigen T i CBP forma part d'un complex ternari on també intervé la proteïna p53, suggerint que és necessària la presència de p53 perquè es doni la interacció antigen T-CBP (Eckner *et al.*, 1996). Posteriorment, un altre grup ha observat que l'antigen T pot ser acetilat mitjançant CBP, i que aquesta acetilació requereix la presència de p53. Aquest grup suggereix que una manera d'estabilitzar la interacció de l'antigen T amb p53 és mitjançant l'acetilació de la oncoproteïna per CBP (Poulin *et al.*, 2004).

Les interaccions observades entre proteïnes virals i HDACs esdevenen un altre focus d'atenció en el procés de la transformació cel·lular, que pot esdevenir complementari a les interaccions descrites anteriorment, sobretot les que es donen amb els enzims HAT. S'ha vist que la interacció de l'antigen T amb una HDAC seria molt important per a la inhibició de la replicació del DNA viral durant les primeres hores infectives.

3.2. SV40 i la transformació cel·lular

Malgrat no s'ha vist implicat el virus SV40 en l'establiment de processos cancerosos en cèl·lules humanes, s'han realitzat diversos estudis per establir els possibles mecanismes que regulen la immortalitat i la transformació en diferents tipus cel·lulars i diferents espècies (Chen and Hahn, 2003). Encara que les cèl·lules murines i les humanes comparteixen varies vies reguladores del cicle cel·lular, diversos estudis revelen diferències importants en els requisits necessaris per a la immortalitat cel·lular. En diversos tipus cel·lulars murins la pèrdua de p53 o altres supressors tumorals significa una immortalitat. No passa el mateix en les cèl·lules humanes, on un nivell de complexitat més elevat s'ha observat per l'establiment d'aquest patró. La immortalitat és un requisit indispensable per a establir la transformació cel·lular (Newbold and

Overell, 1983), les diferències observades entre cèl·lules humanes i de rosegadors en l'experiment d'immortalitat mitjançada per l'antigen T es fan extensives a la transformació per aquesta oncoproteïna viral. Els últims estudis en aquest camp proposen diferents raons que expliquen aquesta discrepància entre cèl·lules humanes i de rosegadors. Diferents barreres en les cèl·lules humanes interfereixen en la capacitat de l'antigen T per transformar (Macera-Bloch *et al.*, 2002). Les tres regions de l'antigen T, descrites anteriorment, responsables de processos de transformació en tipus cel·lulars no permissius s'ha vist que no són suficients per transformar cèl·lules humanes. No obstant, diversos grups han demostrat que l'expressió de la subunitat catalítica de la telomerasa, hTERT, en aquestes cèl·lules permet esquivar una de les barreres cel·lulars, la crisi apoptòtica, allargant els telòmers. Aquest mecanisme dels telòmers és molt diferent entre cèl·lules humanes i de ratolí. Però malgrat que la introducció de l'antigen T i hTERT és suficient per immortalitzar les cèl·lules humanes, aquesta combinació no pot transformar la majoria de cèl·lules humanes (Hahn *et al.*, 1999). Així doncs, seran necessàries més alteracions a part d'aquestes per a tenir una transformació maligna en cèl·lules humanes.

4. El Cicle Cel·lular

Es podria definir el cicle cel·lular com un conjunt d'esdeveniments ordenats, precisos i altament controlats a través dels quals les cèl·lules dupliquen el seu contingut i es separen en dues cèl·lules filles idèntiques genèticament a la cèl·lula mare. Aquest és un procés universal pel qual totes les cèl·lules es reproduïxen, i la base del creixement i desenvolupament de tots els éssers vius. Si aquest procés es porta a terme correctament, l'organisme s'assegura la seva supervivència i viabilitat, mentre que una pèrdua del control en la seva regulació esdevé dramàtica, i en resulta un augment en la inestabilitat genòmica que pot conduir a l'aparició del càncer.

4.1. Fases del cicle cel·lular

El cicle cel·lular en eucariotes és l'alternança de diferents fases per garantir una correcta duplicació i divisió del material cel·lular (veure Figura I18). Es distingeix la **Fase G1** (Fase Gap o espaiadora 1) que es troba a la sortida de la mitosi i just abans de la replicació del DNA, té una durada variable segons el tipus cel·lular però es caracteritza per un augment de mida considerable de la cèl·lula, es donen unes

activitats elevades a nivell de transcripció, síntesi proteica i la cèl·lula avalua les condicions de l'entorn i la possibilitat de continuar amb la divisió cel·lular. Just després es dona la **Fase S** (**F**ase de **S**íntesi), en la qual es replica el DNA. A continuació hi ha la **Fase G2** (**F**ase **G**ap o **e**spaiadora **2**), el període que precedeix la mitosi, la cèl·lula ha de comprovar que la replicació del DNA ha esdevingut de manera correcta per poder passar a mitosi. I per últim, la **Fase M** (**F**ase de **M**itosi), aquesta és la fase més curta del cicle, dura una hora aproximadament en cèl·lules de mamífer, durant la qual tenen lloc la ruptura de l'embolcall nuclear i la condensació dels cromosomes. Els microtúbuls es reorganitzen formant el fus mitòtic, on s'alineen els cromosomes que se segreguen cap als dos pols oposats de la cèl·lula. Finalment, hi ha la citocinesi o la segregació del citoplasma en dues cèl·lules filles. A la sortida de mitosi la cèl·lula té diferents opcions, pot entrar en un nou cicle de proliferació, pot diferenciar-se a un tipus cel·lular determinat, o bé pot entrar en un estat quiescent o de repòs, també anomenat Fase G0, on pot romandre-hi molt de temps. En aquest estat normalment hi entra si les condicions de l'entorn cel·lular impedeixen que es doni la divisió, el metabolisme disminueix així com la mida del citosol. Quan les condicions tornen a ser favorables es reinicia de nou el cicle cel·lular.

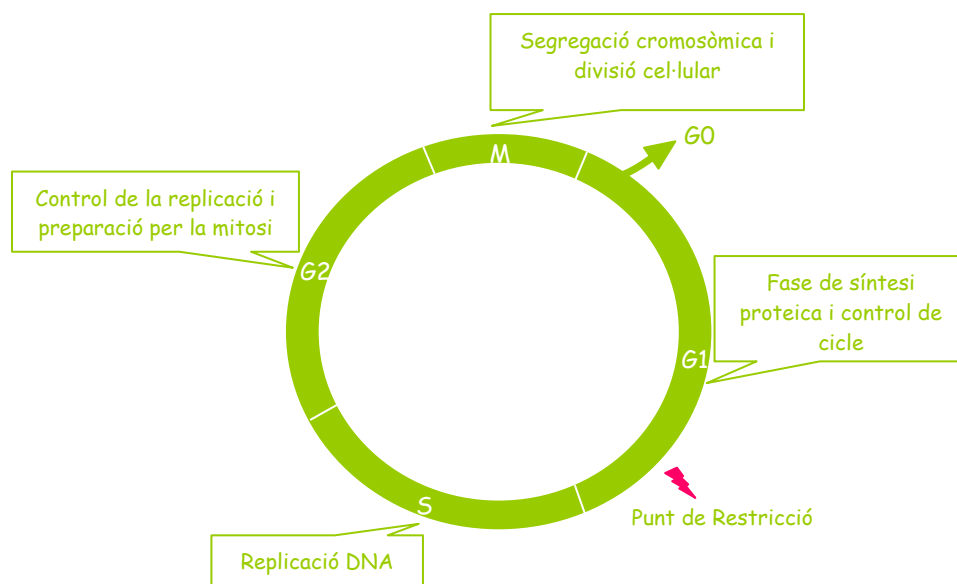


Figura 118: Fases del cicle cel·lular i punt de restricció.

En el control de la proliferació cel·lular hi intervenen tant **senyals extracel·lulars** com **senyals intracel·lulars** -també anomenades sistemes de vigilància o *checkpoints*-. Aquestes últimes provenen de mecanismes que avaluen i verifiquen el correcte estat i replicació del material genètic de cada fase abans de deixar pas a la següent. Quan

algun d'aquests mecanismes no funciona, és quan les cèl·lules creixen sense control i es desenvolupen les neoplàsies en els organismes pluricel·lulars. A finals de la fase G1 hi ha un punt de restricció que és clau per decidir si la cèl·lula continua endavant o no el cicle (Pardee *et al.*, 1978; Cross, 1995), i és el que constitueix la veritable entrada al cicle cel·lular (Dutcher and Hartwell, 1982).

A nivell molecular, el cicle cel·lular està controlat per una família conservada de proteïnes quinasa, les quals són les responsables de desencadenar les transicions del cicle. Aquests enzims estan formats per una subunitat reguladora o **ciclina** -donat que els seus nivells d'expressió oscil·len al llarg del cicle-, i per una subunitat catalítica o **quinasa dependent de ciclina** (Cdk).

Els complexos formats per les ciclines i les Cdks constitueixen la maquinària principal que regula la progressió i la durada de les fases del cicle cel·lular. Actuen integrant la informació dels senyals extra- i intracel·lulars, per assegurar una bona coordinació entre el cicle i els canvis en l'entorn cel·lular i/o possibles errors de caire mecànic (Sherr, 1996; Morgan, 1997).

Donada l'extensa complexitat del cicle cel·lular ens centrarem únicament en la mitosi, ja que un dels objectius d'aquesta tesi ha estat l'anàlisi de la regulació gènica durant aquesta fase i el manteniment de certs senyals d'activació a les regions promotores i codificadores d'alguns gens.

4.1.1. La Mitosi

El principal propòsit de la mitosi és la segregació de les cromàtides germanes entre les dues cèl·lules filles, de manera que cada cèl·lula naixent obtingui un grup de cromosomes complet. També cal que rebin un centrosoma i la meitat dels complements i orgànuls del citoplasma.

Durant la mitosi, la cèl·lula pateix grans canvis a nivell molecular i morfològic. En el primer cas s'ha d'activar el complex **Cdk1-Ciclina B** i, posteriorment, per a la sortida de la mitosi s'ha d'inactivar (Nishijima *et al.*, 1997). En el segon cas, la cèl·lula s'arrodona, disminueixen els contactes amb les altres cèl·lules, es condensen els cromosomes, hi ha un trencament de la membrana nuclear, la fragmentació del reticle

endoplasmàtic i de l'aparell de Golgi. També es produeixen canvis en el citoesquelet per tal de formar el fus mitòtic.

La regulació de la fase M recau principalment en dos mecanismes: la fosforilació de les proteïnes i la proteòlisi. Aquests dos mecanismes estan molt relacionats, ja que la maquinària proteolítica està regulada per fosforilacions, i l'activitat de moltes de les quinases mitòtiques es regula per degradació. La primera quinasa reguladora de la mitosi que es va descriure és el complex Cdk1-Ciclina B, que també es va anomenar MPF (Mitosis-Promoting Factor). La Cdk1 també s'uneix a la Ciclina A i contribueix a la preparació per la mitosi (Nigg, 1995; Edgar and Lehner, 1996). Però estudis recents han descobert altres famílies de quinases implicades en aquest procés, com la de les quinases Polo (PIKs), les Aurora i la família NIMA. La Cdk1-Ciclina B actua sobre diferents substrats que regulen la progressió de la mitosi: la condensació de la cromatina, la formació dels microtúbuls i el fus mitòtic, el trencament dels microfilaments d'actina, el trencament de la membrana nuclear, la fragmentació de l'aparell de Golgi i processos d'inhibició de la transcripció.

La mitosi es divideix en cinc fases: Profase, Prometafase, Metafase, Anafase i Telofase. De manera breu, els esdeveniments que tenen lloc en cada una de les fases són els següents:

Profase: La Cdk1-Ciclina B fosforila la histona H1 i es condensa la cromatina, també fosforila les condensines i les activa, es comença a condensar la cromatina just quan la transcripció finalitza. Les dues cromàtides estan ben diferenciades, els cromosomes estan preparats per dividir-se i els centrosomes es comencen a separar. En la condensació de la cromatina i la formació dels cromosomes hi participen complexos de remodelació de la cromatina dependents de l'energia de l'ATP, complexos modificadors de les histones, que produeixen modificacions covalents a les cues de les histones (fosforilació, acetilació, metilació...). La histona H1, o histona d'unió entre nucleosomes també és un substrat del complex Cdk1-Ciclina B però se'n desconeixen les conseqüències funcionals de la seva fosforilació. En canvi, la fosforilació a la serina 10 de la histona H3 es correlaciona clarament amb la condensació dels cromosomes. Existeixen varies quinases capaces de produir aquesta fosforilació en diversos organismes: la Ipl1p de *S. cerevisiae*, que pertany a la família Aurora; la AIR-2 de la família Aurora tipus B de *C. elegans* (Hsu *et al.*, 2000), i

la NIMA a *A. nidulans* (De Souza *et al.*, 2000). En mamífers s'han identificat les quinases Aurora A i B com a responsables d'aquesta fosforilació (Crosio *et al.*, 2002).

Prometafase: En aquesta fase es dona la ruptura de la membrana nuclear perquè es fosforilen les làmines. Es formen els cinetocors en els cromosomes, i aquests, interaccionen amb els microtúbuls.

Metafase: Els cromosomes s'alineen a la meitat del fus mitòtic formant la placa metafàsica.

Anafase: Es produeix la inactivació del complex Cdk1-Ciclina B i la separació de les cromàtides.

Telofase: S'inicia la formació de la coberta nuclear i es produeix la descondensació de la cromatina deguda a la desfosforilació de les làmines i de la histona H1.

Citocinesi: Es produeix al final de telofase. És el procés de la divisió del citoplasma, el trencament de la cèl·lula. La seva regulació està íntimament lligada amb la progressió de la mitosi.

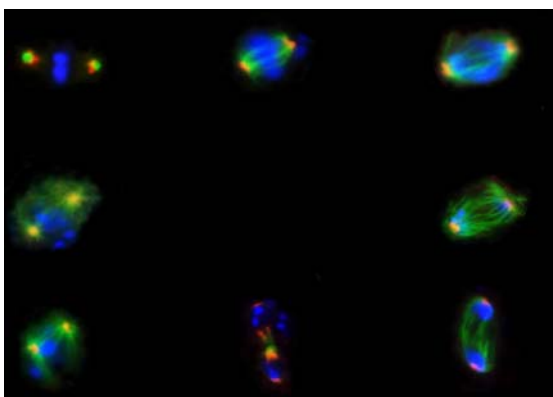


Figura I19: Imatge microscòpica de les diferents fases de la mitosi. La tinció de Dapi (blau) marca el DNA, els microtúbuls estan tenyits de color verd i els centrosomes de color vermell.

4.2. Transcripció i mitosi

Donada l'arquitectura de la cromatina mitòtica: condensada, altament ordenada i molt complexa, es fa difícil d'entendre el procés transcripcional en aquest període. Hi ha dos fets generals que marquen algunes característiques de la mitosi: (i) de manera general l'activitat transcripcional esdevé reprimida i, (ii) es dona una hipoacetilació global de les histones quan els cromosomes estan condensats.

Als inicis de la dècada dels 60, es va observar que la transcripció nuclear en cèl·lules en cultiu s'inhibia durant la mitosi. Estudis d'autoradiografia demostraven que la incorporació de precursors de RNA cessava a la profase tardana i es reprenia a la telofase primerenca (Prescott and Bender, 1962). El grup del Dr. Forbes va ser pioner en reproduir la repressió de la transcripció que es dona durant la mitosi *in vitro*, mitjançant un sistema d'extractes d'ous de *Xenopus*. Van demostrar que la repressió de la RNA polimerasa III durant la mitosi no requeria que la cromatina estigués condensada. La repressió que es dona durant la mitosi es correlaciona amb la fosforilació de diversos components cel·lulars de la maquinària transcripcional de les RNA polimerases I, II i III de manera dependent del complex cdc2/Ciclina B. Amb la inactivació d'aquest complex a finals de l'anafase es reprèn la síntesi de RNA (Hartl *et al.*, 1993). Altres estudis suggerien que no només es donava la fosforilació de les polimerases sinó que també podien fosforilar-se diversos factors de transcripció com Oct-1, TF_{III}B, i TF_{II}D, de manera que podien inhibir el seu potencial d'unió al DNA i de transcripció (Roberts *et al.*, 1991; Hartl *et al.*, 1993; Segil *et al.*, 1996). Més tard, estudis realitzats al laboratori del Dr. C. Wu, demostraven que dels quatre factors de transcripció que s'uneixen al promotor Hsp70, tres en conservaven la seva capacitat d'unió al DNA, mentre que un la perdia. En estudis de *footprinting in vivo* i immunolocalitzacions, veien que aquests factors, tot i conservar les seves propietats d'unió al DNA, quedaven desplaçats del seu lloc d'interacció al promotor durant la mitosi, suggerint un paper important de l'estructura condensada de la cromatina en la redistribució dels factors de transcripció durant la mitosi. No obstant, el manteniment de regions amb hipersensibilitat a la DNasa I suggeria que aquest promotor conservava una **estructura oberta** de la cromatina malgrat l'absència de factors d'unió al DNA, la qual cosa en permetria la seva ràpida reactivació després de la mitosi (Martinez-Balbas *et al.*, 1995). Posteriorment estudis d'hipersensibilitat amb KMnO₄, realitzats al laboratori del Dr. Levens, suggerien un mecanisme de **marcatge**

molecular, en el qual gens que necessitarien una ràpida reactivació just després de mitosi, estarien senyalitzats o marcats, és a dir, patirien una alteració estructural. Aquest marcatge, serviria per captar la maquinària transcripcional cap a aquests promotors per al restabliment de l'expressió gènica posterior a la mitosi (Michelotti *et al.*, 1997). És possible doncs, que la restauració dels patrons programats d'expressió gènica després de mitosi inclogui el marcatge dels gens mitjançant la modificació posttraduccional de les histones o la remodelació de la cromatina.

D'altra banda, malgrat que la mitosi no és la fase del cicle on esdevenen normalment els processos transcripcionals, hi ha una petita part dels gens cel·lulars que es sintetitzen en aquest període. Un exemple, és el cas de les ciclines que controlen aquesta fase: Ciclina B1 i B2, Ciclina A. Concretament en el treball del grup de la Dra. Piaggio, es demostra que l'expressió de la Ciclina B1 és activa durant la mitosi (Sciortino *et al.*, 2001). D'aquesta manera doncs, els gens que s'expressen durant aquesta fase hauran de poder ser reconeguts per la maquinària transcripcional.

Un exemple que ens pot ajudar a entendre la regulació de la transcripció gènica en un ambient cromatínic "desfavorable" per a l'activació gènica ens l'aporta el grup del Dr. Gottschling (Smith *et al.*, 2002). El treball realitzat per aquests investigadors suggereix que l'activació de gens localitzats en regions properes als telòmers de *S. cerevisiae* i que per tant, es troben molt influenciats per la repressió intrínseca de l'heterocromatina, requereix l'acetilació de la lisina 12 en la histona H4. Ells expliquen que l'estat transcripcional dels gens d'aquesta zona -que tan poden estar silenciats com activats-, vindria definit per la presència de la modificació en aquesta lisina. Si el gen s'ha d'activar, la lisina 12 de la histona H4-**H4K12** estaria acetilada, i a l'inversa si ha de romandre inactiu. De la mateixa manera, també exposen que aquest estat transcripcional serà mantingut de manera heretable al llarg de diverses generacions. És en aquí on entra en joc el concepte de **memòria cel·lular**, pel qual un estat d'activació o de repressió d'un gen o un conjunt de gens determinats es perpetua de forma prolongada al llarg de múltiples generacions (Turner, 2002). No obstant, l'acetilació al ser una modificació molt dinàmica, no semblaria ser la candidata ideal per ocupar el lloc de marcador de memòria, però el fet de trobar que enzims amb dominis reconeixadors de lisines acetilades (bromodominis), romanguin units a la cromatina mitòtica, no ens permet descartar del tot aquesta hipòtesi (Kanno *et al.*, 2004).

4.3. Modificacions posttraduccionals de les histones a la mitosi.

La fosforilació de la serina 10 de la histona H3, [H3S10](#), va ser descrita com un marcador cel·lular d'entrada a mitosi, donat que està relacionada amb la condensació i segregació dels cromosomes (Gurley *et al.*, 1978; Hendzel *et al.*, 1997). Posteriorment, es va trobar que la serina 28 de la histona H3, [H3S28](#), també es fosforilava de manera específica durant la mitosi (Goto *et al.*, 1999).

La repressió transcripcional que es dona durant la mitosi, suggeriria que l'estat de les modificacions posttraduccionals relacionades amb aquest procés també podia veure's alterat. Jeppesen i Turner van descriure que en els cromosomes mitòtics dels mamífers es dona una [hipoacetilació de la histona H4](#) en l'heterocromatina pericentromèrica i en el cromosoma X inactiu (Jeppesen and Turner, 1993). Estudis posteriors mitjançant immunolocalitzacions, confirmen aquest nivell global d'hipoacetilació de les histones H3 i H4 a les cèl·lules en mitosi (Kruhlak *et al.*, 2001). No obstant, ells observen la presència de marques d'acetilació que es mantenen durant mitosi: l'acetilació de la lisina 12 de la histona H4, [H4K12](#), s'ha vist que roman en la cromatina mitòtica, també l'acetilació de la lisina 14 de la histona H3, [H3K14](#) (Kruhlak *et al.*, 2001).

Treballs posteriors confirmen la persistència d'algunes senyals d'acetilació en la cromatina mitòtica. Recentment Kouskouti i Talianidis, mitjançant assaigs d'immunoprecipitació de cromatina en cèl·lules mitòtiques, han observat que tant els senyals d'[acetilació de H3 i H4](#), com la [dimetilació i la trimetilació de H3K4](#) es mantindrien a les regions promotores de gens inactius durant aquesta fase però que necessitarien ser activats posteriorment, suggerint un paper epigenètic d'aquests senyals en el manteniment d'una memòria cel·lular (Kouskouti and Talianidis, 2005). Un treball del grup del Dr. D. Allis demostra que els nivells de [dimetilació de H4K20](#) varien al llarg del cicle, essent alts en la mitosi (on H4K16 té nivells baixos) i més baixos a fase S (on H4K16 té nivells alts). Suggerint una associació de la dimetilació de H4K20 amb la condensació de la cromatina i la repressió transcripcional (Rice *et al.*, 2002). No obstant, un altre treball del Dr. Zhang argumenta tot el contrari, i demostra que la dimetilació de H4K20 té els nivells més alts durant la fase S del cicle (Fang *et al.*, 2002).

Així doncs, tot sembla indicar que l'existència de modificacions posttraduccionals de les histones en la cromatina mitòtica és important pel correcte progrés d'aquesta fase, intervenint en processos de condensació i segregació dels cromosomes, però també té un paper molt important en el manteniment de la memòria cel·lular. Els gens que s'han de mantenir actius després de mitosi es senyalitzen d'aquesta manera per tal que puguin ser reconeguts per la maquinària transcripcional i puguin expressar-se d'una generació cel·lular a la següent.

II. OBJECTIUS

OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta Tesi Doctoral és l'anàlisi dels diferents mecanismes que participen en la regulació i el control de l'estructura, el dinamisme i la funcionalitat de la cromatina com a substrat per a múltiples processos biològics.

En particular, hem volgut aprofundir en els mecanismes de regulació de les activitats acetiltransferasa i desacetilasa d'histones com a resposta a diferents senyals que rep la cèl·lula (intracel·lulars i extracel·lulars).

En particular hem estudiat:

- Regulació de les activitats acetiltransferasa i desacetilasa d'histones cel·lulars mitjançant la proteïna oncogènica viral antigen T.

- Regulació de les acetiltransferases i desacetilases d'histones durant la fase de Mitosi del cicle cel·lular.

- Anàlisi de diversos patrons establerts mitjançant les modificacions posttraduccionals de les histones quan la cèl·lula entra a Mitosi.

- Mecanismes de regulació mitjançant acetilació de l'acetiltransferasa PCAF.

III. RESULTATS

Capítol 1:L'antigen T de SV40 modula les activitats
HAT i HDAC cel·lulars

Capítol 1A: L'antigen T de SV40 modula l'activitat
acetiltransferasa d'histones de CBP

Capítol 1B: L'antigen T de SV40 reprimeix la transcripció mitjançant la seva interacció amb HDAC1

L'ANTIGEN T DE SV40 REPRIMEIX LA TRANSCRIPCIÓ MITJANÇANT LA SEVA INTERACCIÓ AMB HDAC1

Ester Valls i Marian A. Martínez-Balbás[#]

Institut de Biologia Molecular de Barcelona. CID. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Parc Científic de Barcelona (PCB). Josep Samitier 1-5. 08028 Barcelona. Spain.

[#]Corresponding author:
e-mail: mmbbmc@ibmb.csic.es
Tel.: 34-93-403-49-61
Fax: 34-93- 403-49-79

Resum

Múltiples dades de la literatura mostren que l'acetilació és una modificació de les histones molt important en diversos processos cel·lulars. El nivell d'acetilació està regulat pels enzims HAT i HDAC que es responsabilitzen de mantenir un equilibri correcte per a cada funció cel·lular. A la vegada, les HAT i HDAC són dianes de proteïnes virals que envaeixen el medi cel·lular i es beneficien de la maquinària transcripcional de la cèl·lula. El treball que es presenta a continuació mostra l'existència d'una interacció entre la principal proteïna reguladora del virus SV40, l'antigen T, i una desacetilasa d'histones, HDAC1. Els nostres resultats demostren que l'antigen T interacciona *in vitro* amb HDAC1, i que aquesta interacció es dona de manera independent a la proteïna del retinoblastoma, pRb. A més, s'observa com l'antigen T és capaç de modular negativament l'activitat transcripcional d'alguns promotors, captant una desacetilasa. Finalment, mitjançant la tècnica de la immunoprecipitació de cromatina (ChIP), es mostra una disminució dels nivells d'acetilació dels nucleosomes als promotors un cop han estat reprimits per l'antigen T.

Introducció

Els virus han adquirit la capacitat de modificar l'ambient de la cèl·lula hoste per tal d'assolir amb èxit el seu cycle vital. D'aquesta manera, l'ús i el control de la maquinària transcripcional cel·lular estan entre les seves tasques més importants.

En el procés d'infecció vírica, el virus SV40 comença expressant les proteïnes de fase primerenca, essencialment dues proteïnes, l'antigen T gran i l'antigen t petit (Tooze, 1980). Aquestes proteïnes tenen la capacitat d'unir-se a moltes proteïnes cel·lulars, de manera que el virus va adquirint el control cel·lular necessari per poder avançar correctament en la infecció. L'antigen T, la principal proteïna reguladora del virus, és una proteïna molt versàtil, capaç de realitzar múltiples tasques. Està implicada en diversos processos cel·lulars, entre els quals es destaquen l'activació i la repressió transcripcionals, l'estimulació de la proliferació cel·lular, el bloqueig de la diferenciació i la transformació cel·lulars (Moran, 1993); també està implicada en processos vírics, com són la replicació del DNA víric (Tegtmeyer, 1972) o l'autoregulació de la seva expressió a nivell transcripcional (Rio *et al.*, 1980; Tjian, 1981). Totes aquestes accions les porta a terme gràcies a la seva capacitat

d'interaccionar amb proteïnes de la cèl·lula eucariota que tenen accions destacades en el control del cicle cel·lular i la regulació de la transcripció. Podem citar-ne algunes, per exemple: p53 (Levine, 1990; Sheppard *et al.*, 1999), la proteïna del retinoblastoma pRb i proteïnes relacionades de la seva família com p107 i p130 (DeCaprio *et al.*, 1988; Ludlow *et al.*, 1990; Cobrinik *et al.*, 1992; Dyson and Harlow, 1992), i p300/CBP (Yaciuk *et al.*, 1991; Avantaggiati *et al.*, 1996; Eckner *et al.*, 1996). Pel què fa a la interacció amb CBP, estudis previs realitzats al nostre laboratori mostren que l'antigen T pot modular-ne la seva activitat HAT (Valls *et al.*, 2003). En aquest context hem volgut aprofundir més en la interrelació entre l'antigen T i les proteïnes que controlen l'equilibri acetilació/desacetilació d'histones, les HATs i HDACs.

Els enzims HAT han esdevingut de gran interès donada la seva intervenció en processos crucials per la cèl·lula, ja siguin el creixement cel·lular, la diferenciació o l'apoptosi. Aquests enzims catalitzen la reacció d'acetilació de diversos substrats, principalment les histones. Les desacetilases d'histones, són els enzims que catalitzen la reacció reversible a l'acetilació, eliminen els residus acetil de les lisines dels extrems Nt protuberants de les histones i indueixen repressió transcripcional mitjançant la condensació de la cromatina que generen. Tant HATs com HDACs, normalment es troben formant part de complexos activadors o repressors de la transcripció, respectivament (Khochbin and Kao, 2001). Borwnell i els seus col·legues el 1996 van descobrir el primer enzim amb activitat acetiltransferasa, p55 (Brownell *et al.*, 1996). Això va representar un canvi a l'hora d'interpretar l'actuació del molts coactivadors transcripcionals, als quals se'ls atribuïen funcions estrictament transcripcionals. A partir d'aquest moment la seva activitat catalítica els vinculava directament amb la regulació de la cromatina. Per la seva banda, el grup liderat per S. L. Schreiber va descobrir la primera desacetilasa de mamífers (Taunton *et al.*, 1996). Es va purificar l'enzim utilitzant trapoxina, un inhibidor de desacetilases, i es va veure que aquest tenia homologia amb Rpd3 de llevat, un regulador de la transcripció. El fet de trobar regions hipoacetilades de la histona H4 en regions d'heterocromatina silents, i per tant reprimides transcripcionalment, va fer acabar d'entendre la relació que hi ha entre l'acetilació i la transcripció (Turner, 1993). Un dels primers estudis que evidencia la repressió de la transcripció ens l'aporten tres laboratoris independents i demostren que la repressió donada per la pRb en els promotors de gens regulats per E2F és deguda a una interacció de pRb amb HDAC1 (Brehm *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998). Aquesta interacció es dona a través de la seqüència IACEE de HDAC1 -seqüència homòloga a la seqüència LXCXE de diverses proteïnes virals i

cel·lulars (Taya, 1997)- amb el domini butxaca (*pocket*) A/B de pRb. D'aquesta manera, HDAC1 actuaria desacetilant les histones de la cromatina dels promotors regulats per E2F impedit l'activació d'aquests gens a la fase G1.

D'altra banda, s'ha mostrat que l'antigen T és capaç de reprimir promotors activats per CBP (Avantaggiati *et al.*, 1996; Eckner *et al.*, 1996), no obstant, els mecanismes implicats en aquesta repressió encara es desconeixen. Els nostres resultats mostren que l'antigen T interacciona amb HDAC1, i que aquesta interacció es dona de manera independent de la proteïna del retinoblastoma. Mitjançant assaigs de transfeccions transitòries, hem demostrat que la repressió exercida per l'antigen T sobre les promotors coactivats per CBP és sensible a l'inhibidor de desacetilases TSA. D'acord amb aquests resultats, la introducció de RNA d'interferència de HDAC1 a les cèl·lules, provoca una disminució de la repressió del promotor induïda per l'antigen T. Finalment, els assaigs d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) han demostrat que la repressió induïda per l'antigen T va acompanyada de la desacetilació de la histona H3 del promotor analitzat. Aquests resultats mostren a l'antigen T com una proteïna viral molt versàtil, capaç d'interaccionar amb HATs i HDACs cel·lulars.

Materials i Mètodes

Plasmidis

pGal4-TK-luciferasa: Promotor natural de la Timidina Quinasa (TK) fusionat a cinc llocs d'unió a la proteïna d'unió al DNA Gal4 i a un gen reporter de la luciferasa. Cedit per el Dr. Didier Trouche.

pcDNA3-GAL4-DBD: Conté el fragment de DNA que codifica pel domini d'unió al DNA de Gal4 (1-147) inserit en el vector pcDNA3. Cedit pel Dr. T. Kouzarides (Martinez-Balbas *et al.*, 1998).

pcDNA3-Gal4-HAT: Conté el domini acetiltransferasa d'histones HAT (1099-1758) de CBP. Cedit pel Dr. T. Kouzarides (Martinez-Balbas *et al.*, 1998).

pcDNA3-Gal4-HAT-CBP2: Codifica per les regions HAT i el tercer dit de zinc de CBP, CBP2 (1099-1877). La regió CBP2 ha estat descrita com el lloc on interacciona l'antigen T. Cedit pel Dr. T. Kouzarides (Martinez-Balbas *et al.*, 1998).

pcDNA3-CBP(FL): Conté el cDNA de la proteïna sencera CBP. Cedit pel Dr. T. Kouzarides.

- pSG5 antigen T: Conté el cDNA de l'antigen T inserit al lloc BamH1. Cedit pel Dr. J. DeCaprio.
- pSG5 antigen T-K1: Conté el cDNA del mutant K1 de l'antigen T, on l'aminoàcid glutàmic 107 està substituït per una lisina. Cedit pel Dr. J. DeCaprio.
- pSG5 antigen T- Δ CBP: Conté el cDNA de l'antigen T amb una deleció entre els nucleòtids 1581-1960.
- pcDNA3-HDAC1-Flag: Conté el cDNA de HDAC1 que porta fusionat al seu extrem Nt el *tag* Flag. Cedit pel Dr. T. Kouzarides.
- pSuper: Vector de 3176 pb basat en el vector pBlueScript-KS. Conté el promotor de la RNA polimerasa III. Cedit per la Dra. Elisa Martí.
- pSuper-SMAD3: Vector pSuper amb l'oligonucleòtid de SMAD3 de 64 pb inserit entre les dianes BgIII i HindIII del *polylinker*. Cedit per la Dra. Elisa Martí.
- pSuper-HD-1: Vector pSuper amb l'oligonucleòtid HD-1 de 64 pb (veure apartat RNAi) inserit entre les dianes BgIII i HindIII del *polylinker*.
- pSuper-HD-2: Vector pSuper amb l'oligonucleòtid HD-2 de 64 pb (veure apartat RNAi) inserit entre les dianes BgIII i HindIII del *polylinker*.
- pSuper-HD-3: Vector pSuper amb l'oligonucleòtid HD-3 de 64 pb (veure apartat RNAi) inserit entre les dianes BgIII i HindIII del *polylinker*.
- pSuper-HD-4: Vector pSuper amb l'oligonucleòtid HD-4 de 64 pb (veure apartat RNAi) inserit entre les dianes BgIII i HindIII del *polylinker*.

Cultius cel·lulars i Transfeccions transitòries

S'han utilitzat les cèl·lules CV1, les quals s'han cultivat en medi de cultiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (*GIBCO BRL*), complementades amb sèrum fetal boví (10% FBS, Foetal Bovine Serum) i 100 mg/ml estreptomicina i 100 U/ml penicil·lina a 5% CO₂ i 37°C. Quan han assolit una confluència d'un 70% aproximadament, han estat transfectades amb el mètode del fosfat càlcic (van der Eb and Graham, 1980) o amb JetPei (*GenyCell*) –aquest últim s'ha utilitzat per les transfeccions amb RNAi-, obtenint uns nivells de transfecció d'un 60-80%. Han estat incubades 48 hores i en el cas dels experiments amb l'inhibidor de desacetilases TSA s'ha afegit a una concentració de 100 nM a les 18 hores prèvies a la recollida de les cèl·lules.

En tots els experiments de transfeccions transitòries s'ha transfectat 1 μ g del plasmidi que porta el gen reporter de la Renilla (pTK-Renilla) per tal de normalitzar les

lectures de la luciferasa obtingudes a partir de la fusió d'aquest gen reporter al promotor de pGal4-TK (pGal4 TK-luciferasa). S'han recollit les cèl·lules a les 48 hores de la transfecció i s'han obtingut extractes cel·lulars utilitzant el *kit* de *Promega* (Dual Luciferase/Renilla assay). Les lectures s'han realitzat a OD₄₂₀.

RNA d'interferència

El primer pas consisteix en la selecció d'una regió candidata de 19 pb del gen HDAC1, per ser el lloc on l'RNA interferirà en l'expressió del gen. Tenim un oligonucleòtid dissenyat de 64 pb que permet col·locar la regió del gen (X₁-X₁₉) escollit de manera antiparal·lela, i separada per uns 10 nucleòtids: Oligonucleòtid sentit: GATCCCC (X₁-X₁₉) TTCAAGAGA (X₁₉-X₁) TTTTGGAA, i Oligonucleòtid antisentit: AGCTTTTCCAAAA (X₁-X₁₉) TCTCTTGAA (X₁₉-X₁) GGG. Posteriorment es fosforilen els oligonucleòtids. Paral·lelament, es prepara el vector on s'hauran de clonar, pSuper: es digereix i es lliguen els oligonucleòtids fosforilats al vector. Quan el vector s'estigui transcrivint, les cadenes complementàries quedaran exposades de manera antiparal·lela, gràcies a un llaç, i la seqüència podrà ser tallada de manera que pugui dirigir-se a l'RNA que s'està transcrivint en el moment. Brummelkamp i els seus col·laboradors van crear el vector pSUPER per poder generar siRNAs (*small interference RNA*) en cèl·lules de mamífer (Brummelkamp *et al.*, 2002). Aquest nou sistema permetia obtenir una inactivació del gen de manera molt específica i sense generar toxicitat per la cèl·lula, a més permetia assajar la pèrdua de funció per períodes de temps molt llargs. Algunes de les característiques més rellevants d'aquest vector són que conté el promotor de la RNA polimerasa III, un lloc d'activació ben definit i un senyal de terminació que consisteix en cinc Ts. Codifica per un transcrit de sRNA (*small RNA*) que és tallat després de la segona U del senyal de terminació per generar un transcrit que té dos nucleòtids a l'extrem 3' protuberant, tal i com es troba en els siRNAs sintètics. Per últim, l'insert específic del gen per inactivar conté 2 seqüències complementàries de 19 nucleòtids cadascuna, que es troben separades per un espaiador de 9 nucleòtids. Es genera una estructura de dues cadenes complementàries de 19 nucleòtids gràcies al llaç que forma l'espaiador. Aquest sistema pot produir una inactivació gènica altament específica, donat que tan sols un canvi d'un nucleòtid a la seqüència diana, fa disminuir dràsticament la inactivació. A més, permet obtenir una inactivació molt prolongada en el temps. Una altra característica important d'aquesta tècnica és que una barreja de seqüències per inactivar un mateix gen, sovint són més eficients. És per això que es va decidir utilitzar

una barreja de varis siRNAs. Els passos a seguir per generar un vector que contingui les dianes del gen a inactivar són els següents:

1. Selecció de les seqüències diana:

Es busquen fragments de 19 nucleòtids de llargada de la seqüència de l'RNA missatger (mRNA) del gen HDAC1 que estiguin precedides preferencialment per dues adenines (A) a l'extrem 5' i per dues timidines (T) a l'extrem 3'. És preferible també que la regió dels mRNA escollits es trobi com a mínim a 100 pb de l'inici i la terminació de la traducció. S'ha de buscar un equilibri entre els nucleòtids de la seqüència, preferiblement un 50% de guanines i citosines.

2. Disseny dels oligonucleòtids:

Oligonucleòtid sentit: 5' GATCCCC (19Nt sentit) ttcaagaga (19Nt antisentit) TTTTTGGAAA 3'

Oligonucleòtid antisentit: 5'AGCTTTTCCAAAAA (19Nt sentit) tctcttgaa (19Nt antisentit) GGG 3'

Segons aquestes recomanacions s'escullen les regions diana del gen HDAC1.

► Hem anomenat **HD-1** a una regió diana que es troba a 1024 pb de l'inici de transcripció a l'exó 5.

HD-1 sentit:

5'GATCCCC(**GCTCCACATCAGTCCTTCC**)ttcaagaga(**GGAAGGACTGATGTGGAGC**) TTTTTGGAAA 3'

HD-1 antisentit:

5'AGCTTTTCCAAAAA(**GCTCCACATCAGTCCTTCC**)tctcttgaa(**GGAAGGACTGATGT GGAG**)GGG 3'

► **HD-2** és una regió diana que es troba a 1426 pb de l'inici de transcripció, exó 7.

HD-2 sentit:

5'GATCCCC(**GGAGGAGGTCAAGTTGGCC**)ttcaagaga(**GGCCAACTTGACCTCCTCC**) TTTTTGGAAA 3'

HD-2 antisentit:

5'AGCTTTTCCAAAAA(**GGAGGAGGTCAAGTTGGCC**)tctcttgaa(**GGCCAACTTGACCT**

CCTCC)GGG 3'

- HD-3 és una regió diana que es troba a 1046 pb de l'inici de transcripció, exó 5.

HD-3 sentit:

5'GATCCCC(TATGACTAACCAGAACACG)ttcaagaga(CGTGTTCTGGTTAGTCATA)T
TTTTGGAAA 3'

HD-3 antisentit:

5'AGCTTTTCCAAAAA(TATGACTAACCAGAACACG)tctcttgaa(CGTGTTCTGGTTAGT
CATA)GGG 3'

- HD-4 és una regió diana que es troba a 1236 pb de l'inici de transcripció, exó 6.

HD-4 sentit:

5'GATCCCC(CGAATTGCCTGTGAGGAAG)ttcaagaga(CTTCCTCACAGGCAATTCTG)T
TTTTGGAAA 3'

HD-4 antisentit:

5'AGCTTTTCCAAAAA(CGAATTGCCTGTGAGGAAG)tctcttgaa(CTTCCTCACAGGCA
ATTCTG)GGG 3'

3. Preparació dels oligonucleòtids i clonatge al vector pSUPER.

Es dissolen els oligonucleòtids en 50 µl d'aigua, la qual cosa ens donarà una concentració aproximada d'uns 3 µg/µl. S'agafa 1 µl de cada oligonucleòtid i s'afegeixen a 48 µl del tampó d'aparellament (100 mM acetat potàssic; 30 mM HEPES-KOH pH 7.4; 2 mM acetat de magnesi), s'incuba la barreja durant 4 minuts a 95°C. Posteriorment es posa a 70°C durant 10 minuts i es deixen refredar els oligonucleòtids aparellats lentament fins a 4°C. Posteriorment es procedeix a la fosforilació dels oligonucleòtids, i s'agafen 2 µl dels oligonucleòtids aparellats als quals s'afegeix: 1 µl de tampó de la T4 PNK (quinasa de polinucleòtids), 1 µl de 1 mM ATP, 1 µl de la T4 PNK i 5 µl d'H₂O. S'incuben 30 minuts a 37°C i 10 minuts a 70°C (aquest últim pas serveix per inactivar l'enzim). Finalment, es lliguen els oligonucleòtids al vector pSUPER. S'agafen 2 µl dels oligonucleòtids lligats, s'hi afegeix 1 µl del tampó de la T4 lligasa, 1 µl de l'enzim T4 lligasa, 1 µl del vector pSUPER digerit amb els enzims de restricció BglII i HindIII i desfosforilat, i 5 µl d'aigua. La barreja s'incuba 1 hora a T.A. Es transformen els bacteris de la soca HB101 d'*E.coli*, es preparen minipreps de diferents clons i se n'analitza si han incorporat els inserts. En un gel d'agarosa es comprova que els clons positius tenen l'insert de 291pb respecte els vectors buits que

tenen l'insert de 227 pb.

Posteriorment, es preparen maxipreps d'aquests DNAs i es transfecten en cèl·lules HeLa, utilitzant el reactiu JetPei de *Genyccell*. S'han utilitzat les condicions recomanades pel fabricant, mantenint uns nivells relatius de quantitat de reactiu respecte quantitat de DNA de ratio N=7. Assegurant al màxim tenir uns bons nivells de transfecció.

Immunoprecipitació de cromatina, ChIP

Es recullen cèl·lules HeLa i es tracten amb 1% formaldehid a temperatura ambient durant 15 minuts (*crosslinking*). La reacció s'atura afegint glicina a una concentració final de 125 mM. Seguidament es renten les cèl·lules un cop amb PBS fred, després amb el tampó I (0,25% Tritó X-100, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM Hepes pH 6'5) i finalment, amb el tampó II (200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM Hepes pH 6'5) a 4°C durant 10 minuts. Aleshores es ressuspèn el *pellet* amb el tampó de lisi (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8, 1 µg/µl d'inhibidors de proteases, 1 mM PMSF) i es sonica en gel fins que s'obtenen fragments de cromatina agregada de mides entre 300 i 600 pb. Després d'una centrifugació, entre 10 i 45 minuts 14000 rpm, la cromatina s'obté a la fase soluble i es dilueix 1:10 en el tampó d'immunoprecipitació (IP) (1% tritó-X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 8, 1 µg/µl d'inhibidors de proteases, 1 mM PMSF), es divideix en al·liquotes que es poden emmagatzemar a -80°C. Es fa un preentat de les preparacions de cromatina, que estan en tampó IP, incubant-les amb una solució de proteïna A-Sefarosa: 30 µg de sèrum preimmune (35µg/µl), 2 µg DNA d'esperma de salmó (1µg/µl), 50 µl proteïna A-Sefarosa CL4B (*Amersham-Pharmacia*) del 10% en tampó TE (50 µg/500 µl TE). Es deixa 2 hores a 4°C en rotació. S'elimina la proteïna A-Sefarosa mitjançant una centrifugació, i la cromatina preentada s'incuba amb 1µg de cada anticòs durant una nit a 4°C. Els anticòsos utilitzats reaccionen contra l'acetilació de les lisines de les histones H3 a les posicions 9 i 14, H3(K9, K14), i H4 en les posicions 5, 8, 12 i 16, H4(K5, K8, K12, K16), de la casa comercial *Upstate*. Finalment, s'incuben els immunoprecipitats amb solució fresca de Proteïna A-Sefarosa durant 2 hores a 4°C, seguida d'una centrifugació a baixa velocitat, 2 minuts a 3000 rpm. Els precipitats es renten amb els tampons TSE I (0'1% SDS, 1% Tritó X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl), TSE II (0'1% SDS, 1% Tritó X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl) , tampó III (0'25 M LiCl, 1% NP40, 1% desoxicolat, 1Mm

EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8), i tres vegades amb tampó Tris-EDTA (TE). Seguidament s'elueixen els precipitats nets amb 300 µl d'una solució que conté 1% SDS i 0'1 M NaHCO₃. Els precipitats eluïts es desagreguen o es fa un *decrosslinking* (es separa la cromatina de les proteïnes agregades en la reacció química generada amb l'addició de formaldehid) durant tota una nit a 65°C, i es purifiquen amb 50 µl de tampó TE en un *kit* de purificació de DNA (*Amersham-Pharmacia*). Els DNAs s'analitzen per PCR amb parelles d'oligonucleòtids de la regió promotora de pGal4-TK-luciferasa. El *primer* TK1: 5'CATGTCTGGATCCGCTCGG3' està separat 380bp del *primer* de la luciferasa GL2: 5'CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA3'. Els oligonucleòtids han estat sintetitzats per *TIB MOLBIOL Germany*.

Assaig d'interacció de proteïnes *in vitro*: Assaig de transcripció i traducció *in vitro* i *Pull Down*

La manera en la que s'han obtingut les interaccions entre proteïnes *in vitro* en els experiments de *Pull Down* ha estat en dos passos: 1) la síntesi d'una de les proteïnes utilitzant el sistema de transcripció i traducció de proteïnes *in vitro* (IVT) *TNT Couple Reticulocyte Lysate System* de *Promega*, i 2) la incubació de la proteïna marcada radioactivament amb una proteïna de fusió amb GST, per detectar-ne la interacció.

1. Assaig de transcripció i traducció de proteïnes *in vitro*:

Primerament, el mètode de IVT ens permet obtenir la proteïna marcada, a partir d'un DNA plasmídic que es transcriu i tradueix mitjançant la incorporació d'aminoàcids precursors marcats radioactivament. El sistema utilitzat consisteix en un extracte de reticulòcit de conill, lloc on es dona la reacció de transcripció i traducció utilitzant el plasmidi que conté el gen d'interès sota la direcció del promotor de la RNA polimerasa T7.

1.1. Síntesi de la proteïna IVT.

25 µl extracte de reticulòcit de conill TNT *Promega*

2 µl Tampó de la reacció TNT *Promega*

1 µl RNA Polimerasa T7 TNT *Promega*

1 µl barreja d'aminoàcids, excepte metionina *Promega*
4 µl (³⁵S)-metionina (1175 Ci/mmol 10 mCi/ml 43.5 TBq pH 7.4) *NEN*
1 µl RNAsin (inhibidor de la Ribonucleasa) *Promega*
1 µg DNA (S'han utilitzat els plasmidis pSG5-antigen T i pSG5-antigen T-K1, amb el promotor de la polimerasa T7)
H₂O lliure de nucleases fins arribar a un volum final de 50 µl

S'ha seguit el protocol proposat per *TNT Coupled Reticulocyte Lysate System* de *Promega*. S'incuba la reacció de IVT a 30°C durant 60-90 minuts. És molt important que la preparació de DNA estigui lliure d'etanol, calci, RNAses i sals, ja que la reacció és molt sensible i aquests components hi podrien interferir. Un cop finalitzada la incubació, es pot guardar la proteïna sintetitzada a -20°C, o bé amb 0'5-2 µl de la reacció es realitza un gel d'acrilamida, es transfereix a una membrana de nitrocel·lulosa i s'exposa el contingut en un film a -80°C durant tota una nit, per comprovar l'eficiència de la reacció, i valorar la quantitat de proteïna que s'ha obtingut.

1.2. Assaig de Pull Down

Per realitzar els assaigs de *Pull Down*, primer de tot es preparen les proteïnes de fusió a GST. S'incuba 0'5-1 µg de proteïna de fusió amb una barreja que conté: 200 µl de Tampó Z' (25 mM Hepes pH 7'5, 12'5 mM MgCl₂, 20% Glicerol, 0'1% NP-40, 150 mM KCl), 1 µl 200 mM DTT, 6 µl BSA (5 mg/ml). Es deixa preincubant 10 minuts a T.A. en rotació. S'afegeixen 0'5-2 µl de la IVT seguint les instruccions esmentades anteriorment, i es deixa incubant una hora a T.A. també en rotació. Seguidament, es precipita la proteïna que ha quedat unida a la reïna de sefarosa amb una breu centrifugació. Es fan 3 rentats de la proteïna amb 1 ml de Tampó NETN (20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0'5% NP40), per tal d'eliminar la radioactivitat no incorporada. Finalment, es ressuspèn la proteïna en 20 µl de tampó de càrrega de proteïnes, es desnatura durant 3 minuts a 95°C, i es carrega en un gel de poliacrilamida, es transfereix en una membrana de nitrocel·lulosa i s'exposa tota una nit a -80°C en un film BIOMAX-MS *Kodak*.

Resultats

L'antigen T reprimeix la transcripció del promotor pGal4-TK-luciferasa mitjançant la seva interacció amb el domini HAT-CBP2 de CBP

L'acció que exerceix l'antigen T sobre els promotors podria ser ambivalent. D'una banda, en resultats obtinguts prèviament al nostre grup, s'havia observat que l'antigen T és capaç de modular positivament l'activitat del promotor Hsp70, interaccionant amb el domini CBP2 de CBP i provocant l'activació de la transcripció condicionada per un augment en l'activitat HAT d'aquest coactivador (Valls *et al.*, 2003). D'altra banda, s'havia descrit que l'antigen T pot reprimir la transcripció mitjançada per CBP sobre el promotor Timidina Quinasa (Avantaggiati *et al.*, 1996; Eckner *et al.*, 1996). És per aquest motiu, que es va decidir analitzar aquest promotor en el nostre sistema. En una primera aproximació mitjançant transfeccions transitòries en cèl·lules CV1, es va cotransfectar el promotor basal Timidina Quinasa, que està fusionat a cinc llocs d'unió a Gal4 i és adjacent al gen reporter de la luciferasa, junt al domini HAT-CBP2 de CBP i l'antigen T (Figura 1A). Tal i com el grup del Dr. Kouzarides va descriure l'any 1997, el domini HAT i els dominis HAT-CBP2 de CBP són potents coactivadors de la transcripció en determinats promotors (Martinez-Balbas *et al.*, 1998). En els resultats obtinguts es mostra l'activació transcripcional induïda pel coactivador HAT-CBP2, 20 vegades respecte l'activació basal (veure Figura 1A carril 2). En els carrils 3 i 4 es mostra de manera contundent una repressió de l'activitat transcripcional mitjançada per l'antigen T d'un 70% (Figura 1A carrils 3 i 4). Per últim, en el carril 5 s'observa l'efecte neutral que té l'antigen T quan és transfectat únicament amb el promotor. Els valors d'activitat transcripcional estan relativitzats respecte al valor de l'activitat basal del promotor (veure Figura 1A carril 1).

Per confirmar que la repressió observada era deguda a la interacció del domini HAT-CBP2 amb l'antigen T es va analitzar el domini HAT de CBP, el qual no conté llocs d'unió a l'antigen T. Els resultats mostren que l'antigen T quan no pot interaccionar directament amb CBP és incapaç de reprimir eficientment la transcripció del promotor. Es passa de tenir una repressió d'un 83% en presència del domini HAT-CBP2 a una repressió d'un 40% amb el domini HAT (dades no mostrades).

Figura 1A

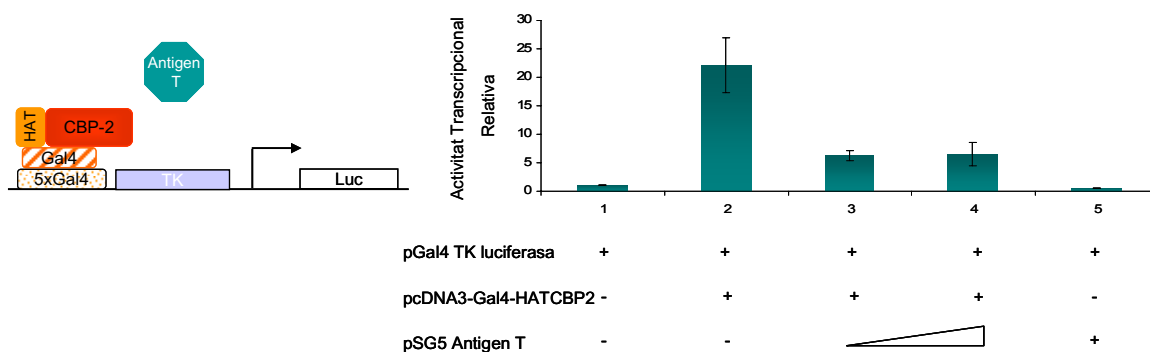


Figura 1B

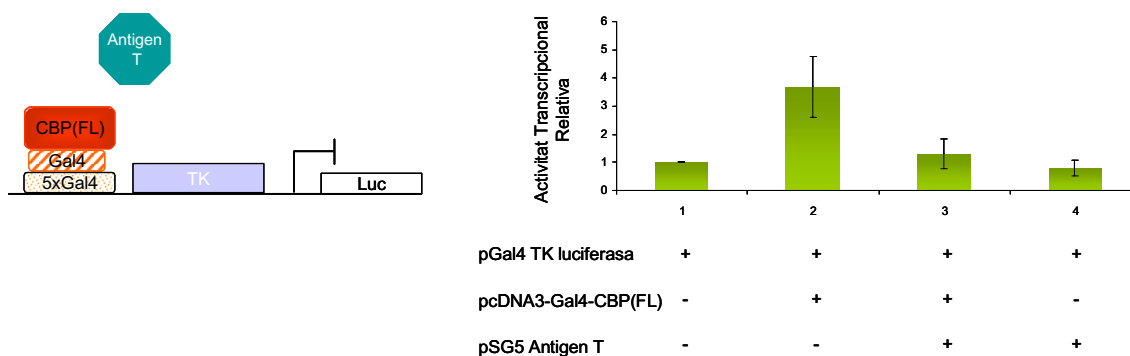


Figura 1: Repressió transcripcional del promotor pGal4-TK-luciferasa induïda per l'antigen T. A) A la part superior de la figura s'observa un esquema de les construccions utilitzades a l'experiment. Es van transfectar en cèl·lules CV1 4 µg de pGal4-TK-luciferasa (carril 1), 2 µg de pcDNA3-Gal4-HAT-CBP2, (carril 2), dues quantitats creixents de pSG5 antigen T (1 i 5 µg) en els carrils 3 i 4 respectivament. En tots els casos es va transfectar 1 µg del gen reportier pTK-Renilla per la normalització de les activitats luciferasa obtingudes de l'activitat transcripcional. Els valors estan relativitzats a l'activitat basal del promotor (carril 1). B) Al igual que en l'apartat anterior, es van realitzar transfeccions transitòries en cèl·lules CV1, utilitzant les mateixes quantitats de plasmidis amb l'excepció del coactivador, en aquest cas es van utilitzar 6 µg de la construcció pcDNA3-CBP(FL), a l'esquerra es mostra l'esquema del plantejament de l'experiment i a la dreta la gràfica de l'activitat transcripcional relativa a l'activitat basal del promotor (carril 1).

L'antigen T reprimeix la transcripció del promotor pGal4-TK-luciferasa mitjançada per la proteïna CBP

Vist l'efecte que exercia l'antigen T sobre el promotor pGal4-TK-luciferasa coactivat per la regió HAT i la regió adjacent rica en cisteïnes CBP2, HAT-CBP2, es va provar amb la proteïna sencera de CBP. Es van realitzar el mateix tipus d'experiments de transfeccions transitòries en CV1, amb el mateix promotor, però es va utilitzar com

a coactivador la proteïna de CBP sencera i fusionada també al domini d'unió al DNA de Gal4. Els resultats que es mostren a la Figura 1B reflecteixen una coactivació per part de CBP de més de 5 vegades l'activació basal del promotor (carril 2), tal com ha estat descrit per el grup del Dr. Kouzarides (Martinez-Balbas *et al.*, 1998). En presència de l'antigen T es produeix una repressió d'un 65% aproximadament (carril 3), tal i com havien descrit prèviament en el laboratori del Dr. Levine (Avantaggiati *et al.*, 1996). Els resultats obtinguts fins ara, suggereixen que la presència d'un agent repressor de la transcripció podria participar en aquest procés de repressió observat.

L'inhibidor de desacetilases TSA desreprimeix l'activació del promotor pGal4-TK-luciferasa mitjançada per l'antigen T

Els resultats obtinguts en els apartats anteriors ens mostren de manera contundent una repressió mitjançada per l'antigen T sobre el promotor pGal4-TK-luciferasa quan està coactivat per CBP (o bé per un domini coactivador de la proteïna). S'ha relacionat l'activació transcripcional dels gens amb un augment en els nivells d'acetilació d'aquests gens, i de manera general s'ha establert un paral·lelisme entre activació transcripcional amb acetilació de la cromatina, i consegüentment, repressió transcripcional amb desacetilació de la cromatina (Turner and O'Neill, 1995). Així doncs, un possible candidat per mitjançar la repressió podria ser una desacetilasa d'histones. Es va pensar doncs, en utilitzar un inhibidor de desacetilases per veure si revertia aquest efecte repressor. Es va utilitzar Tricostatina A (TSA), la qual és una droga inhibidora de desacetilases de classe I i II. Es van realitzar transfeccions transitòries en cèl·lules CV1, utilitzant les mateixes construccions que en els apartats anteriors. Pel què fa a la repressió mitjançada per l'antigen T sobre el promotor coactivat pel domini HAT-CBP2 de CBP, es van transfectar les mateixes quantitats de cada construcció, es va afegir el TSA al medi de les cèl·lules transfectades unes 18 hores abans de recollir-les. Es va utilitzar una concentració d'inhibidor de 100 nM. Al carril 3 de la Figura 2A pot veure's com l'efecte repressor de l'antigen T minva, en presència d'inhibidor, i es passa a una repressió d'un 18% aproximadament. És a dir, en presència de TSA, s'obtidria una desrepressió d'un 50-55% aproximadament. Paral·lelament, es va realitzar el mateix tipus d'experiment de transfeccions transitòries, utilitzant en aquest cas la proteïna sencera de CBP. La Figura 2B en el carril 3 mostra com el TSA és capaç de desreprimir l'activació mitjançada per la proteïna sencera CBP en un 25% aproximadament.

Figura 2A

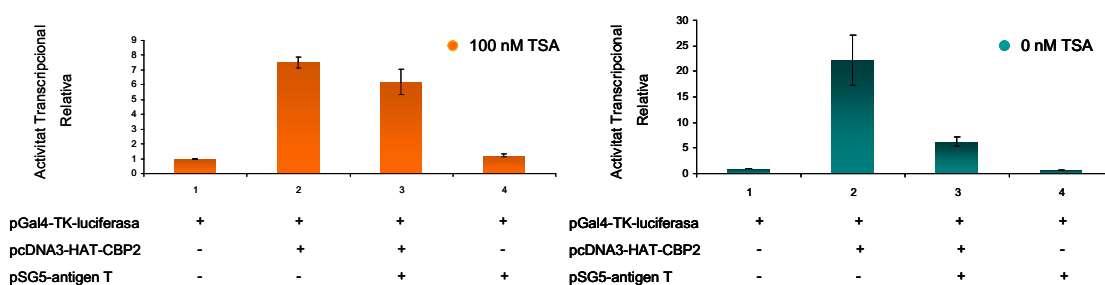


Figura 2B

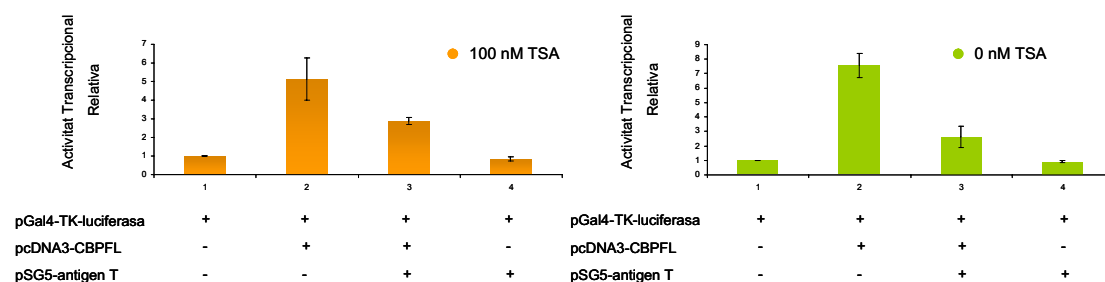


Figura 2: Efecte del TSA en la coactivació del promotor pGal4-TK-luciferasa. A) Es van transfectar cèl·lules CV1 utilitzant les mateixes quantitats de plasmidis indicades en la Figura 1, en presència (gràfica esquerra) o en absència (gràfica dreta) de 100 nM d'inhibidor de desacetilases TSA. B) Es van tractar les cèl·lules CV1 com en el cas anterior (apartat A), però en les transfeccions es va utilitzar el coactivador pcDNA3-CBP(FL) (utilitzant les mateixes quantitats indicades a l'apartat 1B).

L'antigen T regula negativament els nivells d'acetilació del promotor pGal4 TK luciferasa

Els resultats previs suggereixen que l'antigen T podria reprimir la transcripció utilitzant una desacetilasa, que desacetilaria les histones o algun factor transcripcional que participa en el procés. Per confirmar aquests resultats es va utilitzar la tècnica de la immunoprecipitació en cromatina (ChIP), es van realitzar un seguit d'experiments en cèl·lules CV1 transfectades de manera transitòria amb el promotor pGal4-TK-luciferasa, el coactivador CBP fusionat al domini d'unió al DNA de Gal4 i l'antigen T. Aleshores es va realitzar la immunoprecipitació en cromatina utilitzant dos anticossos que reconeixen diferents lisines acetilades de les histones H3 i H4 (veure materials i mètodes). A la Figura 3A es mostra que quan es transfecta únicament el promotor (línia 1), es pot veure un senyal que podria correspondre a uns nivells d'acetilació

basal de la histona H3, on s'observen nivells baixos d'acetilació de les lisines K9 i K14, mentre que si que s'observa acetilació de la histona H4 a les lisines K5, K8, K12 i K16.

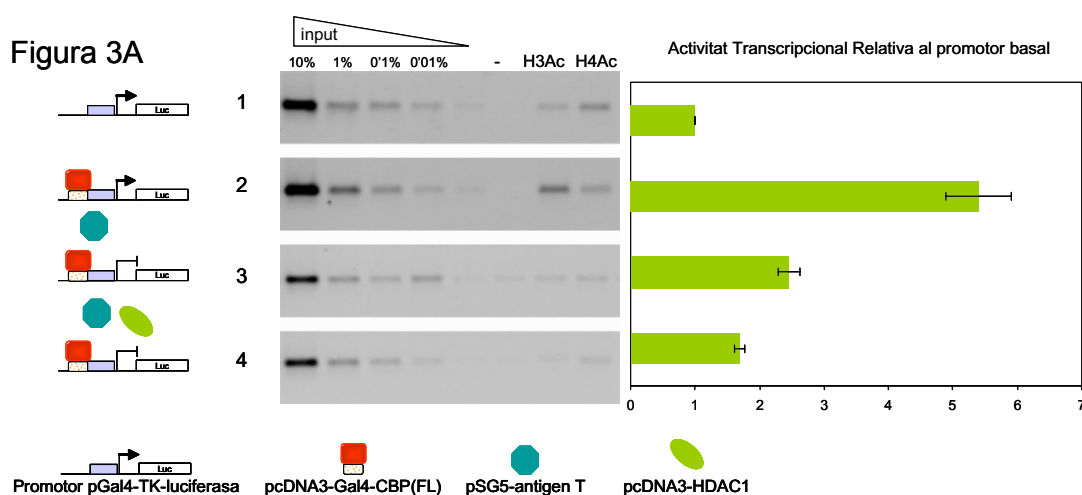


Figura 3B

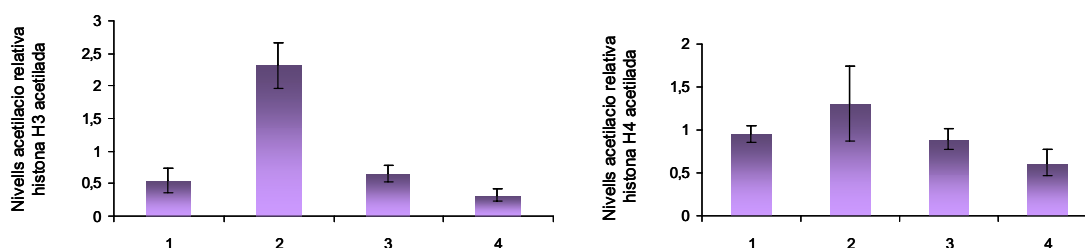


Figura 3: Nivells d'acetilació del promotor pGal4-TK-luciferasa. A) Es van realitzar assaigs d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP's) de cèl·lules CV1 transfectades amb les construccions esmentades anteriorment (Figura 1B): (1) pGal4-TK-luciferasa, (2) pGal4-TK-luciferasa i pcDNA3-CBPFL, (3) pGal4-TK-luciferasa, pcDNA3-CBPFL i pSG5-antigen T, i (4) pGal4-TK-luciferasa, pcDNA3-CBP(FL), pSG5-antigen T i la desacetilasa HDAC1. En tots els casos es va transfectar 1 μ g del gen reporter pTK-Renilla per tal de normalitzar els valors obtinguts pel gen de la luciferasa. S'esquematitzen les diferents condicions de transfecció a l'esquerra, es mostren els gels de DNA dels ChIP's en els panells del centre, i a l'esquerra la gràfica ens dona els nivells d'activitat transcripcional del promotor pGal4-TK-luciferasa obtinguda degut a la transfecció dels diferents DNA plasmídics, i normalitzada respecte el gen reporter de pTK-Renilla. B) Es mostren les quantificacions dels nivells d'acetilació de les histones H3 (panell de la dreta) i H4 (panell de l'esquerra) obtinguts per els assaigs ChIP (Figura 3A), a la gràfica de l'esquerra s'han quantificat els nivells d'acetilació de la histona H3 acetilada, i en la de la dreta els de la histona H4 acetilada. (-) correspon a la immunoprecipitació en absència d'anticòs. Les normalitzacions dels ChIP's s'han realitzat prenent els valors dels immunoprecipitats respecte l'*input* que es correspon a l'1% no saturat.

Quan a més s'hi transfecta el coactivador CBP (línia 2), aquest actua activant la transcripció del promotor (veure Figura 3A, gràfica d'activitat transcripcional de la dreta), i augmentant-ne els nivells d'acetilació de la histona H3 a les lisines K9 i K14 (unes 2'5 vegades) o de manera més modesta pel què fa a la histona H4 (1'3 vegades) (Figura 3B). Quan es transfecta l'antigen T (línia 3), es dona una repressió de la transcripció del promotor, els nivells d'acetilació decreixen de manera global, sobretot a la histona H3 (més de 2'5 vegades), però també disminueixen els de la histona H4. Aquesta baixada s'accentua al cotransfectar a més, una possible candidata en aquest procés repressiu, la desacetilasa HDAC1 (línia 4), veiem que els senyals d'acetilació de la histona H3 i H4 desapareixen completament. A la Figura 3B s'observa la quantificació del nivell d'acetilació de les histones H3 (gràfica de l'esquerra) i H4 (gràfica de la dreta). Els resultats indiquen de manera clara que els nivells d'acetilació observats en el promotor coactivat per CBP augmenten substancialment quan el coactivador és reclutat al promotor, i disminueixen de manera dràstica fins a nivells d'acetilació basal quan al sistema s'hi transfecta l'antigen T. Sobretot les diferències es fan paleses a la histona H3. Se suggereix d'aquesta manera, que l'antigen T, quan és reclutat al promotor mitjançant la seva interacció amb el coactivador CBP, podria orquestrar aquesta repressió transcripcional captant un agent repressor amb activitat desacetilasa d'histones cap al promotor, cosa que explicaria la disminució dels nivells d'histona H3 acetilada en aquest promotor.

La HDAC1 interacciona amb l'antigen T *in vitro* i ho fa de manera independent de la proteïna del Retinoblastoma

Els resultats obtinguts mostren que la repressió de la transcripció induïda per l'antigen T va acompanyada de la desacetilació d'histones, suggerint una possible intervenció d'una desacetilasa en aquest procés. Per confirmar aquesta hipòtesi es va analitzar la capacitat de l'antigen T d'interaccionar *in vitro* amb diferents desacetilases d'histones. Hem detectat la interacció de HDAC1 amb l'antigen T *in vitro* mitjançant un assaig de *Pull Down*.

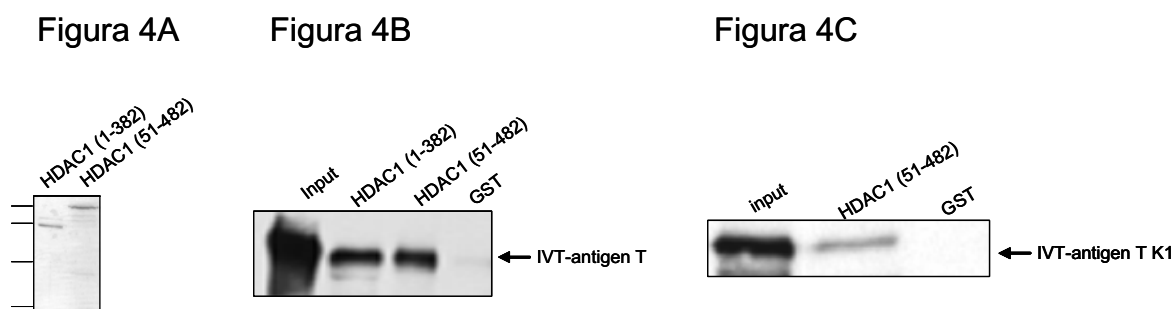


Figura 4: *Pull Down* antigen T-HDAC1. A) Gel SDS-PAGE al 10% tenyit amb CBB. Al primer carril s'observa l'expressió del fragment HDAC1 (1-382), que migra al voltant dels 64 KDa. Al segon carril es veu l'expressió del fragment de HDAC1 (51-482) que migra al voltant dels 98 KDa. B) Autoradiografia d'un gel SDS-PAGE 8%. Assaig de *Pull Down*, al carril de l'*input* es van carregar 0'5 μ l de IVT de l'antigen T, al segon carril s'observa la interacció entre HDAC1 (51-482) i l'antigen T i al tercer carril s'observa la interacció entre HDAC1 (1-382) i l'antigen T, el GST s'ha utilitzat com a control negatiu (carril 4). C) Assaig realitzat com a l'apartat B però utilitzant l'antigen T-K1 marcat amb 35 S-metionina radioactiva per l'expressió *in vitro*. El primer carril correspon a l'*input* d'antigen T K1, 0'5 μ l. El segon carril correspon a la interacció amb el fragment 51-482 de la desacetilasa HDAC1. El tercer carril correspon al control negatiu amb GST. En els dos casos, es van utilitzar 2 μ l d'antigen T i antigen T-K1 expressats i marcats radioactivament *in vitro*.

D'una banda, es va utilitzar la proteïna recombinant HDAC1 fusionada a GST i unida a una reïna de sefarosa. D'altra banda, l'antigen T es va expressar i marcar radioactivament amb metionina- 35 S en un sistema *in vitro* de transcripció i traducció de proteïnes (IVT). Es va realitzar un assaig de *Pull Down*, utilitzant 0'5 μ g de HDAC1 i 2 μ l d'antigen T marcat radioactivament. A la Figura 4B (carrils 3 i 4) pot observar-se com l'antigen T interacciona amb HDAC1. No s'observa interacció amb el GST (carril 2). El fet que la HDAC1 interacciona amb la proteïna del Retinoblastoma (pRb) (Brehm *et al.*, 1999), i que l'antigen T també té capacitat d'unir-se a pRb (DeCaprio *et al.*, 1988), ens porta a analitzar si aquesta interacció antigen T-HDAC1 està mitjançada per la proteïna del Retinoblastoma. Per esbrinar això es va realitzar un altre assaig de *Pull Down* utilitzant l'antigen T K1, la proteïna de l'antigen T que presenta una mutació puntual (substitució del glutàmic a la posició 107 per una lisina) (DeCaprio *et al.*, 1988), conferint-li incapacitat d'unió a pRb, sense alterar la conformació de la proteïna. El resultat indicat a la Figura 4C, suggereix que la interacció entre l'antigen T i la desacetilasa HDAC1 no està condicionada per la presència de pRb. Tampoc s'observa una interacció de l'antigen T amb el GST, Figura 4C carril 3.

La sobreexpressió de HDAC1 accentua la repressió transcripcional del promotor pGal4-TK-luciferasa

Primerament, els resultats obtinguts de les transfeccions transitòries en cèl·lules CV1 en presència de TSA ens conviden a pensar en la presència d'una desacetilasa com a responsable de la repressió transcripcional del promotor. Segonament, els resultats obtinguts en els experiments d'immunoprecipitació de cromatina, apunten a l'acció d'una desacetilasa com a responsable de l'eliminació de certs residus acetilats en el promotor quan aquest és reprimat via la transfecció de l'antigen T sol o en conjunt amb HDAC1. I per últim, els resultats de l'apartat anterior, ens confirmen, almenys *in vitro*, una interacció entre l'antigen T i HDAC1. És per això, que el següent pas en la recerca d'aquesta interacció es dirigí a la sobreexpressió de la desacetilasa HDAC1 en el sistema heteròleg de transfeccions transients descrit anteriorment. En aquest experiment es va voler veure si l'efecte repressor obtingut quan es transfecta l'antigen T juntament amb el coactivador CBP, s'accentuava en presència de la desacetilasa HDAC1. Efectivament, al transfectar la desacetilasa (Figura 5B, carril 4) es veu que l'activitat del promotor disminueix un 70-85% respecte l'activació màxima produïda per CBP.

Figura 5A

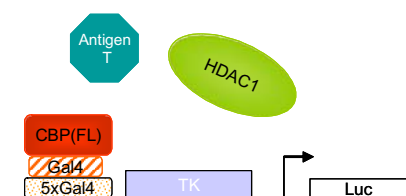
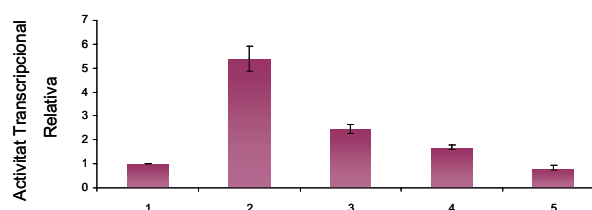


Figura 5B



pGal4 TK luciferasa	+	+	+	+	+
pcDNA3-Gal4-CBP(FL)	-	+	+	+	-
pSG5 Antigen T	-	-	+	+	+
pcDNA3-HDAC1	-	-	-	+	+

Figura 5: Sobreexpressió de la desacetilasa HDAC1 en cèl·lules CV1. A) Es van transfectar cèl·lules CV1 amb 4 μ g DNA pGal4-TK-luciferasa, 6 μ g pcDNA3-CBPFL, 5 μ g pSG5-antigen T, 3 μ g pcDNA3-HDAC1 i 1 μ g pTK-Renilla. Al cap de 48 hores es van preparar els extractes cel·lulars i es va analitzar l'activitat luciferasa resultant normalitzant respecte l'activitat del gen reporter pTK-Renilla.

En resum, la sobreexpressió de HDAC1 en el sistema afecta l'activitat transcripcional del promotor, sembla doncs que aquesta podria participar activament en la repressió via una interacció (directa o indirecta) amb l'antigen T.

L'eliminació de HDAC1 mitjançant l'ús de RNAi té un efecte desrepressor en el promotor pGal4-TK-luciferasa

Per confirmar que la desacetilasa HDAC1 està implicada en el procés de repressió transcripcional, es va decidir eliminar o reduir els nivells de HDAC1 utilitzant el mètode de RNA d'interferència (RNAi). En experiments realitzats en cèl·lules CV1 es va testar el funcionament dels oligonucleòtids de RNAi-HDAC1. Els nivells de proteïna s'analitzen mitjançant WB, tal i com s'indica a la Figura 6A (veure material i mètodes). S'observa que en els carrils on hi ha la combinació de 2 dels RNAi-HDAC1 (carrils 4 i 5, panell superior), o bé la combinació de tots 4 RNAi-HDAC1 (carril 6, panell superior) és on es dona la major inhibició de HDAC1 (a les 72 hores). Com a control de càrrega de proteïna total es mostra un WB amb un anticòs que reacciona amb la tubulina (Figura 6A panell inferior). En experiments similars pot observar-se que en temps llargs d'incubació de les cèl·lules amb l'RNAi-HDAC1 (72-96h) s'obté una inhibició completa de la proteïna endògena (dades no mostrades). Un cop establertes les condicions d'ús de RNAi-HDAC1, es van realitzar transfeccions transitòries en cèl·lules CV1 (es van utilitzar les mateixes construccions i les mateixes quantitats que en els apartats anteriors) i es van transfectar diferents quantitats de RNAi-HDAC1, utilitzant una barreja de 4 RNAi (12 µg totals) de diferents regions en el gen (veure material i mètodes). A les 48 hores es van recollir les cèl·lules i se'n va analitzar l'activitat luciferasa. Pel què fa a les transfeccions transitòries del sistema utilitzat fins ara, en presència o absència de RNAi-HDAC1, els resultats obtinguts revelen una possible intervenció de la desacetilasa HDAC1, ja sigui de manera directa o indirecta, en la repressió d'aquest promotor. Al punt on es transfecten l'antigen T i la desacetilasa HDAC1, (veure Figura 6B carril 3, gràfica de l'esquerra), s'observa una repressió d'un 75-85%, no obstant, quan en aquest mateix punt s'hi transfecta l'RNAi-HDAC1, la repressió passa a ser d'un 52%, carril 3 (lila), observem una **desrepressió** que oscil·la entre un 23-33% respecte el punt control, amb un RNAi-SMAD3 com a control negatiu. Aquest percentatge de desrepressió suggereix que la inhibició que es produeix és la de la desacetilasa transfectada, però no la de l'endògena (veure discussió).

Figura 6A

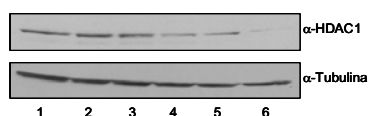


Figura 6B

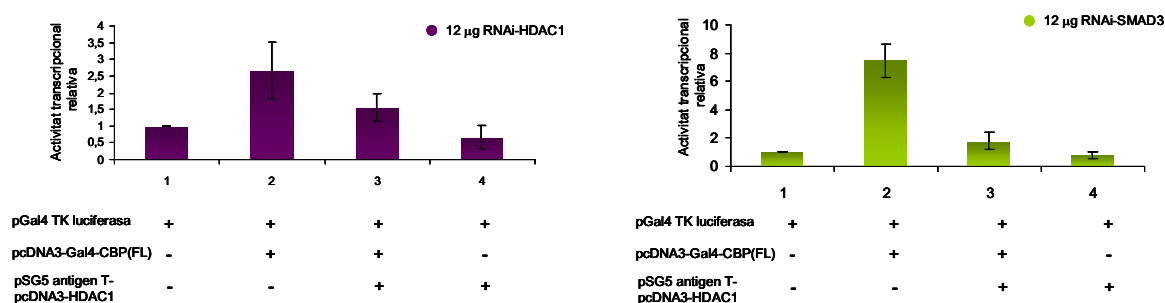


Figura 6: RNA d'interferència de la desacetilasa HDAC1. A) Es varen transfectar cèl·lules CV1 utilitzant Jet-Pei i les següents quantitats de RNAi: (1) 12 μg RNAi-SMAD3 de control; (2) RNAi-HD-3 2 μg; (3) RNAi HD-4 2 μg; (4) RNAi HD-3, HD-4 4 μg totals; (5) RNAi HD-3, HD-4 8 μg totals; (6) barreja de HD-1, HD-2, HD-3, HD-4 12 μg totals. Després de 72 hores es van recollir les cèl·lules i es van preparar extractes totals. Es van analitzar els nivells de HDAC1 i tubulina mitjançant un Western Blot utilitzant un anticòs que reconeix específicament HDAC1 (panell superior) o tubulina (panell inferior, control de càrrega proteica). B) Es van realitzar transfeccions transitòries en cèl·lules CV1 en els mateixes condicions de l'apartat anterior, però recollint a les 48 hores, en presència de 12 μg d'una barreja de RNAi-HDAC1, o bé 12 μg de RNAi-SMAD3 (veure material i mètodes).

Aquests resultats suggereixen que a part de la desacetilasa HDAC1, podrien estar implicats altres mecanismes de repressió lligats a desacetilació, no podríem descartar doncs, la participació d'altres desacetilases en aquest procés.

Discussió

L'efecte repressor de l'antigen T sobre el promotor pGal4-TK-luciferasa està mitjançat per HDAC1

Els resultats obtinguts en els experiments de transfeccions transitòries amb el promotor pGal4-TK-luciferasa ens mostren de manera clara com l'antigen T actua regulant negativament l'activitat del promotor. Les explicacions de com ho fa podrien ser varies.

► Un model que podria proposar-se seria que l'antigen T s'unís a Gal4-CBP, a través del domini CBP2 -unió descrita anteriorment (Avantaggiati *et al.*, 1996; Eckner *et al.*, 1996)- i el **segrestés**, de manera que CBP no podria interaccionar amb els seus llocs Gal4 al promotor, impedit l'activació transcripcional d'aquest. No obstant, aquesta hipòtesi no semblaria encaixar en aquest sistema ja que s'ha vist CBP reclutat al promotor per CHIP's (dades no mostrades).

► Una segona hipòtesi, podria ser que l'antigen T al interaccionar amb CBP, provoqués una **alteració de la conformació** i l'activitat d'aquest coactivador, podria inactivar el seu centre catalític i impedir l'activació del promotor. Aquest model però, no sembla gaire probable, donat que la interacció de l'antigen T amb CBP *in vitro* augmenta l'activitat HAT de CBP (Valls *et al.*, 2003).

► La tercera hipòtesi que es vol proposar, i la que sembla tenir més probabilitats de ser, és que l'antigen T es dirigeixi cap al promotor, atret per CBP, i aleshores **recluti un corepressor** -en aquest treball es proposa la desacetilasa d'histones HDAC1- per tal d'inhibir la transcripció en aquest promotor. A la Figura 7 es mostra aquest possible model d'actuació de l'antigen T sobre el promotor. Els resultats obtinguts amb els experiments realitzats amb TSA validarien aquesta hipòtesi, donat que al afegir TSA a les cèl·lules s'obté una desrepressió en l'activitat del promotor -tant per l'activitat produïda per el domini HAT-CBP2, com la que provoca la proteïna sencera de CBP (veure apartats 1 i 2 de Resultats)-. De la mateixa manera, els resultats realitzats amb la sobreexpressió de HDAC1 i l'RNAi-HDAC1 confirmarien la contribució de les activitats desacetilasa en la repressió de la transcripció en aquest promotor.

El fet que l'antigen T interaccioni amb pRb (Nevins, 1992), una proteïna que forma part d'un complex en el qual s'hi associa la desacetilasa HDAC1 (Brehm *et al.*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998), podria reforçar la possibilitat d'aquesta interacció. No obstant, bona part de la interacció entre l'antigen T i HDAC1 que hem detectat *in vitro* és independent de pRb (Figura 4C). D'altra banda, s'ha demostrat que altres proteïnes virals com E7 interaccionen amb desacetilases, com el complex Mi2-NRD (Brehm *et al.*, 1999), suggerint que les proteïnes virals poden tenir com a dianes els complexos repressors desacetilasa. El fet que el lloc d'interacció de HDAC1 i de pRb amb les proteïnes virals sigui molt similar, reforça la idea que es puguin donar les dues interaccions amb independència una de l'altra.

Figura 7

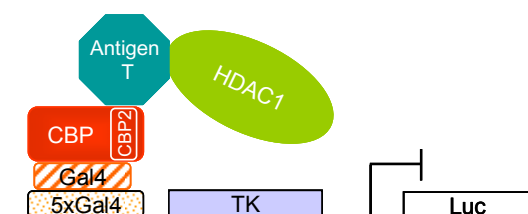


Figura 7: Es proposa un model segons el qual un promotor coactivat per CBP (Timidina Quinasa) reclutaria l'antigen T de SV40 i aquest exerciria un efecte repressor mitjançant la captació de la desacetilasa HDAC1.

Estudis força recents han demostrat que sovint es troben en un mateix complex les principals proteïnes responsables de mantenir l'equilibri d'acetilació de la cèl·lula, HATs i HDACs. En aquest sentit, diferents treballs han demostrat que HDAC1 pot interaccionar amb acetiltransferases com p300 (Simone *et al.*, 2004), o PCAF (Yamagoe *et al.*, 2003). No obstant, no s'ha vist encara la interacció entre HDAC1 i CBP. El que nosaltres proposem és que l'antigen T ordeni aquest reclutament de la desacetilasa cap al complex CBP, la qual cosa tindria un significat molt important, suggerint que el complex format per **CBP/antigen T/HDAC1** es podria donar en els promotors dels gens que l'antigen T necessiti controlar. Això ens dona noves eines que permetrien augmentar el grau de complexitat existent en la regulació de la transcripció d'alguns promotors. Es poden establir nous mecanismes més acurats a l'hora de modular la transcripció. És a dir, donat que és molt important un manteniment de l'equilibri entre acetilació i desacetilació de les histones, i que petits canvis es produeixen en molt poc temps, és de gran valor el fet de poder trobar aquestes dues activitats, aparentment antagòniques, associades a la mateixa proteïna, ja que així podrien actuar coordinadament. No obstant, no sabem si totes tres existeixen en el mateix complex.

L'antigen T s'uneix *in vitro* a HDAC1

Els resultats obtinguts en els experiments de transfeccions transitòries, on s'analitzava l'efecte de l'antigen T en l'activitat transcripcional de pGal4-TK-luciferasa mitjançada per CBP, revelaven la presència d'una desacetilasa d'histones com a candidata per reprimir el promotor. Es va decidir, doncs, comprovar primerament *in vitro*, l'existència d'aquesta interacció. Es van realitzar assaigs de *Pull Down* entre HDAC1 i l'antigen T, i es va detectar una interacció. Semblaria doncs, que l'antigen T té capacitat d'unir-se *in vitro* a HDAC1. Aquesta interacció hauria de confirmar-se *in vivo*. No obstant, això encara no ha estat possible, s'han realitzat experiments de coimmunoprecipitació però no han donat un resultat positiu (podent existir una incompatibilitat dels epítops dels anticossos amb la detecció de les proteïnes). S'ha realitzat també un experiment de doble híbrid, utilitzant l'antigen T fusionat al domini d'unió al DNA de Gal4 i la desacetilasa HDAC1, amb el domini catalític amb una mutació, fusionada al domini de transactivació. Malauradament però, l'experiment ha resultat ser negatiu. No obstant, en els experiments funcionals de transfeccions transitòries eliminant parcialment la desacetilasa HDAC1 mitjançant RNAi o bé mitjançant la sobreexpressió de HDAC1, si que s'han observat efectes que correlacionen la repressió de la transcripció amb la presència de la desacetilasa HDAC1. En els resultats obtinguts en l'experiment de RNAi-HDAC1 (Figura 6) observem una recuperació de la repressió únicament mitjançada per HDAC1 transfectada, i no pas per l'endògena. La raó podria ser que la desacetilasa HDAC1 transfectada se sobreexpressa a la vegada que ho fa l'RNAi-HDAC1, de manera que l'RNAi-HDAC1 actua més fàcilment sobre aquesta i no sobre l'endògena. Assaigs previs mostren que per la inhibició de la desacetilasa HDAC1 endògena, caldria deixar actuar l'RNAi-HDAC1 durant 72 hores, però això no és viable en aquest sistema de transfeccions transitòries heteròleg, donat que si deixem prolongar l'acció de l'RNAi-HDAC1 fins a 72-96 hores, no s'obtenen nivells d'activació del promotor satisfactoris per CBP. D'altra banda, els experiments mitjançant CHIP's demostren una desacetilació contundent del promotor, tant en presència de l'antigen T com quan se sobreexpressen antigen T i desacetilasa. Se suggereix doncs, que HDAC1 seria responsable en part d'aquesta desacetilació en la regió promotora, sense descartar però, l'acció d'alguna altra desacetilasa.

Els resultats obtinguts indiquen que l'antigen T és un proteïna reguladora molt versàtil, ja que d'una banda és capaç d'activar un promotor determinat, i de l'altra de

reprimir-ne d'altres. Encara que aquesta visió sigui contradictòria i sorprenent d'entrada, va en consonància amb les característiques de proteïna multifuncional característica de l'antigen T. Cal recordar que l'antigen T és la principal proteïna reguladora del virus SV40, i quan el virus infecta a la cèl·lula aquest s'encarrega de reorganitzar les prioritats de la cèl·lula hoste al seu favor: reedita de nou els programes que té establerts per els que li convinguin al virus -per poder realitzar amb èxit el seu cicle vital-. Així doncs, això suposa l'activació d'alguns gens o bé la repressió d'altres. Al ser, doncs, la principal proteïna del virus, no és estrany pensar que ella mateixa tingui capacitat per interaccionar amb proteïnes d'activitats oposades clau en processos bàsics de la cèl·lula.

Bibliografia

- Avantaggiati M. L., Carbone M., Graessmann A., Nakatani Y., Howard B. and Levine A. S. (1996). *The SV40 large T antigen and adenovirus E1a oncoproteins interact with distinct isoforms of the transcriptional co-activator, p300*. *Embo J* **15**(9): 2236-2248.
- Brehm A., Miska E. A., McCance D. J., Reid J. L., Bannister A. J. and Kouzarides T. (1998). *Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription*. *Nature* **391**(6667): 597-601.
- Brehm A., Nielsen S. J., Miska E. A., McCance D. J., Reid J. L., Bannister A. J. and Kouzarides T. (1999). *The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth*. *Embo J* **18**(9): 2449-2458.
- Brownell J. E., Zhou J., Ranalli T., Kobayashi R., Edmondson D. G., Roth S. Y. and Allis C. D. (1996). *Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation*. *Cell* **84**(6): 843-851.
- Brummelkamp T. R., Bernards R. and Agami R. (2002). *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*. *Science* **296**(5567): 550-553.
- Cobrinik D., Dowdy S. F., Hinds P. W., Mittnacht S. and Weinberg R. A. (1992). *The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling*. *Trends Biochem Sci* **17**(8): 312-315.
- DeCaprio J. A., Ludlow J. W., Figge J., Shew J. Y., Huang C. M., Lee W. H., Marsilio E., Paucha E. and Livingston D. M. (1988). *SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene*. *Cell* **54**(2): 275-283.

- Dyson N. and Harlow E. (1992). *Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation*. *Cancer Surv* **12**: 161-195.
- Eckner R., Ludlow J. W., Lill N. L., Oldread E., Arany Z., Modjtahedi N., DeCaprio J. A., Livingston D. M. and Morgan J. A. (1996). *Association of p300 and CBP with simian virus 40 large T antigen*. *Mol Cell Biol* **16**(7): 3454-3464.
- Khochbin S. and Kao H. Y. (2001). *Histone deacetylase complexes: functional entities or molecular reservoirs*. *FEBS Lett* **494**(3): 141-144.
- Levine A. J. (1990). *The p53 protein and its interactions with the oncogene products of the small DNA tumor viruses*. *Virology* **177**(2): 419-426.
- Ludlow J. W., Shon J., Pipas J. M., Livingston D. M. and DeCaprio J. A. (1990). *The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T*. *Cell* **60**(3): 387-396.
- Luo R. X., Postigo A. A. and Dean D. C. (1998). *Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription*. *Cell* **92**(4): 463-473.
- Magnaghi-Jaulin L., Groisman R., Naguibneva I., Robin P., Lorain S., Le Villain J. P., Troalen F., Trouche D. and Harel-Bellan A. (1998). *Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase*. *Nature* **391**(6667): 601-605.
- Martinez-Balbas M. A., Bannister A. J., Martin K., Haus-Seuffert P., Meisterernst M. and Kouzarides T. (1998). *The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription*. *Embo J* **17**(10): 2886-2893.
- Moran E. (1993). *DNA tumor virus transforming proteins and the cell cycle*. *Curr Opin Genet Dev* **3**(1): 63-70.
- Nevins J. R. (1992). *E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins*. *Science* **258**(5081): 424-429.
- Rio D., Robbins A., Myers R. and Tjian R. (1980). *Regulation of simian virus 40 early transcription in vitro by a purified tumor antigen*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(10): 5706-5710.
- Sheppard H. M., Corneillie S. I., Espiritu C., Gatti A. and Liu X. (1999). *New insights into the mechanism of inhibition of p53 by simian virus 40 large T antigen*. *Mol Cell Biol* **19**(4): 2746-2753.
- Simone C., Stiegler P., Forcales S. V., Bagella L., De Luca A., Sartorelli V., Giordano A. and Puri P. L. (2004). *Deacetylase recruitment by the C/H3 domain of the acetyltransferase p300*. *Oncogene* **23**(12): 2177-2187.

- Taunton J., Hassig C. A. and Schreiber S. L. (1996). *A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p*. *Science* **272**(5260): 408-411.
- Taya Y. (1997). *RB kinases and RB-binding proteins: new points of view*. *Trends Biochem Sci* **22**(1): 14-17.
- Tegtmeyer P. (1972). *Simian virus 40 deoxyribonucleic acid synthesis: the viral replicon*. *J Virol* **10**(4): 591-598.
- Tjian R. (1981). *Regulation of viral transcription and DNA replication by the SV40 large T antigen*. *Curr Top Microbiol Immunol* **93**: 5-24.
- Tooze J. (1980). *DNA TUMOR VIRUSES: molecular Biology of Tumor viruses*. 2nd edition revised.
- Travers A. A. (1987). *Structure and function of E. coli promoter DNA*. *CRC Crit Rev Biochem* **22**(3): 181-219.
- Turner B. M. (1993). *Decoding the nucleosome*. *Cell* **75**(1): 5-8.
- Turner B. M. and O'Neill L. P. (1995). *Histone acetylation in chromatin and chromosomes*. *Semin Cell Biol* **6**(4): 229-236.
- Valls E., de la Cruz X. and Martinez-Balbas M. A. (2003). *The SV40 T antigen modulates CBP histone acetyltransferase activity*. *Nucleic Acids Res* **31**(12): 3114-3122.
- van der Eb A. J. and Graham F. L. (1980). *Assay of transforming activity of tumor virus DNA*. *Methods Enzymol* **65**(1): 826-839.
- Willis I. M. (1993). *RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity*. *Eur J Biochem* **212**(1): 1-11.
- Yaciuk P., Carter M. C., Pipas J. M. and Moran E. (1991). *Simian virus 40 large-T antigen expresses a biological activity complementary to the p300-associated transforming function of the adenovirus E1A gene products*. *Mol Cell Biol* **11**(4): 2116-2124.
- Yamagoe S., Kanno T., Kanno Y., Sasaki S., Siegel R. M., Lenardo M. J., Humphrey G., Wang Y., Nakatani Y., Howard B. H. and Ozato K. (2003). *Interaction of histone acetylases and deacetylases in vivo*. *Mol Cell Biol* **23**(3): 1025-1033.

Capítol 2: Paper de les modificacions de les histones en el marcatge i l'activació dels gens durant la mitosi

Capítol 3: Mecanismes de l'autoacetilació de PCAF

IV. RESUM DE RESULTATS

El treball realitzat en aquesta Tesi ha tingut com a objectiu l'anàlisi de diferents mecanismes que participen en la regulació de les activitats HAT i HDAC cel·lulars. Podríem distingir dos tipus de modulació d'aquestes activitats, la que es dona mitjançant senyals intracel·lulars, com podria ser la progressió del cicle cel·lular, concretament quan la cèl·lula entra a Mitosi; o bé, la que es dona mitjançant senyals extracel·lulars, com seria la participació d'una oncoproteïna viral (l'antigen T). Es coneix que tant l'entrada a Mitosi com la invasió vírica són processos que tenen respostes per part de la cèl·lula a nivell de cromatina. A grans trets, en els capítols 1A i 1B es presenten dos treballs que tenen com a objectiu l'anàlisi de les conseqüències funcionals de la interacció de l'antigen T amb l'acetiltransferasa CBP i la desacetilasa HDAC1. En el capítol 2 també s'ha analitzat la regulació de les activitats HAT i HDAC durant la mitosi. Al mateix temps s'han estudiat diversos patrons de modificacions posttraduccional de les histones implicats en el manteniment de la competència transcripcional dels gens quan la cèl·lula entra a Mitosi. Per últim, en el capítol 3 es presenta un altre tipus de regulació d'aquestes activitats, l'autoacetilació de l'acetiltransferasa PCAF. Així doncs, tres mecanismes diferents per al control d'unes activitats molt importants per la cèl·lula eucariota, que són crucials per al manteniment de l'equilibri acetilació i desacetilació de la cromatina.

1. L'antigen T de SV40 modula l'activitat acetiltransferasa de CBP.

Les acetiltransferases d'histones (HATs) juguen un paper clau en l'activació de la transcripció gènica, la proliferació i la diferenciació cel·lulars modulant l'estructura de la cromatina; no obstant, es coneixen poques coses de la seva pròpia regulació. En el treball que es presenta en el capítol 1A, s'ha analitzat la regulació de les activitats acetiltransferasa per la proteïna oncogènica viral antigen T. Per això hem utilitzat cèl·lules CV1 i CV1COS com a model. En una primera aproximació s'analitzen els nivells d'activitat globals que presenten les acetiltransferases cel·lulars, i es comparen les dues línies cel·lulars, assumint que les diferències observades són degudes a la presència de l'antigen T o bé al procés de transformació induït per l'antigen T. Es pot veure que l'expressió de l'oncoproteïna viral de SV40 antigen T incrementa de manera general l'acetilació de les histones i l'activació de les activitats enzimàtiques que regulen aquesta modificació (HATs) (Figures 1 i 2). Seguidament s'analitza l'activitat acetiltransferasa de CBP donat que ja s'havia descrit que les dues proteïnes tenen

capacitat per interaccionar (Avantaggiati *et al.*, 1996; Eckner *et al.*, 1996). Pot observar-se que l'activitat HAT de CBP és superior en les cèl·lules que expressen l'antigen T, i que aquest augment de l'activitat és dependent exclusivament de la interacció entre CBP i la proteïna viral (Figura 3). A més, aquest augment de l'activitat no va acompanyat de canvis en l'especificitat de l'enzim (Figura 4). D'altra banda, la interacció entre l'antigen T i CBP modula positivament la capacitat de l'acetiltransferasa d'activar la transcripció gènica del promotor pGal4-Hsp70-luciferasa (Figura 5). Finalment es mostra que la inhibició de les desacetilases d'histones mitjançant TSA incrementa l'índex d'infecció vírica de SV40, de manera que s'observa un augment del nombre i freqüència d'aparició de les plaques de lisi (Taula 1). Aquests resultats ressalten la importància de l'acetilació de les histones en la infecció vírica, mitjançada per les oncoproteïnes virals com l'antigen T.

2. L'antigen T de SV40 reprimeix la transcripció mitjançant la seva interacció amb HDAC1.

Tal i com s'ha mostrat en el capítol 1A i en múltiples treballs publicats l'acetilació de les histones participa en múltiples processos importants per la cèl·lula, i en particular en la infecció de virus de DNA. En el capítol 1B s'analitza de nou la importància de l'equilibri acetilació i desacetilació des del punt de vista de la interacció entre la principal proteïna reguladora del virus SV40, l'antigen T, i la desacetilasa d'histones HDAC1. Hem observat que la transcripció del promotor Timidina Quinasa quan és activat pel coactivador CBP, pateix una repressió transcripcional per acció de l'antigen T (Figura 1); en la literatura hi ha altres exemples de promotors regulats pel coactivador CBP que pateixen una repressió transcripcional degut a la presència de proteïnes virals (Avantaggiati *et al.*, 1996; Eckner *et al.*, 1996). L'existència d'aquesta repressió transcripcional, suggereix la presència d'un complex repressor, per això es realitzen experiments de transfeccions transitòries en presència d'un inhibidor de desacetilases, i es pot observar una desrepressió de l'activitat transcripcional d'aquest promotor (Figura 2), suggerint la implicació d'una activitat desacetilasa. Per corroborar que el procés de repressió comporta una desacetilació, es realitzen assaigs d'immunoprecipitació de cromatina en aquest promotor, i s'analitzen els nivells d'acetilació de les histones H3 i H4. Els resultats de la Figura 3 demostren que els nivells d'acetilació de la histona H3 disminueixen quan l'activitat del promotor també ho fa després de l'expressió de l'antigen T. Paral·lelament, els nostres resultats

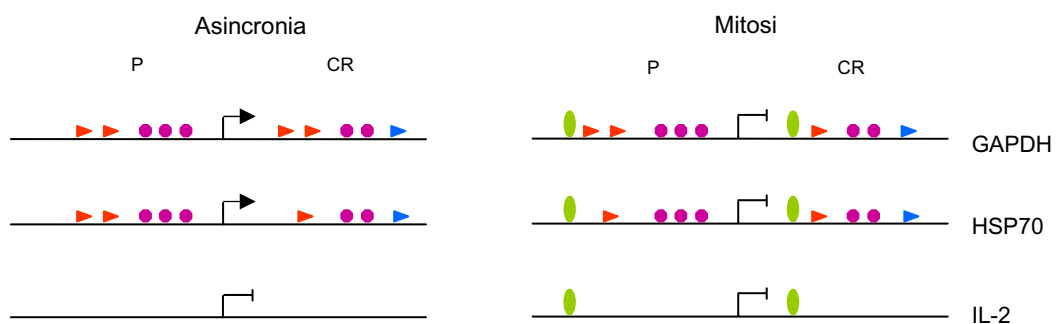
demostran que l'antigen T interacciona *in vitro* amb HDAC1, i que aquesta interacció es dona de manera independent a la proteïna del retinoblastoma, pRb (Figura 4). Finalment, l'eliminació de la desacetilasa HDAC1 mitjançant RNAi comporta una desrepressió parcial de l'activitat transcripcional d'aquest promotor (Figura 6). En aquest capítol es fa palesa la versatilitat de la proteïna viral, donat que pot participar en la regulació de dues activitats cel·lulars oposades, d'una banda participa modulant l'activitat HAT de CBP (Capítol 1A), mentre que de l'altra interacciona amb HDAC1 per reprimir determinats promotors (Capítol 1B). Com a conseqüència d'aquesta dualitat, la proteïna reguladora de SV40 podria adquirir en gran mesura el control cel·lular.

3. Paper de les modificacions de les histones en la senyalització i l'activació dels gens durant Mitosi.

En relació al Capítol 2 d'aquest treball, s'ha volgut incidir en la regulació de HATs i HDACs quan la cèl·lula entra en fase M. S'havia descrit que durant aquesta fase del cicle cel·lular, hi ha una inhibició de la transcripció de forma generalitzada (Prescott and Bender, 1962). S'ha observat també que durant aquesta fase del cicle hi ha un desplaçament de la majoria de factors de transcripció de la cromatina mitòtica (Martinez-Balbas *et al.*, 1995), però tot i així, hi ha alguns promotors que mantenen llocs d'hipersensibilitat a la DNasa I o al KMnO₄ (Michelotti *et al.*, 1997), ajudant a aquests gens potencialment actius a mantenir-se estructurats i preparats per a la ràpida activació de la transcripció un cop finalitzada la divisió cel·lular. Aquests descobriments suggereixen la presència de senyals (probablement modificacions posttraduccionals de les histones) responsables del marcatge dels gens durant la mitosi (Jeppesen, 1997; Kouskouti and Talianidis, 2005). El nostre treball es centra en l'anàlisi de les activitats HAT i HDAC durant mitosi i en l'estudi del paper que tenen l'acetilació i la metilació de H3K4 en el manteniment de la memòria dels gens actius durant mitosi. Primerament es realitza un anàlisi global de les activitats HAT i HDAC durant la mitosi. S'observa que aquests enzims romanen actius durant la mitosi, però es distribueixen en compartiments diferents, mentre que les HATs romanen ancorades a regions membranoses durant la mitosi, les HDAC són més accessibles al seu substrat (Figura 1E). Seguidament es realitza un anàlisi global de les modificacions de les histones que estan relacionades amb un fenotip d'activació transcripcional, com són l'acetilació de H3 (K9, K14) i H4 (K5, K8, K12, K16) o la dimetilació i trimetilació de la histona H3K4, s'observa mitjançant WB i immunolocalitzacions que la metilació de H3K4 es manté als cromosomes mitòtics, no obstant, l'acetilació de la histona H4

disminueix en gran mesura (Figura 1). Posteriorment es porta a terme un anàlisi extens de tres tipus de gens (constitutivament actiu, induïble i inactiu per la RNA polimerasa II) i es comparen els seus nivells d'acetilació i metilació de H3K4 en cèl·lules en asincronia o cèl·lules mitòtiques mitjançant l'anàlisi d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) (distingint les regions promotores i les codificadores). Es pot observar que tant l'acetilació de H3 i H4 com la metilació de H3K4 són marques que es mantenen en els promotors i gens de GAPDH i Hsp70 (constituti i induïble), però són inexistents al llarg del cicle pel què fa a gens inactius (Figures 2 i 3). S'analitza individualment una altra modificació que s'havia vist implicada en l'activació transcripcional de gens situats en regions silents heterocromàtiques, l'acetilació de H4K12. Pot veure's que aquesta modificació es manté en les regions codificadores dels gens GAPDH i Hsp70, i a més també es manté en el gen de la Ciclina B1 que s'expressa durant la mitosi. Per contra, no s'observa senyal ni en les regions promotores d'aquests gens ni en el gen IL-2 (Figura 4). Finalment, s'analitza detalladament el gen de la Ciclina B1, donat que s'activa durant mitosi. L'objectiu d'aquests experiments és veure quin patró d'activació presenten els gens que s'activen durant aquesta fase del cicle, i es pot determinar que l'activació transcripcional d'aquest gen es correlacionava amb un augment en la di- i la trimetilació de H3K4 (Figura 5). Suggestint d'aquesta manera, que les activitats HMTs romanen actives i accessibles al seu substrat durant aquesta fase del cicle.

Manteniment de modificacions posttraduccionals activadores durant mitosi



Senyalització d'activació transcripcional d'un gen actiu a mitosi

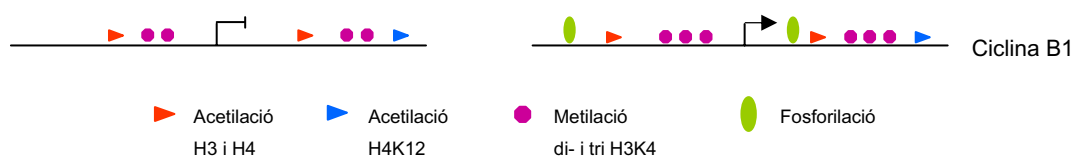


Figura RR1: Resum de les modificacions posttraduccionals senyalitzadores d'activació transcripcional que es mantenen durant la mitosi. A la part superior s'observen tres tipus de gens: GAPDH (constitutivament

actiu), HSP70 (induíble per xoc tèrmic) i IL-2 (inactiu per la RNA polimerasa II). S'exemplifiquen les regions promotores i les codificadores. A la part inferior es mostren els senyals d'activació d'un gen que s'expressa a mitosi, Ciclina B1. Per separat es mostra l'acetilació de la lisina 12 de la histona H4 com a possible marcador de la memòria cel·lular dels gens actius.

Aquests resultats mostren un paper important de l'acetilació de les histones H3 i H4 i la metilació de H3K4 en el marcatge dels gens potencialment actius durant la mitosi, tal i com es resumeix a la següent figura (Figura RR1).

4. Mecanismes de l'autoacetilació de PCAF.

En l'últim capítol descrivim un altre mecanisme per a la regulació de les activitats HAT i HDAC cel·lulars, les modificacions posttraduccionals. En el treball del Capítol 3 es presenta la regulació de l'acetiltransferasa PCAF mitjançant l'acetilació. Hi ha diverses proteïnes no histona amb capacitat per ser acetilades. Factors de transcripció com p53, TF_{II}E, TF_{II}F o E2F, s'ha vist que poden ser acetilats mitjançant diverses acetiltransferases i d'aquesta manera regulen la seva estabilitat i/o funció (Gu *et al.*, 1997; Imhof *et al.*, 1997; Martinez-Balbas *et al.*, 2000). En aquest treball es demostra que PCAF pot autoacetilar-se *in vivo*, i aquesta acetilació pot ser intra- o intermolecular. L'acetilació intramolecular (*cis*) de PCAF es dona a la regió Ct de la proteïna (Figura 3). Concretament, es pot veure mitjançant un assaig d'autoacetilació *in vitro* que l'acetilació intramolecular es dona en cinc lisines que estan situades a la regió de senyalització nuclear (NLS) adjacent al domini catalític (Figura 5). Quatre d'aquestes lisines participen en la localització nuclear, i mitjançant immunolocalitzacions es pot veure que la proteïna mutant en aquestes lisines és incapaç de dirigir-se a la regió nuclear (Figura 6). D'altra banda, l'acetilació de PCAF intermolecular (*trans*) es dona a la regió Nt de la proteïna, com es mostra a la Figura 2. A pesar d'això, la interacció entre dues molècules de PCAF no requereix aquesta regió, tal i com es detecta en l'experiment de *Pull Down* entre PCAF (FL) i PCAF (Ct) (Figura 2). Pot observar-se que p300, però no CBP, pot acetilar PCAF *in vivo* (Figura 4). Finalment, es demostra que l'autoacetilació de PCAF incrementa l'activitat HAT de la proteïna, ja que la proteïna mutant per les lisines de la NLS (necessàries per l'autoacetilació) presenta uns nivells d'activitat HAT inferiors als de la proteïna salvatge (Figura 7).

Aquests resultats mostren una modificació posttraduccional d'una HAT, PCAF, capaç de regular la seva activitat.

V. DISCUSSIÓ

CAPÍTOL 1: L'ANTIGEN T DE SV40 MODULA LES ACTIVITATS HAT I HDAC CEL·LULARS.

L'estat prolífer de la cèl·lula eucariota és molt important en el procés invasiu que pateix quan un virus l'infecta; aquest necessita tota la maquinària enzimàtica de què disposa la cèl·lula per poder-se replicar sense cap impediment. Per a portar a terme el seu objectiu principal de replicar-se i envair les cèl·lules adjacents a la cèl·lula infectada, el virus SV40 disposa essencialment de dos tipus de proteïnes: les proteïnes reguladores, que s'expressen durant la fase inicial de la infecció (antigen T i t), i les proteïnes estructurals, que s'expressen en fases més tardanes de la infecció. Entre totes aquestes proteïnes, la que centra el nostre interès i ha estat objecte del nostre estudi és l'**antigen T**. L'antigen T assumeix el rol de principal proteïna reguladora del virus. Podríem dir que ha evolucionat de manera que accedeix a les eines que dirigeixen el cicle cel·lular i així aconsegueix obtenir totalment el control cel·lular.

Un dels objectius del nostre estudi ha estat aprofundir en l'efecte que exerceix l'antigen T de SV40 a nivell de la cromatina, i això ens ho hem plantejat des de l'òptica de les proteïnes que regulen directament l'estat d'acetilació i desacetilació de les histones. En aquesta línia, cal dir que s'han descrit múltiples proteïnes virals amb capacitat per interaccionar amb HATs, (Avantaggiati *et al.*, 1996; Eckner *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 1998), i altres que tenen capacitat per interaccionar amb HDACs (Brehm *et al.*, 1999). En aquest apartat es discutiran els dos primers capítols d'aquesta tesi que tracten essencialment:

- ▶ Les conseqüències funcionals de la interacció de l'antigen T amb l'acetiltransferasa CBP –Capítol 1A-.
- ▶ Descripció de la interacció *in vitro* de l'antigen T amb HDAC1 i les conseqüències funcionals d'aquesta interacció –Capítol 1B-.

En el treball que s'ha presentat, hem identificat i analitzat les conseqüències funcionals de la interacció de l'antigen T amb una acetiltransferasa d'histones, **CBP**, i una desacetilasa d'histones, **HDAC1**. El fet d'haver trobat que una mateixa proteïna

viral estigui estretament lligada a processos on hi participen proteïnes que regulen l'acetilació i la desacetilació de la cromatina eucariota, permet endinsar-nos en un nou camí fins ara no explorat. Fins aquest moment només s'ha descrit que determinades proteïnes virals tenen capacitat per unir-se a acetiltransferases i d'altres la tenen per fer-ho a desacetilases. En contrapunt, nosaltres volem insistir en la possibilitat que aquesta proteïna viral pugui interaccionar amb els dos tipus d'activitats, permetent així, la regulació d'aquests enzims i dels processos que controlen d'una forma molt més ràpida i ajustada. D'aquesta manera, l'antigen T seria la primera proteïna vírica amb capacitat d'unir-se a HATs i HDACs. Cal dir que la proteïna principal de l'adenovirus, E1A, interacciona amb HATs (Eckner *et al.*, 1994; Avantaggiati *et al.*, 1996; Eckner *et al.*, 1996), però també s'ha vist relacionada amb processos de repressió transcripcional, interaccionant amb un corepressor, CtBP (Zhang *et al.*, 2000). No obstant, no s'ha vist directament associada a una desacetilasa.

1. L'antigen T de SV40 modula positivament l'activitat HAT global cel·lular.

El primer treball que es presenta en aquesta tesi fa referència a les conseqüències funcionals de la interacció entre l'antigen T i CBP. La interacció entre aquestes dues proteïnes s'havia descrit anys enrere, concretament al laboratori del Dr. Morgan (Eckner *et al.*, 1996), però de les conseqüències funcionals que se'n podien derivar d'aquesta unió no se'n sabia gairebé res. A rel d'aquesta interacció i de les múltiples més que hi ha entre HATs i proteïnes virals, al nostre laboratori ens varem plantejar quins eren els efectes generals que succeïen a nivell d'acetilació de les histones quan les cèl·lules estaven sota la presència d'una proteïna viral, en el nostre cas l'antigen T. Com a sistema per analitzar aquests efectes, es van utilitzar dues línies cel·lulars pràcticament idèntiques genèticament: CV1 i CV1COS. Aquestes dues línies cel·lulars només es diferencien en què la segona ha estat transformada amb el virus SV40 defectiu en el seu origen de replicació però conserva la correcta codificació dels seus gens primerencs, els quals estan integrats a l'atzar al seu genoma (Gluzman, 1981).

Dels primers resultats sobre l'efecte de l'expressió de l'antigen T a nivell global en la cèl·lula se'n poden extreure bàsicament dues conclusions:

- ▶ Augmenta l'activitat HAT global cel·lular (Figura 1 Capítol 1A).
- ▶ Incrementa el nivell d'acetilació de les histones (Figura 2 Capítol 1A).

S'ha discutit molt sobre el paper que tenen les HATs i HDACs en la cèl·lula eucariota. S'ha discutit si aquestes proteïnes interpreten papers concrets, actuant localment sobre regions promotores per tal de regular la transcripció gènica o bé, posseeixen papers més generals, actuant directament en el manteniment de l'equilibri d'acetilació de tot el genoma. El [mecanisme d'acció local](#) dels enzims que modifiquen covalentment les histones es dona principalment a les regions promotores dels gens. Això és un fet constatat i recolzat per diverses evidències, entre les quals hi ha: (1) la identificació de les primeres HAT i HDACs que ja eren coneguts cofactors que actuen en determinats promotors específics (Brownell *et al.*, 1996; Taunton *et al.*, 1996); (2) el fet que aquests enzims pertanyin a complexos multiproteics que són reclutats a regions promotores de manera específica per factors de transcripció que s'uneixen al DNA (Grant *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997); i finalment, (3) l'actuació restringida d'aquests enzims a 1 o 2 nucleosomes propers a la TATA box -els primers en veure un efecte *in vivo* de l'activitat HAT en l'activació de promotors regulats per Gcn5 a llevat són el grup del Dr. D. Allis (Kuo *et al.*, 1998)-. Però el que hi ha descrit a la literatura en referència a l'[efecte global](#) de l'acetilació és més confús i són majoritàriament estudis realitzats a llevat. D'una banda, podem fer referència als estudis realitzats al laboratori de M. Grunstein, on s'analitzen tres regions diferents del genoma de *S. cerevisiae* mitjançant ChIP's amb anticossos reactius contra H3 i H4 acetilades a diferents residus lisina; analitzen un total de 22 Kb, entre les quals hi ha regions promotores de gens així com les regions que envolten aquests promotors. Observen l'existència d'una acetilació global que és superior a les regions promotores dels gens (respecte les regions dels voltants), suggerint que pot tenir un paper en la regulació de la transcripció gènica, i proposen que hi hauria uns nivells basals en l'acetilació independent de transcripció que estarien regulats per uns mecanismes de recaptació dels enzims encara desconeguts. A les regions reguladores de la transcripció la cromatina es trobaria en un estat preparat a punt per poder ser modificat ràpidament, per això aquests mecanismes facilitarien que la regulació específica es produeixi de manera més efectiva (Vogelauer *et al.*, 2000). En relació a això, hi ha uns estudis realitzats per Treisman l'any 1998 que demostraven que la hiperacetilació de la histona H4 podia donar-se inclús si es bloquejava la transcripció gènica amb actinomicina D, suggerint que es pot produir una hiperacetilació global de les histones encara que no

hi hagi activitat transcripcional. Això està recolzat per les observacions d'estímuls que indueixen la hiperacetilació de la histona H4, però que són incapaços d'iniciar un procés d'activació transcripcional (Alberts *et al.*, 1998).

Analitzant detingudament els nostres resultats, podríem suggerir que això també podria ocórrer com a conseqüència d'un procés de transformació cel·lular induït per una proteïna viral, l'antigen T (Valls *et al.*, 2003).

► Quina explicació podria tenir la regulació del nivell d'acetilació global del genoma?

Una hipòtesi plausible és que aquests nivells d'acetilació basal serveixin per mantenir la cromatina en un estat determinat, un estat que estigui a punt per ser modificat quan convingui, i que permeti a la cromatina ser accessible a factors a fi que s'esdevinguin els canvis necessaris quan s'ha d'iniciar qualsevol procés que requereixi una modificació de la cromatina; a la vegada això ha de permetre que aquests canvis o alteracions puguin donar-se de manera molt ràpida. Això condueix a la idea que hi ha un estat d'acetilació global del genoma, la qual es troba en un flux constant. Les HATs que participen en l'activació transcripcional també juguen un paper aparent en processos no transcripcionals, establint un balanç d'acetilació general a nivell de tot el genoma (Vogelauer *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 2001; Kristjuhan *et al.*, 2002). L'acetilació global deu representar una resposta general a diferents estímuls que rep la cèl·lula, en aquest cas la presència d'una oncoproteïna viral. En els estudis que hem presentat, l'activitat HAT augmenta, a més, altres estudis preliminars realitzats al nostre laboratori, mostren que l'activitat desacetilasa global cel·lular és igual en cèl·lules CV1COS respecte CV1 (dades no mostrades), conseqüentment l'equilibri entre acetilació i desacetilació es veuria netament desplaçat cap a un augment dels nivells d'acetilació de les histones en cèl·lules que expressen l'antigen T.

Una altra possibilitat que explicaria l'increment general del nivell d'acetilació de les histones després de l'expressió de l'antigen T podria ser deguda merament als efectes addicionals a l'alta acetilació local que s'observa en els promotors regulats per l'antigen T.

2. L'activitat HAT de CBP és regulada positivament per l'antigen T.

Un cop analitzats els efectes globals de l'activitat HAT cel·lular, es va voler incidir en les conseqüències que emergien de la interacció entre CBP i l'antigen T. Com hem mencionat abans, s'havia descrit que l'antigen T interacciona amb CBP (Avantaggiati *et al.*, 1996; Eckner *et al.*, 1996). Varem veure que l'activitat HAT de CBP en cèl·lules CV1COS, que expressen l'antigen T, era superior que en cèl·lules CV1, que no l'expressen, i aquesta diferència augmentava considerablement quan se sotmetia les cèl·lules a creixement en absència de sèrum. Aquest increment en l'activitat HAT no és conseqüència d'un augment en l'expressió de la proteïna, ja que s'observen les mateixes quantitats de CBP en els dos tipus cel·lulars (veure Figura 3C Capítol 1A). A més, per confirmar que aquest augment en l'activitat HAT de CBP és conseqüència directa de la interacció de l'acetiltransferasa amb l'antigen T, es va generar una proteïna viral que presenta una deleció a la regió Ct on interacciona amb CBP, anomenada antigen T Δ CBP. Varem observar que CBP immunoprecipitava en cèl·lules transfectades amb la proteïna salvatge antigen T, i que això comportava un augment de l'activitat HAT de CBP, mentre que les cèl·lules transfectades amb la proteïna mutant antigen T Δ CBP, les quals no poden unir-se a CBP, conseqüentment no presenten un augment de la seva activitat HAT (Figura 3D capítol 1A) (Valls *et al.*, 2003). Aquests resultats van en consonància amb els del grup del Dr. Harel-Bellan, els quals observaren que la interacció entre la proteïna E1A de l'adenovirus i CBP incrementa l'activitat HAT del coactivador transcripcional (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998). No obstant, hi ha certa controvèrsia al respecte, ja que el grup de Chakravarti descrivien exactament el contrari, ells van veure que les activitats HAT, tant de CBP com de PCAF, eren inhibides quan aquestes acetiltransferases interaccionaven amb E1A (Chakravarti *et al.*, 1999); resultats que eren corroborats pel grup de Hamamori (Hamamori *et al.*, 1999). D'altra banda, el treball del grup del Dr. Kouzarides mostra que E1A no té cap efecte sobre l'activitat HAT de PCAF ni *in vitro* ni *in vivo* (Reid *et al.*, 1998).

2.1. A través de quins mecanismes l'antigen T augmenta l'activitat HAT de CBP?

► Podria ser que en el moment de la interacció entre l'antigen T i CBP, la proteïna viral tingués la possibilitat de reclutar una segona proteïna, una quinasa, de manera que fosforilés CBP. Aquesta **fosforilació** podria ser la causant d'una activació

de la proteïna. Hi ha diversos exemples a la literatura que proposen el mecanisme de la fosforilació proteica com a mecanisme per modular les activitats catalítiques canviant, potser, la predisposició del centre catalític vers el seu substrat, o bé fent-lo més accessible a les proteïnes accessòries amb les que haurà d'associar-se per realitzar la seva funció. De fet, hem observat una clara diferència en el patró de migració de CBP entre CV1 i CV1COS. En la primera línia cel·lular, CBP migra en una banda majoritària i dues de més febles per sota; en la segona, l'acetiltransferasa migra en dues bandes, de similar intensitat (dades no mostrades). Aquesta distinció en els patrons de la proteïna, doncs, podria ser deguda a una diferència en aquesta modificació posttraduccional.

► Una altra possibilitat seria que aquesta interacció induís un **canvi de conformació**, la qual cosa podria provocar una exposició més accentuada del centre catalític a l'exterior de la proteïna mostrant-lo al seu substrat, permetent un augment de l'afinitat entre l'enzim i el seu substrat i conseqüentment afavorint l'increment de l'activitat enzimàtica.

3. L'antigen T modula l'activitat transcripcional de CBP de manera dependent de promotor.

Després d'observar que l'antigen T incrementa l'activitat HAT de CBP, es va analitzar l'efecte que tenia sobre l'activitat transcripcional de CBP mitjançada per la seva activitat HAT. Els estudis realitzats per Martínez-Balbás l'any 1998, demostren que el domini HAT de CBP per si sol té la capacitat d'activar la transcripció d'una forma dependent de promotor. D'altra banda, la regió d'interacció de CBP amb l'antigen T, la regió CBP2, no posseeix capacitat transactivadora per si sola, però sí que contribueix a l'activació de la transcripció mitjançada per el domini HAT de CBP (Martinez-Balbas *et al.*, 1998).

Com que CBP posseeix diferents dominis d'activació a banda del domini HAT (veure Figura I8), per analitzar l'efecte que té l'antigen T en la capacitat transcripcional condicionada per la seva activitat HAT es van utilitzar construccions que contenen el domini HAT i el domini CBP2 fusionats al domini d'unió al DNA de Gal4, per poder ser reclutats al promotor (Figura 5 Capítol 1A). L'efecte de l'antigen T sobre l'activitat transcripcional d'aquestes construccions ha estat analitzat en dos promotors diferents,

que estan fusionats a llocs d'unió de Gal4, es tracta del promotor del gen Hsp70 i el promotor del gen Timidina Quinasa (Figura 5 Capítol 1A i Figura 1 Capítol 1B). En el primer cas es va observar que l'antigen T coopera de manera positiva mitjançant la interacció amb Gal4-HAT-CBP2 a l'hora d'activar la transcripció gènica del promotor; en el segon, la cooperació es dona en sentit oposat reprimint la transcripció. Diverses raons podrien explicar l'activació de l'antigen T sobre el promotor Hsp70:

- ▶ La primera podria ser que la interacció de l'antigen T amb el domini CBP2 originés un **canvi de conformació** de l'acetiltransferasa que podria comportar una major exposició del centre catalític de l'enzim vers el seu substrat, provocant-li un augment de la seva l'activitat HAT (tal i com s'ha discutit a l'apartat anterior).

- ▶ La segona podria ser que amb la unió de l'antigen T a CBP de manera dependent de promotor, la proteïna viral afavorís la **unió d'un tercer component**, un altre coactivador transcripcional. Podríem posar com a exemple PCAF, donat que es coneix que és un coactivador de CBP. Aquesta hipòtesi estaria recolzada per observacions fetes al nostre laboratori on s'ha observat que l'antigen T pot interaccionar amb PCAF *in vitro*, tot i que no s'ha aprofundit en el tema. No obstant, un article publicat per Yang i els seus col·laboradors, establiria un mecanisme oposat al que es proposa aquí, en el qual quan la proteïna viral E1A interacciona amb CBP ho fa desplaçant el coactivador PCAF (Yang *et al.*, 1996). Tot i això, aquests dos mecanismes d'actuació no tenen per què ser excloents.

- ▶ Una tercera hipòtesi, encara que potser més improbable, seria el fet que CBP estigués reprimint per algun agent corepressor, i que la interacció de l'antigen T amb CBP provoqués un **desplaçament del corepressor**, la qual cosa desemmascararia l'efecte negatiu que exerciria sobre CBP, i deixaria via lliure a la coactivació mitjançant el domini HAT-CBP2. Nemethova i els seus col·legues han realitzat un treball excel·lent que descriu el mecanisme d'actuació de l'antigen T de poliomavirus sobre els promotors regulats per E2F. L'antigen T de poliomavirus participaria en dos passos amb la finalitat de transactivar el promotor: primer es dissociaria el complex repressor format per E2F i proteïnes que contenen un domini butxaca, mitjançant una interacció directa amb les proteïnes de la família del Retinoblastoma, i després es produiria una acetilació de les histones específica de promotor com a resultat de la interacció de la proteïna viral amb el complex CBP/p300-PCAF (Nemethova *et al.*, 2004).

A la següent figura s'esquematitzen aquestes tres hipòtesis (Figura D1):

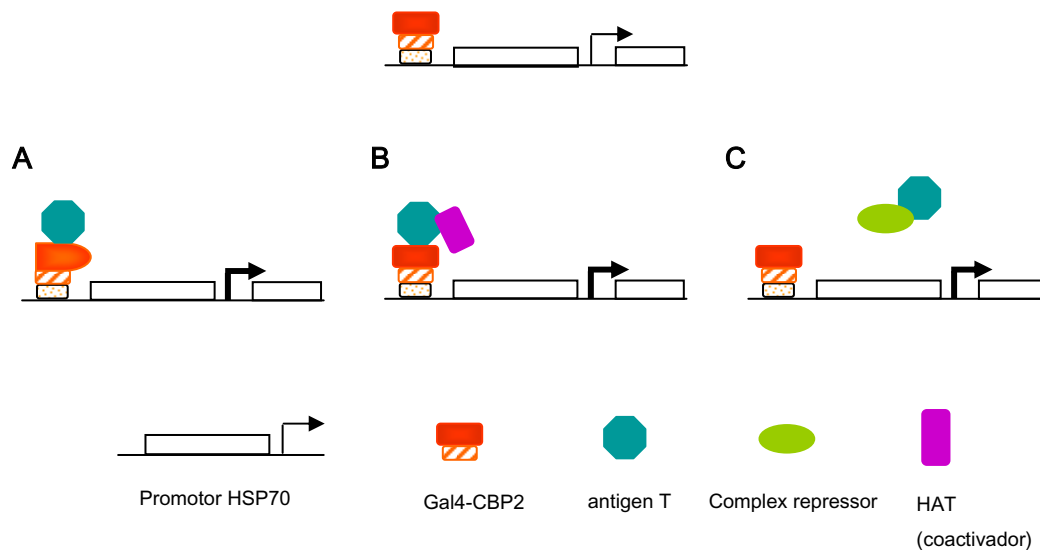


Figura D1: S'esquematitzen tres possibles mecanismes d'activació de la transcripció del promotor HSP70. L'activació del gen es produeix amb el reclutament de CBP a la regió promotora. A) L'antigen T interacciona amb CBP i li provoca un canvi de conformació que produiria un augment de l'activació transcripcional. B) La interacció de l'antigen T amb CBP facilitaria el reclutament d'un tercer component (un coactivador), per exemple una altra acetiltransferasa que participaria en l'augment transcripcional del gen. C) L'antigen T s'enduriria un complex repressor de la regió reguladora del gen, permetent un augment transcripcional del gen.

Pel que fa al promotor Timidina Quinasa, l'efecte que exerceix l'antigen T en la seva activitat transcripcional és oposat a l'anterior. S'ha vist que l'antigen T, quan és reclutat a la regió reguladora d'aquest gen mitjançant Gal4-HAT-CBP2, en reprimeix la seva transcripció (Figura 1B Capítol 1B). Aquestes dades estan en concordança amb les que aporten el grup d'Avantaggiati, en el seu treball demostren que quan E1A i antigen T són portades a determinats promotors mitjançant l'acetiltransferasa p300, aquestes proteïnes virals poden modular negativament l'activitat del promotor (Avantaggiati *et al.*, 1996). Els mecanismes a través dels quals l'antigen T actua com un repressor són desconeguts, no obstant ens atrevim a formular dues hipòtesis:

► La interacció de l'antigen T amb CBP2 suposaria el desplaçament d'un possible coactivador que interaccionaria amb aquesta mateixa regió de CBP (podria ser PCAF com hem discutit anteriorment). L'existència d'aquest coactivador, explicaria també la superactivació del domini CBP2 en l'activitat transcripcional del domini HAT.

► Una altra possibilitat implicaria la interacció de l'antigen T -ja sigui de manera directa o indirecta- amb un **complex repressor**, el qual probablement inclouria una desacetilasa d'histones (veure apartat 4). D'altra banda, es coneix que l'antigen T interacciona amb la proteïna del Retinoblastoma (Nevins, 1992), aquesta és una proteïna repressora, que es troba en un complex que té associada una desacetilasa, concretament HDAC1 (Brehm *et al.*, 1998; Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998). És possible doncs, que la repressió observada en aquest promotor estigui mitjançada per aquesta interacció.

► La tercera hipòtesi, i la que ens sembla més plausible, consistiria en una combinació de les dues hipòtesis esmentades a dalt, produint-se un **bescanvi de complexes**. L'antigen T funcionaria desplaçant un complex activador i afavoriria l'entrada en escena d'un complex repressor.

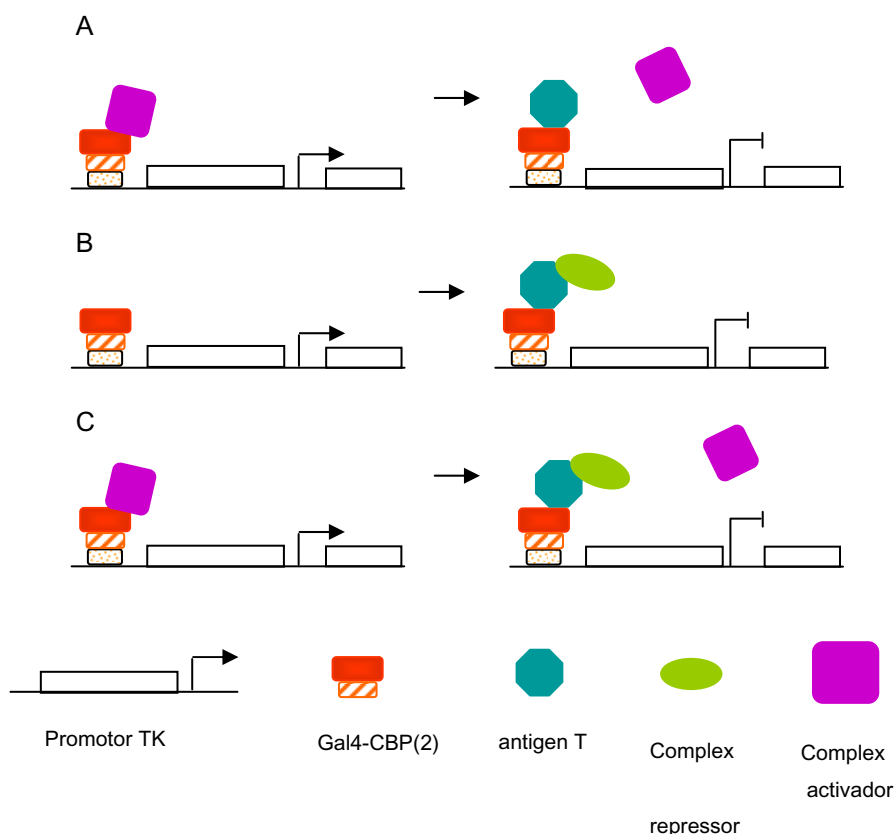


Figura D2: S'esquematitzen tres possibles mecanismes d'activació de la transcripció del promotor Timidina Quinasa (TK). L'activació del gen es produeix amb el reclutament de CBP a la regió promotora. A) El coactivador CBP requeriria un complex activador per a l'activació del gen, la interacció de l'antigen T amb CBP desplaçaria la interacció de CBP amb el complex activador, produint la repressió del gen. B) L'antigen T afavoriria el reclutament d'un tercer component (un complex repressor), per exemple una

desacetilasa d'histones que participaria en la repressió transcripcional del gen. C) Per últim, també podria donar-se una combinació dels dos mecanismes. L'antigen T provocaria un desplaçament del complex activador i a la vegada podria reclutar a un complex repressor, mitjançant així la repressió transcripcional del promotor.

A part dels resultats presentats en aquesta tesi, hem obtingut resultats utilitzant altres promotors, per exemple: el mateix promotor de la Timidina Quinasa regulat per el factor de transcripció E2F, el promotor de la Ciclina E, el promotor de *cdc6*, etc, els resultats obtinguts per aquests promotors mostren també una repressió transcripcional (dades no mostrades).

3.1. Com podria explicar-se l'efecte diferencial en la regulació dels promotors?

L'estat transcripcional d'un gen depèn generalment de l'**ambient** que l'envolta i de les pròpies **regions reguladores**. És a dir, depèn dels factors de què disposa i que es troben al voltant de la regió promotora quan s'ha d'activar o inhibir la seva transcripció. A la vegada, aquesta activació transcripcional està condicionada pels elements intrínsecs (*cis*) de la pròpia seqüència promotora (Travers, 1987; Willis, 1993). D'aquesta manera, segons la seqüència o l'estructura que presenti una regió reguladora determinada i del moment de la vida de la cèl·lula, s'afavorirà la unió d'un tipus de factors o d'un altre. Aquests tindran preferències a l'hora d'unir coactivadors o corepressors transcripcionals que en permetran la seva activació o repressió transcripcionals i que definiran l'activitat final del gen.

Els resultats obtinguts fins ara indiquen que l'antigen T és una proteïna reguladora molt versàtil, ja que d'una banda és capaç d'activar un promotor determinat i de l'altra de reprimir-ne d'altres. Encara que aquesta visió sigui contradictòria i sorprenent d'entrada, si es reflexiona detingudament, podria ajudar a entendre i explicar la multifuncionalitat d'aquesta proteïna reguladora viral. Cal recordar que l'antigen T és la proteïna reguladora per excel·lència del virus SV40, i quan el virus infecta la cèl·lula, aquesta és la proteïna que s'expressa primer, i l'encarregada de reorganitzar el cicle de la cèl·lula infectada. Els programes transcripcionals que haurà de controlar després de la infecció vírica poden ser oposats, com és el cas dels processos de proliferació i diferenciació, d'una banda hi haurà gens que s'hauran d'activar, i de l'altra n'hi haurà que s'hauran de reprimir, no és tant desavinent doncs, pensar que l'antigen T pugui desenvolupar funcions aparentment oposades.

4. Interacció de l'antigen T amb la desacetilasa d'histones HDAC1.

Els resultats obtinguts fins ara suggereixen la participació d'una activitat desacetilasa en aquest procés de repressió transcripcional. Malgrat no s'ha pogut demostrar una interacció entre l'antigen T i una desacetilasa d'histones *in vivo* –hem pogut detectar la interacció entre aquestes dues proteïnes *in vitro* (Figura 5 Capítol 1B)-, tots els efectes funcionals estudiats fins ara recolzarien la hipòtesi de l'existència d'aquesta interacció. Partint d'aquesta base, es va voler confirmar el paper de la desacetilació en l'efecte repressor mitjançat per l'antigen T, per això varem decidir de realitzar CHIP's en cèl·lules transfectades amb les mateixes construccions i determinar els nivells d'acetilació de les histones H3 i H4 d'aquest promotor sota la influència de l'antigen T. Estudis realitzats durant la dècada dels 80, descrivien que el DNA transfectat en plasmidis dins la cèl·lula eucariota s'organitza de manera similar a la cromatina, mitjançant estructures repetitives semblants a nucleosomes (Innis and Scott, 1983; Cereghini and Yaniv, 1984). Així doncs, estant segurs que es dona una estructura de cromatina es van analitzar els nivells d'acetilació de les histones del promotor Timidina Quinasa, concretament les histones H3(K9, K14) i H4 (K5, K8, K12, K16) acetilades. Quan aquest promotor es troba en un estat de transcripció basal, el que s'observa, mitjançant CHIP's és la presència de les histones H3 i H4 acetilades. Aquesta acetilació es podria considerar basal. Quan el promotor és activat mitjançant CBP, els nivells d'acetilació de les lisines 9 i/o 14 de la histona H3 augmenten considerablement, mentre que podríem dir que els de la histona H4 es mantindrien lleugerament superiors. Ara bé, si ens fixem en el punt on també es transfecta l'antigen T, si que veiem una baixada dels nivells d'acetilació, sobretot de la histona H3. Al darrer punt, on també es sobreexpressa HDAC1, la baixada encara esdevé més contundent. Aquests resultats suggeririen doncs, la presència d'una desacetilasa a la regió promotora controlada per l'antigen T. Paral·lelament, en els experiments realitzats amb l'inhibidor de desacetilases TSA s'observa que la repressió obtinguda en aquest promotor per l'antigen T és sensible al TSA, produint la desrepressió de la transcripció del promotor, recolzant la idea de la participació d'una desacetilasa en aquest procés transcripcional (Figura 3 Capítol 1B).

Els resultats obtinguts fins ara reafirmen la idea de versatilitat per part de la proteïna reguladora antigen T. A pesar de les clares evidències funcionals de la implicació de les desacetilases en el procés de repressió mitjançat per l'antigen T (veure apartats de la regulació transcripcional en presència de TSA o RNAi-HDAC1

Capítol 1A), i de la certesa de la interacció *in vitro* d'aquestes dues proteïnes, la seva interacció *in vivo* no s'ha pogut confirmar. S'han dissenyat diverses estratègies: (1) la coimmunoprecipitació de les dues proteïnes en extractes cel·lulars de mamífers; (2) la utilització d'un sistema de doble híbrid; (3) la immunolocalització. Cap d'elles ens ha permès detectar la interacció *in vivo*. De possibles causes d'aquesta fallida en la detecció de la interacció, n'hi ha múltiples. En el primer cas, podria ser que els epítops que reconeixen les proteïnes interfereixen d'alguna manera en la unió, és a dir, potser l'anticòs que reconeix l'antigen T quan l'immunoprecipitem ho fa a la regió per on interacciona HDAC1 i impedeix que la unió es doni, o a l'inrevés, i per això no observem cap banda (en el cas del WB) o cap activitat desacetilasa (en el cas de IP-HDAC). En el segon cas, podria ser que la interacció no sigui directa, i a part de pRb també pugui donar-se per alguna altra proteïna pont, que no existeixi a llevat, per la qual cosa el sistema de dos híbrids no ens funcionaria.

Es coneix fins ara que les proteïnes virals tenen capacitat per interaccionar amb activitats acetiltransferasa d'histones, com E1A i el mateix antigen T entre d'altres (Avantaggiati *et al.*, 1996; Eckner *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 1998), així com amb desacetilases d'histones, com E7 (Brehm *et al.*, 1999). No obstant, si es confirmen els nostres resultats *in vivo*, l'antigen T seria la primera proteïna viral capaç d'interaccionar amb les dues activitats, i això li permetria un major control dels processos reguladors clau de la transcripció cel·lular.

4.1. Per quins motius l'antigen T interaccionaria amb dues proteïnes amb activitats oposades?

Creiem que és molt interessant el significat que es pot atribuir a la interacció de l'antigen T amb HATs i HDACs, encara que *a priori* podria semblar estrany. No obstant, hi ha dades a la literatura que mostren interaccions semblants entre HATs i HDACs: l'any 2003 el grup de la doctora K. Ozato descrivia la interacció entre acetiltransferases i desacetilases *in vivo*, concretament centraven el seu estudi en la unió de PCAF amb HDAC1, però també van detectar que HDAC1, HDAC2 i HDAC3 podien estar associades amb GCN5 i PCAF en cèl·lules HeLa. Utilitzaven una tècnica molt innovadora aleshores, la tècnica de FRET. D'aquesta manera, l'existència de complexos HAT-HDAC semblaria ser compatible amb la idea que hi ha d'un mecanisme que estableix i manté un equilibri entre HATs i HDACs (Yamagoe *et al.*, 2003). Es coneix que les histones del *core* nucleosomal s'acetilen i desacetilen molt

ràpidament (Covault and Chalkley, 1980), i que en regions on hi ha un ràpid recanvi de l'estat acetilat es corresponen en regions transcripcionalment actives, on HAT i HDACs poden coexistir (Davie, 1998). Seguint aquestes pautes, les dades de la Dra. Ozato indicarien que aquests complexos HAT-HDAC participarien en la transcripció (Yamagoe *et al.*, 2003).

Però l'existència d'aquests complexos pot tenir un sentit més generalitzat, així doncs, podrien actuar afectant els nivells globals de l'acetilació al llarg de tot el genoma, com hem discutit anteriorment, mantenint la dinàmica d'un estat acetilat en constànt flux (Vogelauer *et al.*, 2000). Recolzant aquesta idea, el grup del Dr. PL. Puri l'any 2004 van descriure la interacció de p300 amb HDAC1. L'acetiltransferasa reclutaria la desacetilasa a través del seu tercer dit de zinc, precisament també el lloc d'interacció amb l'antigen T. L'explicació que s'atribueix a aquesta unió d'una banda pot ser la prevenció d'unió d'un coactivador (PCAF) a l'acetiltransferasa, quan es troba en llocs transcripcionalment silencis, la qual cosa permetria obtenir un promotor desacetilat quan la transcripció ha de ser reprimida. També es podria tenir una ràpida acetilació en el cas que fos necessari activar la transcripció del promotor. Alternativament, el reclutament d'una activitat desacetilasa per part de p300/CBP podria ser utilitzada com a un mecanisme de retroalimentació negativa per tal d'atenuar la creixent fase inicial de la transcripció. En aquest cas, es podria preveure que la desacetilasa podria estar implicada en el restabliment de la configuració de la cromatina original (Simone *et al.*, 2004).

Totes aquestes dades ens conviden a formular un possible model de coexistència de HATs i HDACs: en el nostre sistema heteròleg de transfeccions transitòries del promotor de pGal4-TK-luciferasa, on s'hi uneix una acetiltransferasa (CBP), l'antigen T quan entra en escena interaccionant amb CBP a la regió CBP2, podria reprimir aquest promotor amb la participació d'una activitat desacetilasa que podria mitjançar la repressió que s'observa. Així doncs, proposaríem que l'antigen T actuaria com a pont d'unió de les dues proteïnes, o com a proteïna encarregada de reclutar HDAC1 cap al promotor regulat per CBP. A la Figura D3 es presenta el model proposat en el qual la transcripció del promotor de la Timidina Quinasa estaria regulada per acetiltransferases i desacetilases. Quan el promotor s'ha d'activar recluta una acetiltransferasa, CBP, i aquesta mitjançant l'acetilació de les histones de la regió promotora actuaria activant la transcripció del gen. D'altra banda, en presència de l'oncoproteïna viral antigen T, aquesta per un costat s'uniria a CBP i per l'altre

reclutaria una desacetilasa que mitjançant la seva activitat catalítica actuaria desacetilant les histones de la regió promotora, la qual cosa provocaria una repressió de la transcripció del gen. Per altres promotors, el mecanisme podria ser ben diferent.

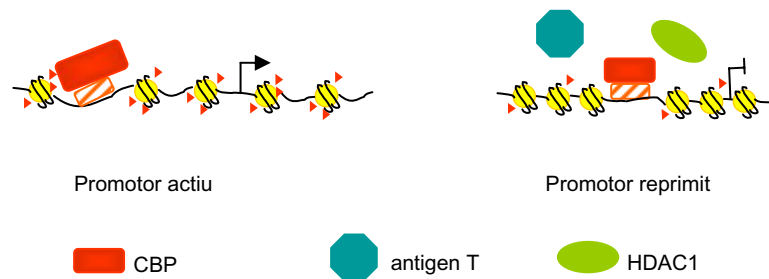


Figura D3: S'esquematitza l'estructura cromatínica del promotor Timidina Quinasa. En una situació d'activació transcripcional, la cromatina està acetilada, i el CBP està reclutat a les regions reguladores del gen. En presència de l'antigen T, la proteïna viral atrau una desacetilasa, i la porta al promotor aprofitant la seva interacció amb CBP, la qual cosa provoca una desacetilació de la cromatina de la regió reguladora del gen, amb la conseqüent repressió transcripcional.

CAPÍTOL 2: PAPER DE LES MODIFICACIONS DE LES HISTONES EN EL MARCATGE I L'ACTIVACIÓ DELS GENS DURANT LA MITOSI

En els organismes pluricel·lulars, la diferenciació cel·lular s'adquireix gràcies a la regulació de l'expressió gènica precisa de diversos grups de gens. El patró que dicta la diferenciació d'un tipus cel·lular es manté al llarg de diverses generacions, per tant els patrons d'expressió gènica s'han de mantenir durant la divisió cel·lular.

La complexitat en la que s'estructura la cromatina de les cèl·lules quan entren en **mitosi**, i l'alt grau de compactació que arriba a assolir posen en evidència la complexitat i la dificultat de la regulació dels processos transcripcionals que es donen durant i després d'aquest esdeveniment. En aquest procés s'han de transmetre i perpetuar les directrius de l'expressió gènica, i la nova cèl·lula resultant de la duplicació haurà de saber quins seran el grup de gens que hauran de ser activats o s'hauran de mantenir reprimits. Donat que la informació que governa l'expressió gènica d'un grup de gens determinat és transmesa d'una manera tan fidel, com aconsegueix la cèl·lula el manteniment dels patrons corresponents d'expressió gènica d'una generació a la següent? Les modificacions de les histones han estat considerades les marques moleculars responsables de la transmissió generació a generació de la informació que controla l'expressió gènica. Podria dir-se que aquestes modificacions estan organitzades en forma de **codi epigenètic**, el qual és reconegut i llegit per uns enzims amb dominis específics que reconeixen aquestes modificacions (Jenuwein and Allis, 2001). Concretament els bromodominis són els encarregats de reconèixer les lisines acetilades, i uns estudis realitzats recentment descriuen que les proteïnes Brd4 (característiques per la presència de domini bromo en tàndem) romanen unides a la cromatina durant mitosi (Dey *et al.*, 2003). De la perpetuació i transmissió d'aquests senyals al llarg de diverses generacions se l'ha anomenat **memòria epigenètica** (Turner, 2000; Jenuwein and Allis, 2001). Es coneixen relativament bé les modificacions específiques de les histones que generen i propaguen l'estructura repressiva de la cromatina (Jenuwein and Allis, 2001; Kouzarides, 2002). No obstant, pel què fa a les modificacions responsables de l'estat actiu transcripcional de determinats gens està menys estudiat, tot i que ja hi ha alguns

treballs que destaquen l'acetilació i la metilació de la lisina 4 de la histona H3 com a responsables d'aquests processos (Santos-Rosa *et al.*, 2002; Dey *et al.*, 2003; Kouskouti and Talianidis, 2005). En aquest capítol hem aprofundit en la regulació de les activitats HAT i HDAC durant mitosi i hem analitzat el seu paper en el manteniment de la memòria cel·lular.

1. Comportament de les activitats HAT i HDAC globals en interfase i mitosi.

S'havia descrit que els nivells d'acetilació globals a la cèl·lula disminuïen dràsticament durant la mitosi (Jeppesen and Turner, 1993), cosa que es correlacionava directament amb una disminució dràstica de la transcripció gènica (Prescott and Bender, 1962). La baixada d'acetilació durant la mitosi pot ser deguda a diverses raons:

- ▶ Els enzims que catalitzen aquestes reaccions estan inactius durant aquesta fase del cicle.
- ▶ Aquests enzims no assoleixen arribar al seu substrat.

Per esbrinar què els succeeix doncs, primer de tot varem analitzar les activitats HAT i HDAC globals durant mitosi. Varem poder observar, tal i com ho feren al grup de D.P. Bazett-Jones, que les activitats HAT i HDAC *in vitro* es mantenien actives (dades no mostrades) (Kruhlak *et al.*, 2001). Això ens portà a pensar que segurament hi havia un canvi en la localització cel·lular d'aquests enzims durant la mitosi, per això varem realitzar dos tipus d'experiments: (1) immunolocalitzacions de les proteïnes confirmant que els enzims estan exclosos de la cromatina condensada (dades no mostrades), (2) una extracció diferencial dels enzims, per saber en quin compartiment es troben, i un assaig enzimàtic posterior per determinar si restaven actius. A més, varem observar que l'activitat HAT romanien en compartiments associats a estructures membranoses (fase pellet, P) durant la mitosi, fent-la més inaccessible al seu substrat. Per contra, les activitats HDAC eren més accessibles al seu substrat, mantenint-se a la fase soluble (fase S) de l'extracte durant mitosi (Figura 1E Capítol 2). Això significa una distribució diferencial dels dos tipus d'enzims, tot i que es mantindrien actius catalíticament durant la fase mitòtica del cicle cel·lular. D'aquesta manera, les desacetilases restarien més

accessibles a la cromatina mentre que les acetiltransferases, *a priori*, romandrien ancorades a regions més inaccessibles. A la Figura D4 es mostra el model que proposem per aquesta hipòtesi, no obstant, cal recordar que estem parlant d'activitats enzimàtiques globals, segurament a nivell específic trobaríem diferències substancials en aquestes distribucions.

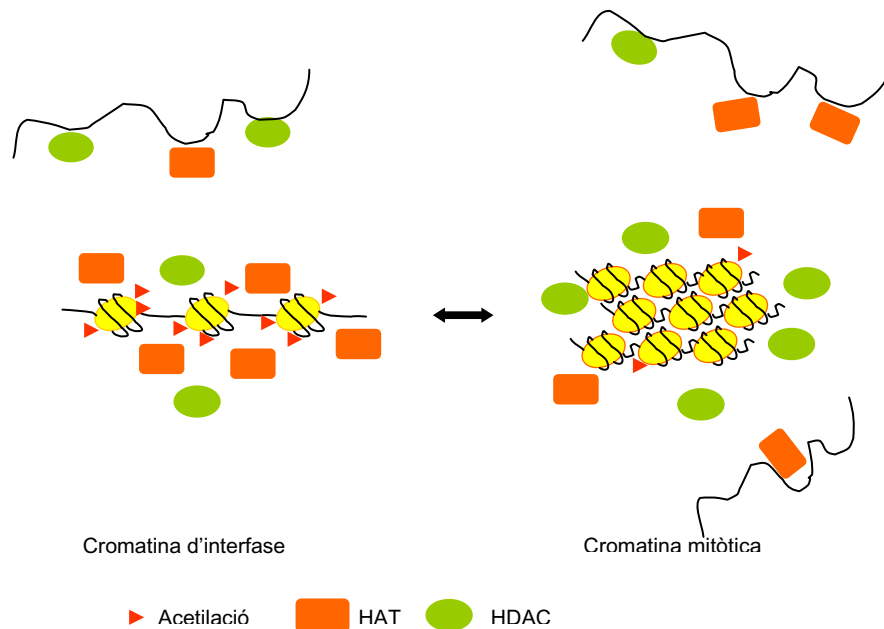


Figura D4: Model de distribució dels enzims HAT i HDAC durant la progressió del cicle cel·lular. En cèl·lules en interfase, la cromatina es troba de manera laxa, acetilada, i les acetiltransferases (HAT) tenen més accessibilitat al seu substrat, mentre que les HDAC no són tant accessibles a la cromatina, restant principalment associades en estructures membranoses. Durant la mitosi, la cromatina adopta una estructura altament condensada i es produeix una hipacetilació generalitzada, les HDAC es distribueixen en la fase soluble de les cèl·lules, mentre que les HATs romanen més inaccessibles al substrat.

2. Qui senyalitza els gens actius (constitutius i induïbles) durant la mitosi?

Malgrat l'observació de la pèrdua d'acetilació de les histones general descrita per Jeppesen (Jeppesen and Turner, 1993), Turner va ser un dels impulsors de la idea que hi havia una acetilació moderada a la cromatina mitòtica que havia de funcionar com a marca epigenètica per preservar la organització de la cromatina en aquella zona, i que ajudés a permetre l'activació dels gens quan s'assolia la fase de mitosi, eren les anomenades bandes R (moderadament acetilades a la lisina 12 de la histona

H4 bàsicament). Es va proposar a les HATs com a responsables del mecanisme de reconeixement i transmissió d'aquestes marques epigenètiques durant aquesta fase de cicle (Turner and Fellows, 1989). Ja a l'any 2000, el mateix Turner, insistia en l'acetilació com una candidata més en el manteniment de determinades estructures cromatíniques al llarg de la mitosi donat que els bromodominis de determinats enzims poden reconèixer la modificació de manera específica. Les investigacions del grup del Dr. Talianidis apunten en la mateixa direcció (Turner, 2000; Kouskouti and Talianidis, 2005). En aquest sentit, hi ha uns descobriments molt destacables per part del grup de la Dra. Ozato, on s'ha observat que la proteïna Brd4, amb doble bromodomini, roman unida *in vivo* a la cromatina mitòtica (Dey *et al.*, 2003). En aquest context, varem voler analitzar si l'acetilació i la metilació participaven activament en el marcatge dels gens que han de romandre actius després de la mitosi.

Varem comparar els senyals d'activació: acetilació de les histones H3, H4 i metilació de la histona H3 a la lisina 4 en promotors i regions codificadores de diversos gens mitjançant CHIP's en cèl·lules asincròniques i sincronitzades a mitosi. Per poder-nos fer una idea de com es senyalitzen els diversos tipus de gens en les cèl·lules eucariotes, i de si aquests senyals es mantenen durant la mitosi, varem analitzar tres tipus de gens que es diferencien segons el tipus d'expressió gènica: (a) un gen constitutivament actiu: Gliceraldehid 3 fosfat deshidrogenasa, [GAPDH](#), (b) un gen induïble per un xoc tèrmic: Heat shock protein 70, [Hsp70](#) i, (c) el gen interleuquina 2, [IL-2](#), el qual és inactiu per la RNA polimerasa II. Dels resultats obtinguts se'n poden extreure diverses conclusions:

- ▶ L'acetilació de H3 i H4 es manté durant la mitosi en gens actius constitutivament i induïbles en regions promotores i regions codificadores (Figures 2 i 3 Capítol 2).

- ▶ La metilació de H3K4 es manté constant en asincronia i en mitosi (Figures 2 i 3 Capítol 2).

2.1. Diferències en els nivells de modificacions entre regions promotores i regions codificadores dels gens.

Les regions promotores dels gens presenten uns nivells de modificacions més alts que les regions codificadores dels mateixos gens. Si es comparen els senyals

obtinguts a les regions promotores respecte els de les regions codificadores, s'observa que a les regions codificadores s'obtenen uns nivells lleugerament inferiors de senyal. Això estaria en consonància amb els resultats obtinguts al grup del Dr. P.A. Jones, on veuen diferències en la senyalització segons la part del gen que s'analitza. Ells obtenen uns nivells de modificació (tan les d'acetilació H3(K9, K14) com les de dimetilació i trimetilació H3K4) més elevats a les regions 5', corresponents a les regions reguladores del gen, mentre que aquestes disminueixen gradualment a mesura que s'aproximen a les regions més 3' del gen (Liang *et al.*, 2004). Resultats similars, pel què fa a la dimetilació i la trimetilació de H3K4, els obtenen Schneider i els seus col·laboradors, quan analitzen els gens de l'anhidrasa carbònica i del GAPDH en cèl·lules en asincronia (Schneider *et al.*, 2004). En els nostres resultats, tot i observar una disminució de senyals d'acetilació de les regions codificadores respecte a les promotores, no veiem una total desaparició d'aquestes. En referència a la metilació de H3K4 els nostres resultats mostren la mateixa intensitat de senyal tant en regions promotores com en codificadores (comparar Figures 2 i 3 (Valls *et al.*, 2005)). Val a dir que tant Liang, com Schneider com Kouskouti, han analitzat diverses parts de les regions codificadores, i han observat una gradual pèrdua de senyal quan s'aproximen a les regions més 3' dels gens. Nosaltres hem analitzat diverses regions dels gens aleatòriament, però no hem analitzat diverses parts en una mateixa regió de codificació.

Com s'ha descrit als resultats, el promotor de la [IL-2](#), el gen inactiu per la RNA polimerasa II, ens ha servit com a control negatiu. La modificació de la serina 10 de la histona H3 fosforilada (H3S10) ha estat utilitzada de control positiu, i s'esperava trobar a cèl·lules en mitosi donat que s'ha descrit que aquesta modificació és un marcador cel·lular d'entrada a mitosi, degut a la seva participació en la condensació de la cromatina (Hendzel *et al.*, 1997).

2.2. L'acetilació de H3 i H4 i la fosforilació de H3 són senyals d'activació de la transcripció del gen [Hsp70](#).

Com a model de gen induïble, hem analitzat el gen [Hsp70](#) que s'activa quan la cèl·lula se sotmet a un xoc tèrmic. Primer de tot, es van voler determinar quins eren els patrons que dirigien l'activació d'aquest gen, i es van realitzar CHIP's en cèl·lules en asincronia sotmeses o no a un xoc tèrmic (HS). Varem poder observar que tant l'acetilació de H3, [H3\(K9, K14\)](#), com la de H4, [H4\(K5, K8, K12, K16\)](#), augmentaven

quan el gen s'activava (tant a la regió promotora com a la codificadora). La fosforilació de la serina 10 de H3, [H3S10](#), també augmentava considerablement. La dimetilació i la trimetilació de H3K4 resultaren inalterades després del xoc de temperatura, suggerint que no participaven en l'activació d'aquest gen. Està descrit a *Drosophila* que la fosforilació de H3S10 augmenta quan el promotor s'activa (Nowak and Corces, 2000). No obstant, en cèl·lules de ratolí s'ha suggerit que és només l'acetilació de les histones la que augmenta just després de l'activació transcripcional d'aquest promotor (Thomson *et al.*, 2004). Així doncs, estariem parlant de tres espècies, mosca, ratolí i humans, que regularien l'activació transcripcional d'un mateix gen, Hsp70 molt conservat evolutivament, de tres maneres diferents. Podria tractar-se de mecanismes redundants, donat que dues de les espècies tenen capacitat per activar el gen només amb una de les dues modificacions. No obstant, podria ser que el codi que se segueix en cèl·lules humanes requereixi les dues marques degut a exigències dels enzims que les reconeixen. S'ha descrit que un dels codis que mitjancen l'activació transcripcional el donarien H3S10 fosforilada i H3K14 acetilada. Donada la proximitat en la que es troben aquests dos residus, semblaria que la primera modificació facilitaria que es donés la segona (Cheung *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2000).

2.3. Tindrien un paper comú aquestes marques de memòria cel·lular?

En conjunt, els resultats que hem obtingut suggeririen que hi ha certes modificacions senyalitzadores de l'activació transcripcional que podrien ser transmeses d'una generació de cèl·lules a la següent. Els resultats recolzarien fortament que la cèl·lula disposa d'un mecanisme de regulació del manteniment de l'estat activat dels gens durant la mitosi (i que segons sembla és compartit pels gens constitutivament actius i pels induïbles), i que podria servir com a senyal per al reagrupament de la maquinària transcripcional que ha d'entrar en joc just després de finalitzar la mitosi.

En resum, proposem que les modificacions que participarien en l'activació de Hsp70 són l'acetilació i la fosforilació i les modificacions que activarien el gen Ciclina B1 serien les de metilació. Però el marcatge de H3K4 en el gen Hsp70 es transmet durant mitosi, i es manté en uns nivells constants, de la mateixa manera, l'acetilació en el gen Ciclina B1 no incrementa quan el gen és actiu, però es manté durant mitosi.

3. Un cas especial, l'acetilació de la lisina 12 de la histona H4.

Gottschling i els seus col·laboradors mostraven que l'acetilació a H4K12 semblaria una alternativa adoptada pels llevats per encapçalar la funció de memòria cel·lular i impedir la repressió gènica en regions típiques on es dona el silenci de gens, en regions d'heterocromatina (Smith *et al.*, 2002). En base a aquests resultats ens plantejarem analitzar si aquesta modificació també marcava els gens actius d'eucromatina durant la mitosi als mamífers. Varem realitzar ChIP's de les regions promotores i codificadores dels gens utilitzats en tot l'estudi (veure Figura 4C Capítol 2), i varem poder-ne extreure dues conclusions bàsiques:

- ▶ L'acetilació de H4K12 és present a les regions codificadores dels gens GAPDH, Hsp70 i Ciclina B1, però no a les seves regions promotores.
- ▶ En el gen inactiu per la RNA polimerasa II, Interleuquina-2, no hi ha evidències d'aquest marcatge ni en la regió promotora ni en la codificadora.

Aquests resultats suggerien que la presència de l'acetilació de H4K12 que es troba als gens de les regions telomèriques dels llevats pot produir-se als gens actius dels eucariotes superiors i es manté a la fase de mitosi. Kruhlak, Kim i Smith recolzen les nostres observacions, les quals coincideixen en què l'acetilació a H4K12 és una marca dels dominis de cromatina transcripcionalment activa necessària per la reactivació postmitòtica (Kruhlak *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003).

4. Regulació transcripcional de la Ciclina B1: Com es regula la seva expressió durant la mitosi?

Finalment varem analitzar què passava en un gen, la **Ciclina B1**, que és actiu durant aquesta fase del cicle (Sciortino *et al.*, 2001). Segurament tindria unes característiques particulars donades les circumstàncies ambientals, o potser seguia els mateixos patrons d'activació gènica que altres gens que s'expressen en interfase. Els resultats obtinguts indiquen que:

- ▶ La metilació de H3K4 del promotor i de la regió codificadora de la Ciclina B1 augmenta considerablement durant mitosi (quan el gen està actiu).

► L'acetilació de H3 és inexistent a la regió codificadora del gen, mentre que l'acetilació de H4 no canvia entre asincronia i mitosi.

En el cas de gens que s'expressen durant la mitosi, sembla que el protagonisme l'adquireix la metilació de H3K4. Veiem un augment de la dimetilació i la trimetilació de H3K4, tant en el promotor com en la regió codificadora del gen de la Ciclina B1, tot i que l'augment més evident l'observem en la trimetilació de H3K4 (Veure Figura 5 Capítol 2). En aquest cas semblaria fàcil imaginar que les metiltransferases responsables de la metilació de H3K4 (Set1) assumissin el protagonisme d'aquest procés. El proper pas a seguir seria determinar si hSet1, l'enzim responsable de la metilació de H3K4, està reclutada al promotor i/o a la regió codificadora de la Ciclina B1 modificant la histona H3, i com està regulada l'activació transcripcional d'aquest gen en humans. Experiments immediats i destacables que ens ajudin a entendre la regulació d'aquest promotor serien ChIP's de Set1 en aquest mateix gen, per veure si la metiltransferasa és reclutada específicament en aquest promotor i/o en la regió codificadora. Addicionalment, uns estudis realitzats a llevat demostren que la interacció entre la proteïna de remodelació de la cromatina Iswi1 i la metiltransferasa de llevat Set1p, comportarien uns canvis a les regions promotores d'alguns gens que serien necessaris per la correcta distribució de la RNA polimerasa II al llarg de les seves regions codificadores (Santos-Rosa *et al.*, 2003). Seria molt interessant establir un paral·lelisme d'aquest mecanisme en humans, i un punt de partida podrien ser els dos homòlegs de ISWI a humans: hSNF2H i hSNF2L (Langst and Becker, 2001); S'ha vist que hSNF2H també té capacitat d'unió a H3K4 metilada però no s'uneix a la forma no metilada (Santos-Rosa *et al.*, 2003). Possibles experiments per confirmar que el complex SWI/SNF està implicat en l'activació del gen de la Ciclina B1 a mitosi podrien ser determinar si existeix la interacció entre la proteïna de remodelació hSNF2H i hSet1, i si es localitzen sobre la regió promotora de Ciclina B1. També seria interessant determinar si existeix una relació amb la RNA polimerasa II que ens permetés establir una connexió directa entre l'activació de la transcripció del gen i la modulació de la cromatina per part de la metilació d'aquest residu. Altres experiments que s'han pensat inclourien eliminar l'expressió de hSet1 mitjançant RNAi de Set1, i veure si realment desapareix la metilació de H3K4 a mitosi, aleshores s'hauria de determinar si aquest gen, Ciclina B1, esdevé inactivat o potser tindria com a alternativa un altre mecanisme d'activació transcripcional.

Ja per acabar, els assaigs HMT globals que s'han realitzat en cèl·lules en asincronia i mitosi no mostren grans diferències en el nivell d'activació d'aquests enzims, suggerint que les metiltransferases es mantindrien actives durant la mitosi (veure Taula 2 Capítol 2). Amb aquests resultats, i tenint en compte que les activitats responsables de mantenir l'equilibri entre acetilació i desacetilació restarien inaccessible al substrat -encara que es mantindrien actives durant mitosi (dades obtingudes per Kruhlak i col·laboradors (Kruhlak *et al.*, 2001)-, proposaríem l'activitat metiltransferasa com la principal responsable dels canvis lligats a activació transcripcional que es donen a la cromatina durant mitosi. Això no obstant, caldria més experimentació per corroborar aquest hipòtesi.

CAPÍTOL 3: MECANISMES D'AUTOACETILACIÓ DE PCAF

Fins ara en aquest treball, la regulació de les activitats HAT i HDAC ha estat abordada des de dos punts de vista: (a) una regulació com a resposta d'un estímul extern, com és la influència d'una proteïna viral, l'antigen T -en els capítols 1A i 1B hem pogut discutir la manera en la que aquesta proteïna pot modular les activitats HAT i HDAC cel·lulars- i, (2) la regulació de la cromatina des del punt de vista de la progressió del cicle cel·lular (en el capítol 2 hem pogut observar les modificacions posttraduccionals que es mantenen a la cromatina mitòtica). Per últim, al capítol 3, s'analitza un altre factor que pot ser determinant en la regulació de les HATs i HDACs cel·lulars, és la modulació de l'activitat de l'enzim PCAF, mitjançant acetilació.

PCAF és una proteïna molt inestable, i perd la seva activitat HAT molt ràpidament de manera irreversible. PCAF s'estabilitza *in vitro* amb la presència continua de l'acetil-CoA i mitjançant l'autoacetilació *in vitro* (Herrera *et al.*, 1997). El nostre treball ha avançat un pas endavant demostrant que PCAF s'autoacetila *in vivo* i que també és una diana de p300, però no de CBP. L'acetilació de PCAF es dona de manera intramolecular (en *cis*) i de manera intermolecular (en *trans*). Finalment, es mostra que l'acetilació de PCAF condueix a un increment de la seva activitat HAT.

1. PCAF s'acetila *in vivo*

Estudis previs realitzats pel grup del Dr. Bustin, demostraven que PCAF podia acetilar-se *in vitro* (Herrera *et al.*, 1997). El que es va voler demostrar primerament, era si aquesta acetilació de la proteïna podia donar-se *in vivo*. A la Figura 1 del Capítol 3 es pot comprovar mitjançant transfeccions transitòries en cèl·lules U2OS, o bé mitjançant el PCAF endogen de les cèl·lules C2C12, que la proteïna PCAF s'acetila *in vivo*. Un cop establerta la capacitat de PCAF d'acetilar-se es va voler determinar si l'acetilació es donava en *cis* o bé en *trans*. Es va poder comprovar que l'acetilació es produïa de manera intra- i intermolecular i això es donava en dues regions diferents de la proteïna. El fet que la proteïna s'acetili en dues regions diferents, i de manera independent suggereix que pugui tenir funcions *in vivo* ben diferenciades: (1) una de

les conseqüències pot ser el reclutament de la proteïna a diferents promotors de la cèl·lula, (2) una altra possibilitat, servir per ser reclutada amb diferents afinitats, o bé, (3) podria formar part de distints complexos.

Donat que PCAF, tal i com el seu nom indica, és un factor associat a les acetiltransferases CBP i p300 -i d'aquesta manera va ser identificada l'any 1996 (Yang *et al.*, 1996)-, la idea que sorgeix immediatament és la de veure si CBP o p300 podrien utilitzar PCAF com a substrat. Se sap des de fa molt temps, que tant CBP com p300 poden acetilar altres factors diferents a les histones com: p53 (Gu *et al.*, 1997), GATA1 (Boyes *et al.*, 1998), ELKF1 (Zhang and Bieker, 1998), E2F1 (Martinez-Balbas *et al.*, 2000), TCF (Waltzer and Bienz, 1998), HMGi(Y) (Munshi *et al.*, 1998), MyoD (Sartorelli *et al.*, 1997), TF_{II}E, TF_{II}F (Imhof *et al.*, 1997) etc. Els nostres resultats mostren que l'acetiltransferasa PCAF pot ser acetilada de manera específica per altres acetiltransferases:

- ▶ p300, però no CBP, té la capacitat d'acetilar PCAF *in vivo*.

Varem observar doncs, que p300 i altres molècules de PCAF acetilaven específicament PCAF, i que aquesta acetilació tenia lloc a la regió Nt de la proteïna. En definitiva, aquest mecanisme d'acetilació de PCAF és una altra evidència que explica que l'acetilació de factors de transcripció o coactivadors participa directament incrementant el grau de complexitat de la regulació de l'equilibri acetilació i desacetilació de la cromatina, i és un element més a tenir en compte en aquest entrellat.

2. Conseqüències funcionals de l'acetilació de PCAF.

Una possible explicació per aquest mecanisme d'acetilació de PCAF *in vivo*, de manera autònoma o dependent d'altres proteïnes, seria la participació en alguna via de senyalització cel·lular que resultés en una resposta d'acetilació. D'aquesta manera, un senyal extern desencadenaria una cascada d'acetilació, provocant que p300, alguna altra HAT, o PCAF mateix, acetilassin PCAF de manera que s'establiria una resposta a aquesta acetilació de forma semblant als mecanismes descrits per la fosforilació. En aquí proposem diverses opcions:

► **Canvi de l'activitat HAT de l'enzim:** Podria ser que l'acetilació de PCAF resultant d'aquesta cadena d'acetilacions provoqués un canvi de conformació de la proteïna, fent-la més o menys activa per acetilar els seus substrats. Tal i com proposaven Herrera i els seus col·laboradors (Herrera *et al.*, 1997), l'autoacetilació de PCAF podria jugar un paper en la regulació de l'activitat enzimàtica de l'enzim. El fet que les dianes lisina de l'acetilació en *cis* de PCAF es localitzin properes al domini catalític de la proteïna, potser significa que formen part d'un mecanisme de modulació de l'activitat enzimàtica, augmentant-la o bé disminuint-la. L'experiment de la Figura 7A del Capítol 3 ens ensenya que la incubació prèvia de la proteïna PCAF-HAT amb el cofactor acetil-CoA comporta una estabilització d'aquesta proteïna i un augment de la seva activitat enzimàtica. El mateix assaig amb la proteïna PCAF-HAT(Ks-Rs) amb les lisines responsables de l'autoacetilació substituïdes per arginines, mostra una acetilació de la histona H3 per part de la proteïna mutant, inferior al de la proteïna salvatge. Aquest experiment suggeriria que el mecanisme de l'autoacetilació de PCAF incrementa la seva activitat acetiltransferasa d'histones.

► **Afinitat diferent per incorporar-se a diferents complexos proteics:** D'aquesta acetilació en podria resultar que la proteïna tingués més afinitat per incorporar-se a un complex proteic determinat, o un altre, i per tant que pogués desencadenar respostes diferents, segons les proteïnes amb les que interacciona.

► **Canvi en la localització cel·lular:** Quatre de les cinc lisines responsables de l'autoacetilació de PCAF es troben situades a la regió NLS. És lògic pensar que el mecanisme d'autoacetilació de PCAF podria tenir algun paper regulador en la localització de la proteïna. Els resultats de la Figura 6 del Capítol 3, suggereixen aquesta possible regulació de la seva localització donat que la proteïna que no pot autoacetilar-se perd la seva localització nuclear en cèl·lules C2C12.

► **Efecte en la coactivació transcripcional:** Com a conseqüència d'aquest canvi de conformació podria ser que quedés afectada la capacitat coactivadora de la transcripció de PCAF a determinats promotors.

En aquest treball s'ha mostrat un altre mecanisme de regulació de les activitats HAT, mitjançant la seva pròpia modificació via acetilació. Aquesta autoregulació podria forma part de l'extensa varietat d'estratègies que utilitza la cèl·lula per modular una estructura bàsica per la seva supervivència, la cromatina.

VI. CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. La proteïna viral antigen T augmenta l'activitat HAT global cel·lular, i com a conseqüència els nivells d'acetilació de les histones cel·lulars.
2. L'antigen T incrementa l'activitat HAT de CBP, sense canviar-ne la seva especificitat pel substrat. Tanmateix regula l'activitat transcripcional mitjançada per CBP de manera dependent de promotor. D'una banda, augmenta la capacitat coactivadora de CBP sobre el promotor Hsp70 mitjançant la seva interacció al domini CBP2 de CBP. De l'altra, provoca una repressió transcripcional al promotor Timidina Quinasa.
3. S'ha identificat la interacció de l'antigen T amb la desacetilasa HDAC1 *in vitro*, i s'ha vist que és independent de la proteïna del Retinoblastoma.
4. La repressió de l'activació exercida per CBP al promotor Timidina Quinasa induïda per l'antigen T comporta una reducció dels nivells d'acetilació de la histona H3. Aquesta repressió es veu revertida per l'acció de l'inhibidor de desacetilases TSA.
5. Les activitats HAT i HDAC globals cel·lulars romanen actives però desplaçades dels seus llocs d'acció durant la mitosi. La seva distribució subcel·lular difereix: mentre que les acetiltransferases serien més accessibles al seu substrat en cèl·lules asincròniques, les desacetilases ho serien durant mitosi.
6. Els senyals d'acetilació de H3 i H4 així com la metilació de H3K4 es mantenen durant la mitosi en gens actius constitutivament i induïbles, mentre que són absents tant en asincronia com en mitosi en gens inactius per la RNA polimerasa II. Aquestes modificacions serien bones candidates a l'hora d'establir un codi de manteniment de la memòria cel·lular en aquests gens.

7. L'acetilació de la lisina 12 de la histona H4 es manté en les regions codificadores dels gens actius o potencialment actius: GAPDH, Hsp70 i Ciclina B1. El gen inactiu IL-2 manca d'aquest marcatge.
8. L'activació del gen de la Ciclina B1 durant la mitosi està correlacionada amb un augment de la dimetilació i la trimetilació de H3K4. Sugerint que les activitats metiltransferasa cel·lulars es mantenen actives durant la mitosi.
9. PCAF s'autoacetila *in vivo*. La regió Nt de la proteïna participa en una acetilació intermolecular, mentre que la regió Ct està implicada en el procés intramolecular.
10. p300 acetila PCAF, mentre que CBP no tindria capacitat per fer-ho.
11. L'autoacetilació de PCAF n'augmenta la seva activitat HAT *in vitro*.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Aalfs J. D. and Kingston R. E. (2000). *What does 'chromatin remodeling' mean?* Trends Biochem Sci **25**(11): 548-555.
- Aasland R., Stewart A. F. and Gibson T. (1996). *The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB.* Trends Biochem Sci **21**(3): 87-88.
- Agalioti T., Chen G. and Thanos D. (2002). *Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene.* Cell **111**(3): 381-392.
- Ait-Si-Ali S., Ramirez S., Barre F. X., Dkhissi F., Magnaghi-Jaulin L., Girault J. A., Robin P., Knibiehler M., Pritchard L. L., Ducommun B., Trouche D. and Harel-Bellan A. (1998). *Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A.* Nature **396**(6707): 184-186.
- Akhtar A., Zink D. and Becker P. B. (2000). *Chromodomains are protein-RNA interaction modules.* Nature **407**(6802): 405-409.
- Alberts A. S., Geneste O. and Treisman R. (1998). *Activation of SRF-regulated chromosomal templates by Rho-family GTPases requires a signal that also induces H4 hyperacetylation.* Cell **92**(4): 475-487.
- Ali S. H. and DeCaprio J. A. (2001). *Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins.* Semin Cancer Biol **11**(1): 15-23.
- Allard S., Utey R. T., Savard J., Clarke A., Grant P., Brandl C. J., Pillus L., Workman J. L. and Cote J. (1999). *NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p.* Embo J **18**(18): 5108-5119.
- Allfrey V. G., Faulkner R. and Mirsky A. E. (1964). *Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis.* Proc Natl Acad Sci U S A **51**: 786-794.
- Allis C. D., Chicoine L. G., Richman R. and Schulman I. G. (1985). *Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating Tetrahymena.* Proc Natl Acad Sci U S A **82**(23): 8048-8052.
- Ambrose C., Blasquez V. and Bina M. (1986). *A block in initiation of simian virus 40 assembly results in the accumulation of minichromosomes containing an exposed regulatory region.* Proc Natl Acad Sci U S A **83**(10): 3287-3291.

- Arents G. and Moudrianakis E. N. (1995). *The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization*. Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11170-11174.
- Avantaggiati M. L., Carbone M., Graessmann A., Nakatani Y., Howard B. and Levine A. S. (1996). *The SV40 large T antigen and adenovirus E1a oncoproteins interact with distinct isoforms of the transcriptional co-activator, p300*. Embo J **15**(9): 2236-2248.
- Bannister A. J. and Kouzarides T. (1996). *The CBP co-activator is a histone acetyltransferase*. Nature **384**(6610): 641-643.
- Bannister A. J. and Kouzarides T. (2005). *Reversing histone methylation*. Nature **436**(7054): 1103-1106.
- Bannister A. J., Oehler T., Wilhelm D., Angel P. and Kouzarides T. (1995). *Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro*. Oncogene **11**(12): 2509-2514.
- Bannister A. J., Schneider R. and Kouzarides T. (2002). *Histone methylation: dynamic or static?* Cell **109**(7): 801-806.
- Berger S. L. (2002). *Histone modifications in transcriptional regulation*. Curr Opin Genet Dev **12**(2): 142-148.
- Bikel I., Montano X., Agha M. E., Brown M., McCormack M., Boltax J. and Livingston D. M. (1987). *SV40 small t antigen enhances the transformation activity of limiting concentrations of SV40 large T antigen*. Cell **48**(2): 321-330.
- Blanco J. C., Minucci S., Lu J., Yang X. J., Walker K. K., Chen H., Evans R. M., Nakatani Y. and Ozato K. (1998). *The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator*. Genes Dev **12**(11): 1638-1651.
- Blasquez V., Stein A., Ambrose C. and Bina M. (1986). *Simian virus 40 protein VP1 is involved in spacing nucleosomes in minichromosomes*. J Mol Biol **191**(1): 97-106.
- Borrow J., Stanton V. P., Jr., Andresen J. M., Becher R., Behm F. G., Chaganti R. S., Civin C. I., Distech C., Dube I., Frischauf A. M., Horsman D., Mitelman F., Volinia S., Watmore A. E. and Housman D. E. (1996). *The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein*. Nat Genet **14**(1): 33-41.
- Bottomley M. J. (2004). *Structures of protein domains that create or recognize histone modifications*. EMBO Rep **5**(5): 464-469.

- Bouazoune K., Mitterweger A., Langst G., Imhof A., Akhtar A., Becker P. B. and Brehm A. (2002). *The dMi2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization*. *Embo J* **21**(10): 2430-2440.
- Boyes J., Byfield P., Nakatani Y. and Ogryzko V. (1998). *Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation*. *Nature* **396**(6711): 594-598.
- Bradbury E. M. (1992). *Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle*. *Bioessays* **14**(1): 9-16.
- Brady J., Bolen J. B., Radonovich M., Salzman N. and Khoury G. (1984). *Stimulation of simian virus 40 late gene expression by simian virus 40 tumor antigen*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(7): 2040-2044.
- Brehm A., Miska E. A., McCance D. J., Reid J. L., Bannister A. J. and Kouzarides T. (1998). *Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription*. *Nature* **391**(6667): 597-601.
- Brehm A., Nielsen S. J., Miska E. A., McCance D. J., Reid J. L., Bannister A. J. and Kouzarides T. (1999). *The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth*. *Embo J* **18**(9): 2449-2458.
- Briggs S. D., Xiao T., Sun Z. W., Caldwell J. A., Shabanowitz J., Hunt D. F., Allis C. D. and Strahl B. D. (2002). *Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin*. *Nature* **418**(6897): 498.
- Brown C. E., Lechner T., Howe L. and Workman J. L. (2000). *The many HATs of transcription coactivators*. *Trends Biochem Sci* **25**(1): 15-19.
- Brown M., McCormack M., Zinn K. G., Farrell M. P., Bikel I. and Livingston D. M. (1986). *A recombinant murine retrovirus for simian virus 40 large T cDNA transforms mouse fibroblasts to anchorage-independent growth*. *J Virol* **60**(1): 290-293.
- Brownell J. E. and Allis C. D. (1996). *Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation*. *Curr Opin Genet Dev* **6**(2): 176-184.
- Brownell J. E., Zhou J., Ranalli T., Kobayashi R., Edmondson D. G., Roth S. Y. and Allis C. D. (1996). *Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation*. *Cell* **84**(6): 843-851.
- Brummelkamp T. R., Bernards R. and Agami R. (2002). *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*. *Science* **296**(5567): 550-553.
- Butel J. S. and Lednicky J. A. (1999). *Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease*. *J Natl Cancer Inst* **91**(2): 119-134.

- Carroll R. B. and Gurney E. G. (1982). *Time-dependent maturation of the simian virus 40 large T antigen-p53 complex studied by using monoclonal antibodies*. J Virol **44**(2): 565-573.
- Carruthers L. M. and Hansen J. C. (2000). *The core histone N termini function independently of linker histones during chromatin condensation*. J Biol Chem **275**(47): 37285-37290.
- Cereghini S. and Yaniv M. (1984). *Assembly of transfected DNA into chromatin: structural changes in the origin-promoter-enhancer region upon replication*. Embo J **3**(6): 1243-1253.
- Chakravarti D., Ogryzko V., Kao H. Y., Nash A., Chen H., Nakatani Y. and Evans R. M. (1999). *A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity*. Cell **96**(3): 393-403.
- Chan H. M. and La Thangue N. B. (2001). *p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds*. J Cell Sci **114**(Pt 13): 2363-2373.
- Chen H., Lin R. J., Schiltz R. L., Chakravarti D., Nash A., Nagy L., Privalsky M. L., Nakatani Y. and Evans R. M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with PCAF and CBP/p300. Cell. **90**: 569-580.
- Chen W. and Hahn W. C. (2003). *SV40 early region oncoproteins and human cell transformation*. Histol Histopathol **18**(2): 541-550.
- Cheung P., Allis C. D. and Sassone-Corsi P. (2000). *Signaling to chromatin through histone modifications*. Cell **103**(2): 263-271.
- Chicoine L. G., Schulman I. G., Richman R., Cook R. G. and Allis C. D. (1986). *Nonrandom utilization of acetylation sites in histones isolated from Tetrahymena. Evidence for functionally distinct H4 acetylation sites*. J Biol Chem **261**(3): 1071-1076.
- Chrivia J. C., Kwok R. P., Lamb N., Hagiwara M., Montminy M. R. and Goodman R. H. (1993). *Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP*. Nature **365**(6449): 855-859.
- Clarke A. S., Lowell J. E., Jacobson S. J. and Pillus L. (1999). *Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression*. Mol Cell Biol **19**(4): 2515-2526.
- Clements A., Poux A. N., Lo W. S., Pillus L., Berger S. L. and Marmorstein R. (2003). *Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase*. Mol Cell **12**(2): 461-473.

- Clements A., Rojas J. R., Trievel R. C., Wang L., Berger S. L. and Marmorstein R. (1999). *Crystal structure of the histone acetyltransferase domain of the human PCAF transcriptional regulator bound to coenzyme A*. *Embo J* **18**(13): 3521-3532.
- Cobrinik D., Dowdy S. F., Hinds P. W., Mittnacht S. and Weinberg R. A. (1992). *The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling*. *Trends Biochem Sci* **17**(8): 312-315.
- Covault J. and Chalkley R. (1980). *The identification of distinct populations of acetylated histone*. *J Biol Chem* **255**(19): 9110-9116.
- Crosio C., Fimia G. M., Louny R., Kimura M., Okano Y., Zhou H., Sen S., Allis C. D. and Sassone-Corsi P. (2002). *Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases*. *Mol Cell Biol* **22**(3): 874-885.
- Cross F. R. (1995). *Starting the cell cycle: what's the point?* *Curr Opin Cell Biol* **7**(6): 790-797.
- Dai P., Akimaru H., Tanaka Y., Hou D. X., Yasukawa T., Kanei-Ishii C., Takahashi T. and Ishii S. (1996). *CBP as a transcriptional coactivator of c-Myb*. *Genes Dev* **10**(5): 528-540.
- Davie J. R. (1998). *Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates*. *Curr Opin Genet Dev* **8**(2): 173-178.
- de la Cruz X., Lois S., Sanchez-Molina S. and Martinez-Balbas M. A. (2005). *Do protein motifs read the histone code?* *Bioessays* **27**(2): 164-175.
- De Souza C. P., Osmani A. H., Wu L. P., Spotts J. L. and Osmani S. A. (2000). *Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans**. *Cell* **102**(3): 293-302.
- DeCaprio J. A. (1999). *The role of the J domain of SV40 large T in cellular transformation*. *Biologicals* **27**(1): 23-28.
- DeCaprio J. A., Ludlow J. W., Figge J., Shew J. Y., Huang C. M., Lee W. H., Marsilio E., Paucha E. and Livingston D. M. (1988). *SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene*. *Cell* **54**(2): 275-283.
- Dey A., Chitsaz F., Abbasi A., Misteli T. and Ozato K. (2003). *The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(15): 8758-8763.
- Dhalluin C., Carlson J. E., Zeng L., He C., Aggarwal A. K. and Zhou M. M. (1999). *Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain*. *Nature* **399**(6735): 491-496.

- Dover J., Schneider J., Tawiah-Boateng M. A., Wood A., Dean K., Johnston M. and Shilatifard A. (2002). *Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6*. J Biol Chem **277**(32): 28368-28371.
- Dunphy E. L., Johnson T., Auerbach S. S. and Wang E. H. (2000). *Requirement for TAF(II)250 acetyltransferase activity in cell cycle progression*. Mol Cell Biol **20**(4): 1134-1139.
- Dutcher S. K. and Hartwell L. H. (1982). *The role of S. cerevisiae cell division cycle genes in nuclear fusion*. Genetics **100**(2): 175-184.
- Dutnall R. N., Tafrov S. T., Sternglanz R. and Ramakrishnan V. (1998). *Structure of the histone acetyltransferase Hat1: a paradigm for the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily*. Cell **94**(4): 427-438.
- Dutnall R. N., Tafrov S. T., Sternglanz R. and Ramakrishnan V. (1998). *Structure of the yeast histone acetyltransferase Hat1: insights into substrate specificity and implications for the Gcn5-related N-acetyltransferase superfamily*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **63**: 501-507.
- Dyson N. and Harlow E. (1992). *Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation*. Cancer Surv **12**: 161-195.
- Eckner R., Ewen M. E., Newsome D., Gerdes M., DeCaprio J. A., Lawrence J. B. and Livingston D. M. (1994). *Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor*. Genes Dev **8**(8): 869-884.
- Eckner R., Ludlow J. W., Lill N. L., Oldread E., Arany Z., Modjtahedi N., DeCaprio J. A., Livingston D. M. and Morgan J. A. (1996). *Association of p300 and CBP with simian virus 40 large T antigen*. Mol Cell Biol **16**(7): 3454-3464.
- Edgar B. A. and Lehner C. F. (1996). *Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective*. Science **274**(5293): 1646-1652.
- Eickbush T. H. and Moudrianakis E. N. (1978). *The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions*. Biochemistry **17**(23): 4955-4964.
- Eissenberg J. C. (2001). *Molecular biology of the chromo domain: an ancient chromatin module comes of age*. Gene **275**(1): 19-29.
- Emiliani S., Fischle W., Van Lint C., Al-Abed Y. and Verdin E. (1998). *Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3*. Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2795-2800.
- Fang J., Feng Q., Ketel C. S., Wang H., Cao R., Xia L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Simon J. A. and Zhang Y. (2002). *Purification and functional*

- characterization of SET8, a nucleosomal histone H4-lysine 20-specific methyltransferase.* *Curr Biol* **12**(13): 1086-1099.
- Ferreri K., Gill G. and Montminy M. (1994). *The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex.* *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1210-1213.
- Fiers W., Contreras R., Haegemann G., Rogiers R., Van de Voorde A., Van Heuverswyn H., Van Herreweghe J., Volckaert G. and Ysebaert M. (1978). *Complete nucleotide sequence of SV40 DNA.* *Nature* **273**(5658): 113-120.
- Fischle W., Kiermer V., Dequiedt F. and Verdin E. (2001). *The emerging role of class II histone deacetylases.* *Biochem Cell Biol* **79**(3): 337-348.
- Fischle W., Wang Y., Jacobs S. A., Kim Y., Allis C. D. and Khorasanizadeh S. (2003). *Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains.* *Genes Dev* **17**(15): 1870-1881.
- Fry C. J. and Peterson C. L. (2001). *Chromatin remodeling enzymes: who's on first?* *Curr Biol* **11**(5): R185-197.
- Frye R. A. (1999). *Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity.* *Biochem Biophys Res Commun* **260**(1): 273-279.
- Frye R. A. (2000). *Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins.* *Biochem Biophys Res Commun* **273**(2): 793-798.
- Gao L., Cueto M. A., Asselbergs F. and Atadja P. (2002). *Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family.* *J Biol Chem* **277**(28): 25748-25755.
- Girdwood D., Bumpass D., Vaughan O. A., Thain A., Anderson L. A., Snowden A. W., Garcia-Wilson E., Perkins N. D. and Hay R. T. (2003). *P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification.* *Mol Cell* **11**(4): 1043-1054.
- Gluzman Y. (1981). *SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.* *Cell* **23**(1): 175-182.
- Gluzman Y., Kuff E. L. and Winocour E. (1977). *Recombination between endogenous and exogenous simian virus 40 genes. I. Rescue of a simian virus 40 temperature-sensitive mutant by passage in permissive transformed monkey lines.* *J Virol* **24**(2): 534-540.
- Goodman R. H. and Smolik S. (2000). *CBP/p300 in cell growth, transformation, and development.* *Genes Dev* **14**(13): 1553-1577.

- Goto H., Tomono Y., Ajiro K., Kosako H., Fujita M., Sakurai M., Okawa K., Iwamatsu A., Okigaki T., Takahashi T. and Inagaki M. (1999). *Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation*. J Biol Chem **274**(36): 25543-25549.
- Grant P. A., Duggan L., Cote J., Roberts S. M., Brownell J. E., Candau R., Ohba R., Owen-Hughes T., Allis C. D., Winston F., Berger S. L. and Workman J. L. (1997). *Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex*. Genes Dev **11**(13): 1640-1650.
- Grant P. A., Eberharter A., John S., Cook R. G., Turner B. M. and Workman J. L. (1999). *Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes*. J Biol Chem **274**(9): 5895-5900.
- Gray S. G. and Ekstrom T. J. (2001). *The human histone deacetylase family*. Exp Cell Res **262**(2): 75-83.
- Grozinger C. M., Hassig C. A. and Schreiber S. L. (1999). *Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p*. Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 4868-4873.
- Grunstein M. (1997). *Histone acetylation in chromatin structure and transcription*. Nature **389**(6649): 349-352.
- Gu W., Shi X. L. and Roeder R. G. (1997). *Synergistic activation of transcription by CBP and p53*. Nature **387**(6635): 819-823.
- Gurley L. R., D'Anna J. A., Barham S. S., Deaven L. L. and Tobey R. A. (1978). *Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells*. Eur J Biochem **84**(1): 1-15.
- Hahn W. C., Counter C. M., Lundberg A. S., Beijersbergen R. L., Brooks M. W. and Weinberg R. A. (1999). *Creation of human tumour cells with defined genetic elements*. Nature **400**(6743): 464-468.
- Halevy O., Novitch B. G., Spicer D. B., Skapek S. X., Rhee J., Hannon G. J., Beach D. and Lassar A. B. (1995). *Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD*. Science **267**(5200): 1018-1021.
- Hamamori Y., Sartorelli V., Ogryzko V., Puri P. L., Wu H. Y., Wang J. Y., Nakatani Y. and Kedes L. (1999). *Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A*. Cell **96**(3): 405-413.
- Hamiche A., Sandaltzopoulos R., Gdula D. A. and Wu C. (1999). *ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF*. Cell **97**(7): 833-842.

- Hartl P., Gottesfeld J. and Forbes D. J. (1993). *Mitotic repression of transcription in vitro*. *J Cell Biol* **120**(3): 613-624.
- Hassan A. H., Prochasson P., Neely K. E., Galasinski S. C., Chandy M., Carrozza M. J. and Workman J. L. (2002). *Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes*. *Cell* **111**(3): 369-379.
- Hayes J. J. and Hansen J. C. (2001). *Nucleosomes and the chromatin fiber*. *Curr Opin Genet Dev* **11**(2): 124-129.
- Haynes S. R., Dollard C., Winston F., Beck S., Trowsdale J. and Dawid I. B. (1992). *The bromodomain: a conserved sequence found in human, Drosophila and yeast proteins*. *Nucleic Acids Res* **20**(10): 2603.
- Helps N. R., Luo X., Barker H. M. and Cohen P. T. (2000). *NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1*. *Biochem J* **349**(Pt 2): 509-518.
- Hendzel M. J., Wei Y., Mancini M. A., Van Hooser A., Ranalli T., Brinkley B. R., Bazett-Jones D. P. and Allis C. D. (1997). *Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation*. *Chromosoma* **106**(6): 348-360.
- Herrera J. E., Bergel M., Yang X. J., Nakatani Y. and Bustin M. (1997). *The histone acetyltransferase activity of human GCN5 and PCAF is stabilized by coenzymes*. *J Biol Chem* **272**(43): 27253-27258.
- Hoffmann A., Chiang C. M., Oelgeschlager T., Xie X., Burley S. K., Nakatani Y. and Roeder R. G. (1996). *A histone octamer-like structure within TFIID*. *Nature* **380**(6572): 356-359.
- Howe L., Auston D., Grant P., John S., Cook R. G., Workman J. L. and Pillus L. (2001). *Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression*. *Genes Dev* **15**(23): 3144-3154.
- Hsu J. Y., Sun Z. W., Li X., Reuben M., Tatchell K., Bishop D. K., Grushcow J. M., Brame C. J., Caldwell J. A., Hunt D. F., Lin R., Smith M. M. and Allis C. D. (2000). *Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes*. *Cell* **102**(3): 279-291.
- Hu E., Chen Z., Fredrickson T., Zhu Y., Kirkpatrick R., Zhang G. F., Johanson K., Sung C. M., Liu R. and Winkler J. (2000). *Cloning and characterization of a novel*

- human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. J Biol Chem* **275**(20): 15254-15264.
- Hudson B. P., Martinez-Yamout M. A., Dyson H. J. and Wright P. E. (2000). *Solution structure and acetyl-lysine binding activity of the GCN5 bromodomain. J Mol Biol* **304**(3): 355-370.
- Hwang W. W., Venkatasubrahmanyam S., Ianculescu A. G., Tong A., Boone C. and Madhani H. D. (2003). *A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. Mol Cell* **11**(1): 261-266.
- Imai S., Armstrong C. M., Kaerberlein M. and Guarente L. (2000). *Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. Nature* **403**(6771): 795-800.
- Imhof A. and Wolffe A. P. (1999). *Purification and properties of the Xenopus Hat1 acetyltransferase: association with the 14-3-3 proteins in the oocyte nucleus. Biochemistry* **38**(40): 13085-13093.
- Imhof A., Yang X. J., Ogryzko V. V., Nakatani Y., Wolffe A. P. and Ge H. (1997). *Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. Curr Biol* **7**(9): 689-692.
- Innis J. W. and Scott W. A. (1983). *Chromatin structure of simian virus 40-pBR322 recombinant plasmids in COS-1 cells. Mol Cell Biol* **3**(12): 2203-2210.
- Jacobson R. H., Ladurner A. G., King D. S. and Tjian R. (2000). *Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. Science* **288**(5470): 1422-1425.
- Janknecht R. (1995). *Regulation of the c-fos promoter. Immunobiology* **193**(2-4): 137-142.
- Janknecht R. and Hunter T. (1996). *Transcription. A growing coactivator network. Nature* **383**(6595): 22-23.
- Jat P. S., Cepko C. L., Mulligan R. C. and Sharp P. A. (1986). *Recombinant retroviruses encoding simian virus 40 large T antigen and polyomavirus large and middle T antigens. Mol Cell Biol* **6**(4): 1204-1217.
- Jenuwein T. and Allis C. D. (2001). *Translating the histone code. Science* **293**(5532): 1074-1080.
- Jeppesen P. (1997). *Histone acetylation: a possible mechanism for the inheritance of cell memory at mitosis. Bioessays* **19**(1): 67-74.
- Jeppesen P. and Turner B. M. (1993). *The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. Cell* **74**(2): 281-289.

- Jones D. O., Cowell I. G. and Singh P. B. (2000). *Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression*. *Bioessays* **22**(2): 124-137.
- Kamei Y., Xu L., Heinzel T., Torchia J., Kurokawa R., Gloss B., Lin S. C., Heyman R. A., Rose D. W., Glass C. K. and Rosenfeld M. G. (1996). *A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors*. *Cell* **85**(3): 403-414.
- Kamine J., Elangovan B., Subramanian T., Coleman D. and Chinnadurai G. (1996). *Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator*. *Virology* **216**(2): 357-366.
- Kanno T., Kanno Y., Siegel R. M., Jang M. K., Lenardo M. J. and Ozato K. (2004). *Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells*. *Mol Cell* **13**(1): 33-43.
- Kao H. Y., Downes M., Ordentlich P. and Evans R. M. (2000). *Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression*. *Genes Dev* **14**(1): 55-66.
- Kasamatsu H. and Wu M. (1976). *Protein-SV40 DNA complex stable in high salt and sodium dodecyl sulfate*. *Biochem Biophys Res Commun* **68**(3): 927-936.
- Kaufman P. D., Kobayashi R., Kessler N. and Stillman B. (1995). *The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication*. *Cell* **81**(7): 1105-1114.
- Kawasaki H., Schiltz L., Chiu R., Itakura K., Taira K., Nakatani Y. and Yokoyama K. K. (2000). *ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation*. *Nature* **405**(6783): 195-200.
- Kelley R. I. (1973). *Isolation of a histone IIb1-IIb2 complex*. *Biochem Biophys Res Commun* **54**(4): 1588-1594.
- Khochbin S. and Kao H. Y. (2001). *Histone deacetylase complexes: functional entities or molecular reservoirs*. *FEBS Lett* **494**(3): 141-144.
- Khochbin S., Verdel A., Lemerrier C. and Seigneurin-Berny D. (2001). *Functional significance of histone deacetylase diversity*. *Curr Opin Genet Dev* **11**(2): 162-166.
- Kierstead T. D. and Tevethia M. J. (1993). *Association of p53 binding and immortalization of primary C57BL/6 mouse embryo fibroblasts by using simian virus 40 T-antigen mutants bearing internal overlapping deletion mutations*. *J Virol* **67**(4): 1817-1829.
- Kim J. M., Liu H., Tazaki M., Nagata M. and Aoki F. (2003). *Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis*. *J Cell Biol* **162**(1): 37-46.

- Kingston R. E. and Narlikar G. J. (1999). *ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity*. *Genes Dev* **13**(18): 2339-2352.
- Kleff S., Andrulis E. D., Anderson C. W. and Sternglanz R. (1995). *Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase*. *J Biol Chem* **270**(42): 24674-24677.
- Kornberg R. D. (1974). *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. *Science* **184**(139): 868-871.
- Kornberg R. D. and Thomas J. O. (1974). *Chromatin structure; oligomers of the histones*. *Science* **184**(139): 865-868.
- Koshland D. and Strunnikov A. (1996). *Mitotic chromosome condensation*. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 305-333.
- Kouskouti A. and Talianidis I. (2005). *Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation*. *Embo J* **24**(2): 347-357.
- Kouzarides T. (2002). *Histone methylation in transcriptional control*. *Curr Opin Genet Dev* **12**(2): 198-209.
- Kriegler M., Perez C. F., Hardy C. and Botchan M. (1984). *Transformation mediated by the SV40 T antigens: separation of the overlapping SV40 early genes with a retroviral vector*. *Cell* **38**(2): 483-491.
- Kristjuhan A., Walker J., Suka N., Grunstein M., Roberts D., Cairns B. R. and Svejstrup J. Q. (2002). *Transcriptional inhibition of genes with severe histone h3 hypoacetylation in the coding region*. *Mol Cell* **10**(4): 925-933.
- Kruhlak M. J., Hendzel M. J., Fischle W., Bertos N. R., Hameed S., Yang X. J., Verdin E. and Bazett-Jones D. P. (2001). *Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin*. *J Biol Chem* **276**(41): 38307-38319.
- Kuo M. H. and Allis C. D. (1998). *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation*. *Bioessays* **20**(8): 615-626.
- Kuo M. H., Brownell J. E., Sobel R. E., Ranalli T. A., Cook R. G., Edmondson D. G., Roth S. Y. and Allis C. D. (1996). *Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines*. *Nature* **383**(6597): 269-272.
- Kuo M. H., Zhou J., Jambeck P., Churchill M. E. and Allis C. D. (1998). *Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo*. *Genes Dev* **12**(5): 627-639.
- LaJeunesse D. and Shearn A. (1995). *Trans-regulation of thoracic homeotic selector genes of the Antennapedia and bithorax complexes by the trithorax group genes: absent, small, and homeotic discs 1 and 2*. *Mech Dev* **53**(1): 123-139.

- Langst G. and Becker P. B. (2001). *Nucleosome mobilization and positioning by ISWI-containing chromatin-remodeling factors*. J Cell Sci **114**(Pt 14): 2561-2568.
- Langst G., Bonte E. J., Corona D. F. and Becker P. B. (1999). *Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer*. Cell **97**(7): 843-852.
- Lau O. D., Courtney A. D., Vassilev A., Marzilli L. A., Cotter R. J., Nakatani Y. and Cole P. A. (2000). *p300/CBP-associated factor histone acetyltransferase processing of a peptide substrate. Kinetic analysis of the catalytic mechanism*. J Biol Chem **275**(29): 21953-21959.
- Levine A. J. (1990). *The p53 protein and its interactions with the oncogene products of the small DNA tumor viruses*. Virology **177**(2): 419-426.
- Lewis A. M., Jr. and Martin R. G. (1979). *Oncogenicity of simian virus 40 deletion mutants that induce altered 17-kilodalton t-proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4299-4302.
- Liang G., Lin J. C., Wei V., Yoo C., Cheng J. C., Nguyen C. T., Weisenberger D. J., Egger G., Takai D., Gonzales F. A. and Jones P. A. (2004). *Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome*. Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7357-7362.
- Liu L., Scolnick D. M., Trievel R. C., Zhang H. B., Marmorstein R., Halazonetis T. D. and Berger S. L. (1999). *p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage*. Mol Cell Biol **19**(2): 1202-1209.
- Lo W. S., Duggan L., Emre N. C., Belotserkovskya R., Lane W. S., Shiekhhattar R. and Berger S. L. (2001). *Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription*. Science **293**(5532): 1142-1146.
- Lo W. S., Trievel R. C., Rojas J. R., Duggan L., Hsu J. Y., Allis C. D., Marmorstein R. and Berger S. L. (2000). *Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14*. Mol Cell **5**(6): 917-926.
- Lohr D. and Van Holde K. E. (1975). *Yeast chromatin subunit structure*. Science **188**(4184): 165-166.
- Lorch Y., Beve J., Gustafsson C. M., Myers L. C. and Kornberg R. D. (2000). *Mediator-nucleosome interaction*. Mol Cell **6**(1): 197-201.
- Lorch Y., Cairns B. R., Zhang M. and Kornberg R. D. (1998). *Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome*. Cell **94**(1): 29-34.

- Lorch Y., Zhang M. and Kornberg R. D. (1999). *Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex*. Cell **96**(3): 389-392.
- Ludlow J. W., Shon J., Pipas J. M., Livingston D. M. and DeCaprio J. A. (1990). *The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T*. Cell **60**(3): 387-396.
- Luger K., Mader A. W., Richmond R. K., Sargent D. F. and Richmond T. J. (1997). *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature **389**(6648): 251-260.
- Luo R. X., Postigo A. A. and Dean D. C. (1998). *Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription*. Cell **92**(4): 463-473.
- Macera-Bloch L., Houghton J., Lenahan M., Jha K. K. and Ozer H. L. (2002). *Termination of lifespan of SV40-transformed human fibroblasts in crisis is due to apoptosis*. J Cell Physiol **190**(3): 332-344.
- Magnaghi-Jaulin L., Groisman R., Naguibneva I., Robin P., Lorain S., Le Villain J. P., Troalen F., Trouche D. and Harel-Bellan A. (1998). *Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase*. Nature **391**(6667): 601-605.
- Mahadevan L. C., Willis A. C. and Barratt M. J. (1991). *Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors*. Cell **65**(5): 775-783.
- Margueron R., Trojer P. and Reinberg D. (2005). *The key to development: interpreting the histone code?* Curr Opin Genet Dev **15**(2): 163-176.
- Martinez-Balbas M. A., Bannister A. J., Martin K., Haus-Seuffert P., Meisterernst M. and Kouzarides T. (1998). *The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription*. Embo J **17**(10): 2886-2893.
- Martinez-Balbas M. A., Bauer U. M., Nielsen S. J., Brehm A. and Kouzarides T. (2000). *Regulation of E2F1 activity by acetylation*. Embo J **19**(4): 662-671.
- Martinez-Balbas M. A., Dey A., Rabindran S. K., Ozato K. and Wu C. (1995). *Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin*. Cell **83**(1): 29-38.
- Meersseman G., Pennings S. and Bradbury E. M. (1992). *Mobile nucleosomes--a general behavior*. Embo J **11**(8): 2951-2959.
- Melnick J. L. and Stinebaugh S. (1962). *Excretion of vacuolating SV-40 virus (papova virus group) after ingestion as a contaminant of oral poliovaccine*. Proc Soc Exp Biol Med **109**: 965-968.

- Metzger E., Wissmann M., Yin N., Muller J. M., Schneider R., Peters A. H., Gunther T., Buettner R. and Schule R. (2005). *LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription*. Nature **437**(7057): 436-439.
- Michelotti E. F., Sanford S. and Levens D. (1997). *Marking of active genes on mitotic chromosomes*. Nature **388**(6645): 895-899.
- Mitchell P. J., Wang C. and Tjian R. (1987). *Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen*. Cell **50**(6): 847-861.
- Mizzen C. A., Yang X. J., Kokubo T., Brownell J. E., Bannister A. J., Owen-Hughes T., Workman J., Wang L., Berger S. L., Kouzarides T., Nakatani Y. and Allis C. D. (1996). *The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity*. Cell **87**(7): 1261-1270.
- Moran E. (1993). *DNA tumor virus transforming proteins and the cell cycle*. Curr Opin Genet Dev **3**(1): 63-70.
- Morgan D. O. (1997). *Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors*. Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 261-291.
- Munshi N., Merika M., Yie J., Senger K., Chen G. and Thanos D. (1998). *Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome*. Mol Cell **2**(4): 457-467.
- Murray K. (1964). *The Occurrence of Epsilon-N-Methyl Lysine in Histones*. Biochemistry **3**: 10-15.
- Narlikar G. J., Fan H. Y. and Kingston R. E. (2002). *Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription*. Cell **108**(4): 475-487.
- Nathan D., Sterner D. E. and Berger S. L. (2003). *Histone modifications: Now summoning sumoylation*. Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13118-13120.
- Nemethova M., Smutny M. and Wintersberger E. (2004). *Transactivation of E2F-regulated genes by polyomavirus large T antigen: evidence for a two-step mechanism*. Mol Cell Biol **24**(24): 10986-10994.
- Neuwald A. F. and Landsman D. (1997). *GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein*. Trends Biochem Sci **22**(5): 154-155.
- Nevins J. R. (1992). *E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins*. Science **258**(5081): 424-429.
- Newbold R. F. and Overell R. W. (1983). *Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene*. Nature **304**(5927): 648-651.

- Newman B. L., Lundblad J. R., Chen Y. and Smolik S. M. (2002). *A Drosophila homologue of Sir2 modifies position-effect variegation but does not affect life span*. Genetics **162**(4): 1675-1685.
- Ng H. H., Ciccone D. N., Morshead K. B., Oettinger M. A. and Struhl K. (2003). *Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation*. Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1820-1825.
- Ng H. H., Feng Q., Wang H., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Zhang Y. and Struhl K. (2002). *Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association*. Genes Dev **16**(12): 1518-1527.
- Nigg E. A. (1995). *Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle*. Bioessays **17**(6): 471-480.
- Nishijima H., Nishitani H., Seki T. and Nishimoto T. (1997). *A dual-specificity phosphatase Cdc25B is an unstable protein and triggers p34(cdc2)/cyclin B activation in hamster BHK21 cells arrested with hydroxyurea*. J Cell Biol **138**(5): 1105-1116.
- Noll M. and Kornberg R. D. (1977). *Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1*. J Mol Biol **109**(3): 393-404.
- Nowak S. J. and Corces V. G. (2000). *Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci*. Genes Dev **14**(23): 3003-3013.
- Oelgeschlager M., Janknecht R., Krieg J., Schreek S. and Luscher B. (1996). *Interaction of the co-activator CBP with Myb proteins: effects on Myb-specific transactivation and on the cooperativity with NF-M*. Embo J **15**(11): 2771-2780.
- Ogryzko V. V., Kotani T., Zhang X., Schiltz R. L., Howard T., Yang X. J., Howard B. H., Qin J. and Nakatani Y. (1998). *Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex*. Cell **94**(1): 35-44.
- Ogryzko V. V., Schiltz R. L., Russanova V., Howard B. H. and Nakatani Y. (1996). *The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases*. Cell **87**(5): 953-959.
- Owen D. J., Ornaghi P., Yang J. C., Lowe N., Evans P. R., Ballario P., Neuhaus D., Filetici P. and Travers A. A. (2000). *The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p*. Embo J **19**(22): 6141-6149.
- Pardee A. B., Dubrow R., Hamlin J. L. and Kletzien R. F. (1978). *Animal cell cycle*. Annu Rev Biochem **47**: 715-750.

- Paro R. and Hogness D. S. (1991). *The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A **88**(1): 263-267.
- Parthun M. R., Widom J. and Gottschling D. E. (1996). *The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism*. Cell **87**(1): 85-94.
- Peterson C. L. and Laniel M. A. (2004). *Histones and histone modifications*. Curr Biol **14**(14): R546-551.
- Petrij F., Giles R. H., Dauwerse H. G., Saris J. J., Hennekam R. C., Masuno M., Tommerup N., van Ommen G. J., Goodman R. H., Peters D. J. and et al. (1995). *Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP*. Nature **376**(6538): 348-351.
- Pflum M. K., Tong J. K., Lane W. S. and Schreiber S. L. (2001). *Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation*. J Biol Chem **276**(50): 47733-47741.
- Pham A. D. and Sauer F. (2000). *Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in Drosophila*. Science **289**(5488): 2357-2360.
- Phillips D. M. and Johns E. W. (1965). *A Fractionation of the Histones of Group F2a from Calf Thymus*. Biochem J **94**: 127-130.
- Pipas J. M. and Levine A. J. (2001). *Role of T antigen interactions with p53 in tumorigenesis*. Semin Cancer Biol **11**(1): 23-30.
- Poulin D. L., Kung A. L. and DeCaprio J. A. (2004). *p53 targets simian virus 40 large T antigen for acetylation by CBP*. J Virol **78**(15): 8245-8253.
- Prescott D. M. and Bender M. A. (1962). *Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells*. Exp Cell Res **26**: 260-268.
- Prives C., Gilboa E., Revel M. and Winocour E. (1977). *Cell-free translation of simian virus 40 early messenger RNA coding for viral T-antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A **74**(2): 457-461.
- Puri P. L., Avantaggiati M. L., Balsano C., Sang N., Graessmann A., Giordano A. and Levrero M. (1997). *p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription*. Embo J **16**(2): 369-383.
- Qian Y. W., Wang Y. C., Hollingsworth R. E., Jr., Jones D., Ling N. and Lee E. Y. (1993). *A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast*. Nature **364**(6438): 648-652.

- Rea S., Eisenhaber F., O'Carroll D., Strahl B. D., Sun Z. W., Schmid M., Opravil S., Mechtler K., Ponting C. P., Allis C. D. and Jenuwein T. (2000). *Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases*. Nature **406**(6796): 593-599.
- Reid J. L., Bannister A. J., Zegerman P., Martinez-Balbas M. A. and Kouzarides T. (1998). *E1A directly binds and regulates the PCAF acetyltransferase*. Embo J **17**(15): 4469-4477.
- Reifsnnyder C., Lowell J., Clarke A. and Pillus L. (1996). *Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases*. Nat Genet **14**(1): 42-49.
- Rice J. C. and Allis C. D. (2001). *Code of silence*. Nature **414**(6861): 258-261.
- Rice J. C. and Allis C. D. (2001). *Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation*. Curr Opin Cell Biol **13**(3): 263-273.
- Rice J. C., Nishioka K., Sarma K., Steward R., Reinberg D. and Allis C. D. (2002). *Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes*. Genes Dev **16**(17): 2225-2230.
- Rio D., Robbins A., Myers R. and Tjian R. (1980). *Regulation of simian virus 40 early transcription in vitro by a purified tumor antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A **77**(10): 5706-5710.
- Roark D. E., Geoghegan T. E. and Keller G. H. (1974). *A two-subunit histone complex from calf thymus*. Biochem Biophys Res Commun **59**(2): 542-547.
- Roberts S. B., Segil N. and Heintz N. (1991). *Differential phosphorylation of the transcription factor Oct1 during the cell cycle*. Science **253**(5023): 1022-1026.
- Robzyk K., Recht J. and Osley M. A. (2000). *Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast*. Science **287**(5452): 501-504.
- Rogakou E. P., Boon C., Redon C. and Bonner W. M. (1999). *Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo*. J Cell Biol **146**(5): 905-916.
- Rogakou E. P., Pilch D. R., Orr A. H., Ivanova V. S. and Bonner W. M. (1998). *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem **273**(10): 5858-5868.
- Rojas J. R., Trievel R. C., Zhou J., Mo Y., Li X., Berger S. L., Allis C. D. and Marmorstein R. (1999). *Structure of Tetrahymena GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide*. Nature **401**(6748): 93-98.

- Roth S. Y., Denu J. M. and Allis C. D. (2001). *Histone acetyltransferases*. Annu Rev Biochem **70**: 81-120.
- Rougeulle C., Chaumeil J., Sarma K., Allis C. D., Reinberg D., Avner P. and Heard E. (2004). *Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome*. Mol Cell Biol **24**(12): 5475-5484.
- Ruiz-Carrillo A., Wang L. J. and Allfrey V. G. (1975). *Processing of newly synthesized histone molecules*. Science **190**(4210): 117-128.
- Sakaguchi K., Herrera J. E., Saito S., Miki T., Bustin M., Vassilev A., Anderson C. W. and Appella E. (1998). *DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade*. Genes Dev **12**(18): 2831-2841.
- Santos-Rosa H., Schneider R., Bannister A. J., Sherriff J., Bernstein B. E., Emre N. C., Schreiber S. L., Mellor J. and Kouzarides T. (2002). *Active genes are trimethylated at K4 of histone H3*. Nature **419**(6905): 407-411.
- Santos-Rosa H., Schneider R., Bernstein B. E., Karabetsou N., Morillon A., Weise C., Schreiber S. L., Mellor J. and Kouzarides T. (2003). *Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin*. Mol Cell **12**(5): 1325-1332.
- Sartorelli V., Huang J., Hamamori Y. and Kedes L. (1997). *Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C*. Mol Cell Biol **17**(2): 1010-1026.
- Sassone-Corsi P., Mizzen C. A., Cheung P., Crosio C., Monaco L., Jacquot S., Hanauer A. and Allis C. D. (1999). *Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3*. Science **285**(5429): 886-891.
- Schneider R., Bannister A. J., Myers F. A., Thorne A. W., Crane-Robinson C. and Kouzarides T. (2004). *Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes*. Nat Cell Biol **6**(1): 73-77.
- Schotta G., Lachner M., Sarma K., Ebert A., Sengupta R., Reuter G., Reinberg D. and Jenuwein T. (2004). *A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin*. Genes Dev **18**(11): 1251-1262.
- Sciortino S., Gurtner A., Manni I., Fontemaggi G., Dey A., Sacchi A., Ozato K. and Piaggio G. (2001). *The cyclin B1 gene is actively transcribed during mitosis in HeLa cells*. EMBO Rep **2**(11): 1018-1023.
- Segil N., Guermah M., Hoffmann A., Roeder R. G. and Heintz N. (1996). *Mitotic regulation of TFIID: inhibition of activator-dependent transcription and changes in subcellular localization*. Genes Dev **10**(19): 2389-2400.

- Sheppard H. M., Corneillie S. I., Espiritu C., Gatti A. and Liu X. (1999). *New insights into the mechanism of inhibition of p53 by simian virus 40 large T antigen*. *Mol Cell Biol* **19**(4): 2746-2753.
- Sherr C. J. (1996). *Cancer cell cycles*. *Science* **274**(5293): 1672-1677.
- Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstone J. R., Cole P. A., Casero R. A. and Shi Y. (2004). *Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1*. *Cell* **119**(7): 941-953.
- Shiio Y. and Eisenman R. N. (2003). *Histone sumoylation is associated with transcriptional repression*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13225-13230.
- Simone C., Stiegler P., Forcales S. V., Bagella L., De Luca A., Sartorelli V., Giordano A. and Puri P. L. (2004). *Deacetylase recruitment by the C/H3 domain of the acetyltransferase p300*. *Oncogene* **23**(12): 2177-2187.
- Sleigh M. J., Topp W. C., Hanich R. and Sambrook J. F. (1978). *Mutants of SV40 with an altered small t protein are reduced in their ability to transform cells*. *Cell* **14**(1): 79-88.
- Smith C. M., Haimberger Z. W., Johnson C. O., Wolf A. J., Gafken P. R., Zhang Z., Parthun M. R. and Gottschling D. E. (2002). *Heritable chromatin structure: mapping "memory" in histones H3 and H4*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** Suppl 4: 16454-16461.
- Smith E. R., Eisen A., Gu W., Sattah M., Pannuti A., Zhou J., Cook R. G., Lucchesi J. C. and Allis C. D. (1998). *ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(7): 3561-3565.
- Sobel R. E., Cook R. G., Perry C. A., Annunziato A. T. and Allis C. D. (1995). *Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(4): 1237-1241.
- Spencer T. E., Jenster G., Burcin M. M., Allis C. D., Zhou J., Mizzen C. A., McKenna N. J., Onate S. A., Tsai S. Y., Tsai M. J. and O'Malley B. W. (1997). *Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase*. *Nature* **389**(6647): 194-198.
- Stern D. E. and Berger S. L. (2000). *Acetylation of histones and transcription-related factors*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 435-459.
- Strahl B. D. and Allis C. D. (2000). *The language of covalent histone modifications*. *Nature* **403**(6765): 41-45.
- Strahl B. D., Ohba R., Cook R. G. and Allis C. D. (1999). *Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 14967-14972.

- Struhl K. (1998). *Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms*. *Genes Dev* **12**(5): 599-606.
- Sun Z. W. and Allis C. D. (2002). *Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast*. *Nature* **418**(6893): 104-108.
- Sweet B. H. and Hilleman M. R. (1960). *The vacuolating virus, S.V. 40*. *Proc Soc Exp Biol Med* **105**: 420-427.
- Tamkun J. W., Dearing R., Scott M. P., Kissinger M., Pattatucci A. M., Kaufman T. C. and Kennison J. A. (1992). *brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2*. *Cell* **68**(3): 561-572.
- Tanner K. G., Langer M. R. and Denu J. M. (2000). *Kinetic mechanism of human histone acetyltransferase PCAF*. *Biochemistry* **39**(50): 15652.
- Tanner K. G., Langer M. R., Kim Y. and Denu J. M. (2000). *Kinetic mechanism of the histone acetyltransferase GCN5 from yeast*. *J Biol Chem* **275**(29): 22048-22055.
- Tanner K. G., Trievel R. C., Kuo M. H., Howard R. M., Berger S. L., Allis C. D., Marmorstein R. and Denu J. M. (1999). *Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator*. *J Biol Chem* **274**(26): 18157-18160.
- Taunton J., Hassig C. A. and Schreiber S. L. (1996). *A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p*. *Science* **272**(5260): 408-411.
- Taya Y. (1997). *RB kinases and RB-binding proteins: new points of view*. *Trends Biochem Sci* **22**(1): 14-17.
- Tegtmeyer P. (1972). *Simian virus 40 deoxyribonucleic acid synthesis: the viral replicon*. *J Virol* **10**(4): 591-598.
- Tegtmeyer P. (1975). *Function of simian virus 40 gene A in transforming infection*. *J Virol* **15**(3): 613-618.
- Thomson S., Clayton A. L., Hazzalin C. A., Rose S., Barratt M. J. and Mahadevan L. C. (1999). *The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase*. *Embo J* **18**(17): 4779-4793.
- Thomson S., Hollis A., Hazzalin C. A. and Mahadevan L. C. (2004). *Distinct stimulus-specific histone modifications at hsp70 chromatin targeted by the transcription factor heat shock factor-1*. *Mol Cell* **15**(4): 585-594.

- Thorne A. W., Kmiecik D., Mitchelson K., Sautiere P. and Crane-Robinson C. (1990). *Patterns of histone acetylation*. Eur J Biochem **193**(3): 701-713.
- Tjian R. (1981). *Regulation of viral transcription and DNA replication by the SV40 large T antigen*. Curr Top Microbiol Immunol **93**: 5-24.
- Tong J. J., Liu J., Bertos N. R. and Yang X. J. (2002). *Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain*. Nucleic Acids Res **30**(5): 1114-1123.
- Tooze J. (1980). *DNA TUMOR VIRUSES: Molecular Biology of Tumor Viruses*. 2nd edition revised.
- Travers A. A. (1987). *Structure and function of E. coli promoter DNA*. CRC Crit Rev Biochem **22**(3): 181-219.
- Turner B. M. (1993). *Decoding the nucleosome*. Cell **75**(1): 5-8.
- Turner B. M. (2000). *Histone acetylation and an epigenetic code*. Bioessays **22**(9): 836-845.
- Turner B. M. (2002). *Cellular memory and the histone code*. Cell **111**(3): 285-291.
- Turner B. M. and Fellows G. (1989). *Specific antibodies reveal ordered and cell-cycle-related use of histone-H4 acetylation sites in mammalian cells*. Eur J Biochem **179**(1): 131-139.
- Turner B. M. and O'Neill L. P. (1995). *Histone acetylation in chromatin and chromosomes*. Semin Cell Biol **6**(4): 229-236.
- Tyler J. K., Adams C. R., Chen S. R., Kobayashi R., Kamakaka R. T. and Kadonaga J. T. (1999). *The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair*. Nature **402**(6761): 555-560.
- Valls E., de la Cruz X. and Martinez-Balbas M. A. (2003). *The SV40 T antigen modulates CBP histone acetyltransferase activity*. Nucleic Acids Res **31**(12): 3114-3122.
- Valls E., Sanchez-Molina S. and Martinez-Balbas M. A. (2005). *Role of histone modifications in marking and activating genes through mitosis*. J Biol Chem.
- van der Eb A. J. and Graham F. L. (1980). *Assay of transforming activity of tumor virus DNA*. Methods Enzymol **65**(1): 826-839.
- van Leeuwen F., Gafken P. R. and Gottschling D. E. (2002). *Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core*. Cell **109**(6): 745-756.
- Vandel L. and Trouche D. (2001). *Physical association between the histone acetyltransferase CBP and a histone methyl transferase*. EMBO Rep **2**(1): 21-26.

- Varshavsky A. J., Bakayev V. V., Chumackov P. M. and Georgiev G. P. (1976). *Minichromosome of simian virus 40: presence of histone H1*. *Nucleic Acids Res* **3**(8): 2101-2113.
- Verreault A., Kaufman P. D., Kobayashi R. and Stillman B. (1996). *Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4*. *Cell* **87**(1): 95-104.
- Verreault A., Kaufman P. D., Kobayashi R. and Stillman B. (1998). *Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase*. *Curr Biol* **8**(2): 96-108.
- Vidal M. and Gaber R. F. (1991). *RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**(12): 6317-6327.
- Vidali G., Gershey E. L. and Allfrey V. G. (1968). *Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones*. *J Biol Chem* **243**(24): 6361-6366.
- Vinograd J., Lebowitz J., Radloff R., Watson R. and Laipis P. (1965). *The twisted circular form of polyoma viral DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **53**(5): 1104-1111.
- Vogelauer M., Wu J., Suka N. and Grunstein M. (2000). *Global histone acetylation and deacetylation in yeast*. *Nature* **408**(6811): 495-498.
- Waltzer L. and Bienz M. (1998). *Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling*. *Nature* **395**(6701): 521-525.
- Wang H., Huang Z. Q., Xia L., Feng Q., Erdjument-Bromage H., Strahl B. D., Briggs S. D., Allis C. D., Wong J., Tempst P. and Zhang Y. (2001). *Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor*. *Science* **293**(5531): 853-857.
- Wang L., Liu L. and Berger S. L. (1998). *Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo*. *Genes Dev* **12**(5): 640-653.
- Wei Y., Yu L., Bowen J., Gorovsky M. A. and Allis C. D. (1999). *Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation*. *Cell* **97**(1): 99-109.
- Whitehouse I., Flaus A., Cairns B. R., White M. F., Workman J. L. and Owen-Hughes T. (1999). *Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex*. *Nature* **400**(6746): 784-787.

- Wiekowski M., Droge P. and Stahl H. (1987). *Monoclonal antibodies as probes for a function of large T antigen during the elongation process of simian virus 40 DNA replication*. J Virol **61**(2): 411-418.
- Willis I. M. (1993). *RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity*. Eur J Biochem **212**(1): 1-11.
- Wittschieben B. O., Otero G., de Bizemont T., Fellows J., Erdjument-Bromage H., Ohba R., Li Y., Allis C. D., Tempst P. and Svejstrup J. Q. (1999). *A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme*. Mol Cell **4**(1): 123-128.
- Wolf E., Vassilev A., Makino Y., Sali A., Nakatani Y. and Burley S. K. (1998). *Crystal structure of a GCN5-related N-acetyltransferase: Serratia marcescens aminoglycoside 3-N-acetyltransferase*. Cell **94**(4): 439-449.
- Wolffe A. P. and Pruss D. (1996). *Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones*. Cell **84**(6): 817-819.
- Wood A., Krogan N. J., Dover J., Schneider J., Heidt J., Boateng M. A., Dean K., Golshani A., Zhang Y., Greenblatt J. F., Johnston M. and Shilatifard A. (2003). *Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter*. Mol Cell **11**(1): 267-274.
- Wydner K. L., Bhattacharya S., Eckner R., Lawrence J. B. and Livingston D. M. (1995). *Localization of human CREB-binding protein gene (CREBBP) to 16p13.2-p13.3 by fluorescence in situ hybridization*. Genomics **30**(2): 395-396.
- Wysocka J., Swigut T., Milne T. A., Dou Y., Zhang X., Burlingame A. L., Roeder R. G., Brivanlou A. H. and Allis C. D. (2005). *WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development*. Cell **121**(6): 859-872.
- Yaciuk P., Carter M. C., Pipas J. M. and Moran E. (1991). *Simian virus 40 large-T antigen expresses a biological activity complementary to the p300-associated transforming function of the adenovirus E1A gene products*. Mol Cell Biol **11**(4): 2116-2124.
- Yamagoe S., Kanno T., Kanno Y., Sasaki S., Siegel R. M., Lenardo M. J., Humphrey G., Wang Y., Nakatani Y., Howard B. H. and Ozato K. (2003). *Interaction of histone acetylases and deacetylases in vivo*. Mol Cell Biol **23**(3): 1025-1033.
- Yang W. M., Inouye C., Zeng Y., Bearss D. and Seto E. (1996). *Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3*. Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 12845-12850.

- Yang X. J., Ogryzko V. V., Nishikawa J., Howard B. H. and Nakatani Y. (1996). *A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A*. Nature **382**(6589): 319-324.
- Yao T. P., Oh S. P., Fuchs M., Zhou N. D., Ch'ng L. E., Newsome D., Bronson R. T., Li E., Livingston D. M. and Eckner R. (1998). *Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300*. Cell **93**(3): 361-372.
- Yuan W., Condorelli G., Caruso M., Felsani A. and Giordano A. (1996). *Human p300 protein is a coactivator for the transcription factor MyoD*. J Biol Chem **271**(15): 9009-9013.
- Zalvide J. and DeCaprio J. A. (1995). *Role of pRb-related proteins in simian virus 40 large-T-antigen-mediated transformation*. Mol Cell Biol **15**(10): 5800-5810.
- Zhang Q., Yao H., Vo N. and Goodman R. H. (2000). *Acetylation of adenovirus E1A regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP*. Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14323-14328.
- Zhang W. and Bieker J. J. (1998). *Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases*. Proc Natl Acad Sci U S A **95**(17): 9855-9860.
- Zhang W., Bone J. R., Edmondson D. G., Turner B. M. and Roth S. Y. (1998). *Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase*. Embo J **17**(11): 3155-3167.
- Zhang Y., Iratni R., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Reinberg D. (1997). *Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex*. Cell **89**(3): 357-364.
- Zhang Y. and Reinberg D. (2001). *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. Genes Dev **15**(18): 2343-2360.
- Zhou X., Marks P. A., Rifkind R. A. and Richon V. M. (2001). *Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9*. Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10572-10577.

Modificació	Histona	Residu	Enzim modificador	Funció biològica
ACETILACIÓ	H2A	K4	Esa1	Activació Transcripcional
		K5	Tip60	Activació Transcripcional
			p300/CBP	Activació Transcripcional
		K7	Hat1	?
	Esa1		Activació Transcripcional	
	H2B	K5	ATF2	Activació Transcripcional
		K11	Gcn5	Activació Transcripcional
		K12	p300/CBP	Activació Transcripcional
			ATF2	
		K16	Gcn5	Activació Transcripcional
			Esa1	
	K15	p300/CBP		
		ATF2	Activació Transcripcional	
	K20	p300	Activació Transcripcional	
	H3	K4	Esa1	Activació Transcripcional
			Hpa2	?
		K9	?	Deposició d'histones
			Gcn5	Activació Transcripcional*
			SRC-1	Activació Transcripcional
		K14	?	Memòria cel·lular*
Gcn5-PCAF			Activació Transcripcional *	
Esa1-Tip60			Activació Transcripcional	
			Reparació DNA	
SRC-1			Activació Transcripcional	
Elp3			Elongació Transcripció	
?			?	
Hpa2			Transcripció per RNA Pol III	
hTFIIIC90			Transcripció per RNA Pol II	
Taf1			Euromatina?	
Sas2	Activació Transcripcional			
Sas3	Elongació Transcripció?			
p300	Activació Transcripcional*			
?	Memòria cel·lular*			
K18	Gcn5 (Complex SAGA/STAGA)	Activació Transcripcional		
	p300/CBP	Reparació DNA		
		Replicació DNA		
K23	Gcn5 (Complex SAGA/STAGA)	Activació Transcripcional		
	Sas3	Reparació DNA		
	p300/CBP	Activació Transcripcional		
K27	Gcn5	Elongació Transcripció?		
		Activació Transcripcional		
H4	K5	Hat1	Deposició d'histones	

			Esa1-Tip60	Activació Transcripcional Reparació DNA
			ATF2	Activació Transcripcional
			Hpa2	?
			p300	Activació Transcripcional*
			?	Memòria cel·lular
		K8	Gcn5-PCAF	Activació Transcripcional*
			Esa1-Tip60	Activació Transcripcional Reparació DNA
			ATF2	Activació Transcripcional
			Elp3	Elongació Transcripció
			p300	Activació Transcripcional*
			?	Memòria cel·lular*
		K12	Hat1	Deposició d'histones Silenci Telomèric
			Esa1-Tip60	Activació Transcripcional
			Hpa2	Reparació DNA
			?	?
			?	Memòria cel·lular*
		K16	Gcn5	Activació Transcripcional
			MOF	Activació Transcripcional
			Esa1(llevat)- Tip60(mamífer)	Activació Transcripcional Reparació DNA
			ATF2	Activació Transcripcional
			Sas2	Euromatina
			?	Memòria cel·lular*
METILACIÓ	H3	K4	Set1 (llevat) Set9 (vertebrats)	Euromatina permissiva (di-Me) Euromatina activa (tri-Me)* Euromatina pre-activa (di-Me)* Elongació Transcripció /memòria (tri-Me)*
			MLL, Trx	Activació Transcripcional
			Ash1 (<i>D. melanogaster</i>)	Activació Transcripcional
		K9	Suv39h, Clr4	Silenci Transcripcional (tri-Me)
			G9a	Metilació DNA (tri-Me) Repressió Transcripcional
			SETDB1	Imprinting
			Dim-5, Kryptonita	Repressió Transcripcional (tri-Me)
			Dim-5, Kryptonita	Metilació DNA (tri-Me)
			Ash1 (<i>D. melanogaster</i>)	Activació Transcripcional
		R17	CARM1	Activació Transcripcional
		K27	Ezh2	Silenci Transcripcional
				Inactivació cromosoma X (tri-Me)

		K36	Set2	Elongació Transcripcional Repressió Transcripcional?
		K79	Dot1p	Euromatina Elongació Transcripcional /memòria
	H4	R3	PRMT1	Activació Transcripcional
		K20	PR-Set7 Suv4-20h Ash1 (<i>D. melanogaster</i>)	Silenci Transcripcional (mono-Me) Heterocromatina (tri-Me) Activació Transcripcional
		K59	?	Silenci Transcripcional?
FOSFORILACIÓ	H2A	S1	? ? MSK1	Mitosi Ensemblatge cromatina? Repressió Transcripcional
		T119	NHK-1	Mitosi
		S129	Mec1	Reparació DNA
		S139	ATR, ATM, DNA-PK	Reparació DNA
	H2B	S14	Mst1	Apoptosi
		S33	TAF1	Activació Transcripcional
	H3	T3	?	Mitosi
		S10	Aurora-B quinasa MSK1, MSK2 Snf1	Mitosi Activació gens resposta ràpida Activació Transcripcional
		T11	DIK/ZIP	Mitosi
		S28	Aurora-B quinasa? MSK1, MSK2	Mitosi Activació gens resposta ràpida
	H4	S1	?	Mitosi
UBIQÜITINACIÓ	H2A	K119	HR6A,B?	Espermatogènesi
	H2B	K120	HR6A,B?	Meiosi
		K123	Rad6	Activació Transcripcional Euromatina
	H3	?	?	Espermatogènesi

Taula II: Relació de les modificacions de les histones i dels enzims que les produeixen. Es mostra la resposta biològica que es produeix. De color blau s'indica l'acetilació i la consegüent activació transcripcional, de color vermell la metilació de les lisines, de color verd la fosforilació de les serines.

HAT	Lisina Acetilada	Funció Biològica	Organisme	Referències
Família GCN5/PCAF				
Gcn5	H3-K14; H4-K8 (histones lliures <i>in vitro</i>) H3-K9, K14, K18, K23 → H4-K8, K16 → H2B-K11; (nucleosomes <i>in vitro</i>) H3-K14; H4-K8	Coactivador transcripcional (C.Trans) C.Trans	Llevat → Humà	(Kuo <i>et al.</i> , 1996) (Grant <i>et al.</i> , 1999) (Yang <i>et al.</i> , 1996)
PCAF			Humà	
Família GNAT-related				
Hat1	H4-K5, K12;	Deposició nucleosomes	Llevat → Humà	(Chicoine <i>et al.</i> , 1986)
	H2A-K7 H4-K12	? Deposició nucleosomes Silenci telomèric		
Elp3	H3-K14 H4-K18	Elongació Transcripció	Llevat	(Wittschieben <i>et al.</i> , 1999)
Família CBP/p300				
CBP	H2A-K5; H2B-K12, K15; H3-K18; H3-K23;	Coactivador transcripcional Activació Transcripcional (A.T.) Replicació DNA Activació elongació transcripcional ???	Nemàtode → Humà	(Bannister, 1996 #12; Ogryzko, 1996 #13)
	H4???			
Família MYST				
Sas2	H3-K14; H4-K16	Silenci gènic Eucromatina	Llevat	
Esa1	H4-K5, K8, K12 (nucleosomes <i>in vitro</i>) H4-K16 H2B-K16 H3-K4 H3-K14	Progressió cicle cel·lular A.T. Reparació DNA ? A.T. A.T. Reparació DNA	Llevat	(Allard <i>et al.</i> , 1999)

MOF Tip60	H4-K16	Compensació dosi	Drosophila
	H4-K16	Interacció Tat HIV	Humà
	H2A-K5	A. T.	
	H3-K14	A. T.	
	H4-K5,K8,K12	A. T.	
MOZ	H4	Reparació DNA	
		Reparació DNA	
Família TAFII250		Leucemogènesi	Humà
TAFII250	H4 K5, K12	Factor transcripció	Llevat→Humà (Mizzen <i>et al.</i> , 1996) (Jacobsen <i>et al.</i> , 2000)
Família SRC			
SRC-1/ ACTR		Receptor hormonal coactivador	Ratolí→Humà
		Activador unió DNA	Llevat→Humà (Kawasaki <i>et al.</i> , 2000)
ATF-2			

Taula III: Classificació de les diferents famílies d'acetiltransferases d'histones. Es destaquen els components més importants. Es mostra també la funció biològica en la qual estan implicades i els organismes on s'han descrit.

HDAC (Complex)	HDAC Llevat	Corepressor	Expressió	Funció biològica associada	Inhibidor	Referències
Classe I	Rpd3			Progrèssió cicle cel·lular		
HDAC1 (NuRD, SIN3)		NCOR, SMRT	N	Repressió transcripcional Proliferació cel·lular	S	(Taunton <i>et al.</i> , 1996)
HDAC2 (NuRD, SIN3)		NCOR, SMR	N		S	(Yang <i>et al.</i> , 1996)
HDAC3		NCOR, SMRT	N/C		S	(Emiliani <i>et al.</i> , 1998)
HDAC8			N		S	(Hu <i>et al.</i> , 2000)
Classe II	Hda1			Ús i transport de carbohidrats		
HDAC4		NCOR, SMRT	N/C	Inhibició miogènesi-Repressió MyoD	S	(Grozinger <i>et al.</i> , 1999)
HDAC5		NCOR, SMRT	N/C	Inhibició miogènesi-Repressió MyoD	S	(Grozinger <i>et al.</i> , 1999)
HDAC6			N/C		S*	(Grozinger <i>et al.</i> , 1999)
HDAC7		NCOR, SMRT	N/C		S	(Kao <i>et al.</i> , 2000)
HDAC9			N/C		S	(Zhou <i>et al.</i> , 2001)
HDAC10			N/C		ND	(Tong <i>et al.</i> , 2002)
HDAC11			N/C		ND	(Gao <i>et al.</i> , 2002)
Classe III†	Sir2			Biosíntesi d'aminoàcids	NS	
SIRT1	Hst1		N		ND	(Frye, 1999)
SIRT2	Hst2				ND	(Frye, 1999)
SIRT3	Hst3				ND	(Frye, 1999)
SIRT4	Hst4				ND	(Frye, 1999)
SIRT5					ND	(Frye, 1999)
SIRT6					ND	(Frye, 2000)
SIRT7					ND	(Frye, 2000)

Taula IV: Classificació de les diferents famílies de desacetilases d'histones. Es destaquen els components més importants i els complexos corepressors dels que formen part. Es mostra també la funció biològica en la qual estan implicades i els organismes on s'han descrit. També s'indica el grau de sensibilitat a inhibidors de desacetilases.

Meiltransferasa	Organisme	Modificació	Desmetilasa	Funció associada
ySET1	<i>S. cerevisiae</i>	H3K4	-	Activació Transcripció /eucromatina
SET7/Set9	<i>H. sapiens</i>	H3K4	-	Activació Transcripció
MLL	<i>H. sapiens</i>	H3K4	-	Activació Transcripció
Ash1	<i>D. melanogaster</i>	H3K4	-	Activació Transcripció
Smyd3	<i>H. sapiens</i>	H3K4	-	Activació Transcripció
	<i>H. sapiens</i>	H3K4(mono-, di-)	LSD1	Repressió Transcripció
SUV39h1	<i>M. musculus</i>	H3K9	-	Metilació DNA/ repressió transcripció
SUV39H1	<i>H. sapiens</i>	H3K9	-	heterocromatina
SUV39h2	<i>H. sapiens</i>	H3K9	-	Metilació DNA /heterocromatina
Clr4	<i>S. pombe</i>	H3K9	-	Repressió transcripció / heterocromatina
Dim5	<i>N. crassa</i>	H3K9	-	Metilació DNA
Kryptonita	<i>A. thaliana</i>	H3K9	-	Metilació DNA
G9a	<i>M. musculus / H. sapiens</i>	H3K9	-	<i>Imprinting</i> /repressió transcripció
Eu-HMTasa	<i>H. sapiens</i>	H3K9	-	Repressió transcripció
ESET/SETDB1	<i>M. musculus / H. sapiens</i>	H3K9	-	Repressió transcripció /metilació DNA
E(z)/EZH2	<i>D. melanogaster / H. sapiens</i>	H3K9(tri-)	-	Repressió transcripció
Ash1	<i>D. melanogaster</i>	H3K9	-	Activador transcripció
	<i>H. sapiens</i>	H3K9(mono-, di-)	LSD1	Activació transcripció
E(z)/EZH2	<i>D. melanogaster / H. sapiens</i>	H3K27	-	Repressió transcripció
Ezh2	<i>M. musculus</i>	H3K27	-	Inactivació cromosoma X / heterocromatina
Set2	<i>S. cerevisiae</i>	H3K36	-	Activador transcripció
Dot1	<i>S. cerevisiae</i>	H3K79	-	Repressió transcripció / Dany DNA
DOT1L	<i>H. sapiens</i>	H3K79	-	Repressió transcripció / Dany DNA
SET9	<i>S. pombe</i>	H4K20	-	Dany DNA
Pr-SET7/Set8	<i>H. sapiens /D. melanogaster</i>	H4K20	-	Repressió transcripció
SUV4-20	<i>H. sapiens</i>	H4K20	-	Heterocromatina
Ash1	<i>D. melanogaster</i>	H4K20	-	Activador transcripció

Taula V: Classificació dels enzims metiltransferasa d'histones segons els residu que modifiquen. S'indica també la desmetilasa LSD1. Es pot veure la funció biològica que desenvolupen així com els organismes en els que han estat descrits aquests enzims.

