



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

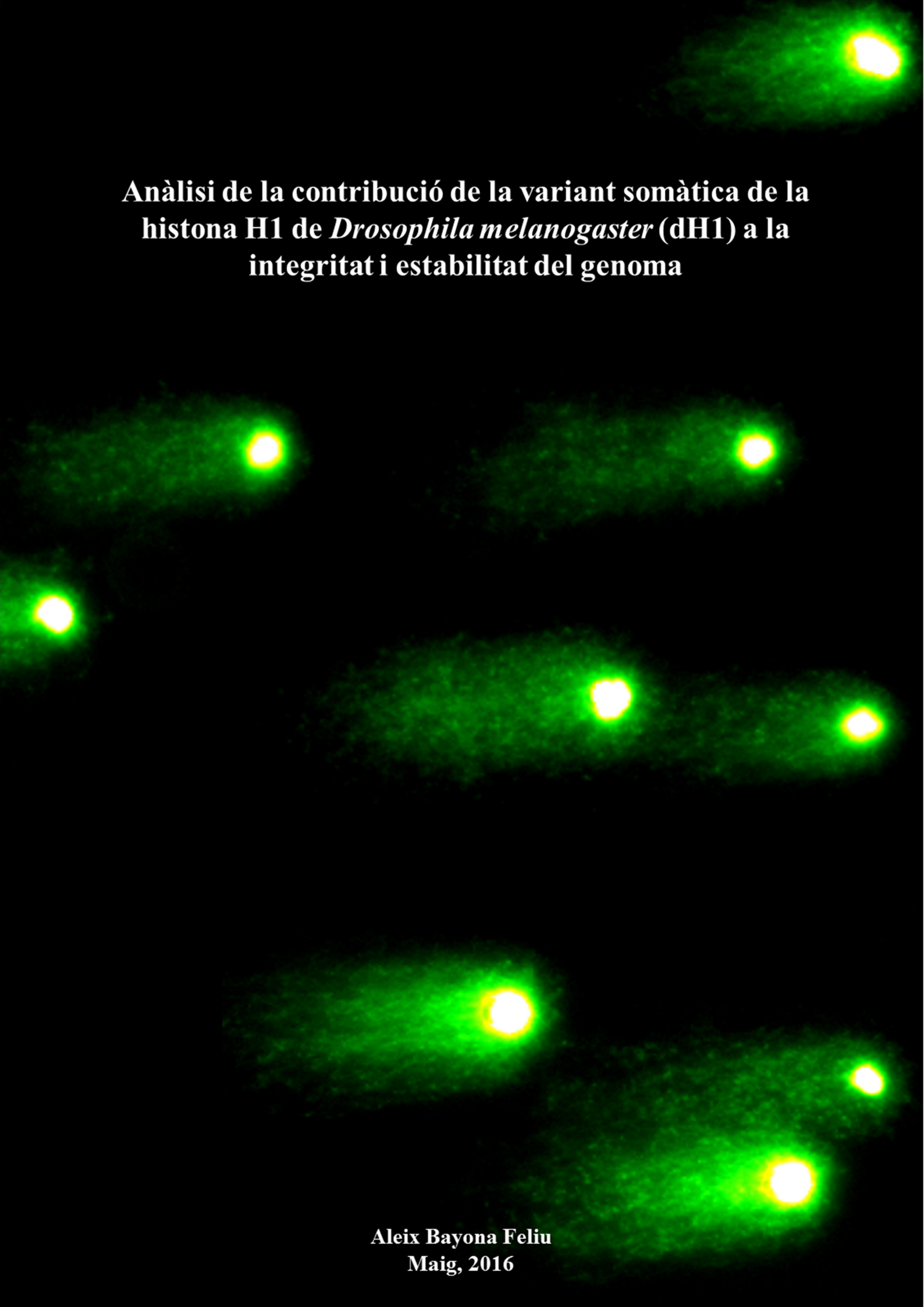
## Anàlisi de la contribució de la variant somàtica de la histona H1 de *Drosophila melanogaster* (dH1) a la integritat i estabilitat del genoma

Aleix Bayona Feliu

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

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

The background of the slide is a fluorescence microscopy image of Drosophila melanogaster embryos. The image shows several embryos, each with a distinct, bright green fluorescent spot. These spots are distributed across the frame, with some appearing as single points and others as small clusters. The overall appearance is that of a grid of embryos, with the green spots likely representing the expression of a specific marker or protein in the developing embryos.

**Anàlisi de la contribució de la variant somàtica de la histona H1 de *Drosophila melanogaster* (dH1) a la integritat i estabilitat del genoma**

**Aleix Bayona Feliu**  
**Maig, 2016**





Departament de Genètica  
Programa de Doctorat de Genètica  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona  
Curs 2015-2016

**Anàlisi de la contribució de la variant somàtica de la histona H1 de  
*Drosophila melanogaster* (dH1) a la integritat i estabilitat del genoma**

Memòria presentada per

**Aleix Bayona Feliu**

Per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció dels Drs. Ferran Azorín Marín i Jordi Bernués Martínez a  
l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC) / Institut de Recerca Biomèdica de  
Barcelona (IRB)

Els Directors,

La Tutora,

Dr. Ferran Azorín Marín, Dr. Jordi Bernués Martínez

  
Dra. Montserrat Corominas Guiu

L'autor,

Aleix Bayona Feliu  
Barcelona, Maig 2016



# AGRAÏMENTS

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies als Dr. Ferran Azorín Marín i al Dr. Jordi Bernués Martínez per haver-me donat l'oportunitat de realitzar la tesi doctoral en el seu laboratori.

En segon lloc, m'agradaria donar les gràcies a tota la meva família per haver estat sempre al meu costat ajudant-me en tot moment durant aquests anys. Moltes gràcies a tots per haver-me ajudat tan en els bons com en els no tan bons moment al llarg d'aquests quatre anys. Sobretot, voldria tenir una menció especial per la Judith, els meus pares i el meu germà, en Pere, la Laura i l'Arnau, que són els que han viscut tot aquest període de temps més a prop meu. Ells són probablement els que han viscut més intensament el dia a dia mentre he estat realitzant la tesi doctoral. Tot i així, evidentment aquest agraïment és extensible a tota la resta de persones de la meva família, tan als que hi són com els que per desgràcia ja no. En aquest sentit, voldria agrair personalment el suport i l'estima que han mostrat per mi en tot moment els meus avis, el Pepe, la Isabel, la Lala i l'Avi; els meus tiets i els meus cosins, el Carlos, el Manel, la Sílvia, la Júlia i el Guillem; i als pares, germans, tiets i cosins de la Judith, la Rosa, el David, el Sergi, la Chloe, la Carme, el Manel, la Carmen, el Marc i la Núria. Finalment, m'agradaria també agrair el suport totalment incondicional que ha mostrat per mi en tot moment la Bruna, que per mi també forma part de la meva família. En tot moment, ella ha estat al meu costat de forma incondicional mentre he estat fent feina per la tesi a casa fos l'hora que fos.

En tercer lloc, m'agradaria destacar i agrair l'ajuda i el suport que també m'han ofert moltes de les persones que han passat per aquest laboratori. Des que vaig començar hi ha hagut molts canvis del personal del laboratori, però, tan als que hi eren al principi quan vaig començar com els que hi són ara m'agradaria dir-los que ha estat un plaer treballar al seu costat i agrair-los haver-me aguantat i l'ajuda que m'han pogut oferir en tot moment durant aquest temps. Primer de tot, voldria donar les gràcies a tots els que han format part en un moment o altre del grup que hem estat estudiant la histona H1. Gràcies Carles, Anna, Jordi, Lucía i Olivera per haver compartit amb mi tan les victòries com les frustracions estudiant aquesta proteïna. També m'agradaria tenir unes paraules d'agraïment per la Olga i la Mònica (tot i que a vegades no m'hagi volgut comprar reactius o anticossos...) ja que sense el seu ajut i suport no hauria pogut dur a terme molts dels experiments que he realitzat durant aquests anys. Moltes gràcies també al Sergi per haver-me introduït en el grup de l'equip de futbol amb el que participaven a la lliga de futbol de l'IRB amb els que ha gaudit de molt bons moments. Finalment, també voldria donar les gràcies al Salva, la Paula, la Maria, la Laura, l'Eva Satovic, l'Albert, el Milos, el Johan, el Gianmarco, la Ujué, el Roman, la Sònia, l'Anne, la Carolina, la Marta, la Katrin, el Tomàs, la Lluïsa, el Josep i tots aquells qui han passat pel laboratori durant aquests anys. A totes vosaltres us voldria dir que evidentment m'enduc molt coneixement i experiències del temps que he estat en aquest laboratori, però sobretot m'enduc amistats per tota la vida.

També voldria agrair l'ajuda que m'han pogut oferir en moments puntuals de la meva tesi en els laboratoris del Dr. Àlex Vaquero de l'Idibell, Dr. Oscar Fernández Capetillo del CNIO, Dr. Raúl Méndez de l'IRB, Dr. Andrés Aguilera del CABIMER i la Dra M<sup>a</sup> Pia Cosma del CRG. Sense ells i la gent dels seus laboratoris alguns dels experiments que he hagut de realitzar al llarg de la tesi no haurien estat possibles.

Per acabar, m'agradaria tenir unes paraules d'agraïment per al meu avi, el Pepe, que per desgràcia no ha pogut veure'm acabar la tesi. Ell va ser qui em va encomanar des de ben petit la passió per la ciència i, en especial, la biologia. Sense ell, probablement no estaria escrivint els agraïments d'una tesi doctoral en genètica ara mateix i no seria qui sóc. Moltes gràcies per haver-me fet viure la ciència amb entusiasme i transmetre'm infinitat de valors. M'hagués agradat molt que haguessis pogut veure'm presentar la tesi, però, tot i que no pugui ser, sé que siguis on siguis estàs superorgullós de mi.

Moltes gràcies a tots!







# ÍNDEX GENERAL

A. INTRODUCCIÓ.....	1
A.1. La cromatina.....	3
A.1.1. Estructura de la cromatina .....	3
A.1.1.1. El nucleosoma .....	4
A.1.1.2. La fibra de 30nm .....	5
A.1.1.3. Els cromosomes.....	6
A.1.2. La regulació epigenètica .....	7
A.1.2.1. La metilació del DNA.....	7
A.1.2.2. Les modificacions post-traduccionals de les histones .....	8
A.1.2.3. Els RNAs no codificants.....	8
A.1.2.4. Les variants d'histones .....	9
A.1.3. Classificació de la cromatina .....	9
A.1.3.1. Mecanismes de formació de l'heterocromatina .....	10
A.1.3.2. Silenciament gènic associat a la formació d'heterocromatina .....	11
A.1.4. La cromatina de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	13
A.1.4.1. Classificació clàssica de la cromatina de <i>D. melanogaster</i> .....	13
A.1.4.2. Classificació moderna de la cromatina de <i>D. melanogaster</i> .....	15
A.2. La histona H1 .....	17
A.2.1. Estructura de la histona H1 .....	17
A.2.2. La família gènica de la histona H1.....	20
A.2.3. La histona H1 de <i>D. melanogaster</i> .....	21
A.2.4. Funcions de la histona H1 .....	23
A.2.4.1. Contribució a la formació d'estructures d'ordre superior .....	23
A.2.4.1. Altres funcions de la histona H1 .....	24
A.2.5. Modificacions post-traduccionals de la histona H1 .....	27
A.3. L'estabilitat del genoma .....	27
A.3.1. El programa eucariota de replicació del DNA .....	27
A.3.2. L'estrès replicatiu .....	28
A.3.2.1. Causes de l'estrès replicatiu .....	29
A.3.2.1.1. Activació inadequada dels orígens de replicació: excés i dèficit .....	30

A.3.2.1.2. Obstacles en la progressió de la forqueta de replicació .....	30
A.3.2.1.3. Interferència entre el programa de transcripció i replicació .....	31
A.3.2.2. Conseqüències de l'estrès replicatiu sobre l'estabilitat genòmica .....	31
A.3.2.2.1. Mutacions associades a la segregació desigual dels cromosomes .....	31
A.3.2.2.2. Mutacions associades a l'aturada de la forqueta .....	32
A.3.2.2.3. Mutacions associades als sistemes de reparació del DNA .....	32
A.3.2.3 Senyalització de l'estrès replicatiu .....	33
A.3.2.3.1. Fosforilació de la variant d'H2A, H2AX, en resposta al dany al DNA .....	35
A.3.2.3.2 La variant H2Av és l'homòleg funcional d'H2AX a <i>D. melanogaster</i> .....	35
A.3.3. Els R-loops: un exemple de causa d'estrès replicatiu .....	36
A.3.3.1 Definició i característiques dels R-loops .....	36
A.3.3.2 Funcions fisiològiques dels R-loops .....	36
A.3.3.3 Mecanismes de formació i resolució dels R-loops .....	38
A.3.3.4. Els R-loops com a causa de dany al DNA .....	39
B. OBJECTIUS .....	43
C. MATERIALS I MÈTODES .....	47
C.1. Materials .....	49
C.1.1. Reactius i enzims .....	49
C.1.2. Soques bacterianes .....	49
C.1.3. Plasmidis .....	49
C.1.3.1 Plasmidis de clonatge .....	49
C.1.3.2 Plasmidis per a l'expressió de proteïnes a cèl·lules S2 .....	50
C.1.3.3. Plasmidis per a la producció de línies de mosques transgèniques .....	50
C.1.4. Línies cel·lulars .....	50
C.1.5. Oligonucleòtids .....	51
C.1.6. Anticossos .....	53
C.1.7. Soques de <i>D. melanogaster</i> .....	55
C.2. Mètodes .....	55
C.2.1. Mètodes de manipulació del DNA plasmídic .....	55
C.2.1.1 Tècniques de DNA recombinant .....	55
C.2.1.2 Preparació de soques bacterianes competents .....	55
C.2.1.3 Procés de transformació .....	56
C.2.1.4 Minipreparació de DNA .....	56
C.2.1.5 Maxipreparació de DNA .....	57
C.2.1.6 Electroforesi de DNA en gel d'agarosa .....	57
C.2.2. Mètodes de treball amb cèl·lules SL2 en cultiu .....	58
C.2.2.1. Cultiu de cèl·lules SL2 .....	58
C.2.2.2. Congelació de cèl·lules SL2 .....	58

C.2.2.3. Descongelació de cèl·lules SL2 .....	59
C.2.2.4. Comptatge de cèl·lules SL2 .....	59
C.2.2.5. Transfecció de cèl·lules SL2 mitjançant fosfat càlcic .....	59
C.2.2.6. Interferència de la histona dH1 a cèl·lules SL2 .....	60
C.2.2.7. Immunolocalització a cèl·lules SL2 adherides a una matriu de concanavalina .....	61
C.2.2.8. Immunolocalització a cèl·lules SL2 impactades .....	62
C.2.2.9. Anàlisi del cicle cel·lular .....	63
C.2.2.10. Separació de les cèl·lules segons la fase del cicle cel·lular .....	63
C.2.3. Tècniques utilitzades amb cèl·lules SL2 en cultiu .....	65
C.2.3.1. Electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) .....	65
C.2.3.2. Transferència de proteïnes ( <i>Western blot</i> ) .....	65
C.2.3.3. Rentat de membranes de <i>western blot (stripping)</i> .....	66
C.2.3.4. Tinció amb solució roig de Ponceau .....	67
C.2.3.5. Reacció en cadena de la polimerasa ( <i>PCR</i> ) .....	67
C.2.3.6. Síntesi d'RNA de doble cadena .....	68
C.2.3.7. Extracció i purificació d'RNA total .....	69
C.2.3.8. Transcripció reversa de l'mRNA .....	69
C.2.3.9. Reacció quantitativa en cadena de la polimerasa ( <i>qPCR</i> ) .....	70
C.2.3.10. Immunoprecipitació de la cromatina ( <i>ChIP</i> ) .....	71
C.2.3.11. Anàlisi bioinformàtica de la seqüenciació del material immunoprecipitat .....	73
C.2.3.12. Immunoprecipitació d'hibrids RNA:DNA ( <i>DRIP</i> ) .....	74
C.2.3.13. <i>Comet Assay</i> .....	75
C.2.3.14. Assaig d'intercanvis entre cromàtides germanes ( <i>SCE</i> ) .....	78
C.2.3.15. Irradiació amb rajos X .....	80
C.2.3.16. Experiments d'inhibició de la transcripció .....	80
C.2.3.17. Tractament amb 5-etinil-2'-desoxiuridina ( <i>EdU</i> ) .....	80
C.2.3.18. Purificació de DNA genòmic .....	80
C.2.3.19. Processament de les imatges amb el <i>software</i> FIJI .....	81
C.2.4. Tècniques utilitzades en mosques .....	82
C.2.4.1. Sistema d'expressió ectòpica a <i>Drosophila</i> .....	82
C.2.4.2. Immunolocalitzacions en discos imaginals de larves .....	83
C.2.4.3. Immunolocalitzacions a cromosomes politènics .....	83
C.2.4.4. Muntatge d'ales de <i>Drosophila</i> .....	84
D. RESULTATS .....	87
D.1. Conseqüències de la depleció de la histona dH1 a cèl·lules SL2 .....	89
sobre l'acumulació de dany al DNA i l'estabilitat genòmica .....	89
D.1.1 La depleció de la histona dH1 a cèl·lules SL2 provoca un increment del senyal de $\gamma$ H2Av ...	89
D.1.2 La depleció de la histona dH1 a cèl·lules SL2 provoca un increment de trencaments de doble cadena del DNA .....	91

D.1.3. Les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 presenten inestabilitat genòmica.....	93
D.1.4. L'absència d'histona dH1 provoca una acumulació de $\gamma$ H2Av en seqüències repetitives.....	94
D.1.5. Els <i>foci</i> de $\gamma$ H2Av resultat de la depleció d'histona dH1 tendeixen a colocalitzar amb HP1a ...	98
D.1.6. El dany al DNA produït per la depleció de la histona dH1 apareix preferentment a fase S....	99
D.1.7. La depleció de la histona dH1 també provoca un increment del senyal de $\gamma$ H2Av en cromosomes metafàsics i problemes en la segregació cromosòmica.....	100
D.2. Causes del dany al DNA generat en deplecionar la variant somàtica la histona dH1 .....	102
D.2.1. L'eficiència en la reparació del DNA no està afectada en deplecionar la histona dH1.....	102
D.2.2. La depleció de la histona dH1 genera R-loops a l'heterocromatina.....	104
D.2.3. La depleció d'HP1a no provoca una acumulació d'R-loops.....	112
D.2.4. Els R-loops generats en deplecionar la histona dH1 causen dany al DNA durant la replicació .....	114
D.3. Alteracions del patró temporal de replicació del DNA causades per la depleció de la histona dH1 ..	115
D.3.1. El cicle cel·lular només està lleugerament afectat en les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 .....	116
D.3.2. L'heterocromatina es replica anormalment d'hora a fase S en cèl·lules deplecionades d'histona dH1 .....	118
E. DISCUSSIÓ.....	121
E.1. La depleció de la histona H1 de <i>D. melanogaster</i> , dH1, provoca dany al DNA a l'heterocromatina i inestabilitat genòmica .....	124
E.2. La depleció de la histona dH1 provoca una acumulació d'R-loops a l'heterocromatina que són la causa del dany al DNA observat .....	126
E.3. El patró temporal de replicació del DNA està alterat en deplecionar la histona dH1 .....	133
E.4. La histona dH1 prevé l'acumulació d'R-loops de forma específica .....	135
F. CONCLUSIONS.....	143
G. REFERÈNCIES.....	147
H. ANNEX.....	159
H.1 Revisió <i>Histone H1: Lessons from Drosophila</i> .....	161

# ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1. Nivells d'empaquetament del DNA eucariota .....	3
Figura 2. Estructura del nucleosoma .....	4
Figura 3. Estructura del cromatosoma.....	5
Figura 4. Model de l'estructura cromosòmica.....	6
Figura 5. Mecanismes epigenètics de regulació de l'expressió gènica .....	7
Figura 6. Mecanismes d'inici de la formació de l'heterocromatina .....	10
Figura 7. L'heterocromatina actua com un plataforma per al reclutament d'efectors al llarg d'extensos dominis.....	12
Figura 8. Imatge del cromocentre i els braços dels cromosomes politènics que emanen d'ell .....	14
Figura 9. Estructura cromosòmica de <i>D. melanogaster</i> .....	14
Figura 10. Localització dels elements transponibles i les principals posicions dels satèl·lits a l'heterocromatina de <i>D. melanogaster</i> .....	15
Figura 11. Característiques dels cinc tipus de cromatina .....	16
Figura 12. Patró temporal de replicació de cada tipus de cromatina.....	17
Figura 13. Classificació de la cromatina de <i>D. melanogaster</i> en 9 estats .....	17
Figura 14. Estructura de la histona H1 i la seva interacció amb el nucleosoma. ....	18
Figura 15. Número de variants d'histona H1 en diverses espècies .....	20
Figura 16. Organització genòmica dels gens de les histones canòniques de <i>D. melanogaster</i> al cromosoma 2 .....	22
Figura 17. Models de condensació de la cromatina en la fibra de 30 nm .....	24
Figura 18. Funcions de la histona H1 .....	25
Figura 19. La histona dH1 és necessària per mantenir el silenciament dels gens heterocromàtics i els transposons.....	26
Figura 20. Resum de les modificacions post-traduccionals identificades de la variant somàtica de la histona dH1 .....	27
Figura 21. Fonts d'estrès replicatiu.....	29
Figura 22. Mecanismes de col·lapse de la forqueta de replicació.....	32
Figura 23. Senyalització a les forquetes de replicació aturades .....	34

Figura 24. Seqüència aminoacídica de l'extrem C-terminal de les histones H2A .....	36
Figura 25. Funcions fisiològiques naturals dels R-loops a les cèl·lules.....	37
Figura 26. Activitats cel·lulars que limiten l'acumulació d'R-loops .....	38
Figura 27. Mecanismes a través dels quals una acumulació d'R-loops pot donar lloc a trencaments de doble cadena del DNA .....	40
Figura 28. Depleció de la histona dH1 en cèl·lules en cultiu.....	61
Figura 29. Separació cel·lular per citometria de flux.....	64
Figura 30. Esquema del muntatge dels diferents elements per a la transferència de proteïnes .....	66
Figura 31. Reactius i programa utilitzats per amplificar els fragments de DNA corresponents al gen de la histona dH1 i LacZ.....	68
Figura 32. Reactius i programa utilitzats per amplificar els fragments de DNA en les reaccions de PCR quantitatives .....	70
Figura 33. Metodologia emprada per al càlcul de l'expressió gènica i la cromatina immunoprecipitada.....	71
Figura 34. Metodologia emprada per al càlcul de la quantitat de material immunoprecipitat en els experiments de DRIP .....	75
Figura 35. Comet Assay .....	76
Figura 35. Anàlisi d'intercanvis entre cromàtides germanes .....	79
Figura 37. Processament de les immunodeteccions utilitzant l'anticòs S9.6 .....	81
Figura 38. Esquema del funcionament del sistema d'expressió UAS-GAL4 .....	83
Figura 39. La depleció de la histona dH1 provoca un increment de la reactivitat de $\gamma$ H2Av .	90
Figura 40. La interferència de l'expressió de la histona dH1 provoca la generació de trencaments a la cadena de DNA .....	92
Figura 41. En deplecionar la histona dH1 existeix hiperrecombinació genòmica .....	93
Figura 42. Localització genòmica de les regions enriquides en $\gamma$ H2Av .....	94
Figura 43. Es detecta un enriquiment de $\gamma$ H2Av a les regions promotores de gens pericentromèrics que s'expressen per sobre la mitjana d'expressió a cèl·lules SL2.....	95
Figura 44. La depleció d'histona dH1 provoca una acumulació de $\gamma$ H2Av en seqüències repetitives .....	96
Figura 45. L'anàlisi de la immunoprecipitació de cromatina enriquida en $\gamma$ H2Av mitjançant PCR quantitativa confirma que la depleció d'histona dH1 provoca una acumulació de $\gamma$ H2Av en seqüències repetitives .....	97
Figura 46. En condicions de depleció d'histona dH1 s'observa una major colocalització entre $\gamma$ H2Av i HP1a .....	98
Figura 47. El dany al DNA es produeix en la fase S del cicle cel·lular a cèl·lules deplecionades de dH1.....	99



Figura 48. L'increment de $\gamma$ H2Av en interferir l'expressió de la histona dH1 també es pot detectar en cromosomes metafàsics i presenta un patró de localització que està d'acord amb els resultats obtinguts mitjançant ChIP-seq contra $\gamma$ H2Av .....	101
Figura 49. Les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 presenten problemes de segregació cromosòmica .....	102
Figura 50. La reparació del DNA no està afectada deplecionar la histona dH1.....	103
Figura 51. La causa del dany generat en deplecionar la histona dH1 es deguda a l'acumulació d'R-loops.....	105
Figura 52. Els R-loops induïts en deplecionar la histona dH1 també colocalitzen amb HP1a.....	106
Figura 53. En deplecionar la histona dH1 hi ha una acumulació d'híbrids RNA:DNA a les seqüències repetitives.....	107
Figura 54. La interferència d'histona dH1 a glàndules salivals provoca una acumulació d'R-loops a l'heterocromatina.....	108
Figura 55. La sobreexpressió de l'RNasa H1 humana en condicions d'interferència d'histona dH1 a disc imaginal d'ala permet un rescat parcial de l'ala.....	109
Figura 56. La depleció d'histona dH1 comporta una sobreexpressió de les seqüències repetitives.....	110
Figura 57. La transcripció és necessària per a la generació del dany.....	111
Figura 58. La depleció d'HP1a no provoca una acumulació d'R-loops a cromosomes politènics .....	112
Figura 59. La depleció d'HP1a no provoca una acumulació de $\gamma$ H2Av al disc imaginal d'ala i l'ala adulta només resulta lleugerament afectada.....	113
Figura 60. Els R-loops comencen a acumular-se a G1, però el principal increment de dany no es visible fins fase S.....	115
Figura 61. El perfil del cicle cel·lular mostra una petita acumulació de cèl·lules a G1 en interferir l'expressió d'histona dH1 .....	116
Figura 62. En deplecionar la histona dH1 es detecta un increment de cèl·lules EdU positives.....	117
Figura 63. L'heterocromatina es replica anormalment d'hora a fase S en deplecionar la histona dH1 .....	119
Figura 64. Model molecular de l'activació de PARP-1 per les histones del nucleosoma.....	125
Figura 65. La replicació del DNA de les cèl·lules interferides d'histona dH1 tendeix a estar alentida i a aturar-se .....	128
Figura 66. Model de la generació de dany al DNA en condicions de depleció d'histona dH1 .....	130
Figura 67. Hipotètic model que explicaria perquè la depleció de la histona dH1, però no la d'HP1a, provoca una acumulació d'R-loops a l'heterocromatina.....	139



## ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Composició de cadascun dels 5 tipus de cromatina en que s'ha suggerit que es podria classificar la cromatina de <i>D. melanogaster</i> segons [37].....	16
Taula 2. Variants d'histona H1 humanes .....	21
Taula 3. Taula dels primers utilitzats .....	51
Taula 4. Taula dels anticossos utilitzats .....	53
Taula 5. Taula de les línies de mosques emprades. Es mostra el nom, la descripció i l'origen de les línies de mosques utilitzades.....	55
Taula 6. Elements repetitius identificats enriquits en $\gamma$ H2Av específicament en deplecionar la histona dH1 .....	96
Taula 7. Llista de proteïnes en que s'hi ha detectat associada la histona H1 segons la base de dades del projecte DPiM que presenten o poden interaccionar amb altres proteïnes que presenten activitats enzimàtiques que podrien estar implicades en la prevenció de l'acumulació d'R-loops.....	137







# **A. INTRODUCCIÓ**

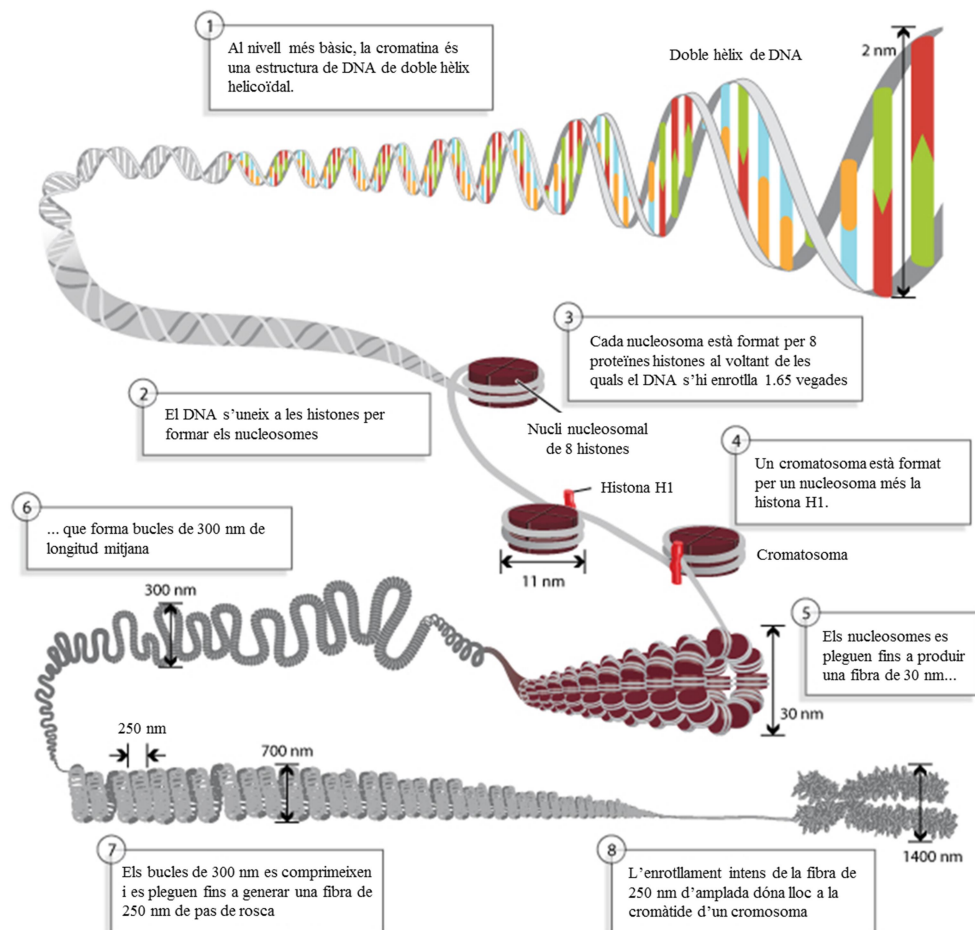




## A.1. La cromatina

### A.1.1. Estructura de la cromatina

El genoma humà haploide conté aproximadament 3 bilions de parells de bases de DNA empaquetat formant 23 cromosomes. La majoria de cèl·lules del cos humà, excepte els òvuls i els espermatozoides, són diploides i contenen 23 parelles de cromosomes homòlegs. Això fa un total de 6 bilions de parells de bases de DNA per cèl·lula. Donat que cada parell de bases és al voltant de 0.34 nanòmetres de llarg, això vol dir que cada cèl·lula diploide conté uns 2 metres de DNA. A més a més, s'estima que el cos humà conté uns 50 trilions de cèl·lules. Això vol dir que cada ésser humà conté al voltant de 100 trilions de metres de DNA. Si tenim en compte que el Sol està a 150 bilions de metres de la Terra, cadascú de nosaltres conté prou DNA per anar d'aquí al Sol i tornar més de 300 vegades o donar la volta a l'equador terrestre 25 bilions de vegades [1].

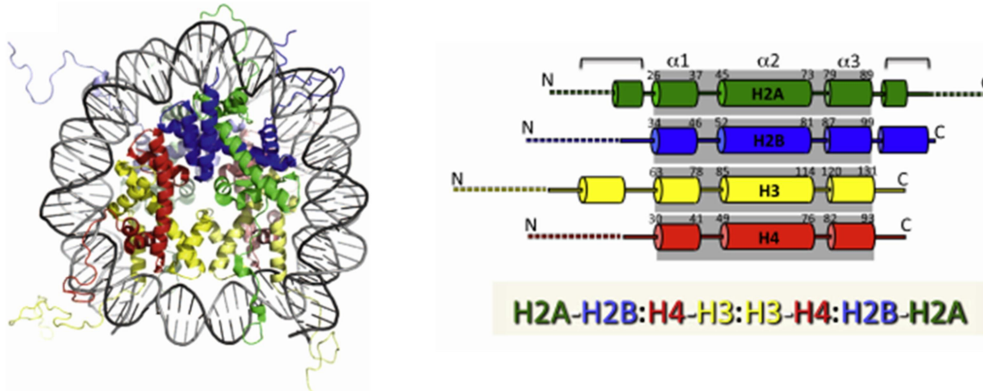


**Figura 1. Nivells d'empaquetament del DNA eucariota.** El DNA cromosòmic està empaquetat dins el nucli microscòpic amb l'ajuda de les histones. Aquestes són proteïnes carregades positivament que s'adhereixen fortament al DNA carregat negativament i formen uns complexos anomenats nucleosomes. Cada nucleosoma està format per DNA enrotllat 1.65 vegades al voltant de 8 proteïnes histones. Els nucleosomes es pleguen encara més per a generar la fibra de cromatina de 30 nm, que forma bucles de 300 nm de longitud mitjana. Els bucles de 300 nm es comprimeixen i es pleguen encara més fins a generar una fibra de 250 nm de pas de rosca, que es enrotllada encara més fins a formar la cromàtide d'un cromosoma. Imatge adaptada de [1].

Per fer possible que aquesta gran quantitat de DNA càpiga dins l'espai microscòpic de  $6\mu\text{m}$  de diàmetre del nucli d'una cèl·lula humana, el DNA es troba altament compactat. Això és possible gràcies a l'acció de proteïnes especialitzades que empaqueten el DNA en nivells de compactació cada vegada majors permetent que càpiga en un espai tan minúscul (Fig. 1). Aquest complex de DNA i proteïnes és el que anomenem cromatina. Sorprenentment, tot i estar altament compactat, el DNA està condensat d'una manera que permet que sigui fàcilment accessible als molts enzims que necessiten interaccionar amb ell per replicar-lo, reparar-lo o llegir els gens per produir noves proteïnes.

### A.1.1.1. El nucleosoma

Les proteïnes que s'uneixen al DNA per compactar-lo es divideixen tradicionalment en dues classes: les histones i les proteïnes cromosòmiques no histones.



**Figura 2. Estructura del nucleosoma.** A l'esquerra, model de l'estructura del nucleosoma. A la dreta, estructura secundària de les proteïnes histones del nucli nucleosomal. La regió marcada en gris indica els dominis *histone fold* formats per 3 hèlixs- $\alpha$  de cada proteïna amb el primer i últim residu que formen cadascuna de les tres hèlixs- $\alpha$  indicats. Les hèlixs- $\alpha$  addicionals fora el domini *histone fold* estan indicades amb els parèntesis. A sota, representació linial dels contactes primaris entre les histones del nucli del nucleosoma. Imatge adaptada de [2, 3].

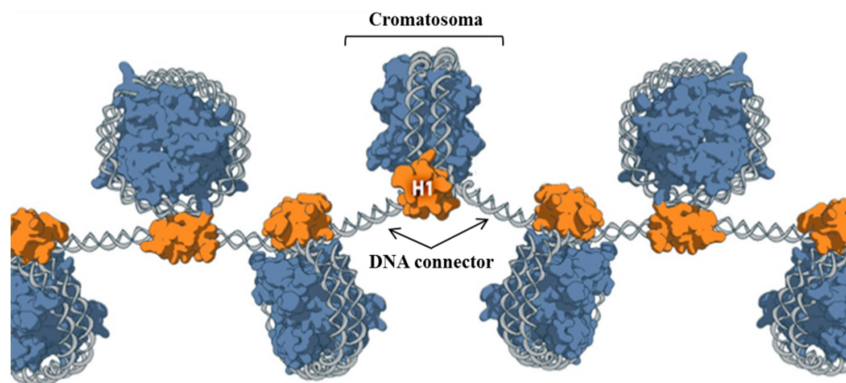
Les histones són les responsables del primer i més bàsic nivell d'empaquetament del DNA. Es troben presents a la cèl·lula en unes quantitats enormes, gairebé 60 milions de molècules de cada tipus d'histona per cèl·lula humana. Això fa que la massa total d'histones a la cromatina sigui gairebé igual que la de DNA. La unitat repetitiva, bàsica, estructural i funcional de la cromatina és el que s'anomena el nucleosoma. Cada nucleosoma està format per uns 146pb de DNA enrotllats al voltant d'un nucli proteic d'histones donant aproximadament 1.65 voltes de forma levògira (Fig. 2). El nucli proteic consisteix en un octàmer d'histones compost per dues còpies de cadascuna de les histones H2A, H2B, H3 i H4. Totes quatre histones són proteïnes relativament petites i contenen un motiu estructural, anomenat *histone fold*, format per tres hèlixs- $\alpha$  i 2 bucles, que permet la unió de les histones entre elles per formar heterodímers. Quan es genera el nucleosoma, els *histone fold* s'uneixen entre ells per formar heterodímers H3-H4 i H2A-H2B. A continuació, els dímers H3-H4 s'uneixen per

formar tetràmers. Finalment el tetràmer H3-H4 es combina amb dos dímers H2A-H2B i formen l'octàmer proteic al voltant del qual s'hi enrotlla el DNA [2].

Totes les histones del nucli del nucleosoma són riques en lisines i arginines, dos aminoàcids bàsics, i presenten per tant, una forta càrrega positiva. En canvi, el DNA està carregat negativament, degut als grups fosfat de l'esquelet del DNA format per sucres i fosfats. Per aquesta raó, les histones s'uneixen fortament amb el DNA ja que les seves càrregues positives poden neutralitzar eficientment la càrrega negativa de l'esquelet de DNA.

### A.1.1.2. La fibra de 30nm

L'empaquetament del DNA en nucleosomes permet escurçar la longitud de la fibra de DNA fins a 7 vegades. Per exemple, una molècula de DNA d'1 metre de llarg quedaria comprimida a una fibra de cromatina de 14 centímetres. Tot i això, aquesta fibra encara és massa llarga per encabir-la al nucli cel·lular. Per fer-ho possible, la cromatina es compacta encara més fins a donar lloc a una fibra més curta, anomenada fibra de 30 nm ja que té aproximadament 30 nm de diàmetre. Per a la formació d'aquesta fibra, és molt important la contribució d'una altra histona anomenada histona H1. La unió d'aquesta proteïna al nucleosoma permet l'empaquetament de 20pb addicionals de DNA, resultant en dues voltes completes del DNA al voltant de l'octàmer d'histones. L'estructura formada pel nucleosoma més la histona H1 i els 20pb addicionals de DNA és el que es coneix com a cromatosoma, mentre que el DNA entre dos nucleosomes adjacents rep el nom de DNA connector (Fig. 3) [4].

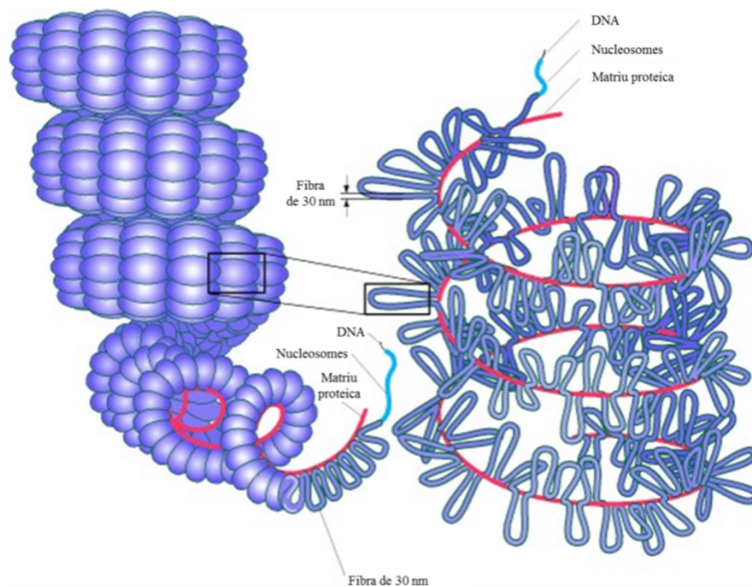


**Figura 3. Estructura del cromatosoma.** L'estructura formada per la unió de la histona H1 al nucleosoma és coneix amb el nom de cromatosoma. El DNA entre nucleosomes adjacents rep el nom de DNA connector. Imatge adaptada de [5].

La majoria dels resultats que han conduït a la hipòtesi de l'existència d'una fibra de 30nm al nucli cel·lular provenen d'assajos *in vitro*. Recentment, però, en estudis realitzats *in vivo*, s'ha observat que els nucleosomes es troben agrupats en dominis discrets al llarg de la fibra de cromatina intercalats amb regions on no hi ha nucleosomes i que el nombre de nucleosomes en cadascun d'aquests dominis és molt heterogeni. Aquests resultats posen seriosament en dubte l'existència d'una fibra de cromatina ben organitzada i ordenada al nucli cel·lular [6].

**A.1.1.3. Els cromosomes**

Per arribar a formar l'estructura final dels cromosomes de 700 nm de diàmetre, les fibres de 30nm s'uneixen mitjançant unes regions específiques de DNA, anomenades *Matrix Attachment Regions* (MAR) o *Scaffold Attachment Regions* (SAR), a una estructura central proteica helicoidal de la qual emanen formant bucles (Fig. 4). Sorprenentment, aquestes regions MAR o SAR presenten una baixa conservació de seqüència. Són típicament al voltant d'un 70% riques en A-T, però no presenten seqüències consens. En canvi, si que es troben sovint altres seqüències interessants en aquestes regions MARS. És habitual trobar seqüències que regulen la transcripció *en cis* i, normalment, també hi ha un lloc de reconeixement per a la topoisomerasa II. Per aquesta raó, es creu que les regions MAR duen a terme més d'una funció, proporcionant llocs d'unió a la matriu proteica i regions on tenen lloc els canvis topològics del DNA [7].



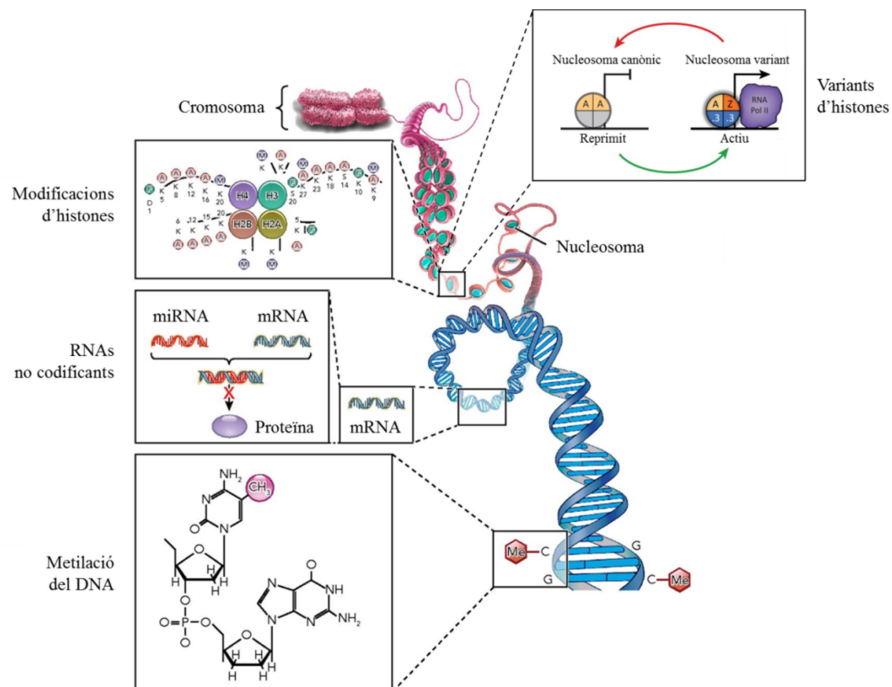
**Figura 4. Model de l'estructura cromosòmica.** A l'esquerra, es mostra un alt grau de superenrotllament de la cromatina, representant un cromosoma durant la divisió cel·lular. A la dreta, es mostra un superenrotllament més relaxat de la cromatina, representant un cromosoma quan la cèl·lula no s'està dividint. Imatge adaptada de [8].

En múltiples casos, els mateixos fragments de DNA que es troben units a la matriu proteica en interfase es poden trobar units també a la matriu de metafase [9]. Donat que els fragments MAR poden unir-se també a la matriu proteica mitòtica, sembla probable que el DNA només contingui un únic tipus de lloc d'unió comú per a ambdues estructures. En interfase, el lloc d'unió es trobaria connectat a la matriu proteica d'interfase, mentre que a cromosomes mitòtics estaria unit a la matriu metafàsica. Ambdues matrius estan formades per proteïnes diferents, tot i que hi ha components

comuns. Per exemple, l'enzim topoisomerasa II és un component que forma part d'ambdues [9]. Això suggereix que el control de la topologia és important en tots dos casos.

### A.1.2. La regulació epigenètica

Existeixen diversos mecanismes que permeten modificar l'estructura de la cromatina per regular l'expressió gènica en resposta a estímuls endògens i exògens. Aquesta dinàmica contínua entre un estat permissiu o repressiu de l'expressió és possible gràcies a diversos mecanismes epigenètics (Fig. 5). Entre aquests mecanismes trobem: la metilació del DNA, les modificacions post-traduccionals de les histones, els RNAs no codificants i les variants d'histones [10-12].



**Figura 5. Mecanismes epigenètics de regulació de l'expressió gènica.** Es mostren la metilació del DNA, la modificació post-traduccionals de les histones, els RNAs no codificants i les variants d'histones. Imatge adaptada de [3, 13].

#### A.1.2.1. La metilació del DNA

La metilació del DNA és un procés químic que afegeix un grup metil al DNA. Té lloc a les bases de citosina de tot el genoma però està particularment concentrada a les illes CpG, regions de DNA altament enriquides en seqüències formades per una base de citosina seguida directament per una de guanina [14]. La metilació del DNA és una forma potent de silenciar gens transcripcionalment [15]. La via enzimàtica que dóna lloc a la metilació del DNA és bastant coneguda actualment. Hi

participen múltiples proteïnes metiltransferases de DNA (DNMTs). Es sap, per exemple, que DNMT1 és la responsable de mantenir el patró de metilació del DNA, mentre que el complex DNMT3a/DNMT3b s'encarrega d'establir les metilacions *de novo* [16].

### **A.1.2.2. Les modificacions post-traduccionals de les histones**

Existeix un elevat nombre de tipus de modificacions covalents que es poden introduir a les cues N-terminal de les histones que emanen del nucli nucleosomal [17]. De la mateixa manera, també trobem un elevat nombre de proteïnes que duen a terme aquestes modificacions. Entre elles, per exemple, tenim acetiltransferases d'histones (HATs), metiltransferases d'histones (HMTs) i desacetilases d'histones (HDACs). Totes aquestes modificacions afecten l'estructura de la cromatina mitjançant interaccions electrostàtiques entre les histones carregades més o menys positivament en funció de les modificacions i el DNA carregat negativament. Això fa que les regions genòmiques siguin més o menys accessibles als factors de transcripció permetent regular l'expressió gènica.

A més a més, aquestes modificacions també funcionen com a plataformes de reclutament de proteïnes efectores a llocs concrets de la cromatina. Això és possible gràcies a l'existència de dominis en les proteïnes efectores que permeten la unió específica a modificacions concretes de les cues de les histones. Per exemple, els *bromodominis* permeten la unió a lisines acetilades, mentre que els *cromodominis* reconeixen lisines metilades [18].

Normalment, les modificacions de les histones no actuen per separat sinó que ho fan conjuntament amb la metilació del DNA. Per exemple, les proteïnes que s'uneixen a les histones modificades, o directament les que modifiquen les histones, poden reclutar metiltransferases de DNA per induir la metilació del DNA del gen a silenciar [19-21]. En conseqüència, les proteïnes d'unió a illes CpG metilades (MBPs) s'uneixen a les regions de DNA metilades i recluten HDACs que s'encarreguen de desacetilar les histones aigües avall de les illes CpG silenciant la transcripció d'aquella regió genòmica [16].

### **A.1.2.3. Els RNAs no codificants**

Els gens també es poden silenciar mitjançant RNAs en forma de trànscrips en sentit invers, RNAs no codificants o RNAs d'interferència. Normalment, aquests RNAs no codificants indueixen la formació d'heterocromatina o certes modificacions d'histones i metilació del DNA provocant el silenciament de la regió genòmica [22]. A més a més, també poden promoure el silenciament de l'expressió gènica induint la degradació de trànscrips a través del sistema de l'RNA d'interferència. Recentment, però, també s'ha descrit que alguns RNAs no codificants poden estar implicats en l'activació de l'expressió gènica. Concretament, s'ha observat que alguns *enhancers* es transcriuen donant lloc a RNAs no codificants (*enhancer* RNAs o eRNAs) i que els nivells d'expressió d'aquests eRNAs coincideixen amb els dels gens de la perifèria [23].

### A.1.2.4. Les variants d'histones

A diferència de les histones canòniques que tenen com a funcions principals l'empaquetament del genoma i la regulació gènica, les variants no canòniques participen en un ampli ventall de processos, com per exemple, la reparació del DNA, la recombinació meiótica, la segregació cromosòmica, la iniciació i finalització de la transcripció i la condensació dels cromosomes sexuals. Aquesta diversitat de funcions reflecteix, almenys en part, diferències estructurals respecte les histones canòniques que alteren els nucleosomes. Les modificacions en la composició de l'octàmer d'histones del nucli proteic del nucleosoma poden afectar la manera en que el DNA s'enrotlla al voltant de les histones i, per tant, alterar la dinàmica dels nucleosomes [24].

### A.1.3 Classificació de la cromatina

A principis del segle XX, utilitzant tints bàsics per tenyir la cromatina i observant-la al microscopi, *Emil Heitz* va observar que a la cromatina de les cèl·lules eucariotes es podia diferenciar clarament 2 formes: l'heterocromatina i l'eucromatina. L'heterocromatina es va descriure com a regions condensades del nucli que no es descondensen durant interfase, mentre que l'eucromatina es va descriure com aquelles regions que es descondensaven eficientment al sortir de mitosi. Es va postular que l'heterocromatina eren les regions del genoma funcionalment inactives mentre que l'eucromatina eren les regions on l'activitat gènica tenia lloc. Al entrar al segle XXI, però, els dominis de la cromatina es van definir més eficientment a nivell molecular. En general, l'eucromatina presenta una conformació oberta i accessible, és rica en gens activament transcrits i es replica d'hora a la fase S. En canvi, l'heterocromatina presenta una estructura més condensada de la cromatina, conté pocs gens activament expressats i es replica tard durant la fase S [25].

Existeixen dos tipus d'heterocromatina: l'heterocromatina constitutiva i la facultativa o induïble. Tot i que tots dos estats poden ser establement heretats durant nombroses divisions, cadascun dels dos tipus presenta una composició i funció diferent. L'heterocromatina constitutiva engloba principalment els elements genètics repetitius, com els telòmers i els centròmers, que es localitzen a la perifèria nuclear. En canvi, l'heterocromatina facultativa es pot formar a tot arreu del nucli i la seva formació és necessària per al silenciament gènic del *matig-type* a llevat o la inactivació del cromosoma X [26].

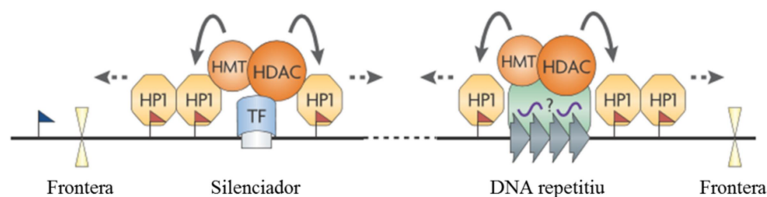
Tan l'heterocromatina constitutiva com la facultativa formen estructures de la cromatina repressives i estan associades a silenciament transcripcional. L'heterocromatina constitutiva es creu que actua principalment com un estabilitzador del genoma que prevé els entrecreuaments entre seqüències genètiques molt semblants i assegura una segregació cromosòmica eficient [27]. Indirectament, els gens adjacents a les seqüències repetitives de DNA es poden silenciar per l'expansió de l'heterocromatina silenciada a regions no repetitives que contenen gens. Aquest fenomen és conegut com a variegació per efecte de posició [28]. L'heterocromatina facultativa normalment es localitza als promotors i s'estableix de manera regulada al llarg del desenvolupament o en resposta a factors ambientals. Assegura el

silenciament epigenètic de gens a certs tipus cel·lulars o teixits, i és una mecanisme important per a la programació del desenvolupament i els destí cel·lular [27].

### A.1.3.1 Mecanismes de formació de l'heterocromatina

En general, a la cèl·lula eucariota s'han determinat dos mecanismes diferents a través dels quals es pot induir la formació de l'heterocromatina. Bàsicament, la generació d'aquesta estructura altament condensada de la cromatina pot ser promoguda per la unió de factors proteics específics al DNA o a través del sistema d'RNAs d'interferència (Fig. 6). Per exemple, mentre l'establiment de l'heterocromatina facultativa depèn generalment de la unió específica de determinats factors a seqüències de DNA concretes, la formació de l'heterocromatina constitutiva, en canvi, sovint es troba associada a la presència d'elements repetitius de DNA. En aquest darrer cas, la naturalesa repetitiva d'aquests elements i els RNAs d'interferència petits que se'n deriven de la seva transcripció, més que no pas la unió de cap proteïna a una seqüència primària específica de DNA, sembla ser l'inductor i diana de formació d'heterocromatina [29].

La inducció de la formació d'heterocromatina constitutiva mitjançant RNAs d'interferència es basa en la generació d'RNAs d'interferència petits (siRNAs) que s'uneixen a les seqüències genòmiques diana sobre les quals s'ha de construir l'heterocromatina, per induir-ne la formació. Per exemple, a *S. pombe*, s'ha observat que la transcripció d'elements repetitius per part de la RNA polimerasa II és essencial per desencadenar la producció d'siRNAs i la formació de l'heterocromatina. A més a més, també s'ha vist que els components de l'RNAi s'uneixen preferentment al llarg dels principals dominis heterocromàtics del genoma de *S. pombe* [29].



**Figura 6. Mecanismes d'inici de la formació de l'heterocromatina.** La formació de l'heterocromatina pot ser nucleada per factors que reconeixen seqüències específiques de DNA, com factors de transcripció (TF), o mitjançant la maquinària d'RNAi que actua sobre els elements de DNA repetitius. Ambdós mecanismes recluten enzims modificadors d'histones com metiltransferases d'histones (HMTs) i desacetilases d'histones (HDACs) per nuclear la formació d'heterocromatina a llocs específics. Les proteïnes heterocromàtiques com Swi6/HPI, que s'uneixen a cues modificades d'histones, permeten a l'heterocromatina estendre's cap a les seqüències adjacents. Els elements frontera impedeixen que l'heterocromatina s'estengui cap a regions eucromàtiques veïnes, que presenten un patró de modificacions d'histones diferent. Les banderes vermelles representen la histona H3 metilada a la lisina 9, i la blava la histona H3 metilada a la lisina 4. Imatge adaptada de [29].

D'altra banda, la formació d'heterocromatina també pot ser nucleada per proteïnes d'unió al DNA. Per exemple, a *S. pombe*, els factors de transcripció d'unió específica al DNA, Atf1 i Pcr1, cooperen amb Clr3, una HDAC, per nuclear la formació d'heterocromatina facultativa a la regió del



*matings type* [29-32]. En alguns casos, aquest mecanisme fins i tot pot funcionar en paral·lel amb la nucleació de l'heterocromatina constitutiva dirigida per RNAs d'interferència. En aquest sentit, als telòmers de *S. pombe* s'ha observat que ambdós mecanismes participen en la formació de l'heterocromatina. Concretament, s'ha vist que tan la proteïna d'unió a repeticions telomèriques Taz1 com la maquinaria d'RNAi contribueixen a la nucleació de l'heterocromatina en aquesta regió [29].

Les histones i les modificacions d'aquestes també tenen un paper determinant en la formació de l'heterocromatina. En aquest sentit, s'ha observat que la metilació de la lisina 9 de la histona H3 proporciona un lloc d'unió per al cromodomini d'HP1a, una proteïna estructural de l'heterocromatina que presenta homòlegs des de llevat (Swi6, Chp2, Chp1) fins a humans (HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  i HP1 $\gamma$ ), per reclutar-la als loci heterocromàtics [29]. Alhora, també s'ha vist que l'HP1a unida a la cromatina induïx el reclutament de la metiltransferasa d'histones Su(var)3-9, el principal productor d'H3K9me<sub>2/3</sub>. D'aquesta manera, Su(var)3-9 metila els residus de lisina 9 de les histones H3 dels nucleosomes adjacents i el procés d'elongació de la formació d'heterocromatina continua [29].

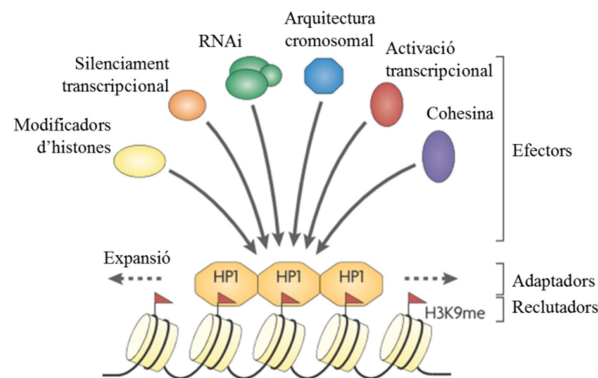
L'habilitat de l'heterocromatina d'expandir-se, però, ha d'estar limitada per evitar la invasió inapropiada cap a l'eucromatina del voltant. Per aquesta raó, les cèl·lules han desenvolupat múltiples mecanismes per limitar la propagació de l'heterocromatina. Un d'aquests mecanismes implica elements de DNA que actuen com a frontera. Aquests elements estan implicats en definir els límits entre l'heterocromatina i l'eucromatina adjacent. D'una banda, hi ha factors que es recluten a aquests elements frontera que es creu que actuen impossibilitant el muntatge dels nucleosomes, provocant la disrupció de les formacions contigües de nucleosomes, la qual cosa es creu que és necessària per a la extensió de l'heterocromatina. D'altra banda, en alguns casos, aquests elements recluten factors especialitzats per crear un ambient de cromatina activa que impedeix la propagació de l'heterocromatina [29].

### **A.1.3.2. Silenciament gènic associat a la formació d'heterocromatina**

L'heterocromatina funciona com una gran plataforma de reclutament de factors composta per lligands, com H3K9me, i adaptadors, com Swi6/HP1, que permeten reclutar proteïnes efectores que alhora regulen diversos processos cromosòmics (Fig. 7).

Habitualment, la formació de l'heterocromatina està associada amb la condensació de la cromatina i la reorganització dels dominis nuclears. Ambdós casos poden reduir l'accessibilitat de la maquinaria de transcripció als loci heterocromàtics. A *S. pombe*, s'ha vist que les molècules d'Swi6/HP1 adjacents unides a diferents nucleosomes poden dimeritzar a través del domini *chromshadow* provocant la condensació de la cromatina. Tot i això, d'acord amb evidències recents, Swi6/HP1 també funcionen com a plataforma de reclutament d'enzims modificadors de la cromatina que poden alhora impedir l'accessibilitat de la maquinaria transcripcional. Per exemple, ha estat suggerit que la proteïna Swi6 funciona com una plataforma de reclutament de la HDAC Clr3. La desacetilació mitjançant Clr3 manté l'heterocromatina estabilitzant H3K9me<sub>3</sub> i impedeix l'accés de la RNA polimerasa II [29, 30].

En eucariotes superiors, el silenciament heterocromàtic recau en complexes interaccions entre la metilació del DNA i la metilació d'histones. En aquest cas, la metilació del DNA i de les histones actuen en paral·lel reclutant activitats de silenciament gènic. Per exemple, a mamífers, s'ha observat que la metilació del DNA recluta proteïnes amb dominis d'unió a grups metil d'illes CpG (MBD) que, de forma anàloga a HP1, funcionen com a plataformes per reclutar enzims reorganitzadors de la cromatina [29].



**Figura 7. L'heterocromatina actua com un plataforma per al reclutament d'efectors al llarg d'extensos dominis.** Un mare de reclutadors amb la metilació de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me) o la metilació del DNA, i adaptadors com Swi6/HP1 (o altres proteïnes amb cromodomis capaces d'unir-se a H3K9me), recluten diversos efectors, com factors implicats en la segregació cromosòmica (cohesina), silenciament gènic (RNAi i desacetilases d'histones) i activadors transcripcionals. L'expansió d'H3K9me i Swi6/HP1 permet als factors que interaccionen amb aquests components de l'heterocromatina funcionar al llarg de d'extensos dominis cromosòmics. Imatge adaptada de [29].

D'altra banda, el silenciament de les seqüències heterocromàtiques en alguns sistemes també implica processaments post-transcripcionals dels transcrits derivats d'aquestes seqüències mitjançant mecanismes relacionats amb el mecanisme de l'RNAi. En aquest sentit, s'ha observat a *S. pombe* que la metilació de la lisina 9 de la histona H3 i les proteïnes d'heterocromatina permeten dirigir preferentment els complexos efectors del mecanisme de l'RNAi, com els complexos RITS i RDRC, als elements de DNA repetitius. Un cop a lloc, proporciona un mecanisme per a monitoritzar, detectar i eliminar transcrits inapropiats derivats d'elements repetitius. De forma similar, en eucariotes superiors s'ha observat que la pèrdua de *Dicer* a cèl·lules DT40 de pollastre o cèl·lules mare embrionàries de ratolí provoca una acumulació de transcrits de seqüències repetitives heterocromàtiques [29].

El reclutament de la maquinaria d'RNAi als elements repetitius de DNA permet silenciar aquests loci i alhora crea factories de producció d'siRNAs. Aquests siRNAs tenen un doble propòsit. D'una banda, reforcen el silenciament de l'heterocromatina i, de l'altra, són exportats al citoplasma on indueixen complexos similars a RISC per neutralitzar futures invasions de seqüències similars i degradar qualsevol transcrit que escapi del mecanisme RITS [29].

A banda d'induir el silenciament gènic, també cal destacar que existeixen diverses evidències que demostren que la formació de l'heterocromatina és necessària, en alguns casos, per a l'activació de determinats loci. Per exemple, a *D. melanogaster* existeixen dos gens essencials, *light* i *enrolled*, que estan dins l'heterocromatina i la seva expressió requereix HP1a i la proximitat de grans blocs

d'heterocromatina [33, 34]. A més a més, en cromosomes politènics també s'ha vist que HP1a es localitza als gens de *heat shock* activament transcrits [35]. D'altra banda, a mamífers, s'ha observat, per exemple, que ambdós H3K9me i HP1 $\gamma$  s'associen amb les regions codificants de gens actius [36].

### **A.1.4. La cromatina de *Drosophila melanogaster***

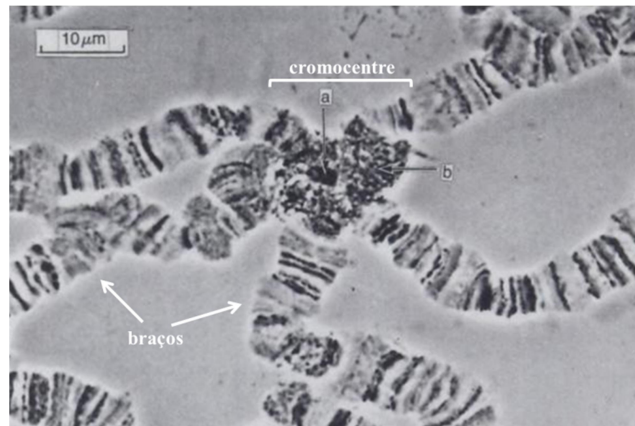
Més enllà de la típica classificació de la cromatina en eucromatina i heterocromatina, recentment gràcies a les tècniques modernes d'alta resolució i anàlisis profundes bioinformàtiques s'ha pogut anar més enllà i s'han dut a terme diversos estudis on ha estat possible caracteritzar diversos tipus de cromatina a *D. melanogaster* [37, 38]. El número de tipus o estats de la cromatina identificats varia segons l'astringència en la classificació dels autors, però en tots els casos s'arriba a la conclusió que es poden identificar diversos tipus de cromatina més enllà dels dos grups tradicionalment estudiats atenent a les combinacions de proteïnes i marques epigenètiques del genoma. Estudis recents fins i tot han posat de manifest que moltes d'aquestes propietats en la organització de la cromatina estarien conservades fins a humans [38].

#### **A.1.4.1. Classificació clàssica de la cromatina de *D. melanogaster***

Inicialment, la cromatina de *D. melanogaster* es classificava en dos grans grups atenent a l'aparença citològica del DNA dels cromosomes politènics. Llavors, es parlava d'eucromatina per fer referència al DNA amb una aparença més laxa dels braços dels cromosomes i d'heterocromatina per anomenar la regió centromèrica altament densa coneguda com a cromocentre a partir de la qual emanaven els braços dels cromosomes [39]. Mentre que l'eucromatina es considerava rica en gens i que es replicava d'hora a fase S, l'heterocromatina era vista com una regió pobre en gens que es replicava tard a fase S composta majoritàriament per elements de DNA repetitius com DNAs satèl·lit i transposons. Dins l'heterocromatina es diferenciaven dos tipus: l' $\alpha$ -heterocromatina i la  $\beta$ -heterocromatina (Fig. 8).

Basant-se en estudis citològics, en un primer moment es va pensar que el cromocentre consistia en una regió central d' $\alpha$ -heterocromatina composta per DNAs satèl·lit flanquejada per  $\beta$ -heterocromatina feta de seqüències mitjanament repetitives (transposons). Estudis posteriors, però, van demostrar que els elements mitjanament repetitius (transposons) estaven presents en blocs, dins els quals hi havia alguns gens únics, envoltats per blocs de DNAs satèl·lit [40, 41]. Aquests estudis van fer que la  $\beta$ -heterocromatina dels cromosomes politènics deixés de veure's com un continu de seqüències que es trobaven entre el DNA satèl·lit del cromocentre i l'eucromatina, i passés a tenir-se la imatge que representava un agregat de blocs compostos per elements mitjanament repetitius replicats a un nivell similar a l'eucromatina durant el procés de politenització. A partir d'aquí, el cromocentre dels cromosomes politènics va passar a veure's com una estructura formada per blocs de DNA satèl·lit poc replicats que s'associaven per formar l' $\alpha$ -heterocromatina, intercalats entre blocs de

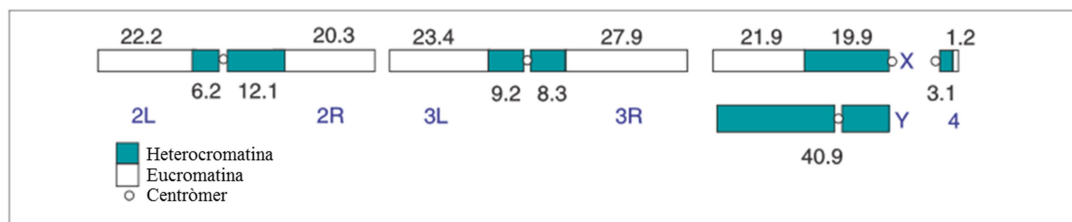
DNA mitjanament repetitiu totalment replicats que emanaven d'aquesta estructura central per formar la  $\beta$ -heterocromatina [40].



**Figura 8.** Imatge del cromocentre i els braços dels cromosomes politènics que emanen d'ell. La regió central més intensament tenyida correspon al cromocentre. A la imatge, la lletra *a* indica l' $\alpha$ -heterocromatina i la *b* la  $\beta$ -heterocromatina. Imatge adaptada de [42].

Més endavant també es va veure que els telòmers estaven formats principalment pels retrotransposons HeT-A , TART i seqüències similars, i que també es comportaven com a dominis heterocromàtics però que responien a modificadors genètics diferents [40].

L'heterocromatina constitutiva de *D. melanogaster* està concentrada en regions de megabases de grandària a les regions cèntriques i subtelo mèriques dels cromosomes (Fig. 9). Conté seqüències curtes repetides en tàndem (DNAs satèl·lit), elements mitjanament repetitius (elements transponibles), i algunes seqüències de còpia única [43] (Fig. 10). L'anàlisi del component no satèl·lit de l'heterocromatina de *Drosophila*, *Arabidopsis* i humana ha progressat molt en els últims temps. En canvi, l'anàlisi de les seqüències satèl·lit no ha progressat tant, tot i que alguns estudis recents han mostrat l'estructura i composició d'alguns dels satèl·lits centromèrics.

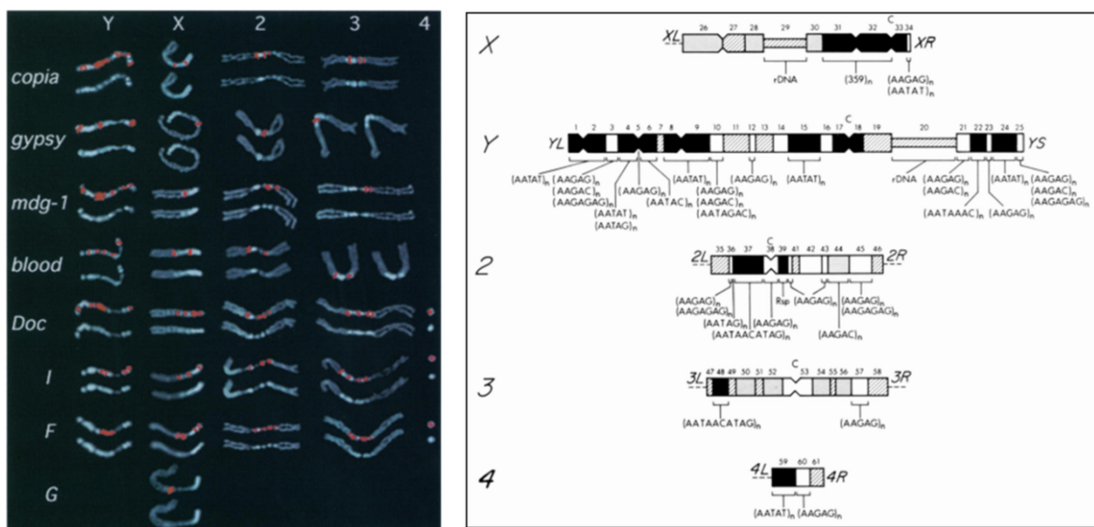


**Figura 9.** Estructura cromosòmica de *D. melanogaster*. A la imatge es mostren els braços esquerra i dret dels cromosomes 2 (2L, 2R), 3 (3L, 3R), els cromosomes sexuals X i Y, i el petit cromosoma 4. Els números representen la longitud en megabases. Les regions euromàtiques dels braços dels cromosomes estan representades de color blanc, mentre que les regions heterocromàtiques es troben en color blau. Les longituds de les regions heterocromàtiques són estimacions de mesures en cromosomes mitòtics. Imatge adaptada de [43].

L'heterocromatina representa aproximadament 59 megabases (Mb) de les 176 Mb del genoma de la femella de *D. melanogaster*. A més a més, les 41 Mb del cromosoma Y dels mascles són totalment heterocromàtiques. La localització de les seqüències repetitives dins l'heterocromatina

ha estat estudiada mitjançant la hibridació *in situ* de sondes derivades d'elements repetitius coneguts a cromosomes mitòtics. Això, conjuntament amb l'anàlisi molecular de minicromosomes, ha permès determinar l'organització i composició general de l'heterocromatina. Concretament, s'ha observat que està formada per blocs de satèl·lits de 20 quilobases (kb) a 1 Mb interrompudes per illes de 5-50 kb de seqüències complexes que contenen una alta densitat d'elements transponibles [43].

A *D. melanogaster*, la transició entre heterocromatina i eucromatina sembla ser gradual més que no pas abrupta. Per exemple, una característica de l'heterocromatina és una alta densitat de transposons, però la densitat d'aquests elements a la seqüència genòmica incrementa gradualment com més a prop de l'extrem cèntric de la fracció eucromàtica dels braços dels cromosomes. Aquesta tendència continua a l'heterocromatina cèntrica, que conté grans blocs de tipus específics de seqüències mitjanament repetitives [43].



**Figura 10.** Localització dels elements transponibles i les principals posicions dels satèl·lits a l'heterocromatina de *D. melanogaster*. A l'esquerra, es mostra la distribució dels elements transponibles indicats, detectats mitjançant FISH, en un cariotip amb els cromosomes de neuroblastos de cervells de larves. Els senyals de FISH estan marcats de color vermell i el DAPI en blau. Imatge adaptada de [44]. A la dreta, es mostra les principals localitzacions dels satèl·lits, definida mitjançant tincions i bandatges cromosòmics, a l'heterocromatina de cada cromosoma. Només es mostren les regions que contenen una quantitat de satèl·lits superior a 300kb. Imatge adaptada de [45].

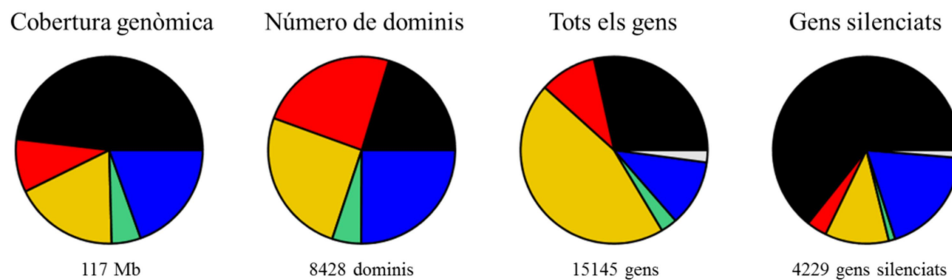
### A.1.4.2. Classificació moderna de la cromatina de *D. melanogaster*

Recentment, però, tant la classificació citològica de la cromatina en eucromatina,  $\alpha$ -heterocromatina i  $\beta$ -heterocromatina, com la classificació funcional de la cromatina en eucromatina i heterocromatina constitutiva i facultativa han quedat en un segon pla. En el seu lloc, mitjançant el mapatge dels llocs d'unió al DNA de 53 proteïnes de la cromatina utilitzant la tecnologia del DamID i la posterior anàlisi dels patrons combinatorials que presenten aquestes proteïnes a la cromatina, s'ha suggerit una classificació de la cromatina en 5 tipus diferents [37] (Taula 1).

Tipus de cromatina	Principals proteïnes	Classificació tradicional
Vermella	RPD3, SIR2, SIN3A, DF31, ASH2, MAX, BRM, Su(var)2-10, MED31, CAF1, ECR, GAF, JRA	Euromatina
Groga	RPD3, SIR2, SIN3A, DF31, ASH2, MAX, MRG15	Euromatina
Verda	Su(var)3-9, HP1, LHR, HP6, RPD3	Heterocromatina
Blava	PC, E(Z), PCL, SCE, RPD3, EFF	Heterocromatina
Negra	Histona dH1, D1, IAL, SUUR, SU(HW), LAM, EFF	Heterocromatina

**Taula 1. Composició de cadascun dels 5 tipus de cromatina en que s’ha suggerit que es podria classificar la cromatina de *D. melanogaster* segons [37].** Es mostra una taula on es pot observar les proteïnes que s’han identificat enriquides en cadascun dels 5 tipus de cromatina. A la última columna, es mostra el tipus de cromatina segons la classificació més tradicional a que correspondrien cadascun dels 5 tipus de cromatina suggerits.

Per anomenar a cadascuna d’aquestes combinacions de proteïnes s’ha fet servir el nom d’un color. D’aquesta manera, han estat identificats dos tipus de cromatina, la vermella i la groga, que correspondrien a la classificació tradicional d’euromatina, i tres tipus, la verda, la blava i la negra, que correspondrien a l’heterocromatina clàssica (Fig. 11). Sorprenentment, l’anomenada cromatina negra cobriria un 50% del genoma aproximadament. En canvi, la cromatina vermella i groga, tradicionalment euromatina, representaria només el 25% del genoma, mentre que el 25% restant correspondria a la cromatina verda i blava, antigament heterocromatina. A nivell gènic, vora el 60% dels gens es troben en un ambient de cromatina vermella o groga corresponent a euromatina, mentre que el 40% restant formarien part de la cromatina heterocromàtica representada pels tipus de cromatina verd, blau i negre. En canvi, a nivell de gens silenciats, s’observa que vora un 80% dels gens que no s’expressen es troben en algun dels tres tipus de cromatina verda, blava o negra, reflexant la naturalesa repressiva d’aquests tipus de cromatina [37].



**Figura 11. Característiques dels cinc tipus de cromatina.** Es mostra la cobertura genòmica, les regions genòmiques identificades per cadascun dels tipus de cromatina (dominis), el contingut gènic i el de gens silenciats de cadascun dels tipus de cromatina. Les regions grises corresponen a aquells gens que els seus promotors mapen en llocs de transició entre dos tipus diferents de cromatina. Imatge adaptada de [37].

Pel que fa al patró temporal de replicació, el DNA de la cromatina vermella i groga es replica generalment d’hora a fase S, com es d’esperar per a l’euromatina. Tot i això, la cromatina vermella tendeix a ser replicada encara abans que la cromatina groga. En canvi, les cromatines verda, blava i negra es repliquen més tard a fase S com és d’esperar donada la seva naturalesa heterocromàtica, sent la cromatina negra la última a replicar [37] (Fig. 12).

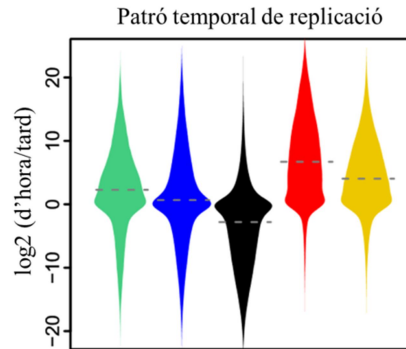


Figura 12. Patró temporal de replicació de cada tipus de cromatina. El gràfic mostra la tendència temporal a replicar-se que presenten cadascun dels diferents tipus de cromatina identificats. Imatge adaptada de [37].

Alternativament, en un context més epigenètic, la cromatina de *D. melanogaster* també ha estat categoritzada en base a 18 modificacions d'histones en 9 nivells d'organització o 'estats' [46] (Figura 13). Aquesta regionalització de la cromatina ha estat possible en part gràcies al projecte modENCODE (*model organism Encyclopedia of DNA*) que ha permès el mapatge de múltiples components de la cromatina al genoma de *D. melanogaster*. En aquest model, s'associa cada localització genòmica amb un estat en particular, generant un anotació del genoma basada en la cromatina.

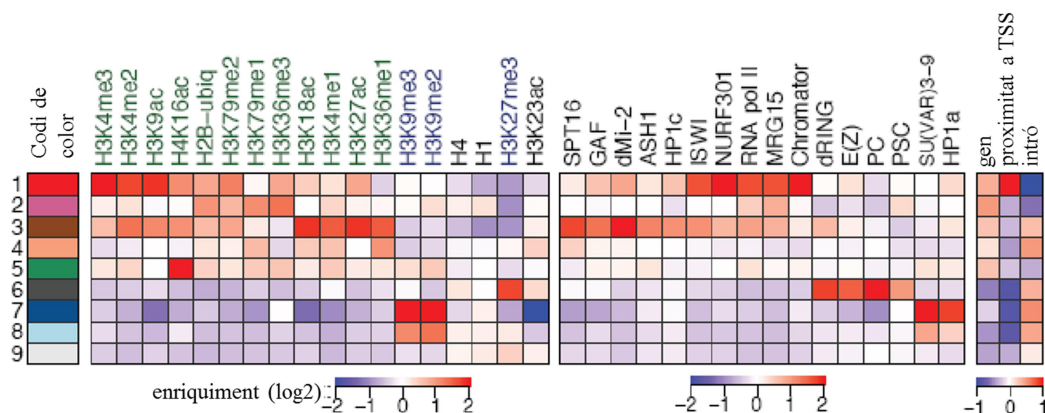


Figura 13. Classificació de la cromatina de *D. melanogaster* en 9 estats. Cada estat (línies) es caracteritza per presentar un patró d'enriquiment (vermell) i depleció (blau) de diferents marques específiques de la cromatina (columnes). Imatge adaptada de [46].

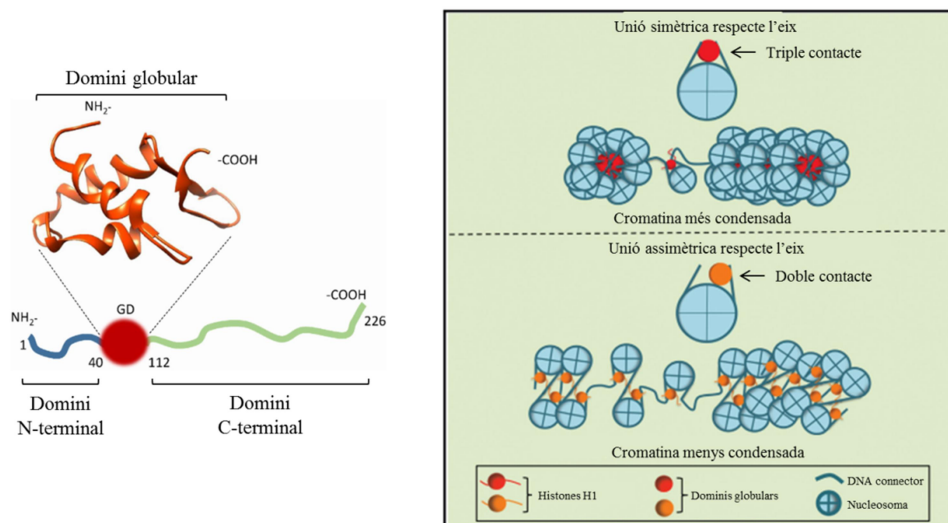
## A.2. La histona H1

### A.2.1 Estructura de la histona H1

La histona H1 presenta una estructura típicament tripartida (Fig. 14). Conté un domini central globular d'estructura definida flanquejat per dominis d'estructura no definida C-terminal i N-terminal. A diferència de les histones del nucli nucleosomal, aquest domini estructurat central no presenta el típic

domini *histone fold*. Enlloc d'això, presenta un motiu *winged-helix* consistent en tres hèlixs  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  i  $\alpha 3$ ), tres bucles (L1, L2 i L3) i dues fulles  $\beta$  petites (B1 i B2) [47].

Els primers experiments utilitzant nucleasa micrococcal per digerir cromatina nativa van revelar que la presència de la histona H1 estenia el patró de protecció del DNA de 147pb a uns 166pb, suggerint que la histona H1 interacciona amb 10pb de cada cadena de DNA entrant i sortint del nucleosoma respectivament. Més endavant, en estudis més recents realitzats amb la histona H1.5 humana es va observar que el domini globular de la histona H1 s'uneix al solc menor del DNA situat al centre del nucleosoma contactant amb una regió de DNA de 10pb localitzada simètricament respecte l'eix nucleosomal. A més a més, també mostra que el domini globular interacciona directa i simultàniament amb ambdues hèlixs de DNA entrant i sortint del nucleosoma [47].



**Figura 14. Estructura de la histona H1 i la seva interacció amb el nucleosoma.** A l'esquerra, es mostra l'estructura típicament tripartida de la histona H1. El domini globular es troba flanquejat per un domini N-terminal curt i un llarg domini C-terminal. La imatge de l'estructura correspon a la histona H1.5, i el domini globular de la imatge a la histona H1 de pollastre. Imatge adaptada de [4]. Els números indiquen les posicions dels residus d'aminoàcids. A la dreta, es mostra una representació de l'efecte que pot tenir el mode en que s'uneix la histona H1 al nucleosoma en la formació d'estructures d'ordre superior de la cromatina. Imatge adaptada de [48].

Recentment, però, utilitzant ressonància magnètica nuclear, també s'ha analitzat la unió de la histona H1 de *Drosophila* al nucleosoma [49]. Aquests resultats indiquen que el domini globular s'uneix lleugerament asimètricament respecte l'eix i que existeix un segon contacte amb el DNA que s'estableix preferentment només amb una de les cadenes de DNA entrant o sortint. Malgrat això, un segon contacte més feble es pot establir dinàmicament amb la segona cadena de DNA connector. Finalment, fa molt poc, s'ha pogut determinar l'estructura cristal·lina del cromatosoma contenint el domini globular de la histona H5 de pollastre, membre de la família H1 [48]. Aquest estudi ha mostrat que la manera en que el domini globular d'H5 s'uneix a l'eix es diferent del determinat per a la histona H1 de *Drosophila*. En aquest sistema, el domini globular de la histona H5 estableix contactes estables amb totes dues cadenes de DNA connector i s'uneix asimètricament al DNA de l'eix nucleosomal formant una configuració de tres contactes. En aquest últim treball, fins i tot es demostra que diferents histones H1 es poden unir al nucleosoma de diferents formes, donant lloc a diferents estructures d'ordre superior de la cromatina



(Figura 14). En base a això, proposen que els diferents subtipus d'histona H1 deuen utilitzar formes diferents d'unió per regular les estructures d'ordre superior i les funcions de la cromatina [48].

El domini N-terminal es considera sense estructura definida donat que l'estructura cristal·logràfica no s'ha pogut determinar encara. Aquest domini es pot dividir en dues subregions basant-se en la seqüència. La seqüència de l'extrem és rica en aminoàcids hidrofòbics, mentre que a prop del domini globular trobem una regió enriquida en aminoàcids bàsics. Aquesta regió bàsica ha estat lligada al posicionament del domini globular i adopta una estructura d'hèlix  $\alpha$  en presència de DNA, mentre que la regió hidrofòbica resta no caracteritzada. Tot i que el domini N-terminal de la histona H1 de timus boví s'ha mostrat que no és essencial per a la formació d'estructures d'ordre superior de cromatina, la deleció del domini N-terminal de les isoformes de la histona H1 redueix l'afinitat d'unió a cromatina *in vitro* [50-52]. A més a més, també s'ha observat que l'intercanvi dels dominis N-terminal entre H1<sup>o</sup> i H1c provoca un intercanvi de les afinitats d'unió a la cromatina [53]. Aquests experiments suggereixen que el domini N-terminal de la histona H1 juga un paper important en l'afinitat d'unió als nucleosomes. Tot i així, encara es necessiten més estudis per caracteritzar la funcionalitat d'aquest domini [47].

Pel que fa al domini C-terminal, tampoc no s'ha resolt l'estructura cristal·logràfica i s'assumeix que es tracta d'un domini intrínsecament desordenat en solució. Hi ha dades *in vitro* que assumeixen que al unir-se al DNA a concentracions fisiològiques de sal aquest domini adopta una conformació dominada per components estructurals secundaris com hèlixs  $\alpha$ , fulles  $\beta$ , bucles i girs [54-59]. La interacció del domini C-terminal amb el DNA connector s'ha demostrat que s'estén més enllà dels 20pb inicials a l'entrada i sortida del nucleosoma [47].

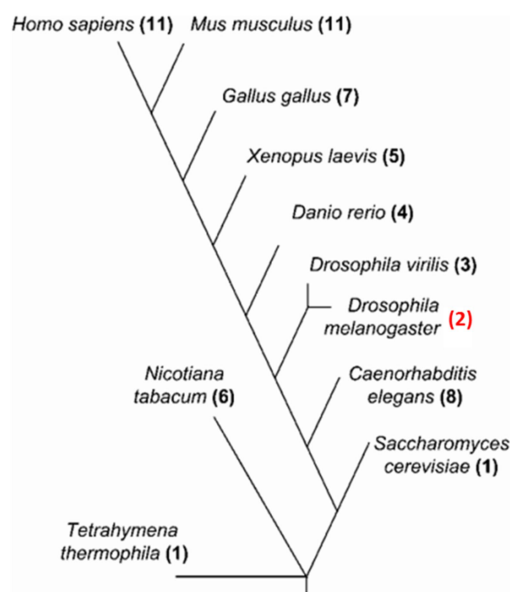
El domini carboxi-terminal representa més del 50% de la seqüència de la histona H1. Està compost en un ~40% de residus de lisina, ~25-30% d'alanina i ~15% de residus de prolina. Els estudis mutacionals duts a terme amb la regió C-terminal suggereixen l'existència de dues regions funcionals d'unió al DNA d'uns 24 aminoàcids de llargada que faciliten la condensació de la cromatina [55-61]. D'altra banda, es creu que la regió restant del domini C-terminal d'uns 50 aminoàcids està involucrada en interaccions proteïna-proteïna. Una prova d'aquesta possibilitat la trobem en el fet que recentment s'ha demostrat que les metiltransferases de DNA DNMT1 i DNMT3B s'uneixen al domini C-terminal de la histona H1 de ratolí [47].

La càrrega positiva neta del domini C-terminal degut a l'alt contingut en lisina permet la regulació de les estructures de la cromatina d'ordre superior mitjançant la neutralització de la càrrega de la cadena de DNA. Això faria que la unió de baixa afinitat doni lloc a la formació d'una estructura secundària al domini C-terminal que permetria unió d'alta afinitat [47].

A més del domini globular, l'estructura secundària del domini C-terminal permet la formació i estabilització del DNA connector en estructures de la cromatina d'ordre superior. La llargada, la càrrega i el número de modificacions post-traduccionals de les cues C-terminal varien entre les isoformes de la histona H1 suggerint que les variants individuals de H1 deuen jugar papers diferents en la regulació de l'estructura d'ordre superior de la cromatina [47].

### A.2.2 La família gènica de la histona H1

La família gènica de la histona H1 als organismes inferiors es troba menys conservada evolutivament que les histones del nucli nucleosomal. Per exemple, a *Saccharomyces cerevisiae*, l'homologia de seqüència entre Hho1, l'homòleg de la histona H1 a *S. cerevisiae*, i la histona H1 d'*Homo sapiens* és idèntica en un 31% i un 44% similar, mentre que la histona H4 entre les mateixes espècies és un 92% idèntica i un 96% similar. En canvi, en organismes d'ordre superior com al pollastre (*Gallus gallus*), la histona de la família H1 dels eritròcits, la histona H5, mostra una elevada homologia de seqüència (66%) amb la histona H1.0 humana, amb la major divergència de seqüència trobada al domini C-terminal [62].



**Figura 15.** Número de variants d'histona H1 en diverses espècies. Es mostren les espècies en un arbre evolutiu. El nombre de variants d'histona H1 s'indica entre parèntesi (en vermell, *D. melanogaster*). Imatge adaptada de [62].

A més de la variabilitat en la seqüència, les proteïnes d'histona H1 també presenten un ampli ventall d'estructures. Per exemple, Hho1p de *S. cerevisiae* conté dos dominis globulars, mentre que a *Tetrahymena* l'H1 està mancada de domini globular. Els eucariotes també difereixen en el nombre de variants d'histona H1 (Fig. 15). Mentre que *H. sapiens* i *Mus musculus* ambdós tenen 11 variants diferents, *C. elegans* en conté 8 i *X. laevis* 5. La família de la histona H1 d'*H. sapiens* presenta 7 variants somàtiques (H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5, H1.0 i H1.X), tres variants específiques de testicles (H1t, H1T2 i H1LS1) i una específica d'oòcits (H1oo) [63].

Totes les variants són codificades per gens de còpia única. En funció del patró d'expressió, els gens que codifiquen per les variants d'histona H1 es poden classificar en: gens dependents de replicació i independents de replicació (Taula 2) [62]. Els gens d'histona H1 independents de replicació, com la histona H1.0, exhibeixen un fenotip de reemplaçament. Els gens que codifiquen per aquestes variants es troben aïllats genòmicament de la resta de gens de les histones i presenten una transcripció basada en

l'estatus cel·lular. Mentre les variants independents de replicació han estat observades al llarg de tot el cicle cel·lular, la majoria d'histona H1 es produïda durant la fase S del cicle cel·lular. En canvi, les variants dependents de replicació es troben junt a molts dels gens de les histones del nucli nucleosomal en un gran clúster, anomenat HIST1, que es troba a la regió 6p21-6p22 del cromosoma 6 [65]. Els gens d'aquestes variants presenten una expressió coordinada amb la replicació del DNA i els nivells d'expressió de les histones del nucli nucleosomal, tot i que s'ha observat que variants d'H1 específiques presenten fluctuacions en l'expressió al llarg de fase S. L'mRNA de les variants dependents de replicació no presenten cua poli(A) ni introns. Alternativament, els gens de les histones H1 somàtiques presenten una seqüència *stem-loop* a 3' que permet una ràpida traducció durant la replicació del DNA, alhora que permet una regulació acurada de l'expressió gènica un cop finalitzada la fase S [62].

Proteïna H1 (i sinònims)	Gen H1 (i sinònims)	Locus (cromosoma)	Llargada (aminoàcids)	Expressió (cèl·lula, teixit)
<b>Histones H1 dependents de replicació</b>				
H1.1 (H1a)	HIST1HA (H1F1)	6p21.3-22	214	Ubiqua
H1.2 (H1c)	HIST1HC (H1F2)	6p21.3-22	212	Ubiqua
H1.3 (H1d)	HIST1HD (H1F3)	6p21.3-22	220	Ubiqua
H1.4 (H1e)	HIST1HE (H1F4)	6p21.3-22	218	Ubiqua
H1.5 (H1b)	HIST1HB (H1F5)	6p21.3-22	225	Ubiqua
<b>Histones H1 independents de replicació</b>				
H1t	HIST1H1T (H1FT)	6p21.3-22	206	Espermatòcits
H1T2	H1FNT (HANP1)	12q13.11	233	Espermàtides
H1oo (H1foo)	H1FOO	3q21.3	345	Oòcits
HILS1 (Hils1)	HILS1	17q21.33	230	Espermàtides
H1x (H1X, H1.X)	H1FX	3q21.3	212	Ubiqua
H1.0 (H1°)	H1FV (H1F0)	22q13.1	193	Cèl·lules diferenciades

**Taula 2. Variants d'histona H1 humanes.** Es mostra les diferents variants humanes d'histona H1. Per cada variant, s'indica el nom de la proteïna i del gen, el locus genòmic, la llargada de la proteïna i el patró d'expressió. Taula adaptada de [64].

### A.2.3. La histona H1 de *D. melanogaster*

A diferència de la resta d'eucariotes superiors, *D. melanogaster* conté una única variant somàtica d'histona H1. El locus amb els gens que codifiquen per les histones somàtiques es troba al cromosoma II. Aquest locus està format per unitats repetitives que contenen una còpia de cadascun dels gens que codifiquen per les histones somàtiques repetides al voltant de 100 vegades (Fig. 16). El gen de la histona H1 es troba en aquestes unitats repetitives entre els gens d'H2B i H3. La disposició i organització genòmica d'aquest locus està conservat a totes les espècies de *Drosophila*. Cada repetició conté totes les seqüències reguladores per permetre l'expressió de cadascun dels gens de les histones. Recentment, s'ha vist que únicament 12 repeticions són suficients per a uns nivells normals d'expressió de les histones suggerint que no totes les còpies són funcionals [66-68].

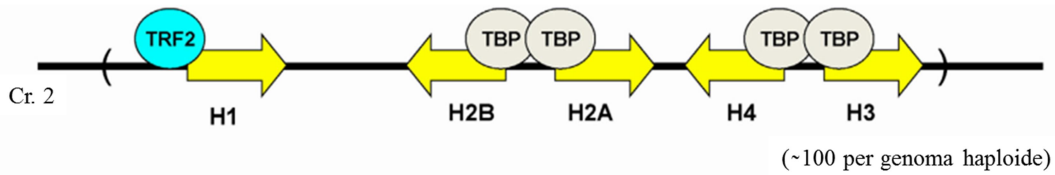


Figura 16. Organització genòmica dels gens de les histones canòniques de *D. melanogaster* al cromosoma 2. Es mostra els gens de les histones canòniques i l'ús de TBP o TRF2. Imatge adaptada de [68].

Malgrat el gen de la histona H1 es troba dins aquestes unitats repetitives, la regulació de l'expressió de la histona H1 és independent de les histones del nucli nucleosomal. En aquest sentit, mentre els gens de les histones del nucli nucleosomal de *Drosophila* requereixen el factor TBP (TATA-binding protein) per a la seva expressió, els gens de la histona H1 no contenen caixa TATA al promotor i requereixen el factor TRF2 (TBP-related factor 2) [69]. A més a més, mentre als gens de les histones del nucli nucleosomal s'hi acumula RNA pol II i TBP a fase S, TRF2 es detecta als gens de la histona H1 al llarg de tot el cicle cel·lular suggerint que la histona H1 es deu expressar i regular de manera diferent [69]. En aquest sentit, el gen de la histona H1 es transcriu al llarg de tota la fase S mentre que els gens de les histones del nucli nucleosomal només es transcriuen durant un curt però intens pols a l'inici de fase S. Una altra diferència important la trobem en la vida mitjana dels mRNAs. La vida mitjana dels transcrits de la histona H1 és molt més curta que la dels transcrits de les histones del nucli nucleosomal. Això fa pensar que, tot i que l'expressió de la histona H1 i de les histones del nucli nucleosomal ha d'estar coordinada fins a cert punt, probablement existeixin mecanismes de regulació de l'expressió específics de desenvolupament o de tipus cel·lular independents en cada cas [68].

D'altra banda, l'expressió de les histones ha d'estar altament regulada donat que un excés d'histones provoca problemes citotòxics a través de múltiples mecanismes com s'ha vist a llevat. En aquest sentit, un estudi recent ha mostrat que la sobreexpressió de la proteïna de fusió H1-GFP a mosques mitjançant el sistema UAS/GAL4 és limitada. A més a més, és compensada per una davallada de l'expressió de la H1 endògena de manera que es mantinguin uns nivells normals d'histona H1 total. Tot això fa pensar que els nivells de proteïna H1 estan altament regulats [68].

El sistema de *D. melanogaster* demostra que una única isoforma d'histona H1 somàtica és suficient per permetre el desenvolupament complex dels metazous i que la histona H1 és essencial donat que inclús una depleció parcial a nivell de tot l'organisme provoca una alta letalitat [70, 71]. Des d'un punt de vista evolutiu, *D. melanogaster* és un sistema únic entre els metazous. Sembla una situació simplificada donat que mentre eucariotes unicel·lulars com *S. cerevisiae* i *T. thermophila* contenen una única isoforma d'histona H1, els metazous habitualment presenten diverses isoformes d'H1. Per exemple, *C. elegans* en conté 8, *X. laevis* 5, *D. rerio* 4 i, a plantes, *N. Tabacum* en té 6. Donat que *D. melanogaster* si que presenta variants de les histones del nucli nucleosomal de manera similar a tots els eucariotes, semblaria que en el cas de la histona H1 s'ha donat una reducció del número de variants al llarg de l'evolució en aquest organisme [68].

## A.2.4. Funcions de la histona H1

### A.2.4.1. Contribució a la formació d'estructures d'ordre superior

Les histones H1 estan implicades tant en l'estructura del nucleosoma com en la formació d'estructures de la cromatina d'ordre superior. Inicialment, la fibra de 30nm va ser descrita com una estructura solenoide generada pel plegament d'una cadena de nucleosomes en presència de la histona H1. Aquesta fibra solenoide també es va detectar a elevada força iònica en absència de la histona H1, tot i que no era tan condensada i no tan regularment orientada com en presència de la histona H1. Des de llavors, diversos estudis sobre l'estructura de la fibra de 30nm s'han dut a terme, i els models derivats d'aquestes investigacions encara generen controvèrsia. Dos tipus principals d'organització de la cadena de nucleosomes han estat descrits (Fig. 17). D'una banda, la fibra solenoide pot ser descrita com una hèlix d'inici únic en la qual nucleosomes consecutius segueixen un a l'altre, i el *linker DNA* entre els nucleosomes es troba orientat cap al centre de la fibra solenoïdal. D'altra banda, la principal característica del segon model és la distribució dels nucleosomes en zig-zag. Això resulta en una estructura de doble hèlix de dos inicis. El model del zig-zag deriva de l'estructura mitjançant rajos X d'un tetranucleosoma muntat *in vitro* en solucions contenenent cations divalents a concentracions com les necessitades per obtenir cromatina compactada. A més de l'organització dels nucleosomes en zig-zag, aquest model també situa la cua de la histona H4 i el dímer H2A-H2B a prop l'un de l'altre la qual cosa facilitaria la interacció del nucli nucleosomal en compactar la fibra de cromatina en estructures d'ordre superior. En canvi, el model d'inici únic va ser presentat en base a un estudi mitjançant microscòpia electrònica d'una col·lecció de nucleosomes amb diferents longitud de repetició [64].

D'altra banda, analitzant en piles de nucleosomes els entrecreuaments entre les histones del nucli nucleosomal H4 i H2A en nucleosomes veïns, es va observar que aquestes dades donaven suport al model d'inici doble i es va concloure a partir dels patrons d'entrecreuament que ni les diferències en la longitud de repetició ni la presència o absència de la histona H1 influenciaven el desenvolupament de dues piles de nucleosomes en suport del model de doble inici. La controvèrsia entre els dos models probablement pugui ser resolta considerant diferents nivells de compactació de la cromatina, com una estructura molt compactada que només es forma en presència de la histona H1 versus una estructura menys condensada que també deu ocórrer en absència de la histona H1 [64].

En resum, ha de ser considerat que la majoria de les dades sobre la fibra de 30 nm estan basades en estudis *in vitro*, i podria ser que *in vivo* els diferents tipus d'organització puguin ser aplicables a petites regions de cromatina funcionalment definides i podrien estar subjectes a transicions dinàmiques [64]. De fet, recentment, s'ha descrit que *in vivo* els nucleosomes es troben agrupats en dominis discrets al llarg de la fibra de cromatina intercalats amb regions on no hi ha nucleosomes dins el nucli cel·lular i que el nombre de nucleosomes en cadascun d'aquests dominis és molt heterogeni. Aquests resultats posen seriosament en dubte l'existència d'una fibra de cromatina ben organitzada i ordenada al nucli cel·lular [6].

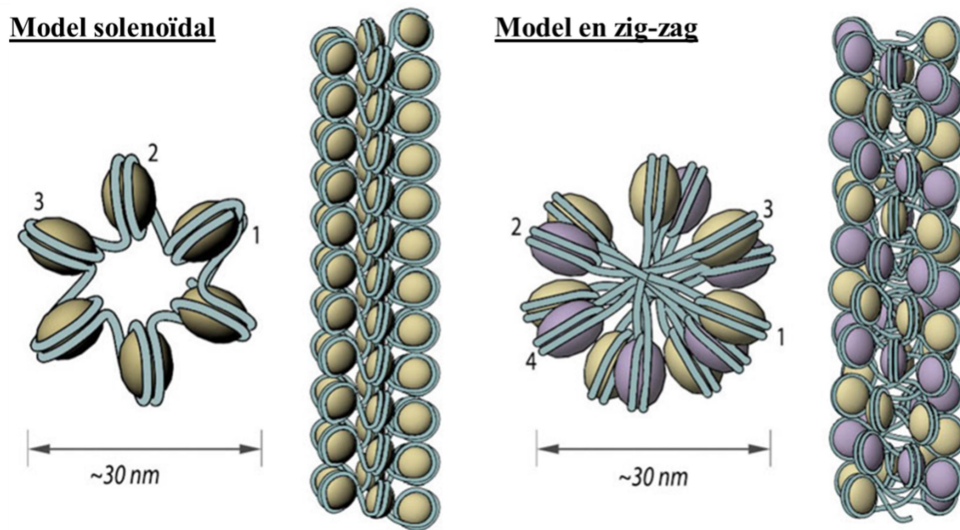


Figura 17. Models de condensació de la cromatina en la fibra de 30 nm. Es mostra dues possibles estructures de la fibra de 30 nm, una basada en un model solenoïdal i l'altra en una estructura en zig-zag dels nucleosomes. Imatge adaptada de [5].

#### A.2.4.1. Altres funcions de la histona H1

La histona H1 ha estat relacionada amb diverses funcions cel·lulars. Concretament, s'ha observat que aquesta histona està implicada en processos com la formació de l'heterocromatina, l'expressió gènica, l'embriogènesi primerenca, la reparació del DNA i l'estabilitat genòmica [72] (Fig. 18).

A *D. melanogaster*, s'ha demostrat que aquesta proteïna és essencial per al desenvolupament de l'organisme i presenta un paper fonamental en la formació de l'heterocromatina. En aquest sentit, s'ha observat que quan els nivells de proteïna de la variant somàtica d'histona H1 es redueixen a un ~20% del contingut normal mitjançant RNAi, les larves deplecionades d'histona H1 no es desenvolupen a mosques adultes i moren [70].

Conjuntament, en aquestes condicions s'observen marcats efectes en l'estructura i funció de l'heterocromatina. En aquest sentit, s'aprecia que la variant somàtica de la histona H1 és un fort supressor de la variegació i és essencial per a l'organització de les regions pericentromèriques en cromosomes politènics [70]. S'anomenen supressors de la variegació aquelles proteïnes que en eliminar-les desapareix el patró de variegació. La formació d'aquest fenotip es basa en la pròpia variabilitat que existeix en les cèl·lules per determinar el límit de l'heterocromatina. Quan un gen reporter es troba adjacent a una regió heterocromàtica, aquest resulta silenciada o no aleatòriament en cada cèl·lula en funció del punt en que cada cèl·lula estableix el límit de l'heterocromatina. D'aquesta manera, si en eliminar la proteïna es perd la capacitat de generar l'heterocromatina, aquest patró és perd i es parla llavors de supressors de la variegació. Per aquesta raó, donat que en eliminar la variant somàtica de la histona H1 es perd aquest fenotip de variegació [70], es diu que la histona H1 actua com un supressor de la variegació. Això demostra que la variant somàtica de la histona H1 és essencial per al correcte establiment de l'heterocromatina a *D. melanogaster*. En relació amb això, a

més a més també s'observa que mentre els cromosomes politènics de glàndules salivals normals presenten un patró de bandes i interbandes amb una tinció prominent del cromocentre per la proteïna d'heterocromatina 1a (HP1a) i la marca repressiva H3K9me2/3, la depleció de la histona H1 resulta en una estructura cromosòmica massivament alterada i la pèrdua del bandatge cromosòmic. A més a més, la tinció d'H3K9me2 resulta indetectable i enlloc d'un únic cromocentre es poden observar diversos *foci* d'HP1a [70].

En la mateixa línia, recentment també s'ha descrit que la pèrdua d'aquesta variant somàtica d'histona H1 provoca majoritàriament la derepressió d'un 5-10% aproximadament dels gens. Sorprenentment, però, vora el 90% d'aquests gens corresponen a elements heterocromàtics (Fig. 19) [71, 74].

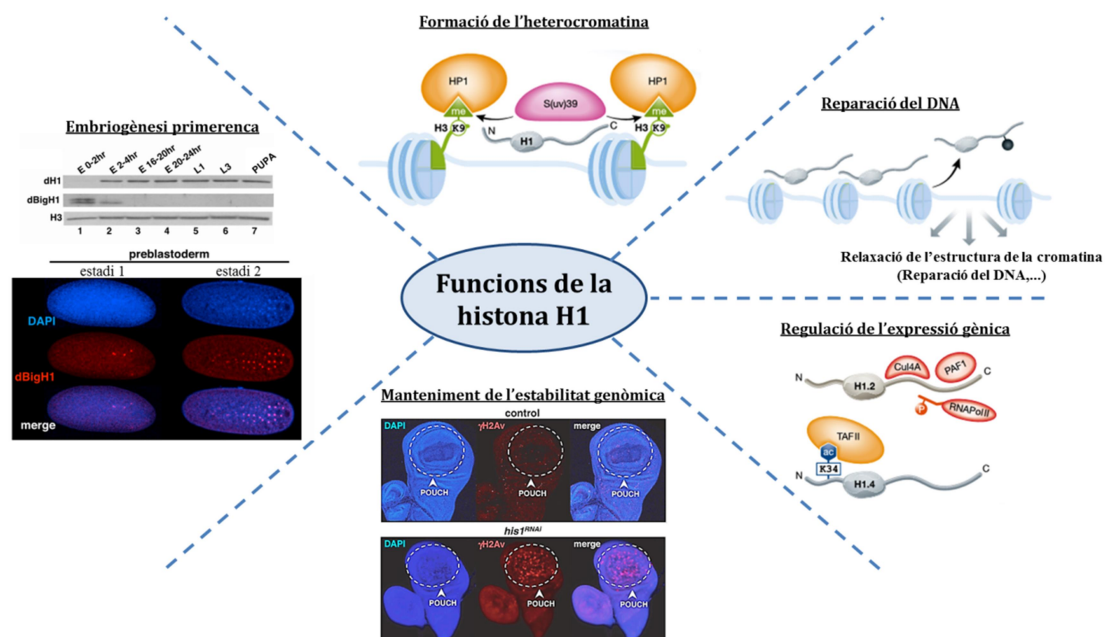
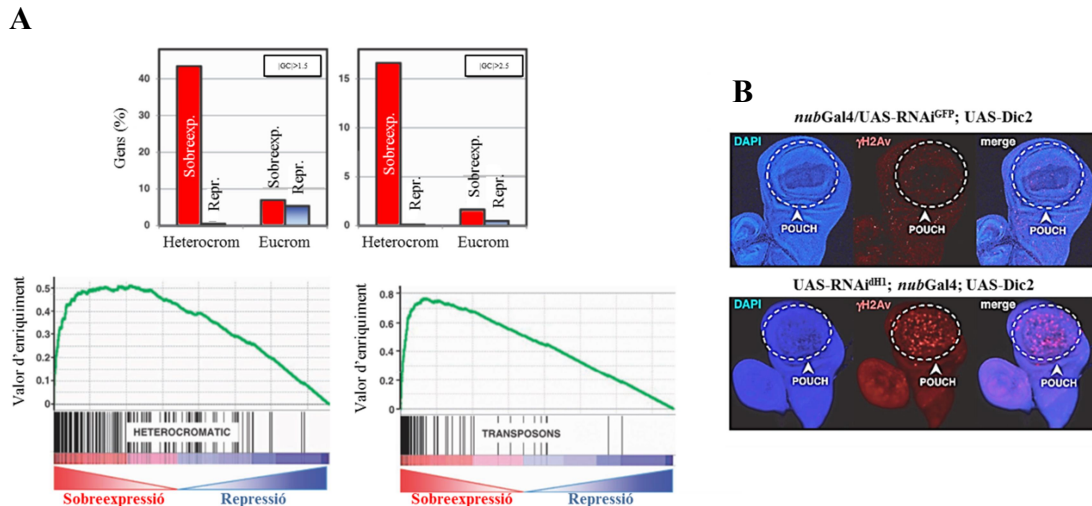


Figura 18. Funcions de la histona H1. Es mostra un resum de les principals funcions descrites fins al moment de la histona H1. Imatge adaptada a partir de [71-73].

Recentment, també s'ha demostrat que la variant somàtica de la histona H1 de *D. melanogaster* pot induir la formació d'heterocromatina mitjançant dos mecanismes alternatius. D'una banda, s'ha demostrat que pot induir la formació d'heterocromatina mitjançant el reclutament de Su(var)3-9. En aquest sentit, s'ha observat que la histona H1 actua reclutant Su(var)3-9 a l'heterocromatina, facilitant així la metilació d'H3K9 [74] i proporcionant una plataforma d'unió per a HP1a. Alternativament, també s'ha demostrat que aquesta variant somàtica està implicada en una segona via d'inducció de la formació d'heterocromatina que implica la única proteïna de la família STAT a *D. melanogaster*, STAT29E [75].

A banda dels efectes severos sobre l'heterocromatina indicats anteriorment, la depleció de la histona H1 de *D. melanogaster* a la regió del *pouch* dels discos imaginis d'ala larvaris dona lloc a unes ales de tamany reduït altament atrofiades a l'organisme adult. Una anàlisi més profunda d'aquest fenotip ha permès observar que la depleció dona lloc a l'aparició de molècules de DNA circular extracromosomals que contenen rDNA, una propietat que també és observada en mutants de pèrdua

de funció de Su(var)3-9 i és una indicació directa d'inestabilitat genòmica. A més a més, la depleció també dóna lloc a un alt senyal de  $\gamma$ H2Av a la regió deplecionada suggerint dany al DNA quan el contingut en histona H1 es redueix [71] (Figura 19). Aquest resultat indiquen que la histona H1 d'alguna manera prevé el dany al DNA i contribueix a mantenir l'estabilitat genòmica. De manera similar, la delecció del gen Hho1, la histona H1 de *S. cerevisiae*, indueix un fenotip d'hiperrecombinació al locus d'rDNA [68].



**Figura 19. La histona dH1 és necessària per mantenir el silenciament dels gens heterocromàtics i els transposons.** (A) A la part superior, es mostren els percentatges de gens heterocromàtics i eucromàtics analitzats mitjançant *microarrays* que es troben diferencialment expressats en mosques mutants *UAS-RNAi<sup>dH1</sup>*; *Act5C-GAL4* tenint en compte els graus de canvi (GC) indicats. A la part de sota, es mostra el *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) de gens heterocromàtics i transposons (línies negres) en funció del canvi en l'expressió en mosques mutants *Act5C-GAL4; RNAi<sup>dH1</sup>*. (B) Nivells de  $\gamma$ H2Av determinats mitjançant immunolocalització en discos imaginals d'ala de mosques mutants *UAS-RNAi<sup>dH1</sup>*; *nubGAL4; UAS-Dcr2* i mosques control *nubGAL4/UAS-RNAi<sup>GFP</sup>; UAS-Dcr2*. S'indica la regió corresponent al *pouch*. Imatge adaptada de [71].

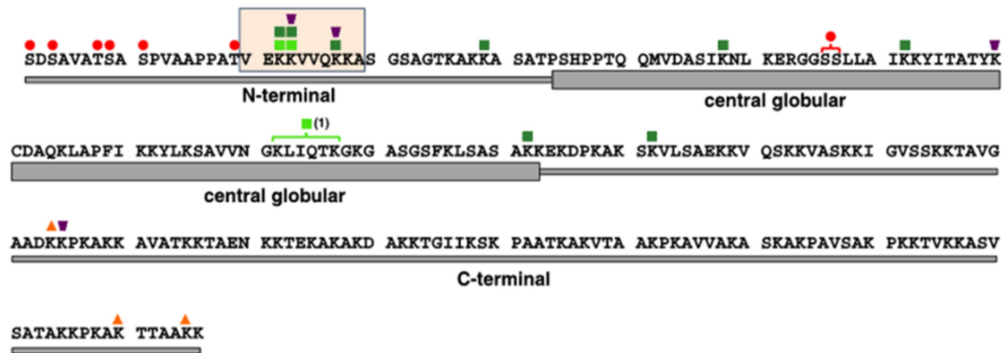
Diversos treballs també han descrit connexions entre la histona H1 i els components de l'heterocromatina a cèl·lules de mamífer. Potser la interacció més ben caracteritzada és la que es dóna entre la histona H1 i la proteïna HP1, la qual cosa es pensa que és específica de subtipus d'histona H1 i dependent d'una metilació específica de la histona H1. D'altra banda, estudis en cèl·lules mare embrionàries (mESCs) de ratolí amb una triple delecció de gens d'histona H1, i que contenen el 50% del contingut normal d'histona H1, també suggereixen un paper de la histona H1 en el manteniment de l'estructura de l'heterocromatina [72].

Finalment, també cal destacar que recentment ha estat identificada una variant embrionària de la histona dH1 a *D. melanogaster* que presenta un paper important en l'embriogènesi primerenca. En general, als metazous, les variants somàtiques d'H1 són reemplaçades per variants d'histona H1 específiques a les cèl·lules germinals. Durant molt de temps, *D. melanogaster* semblava ser una excepció amb una única proteïna H1 caracteritzada. Fa poc, però, s'hi ha identificat una histona H1 embrionària, dBigH1. Aquesta variant d'H1 presenta una cua N-terminal inusualment llarga enriquida en aminoàcids carregats negativament. dBigH1 es troba present a les cèl·lules germinals i durant les primeres hores de l'embriogènesi, desapareixent a l'etapa de cel·lularització quan és reemplaçada per la histona H1 somàtica. A més a més, dBigH1 és essencial per al desenvolupament embrionari primerenc i prevé l'activació prematura del genoma zigòtic [68, 73].



## A.2.5. Modificacions post-traduccionals de la histona H1

La histona H1 pot ser modificada post-traduccionament en residus tan de les cues N i C-terminal com del domini globular.



**Figura 20. Resum de les modificacions post-traduccionals identificades de la variant somàtica de la histona dH1.** Es mostra la seqüència d'aminocàcids i les diferents modificacions identificades: fosforilació (cercles vermells), monometilació (quadrats verd clar), dimetilació (quadrats verd fosc), acetilació (triangles taronja) i ubiquitinització (trapezis liles). Sota la seqüència, s'indiquen els dominis de la proteïna. Al domini N-terminal, s'indica la posició d'una regió evolutivament conservada entre els residus 19 i 29 (rectangle taronja pàl·lid). Imatge adaptada de [76].

Mitjançant estudis d'espectrometria de masses s'han identificat diverses modificacions post-traduccionals de la histona H1 en organismes com *Drosophila*, pollastre, ratolí i humans. Entre elles, s'ha observat que la histona H1 pot ser metilada, acetilada, fosforilada, ADP-ribosilada, ubiquitinada i citrulinitzada [72].

En el cas de *D. melanogaster*, s'ha observat que la variant somàtica de la histona H1 està àmpliament modificada per fosforilació, metilació, acetilació i ubiquitinació, i que la majoria d'aquestes modificacions es donen al domini N-terminal [76] (Fig. 20). De forma similar, també han estat identificades diverses modificacions al domini N-terminal en variants específiques d'histona H1 d'humans i ratolí.

## A.3. L'estabilitat del genoma

### A.3.1 El programa eucariota de replicació del DNA

La maquinària de replicació de les cèl·lules eucariotes duplica acuradament el genoma i és suficientment robusta per dur a terme aquesta tasca en front de nombrosos obstacles. El programa de replicació del DNA està controlat temporal i espacialment. L'inici de la síntesi de DNA té lloc a milers d'origens de replicació a partir dels quals dues forquetes de replicació progressen bidireccionalment [77].

La replicació del DNA es dona simultàniament amb nombrosos processos metabòlics com la transcripció, el processament dels mRNAs i el remodelament de la cromatina. Aquests processos han

d'estar acuradament coordinats amb la replicació del DNA per evitar conflictes potencials i assegurar la correcta transmissió de la informació genètica i epigenètica. La precisió i la robustesa de la replicació del DNA es basa en els següents punts [77]:

- 1) La síntesi del DNA és altament precisa degut a la fidelitat de les polimerases replicatives i l'associació de factors de reparació de desajustos (MMR) a les factories de replicació.
- 2) Els orígens de replicació es disparen una única vegada per cada cicle cel·lular. Són activats seqüencialment al llarg de fase S. Aquesta activació seqüencial depèn de la seva accessibilitat als factors d'iniciació limitants, per als quals competeixen els orígens. A més a més, els orígens estan agrupats en dominis temporals de replicació, en els quals els orígens es disparen estocàsticament.
- 3) El genoma conté un gran excés d'orígens de replicació. Tots els orígens es llicencien abans de fase S, però molts d'ells no són activats en condicions normals. Aquests orígens es coneixen com a orígens críptics o dorments i s'utilitzen per rescatar forquetes aturades en condicions d'*estrès replicatiu*.
- 4) La progressió de les forquetes de replicació és escortada per múltiples factors que assegurin la seva estabilitat en front d'obstacles i promouen el seu reinici quan es necessita.

### A.3.2 L'estrès replicatiu

El manteniment de l'estabilitat genòmica és essencial per a una acurada transmissió de la informació genètica. Això implica una adequada duplicació dels cromosomes seguida per una correcta segregació a mitosi. La inestabilitat genòmica no només és una característica del càncer, sinó que també, i encara més important, és causa de malalties genòmiques i predisposició a càncer [77].

Anomenem estrès replicatiu aquelles alteracions en la dinàmica de la replicació del DNA que provoquen inestabilitat genòmica. El concepte d'estrès replicatiu engloba una àmplia varietat d'esdeveniments que distorsionen el programa temporal i espacial del programa de replicació del DNA. Aquests esdeveniments tenen orígens endògens o exògens i afecten local (llocs de pausa discrets) i globalment la dinàmica de la replicació del DNA. Poden aparèixer en una finestra curta de temps (estrès agut) o durant cada fase S (estrès crònic) [77].

Les situacions conegudes actualment en que la replicació del DNA es veu afectada es poden agrupar en quatre categories [77]:

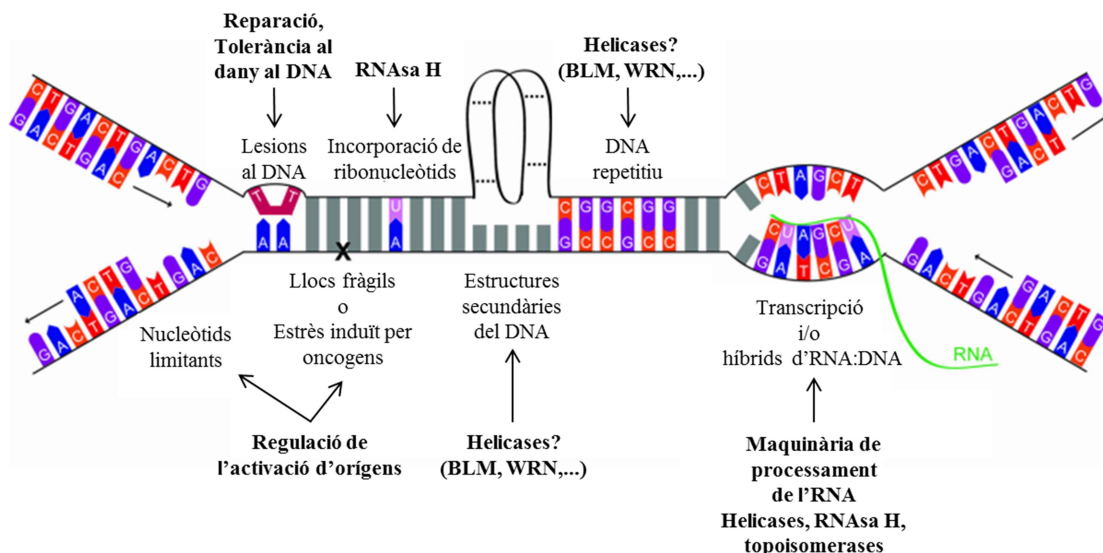
- 1) Activació inadequada d'orígens de replicació (deficiència o excés)
- 2) Obstacles a la replicació del DNA

- 3) Conflictes entre la transcripció i la replicació
- 4) Replicació del DNA en condicions metabòliques inadequades (replicació del DNA desequilibrada)

Donat que el programa de replicació del DNA és un procés altament regulat per molts factors, l'estrès replicatiu sovint apareix com una cascada d'esdeveniments. Un estrès local impedeix completar la replicació del DNA a un locus concret compromentent la segregació cromosòmica a mitosi i acaba tenint un efecte global en la integritat genòmica [77].

### A.3.2.1 Causes de l'estrès replicatiu

Cada vegada que la cèl·lula entra a fase S ha de replicar un gran nombre de *loci* que representen un desafiament per a la progressió de la forqueta de replicació i, per tant, una font potencial d'estrès replicatiu local (Fig. 21). No totes les regions del genoma són igualment sensibles a l'estrès replicatiu, sinó que algunes regions del genoma són més sensibles que altres. Aquests loci altament sensibles es coneixen com a llocs intrínsecament difícils de replicar. A mamífers, són paradigmes de regions difícils de replicar els llocs fràgils habituals (CFSs), que es defineixen com a regions cromosòmiques específiques que tendeixen a trencar-se preferentment en situacions d'estrès replicatiu [78, 79].



**Figura 21. Fonts d'estrès replicatiu.** Es mostren diferents condicions o obstacles que poden alentir o aturar la replicació del DNA, i algunes de les vies conegudes per resoldre cadascuna de les situacions d'estrès (negreta). Imatge adaptada de [80].

### **A.3.2.1.1. Activació inadequada dels orígens de replicació: excés i dèficit**

Per a mantenir l'estabilitat del genoma durant la replicació del DNA és crític que es dispari una quantitat suficient d'orígens que permeti completar la replicació del DNA en un període de temps prudencial, que els orígens es disparin en ordre seqüencial i no tots al mateix temps, i que els orígens es disparin un únic cop per fase S. Les alteracions d'aquest patró en l'activació dels orígens, tan per un excés com per un dèficit en l'activació d'aquests, donen lloc a situacions d'estrès replicatiu [77].

Un exemple de situacions d'estrès replicatiu induïdes per un dèficit en l'activació dels orígens es dona als llocs fràgils habituals (CFS). Els orígens de replicació no es troben igualment distribuïts al llarg del genoma i la seva eficiència varia àmpliament. Algunes regions genòmiques, com els llocs fràgils habituals (CFS), són pobres en orígens al llarg de megabases de DNA i són, per tant, incapaces de compensar forquetes alentides activant orígens dorments. En resposta a situacions d'estrès replicatiu lleus, per tant, la duplicació de les CFSs depèn de la capacitat de les forquetes alentides de sintetitzar DNA al llarg d'una distància gran [77, 81].

D'altra banda, una activació excessiva dels orígens de replicació també és negativa per a la viabilitat cel·lular. Per exemple, a llevat, la sobreexpressió dels factors d'iniciació limitants permet l'activació simultània de la majoria d'orígens a l'inici de fase S i, en conseqüència, el nivell de dNTPs es torna limitant ràpidament, amb conseqüències nefastes per a la viabilitat cel·lular. Si la quantitat de dNTPs baixa per sota d'uns nivells crítics, s'acumula ssDNA a les forquetes sotmeses a estrès, el punt de control de la replicació del DNA s'activa i interromp el programa de replicació [82].

### **A.3.2.1.2. Obstacles en la progressió de la forqueta de replicació**

Una gran varietat d'obstacles poden impedir la progressió de les forquetes de replicació, alterant l'activitat de les helicases replicatives o la capacitat de les polimerases replicatives d'incorporar nucleòtids. Per exemple, poden representar un obstacle important per a la progressió de la forqueta de replicació les lesions del DNA (bases danyades, inter o intra entrecreuaments,...), els complexos DNA-proteïna, les seqüències de DNA amb tendència a formar estructures secundàries de DNA o els gens altament transcrits. L'estat de la cromatina també ha estat proposat com una font d'impediment de la progressió de la forqueta de replicació. En aquest sentit, a *S. cerevisiae*, s'ha observat que alguns gens reprimits activament representen un obstacle especial per a la replicació del DNA, probablement degut a una estructura especialitzada de la cromatina que implica desacetilases d'histones (HDACs). De forma similar, a *S. pombe*, també s'ha observat problemes en regions transcripcionalment reprimides, majoritàriament subtelomèriques i als retrotransposons, silenciades per la desacetilació d'histones dependent de Clr3/Clr6 [83].

### **A.3.2.1.3. Interferència entre el programa de transcripció i replicació**

El procés de la transcripció representa un font molt important d'estrès replicatiu tan a eucariotes com procariotes. Això és degut al fet que les maquinàries de replicació i transcripció comparteixen el mateix DNA motlle i tenen tendència, per tant, a col·lisionar [77]. Els genomes bacterians generalment són replicats a partir d'un únic origen de replicació i els gens es troben organitzats en el mateix sentit que la replicació per evitar col·lisions frontals. Aquesta situació és més complexa en eucariotes degut a la presència de múltiples orígens de replicació. Per limitar la interferència entre aquests dos processos, la replicació del DNA i la transcripció estan físicament i temporalment separades dins el nucli. Tot i així, gran quantitat d'evidències indiquen que la transcripció interfereix amb la replicació del DNA i indueix inestabilitat genòmica a eucariotes. En aquest sentit, ha estat àmpliament descrit que aquestes situacions d'estrès replicatiu poden ser induïdes per l'acumulació d'híbrids RNA:DNA que es formen durant la transcripció quan l'RNA naixent s'anella a la cadena de DNA motlle, deixant la cadena de DNA no motlle desparellada [77, 84]. Aquestes estructures es coneixen amb el nom d'R-loops. La formació d'aquestes estructures es veu afavorida en seqüències de DNA riques en GC i augmenta quan la formació dels complexos mRNA-proteïna (mRNPs) està afectada [77, 85, 86]. La depleció dels factors que eliminen els R-loops o prevenen la seva formació indueix inestabilitat genòmica tan a llevat com a eucariotes superiors [77, 84, 87-89].

### **A.3.2.2. Conseqüències de l'estrès replicatiu sobre l'estabilitat genòmica**

Les situacions d'estrès replicatiu afecten l'estabilitat i integritat del genoma induint mutacions genòmiques heretables. Aquests problemes poden aparèixer com a resultat de problemes associats a l'aturada de les forquetes de replicació, als sistemes de reparació o a la segregació cromosòmica a mitosi.

#### **A.3.2.2.1. Mutacions associades a la segregació desigual dels cromosomes**

En primer lloc, aquestes situacions es poden donar en cèl·lules eucariotes que arriben a mitosi amb cromosomes danyats o no replicats completament.

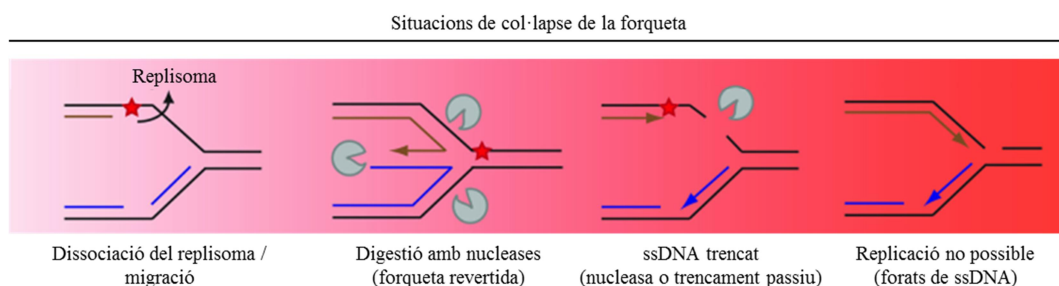
Aquelles regions genòmiques que arriben a anafase no replicades o no resoltes afecten la segregació cromosòmica creant un enllaç físic entre les dues cromàtides germanes. Aquestes estructures reben el nom de ponts anafàsics o ponts de cromatina. Aquestes estructures es poden tenir amb agents intercalants del DNA com DAPI quan es donen [81]. La separació de les cromàtides que té lloc a l'anafase genera una tensió mecànica creixent en cromàtides parcialment replicades que tendeixen a trencar-se. Finalment, el trencament dels ponts anafàsics dona lloc a una segregació desigual dels braços trencats dels cromosomes [77].

Alternativament, aquestes situacions de problemes en la segregació cromosòmica també es poden donar com a conseqüència de la formació de centrosomes addicionals a mitosi . Donat que molts dels centrosomes mitòtics addicionals són funcionals, la seva presència provoca mitosis multipolars i segregacions desequilibrades de cromosomes [90].

En resum, la replicació incompleta dóna lloc a anomalies cromosòmiques locals a mitosi, i la formació de centrosomes extrems amplifica els defectes a tot el genoma generant mitosis multipolars que acaben provocant una segregació aberrant de cromosomes completament replicats.

### A.3.2.2.2. Mutacions associades a l'aturada de la forqueta

Les situacions d'aturada de la forqueta de replicació que es donen en situacions d'estrès replicatiu són una important font mutacional (Fig. 22). Això és degut a que l'aturada de les forquetes de replicació està associada a una acumulació de trencaments de doble cadena al DNA. Existeixen diferents hipòtesis sobre com una forqueta aturada pot donar lloc a trencaments de doble cadena en cèl·lules eucariotes. En primer lloc, poden ser deguts a l'intent de la cèl·lula de resoldre estructures de forquetes de replicació aturades mitjançant activitats endonucleolítiques i vies de reinici basades en la recombinació [77, 80]. Aquesta resposta pot ser iniciada per la formació d'estructures vulnerables com una forqueta revertida, una forqueta aturada o DNA de cadena senzilla. En segon lloc, el DNA de cadena senzilla desprotegit persistent, trobat a la forqueta de replicació aturada, en forats deixats darrera la forqueta o en estructures que sorgeixen d'aquests forats, poden ser també dianes d'endonucleases o tenir tendència a trencaments passius en condicions prolongades d'aturada[77, 80].



**Figura 22. Mecanismes de col·lapse de la forqueta de replicació.** Si les forquetes de replicació aturades no són estabilitzades, o si persisteixen durant períodes llargs de temps, les forquetes de replicació col·lapsen, i d'aquesta manera prevenen el reinici de la replicació. El mecanisme mitjançant el qual una forqueta de replicació col·lapsa encara és desconegut. Aquí es presenten diverses possibilitats, incloent la dissociació dels components del replisoma, la digestió per part de nucleases d'una forqueta revertida o aturada, o forats de cadena senzilla del DNA. Imatge adaptada de [80].

### A.3.2.2.3. Mutacions associades als sistemes de reparació del DNA

Alternativament, els sistemes de reparació del DNA també poden donar lloc a mutacions genòmiques heretables. A eucariotes, existeixen dues vies principals de reparació dels trencaments

de doble cadena que permeten restaurar la continuïtat del DNA: el sistema d'Unió d'Extrems No Homòlegs (NHEJ) i la Reparació per Homologia [77, 91].

El NHEJ consisteix a unir directament els extrems dels trencaments de doble cadena entre ells sense que siguin homòlegs necessàriament. Per aquesta raó, aquest sistema de reparació presenta certa tendència a l'error ja que freqüentment dona lloc a petites insercions, delecions, substitucions al punt de trencament, o inclòs translocacions si la unió es realitza entre fragments de diferents parts del genoma. Alternativament, aquestes lesions també poden ser reparades utilitzant seqüències homòlogues com a DNA motlle per sintetitzar el fragment de DNA que falta. La forma més habitual de reparació per homologia s'anomena Recombinació Homòloga (HR) [91]. Ocasionalment, la recombinació homòloga pot donar-se entre seqüències repetitives dispersades pel genoma. En aquest cas es coneix amb el nom de recombinació homòloga no al·lèlica (NAHR). Aquest tipus de Recombinació Homòloga pot provocar reordenaments genòmics importants amb seqüències que presenten homologia amb els punts de trencament. Aquesta situació és la que es pot donar en seqüències repetides diverses vegades al llarg del genoma, com per exemple els transposons [77].

La preferència en la utilització d'un sistema de reparació en front de l'altre depèn de les condicions en que es trobi la cèl·lula fins a cert punt. Durant les fases S i G2, la cromàtide germana està físicament molt a prop, proporcionant d'aquesta manera un donant homòleg per a la recombinació homòloga i afavorint la utilització d'aquest mecanisme. En canvi, fora de S/G2, donat que no existeix una cromàtide germana, el NHEJ és l'opció preferida majoritàriament [91].

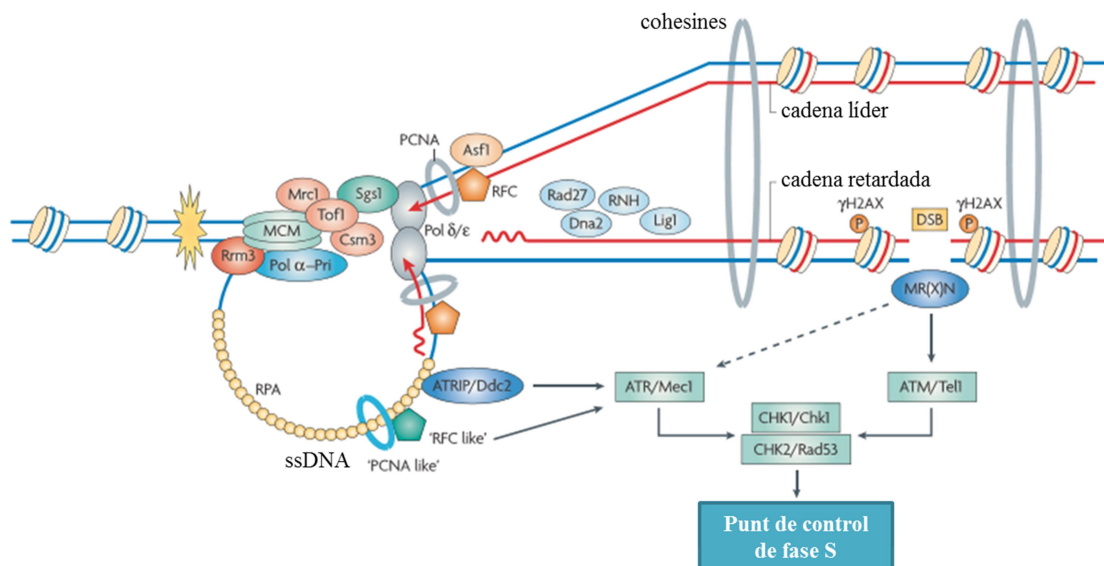
A banda de la Recombinació Homòloga, també han estat descrits a eucariotes altres formes de reparació dels trencaments de doble cadena per homologia, com l'Anellament de Cadena Senzilla (SSA) i la Reparació Induïda per Trencament (BIR), que presenten unes taxes de mutacions associades més elevades [77, 92]. En el mateix sentit, també ha estat demostrat que en comparació amb les DNA polimerases replicatives, que utilitzen el sistema de lectura de prova i exhibeixen taxes d'error en el rang d'un nucleòtid incorrecte cada  $10^6$ - $10^8$  bases replicades, les polimerases implicades en la síntesi trans-lesió (TLS) presenten una taxa d'error que pot anar des d'aproximadament un nucleòtid incorrecte cada 10 bases a un cada 10000 bases quan repliquen DNA no danyat [93].

### **A.3.2.3 Senyalització de l'estrès replicatiu**

Les forquetes de replicació aturades són una font molt important de dany endogen al DNA. Per evitar la generació de dany derivada de la seva aturada, existeixen diverses vies de senyalització que permeten detectar i assegurar la resolució d'aquestes forquetes (Fig. 23). La detecció implica la identificació dels trossos de ssDNA que es formen quan les helicases de DNA replicatives continuen obrint el DNA després que la DNA polimerasa s'hagi aturat [80, 94].

En primer lloc, la proteïna de replicació A (RPA) reconeix el ssDNA i s'hi uneix. Llavors, RPA indueix el reclutament i activació de diversos mediadors de resposta a l'estrès replicatiu. Entre

ells, la quinasa de resposta al dany al DNA Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-related (ATR) que juga un paper central en la resposta. A banda d'ATR, la proteïna RPA també recluta el complex 9-1-1 (RAD9-HUS1-RAD1) a les lesions del DNA. Aquest complex regula ATR mitjançant el reclutament del seu activador al·lostèric, TOPBP1 (*Topoisomerase Binding Protein 1*). La formació del complex d'ATR a les forquetes de replicació aturades engega una senyalització que permet coordinar replicació, cycle cel·lular i reparació. Una de les dianes més importants d'ATR és la quinasa de serina i treonina CHK1 (*Checkpoint Kinase-1*). Alhora, aquesta quinasa estén la senyalització al control del cycle cel·lular a través de la fosforilació de quinases dependents de ciclins (CDKs). A més a més, ATR juga també un paper molt important inhibint l'activació excessiva d'origens de replicació. Una prova del seu paper central durant la replicació la trobem en el fet que la pèrdua d'ATR sensibilitza les cèl·lules a l'estrès replicatiu, provocant defectes en els punts de control i, finalment aberracions cromosòmiques [94].



**Figura 23. Senyalització a les forquetes de replicació aturades.** Diversos factors s'associen amb la forqueta de replicació per evitar el seu col·lapse. Les regions de ssDNA i els trencaments de doble cadena són detectats pel punt de control de fase S que és activat mitjançant ATM i ATR. En el cas dels trencaments de doble cadena, la senyalització del punt de control s'estén al voltant del trencament de doble cadena mitjançant la fosforilació de la histona H2AX. Imatge adaptada de [95].

En condicions d'aturada persistent de la forqueta de replicació, la cèl·lula no és capaç de rescatar la forqueta aturada. Això pot provocar la generació de trencaments de doble cadena i el col·lapse de la forqueta de replicació. En aquest cas, aquestes situacions indueixen la senyalització de dany al DNA a través de la quinasa Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) [80, 94]. L'activació d'ATM promou el reclutament del complex MRN (MRE11-RAD51-NBS1) a les forquetes de replicació trencades. Un cop carregat, aquest complex facilita el resseguiment de l'extrem de DNA i la reparació del dany mitjançant la Recombinació Homòloga. Diversos estudis indiquen que la senyalització d'ATR també està connectada de manera similar al reclutament del complex MRN. La senyalització d'ATM també jugaria un paper molt important en condicions d'estrès replicatiu. En



aquest sentit, s'ha observat que la pèrdua simultània d'ATR i ATM provoca una inestabilitat als llocs fràgils habituals (CFSs) més elevada que la depleció sola d'ATR [94, 96].

### **A.3.2.3.1. Fosforilació de la variant d'H2A, H2AX, en resposta al dany al DNA**

En resposta als trencaments de doble cadena del DNA, a mamífers, la variant d'H2A, H2AX, és fosforilada a la serina 139 de l'extrem C-terminal als nucleosomes del voltant del punt de trencament del DNA [97]. Per exemple, s'ha observat que H2AX pot ser fosforilada en aquest residu en resposta a radiacions ionitzants, aturada de les forquetes de replicació o apoptosi. Generalment, quan H2AX està fosforilada en aquest residu en resposta al dany al DNA rep el nom de  $\gamma$ H2AX [98]. La fosforilació d'H2AX s'estén massivament fins a 1-2 megabases al voltant del trencament de doble cadena i dona lloc a una acumulació local d'aquesta modificació al voltant dels trencaments de doble cadena visible al microscopi en forma de punts discrets o *foci* al nucli de les cèl·lules [99].

La variant H2AX pot ser fosforilada en aquest residu mitjançant diverses quinases. En general, ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) sembla ser la principal quinasa implicada en la fosforilació d'H2AX en resposta a radiacions ionitzants, mentre que ATR (*ATM and Rad3-related*) hi està implicada preferentment en resposta a l'estrès replicatiu. Tot i així, hi ha certa redundància funcional entre ambdues vies, donat que es pot detectar fosforilació d'H2AX en mutants ATM<sup>-/-</sup> i ATR<sup>-/-</sup> [97].

Recentment, però, diverses evidències han posat de manifest que també es pot formar  $\gamma$ H2AX en forquetes aturades en absència de trencaments de doble cadena [100, 101].

### **A.3.2.3.2 La variant H2Av és l'homòleg funcional d'H2AX a *D. melanogaster***

La resposta de les cèl·lules eucariotes a la formació de trencaments de doble cadena està molt conservada. Una de les primeres respostes a la generació de trencaments de doble cadena és la fosforilació de la cua C-terminal de les histones H2A localitzades als nucleosomes pròxims al trencament. A llevat, es fosforila la histona H2A, mentre que a mamífers és la variant d'H2A, H2AX, la que és fosforilada.

A *D. melanogaster*, els trencaments de doble cadena indueixen la fosforilació de la variant d'H2A (H2Av) a la serina 137 [102]. Donat que la modificació es dona al quart residu començant des de l'extrem C-terminal ( $\gamma$ ), es fa servir el terme  $\gamma$ H2Av per referir-se a la fosforilació de la variant en resposta al dany. Aquesta proteïna és homòloga de la variant humana H2AZ, però a més a més conté un domini a la regió C-terminal similar al de la variant humana H2AX que es fosforila en resposta al dany [102]. En resum, l'homòleg d'H2AZ a *D. melanogaster*, H2Av, també és l'homòleg funcional d'H2AX (Fig. 24).

De forma similar al que succeeix en mamífers, a la mosca, la variant H2Av també pot ser fosforilada pels ortòlegs d'ATM i ATR, tefu i mei-41 respectivament [103]. En la mateixa línia, mei-

41 sembla tenir un paper preferentment en la fosforilació d'H2Av en resposta a l'estrès replicatiu [104], mentre que tefu estaria implicada principalment en la resposta a radiacions ionitzants i dany al DNA espontani [105]. De nou, sembla que ambdues proteïnes però també presenten una certa redundància funcional [103].

					136	137	138	139	140
Dm	H2Av	KKEETVQDPQRK·G···NVI	L	S	Q	A	Y	*	
Hs	H2AX	KKTSATVGPKAPSGGKKATQ	A	S	Q	E	Y	*	
Sc	H2A1	KK·SA···········KATK	A	S	Q	E	L	*	
Dm	H2A1	KKTEKKA	*						
Hs	H2A1	KKTESHHKAKGK	*						

**Figura 24. Seqüència aminoacídica de l'extrem C-terminal de les histones H2A.** Es mostra els extrems C-terminals de les histones H2A i H2Av de *D. melanogaster* (Dm), H2A i H2AX d'*Homo sapiens* (Hs) i H2A de *S. cerevisiae* (Sc). Els punts indiquen forats i els asteriscos codons stop. Els números damunt la seqüència de la variant H2Av indiquen la seva posició en la cadena aminoacídica. Els aminoàcids del domini conservat SQ estan subratllats en negre i la serina que és fosforilada en resposta al dany en cada variant està aliniada sota la serina 137 d'H2Av de *D. melanogaster*. Imatge adaptada de [102].

### A.3.3. Els R-loops: un exemple de causa d'estrès replicatiu

#### A.3.3.1 Definició i característiques dels R-loops

Els R-loops són estructures de triple cadena d'àcids nucleics compostos per un híbrid RNA-DNA i una cadena desplaçada de ssDNA [106]. Aquestes estructures es formen quan el transcrit naixent emergent de la maquinària de transcripció s'hibrida amb la cadena complementaria de DNA motlle. Els R-loops van ser descoberts a bacteris [107]. Des de llavors, s'han detectat a molts organismes des de llevats fins a humans. El mapatge genòmic d'aquestes estructures a llevat o cèl·lules de mamífer han mostrat que els R-loops poden aparèixer a molts llocs del genoma en condicions normals. Els R-loops juguen múltiples papers fisiològics a les cèl·lules, regulant l'expressió gènica, la replicació del DNA, la recombinació del canvi de classe d'immunoglobulina o la reparació del DNA. Malgrat això, els R-loops també poden induir dany al DNA i inestabilitat genòmica [108].

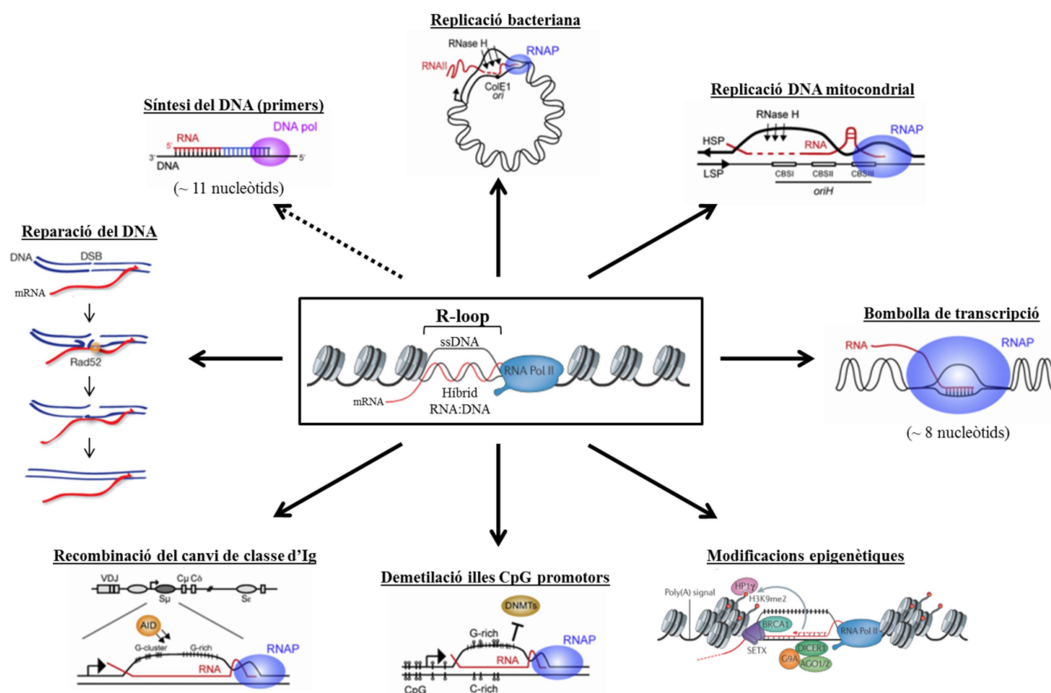
#### A.3.3.2 Funcions fisiològiques dels R-loops

A banda del seu paper en la recombinació de canvi de classe de les immunoglobulines o la replicació del DNA bacteriana i la replicació del DNA mitocondrial en humans, els R-loops també

poden afectar dinàmicament funcions cel·lulars fonamentals com la regulació de l'expressió gènica o la reparació del DNA [108] (Fig. 25).

En primer lloc, ha estat descrit que els R-loops es formen preferentment a les seqüències promotores i terminadores de certs gens, i regulen l'expressió gènica a través de diversos mecanismes. D'una banda, es formen a les regions promotores que contenen illes CpG caracteritzades per una distribució asimètrica de guanines i citosines [85, 109]. En aquests promotors, les seqüències riques en citosines es troben a la cadena motlle, mentre que les seqüències riques en guanines es troben a la cadena no motlle. També s'ha observat que els R-loops protegeixen la seqüència sobre la que es troben de la metilació *de novo* del DNA, una marca epigenètica associada amb silenciament transcripcional. Aquest descobriment suggereix que els R-loops poden actuar com a reguladors positius de l'expressió gènica [109]. D'altra banda, també ha estat descrit que els R-loops es poden formar a les regions terminals de certs gens. En aquestes regions, la formació d'R-loops promou la terminació transcripcional mitjançant el reclutament de l'helicasa d'RNA:DNA *Senataxin* (SETX) [110, 111].

A més a més, els R-loops també estan implicats en el silenciament d'RNAs llargs no codificants (lncRNAs). Per exemple, a *Arabidopsis*, els R-loops inhibeixen l'expressió del lncRNA *COOLAIR*, un transcrit *antisense* necessari per silenciar el gen repressor floral *FLC* [112]. En la mateixa línia, a humans, s'ha observat que inhibeixen l'expressió del transcrit *antisense* *Uba3a* associat a la Síndrome Prader-Willi [113].



**Figura 25. Funcions fisiològiques naturals dels R-loops a les cèl·lules.** Es mostra l'ampli ventall de funcions en que participen els R-loops de manera natural. Aquestes estructures estan implicades en la replicació bacteriana, la replicació mitocondrial, la recombinació de canvi de classe d'Ig, l'expressió gènica, la reparació del DNA i l'establiment de marques epigenètiques. A banda dels R-loops, també es formen híbrids RNA:DNA durant la replicació del genoma en sintetitzar els primers d'RNA dels fragments d'Okazaki (línia discontinua). Entre parèntesi, es troba la longitud que presenten els híbrids RNA:DNA a les estructures indicades. Imatge adaptada de [84, 108, 114].

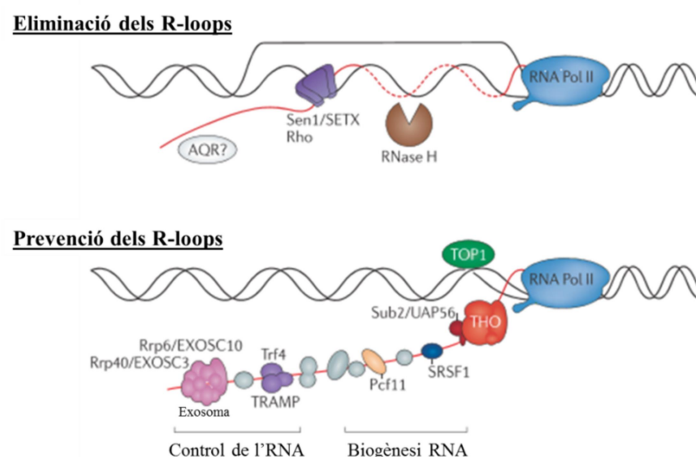
Finalment, recentment ha estat descrit que els R-loops, o més aviat els híbrids DNA-RNA, també poden estar implicats en la reparació del DNA [115]. Per exemple, a llevats que no presenten un motlle homòleg per reparar, s'ha observat que es pot utilitzar un transcrit d'RNA com a motlle per a la reparació sense errors dels trencaments de doble cadena. Sembla que el transcrit pot hibridar amb el seu DNA complementari *en cis* per generar una estructura similar als R-loops [115].

### A.3.3.3 Mecanismes de formació i resolució dels R-loops

Es creu que els R-loops es formen cotranscripcionalment quan la molècula d'RNA naixen s'hibrida *en cis* amb la cadena de DNA motlle. Experiments a llevat, però, suggereixen que els R-loops també es poden formar quan els transcrits s'hibriden a seqüències complementàries o parcialment complementàries distants del punt original de transcripció, és a dir, *en trans* [108, 116].

Existeixen diversos mecanismes per resoldre o prevenir la formació dels R-loops [106] (Fig. 26). En primer lloc, els R-loops poden ser resolts per l'RNasa H. Aquest enzim degrada específicament la cadena de RNA dels híbrids RNA:DNA [89]. Alternativament, aquests híbrids també poden ser resolts mitjançant helicases d'RNA:DNA com *Senataxin* (SETX) o *Aquarius* (AQR) [110, 111, 117].

També ha estat descrit que la formació d'R-loops pot ser suprimida per la topoisomerasa I, la qual resol l'estrès torsional negatiu darrera l'RNA polimerasa II per prevenir l'anellament de l'RNA naixent amb el motlle de DNA [87, 118]. En el mateix sentit, també s'ha observat que la dimetilació de l'arginina 3 de la histona H3 (H3R3me2) pot prevenir la formació de R-loops al locus MYC mitjançant el reclutament de la topoisomerasa IIIB, un enzim que també relaxa l'estrès torsional darrera l'RNA polimerasa [119].



**Figura 26. Activitats cel·lulars que limiten l'acumulació d'R-loops.** A la part de dalt, es mostra alguns dels mecanismes, no excloents, d'eliminació dels R-loops quan es formen. A la part inferior, en canvi, es mostra els mecanismes que eviten la formació d'aquestes estructures. Imatge adaptada de [114].

En darrer lloc, també ha estat àmpliament descrit que els factors encarregats del processament i de l'export de l'RNA impedeixen la formació dels R-loops, probablement unint-se a l'RNA a mesura que aquest va emergint de la RNA polimerasa [86, 120].

La formació i resolució dels R-loops són, per tant, uns processos altament regulats, i tenen un efecte important en l'homeòstasi cel·lular.

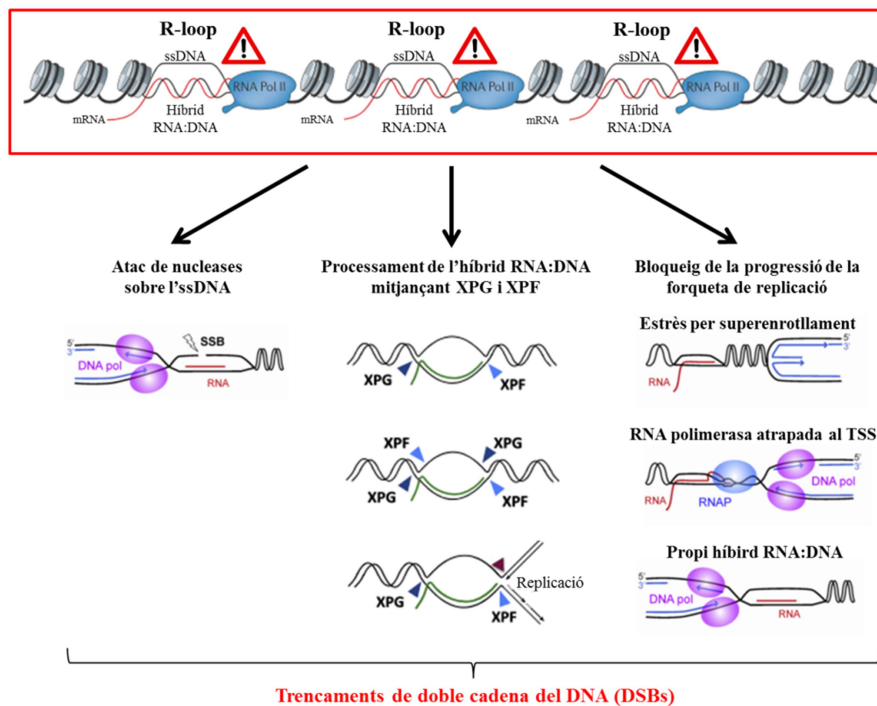
### **A.3.3.4. Els R-loops com a causa de dany al DNA**

Tots aquests defectes en els factors que resolen els R-loops o prevenen la seva formació poden donar lloc a dany al DNA i inestabilitat genòmica [108, 114]. La primera evidència experimental d'això prové de llevat mutants per THO/TREX, un complex implicat en transcripció i exportació del RNA, els quals exhibeixen un fenotip d'hiperrecombinació. Aquest fenotip pot ser suprimit mitjançant la sobreexpressió d'RNasa H1, una observació que implica els R-loops com a causa del dany [86]. Diversos estudis a llevat i en humans confirmen que els R-loops induïts eliminant factors implicats en el processament del mRNA són una font de dany al DNA [89, 121-123]. En relació amb això, diverses anàlisis genòmiques han permès identificar nombrosos factors implicats en transcripció, splicing o processament del mRNA que suprimeixen l'acumulació de dany al DNA o la inestabilitat genòmica induïda pels R-loops [89, 122, 123]. Entre els factors que s'ha vist que prevenen la formació de trencaments de doble cadena induïts per R-loops a cèl·lules humanes trobem ASF, AQR, SETX, BRCA1, BRCA2 i la topoisomerasa I [87, 117, 118, 121, 124, 125], suggerint que existeixen múltiples connexions entre els R-loops i el dany al DNA.

Existeixen diverses hipòtesis sobre com es pot generar aquest dany al DNA com a conseqüència de l'acumulació d'R-loops (Fig. 27). En primer lloc, el DNA de cadena senzilla de la cadena no motlle que és exposat durant la formació dels R-loops és un element d'aquesta estructura particularment vulnerable al dany al DNA. Existeixen diverses nucleases que actuen específicament sobre el ssDNA, que en el cas dels R-loops es pot estendre fins a diversos centenars de bases [109, 126]. Per exemple, ha estat demostrat en llevat i humans que l'enzim *Activation-induced cytidine deaminase* (AID), un enzim que promou la conversió de residus dC a dU específicament al ssDNA, pot actuar sobre la cadena de DNA desaparellada dels R-loops [127]. Aquesta modificació fa el DNA susceptible a l'enzim de reparació per excisió de bases Uracil DNA Glicosilasa, que llavors elimina la base d'uracil per crear un lloc abàsic i genera una lesió al DNA.

Altres elements estructurals que poden ser susceptibles al dany són les solapes que es formen a cada cantó dels R-loops. Treballs recents indiquen que aquestes estructures poden ser tallades per nucleases específiques d'estructura dins la cèl·lula [117]. Per exemple, a cèl·lules humanes, ha estat descrit que els R-loops induïts per l'absència de diversos factors de processament dels mRNAs, o per la inhibició de la topoisomerasa I, són processats activament a trencaments de doble cadena mitjançant XPF i XPG (Tipus F i G de Xeroderma Pigmentosum), dues endonucleases implicades en la reparació per excisió de nucleòtid (NER) [117]. No està clar com la maquinària del sistema reparació per escissió de nucleòtid associada a transcripció (TC-NER) reconeix i processa els R-loops

per donar lloc a trencaments de doble cadena. Malgrat això, han estat proposades dues hipòtesis no exclusives entre elles. En primer lloc, pot ser que XPF i XPG reconeixin ambdues cadenes d'un R-loop i generin directament un trencament de doble cadena. En aquest sentit, han demostrat en estudis *in vitro* que els R-loops poden ser tallats en ambdues cadenes per XPF i XPG purificades [128]. Alternativament, un altra possibilitat és que els híbrids RNA-DNA siguin tallats per XPG i XPF d'una manera similar a la que té lloc durant la reparació per excisió de nucleòtid clàssica, generant un forat de cadena senzilla que és convertit a trencament de doble cadena mitjançant l'acció d'una altra nucleasa o en trobar-se amb una forqueta de replicació [114].



**Figura 27. Mecanismes a través dels quals una acumulació d'R-loops pot donar lloc a trencaments de doble cadena del DNA.** Una acumulació anòmla d'R-loops pot acabar donant lloc a trencaments de doble cadena del DNA fàcilment a través de diversos mecanismes. L'atac de nucleases sobre la cadena de DNA desaparellada dels R-loops, els forats de cadena senzilla generats en eliminar els híbrids RNA:DNA mitjançant les nucleases XPF i XPG o el bloqueig que exerceixen sobre la forqueta de replicació aquestes estructures poden provocar la generació de trencaments de doble cadena del DNA. Imatge adaptada de [84, 108, 114].

Finalment, una altra possibilitat és que els trencaments de doble cadena siguin generats per la col·lisió física entre un R-loop i la maquinària replicació [87, 89, 108, 114, 129-131]. En aquest sentit, ha estat suggerit que els R-loops representen una barrera física formidable per a la forqueta de replicació donat que són estructures secundàries de DNA relativament estables que estan associades amb la maquinària de transcripció i altres enzims implicats en el processament del RNA. Per tant, es creu que els R-loops provoquen el col·lapse de la forqueta de replicació i la formació de trencaments de doble cadena, inclòs sense la intervenció de nucleases com XPF i XPG [108, 114].

Malgrat tot això, els R-loops que estan implicats en la replicació bacteriana i mitocondrial, expressió gènica, o reparació normalment no donen lloc a DSBs. Perquè alguns R-loops són processats a DSBs mentre altres estan d'alguna manera protegits es desconeix de moment [108, 114]. Actualment, no es sap si els R-loops reguladors i els R-loops que donen lloc a DSBs són diferents en

mida, nombre, localització, o persistència però s'han proposat diverses hipòtesis per explicar aquestes diferències. En primer lloc, una possibilitat és que l'excés d'R-loops observats en aquestes cèl·lules saturi les vies que normalment actuen per resoldre aquestes estructures o prevenir la seva formació, permetent d'aquesta manera el seu processament aberrant per part de nucleases [108, 114]. En segon lloc, una altra possibilitat és que els R-loops induïts existeixin en diferents contextos cromosòmics que poden afectar el seu processament [108, 114]. Finalment, també podria ser que la persistència dels R-loops que són processats a DSBs sigui diferent de la dels R-loops reguladors. En aquest sentit, els R-loops que són processats a DSBs podrien presentar un temps de vida més llarg, i en conseqüència, una probabilitat més elevada de ser reconeguts per nucleases o impactats per la forqueta de replicació [108, 114].





## **B. OBJECTIUS**



La variant somàtica de la histona H1 de *D. melanogaster* (dH1) és essencial per a la viabilitat de l'organisme [70]. En depleccionar-la, existeixen problemes amb la formació de l'heterocromatina [70, 74] i es genera dany al DNA [71]. En base a aquestes observacions, el nostre objectiu ha estat l'anàlisi de les causes moleculars de la inestabilitat generada quan es depleciona la histona dH1. Més concretament ens varem proposar:

- 1) La determinació de les regions genòmiques on es genera el dany en el DNA en interferir l'expressió de la histona dH1.
  
  
  
  
  
  
  
  
  
  
- 2) La determinació de les possibles causes de la generació de dany al DNA en depleccionar la histona dH1.



## **C. MATERIALS I MÈTODES**



### C.1. Materials

#### C.1.1. Reactius i enzims

La majoria de productes que han estat utilitzats en la realització dels experiments són de qualitat analítica i provenen de les cases comercials Merck, Fluka, Sigma, Gibco, Life Technologies i Ambion. Els enzims utilitzats són de Fermentas, Roche, Biotools, Ambion i New England Biolabs (NEB).

#### C.1.2. Soques bacterianes

En aquest treball s'han utilitzat les següents soques d'*Escherichia coli*:

- Soques per a l'amplificació de plasmidis:
  - **DH5α**: deoR endA1 gyrA96 hsdR17 ( $r_k^- m_k^+$ ) recA1 relA1 supE44 thi-1 F'[traD36 proAB<sup>+</sup> lac I<sup>q</sup> lac Z ΔM15]
  - **TOP10**: F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG λ-

#### C.1.3. Plasmidis

##### C.1.3.1 Plasmidis de clonatge

En aquest treball s'han utilitzat els següents plasmidis de clonatge:

- **pCR2.1-TOPO (Invitrogen)**: Utilitzat per al clonatge de fragments de PCR mitjançant el sistema TOPO-TA (Invitrogen).
- **pUAST**: Empleat per a la realització de construccions que permetin l'expressió en mosques transgèniques sota control de GAL4 d'integració genòmica aleatòria [132].

- **pUASattB:** Empleat per a la realització de construccions que permetin l'expressió en mosques transgèniques sota control de GAL4 d'integració genòmica dirigida [133].

### C.1.3.2 Plasmidis per a l'expressió de proteïnes a cèl·lules S2

En aquest treball s'han utilitzat els següents plasmidis per a l'expressió de proteïnes a cèl·lules S2:

- **pcDNA3-RNH1:** Conté la seqüència de la RNasa H1 humana sota control del promotor del citomegalovirus. Cedit amablement pel Dr. Raúl Mendez.

### C.1.3.3. Plasmidis per a la producció de línies de mosques transgèniques

En aquest treball s'han utilitzat els següents plasmidis per generar línies transgèniques de mosques:

- **pUAST-RNH1:** Conté la seqüència de la RNasa H1 humana clonada al plasmidi d'integració genòmica aleatòria pUAST sota control d'una seqüència induïble per Gal4.
- **pUASattB-RNH1:** Conté la seqüència de la RNasa H1 humana clonada al plasmidi d'integració genòmica dirigida pUASattB sota control d'una seqüència induïble per Gal4.

### C.1.4. Línies cel·lulars

Per a la realització d'aquest treball s'han fet servir les següents línies de cèl·lules eucariotes en cultiu:

- **Cèl·lules S2 ( també anomenades SL2) de *D. melanogaster*:** Línia cel·lular originària de *D. melanogaster* procedent d'embrions tardans de 20 a 24h, establerta per Imogen Schneider [134]. Són cèl·lules d'aspecte esfèric que creixen tan enganxades a la superfície del recipient en que es troben com en suspensió.



**C.1.5. Oligonucleòtids**

Els oligonucleòtids utilitzats en els experiments han estat els següents (Taula 3):

Llista d'oligonucleòtids utilitzats		
<b>Nom del primer</b>	<b>Seqüència de l'oligonucleòtid de 5' a 3'</b>	<b>Ús</b>
<i>Mthl12TSS-F</i>	TGCAAAGCTATTTAATGCACGA	3
<i>Mthl12TSS-R</i>	TAAAACTCGACTGGGGTTCC	3
<i>Diver2LTR-F</i>	CGCCAAAACGTGTCAGTAGA	2,3
<i>Diver2LTR-R</i>	CAGATAAATGCGTGCGAGAA	2,3
<i>Diver2ORF-F</i>	CTCTTACGGTGAGGCTGGAG	1,2,3
<i>Diver2ORF-R</i>	GCTGTGCGATTATGCTCGTGA	1,2,3
<i>GATELTR-F</i>	CCGCTCTTCACCTCAGAGTC	2,3
<i>GATELTR-R</i>	CCGGGCGTATGTTTATTCAG	2,3
<i>GATEORF-F</i>	GCAGACCTGGCAAGTAGAGG	1,2,3
<i>GATEORF-R</i>	GAGCGTTGACCTGAGTAGGC	1,2,3
<i>Invader4LTR-F</i>	AGATGACAATGTGGCACACG	2,3
<i>Invader4LTR-R</i>	GATCGACGTCAGCAGTCAAA	2,3
<i>Invader4ORF-F</i>	GCTTACGCCTTCAAGAAACG	1,2,3
<i>Invader4ORF-R</i>	CAAAAATGGCACATGGTCTG	1,2,3
<i>PogoIR-F</i>	CATCGGCAAGATATCTGCATT	2,3
<i>PogoIR-R</i>	CGATGCAGCAAACGTATGAA	2,3
<i>PogoORF-F</i>	TACATTTGGTTCCGACAGCA	1,2,3
<i>PogoORF-R</i>	ACGTGCCGGTCAAGAATTAC	1,2,3
<i>3S18LTR-F</i>	CAGCGGAATCAATGTAAGCA	2,3
<i>3S18LTR-R</i>	TGGAAAAGTACTGGGCAAGC	2,3
<i>3S18ORF-F</i>	GCCATCAATCGCTTCTTCTC	1,2,3
<i>3S18ORF-R</i>	CCAGGAAAGCTTCGTACTGC	1,2,3
<i>Het-AUTR-F</i>	TTCGCTTGCCAAAGACTCTC	2,3
<i>Het-AUTR-R</i>	GCTTTTCTTTGCAGCCTGAG	2,3
<i>Het-AORF-F</i>	AAACGACGATCTGGACTGCT	1,2,3
<i>Het-AORF-R</i>	CGGAAAAATGCTGGGAGTTA	1,2,3
<i>rDNA2-F</i>	GAAAAGCCATTTTAGTGAATGGA	1,2
<i>rDNA2-R</i>	CGTCGTAGAACAGCTAGCTTACAG	1,2
<i>rDNA4-F</i>	GGTTGCCGACCTCTCATATT	2
<i>rDNA4-R</i>	TGCCAAAATCATATGAACACA	2
<i>TR2-F</i>	AAACACGTCTCCACCCGAAG	1,2,3
<i>TR2-R</i>	CTATTCTAACATTTCGGCATTCCAC	1,2,3

<i>RpL5CENTSS2L-F</i>	CGGTATGAACGATATGACAGG	2
<i>RpL5CENTSS2L-R</i>	TCACATGGCTATTGAAGTGAAA	2
<i>CG9662TEL2L-F</i>	CCCTGCATTGGTGTATTTCC	2
<i>CG9662TEL2L-R</i>	TGACATGGCTTACGATGCAG	2
<i>CG125672LHet-F</i>	ACCGATTGCTTTTCGTTGAA	2
<i>CG125672LHet-R</i>	GCTTCGATGCTTATTTTATATCCAG	2
<i>GYPYLTR-F</i>	GGCTCATTGCCGTAAACAT	2,3
<i>GYPYLTR-R</i>	GGCGATAGCGATTTGATTGT	2,3
<i>GYPYORF-F</i>	CCTCAGAGCTGTGGTCTTCC	1,2,3
<i>GYPYORF-R</i>	CAGATGGCAGGTCTTTTGGT	1,2,3
<i>DOCUTR-F</i>	GACATTCGGCATTCCACAGT	2,3
<i>DOCUTR-R</i>	ACGTCTCCACCCGAAGACT	2,3
<i>DOCORF-F</i>	CGCTGTGCCAGCTGTAAATA	1,2,3
<i>DOCORF-R</i>	ATTGTTGTTGCAAACGGTCA	1,2,3
<i>MDG3LTR-F</i>	TCAGTCGCTGTTGAACCAAG	2,3
<i>MDG3LTR-R</i>	TTAGCCGCCGTTTACAGAAG	2,3
<i>MDG3ORF-F</i>	AAATGCAAAAAGGCCAAATG	1,2,3
<i>MDG3ORF-R</i>	AGCTAAACGGTTTCGGGTTT	1,2,3
<i>ACCORDLTR-F</i>	TAGGCGACATCAGCAAAGTG	2,3
<i>ACCORDLTR-R</i>	ATCGGGTGCAACAGAGTTTC	2,3
<i>ACCORDORF-F</i>	CCAACAGCAACAACATGGAC	1,2,3
<i>ACCORDORF-R</i>	AAAAGCCAAAATGTGCGTTG	1,2,3
<i>DMCRIAUTR-F</i>	TTCGCGAGTGATTCTTTGTG	2
<i>DMCRIAUTR-R</i>	ACAACGCACAAAAGGGAGAG	2
<i>DMCRIAORF-F</i>	GTTGTGATGCTTGCCTTGTG	1,2
<i>DMCRIAORF-R</i>	ATTTTCATCTCGTTTCGCAACC	1,2
<i>TARTORF-F</i>	CCAATGCAACCAAAGCATT	1,2
<i>TARTORF-R</i>	TATGTGTGGGAGGGAGAAGC	1,2
<i>TARTAUTR-F</i>	GACTTCCACTCCCTGCAGAC	2
<i>TARTAUTR-R</i>	TCCTTCACATCCAGGGAATC	2
<i>T7dH1-F</i>	ATTG <u>TAATACGACTCACTATAG</u> ATGTCTGATTCTGCAGTTGC	4
<i>T7dH1-R</i>	ATTG <u>TAATACGACTCACTATAG</u> TACTTTTTGGCAGCCGTAG	4
<i>LacZ-F</i>	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> ATGACCATGATTACGCCAAGC	4
<i>LacZ-R</i>	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> CAATTTCCATTCGCCATTCAG	4
<i>Tub-F</i>	ACCTGAACCGTCTGATTGGC	1
<i>Tub-R</i>	GCAGAGAGGCGGTAATCGAG	1
<i>Act-F</i>	CGTCCACCATGAAGATTAAGATTGT	1
<i>Act-R</i>	CAATACTTTTGACTCCCATCCTTTG	1

<i>RNH1-F</i>	ATGAGCTGGCTTCTGTTCC	5
<i>RNH1-R</i>	TCAGTCTCCGATTGTTTAGC	5

**Taula 3. Taula dels primers utilitzats.** Es mostra les seqüències de 5' a 3' dels primers utilitzats i els experiments (1:RT-qPCR; 2:ChIP-qPCR; 3:DRIP-qPCR; 4:Síntesi de dsRNA; 5:clonatge) en que han estat utilitzats. Subratllada, es mostra la seqüència promotora mínima de la polimerasa T7.

### C.1.6. Anticossos

Els anticossos utilitzats en els experiments han estat els següents (Taula 4):

Llista d'anticossos primaris utilitzats					
Diana de l'anticòs	Animal d'origen	Clonalitat	Experiments en que s'ha utilitzat i dilucions emprades		Referència
<i>γH2Av</i>	Conill	Policlonal	Western blot: 1/2000 Immunoprecipitació: 3μL Immunotinció SL2: 1/500 Immunotinció discos: 1/1000		Rockland, 600-401-914
<i>γH2Av</i>	Ratolí	Monoclonal	Immunotinció SL2: 1/500		DSHB, UNC93-5.2.1
<i>dH1</i>	Conill	Policlonal	Western blot: 1/20000 Immunotinció SL2: 1/4000 Immunotinció politènics: 1/4000		[71]
<i>dH4</i>	Conill	Policlonal	Western blot: 1/2000		Abcam Ab10158
<i>CID</i>	Conill	Policlonal	Immunotinció SL2: 1/300		[135]
<i>Cenp-C</i>	Rata	Policlonal	Immunotinció SL2: 1/500		Generat al laboratori
<i>HP1a</i>	Rata	Policlonal	Immunotinció SL2: 1/400 Immunotinció discos: 1/500 Immunotinció politènics: 1/500		[136]
<i>R-loops (S9.6)</i>	Ratolí	Monoclonal	Immunotinció SL2: 1/400 Immunotinció politènics: 1/500		[137]
<i>β-tubulina</i>	Ratolí	Policlonal	Western blot: 1/2500		EMD-Millipore, MAb3408
Llista d'anticossos secundaris utilitzats					
Diana de l'anticòs	Animal d'origen	Clonalitat	Conjugació	Experiments en que s'ha utilitzat i dilucions emprades	Referència
<i>Ac de ratolí</i>	Cabra	Policlonal	Cy2	Immunotinció SL2: 1/400 Immunotinció politènics: 1/400	Jackson IR 115-225-146

				Immunotinció discos: 1/600	
<i>Ac de ratolí</i>	Cabra	Policlonal	Cy3	Immunotinció SL2: 1/400 Immunotinció politènics: 1/400 Immunotinció discos: 1/600	Jackson IR 115-165-146
<i>Ac de ratolí</i>	Cabra	Policlonal	Cy5	Immunotinció SL2: 1/400 Immunotinció politènics: 1/400 Immunotinció discos: 1/600	Jackson IR 115-175-146
<i>Ac de ratolí</i>	Ruc	Policlonal	HRP	<i>Western blot</i> : 1/10000	Jackson IR 715-035-150
<i>Ac de ratolí</i>	Ruc	Policlonal	Cy3	Immunotinció SL2: 1/400 Immunotinció politènics: 1/400 Immunotinció discos: 1/600	Jackson IR 715-165-151
<i>Ac de rata</i>	Cabra	Policlonal	Cy2	Immunotinció SL2: 1/400 Immunotinció politènics: 1/400 Immunotinció discos: 1/600	Jackson IR 112-225-143
<i>Ac de rata</i>	Cabra	Policlonal	Cy3	Immunotinció SL2: 1/400 Immunotinció politènics: 1/400 Immunotinció discos: 1/600	Jackson IR 112-165-143
<i>Ac de rata</i>	Cabra	Policlonal	Cy5	Immunotinció SL2: 1/400 Immunotinció politènics: 1/400 Immunotinció discos: 1/600	Jackson IR 112-175-143
<i>Ac de rata</i>	Ruc	Policlonal	HRP	<i>Western blot</i> : 1/10000	Jackson IR 712-035-150
<i>Ac de rata</i>	Ruc	Policlonal	Cy2	Immunotinció SL2: 1/400 Immunotinció politènics: 1/400 Immunotinció discos: 1/600	Jackson IR 712-225-153
<i>Ac de conill</i>	Cabra	Policlonal	Cy2	Immunotinció SL2: 1/400 Immunotinció politènics: 1/400 Immunotinció discos: 1/600	Jackson IR 111-225-144
<i>Ac de conill</i>	Cabra	Policlonal	Cy3	Immunotinció SL2: 1/400 Immunotinció politènics: 1/400 Immunotinció discos: 1/600	Jackson IR 111-165-144
<i>Ac de conill</i>	Cabra	Policlonal	Cy5	Immunotinció SL2: 1/400 Immunotinció politènics: 1/400 Immunotinció discos: 1/600	Jackson IR 111-175-144
<i>Ac de conill</i>	Ruc	Policlonal	HRP	<i>Western blot</i> : 1/10000	Jackson IR 715-035-150

**Taula 4. Taula dels anticossos utilitzats.** Es mostra les dianes, l'animal d'origen, la clonalitat i l'origen dels anticossos utilitzats. En el cas dels anticossos secundaris, a més a més també es mostra la conjugació.

### C.1.7. Soques de *D. melanogaster*

Les línies de mosques amb que s'ha realitzat experiments han estat els següents (Taula 5):

Llista de línies de mosques utilitzades			
<u>Nom de la línia</u>	<u>Cromosoma</u>	<u>Descripció</u>	<u>Referència</u>
If/CyO; Iy/TM3	Doble balancejat	Presenta balancejadors i marcadors als cromosomes II i III sobre un fons white <sup>-</sup> .	B-4911
If/CyO; RNH1/TM3	III	Expressa el gen de la RNasa H1 humana sota control de GAL4.	Generades per a la realització d'aquesta tesi doctoral
RNAi <sup>dH1</sup> /FM6; TM3Serr/RNH1	X;III	Expressa el gen de la RNasa H1 humana i un shRNA contra la histona dH1 sota control de GAL4.	
RNAi <sup>dH1</sup> /FM6; sb/TM3Serr	X	Expressa un shRNA contra la histona dH1 sota control de GAL4.	[71]
nubGal4; UAS-Dic2	II;III	Expressa GAL4 sota control del promotor nubbin.	
UAS-RNAi <sup>HP1a</sup>	II	Expressa un shRNA contra HP1a.	VDRC 31995
white <sup>-</sup>	X	<i>Wild-type</i> . Conté una mutació al gen <i>white</i> que elimina tota la proteïna. Ulls blancs.	<i>white</i> <sup>1118</sup>

Taula 5. Taula de les línies de mosques emprades. Es mostra el nom, la descripció i l'origen de les línies de mosques utilitzades.

## C.2. Mètodes

### C.2.1. Mètodes de manipulació del DNA plasmídic

#### C.2.1.1 Tècniques de DNA recombinant

Per a l'obtenció dels clonats realitzats en aquest treball s'han seguit les tècniques bàsiques de Biologia Molecular descrites per J. Sambrook [138].

#### C.2.1.2 Preparació de soques bacterianes competents

La competència artificial d'una soca bacteriana és induïda al laboratori on les cèl·lules són convertides en permeables de forma passiva a través de condicions que normalment no ocorren a la

natura. Les cèl·lules es refreden en presència de cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) que preparen les membranes cel·lulars per ser permeables al DNA plasmídic. Es prepara un precultiu de 4 ml de medi LB (10 g/l triptona, 5 g/l extracte de llevat, 10 g/l NaCl, 1 mM NaOH), s'inocula amb bacteris procedents d'un glicerinat i es deixa tota la nit a 37°C amb agitació. En un erlenmeyer amb 200 ml de medi LB, s'afegeixen els 4 ml del precultiu i es deixa amb agitació a 37°C fins que la densitat òptica arriba a  $\text{D.O.}_{600} = 0,3$ . Es refreda el cultiu en gel durant uns 20 min. Es reparteix el volum del cultiu en tubs de 50 ml i es centrifuga a 4°C durant 20 min a 2500 rpm. Es descarta el sobrenedant, es ressuspen el sediment cel·lular amb 100 ml de  $\text{CaCl}_2$  50 mM prèviament autoclavat i es deixa en gel 20 min. Es centrifuguen els tubs a 4°C, 20 min a 2500 rpm. Es descarta el sobrenedant i es ressuspenen les cèl·lules en 16 ml de  $\text{CaCl}_2$  50 mM (15% glicerol) prèviament autoclavat. Es fan alíquotes de 250 µl en tubs de 1,5 ml i es guarden a -80°C (cal treballar en les màximes condicions d'esterilitat durant tot el protocol).

### **C.2.1.3 Procés de transformació**

La transformació de bacteris competents es refereix a un canvi genètic estable produït a l'incorporar DNA nu en bacteris competents (bacteris amb capacitat per incorporar DNA exogen). S'afegeixen 1-20 µg de DNA plasmídic (generalment procedent d'una lligació) a 100 µl de cèl·lules competents i es deixa el tub durant 20 min en gel. Seguidament, es fa un xoc tèrmic de 2 min a 42°C en un bany d'aigua. Es recuperen les cèl·lules del xoc tèrmic afegint 300 µl de medi LB fresc sense antibiòtic i incubant el tub durant 30 min a 37°C (temps que tarden els bacteris a produir la resistència a l'antibiòtic). Finalment, utilitzant les màximes condicions d'esterilitat, amb una nansa de Digiralsky es sembren 100 µl de la transformació en plaques de Petri que contenen, medi LB, 15 g/l d'agar i l'antibiòtic adient. S'incuben les plaques tota la nit en una estufa a 37°C per permetre el creixement de les colònies de bacteris.

### **C.2.1.4 Minipreparació de DNA**

El DNA plasmídic present en els bacteris s'aïlla mitjançant un mètode ràpid i senzill anomenat "minipreparació alcalina ràpida". Consisteix en la lisi alcalina dels bacteris, la precipitació de DNA genòmic juntament amb les restes cel·lulars i finalment la precipitació del DNA plasmídic d'interès que no sedimenta amb el DNA genòmic. Per l'extracció de DNA bacterià s'inocula una colònia aïllada de bacteris transformats amb el plasmidi d'interès en un tub amb 4 ml de medi LB amb l'antibiòtic adequat. S'incuba el tub tota la nit a 37°C amb agitació constant. El dia següent, es passa 1 ml del cultiu a un tub d'1,5 ml i es centrifuga a 9000 rpm durant 1 min. Es descarta el sobrenedant amb una pipeta Pasteur i es ressuspen el sediment en 100 µl de GTE (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0) vortexant. S'afegeixen 200 µl de solució de lisi (NaOH 0.2N, SDS 1%) al sediment, s'inverteix el tub 2 o 3 cops i es deixa en gel 5 min. S'afegeixen 150 µl d'acetat sòdic 3M

pH 5.0, s'inverteix el tub 2 o 3 cops i es deixa en gel 5 min. Es centrifuga el tub 5 min a 14000 rpm i es passa el sobrenedant a un tub nou. S'afegeixen 450 µl de fenol/cloroform, es vortexa i es centrifuga 2 min a 14000 rpm. En aquest punt, dins el tub es generen dues fases. Es recupera la fase superior corresponent a la fase aquosa, on hi ha el DNA plasmídic, i s'afegeix 1 ml d'etanol absolut fred. S'inverteix el tub 2 o 3 cops i es centrifuga 5 min a 14000 rpm. Seguidament, es treu el sobrenedant i es renta el sediment amb 300 µl d'etanol 70% fred, centrifugant 3 min a 14000 rpm. Es descarta el sobrenedant i es deixa eixugar el sediment a 37°C. Finalment es ressuspèn el sediment en 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM) amb 1 µg d'RNasaA i es deixa digerint amb l'RNasaA durant 15 min a 37°C.

### **C.2.1.5 Maxipreparació de DNA**

Les maxipreparacions de DNA permeten obtenir DNA plasmídic de gran puresa en grans quantitats. S'inoculen 500 ml de medi LB amb l'antibiòtic adient amb un precultiu de 6-10 hores de la soca bacteriana transformada amb el plasmidi que es vol amplificar. S'incuba tota la nit a 37°C en agitació constant. Es recull el cultiu en pots de 250 ml i es centrifuguen en una centrífuga Beckman® a 6000 g, 10 min. Es descarta el medi i es procedeix a l'extracció i purificació del DNA plasmídic amb el kit "Plasmid Maxi Kit" (Qiagen®), segons les instruccions del fabricant. El protocol del kit està basat amb el protocol de lisi alcalina, seguit de la unió del plasmidi a reïnes de bescanvi aniónic Qiagen®, sota condicions apropiades de sals i pH. L'RNA, les proteïnes i les impureses de baix pes molecular són eliminades mitjançant rentats amb un medi salí. El DNA plasmídic s'elueix en un tampó ric en sals i posteriorment es concentra i se n'elimina la sal mitjançant precipitació amb isopropanol i rentant posteriorment amb etanol 70%. Després de realitzar els passos indicats pel fabricant del kit, un cop el DNA ja ha estat precipitat i rentat amb etanol de 70% es deixa assecar el sediment i es ressuspèn en 500 µl d'aigua MilliQ. Per conèixer la concentració del DNA obtingut, cal diluir la mostra (normalment es dilueix 1:100) i llegir l'absorbància a 260 nm en un espectrofotòmetre *UV-1603* (Shimadzu). Es calcula la concentració de DNA segons la següent relació:  $[DNA] = 50 \mu\text{g} / \text{ml} \times A_{260} \times \text{factor de dilució}$ . Per comprovar la integritat i puresa del DNA es realitza una electroforesi de DNA.

### **C.2.1.6 Electroforesi de DNA en gel d'agarosa**

L'electroforesi en gel d'agarosa permet separar, identificar i purificar DNA. Quan s'aplica un voltatge als extrems d'un gel, es genera un camp elèctric, la intensitat del qual ve donada per la longitud del gel i la diferència de potencial entre els extrems. Les molècules de DNA exposades al camp elèctric, migren cap a l'ànode o pol positiu, degut a la càrrega negativa dels grups fosfat del DNA. Per a fer el gel, es pesa l'agarosa, es dilueix amb TBE 1X (Tris base 9 mM, EDTA 2,4 mM, àcid bòric 0,08 M) dins un erlenmeyer i es dissol en un microones. L'agarosa dissolta, s'aboca a la

safata d'electroforesi i es col·loca la pinta per fer el pous del gel. Quan l'agarosa està solidificada, es treu la pinta i es posa la safata amb el gel dins la cubeta d'electroforesi plena amb tampó TBE 1X. Es col·loca la mostra de DNA amb solució Orange G (glicerol 50 %, EDTA 20 mM, Orange G (Sigma) 0,02 %) dins els pous del gel i en un dels pous es situa un marcador de pes molecular que permet identificar la mida de les bandes de DNA de les mostres. Es fa córrer el gel a 100 V i quan es considera que el DNA ha avançat prou, es posa el gel dins una solució de bromur d'etidi (BrEt) 0,5 µg/ml dissolt en aigua durant 15 min en agitació. Es renta el gel durant 15 min en aigua destil·lada. Per detectar el DNA cal observar el gel sota un transil·luminador de llum ultraviolat (UV). El bromur d'etidi és un agent intercalant de DNA que permet marcar els àcids nucleics i quan s'exposa a llum UV, emet llum vermella-ataronjada que s'intensifica unes 20 vegades després d'haver-se unit al DNA.

### **C.2.2. Mètodes de treball amb cèl·lules SL2 en cultiu**

#### **C.2.2.1. Cultiu de cèl·lules SL2**

La línia cel·lular de *D. melanogaster* SL2 es manté en medi Schneider (Schneider's insect Medium, Sigma) suplementat amb un 10% de sèrum boví fetal (FBS, GIBCO®) inactivat prèviament 30 minuts a 56°C, i un 1% de penicil·lina/estreptomicina (GIBCO®). Les cèl·lules es mantenen en flascons de cultiu Corning® de 25 cm<sup>2</sup> a una densitat entre 1-8x10<sup>6</sup> cèl·lules /mL, en una estufa a 25°C i sense font de CO<sub>2</sub>. Dos cops per setmana, es passa 1 mL de cèl·lules d'un flascó crescut, a un altre flascó de cultiu, amb 4 mL de medi nou (dilució 1/5). No és necessari tripsinitzar les cèl·lules SL2, ja que aquestes són semiadherents i es desenganxen fàcilment amb la pipeta.

#### **C.2.2.2. Congelació de cèl·lules SL2**

Es recullen les cèl·lules d'un flascó de 175 cm<sup>2</sup> en creixement exponencial i es centrifuguen 5 minuts a 200g en un tub de 15 mL. S'elimina el sobrenedant i es renta 2 cops el precipitat amb PBS1X estèril. Es descarta el sobrenedant i es ressuspenen les cèl·lules en 900 µL d'FBS (GIBCO®). Es posen les cèl·lules en un criotub i s'afegeixen, gota a gota, 100 µL de DMSO. El procés de congelació de les cèl·lules ha de ser un procés gradual. En primer lloc, es posa el criotub a -20°C de 2 a 4 hores. A continuació, es passa el criotub al congelador de -80°C i es deixa tota la nit. Finalment, es guarda el criotub en un tanc amb nitrogen líquid.



### C.2.2.3. Descongelació de cèl·lules SL2

Es descongela ràpidament un criotub amb cèl·lules procedent del tanc de nitrogen líquid. Es passen les cèl·lules a un tub de 15 mL que conté 5 mL de medi de cultiu. Es centrifuga el tub 5 minuts a 200 g, es descarta el sobrenedant i es realitza un segon rentat amb medi nou. Finalment, es ressuspenen les cèl·lules en 5 mL de medi de cultiu nou, es passen a un flascó de cultiu de 25 cm<sup>2</sup> i es deixa el flascó a l'estufa a 25°C.

### C.2.2.4. Comptatge de cèl·lules SL2

Per comptar cèl·lules s'utilitza una cambra de *Neubauer* BLAUBRAND ®, adaptada al microscopi de camp clar o al de contrast de fases. A la cambra de *Neubauer* hi ha 2 quadrícules iguals, cada quadrícula és un quadrat de 3 x 3 mm, amb una separació entre dos línies consecutives de 0.25 mm (veure figura C.1). Així doncs, l'àrea enfosquida i marcada L de la figura C.1, està dividida amb 16 quadrats i aquesta àrea correspon a 1 mm<sup>2</sup>. La depressió central del portaobjectes està enfonsada 0.1 mm respecte la superfície, de manera que quan es cobreix amb un cobreobjectes, aquest dista de la superfície marcada 0.1 mm, i el volum comprès entre la superfície L i el cobreobjectes és de 0.1 mm<sup>3</sup>, és a dir, 1 x 10<sup>-4</sup> ml. Per fer el comptatge cel·lular, cal posar 200 µl d'una dilució del cultiu cel·lular (generalment, 1:10) a la quadrícula de la cambra de *Neubauer*. Es compten les cèl·lules de cada zona enfosquida L, quadrícula de 4 x 4 (16 quadrats) i es fa la mitjana de totes les zones L. Per conèixer la concentració de cèl·lules, s'ha de multiplicar la mitjana del nombre obtingut de cèl·lules que hi ha en un quadrat 4 x 4 (16 quadrats) per 10<sup>4</sup> i pel factor de dilució. D'aquesta manera, s'obté el nombre de cèl·lules per mil·lilitre de medi.

### C.2.2.5. Transfecció de cèl·lules SL2 mitjançant fosfat càlcic

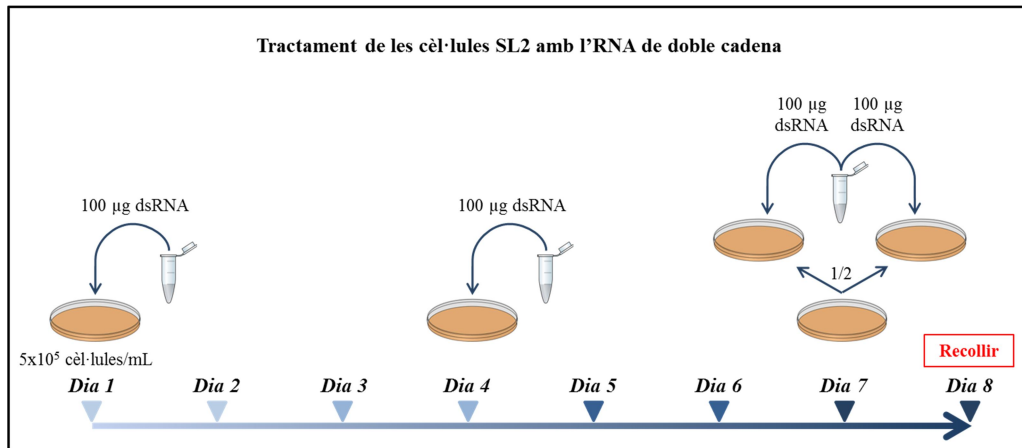
El mètode de transfecció amb fosfat càlcic facilita l'entrada del DNA a les cèl·lules mitjançant la formació de precipitats de DNA-Ca<sup>2+</sup>. En primer lloc, per a cada transfecció s'inoculen 3x10<sup>6</sup> cèl·lules per placa de cultiu de 60 mm<sup>2</sup> (Corning ®) en un volum final de 5 ml i s'incuben 24 hores a 25°C. Es transfecta sempre un total de 20 µg de DNA per placa. El DNA que es transfecta ha de ser DNA obtingut a partir de maxipreparacions amb el kit de QIAGEN ®, per tal que sigui un DNA el més pur possible. Es posen els microlitres necessaris de cada plasmidi que cal transfectar (un total de 20 µg) en un volum final de 50 µl. Com que cada transfecció es fa per duplicat, les barreges s'escalen a 2,5 transfeccions. Es col·loquen les quantitats adequades de cada plasmidi, afegint, si fa falta, plasmidis buits per arribar als 20 µg de DNA, i s'ajusta el volum a 125 µl (50 µl x 2,5 transfeccions) amb H<sub>2</sub>O estèril. A la barreja de plasmidis i aigua s'afegeix 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,25 M esterilitzat per filtració. S'afegeix aquesta barreja gota a gota a un tub de 15 ml mentre es vortexa el tub de 15 ml, al qual prèviament se li ha afegit 1 ml de HEBS 2X (250 mM NaCl, 9 mM KCl, 1,5 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM D-Glucosa, 50 mM HEPES, pH 7.1) esterilitzat per filtració. Es produeixen d'aquesta manera uns petits precipitats d'aspecte blanquinós. S'incuben els precipitats 35 min a 25°C i un cop passat el temps, es ressuspenen els precipitats pipetejant diverses vegades. S'afegeixen 850 µl d'aquesta barreja a cada placa, gota a gota i procurant escampar-ho homogèniament. Posteriorment, es deixen les plaques a 25°C. Per a les transfeccions transitòries, generalment, s'incuben les plaques 48 hores a 25°C.

### **C.2.2.6. Interferència de la histona dH1 a cèl·lules SL2**

La depleció de la histona dH1 en cèl·lules SL2 de *D. melanogaster* ha estat duta a terme mitjançant el tractament de les cèl·lules amb un RNA de doble cadena dissenyat específicament per deplecionar la histona dH1, prèviament descrit [139]. Aquest sistema de depleció es basa en el mecanisme de l'RNA d'interferència i permet el silenciament gènic post-transcripcional de gens específics. L'ús d'aquesta tècnica en cèl·lules de *D. melanogaster* presenta molts avantatges. És tècnicament senzilla, eficaç i altament reproduïble. A més a més, els dsRNAs són internalitzats eficientment per les cèl·lules. No calen vectors per a que l'RNA de doble cadena entri dins la cèl·lula ja que les cèl·lules l'internalitzen directament dissolt en el medi de cultiu. Això permet evitar els problemes generats per la variabilitat de les eficiències de transfecció. En resum, es tracta d'un mètode altament efectiu per a determinar la funció de proteïnes de *D. melanogaster* [139].

El tractament de les cèl·lules SL2 amb l'RNA de doble cadena (Fig. 28) es duu a terme sota campana de cultius cel·lulars. En primer lloc, es realitza un comptatge cel·lular i s'agafa el volum de cultiu cel·lular corresponent a  $2,5 \times 10^6$  cèl·lules. A continuació es centrifuguen 10 minuts a 500g i un cop centrifugades es descarta el sobrenedant. Llavors, es resuspèn el pellet de cèl·lules en 2mL de medi de cultiu sense sèrum fetal boví que conté l'RNA de doble cadena desitjat de manera que quedin a  $1,25 \times 10^6$  cèl·lules/mL i es plaquegen els 2mL en una placa petita de 5mL de volum total. Aquestes plaques s'incuben durant 1 hora a 25°C. Passada la hora, s'agafen les plaques i s'hi afegeixen 3mL de medi de cultiu que conté sèrum fetal boví 5/3X vegades concentrat (41.6mL medi Schneider, 0.5mL penicil·lina-estreptomicina i 8.4mL de sèrum fetal boví) per a que en barrejar els 3mL amb els 2mL presents a la placa quedi a la concentració adequada per a un volum de 5mL. Finalment, les cèl·lules queden a una concentració cel·lular de  $5 \times 10^5$  cèl·lules/mL i s'incuben a 25°C entre 3 i 6 dies. Opcionalment, també es poden afegir noves dosis d'RNA per a potenciar la interferència. Per a la depleció de la histona dH1 a cèl·lules SL2 es va utilitzar una dosi inicial d'RNA de doble cadena de 100µg i es va incubar les cèl·lules durant 72 hores a 25°C. Passats els tres dies, es va afegir una nova dosi de 100µg i es va retornar les cèl·lules a l'incubador durant tres dies més. El dia 7 s'agafen les cèl·lules i es dilueix el cultiu a la meitat amb medi de cultiu normal per a mantenir el cultiu en creixement exponencial i s'hi afegeix una última dosi de 100µg d'RNA. Les cèl·lules s'incuben durant 24 hores més a 25°C i el dia següent es recullen les cèl·lules interferides. El mateix tractament es va utilitzar en les interferències control contra el gen LacZ.



**Figura 28. Depleció de la histona dH1 en cèl·lules en cultiu.** Es mostra un esquema del tractament amb RNA de doble cadena contra histona dH1 seguit per deplecionar la histona dH1 a cèl·lules SL2.

### C.2.2.7. Immunolocalització a cèl·lules SL2 adherides a una matriu de concanavalina

Com que les cèl·lules SL2 són semiadherents, una opció per dur a terme immunolocalitzacions consisteix en fixar-les sobre un cobreobjectes tractat amb concanavalina-A, una lectina procedent de la mongeta *Canvalia ensiformis* que facilita la immobilització de les cèl·lules. En primer lloc, es netegen cobreobjectes rodons amb etanol absolut i es deixen assecar. A continuació, s'afegeixen 50 µL de concanavalina-A (0,5 mg/ml) (Sigma) al damunt dels cobreobjectes rodons i es deixen a temperatura ambient durant 15 minuts. Passat aquest temps, es retira l'excés de concanavalina-A dels cobreobjectes i es deixa assecar la concanavalina-A durant 1 hora aproximadament també a temperatura ambient. Acte seguit, es posen els cobreobjectes dins els pous d'una placa de 24 pous d'1.6 cm de diàmetre cadascun (Corning) i s'hi afegeix 1mL de medi Schneider sense penicil·lina-estreptomicina ni sèrum fetal boví. Un cop fet això, es recullen les cèl·lules i es centrifuguen 10 minuts a 500g. Acte seguit es descarta el sobrenedant i es resuspenden les cèl·lules en 5mL PBS1X. De nou, es centrifuguen i es tornen a resuspendre en PBS1X, aquest cop en 1mL. Després, s'afegeixen aproximadament 1-5x10<sup>5</sup> cèl·lules a cadascun dels pous que contenen els cobreobjectes coberts per 1mL de medi Schneider i es deixa que les cèl·lules s'adhereixin durant 1 hora aproximadament a temperatura ambient. Un cop adherides, es retira el líquid dels pous i es renten amb 1mL de PBS1X durant 10 minuts en agitació. Passat aquest temps, es retira el PBS1X i es fixen les cèl·lules afegint 300 µL de paraformaldehid al 4% en PBS1X als pous. S'incuben durant 15 minuts sense agitació a temperatura ambient i després d'aquest temps es retira el fixador. Tot seguit, es renten durant 15 minuts amb 1mL de PBS1X i dues vegades més amb 1mL de PBS1X-tritóX100 0.3%-BSA 0.2% durant deu minuts. Quan es duen a terme immunotincions contra híbrids d'RNA:DNA utilitzant l'anticòs S9.6, previ als dos rentats amb PBS1X-tritóX100 0.3%-BSA 0.2% es duu a terme un rentat extra de 5 minuts amb SDS 0.5% en PBS1X amb agitació. A continuació, s'afegeixen 200-300µL d'anticòs primari a la dilució corresponent en PBS1X-tritóX100 0.3%-BSA 0.2% als pous i s'incuba les cèl·lules 1 hora a temperatura ambient o tota la nit a 4°C en agitació. Passat aquest temps, es renten

tres vegades amb 1mL de PBS1X-tritóX100 0.3%-BSA 0.2% durant deu minuts. Tot seguit, s'afegeixen 300µL de l'anticòs secundari corresponent diluït 1:400 en PBS1X-tritóX100 0.3%-BSA 0.2% als pous i s'incuba les cèl·lules durant 1 hora a temperatura ambient en agitació. Passat aquest temps, es realitzen dos rentats de 10 minuts amb 1mL de PBS1X-tritóX100 0.3% i dos rentats més de 10 minuts amb 1mL de PBS1X. Per acabar, es munten els cobreobjectes en portaobjectes afegint 3-5µL de solució DAPI-Mowiol (DAPI 0.2 ng/µL en Mowiol (Calbiochem-Novabiochem)).

Les preparacions han estat analitzades per microscòpia confocal mitjançant els microscopis Leica TCS SPE i Leica TCS SP2.

### **C.2.2.8. Immunolocalització a cèl·lules SL2 impactades**

Una altra tècnica per dur a terme preparacions de cèl·lules SL2 consisteix en centrifugar les cèl·lules sobre un cobreobjectes mitjançant una citocentrífuga. A diferència de les preparacions obtingudes adherint les cèl·lules a una matriu de concanavalina-A, on es poden visualitzar les cèl·lules en les tres dimensions, aquesta metodologia comprimeix tot el volum cel·lular pràcticament en un únic pla degut a la força centrífuga. Aquesta tècnica és molt utilitzada per a l'obtenció de preparacions nuclears.

En primer lloc, es munten uns embuts especials dissenyats per funcionar amb la citocentrífuga damunt els portaobjectes que permeten concentrar les cèl·lules en una àrea concreta de la superfície de vidre del portaobjectes en aplicar-hi la força centrífuga. A continuació, s'afegeixen 300 µL de cultiu cel·lular a 1 mL de solució hipotònica (glicerol 50mM, KCl 5mM, NaCl 10mM, CaCl<sub>2</sub> 0.8mM, sacarosa 10mM) i s'incuben durant exactament 5 minuts a temperatura ambient. Immediatament després, s'afegeixen 200 µL de la barreja a cadascun dels embuts prèviament muntats damunt dels portaobjectes. Tot seguit, es centrifuga les cèl·lules damunt els portaobjectes en una citocentrífuga a 500 rpm durant 10 minuts. Un cop centrifugades, es retiren els embuts i es deixa assecar les cèl·lules damunt els portaobjectes entre 30 minuts i 1 hora. Després d'això, s'afegeixen 50 µL de paraformaldehid al 4% en PBS1X damunt l'àrea del portaobjectes on es troben les cèl·lules i s'incuben durant 15 minuts. Passat aquest temps, es retira el fixador i es renten els portes en una coplin jar durant 10 minuts amb PBS1X. A continuació, es realitzen dos rentats més de 10 minuts en PBS1X-Tween20 0.5%-BSA2% en una coplin jar. Quan es duen a terme immunotincions contra híbrids d'RNA:DNA utilitzant l'anticòs S9.6, previ als dos rentats amb PBS1X-Tween20 0.5%-BSA2% es duu a terme un rentat extra de 5 minuts amb SDS 0.5% en PBS1X amb agitació. Després d'aquests rentats, les preparacions s'incuben en cambra humida amb l'anticòs primari a la dilució corresponent en PBS1X-Tween20 0.5%-BSA2% 1 hora a temperatura ambient o tota la nit a 4°C. Un cop incubades amb l'anticòs primari, es renten les preparacions en una coplin jar amb PBS1X-Tween20 0.5%-BSA2% durant 10 minuts dues vegades. Tot seguit, s'incuben de nou en cambra humida amb l'anticòs secundari corresponent diluït 1:400 en PBS1X-Tween20 0.5%-BSA2% durant 45 minuts. Passat aquest temps, es renten de nou en una cubeta de portaobjectes amb PBS1X-Tween20 0.5%-BSA2% durant 10 minuts dues vegades i una última vegada en PBS1X durant 10

minuts. Finalment, es munten els cobreobjectes sobre els portaobjectes amb 5-10 $\mu$ L de solució DAPI-Mowiol (DAPI 0.2 ng/ $\mu$ L en Mowiol (Calbiochem-Novabiochem)).

Les preparacions han estat analitzades per microscòpia confocal mitjançant els microscopis Leica TCS SPE i Leica TCS SP2.

### C.2.2.9. Anàlisi del cicle cel·lular

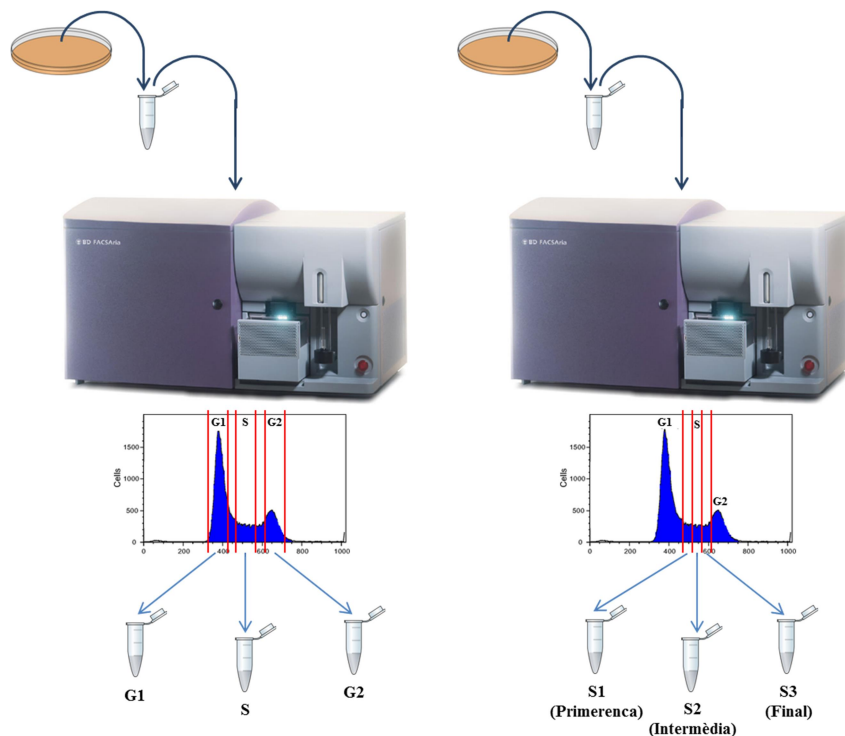
Per fer l'anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux, primerament cal fixar les cèl·lules amb etanol i seguidament marcar-les amb iodur de propidi [140]. La tinció amb iodur de propidi proporciona informació sobre el contingut de DNA i permet distingir i quantificar, mitjançant la utilització d'un citòmetre de flux, la distribució de cèl·lules al llarg de les diferents fases del cicle cel·lular. En primer lloc, cal fixar les cèl·lules amb etanol. Per fer-ho, es prepararen 4,5 ml d'etanol al 70% en tubs de 5 ml i es deixen en gel perquè estiguin els tubs freds. Es recullen 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> cèl·lules en un tub de 15 ml i es centrifuguen a 200 g 5 minuts. A continuació, es retira el sobrenedant i es ressuspenen amb 5 ml de PBS 1X. De nou, es centrifuguen 5 minuts a 200 g i es ressuspen el sediment cel·lular amb 0,5 ml de PBS 1X donant copets amb el dit. Finalment, s'afegeix la solució amb les cèl·lules gota a gota amb una pipeta Pasteur al tub amb l'etanol 70% fred per evitar agregats.

A partir d'aquí, es poden guardar setmanes a 4 °C. El dia que s'han de dur al citòmetre, es marquen amb iodur de propidi abans de dur-les-hi. Primer de tot, les cèl·lules es centrifuguen amb l'etanol 70% durant 5 min a 200 g. Acte seguit, es decanta l'etanol i les cèl·lules es ressuspenen en 5 ml de PBS 1X donant cops amb el dit. S'espera 1 min i es tornen a centrifugar els tubs 5 min a 200 g. A continuació, es ressuspen el sediment amb 1 ml de solució IP/tritóX100/RNasa (iodur de propidi 20 $\mu$ g/ml, RNasa A DNasa-free 0.2 mg/ml, tritó X100 0.1% en PBS1X) i es deixen els tubs 15 min a 37°C, o bé 30 min a temperatura ambient. Finalment, es duu a terme l'anàlisi de les mostres en el citòmetre de flux. Les mostres han estat analitzades mitjançant la utilització d'un citòmetre de flux *Coulter Epics-XL* dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona. Es va fer servir el làser argó blau (488 nm, 15 mW) i es va detectar la fluorescència a 665-685 nm.

### C.2.2.10. Separació de les cèl·lules segons la fase del cicle cel·lular

La separació de les cèl·lules en funció de la fase, o subfases, del cicle cel·lular en que es troben les cèl·lules ha estat duta a terme utilitzant un citòmetre de flux *BD FACSAria* (Beckman-Coulter) (Fig. 29). Aquest aparell permet separar les cèl·lules en funció de la intensitat del marcatge fluorescent que presenten. Per exemple, aquest sistema es pot utilitzar per separar cèl·lules que expressen GFP de cèl·lules que no n'expressen, cèl·lules en que es pot detectar una proteïna concreta de cèl·lules en que aquesta proteïna no hi és mitjançant immunodetecció amb anticossos secundaris fluorescents, o cèl·lules en funció de la quantitat de DNA tenyint-les amb molècules fluorescents que permeten tenyir el DNA. En aquest treball, aquesta metodologia ha estat emprada per separar les

cèl·lules en funció de la quantitat de DNA, marcat amb iodur de propidi o DAPI, segons les necessitats de cada cas.



**Figura 29. Separació cel·lular per citometria de flux.** Es mostra un esquema sobre com es van separar les cèl·lules atenent a la fase del cicle cel·lular, o subfases, en que es trobaven.

El procediment previ a sotmetre les cèl·lules a la separació mitjançant aquest aparell és el mateix que el que es duu a terme per a realitzar un anàlisi del cicle cel·lular. Breument, es fixen les cèl·lules en etanol 70% fred, es tenyeix el DNA i es sotmet la mostra a l'anàlisi per citometria de flux. Per evitar creuaments entre la fluorescència del iodur de propidi i la de fluorocroms com la cianina 3 a l'hora de dur a terme immunolocalitzacions sobre cèl·lules prèviament separades per citometria de flux, el DNA de les cèl·lules es va tenyir amb DAPI i la separació d'aquestes es va dur a terme atenent al perfil cel·lular obtingut en aquestes condicions. A diferència de la tinció amb iodur de propidi, la tinció del DNA amb DAPI no requereix l'ús d'RNasa A donat que únicament reacciona amb el DNA.

En aquest cas, simplement s'incuben les cèl·lules amb 1 ml de solució de DAPI/tritoX100 (DAPI 1 µg/ml, TritóX100 0.1% en PBS1X) durant 15 minuts abans de sotmetre-les a citometria de flux.

Donat que la fase del cicle cel·lular més limitant quan al número de cèl·lules que es poden obtenir en separar-les és la fase S, es va establir que la quantitat mínima de cèl·lules de fase S obtingudes havia de ser al voltant de  $10^6$  per a les anàlisi mitjançant *Western Blot* i de  $10^5$  per als experiments d'immunolocalització. Per a la separació de les cèl·lules de fase S en inicial, mitjana i final, la fase S es va subdividir en tres finestres igualment amples. En aquest cas, es van separar  $10^5$  cèl·lules per cadascuna de les subfases aproximadament que posteriorment es van utilitzar per a experiments d'immunolocalització.

### C.2.3. Tècniques utilitzades amb cèl·lules SL2 en cultiu

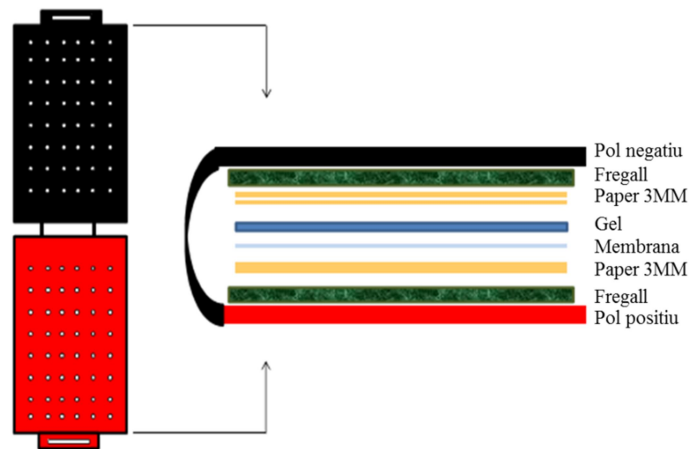
#### C.2.3.1. Electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

L'electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) és una tècnica que permet separar proteïnes segons el seu pes molecular. L'SDS és un detergent que desnatura les proteïnes i les cobreix amb càrregues negatives, eliminant així els possibles efectes de la càrrega intrínseca de cada proteïna. En un camp elèctric, totes les proteïnes migren cap al pol positiu i cada una es separa en funció del seu pes molecular. Els gels de poliacrilamida-SDS estan formats per dues fases: la fase superior o gel apilador i la fase inferior o gel separador. Cada fase presenta un pH i un percentatge d'acrilamida diferent. La fase apiladora (acrilamida: bisacrilamida 29:1 (40%) 4 %, Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1 %, persulfat amònic (PSA) 10% 6 µl/ml solució, TEMED 3µl/ml solució) permet apilar les proteïnes de les mostres abans de la separació i el gel separador (10%: acrilamida: bisacrilamida 29:1 (40%) 10 %, Tris-HCl 0.125M pH 8.7, SDS 0.1 %, 6 µl persulfat amònic (PSA) 10% per ml solució, 3µl TEMED per ml solució) és el que separa les proteïnes segons el seu pes molecular. Tots els gels d'aquest treball han estat realitzats amb un percentatge del 4% pel gel apilador i un percentatge variable entre el 10% i el 18% de gel separador segons la mida de la proteïna d'interès. Es munta el sistema de vidres, separadors pines i gomes Miniprotean (BioRad). Posteriorment es prepara la solució pel gel separador al percentatge necessari per separar les proteïnes d'interès. S'afegeix la solució del gel separador entre els dos vidres, i s'afegeix isopropanol per facilitar la polimerització de l'acrilamida. Es deixa un temps fins que el gel separador polimeritzi. Un cop solidificat, es treu l'isopropanol, i es renta amb aigua MilliQ. S'afegeix la solució del gel apilador, es col·loca la pinta per formar els pous i carregar les mostres en el gel. Un cop polimeritzat el gel apilador, es retira la pinta i es munten els vidres en una cubeta d'electroforesi vertical amb tampó Laemmli 1X (SDS 0,1 %, Glicina 200 mM, Tris-base 25 mM pH 8,3-8,5). A les mostres se'ls afegeix tampó de càrrega desnaturant de proteïnes PLB 5X (Protein Loading Buffer; Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 21,75 %, SDS 5 %, blau de bromofenol 0,25 %) i β-mercaptoetanol (1,5 M final), s'escalfen els tubs 5 min a 95°C i immediatament es carreguen les mostres en els pous. L'electroforesi es fa a 25 mA, i voltatge il·limitat, utilitzant com a tampó Laemmli 1X. Un cop migrades les proteïnes, es descarta el gel apilador i el gel separador es transfereix a una membrana de nitrocel·lulosa per a dur a terme un assaig de *western blot*.

#### C.2.3.2. Transferència de proteïnes (*Western blot*)

La tècnica de *western blot* permet la detecció de proteïnes presents en un gel de poliacrilamida-SDS transferit a una membrana de nitrocel·lulosa mitjançant l'ús d'anticossos específics. Un cop s'ha fet l'electroforesi SDS-PAGE, es transfereix el gel a una membrana de nitrocel·lulosa Optitran (Schleicher & Schuell). Per fer la transferència cal muntar els diferents

elements de la transferència seguint un ordre concret tal i com es mostra en l'esquema de la figura 30 tenint en compte que les proteïnes avancen cap al pol positiu.



**Figura 30.** Esquema del muntatge dels diferents elements per a la transferència de proteïnes. Es mostra el sistema utilitzat per transferir les proteïnes del gel a la membrana.

El pas de transferència es realitza en una cubeta amb tampó de transferència (Tris-base 25 mM, glicina 40 mM, SDS 0,05 %, metanol 20 %) i aplicant un voltatge de 80 V durant 3 hores a 4°C amb agitació constant. Un cop finalitzada la transferència, s'incuba la membrana des d'una hora a tota la nit amb solució de bloqueig (llet desnatada en pols 5 %, Tween 20 0,1 % en PBS 1X) per tal d'evitar la unió inespecífica dels anticossos a la membrana. Posteriorment, es fa un rentat de 5 min amb PBST (Tween 20 0,1 % en PBS 1X) i s'incuba amb l'anticòs primari diluït en PBST, a la concentració requerida per cada anticòs durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació constant. Seguidament, es fan 3 rentats de 5 min amb PBST i s'incuba la membrana amb l'anticòs secundari diluït amb PBST a la concentració adequada durant 1 hora, a temperatura ambient i en agitació constant. Finalment, es fan 5 rentats de 5 min amb PBST i es procedeix a la detecció del senyal mitjançant quimioluminescència. En el cas de les immunodeteccions de fosforilacions de proteïnes, enlloc de PBST (Tween 20 0,1 % en PBS 1X) s'utilitza TBST (Tween 20 0,1 % en TBS 1X) durant tot el procés.

Per a la detecció de l'anticòs secundari conjugat a la peroxidasa de rave (HRP) es barregen volums iguals de la solució de luminol i la solució de peròxid de la casa comercial EMD Millipore, s'apliquen sobre la membrana i s'incuben 1 min. Finalment, s'asseca la membrana i s'exposa amb una pel·lícula fotogràfica Curix RP2 (Agfa) el temps adient per obtenir un senyal òptim i es revela en una màquina de revelat automàtic Hyperprocessor (Amersham).

### **C.2.3.3. Rentat de membranes de western blot (stripping)**

En algunes ocasions, per tal de poder revelar més d'un cop amb diferents anticossos una mateixa membrana de *western blot* que ja ha estat revelada anteriorment, cal eliminar els anticossos



primaris i secundaris que es troben units a la membrana. Aquest procés s'anomena *stripping*. Per fer el rentat de la membrana, es situa la membrana dins un recipient que tanqui bé, es cobreix la membrana en solució stripping ( $\beta$ -mercaptoetanol 100mM, SDS 2%, Tris 62.5 mM pH6.7), es tapa el recipient i s'incuba dins un bany d'aigua a 50°C durant 30 min. Es descarta la solució d'*stripping* i es fan dos rentats de la membrana amb PBST. Després dels rentats, la membrana està a punt per començar de nou el protocol de western blot amb una altra combinació d'anticossos.

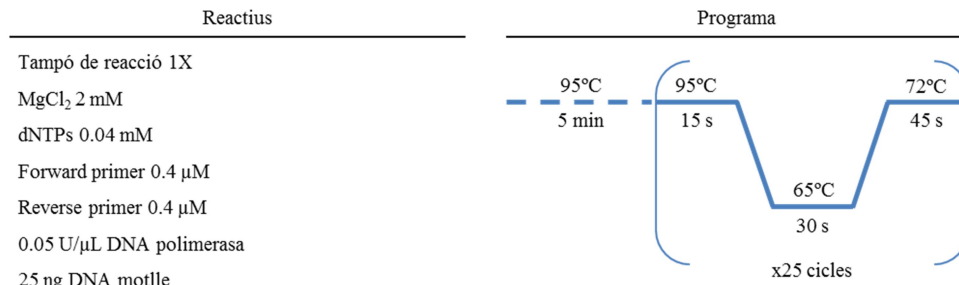
### **C.2.3.4. Tinció amb solució roig de Ponceau**

És un mètode de tinció de membranes de *western blot* ràpid inespecífic i reversible per localitzar les bandes de les proteïnes transferides a la membrana de nitrocel·lulosa abans de seguir amb la immunodetecció de les proteïnes a la membrana. La tinció amb vermell Ponceau produeix una tinció de bandes de color vermell-rosat. És una tinció que s'uneix de manera feble i no té efectes deleteris en la membrana. La membrana s'incuba durant 15 min en agitació amb Ponceau diluït 1:5 amb aigua i posteriorment es destenyeix la membrana amb aigua destil·lada fins que el fons queda net i les bandes queden contrastades. Finalment la tinció es pot eliminar totalment i continuar amb el procés d'immunodetecció de les proteïnes.

### **C.2.3.5. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) de l'anglès *Polymerase Chain Reaction* és una tècnica que té per objectiu obtenir un gran nombre de còpies d'un fragment de DNA, partint d'una quantitat mínima. Aquesta tècnica es fonamenta en la propietat natural de la DNA-polimerasa per replicar fragments de DNA. Consisteix en un procés cíclic de desnaturalització del DNA i d'amplificació de les dues cadenes resultants, de manera que a cada cicle d'amplificació el nombre de cadenes de DNA es duplica. Actualment s'utilitzen polimerases termostables, encarregades de la replicació del DNA d'organismes adaptats a altes temperatures que mostren una activitat òptima a elevades temperatures, característica imprescindible per assegurar l'especificitat de la reacció. La DNA polimerasa és capaç de sintetitzar DNA bicatenari a partir de DNA monocatenari, que serveix com a motllo. Per a que l'amplificació tingui lloc, cal que petits fragments de DNA monocatenari anomenats encebadors o oligonucleòtids, s'uneixin als extrems de la seqüència que es vol amplificar. Cada encebador és complementari a una de les cadenes de DNA i a partir de la unió dels encebadors es pot començar a sintetitzar la nova cadena sobre la cadena motllo. Per a que aquests encebadors s'uneixin de forma específica es realitza un aparellament (*annealing*) a una temperatura elevada, de manera que s'eviten les unions inespecífiques. Un cop els encebadors s'han unit a la seva seqüència complementària, la polimerasa pot començar el procés d'amplificació, que és dependent d'ATP i  $Mg^{2+}$ , afegint desoxiribonucleòtids a l'extrem 3' de l'encebador. Aquest procés es produeix de forma cíclica gràcies a un aparell termociclador, que condueix canvis molt ràpids de temperatura de la

mostra. S'ha de tenir en compte que per a cada parell d'encebadors s'ha d'ajustar la temperatura d'aparellament o annealing i que variar aquesta temperatura, així com la concentració de  $MgCl_2$  a la reacció pot fer variar la seva especificitat i eficiència.



**Figura 31. Reactius i programa utilitzats per amplificar els fragments de DNA corresponents al gen de la histona dH1 i LacZ.** A l'esquerra, es mostren els reactius i les respectives concentracions a que han estat utilitzats i, a la dreta, el programa utilitzat per a l'amplificació.

Per poder dur a terme la síntesi de dsRNA, en primer lloc, s'amplifica mitjançant una reacció de PCR la regió del DNA que es vol obtenir en forma d'RNA de doble cadena (Fig. 31). En aquests casos, la reacció de PCR es va dur a terme amb la DNA polimerasa de la casa comercial BIOTOOLS d'acord amb les indicacions del fabricant. Per a obtenir el fragment de DNA corresponent al gen de la histona dH1 es va utilitzar DNA genòmic purificat de cèl·lules SL2 com a DNA motlle i una parella de primers prèviament descrita [141] per a la reacció de PCR. En canvi, per a obtenir el fragment de DNA control corresponent al gen LacZ es va utilitzar com a DNA motlle el plàsmid pBluescript-SK i una parella de primers dissenyada al nostre laboratori per amplificar una regió del gen LacZ. A la figura X es poden veure els reactius i els diferents passos de temperatura del termociclador d'aquestes reaccions de PCR.

### C.2.3.6. Síntesi d'RNA de doble cadena

La síntesi d'RNA de doble cadena d'una seqüència genòmica concreta depèn de la capacitat de generar transcrits en gran quantitat d'aquesta regió. Per aquesta raó, normalment, primer de tot es dissenyen primers per amplificar un fragment del gen que es vol depleccionar mitjançant una reacció de PCR. A 5' dels primers s'hi afegeix la seqüència promotora mínima del bacteriòfag T7. Això permet amplificar una regió concreta del genoma i obtenir molts fragments de DNA de la regió desitjada amb el promotor del bacteriòfag T7 a 5'. Finalment, aquests fragments s'incuben amb una barreja que conté l'RNA polimerasa del bacteriòfag T7. Aquest enzim transcriu amb una alta eficiència les seqüències de DNA amplificades que contenen el promotor T7 a 5' i això permet obtenir una elevada quantitat d'RNA contra una regió genòmica concreta.

Un cop amplificat el fragment de DNA desitjat amb el que generar l'RNA de doble cadena, s'agafen directament 8  $\mu$ L de la reacció de PCR i s'hi afegeixen 2  $\mu$ L dels reactius per a la síntesi de l'RNA de doble cadena del kit MEGAscript® T7 Transcription Kit de la companyia *Ambion*,

*ThermoFisher Scientific*. Acte seguit, les reaccions de transcripció es deixen tota la nit a 37°C. El matí de l'endemà s'afegeix 1µL de l'*RNasa Turbo* del kit a les reaccions de transcripció i es deixen 15 minuts a 37 °C. Finalment, l'RNA de doble cadena es purifica utilitzant columnes de purificació del kit *RNAeasy Mini Kit* de *QIAGEN*, d'acord amb les indicacions del fabricant. L'RNA purificat es quantifica, aliquota i guarda congelat a -20°C fins a ser utilitzat.

### **C.2.3.7. Extracció i purificació d'RNA total**

Per a realitzar una extracció d'RNA total de cèl·lules SL2 s'ha utilitzat un protocol que combina la utilització de Trizol ® per a l'extracció d'RNA, el Kit d'extracció d'RNA RNeasy mini KIT Qiagen ® per la purificació d'aquest RNA i una precipitació final de l'RNA per eliminar impureses que s'arrastren de les columnes del kit i així deixar l'RNA el més net possible. Extracció d'RNA total: s'afegeixen 500 µl de Trizol ® en el tub amb els discos imaginals (si els discos estan congelats a -80°C cal deixar el tub en gel fins que es descongelin abans d'afegir el Trizol ®). S'homogeneïtza uns 10 cops amb un homogeneïtzador per a tubs eppendorf i es deixa el tub 5 min a temperatura ambient. S'afegeixen 100µl de cloroform, es vortexa 10 segons i es deixa reposar el tub 5 min a temperatura ambient. Es centrifuga a 4°C durant 15 min a 13000 rpm. S'agafa la fase aquosa superior i es passa a un tub nou de 1,5 ml (es treuen uns 170 µl de fase aquosa, no s'ha d'apurar al màxim la fase). Es reserva el tub en gel. Purificació d'RNA amb el Kit RNAeasy mini Kit Qiagen ®: dins el tub que tenim reservat en gel, s'afegeixen 3,5 volums referents al que s'ha agafat de fase aquosa de solució RLT (tampó de lisi) del Kit i es vortexa (si s'ha tret 170 µl de fase aquosa caldrà afegir 595µl de solució RLT). Seguidament s'afegeixen 2,5 volums referents a la fase aquosa d'etanol absolut i es vortexa (si s'ha tret 170 µl de fase aquosa caldrà afegir 425µl d'etanol). Es preparen les columnes del kit i s'afegeixen 600 µl (màxim volum que accepta la columna) de la barreja del tub a la columna. Es centrifuga durant 30 segons a 13000 rpm i es repeteix el procés tants cops com sigui necessari fins que tot el volum de la barreja del tub hagi passat per la columna. Es renta 3 vegades la columna amb 500 µl de solució RPE (solució per rentar l'RNA en les columnes). Entre rentat i rentat s'ha de centrifugar 30 segons a 13000 rpm. S'asseca la columna centrifugant 2 min a 13000 rpm i finalment s'elueix la columna amb 30 µl d'aigua MilliQ.

### **C.2.3.8. Transcripció reversa de l'mRNA**

La reacció en cadena de polimerasa amb transcripció reversa (RT-PCR, de l'anglès *Reverse transcription polymerase chain reaction*) és una variant de la PCR que permet realitzar amplificacions d'RNAs específics. En l'RT-PCR, l'RNA es retrotranscriu a DNA complementari (cDNA) gràcies a un enzim DNA polimerasa/RNA-dependent, la retrotranscriptasa o transcriptasa reversa, que utilitza la cadena d'RNA com a motlle per a generar la cadena complementària de DNA. Aquest DNA

resultant, s'amplifica posteriorment mitjançant PCR convencional. Perquè la transcriptasa reversa pugui afegir dNTPs, cal que hi hagi uns encebadors units a la cadena d'RNA que es vol amplificar.

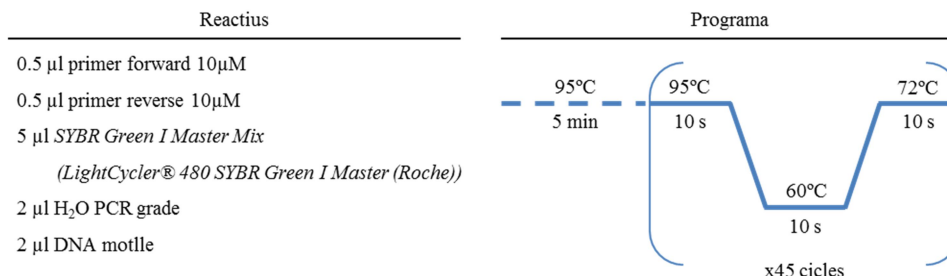
Aquestes reaccions es van dur a terme amb el *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* de Roche, d'acord amb les indicacions del fabricant, utilitzant *random primers* en totes les ocasions.

### C.2.3.9. Reacció quantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR)

L'anàlisi quantitatiu d'una regió concreta del genoma sovint es duu a terme mitjançant una reacció quantitativa en cadena de la polimerasa. A diferència d'una PCR convencional, aquesta tècnica permet inferir la quantitat de DNA d'una regió genòmica específica. Per aquesta raó, és una tècnica àmpliament utilitzada per assajos d'expressió gènica o immunoprecipitació de la cromatina.

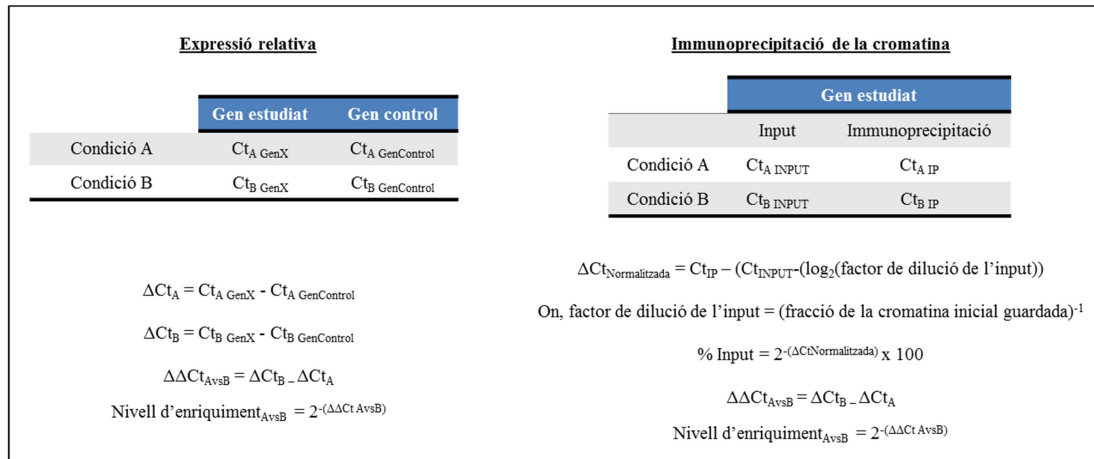
Existeixen diverses metodologies lligades a reaccions de PCR que permeten determinar la quantitat de DNA inicial de la mostra. La més àmpliament utilitzada es basa en monitoritzar la reacció de PCR amb el tint SYBR Green I. Aquest tint presenta la propietat que quan s'intercala en el DNA de doble cadena, la seva fluorescència incrementa notablement. Aquesta tècnica, per tant, es basa en el fet que durant les diferents etapes de la reacció de PCR, la intensitat del senyal fluorescent variarà depenent de la quantitat de DNA de doble cadena present. Durant la fase d'anellament dels primers, aquests s'hibriden a la seva seqüència homòloga i formen petites regions de DNA de doble cadena en que s'intercala el SYBR Green I. Això fa que el senyal fluorescent augmenti lleugerament. A l'etapa d'elongació, es forma més DNA de doble cadena i, en conseqüència, més SYBR Green I es pot intercalar fent que el senyal fluorescent augmenti notablement. Al final de la fase d'elongació, tot el DNA ha esdevingut DNA de doble cadena i la màxima quantitat de tint s'intercala. La fluorescència es mesura (530 nm) al final de cada fase d'elongació.

En aquest treball, totes les anàlisis quantitatives de DNA mitjançant reaccions de PCR quantitatives han estat dutes a terme utilitzant la metodologia basada en la fluorescència del *SYBR Green I* amb un termociclador *LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche)*. En aquest cas, els components i el programa d'amplificació utilitzats han estat els següents (Fig. 32):



**Figura 32.** Reactius i programa utilitzats per amplificar els fragments de DNA en les reaccions de PCR quantitatives. A l'esquerra, es mostren els reactius i les respectives concentracions a que han estat utilitzats i, a la dreta, el programa utilitzat per a l'amplificació.

Quan s’ha analitzat els nivells d’expressió d’un gen, el càlcul del grau d’expressió sempre s’ha dut a terme de manera relativa respecte a una seqüència control mitjançant el mètode de càlcul estàndard de la  $\Delta\Delta Ct$  [142] (Fig. 33).



**Figura 33. Metodologia emprada per al càlcul de l’expressió gènica i la cromatina immunoprecipitada.** A l’esquerra, es mostren els càlculs emprats per a calcular l’expressió relativa d’un gen. A la dreta, es mostra com han estat calculat els percentatges de material immunoprecipitat i els nivells d’enriquiment.

Aquest mètode es basa en el creixement exponencial de la quantitat del DNA a cada cicle d’amplificació de la reacció de PCR, i permet expressar la quantitat de DNA de la regió genòmica d’estudi respecte una regió genòmica control i comparar els resultats entre diferents condicions. El mateix principi de la diferència entre Ct ha estat utilitzat per al càlcul dels percentatges de material immunoprecipitat. En aquest cas, però, es compara la quantitat de DNA immunoprecipitat respecte la quantitat de DNA inicial de l’input. Aquest sistema permet determinar el percentatge de material immunoprecipitat i comparar els valors obtinguts entre diferents condicions experimentals.

### C.2.3.10. Immunoprecipitació de la cromatina (ChIP)

Els experiments d’immunoprecipitació de la cromatina es van dur a terme bàsicament com està descrit a [46]. En tots els casos, es va partir de 5 plaques de cultiu de 60 mm<sup>2</sup> (Corning ®) amb 5 mL de cultiu cel·lular cadascuna, és a dir, d’un volum total de 25 mL (10<sup>8</sup> cèl·lules aproximadament).

Per dur a terme la immunoprecipitació de la cromatina, en primer lloc, s’afegeix formaldehid al 37% a les plaques de cultiu de manera que quedi a l’1% i s’incuben durant 10 minuts a temperatura ambient en agitació horitzontal. A continuació, s’afegeix glicina 1M pH 7.0 de manera que quedi a una concentració final de 0.125 M i s’incuben durant 5 minuts a temperatura ambient en agitació horitzontal. Passat aquest temps, s’aixequen les cèl·lules amb un scraper, es passen a un tub de 50 mL i es centrifuguen a 1500 rpm durant 10 minuts a 4°C. Tot seguit, es descarta el sobrenedant, es resuspenen les cèl·lules en 10 mL de PBS1X fred i es centrifuguen de nou a 1500 rpm durant 10

minuts a 4°C. Es repeteix aquest últim pas un cop més. Un cop rentades amb PBS1X, es descarta el sobrenedant, es resuspèn les cèl·lules en 1 mL de solució de lisi 1% SDS (SDS 1%, EDTA 10mM, Tris-HCl pH8.1 50mM, Inhibidor de proteases 1X (Sigma-Aldrich)) i es deixen en agitació circular a 4°C entre 10 i 30 minuts. Després d'això, es fan al·lotes de 300 µL en tubs de 1,5 mL i es sonica les mostres en un aparell *BioRuptor* durant 16 minuts (5, 6 i 5 minuts amb addició de gel entre ells i eliminació d'aigua) a màxima potència i en cicles de 30 segons actiu i 30 segons inactiu, per a obtenir fragments d'entre 500 pb i 1000 pb. Un cop sonicades, les mostres es centrifuguen a màxima velocitat durant 10 minuts a 4°C. Es recupera el sobrenedant i es descarta el pellet. Arribats en aquest punt, les mostres es poden guardar a -80°C.

Per determinar l'eficiència de la sonicació, s'afegeix 350 µL de tampó d'elució a 50 µL de mostra i es deixa tota la nit a 65°C. El dia següent, s'extreu el DNA amb 350 µL de fenol/cloroform i es precipita el DNA afegint 7 µL de poliacrilamida soluble 0.25% i 1 mL d'etanol absolut fred. Es desa les mostres 10 minuts en gel i acte seguit es centrifuguen a màxima velocitat durant 10 minuts. Per acabar, es retira el sobrenedant, es renta el pellet amb etanol 70%, es resuspen finalment en 50 µL de TE+RNasa A i s'incuba durant 10 minuts a 37°C. Passat aquest temps, ja es poden córrer les mostres en un gel d'agarosa per determinar si la sonicació ha funcionat correctament.

Un cop la cromatina ha estat entrecreuada i sonicada comença el procés de la immunoprecipitació. En primer lloc, es prepara la matriu a la que s'uniran els anticossos i permetrà enriquir la mostra en la diana de l'anticòs utilitzat. En aquest cas, s'han utilitzat esferes de sefarosa unides a proteïna A. Per a preparar la matriu, primerament es resuspenen 100 mg de proteïna A-sefarosa en 1 mL de solució de lisi 0.1% SDS (SDS 0.1%, EDTA 10mM, Tris-HCl pH8.1 50mM, Inhibidor de proteases 1X (*Sigma-Aldrich*)). A continuació, es barreja volums iguals de la suspensió de proteïna A-sefarosa amb albúmina de sèrum boví (*Sigma-Aldrich*) dissolta a 1mg/mL en TE1X. Es deixa en agitació circular durant 20 minuts a 4°C. Passat aquest temps, es centrifuga a 2000 rpm durant 2 minuts a 4°C, s'elimina el sobrenedant i s'afegeix 1 mL de solució de lisi 0.1% SDS a les esferes precipitades. Es repeteix els passos anteriors fins a 3 vegades. Finalment, les esferes estan llestes per a ser utilitzades. Alternativament, també es poden guardar a 4°C una setmana com a màxim.

Un cop preparada la solució amb les esferes de proteïna A-sefarosa, les mostres de cromatina sonicada es dilueixen 1:10 amb solució IP (SDS 0.01%, Triton X-100 1.1%, EDTA 1.2 mM, Tris-HCl 16.7 mM pH 8.0, NaCl 16.7 mM, Inhibidor de proteases 1X (*Sigma-Aldrich*)) de manera que quedi un volum final de 2,5 mL i es reparteix la mostra en 3 tubs, afegint 1 mL, 1mL i 0.5 mL a cada tub, respectivament. Els tubs amb 0.5 mL es guarden a -20°C i serviran per a determinar els inputs. A cada al·lota d'1 mL s'afegeixen 50 µL de solució de proteïna A-sefarosa diluïda prèviament a la meitat en solució de bloqueig (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM, BSA 1 mg/mL). Es deixa les mostres en agitació circular durant 30 minuts a 4°C i, passat aquest temps, es centrifuga les mostres a 3000 rpm durant 2 minuts a 4°C. Es recupera el sobrenedant de les mostres, s'hi afegeix la quantitat d'anticòs corresponent (en el cas de  $\gamma$ H2Av, 3µL de l'anticòs de la casa comercial *Rockland*) i s'incuba tota la nit a 4°C amb agitació circular.

El dia següent, s'afegeix 35 µL de proteïna A-sefarosa diluïda a la meitat en solució de bloqueig i s'incuba durant 2 hores a 4°C en agitació circular. Alternativament, també es pot fer 2h d'incubació amb l'anticòs i tota la nit amb la solució de proteïna A-sefarosa. Passat aquest temps, es centrifuga les mostres a 3000 rpm durant 5 minuts a 4°C i s'inicia els rentats de la fracció immunoprecipitada. En primer lloc, es renta el pellet amb 1 mL de solució de rentat 1 (SDS 0.1%, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM, TrisHCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM) durant 10 minuts en agitació circular. A continuació, es centrifuga de nou la mostra a 3000 rpm durant 5 minuts a 4°C i es descarta el sobrenedant. Es repeteix el pas anterior fins a 4 vegades més, realitzant els rentats amb solució de rentat 2 (SDS 0.1%, Triton X-100 1%, EDTA 2 mM, TrisHCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM) una vegada, solució de rentat 3 (LiCl 0.25M, NP40 1%, desoxicolat sòdic 1%, EDTA 1mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, PMSF 0.1 mM) una vegada i amb TE1X dues vegades més.

Finalment, es duu a terme l'elució i purificació del DNA immunoprecipitat. En primer lloc, s'afegeixen 40 µL de TE1X i 0.5 µL d'RNasa A 10 mg/ml a les esferes de safarosa rentades i s'incuba durant 30 minuts a 37°C. A continuació, s'afegeix 50 µL de NaHCO<sub>3</sub> 0.2 M i 10 µL d'SDS 10% i es vortexa a màxima potència entre 30 segons i 1 minut. Tot seguit, es centrifuga a màxima velocitat durant 30 segons i es guarda el sobrenedant (100 µL). S'afegeix 100 µL de tampó d'elució (SDS 1%, NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M) al pellet i es vortexa de nou entre 30 segons i 1 minut a màxima potència. De nou, es centrifuga a màxima velocitat durant 30 segons i es guarda el sobrenedant. Es repeteix aquest últim pas un cop més fins a obtenir un volum total final de 300 µL. El material eluït s'incuba llavors tota la nit a 65°C. El dia següent s'afegeix 3 µL de proteïnasa K 10mg/ml i s'incuba durant 3 hores a 55°C. Després d'aquest tractament, s'afegeix 300 µL de fenol/cloroform, es vortexa durant 30 segons i es centrifuga durant 5 minuts a màxima velocitat a temperatura ambient. Un cop centrifugades les mostres, s'agafa la fase aquosa i es passa a un tub nou. En aquest tub, s'hi afegeix 2 µL de pellet paint, 30 µL d'acetat sòdic 3 M i 700 µL d'etanol absolut fred, i es deixa precipitar el DNA tota la nit a -20°C. Alternativament, també es pot deixar entre 30 minuts i 1 hora a -80°C. A continuació, es centrifuga a màxima velocitat durant 15 minuts a 4°C. Es retira el sobrenedant i el pellet es renta amb 500 µL d'etanol 70% fred. De nou, es centrifuga a màxima velocitat a 4°C durant 10 minuts i finalment el pellet es resuspèn en 25 mil·lilitres d'aigua mil·liQ.

Pel que fa als inputs, s'agafa 100 µL d'input, s'hi afegeix 20 µL de TE1X i 0.5 µL d'RNasa A 10 mg/mL i s'incuba durant 30 minuts a 37°C. A continuació, s'afegeix 30 µL de SDS 10% i 150 µL de NaHCO<sub>3</sub> 0.2 M i s'incuba tota la nit a 65°C. A partir d'aquí, es purifica el DNA de la mateixa manera que amb el DNA immunoprecipitat.

### C.2.3.11. Anàlisi bioinformàtica de la seqüenciació del material immunoprecipitat

La preparació del material immunoprecipitat per a la seva seqüenciació ha estat duta a terme per la unitat de genòmica de l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona. La seqüenciació del material, però, ha estat externa. Finalment, l'anàlisi bioinformàtica de la seqüenciació del material

immunoprecipitat ha estat duta a terme essencialment per la unitat de bioinformàtica de l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona.

Posteriorment, les seqüències enriquides identificades han estat analitzades amb el software *RepeatMasker* (<http://www.repeatmasker.org>, web release 4) per a identificar elements repetitius putatius en les regions enriquides.

### **C.2.3.12. Immunoprecipitació d'híbrids RNA:DNA (DRIP)**

La immunoprecipitació dels híbrids RNA:DNA ha estat duta a terme essencialment tal i com està descrit a [124].

En primer lloc, es purifica DNA genòmic de cèl·lules SL2 i es quantifica. Un cop purificat i quantificat, s'agafa 50µg de DNA genòmic i es passen a un tub a part on s'hi afegeix 20 µL de TE10X i l'aigua que calgui fins aconseguir un volum final de 200 µL. A continuació, el DNA genòmic es sonica en un aparell *BioRuptor* durant 16 minuts (5, 6 i 5 minuts amb addició de gel entre ells i eliminació d'aigua) a màxima potència i en cicles de 30 segons actiu i 30 segons inactiu, per a obtenir fragments d'entre 500 pb i 1000 pb.

Un cop sonicat, s'agafa el volum corresponent a 15 µg i es distribueix en parts iguals en tres tubs, de manera que quedi 5 µg de DNA genòmic a cada tub. Un dels tubs serà l'input, un altre serà el tub en que es durà a terme la immunoprecipitació i l'últim serà el tub en que es durà a terme la immunoprecipitació de les mostres tractades amb RNasaH, com a control negatiu. Per aquesta raó, s'afegeix 3 µL d'RNasa H 2U/µL (*Invitrogen*) a un dels tubs. Per evitar possibles problemes indirectes derivats de tractaments diferents, a totes les mostres s'afegeix 10 µL de tampó de l'RNasa H 5X i el TE1X necessari fins a un volum de 50 µL, afegint però RNasaH únicament en els tubs que actuaran com a control negatiu. A continuació, tots els tubs són incubats a 37°C tota la nit.

El dia següent s'afegeix 500 µL de tampó d'unió (NaPO<sub>4</sub> 10mM, NaCl 140mM, Tritó X100 0.05%) a dos dels tubs. El tercer tub es guarda com a input a -20°C. Als altres dos, a més a més, s'hi afegeix 1 µL (~4 µg) d'anticòs S9.6 contra híbrids RNA:DNA i s'incuben tota la nit a 4°C en agitació circular.

L'endemà es prepara la matriu amb que s'immunoprecipitarà els complexos DNA-anticòs. En aquest cas, s'ha utilitzat *Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific)*. Per preparar les esferes unides a proteïna G es procedeix de la següent manera. En primer lloc, s'agafa un volum de 350 µL d'esferes i es deixen en agitació circular a 4°C durant 5 minuts. A continuació, es retira el sobrenedant, es resuspenen les esferes en 1 mL de tampó d'unió amb albúmina de sèrum boví 0.5% i s'incuben durant 10 minuts a 4°C en agitació circular. Es repeteix aquest últim pas fins a 3 vegades més. Finalment, les esferes unides a proteïna G es resuspenen en 300 µL de tampó d'unió i s'afegeix 35 µL a cadascun dels tubs amb el material a immunoprecipitar. Tot seguit, les mostres s'incuben durant 2 hores a 4°C en agitació circular.

Després d'això, es realitzen un total de 3 rentats de 10 minuts amb tampó d'unió a 4°C en agitació circular. A partir d'aquí, per a purificar el DNA immunoprecipitat de les mostres s'afegeix 100 µL



de tampó d'elució (Tris-HCl 50mM pH 8.0, EDTA 10mM, SDS 0.5%) i es vortexa a màxima potència entre 30 segons i 1 minut. Es recupera el sobrenedant i es repeteix el procés anterior fins a aconseguir un volum final de 300 µL. Pel que fa als inputs, s'agafa un 10% del material inicial previ a l'addició dels 500 µL de tampó d'unió (5 µL) i s'hi afegeix tampó d'elució fins a un volum total de 300 µL. En tots els casos, les mostres són tractades amb 7 µL de proteïnasa K 10mg/ml a 55°C durant 45 minuts i passat aquest temps es duu a terme la purificació del DNA igual com es realitza per a les immunoprecipitacions de cromatina.

<b>Immunoprecipitació d'híbrids RNA:DNA</b>				
	<b>Gen estudiat</b>		<b>Gen control</b>	
	Input	Immunoprecipitació	Input	Immunoprecipitació
Condicció A	$C_{t_{AINPUTGenX}}$	$C_{t_{AIPGenX}}$	$C_{t_{AINPUTGenControl}}$	$C_{t_{AIPGenControl}}$
Condicció B	$C_{t_{BINPUTGenX}}$	$C_{t_{BIPGenX}}$	$C_{t_{BINPUTGenControl}}$	$C_{t_{BIPGenControl}}$

$$\Delta C_{t_{NormalitzadaGenX}} = C_{t_{IPGenX}} - (C_{t_{INPUTGenX}} - (\log_2(\text{factor de dilució de l'input})))$$

On, factor de dilució de l'input = (fracció de la cromatina inicial guardada)<sup>-1</sup>

$$\% \text{ Input}_{GenX} = 2^{-(\Delta C_{t_{NormalitzadaGenX}})} \times 100$$
  

$$\Delta C_{t_{NormalitzadaGenControl}} = C_{t_{IPGenControl}} - (C_{t_{INPUTGenControl}} - (\log_2(\text{factor de dilució de l'input})))$$

On, factor de dilució de l'input = (fracció de la cromatina inicial guardada)<sup>-1</sup>

$$\% \text{ Input}_{GenControl} = 2^{-(\Delta C_{t_{NormalitzadaGenControl}})} \times 100$$
  

$$\Delta \Delta C_{t_{GenXvsGenControl}} = \Delta C_{t_{NormalitzadaGenX}} - \Delta C_{t_{NormalitzadaGenControl}}$$

$$\text{Nivell d'enriquiment}_{GenXvsGenControl} = 2^{-(\Delta \Delta C_{t_{GenXvsGenControl}})}$$
  

$$\Delta \Delta \Delta C_{t_{AvsB}} = \Delta \Delta C_{t_{AGenXvsGenControl}} - \Delta \Delta C_{t_{BGenXvsGenControl}}$$

$$\text{Nivell d'enriquiment}_{AvsB} = 2^{-(\Delta \Delta \Delta C_{t_{AvsB}})}$$

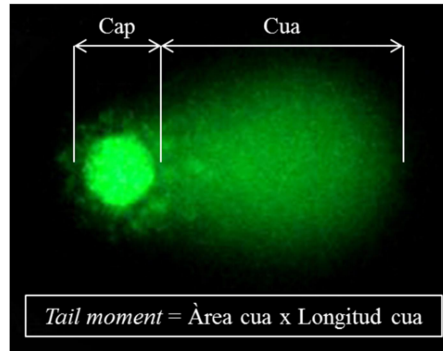
Figura 34. Metodologia emprada per al càlcul de la quantitat de material immunoprecipitat en els experiments de DRIP. Es mostren els càlculs emprats per determinar els percentatges de material immunoprecipitat i els nivells d'enriquiment.

A diferència de l'anàlisi dels resultats d'una immunoprecipitació de cromatina mitjançant una reacció en cadena quantitativa de la polimerasa convencional, en els experiments d'immunoprecipitació d'híbrids RNA:DNA generalment es referencia l'enriquiment pel que fa als híbrids RNA:DNA de cadascuna de les regions analitzades respecte una regió genòmica control (Fig. 34). En aquest treball, s'ha utilitzat com a regió genòmica control la zona promotora del gen *mthl12*, un dels gens que, d'acord al *microarray* d'expressió a cèl·lules SL2 no tractades dipositat sota el codi GSE49103, pràcticament no s'expressa a cèl·lules SL2.

### C.2.3.13. Comet Assay

La tècnica del *Comet Assay* o electroforesi de cèl·lules individuals permet determinar físicament la presència de trencaments de la cadena del DNA [143] (Fig. 35). Existeixen dues

variants, el *Comet Assay* alcalí, i el neutre. La variant alcalina de la tècnica permet determinar l'existència de trencaments de la cadena de DNA independentment que aquests siguin de cadena senzilla o doble. En canvi, la variant neutra únicament permet la detecció dels trencaments de doble cadena del DNA.



**Figura 35. Comet Assay.** Es mostra un exemple de cèl·lula amb dany al DNA en que el DNA danyat ha sortit de dins el nucli i ha migrat cap al pol positiu de la cubeta d'electroforesi. S'indica el cap i cua en aquesta estructura i el principal paràmetre utilitzat per quantificar el dany cel·lular.

Per a la realització dels experiments descrits en aquesta tesi doctoral, la tècnica va ser adaptada prèviament a cèl·lules SL2.

Per dur a terme aquesta anàlisi a cèl·lules SL2 es procedeix de la manera següent. Per començar, el mateix dia de l'experiment es preparen d'hora al matí suficients portaobjectes per poder realitzar l'experiment. És important destacar que per a la correcta adhesió de l'agarosa als portaobjectes cal utilitzar portaobjectes *Superfrost Plus (Thermo Scientific)* que permeten una major adhesió de l'agarosa.

En primer lloc, es prepara els portaobjectes cobrint-los amb agarosa de punt de fusió normal per la cara superior. Per fer-ho, es prepara uns 300 mL de solució d'agarosa de punt de fusió normal al 1,5-2% en PBS1X i es posa al microones fins que l'agarosa està completament dissolta. És important mantenir l'agarosa pocs minuts seguits dins el microones i anar traient-la i agitant-la de tant en tant per evitar un excés d'evaporació de l'aigua. Un cop dissolta, es deixa refredar una mica la solució fins que encara estigui calenta però no cremi. Aquest pas és crític donat que si l'agarosa està massa calenta no s'adherirà al portaobjectes i relliscarà per sobre. Quan l'agarosa ha adquirit la temperatura adequada, es suquen els portaobjectes completament fins a la regió en què es poden fer anotacions 3 o 4 vegades, introduint-los i traient-los de l'agarosa amb delicadesa. Un cop sucats, s'elimina amb un paper l'agarosa enganxada a la cara inferior dels portaobjectes i es deixen assecat a temperatura ambient en posició horitzontal amb la cara superior cap amunt. Paral·lelament, mentre l'agarosa dels portaobjectes s'asseca es prepara uns 10 mL d'agarosa de punt de fusió baix al 0.5% i al 1% en PBS1X. Igual que abans, per dissoldre l'agarosa es posa la solució al microones. En aquest cas, però, cal anar alerta ja que pocs segons són suficients per dissoldre l'agarosa. Un cop preparades, s'aliquoten en tubs d'1,5 mL i es deixen en un termoblock a 37°C per mantenir la solució d'agarosa en estat líquid.

A continuació, un cop l'agarosa dels portaobjectes està seca, es recullen les cèl·lules i es conta el número de cèl·lules de la mostra amb una cambra de Neubauer. És molt important mantenir les cèl·lules en la foscor en tot moment per evitar que l'exposició lumínica pugui danyar el DNA. Un cop determinada la concentració cel·lular, es centrifuga les cèl·lules a 500g 10 minuts a temperatura ambient i es resuspen el pellet a una concentració de  $10^6$  cèl·lules/mL en PBS1X fred. Tot seguit, es barregen 12  $\mu$ L d'aquesta solució que conté les cèl·lules amb 95  $\mu$ L d'agarosa de punt de fusió baix al 0.5%. Es barreja bé pipetejant amunt i avall i es distribueixen aquests 107  $\mu$ L equitativament per la cara del portaobjectes coberta amb agarosa. Tot seguit, es disposa un cobreobjectes de vidre de 24x60mm sobre l'agarosa de punt de fusió baix per estendre-la igualment per tota la superfície del portaobjectes i es porten els portaobjectes a 4°C durant 15 minuts per a que l'agarosa solidifiqui. Un cop solidificada, es treu el cobreobjectes amb compte i s'afegeix damunt la capa d'agarosa de punt de fusió baix recent solidificada 90  $\mu$ L d'agarosa de punt de fusió baix a l'1% per crear una nova capa d'agarosa de punt de fusió baix a l'1% sobre la capa al 0.5% que conté les cèl·lules. De nou, es col·loca un cobreobjectes de vidre damunt l'agarosa per a estendre-la equitativament per tota la superfície del portaobjectes i es porten les preparacions a 4°C durant 15 minuts. Passat aquest temps, es retira els cobreobjectes amb compte altre cop.

Un cop les cèl·lules estan atrapades dins la matriu d'agarosa, es tracta les cèl·lules amb una solució de lisi. Depenent de si es vol dur a terme la variant alcalina o neutra de la tècnica, les condicions del tractament són diferent. Si es vol dur a terme la variant alcalina, els portaobjectes es submergeixen en una solució de lisi alcalina (NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Trizma base 10mM, Sarcosil 1%, Tritó X100 1%, pH ajustat a 10) freda i s'incuben a 4°C entre 18 i 20 hores. En canvi, si es vol analitzar les mostres mitjançant la variant neutra, els portaobjectes es submergeixen en solució de lisi neutra (EDTA 0.5M, Proteinasa K 0.5mg/mL, Sarcosil 2%, pH ajustat a 8) i s'incuben a 37°C també entre 18 i 20 hores.

El dia següent, es realitzen tres rentats de 25 minuts amb solució d'electroforesi en les mateixes cubetes en que s'ha incubat els portaobjectes amb la solució de lisi. De nou, per al comet assay alcalí s'utilitza una solució d'electroforesi alcalina (NaOH 0.03M, EDTA 2mM, pH ajustat a 12.45) prèviament refredat a 4°C, mentre que per al neutre es fa servir solució d'electroforesi neutra (Tris 90mM, àcid bòric 90mM, EDTA 2mM, pH ajustat a 8.5) que es manté a temperatura ambient. A continuació, es disposa els portaobjectes horitzontalment en una cubeta d'electroforesi prèviament equilibrada amb la cara on hi ha l'agarosa cap amunt, s'omple la cubeta d'electroforesi amb el tampó d'electroforesi corresponent fins que els portaobjectes queden coberts per uns 1-2mm de tampó i es corre l'electroforesi. Les mostres analitzades en condicions alcalines es corren fixades a 15mA durant 25 minuts, mentre que les analitzades en condicions neutres es corren fixades a 5mA durant 25 minuts.

Després de l'electroforesi, es decanta l'excés de tampó d'electroforesi dels portaobjectes i es submergeixen en aigua en la mateixa cubeta utilitzada per a la lisi i els rentats. Immediatament, es decanta l'aigua i se n'afegeix de nova i es deixa durant 20 minuts. Passat aquest temps, es treuen de l'aigua i es decanta l'excés d'aigua dels portaobjectes. Llavors, s'afegeixen 300  $\mu$ L de Hoescht 10  $\mu$ g/mL en PBS1X sobre la capa d'agarosa i s'incuba durant 20 minuts. Passat aquest temps s'elimina

L'excés de *Hoescht* i es submergeixen els portaobjectes horitzontalment en 300 mL de PBS1X durant 5 minuts dues vegades. Alternativament també es poden fer els rentats amb aigua per eliminar soroll de fons, però això també fa disminuir lleugerament el senyal. Finalment, es posa un cobreobjectes i s'analitza la mostra al microscopi de fluorescència.

En aplicar aquesta tècnica, la presència de dany al DNA es tradueix en la formació d'una cua que emana del nucli cel·lular en direcció al pol positiu que conté el DNA trencat donant lloc a una estructura similar a un cometa, d'aquí el seu nom (Fig. 35). Existeixen diversos paràmetres associats a aquesta tècnica que permeten quantificar el dany al DNA. Entre ells, però, el més àmpliament utilitzat és el *tail moment* que no és res més que el producte del percentatge de DNA a la cua i la longitud de la cua. En aquest treball, l'anàlisi dels resultats del *comet assay* sempre s'ha dut a terme tenint en compte aquest paràmetre que ha estat calculat utilitzant el software CASP, dissenyat específicament per a l'anàlisi d'experiments de *comet assay* [144].

### **C.2.3.14. Assaig d'intercanvis entre cromàtides germanes (SCE)**

L'assaig d'intercanvis entre cromàtides germanes permet visualitzar al microscopi els intercanvis entre cromàtides germanes sense necessitat de fluorescència [145]. Es basa en la naturalesa semiconservativa de la replicació del DNA i la diferent tinció de giemsa que presenten cadascuna de les cromàtides germanes en funció de la quantitat de BrdU (5-bromo-2'desoxiuridina) que han incorporat. Després de dos cicles de replicació, una cromàtide germana conté BrdU en ambdues cadenes de la doble hèlix i presenta baixa tinció de giemsa, mentre que l'altra només conté BrdU en una de les dues cadenes de la doble hèlix i presenta una tinció de giemsa més intensa (Fig. 36).

Per a la realització dels experiments descrits en aquesta tesi doctoral, la tècnica va ser adaptada prèviament a cèl·lules SL2.

En primer lloc, les cèl·lules s'incuben amb BrdU 20 µg/mL (Sigma) durant 48 hores, el temps necessari per a que es completin dos cicles de replicació del DNA, en una estufa a 25°C i a la foscor per minimitzar la fotòlisi del BrdU. Al cap dels dos dies, primer de tot, s'afegeix colcemida (*Roche*) al medi de cultiu de manera que quedi a 0.5µg/mL i s'incuba les cèl·lules durant 5-6 hores per a maximitzar el nombre de mitosis obtingudes al final del procés. Passat aquest temps, les cèl·lules es recullen, i es barreja 300 µL de cultiu cel·lular amb 1 mL de solució hipotònica (glicerol 50mM, KCl 5mM, NaCl 10mM, CaCl<sub>2</sub> 0.8mM, sacarosa 10mM) llençant les cèl·lules gota a gota a la solució hipotònica en agitació lleugera amb el vòrtex. S'incuben en la solució hipotònica durant 5 minuts a temperatura ambient. A continuació, s'afegeix 3 o 4 gotes de metanol:acètic 3:1 també gota a gota amb agitació lleugera del vòrtex i es centrifuga les cèl·lules durant 5 minuts a 500g a 4°C. El pellet es ressuspèn amb 1 mL de metanol:acètic 3:1, de nou, tirant la solució fixadora gota a gota amb agitació lleugera del vòrtex. Una vegada més, es centrifuga les cèl·lules durant 5 minuts a 500g a 4°C, el pellet es ressuspèn amb 1 mL de metanol:acètic 3:1 i s'incuba durant 30 minuts a temperatura ambient. Després d'això, es centrifuga una última vegada les cèl·lules durant 5 minuts a 500g a 4°C i es retira la major part del sobrenedant deixant un petit volum d'uns 200-300 µL de solució fixadora dins el tub

amb el pellet de cèl·lules. Les cèl·lules es ressuspenen llavors donant cops amb el dit en aquest volum restant de solució fixadora. Ha de quedar una solució lleugerament tèrbola. Si queda massa densa, es pot diluir més afegint la solució fixadora necessària. A continuació, es xucla la solució amb les cèl·lules amb una pipeta Pasteur i es deixen caure entre 2 i 3 gotes des d'una alçada d'un pam aproximadament damunt portaobjectes inclinats uns 45°. Uns 200 µL de solució donen aproximadament per 4 o 5 portaobjectes. Finalment, es deixa assecar les preparacions tota la nit a temperatura ambient i a la foscor.

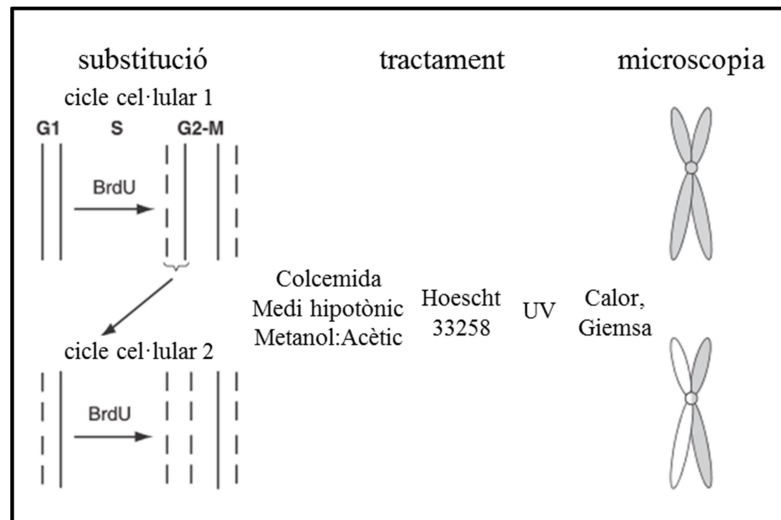


Figura 36. Anàlisi d'intercanvis entre cromàtides germanes. Es mostra una representació del tractament a que es sotmet les cèl·lules per a obtenir la tinció diferencial de les cromàtides amb Giemsa.

El dia següent s'incuba les preparacions amb Hoescht (Sigma) 0.5 µg/ml en aigua mil·liQ en *Coplin Jars* durant 15 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, es renten amb aigua i es deixen assecar. A continuació, es submergeixen els portaobjectes en tampó de Sorensen ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.133 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.133 M, pH 7) i s'incuben sota una font de llum ultraviolada, a una distància d'uns 10cm de la font de llum, durant 1 hora. En aquest treball, es va utilitzar un aparell *Stratalinker® UV Crosslinker* com a font de llum ultraviolada. Després d'aquest tractament, els portaobjectes es submergeixen verticalment en una *Coplin Jar* amb medi SSC 2X ( $\text{NaCl}$  0.3M, citrat sòdic 0.03M) durant 2 hores a 62,5°C en una estufa. Passades les dues hores, es treuen del medi SSC 2X i es tenyeixen submergeint-los horitzontalment en Giemsa 20% en tampó de Sorensen durant 25 minuts amb agitació. Finalment, els portaobjectes es retiren de la solució de Giemsa, es renten sucant-los en aigua un parell de vegades i es munten les preparacions amb medi de muntatge Permout™ (*Fisher Scientific*).

Per acabar, les preparacions s'observen al microscopi de camp clar a 63X o 100X i s'analitza el percentatge de cromosomes en què s'observen intercanvis entre les cromàtides germanes. En aquest treball, les imatges han estat obtingudes mitjançant un microscopi Nikon E1000.

### **C.2.3.15. Irradiació amb rajos X**

La irradiació de les cèl·lules amb rajos X es va dur a terme sotmetent-les a una dosi de 10Gy en un aparell Xylon SMART200 a temperatura ambient. Un cop irradiades, es van anar traient mostres a diferents temps específics.

### **C.2.3.16 Experiments d'inhibició de la transcripció**

Per a la inhibició de la transcripció, les cèl·lules SL2 van ser incubades amb cordicepina 200µM (Sigma-Aldrich) durant 0, 2 i 4 hores. Després de la incubació, es van dur a terme immunotincions amb aquestes cèl·lules.

### **C.2.3.17. Tractament amb 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU)**

Per als experiments d'incorporació d'EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), les cèl·lules SL2 es van incubar amb EdU 10µM (ThermoFisher) durant 10 minuts a 25°C. A continuació, es va dur a terme la detecció de l'EdU d'acord a les indicacions del fabricant. A diferència de la BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina), on la detecció de l'anàleg de timina es basa en l'afinitat d'un anticòs i cal desnaturalitzar el DNA per a permetre la immunodetecció, l'EdU presenta el gran avantatge que no requereix la desnaturalització del DNA i, a més a més, la seva detecció es basa en una reacció covalent la qual cosa dóna moltíssima especificitat al senyal de detecció evitant problemes de soroll de fons. Breument, la detecció es basa en una reacció covalent catalitzada per coure entre una azida present a l'EdU i un alquí present al fluorocrom Alexa Fluor.

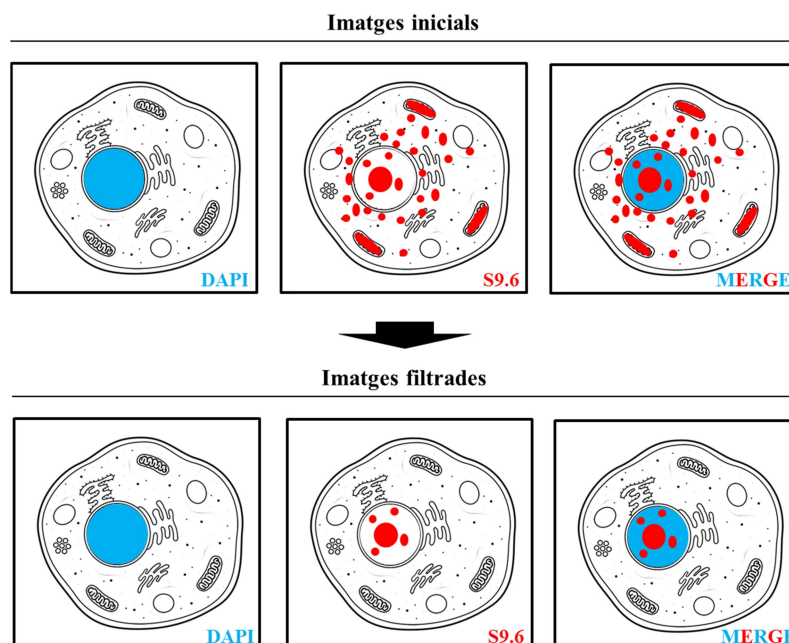
### **C.2.3.18. Purificació de DNA genòmic**

Per a purificar el DNA genòmic de les cèl·lules SL2, en primer lloc, es recullen les cèl·lules d'un flascó de cultiu Corning® de 25 cm<sup>2</sup> confluent i es centrifuguen 10 minuts a 500g a 4°C. Tot seguit, es ressuspen el pellet de cèl·lules en 5 mL de PBS1X i es centrifuga de nou a 500g durant 10 minuts a 4°C. Es repeteix el rentat un cop més. A continuació, el pellet es ressuspen en tampó de lisi (Tris-HCl 10mM pH7.4, EDTA 10mM, NaCl 10mM, SDS 0.5%, proteïnasa K 0.5µg/µL) i s'incuba durant 1 hora a 50°C. Passat aquest temps, s'afegeix RNasaA de manera que quedi a 1mg/mL i s'incuba durant 2 hores més a 50°C. Després d'això, s'inicia l'extracció fenòlica del DNA. S'afegeix el mateix volum de fenol:cloroform que el volum de la mostra, es vortexa vigorosament entre 30 segons i 1 minut i es centrifuga a velocitat màxima durant 5 minuts a temperatura ambient. Es descarta la fase fenòlica i es repeteix el procés d'extracció amb la fase aquosa fins a dues vegades. Finalment, es precipita el DNA afegint 0.3 volums d'acetat sòdic 3M i 2 volums d'etanol absolut fred. Es

ressuspèn donant copets amb els dits i s'incuba durant 30 minuts a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Passat aquest temps, es treu la mostra del congelador i es centrifuga a màxima potència durant 15 minuts a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tot seguit, es descarta el sobrenedant i es ressuspèn el pellet en el mateix volum inicial de la mostra abans de fenolitzar amb etanol 70% fred. Es deixa la mostra a  $-20^{\circ}\text{C}$  durant 20 minuts i es centrifuga a màxima potència a  $4^{\circ}\text{C}$  durant 15 minuts. Per acabar, es retira l'etanol 70% i es deixa el pellet a  $37^{\circ}\text{C}$  uns 5 minuts per a que s'evapori tot l'etanol restant. Finalment, es ressuspèn el DNA amb aigua mil·liQ.

### C.2.3.19. Processament de les imatges amb el software FIJI

Les imatges resultants dels experiments d'immunolocalització han estat processades en tots els casos mitjançant el software FIJI.



**Figura 37. Processament de les immunodeteccions utilitzant l'anticòs S9.6.** Es mostra un breu exemple del tractament a que han estat sotmeses les tincions amb l'anticòs S9.6. Donat que aquest anticòs presenta una certa afinitat per altres estructures de DNA [146] i que també existeixen híbrids d'RNA:DNA en altres compartiments cel·lulars a part del nucli [108], les tincions amb aquest anticòs presenten un elevat nivell de senyal fora del nucli. Per aquesta raó, les immunotincions amb aquest anticòs han d'anar acompanyades sempre d'una condició transfectada amb RNasa H com a control en que el senyal disminueixi significativament. Donat que l'interès es centra en els híbrids nuclears, per facilitar la visualització dels resultats les imatges han estat processades de manera que s'ha eliminat del canal en que hi ha la tinció d'aquest anticòs aquell senyal que no colocalitza amb el DAPI i que, per tant, no és nuclear.

Ha estat àmpliament descrit que l'anticòs S9.6 contra els híbrids RNA:DNA pot reconèixer altres estructures d'àcids nucleics amb certa afinitat [146] i que també dóna molt senyal citoplasmàtic degut al fet que també hi ha híbrids a altres compartiments cel·lulars a part del nucli [109, 147]. Per aquesta raó, les immunotincions contra els híbrids RNA:DNA han estat processades de manera que només es mostra el senyal d'aquestes tincions que colocalitza amb el DAPI per facilitar la

visualització dels resultats donat que l'interès es centra en els R-loops de l'heterocromatina. El procés utilitzat ha estat el següent (Fig. 37). En primer lloc, s'obtenen talls de 0.5µm de gruix per cada nucli mitjançant microscòpia confocal des de la part inferior fins a la part superior del nucli. A continuació, els talls es processen filtrant les imatges de 8-bits de la tinció amb l'anticòs S9.6 amb les imatges corresponents de 8-bits de la tinció amb DAPI. D'aquesta manera, es descarta el senyal de l'anticòs S9.6 que no colocalitza amb el DAPI i la imatge es converteix a RGB.

Les quantificacions del contingut nuclear d'R-loops han estat dutes a terme expressant l'àrea nuclear dels R-loops respecte l'àrea total del DAPI. Per a les quantificacions, s'obtenen les projeccions màximes de la pila de talls en RGB i es determina l'àrea total del senyal de l'anticòs S9.6, prèviament filtrada, i l'àrea total del senyal de DAPI. Finalment, el grau de colocalització s'expressa com la proporció de l'àrea del senyal de l'anticòs S9.6 respecte la del DAPI (S9.6/DAPI).

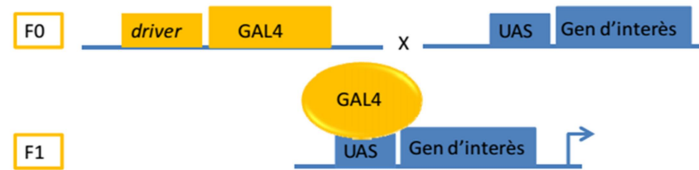
En el cas de les quantificacions del grau de colocalització entre el senyal de l'anticòs S9.6 i HP1a es procedeix d'una manera similar. En primer lloc, s'obtenen les projeccions màximes de la pila de talls en RGB i es determina l'àrea total del senyal de l'anticòs S9.6, prèviament filtrada, i l'àrea del senyal de l'anticòs S9.6 que colocalitza amb HP1a (S9.6+HP1a). Finalment, el grau de colocalització s'expressa com la proporció de l'àrea del senyal de l'anticòs S9.6 que colocalitza amb HP1a respecte l'àrea total del senyal de l'anticòs S9.6 ((S9.6+HP1a)/S9.6). El mateix procediment es duu a terme quan es quantifica el grau de colocalització entre EdU i HP1a. En aquest cas, però, el grau de colocalització s'expressa com la proporció de l'àrea d'HP1a que colocalitza amb EdU respecte l'àrea total d'HP1a ((HP1a+EdU)/HP1a).

### C.2.4. Tècniques utilitzades en mosques

#### C.2.4.1. Sistema d'expressió ectòpica a *Drosophila*

Per expressar proteïnes i hairpins d'RNAi ectòpicament a *Drosophila* s'utilitza el sistema de d'expressió UAS-GAL4 [132] (Fig. 38). Aquest sistema consisteix en el creuament de dues mosques que porten diferents construccions. La presència de les dues construccions a la descendència permet l'expressió del gen d'interès. Una mosca parental conté el cDNA de GAL4 que codifica la proteïna activadora GAL4 de llevat, sota el control d'un *driver* o controlador. Els *drivers* o controladors consisteixen en la regió promotora de gens amb patró d'expressió conegut que permeten saber on s'expressarà GAL4 i permetrà l'expressió del transgèn. L'altra mosca parental porta una construcció amb el gen d'interès que es vol expressar, sota el control d'una regió promotora per GAL4 amb seqüències UAS, que permeten la unió de GAL4 (*Upstream Activation Sequence*). En la F1, les mosques contenen les dues construccions, l'activador GAL4, s'expressa en els teixits on el driver és actiu, s'uneix a les seqüències UAS i permet l'expressió del gen d'interès (Fig. 38).





**Figura 38. Esquema del funcionament del sistema d'expressió UAS-GAL4.** El creuament d'una mosca que conté la seqüència que codifica per la proteïna GAL4 sota control d'un *driver* o controlador i d'una altra mosca que conté el gen d'interès sota una regió promotora que conté seqüències UAS a les que s'hi uneix GAL4 i indueix l'expressió del gen que conté aquestes seqüències a la regió promotora, dona lloc a una F1 en que ambdues construccions es troben en un mateix individu. En conseqüència, GAL4 s'expressa als teixits en que el *driver* és actiu i s'uneix a les seqüències UAS induint l'expressió del gen que conté aquestes seqüències a la regió promotora únicament en aquests teixits en que el *driver* és actiu.

#### C.2.4.2 Immunolocalitzacions en discos imaginals de larves

En primer lloc, es col·loquen les larves en PBS 1X fred i es parteixen per la meitat. La meitat posterior es descarta i la meitat anterior es gira amb les pinces de dissecció deixant en contacte els òrgans interns amb el medi. A continuació, es posen un màxim de 12 larves partides i girades en un tub de 0,5 ml i es fixen amb paraformaldehid 4% (diluït en PBS 1X) 15 min en agitació en una roda a temperatura ambient. Es fan 3 rentats ràpids amb PBS 1X, 0,3 % Tritó X-100, i després es deixen en PBS 1X, 0,3% Tritó X-100 durant 20 min en agitació a la roda. Seguidament, es bloquegen els teixits durant 10 min amb solució de bloqueig (PBS 1X, 0,3% Tritó X-100, 2% BSA), agitant-se a la roda, es treu la solució de bloqueig i es torna a posar solució de bloqueig nova (es fan 3 bloquejos). Tot seguit, s'incuben els teixits tota la nit a 4°C en agitació a la roda, amb 600 µl d'anticòs primari, diluït en solució de bloqueig.

Al dia següent, es renten ràpidament 3 cops amb la solució de bloqueig, i es fan 4 rentats de 10 min en agitació a la roda, amb la mateixa solució. Tot seguit, s'incuben 2 hores a temperatura ambient amb l'anticòs o anticossos secundaris, diluïts 1:600 en solució de bloqueig, protegits de la llum. Acabada la incubació, es renten els teixits ràpidament 3 cops amb PBS 1X, 0,3% Tritó X-100. Seguidament, es fan 4 rentats de 10 min girant a la roda amb la solució de bloqueig. Es fa un rentat de 10 min amb PBS 1X. Per fer la tinció amb DAPI, s'incuben els teixits en 500 µl de PBS 1X + 5 µl de DAPI (2 ng/µl) durant 15 min a temperatura ambient, agitant-se a la roda.

Finalment, es fan 3 rentats de 5 min amb PBS 1X; 0,3% Tritó-X100, es disseccionen els teixits recollint els discos imaginals d'ala, halteri i potes, i es munten en Mowiol (Calbiochem-Novabiochem).

En aquest treball, les mostres han estat analitzades utilitzant els microscopis confocals Leica TCS SPE i Leica TCS SP2.

#### C.2.4.3. Immunolocalitzacions a cromosomes politènics

Per a realitzar immunolocalitzacions en cromosomes politènics cal disseccionar glàndules salivals de larva en el tercer estadi, crescudes amb llevat en pols dins els tubs perquè siguin larves grans

amb glàndules salivals grosses, i preparar cromosomes politènics. S'agafen larves en tercer estadi, s'extreuen les glàndules salivals en medi *Cohen-Gotchell* (Na-glicerol-3-fosfat 25 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, KCl 30 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{CaCl}_2$  3 mM, Sacarosa 160 mM, Nonidet P-40 o IGEPAL 0,5 %) i s'hi incuben durant 8-10 min (mai més de 10 min). Es deixen les glàndules el més netes possibles, intentant eliminar al màxim el teixit adipós que les envolta. Seguidament les glàndules es fixen 2 min amb solució fixadora 1 (PBS 1X, formaldehid 2 %) i seguidament amb solució fixadora 2 (àcid acètic 45 %, formaldehid 2 %) durant 3 min. Sobre un cobreobjectes siliconitzat net es posen 20  $\mu\text{l}$  de solució fixadora 2 i a sobre es col·loquen les glàndules salivals. Es neteja un portaobjectes amb etanol i es posa el portaobjectes sobre el cobreobjectes fins que queda en contacte amb la gota que conté les glàndules. Es gira el portaobjectes unit al cobreobjectes deixant a la part superior el cobreobjectes. A continuació, amb una agulla emmanegada es fan copets secs damunt el cobreobjectes per tal de trencar els nuclis de les glàndules i així deixar lliures els cromosomes politènics. Seguidament es pressiona el cobreobjectes amb força utilitzant el dit polze i intentant que el cobreobjectes no es mogui. Aquest pas s'anomena *squash* i pretén estendre al màxim els cromosomes politènics. Finalment, es submergeix la preparació en nitrogen líquid i quan està congelada, es treu el cobreobjectes i es submergeix la preparació dins una cubeta de portaobjectes amb PBS 1X.

Per la immunolocalització, es fan 3 rentats de 5 min amb Tween 20 0.05% en PBS 1X en agitació dins una cubeta de portaobjectes. Seguidament es bloquegen les preparacions 2 cops durant 20 min en la cubeta de portaobjectes amb solució de bloqueig (PBS1X, Tween 20 0.05 %, BSA 1 %). Quan s'analitza la presència d'híbrids RNA:DNA amb l'anticòs S9.6, prèviament a aquest darrer pas, s'incuben amb SDS 0.5% en PBS1X durant 5 min amb agitació en la cubeta de portaobjectes. Després es dilueix l'anticòs primari a la concentració adient amb solució de bloqueig i s'afegeix 30  $\mu\text{l}$  de la dilució d'anticòs sobre els cromosomes. A continuació, es tapa amb un cobreobjectes, es posen les preparacions dins una cambra humida per tal que les preparacions no s'assequin i es deixa tota la nit a 4°C sense agitació. El dia següent es fan tres rentats de 5 min en agitació a la cubeta portaobjectes amb Tween 20 0.05% en PBS 1X. Després de l'últim rentat s'incuben les preparacions dins la cambra humida amb 30  $\mu\text{l}$  d'anticòs secundari diluït 1:400 en solució de bloqueig. Seguidament, es fan 3 rentats de 5 min en agitació a la cubeta de portaobjectes amb Tween 20 0.05% en PBS 1X i un rentat final de 5 min amb PBS 1X. Per acabar, es munten les preparacions amb una barreja de DAPI-Mowiol (DAPI 0.2 ng/ $\mu\text{L}$  en Mowiol (Calbiochem-Novabiochem)) i s'analitzen per microscòpia confocal.

En aquest treball, les mostres han estat analitzades utilitzant els microscopis confocals Leica TCS SPE i Leica TCS SP2.

### C.2.4.4. Muntatge d'ales de *Drosophila*

Per al muntatge de les ales, en primer lloc, les mosques s'han de tenir almenys una nit en medi SH (etanol 75%, glicerol 25%). A continuació, es passen a PBS1X en un vidre de rellotger i es disseccionen les ales. Finalment, les ales es munten en medi de Faurè [148] sobre un porta (uns 15 mL o 20 mL per a cubre petit o gran, respectivament), es posa un cubre i uns 250 g de pes i es desen assecant

tota la nit. A partir d'aquí, s'analitzen al microscopi òptic. En aquest treball, les imatges de les ales han estat obtingudes en un microscopi Nikon E600.

L'anàlisi de les imatges de les ales s'ha dut a terme amb el software FIJI. Mitjançant aquest programa, s'ha quantificat l'àrea de l'ala a partir de les imatges obtingudes.



## **D. RESULTATS**



## **D.1. Conseqüències de la depleció de la histona dH1 a cèl·lules SL2 sobre l'acumulació de dany al DNA i l'estabilitat genòmica**

La histona H1 de *D. melanogaster* (dH1) és essencial per al desenvolupament. En interferir la seva expressió, els individus moren a la fase de pupa [70, 71]. En la mateixa línia, la depleció de la histona dH1 a la regió del *pouch* dels discos imaginals d'ala utilitzant el sistema UAS-GAL4 afecta severament el desenvolupament de l'ala [71]. En reduir el contingut d'histona dH1, s'indueix l'apoptosi i les ales presenten una mida extremadament petita. Conjuntament amb això, en deplecionar la histona dH1 en aquesta regió del disc d'ala, també es pot apreciar un increment de la fosforilació de la serina 137 de la variant H2Av, generalment referida com  $\gamma$ H2Av, suggerint acumulació de dany al DNA en forma de trencaments de doble cadena [71]. En aquest sentit, un dels primers interessos per la nostra part ha estat establir un sistema eficient de depleció de la histona dH1 a cèl·lules SL2 que ens permetés dur a terme fàcilment estudis mecanístics per analitzar les conseqüències de la seva depleció sobre la generació de dany al DNA i l'estabilitat del genoma.

### **D.1.1 La depleció de la histona dH1 a cèl·lules SL2 provoca un increment del senyal de $\gamma$ H2Av**

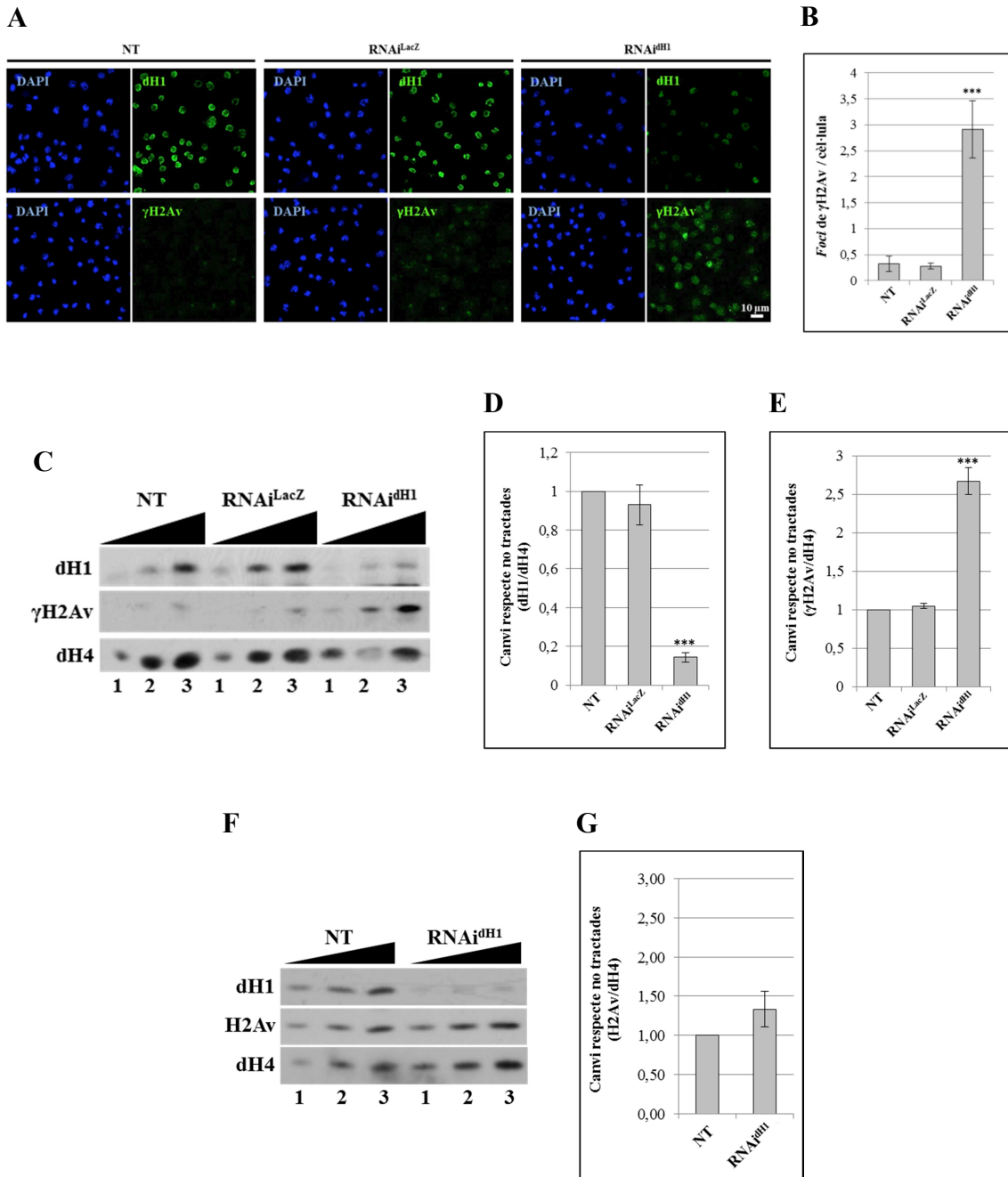
En primer lloc, es va posar apunt una metodologia pràctica i reproduïble que permetés deplecionar eficientment la histona dH1 en cèl·lules SL2.

Per aconseguir una depleció eficient es va utilitzar un RNA de doble cadena contra el gen sencer de la histona dH1, tal i com havia estat descrit prèviament per interferir l'expressió de la proteïna en una altra línia cel·lular de *D. melanogaster* [141]. Després de diverses proves, es va determinar les condicions idònies per aconseguir una depleció significativa amb aquest dsRNA en cèl·lules SL2 (descrites a *C. Materials i Mètodes, C.2.2.6.*).

El tractament de les cèl·lules amb aquest dsRNA contra la histona dH1 provoca una disminució molt important del contingut d'histona dH1, com es pot visualitzar per immunotinció (Fig. 39A). Aquesta depleció és específica ja que no s'observa en cèl·lules no tractades ni en deplecions control emprant un dsRNA contra el gen de la  $\beta$ -galactosidasa bacteriana (LacZ) i, per tant, sense efecte a *Drosophila*. A més a més, mitjançant assajos de *western blot* es va determinar que l'expressió de la proteïna disminuïa un ~75% en tractar les cèl·lules amb l'RNA de doble cadena en les condicions establertes (Fig. 39 C i D).

En segon lloc, es va analitzar el contingut en  $\gamma$ H2Av d'aquestes cèl·lules en que s'havia interferit l'expressió de la histona dH1. Com es pot observar a la figura 39A, la depleció de la proteïna provoca un increment important del senyal de l'anticòs contra aquesta modificació de la variant H2Av associada a dany al DNA en forma de trencaments de doble cadena [102]. La quantificació dels resultats obtinguts mitjançant immunolocalitzacions va permetre determinar que les cèl·lules deplecionades contenen al voltant de ~3 *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula, mentre que a les cèl·lules no tractades o les cèl·lules tractades

amb un dsRNA inespecífic presentaven valors notablement inferiors per sota de  $\sim 0.5$  *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula de mitjana (Fig. 39B).



**Figura 39. La depleció de la histona dH1 provoca un increment de  $\gamma$ H2Av.** A) Es mostra immunotincions contra la histona dH1 i  $\gamma$ H2Av. Es pot observar clarament que hi ha un increment important del senyal de  $\gamma$ H2Av en cèl·lules deplecionades d'histona dH1 (RNAi<sup>dH1</sup>) respecte deplecions control (RNAi<sup>LacZ</sup>) i cèl·lules no tractades (NT). B) Quantificació del nombre de *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula en les tres condicions (n>100 per condició). C) Es mostra el grau de depleció de la histona dH1 i l'increment de  $\gamma$ H2Av observat per *western blot* en els tres casos. Es pot observar com la banda de  $\gamma$ H2Av és notablement més important en deplecionar la histona dH1 que en deplecions control (RNAi<sup>LacZ</sup>) i cèl·lules no tractades (NT). D) i E) Quantificació del nivell d'enriquitment respecte la condició no tractada (NT), normalitzada a valor 1, de les relacions dH1/dH4 (D) i  $\gamma$ H2Av/dH4 (E) (n>10 per cada condició). F) Anàlisi per *western blot* del contingut en dH1, H2Av i dH4 en cèl·lules no tractades (NT) i cèl·lules deplecionades d'histona dH1 (RNAi<sup>dH1</sup>). G) Quantificació del nivell d'enriquitment respecte la condició no tractada (NT), normalitzada a valor 1, de la relació H2Av/dH4 (n=9 per condició). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA (RNAi<sup>LacZ</sup> i RNAi<sup>dH1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) (\*< 0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.005; test t-Student de dues cues).



Paral·lelament, també es van dur a terme assajos de *western blot* contra aquesta modificació. Coherentment, els resultats també van mostrar un increment molt important del contingut en  $\gamma$ H2Av en condicions d'interferència de la histona dH1 (Fig. 39C). En aquest cas, la quantificació d'aquest increment va permetre determinar que el contingut en  $\gamma$ H2Av era aproximadament  $\sim 3$  vegades superior en cèl·lules deplecionades d'histona dH1 respecte cèl·lules no tractades i cèl·lules tractades amb un dsRNA inespecífic, que presentaven uns valors similars (Fig. 39E). Per descartar que l'increment en  $\gamma$ H2Av fos el resultat indirecte d'un hipotètic augment del contingut d'H2Av en deplecionar la histona dH1, també es va analitzar el contingut d'aquesta variant mitjançant *western blot*. Els resultats obtinguts van demostrar que el contingut d'H2Av no augmentava significativament en interferir l'expressió de la histona dH1 (Fig. 39F). En aquestes condicions, el contingut d'H2Av únicament era  $\sim 1.25$  vegades superior a l'observat en cèl·lules no tractades (Fig. 39G).

Per tant, igual com passa en deplecionar la proteïna a discos imaginals d'ala [71], es va observar que la depleció de la histona dH1 a cèl·lules SL2 també provoca un increment notable del contingut en  $\gamma$ H2Av, suggerint acumulació de dany al DNA en deplecionar la proteïna. En canvi, això no s'observa en el control tractat amb un dsRNA contra LacZ que presenta uns nivells de  $\gamma$ H2Av semblants als de les cèl·lules no tractades. Conjuntament, tot això permet afirmar que la depleció de la histona dH1 en cèl·lules SL2 provoca un increment de  $\gamma$ H2Av, una marca epigenètica associada amb dany al DNA en forma de trencaments de doble cadena [102], igual com s'observa en discos imaginals d'ala [71].

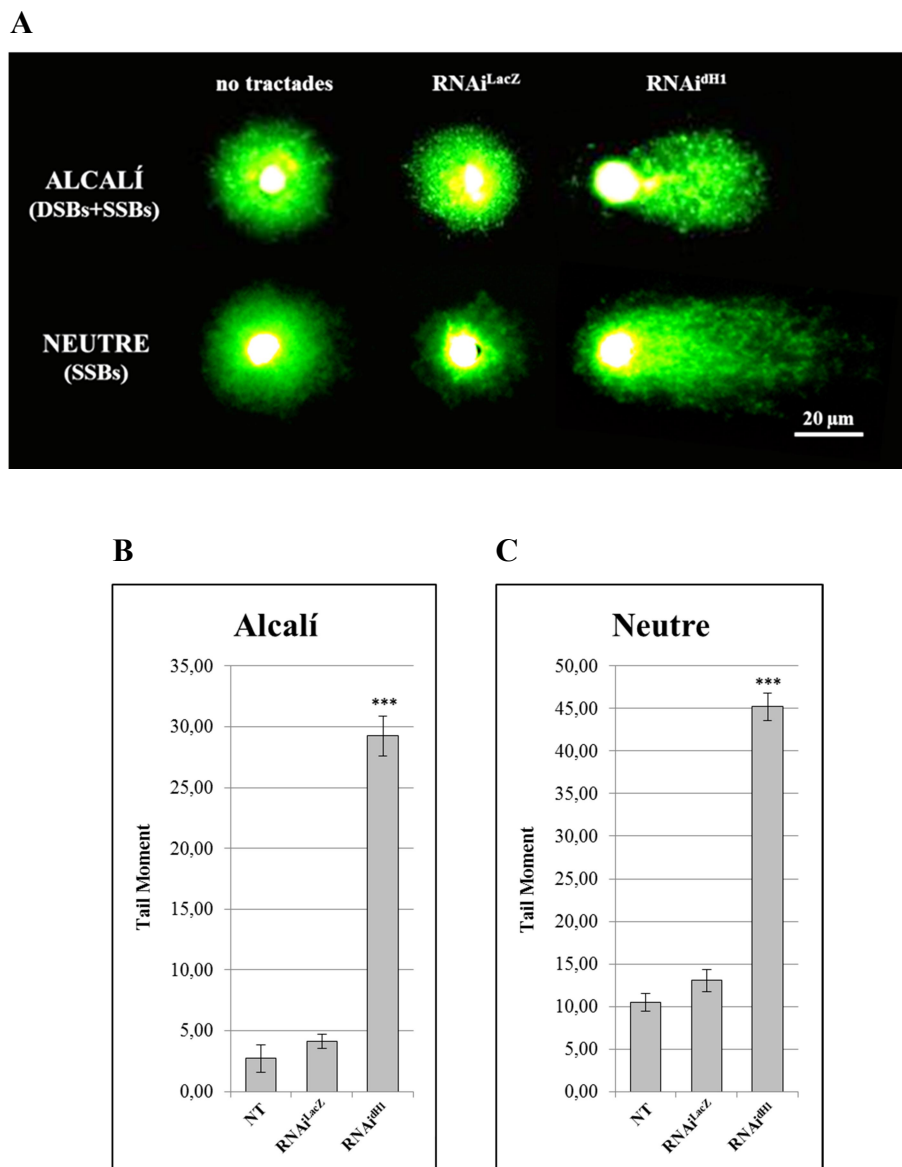
### **D.1.2 La depleció de la histona dH1 a cèl·lules SL2 provoca un increment de trencaments de doble cadena del DNA**

Malgrat l'increment en  $\gamma$ H2Av representa una prova indirecta important d'acumulació de trencaments de doble cadena del DNA [102], no es disposava d'una prova directa de l'existència d'aquests. Per aquesta raó, es va dur a terme l'assaig de *Comet Assay* o electroforesi de cèl·lules individuals.

En primer lloc, es va analitzar els resultats de la variant alcalina de la tècnica. Aquesta permet la detecció dels trencaments tant de cadena senzilla (SSBs) com de doble cadena (DSBs). Com es pot apreciar al panell superior de la figura 41A, la cua dels cometes generats amb cèl·lules deplecionades d'histona dH1 són notablement més llargues que les de les cèl·lules intactes o deplecionades amb un dsRNA contra LacZ. La quantificació dels resultats d'aquesta tècnica en forma de *tail moment* (veure Materials i Mètodes C.2.3.13. Comet Assay, per detalls) va indicar que les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 presenten uns valors de *tail moment* al voltant de  $\sim 30$  de mitjana. En canvi, aquest valor es trobava al voltant de  $\sim 3-5$  en cèl·lules no tractades i cèl·lules deplecionades amb un dsRNA contra LacZ, respectivament (Fig 40B). Això suggereix que les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 presenten un contingut en trencaments del DNA aproximadament  $\sim 6$  vegades superior a l'observat en deplecions control i cèl·lules no tractades.

D'altra banda, es va analitzar els resultats del mètode neutre de la tècnica. A diferència de l'anterior, aquest únicament permet la detecció de DSBs. A la figura 40A, es pot apreciar com les cues dels cometes són clarament més llargues en cèl·lules en que s'ha reduït el contingut d'histona dH1 que en

deplecions control amb un dsRNA contra LacZ i cèl·lules intactes. La quantificació dels resultats va indicar que les cèl·lules deplecionades d'histona dh1 presenten uns valors de *tail moment* al voltant de ~45 de mitjana, mentre que aquest valor es trobava al voltant de ~10-13 en cèl·lules no tractades i cèl·lules deplecionades amb un dsRNA contra LacZ, respectivament (Fig. 40C). En aquest cas, això representa un increment al voltant de ~4.5 vegades pel que fa a trencaments de doble cadena del DNA respecte cèl·lules tractades amb un dsRNA contra LacZ i cèl·lules no tractades.

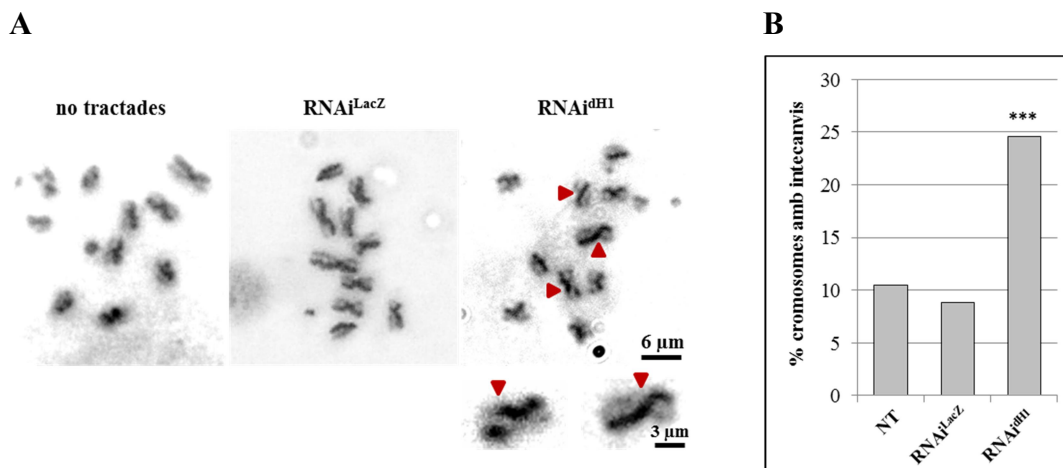


**Figura 40. La interferència de l'expressió de la histona dh1 provoca la generació de trencaments a la cadena de DNA.** Es mostra els resultats de l'assaig de *Comet Assay* emprat per detectar la presència de trencaments del DNA. A) Exemples de nuclis en condicions alcalina i neutra per a les tres condicions estudiades. B) i C) Es mostra la quantificació dels resultats de la variant alcalina (B) i neutra (C) de la tècnica en forma de *tail moment* ( $n > 100$  per cada condició i variant de la tècnica). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA (RNAi<sup>LacZ</sup> i RNAi<sup>dh1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) (\* $< 0,05$ , \*\* $< 0,01$ , \*\*\* $< 0,005$ ; test t-Student de dues cues).

En resum, aquests resultats posen de manifest que en condicions de depleció de la histona dH1 hi ha una quantitat important de trencaments de doble cadena del DNA, tal i com suggerien els assajos de *western blot* i immuotinció realitzats amb anticossos contra  $\gamma$ H2Av (descrits a *D. Resultats, D.1.1.*).

### D.1.3. Les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 presenten inestabilitat genòmica

Un cop determinat que en deplecionar la variant somàtica d'histona dH1 hi havia un increment de trencaments del DNA, el següent pas era analitzar si existia inestabilitat genòmica associada a aquest increment del dany al DNA. La inestabilitat genòmica provoca reorganitzacions genòmiques com a conseqüència dels intents de reparació dels trencaments del DNA per part de la cèl·lula. Una d'aquestes reordenacions són els intercanvis entre cromàtides, que es poden donar quan la cèl·lula intenta reparar una regió de DNA danyada mitjançant recombinació homòloga. Per estudiar si en condicions d'interferència existia inestabilitat genòmica associada, es va dur a terme assajos d'intercanvis entre cromàtides germanes.



**Figura 41. En deplecionar la histona dH1 existeix hiperrecombinació genòmica.** Es mostra els resultats de l'anàlisi d'intercanvis entre cromàtides germanes. A) Es mostren alguns exemples dels resultats obtinguts per les tres condicions estudiades. A la part inferior de la condició interferida d'histona dH1 (RNAi<sup>dH1</sup>), es mostren dos exemples a més augments en que es pot apreciar clarament l'intercanvi entre el color clar i fosc que marquen cadascuna de les cromàtides. Les fletxes vermelles mostren exemples de punts d'intercanvi entre les cromàtides germanes. B) Es mostra la quantificació del percentatge de cromosomes que presenten com a mínim un intercanvi entre cromàtides germanes per cada condició (n>100 per cada condició). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA (RNAi<sup>LacZ</sup> i RNAi<sup>dH1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) (\*< 0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.005; test F de Fisher de dues cues).

Com es pot apreciar a la figura 41A, les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 presenten més freqüentment intercanvis entre cromàtides germanes, visualitzats per l'intercanvi de tincions fosca i clara, que les cèl·lules no tractades o tractades amb un dsRNA contra lacZ. En quantificar el nombre d'intercanvis per cadascuna de les tres condicions, es va observar que les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 presentaven entorn a un ~25% de cromosomes en que es podia detectar intercanvis entre cromàtides germanes. En canvi, només se'n detecten en un 10% dels cromosomes en deplecions control i cèl·lules no tractades (Fig. 41B). En altres paraules, això representa que les cèl·lules deplecionades

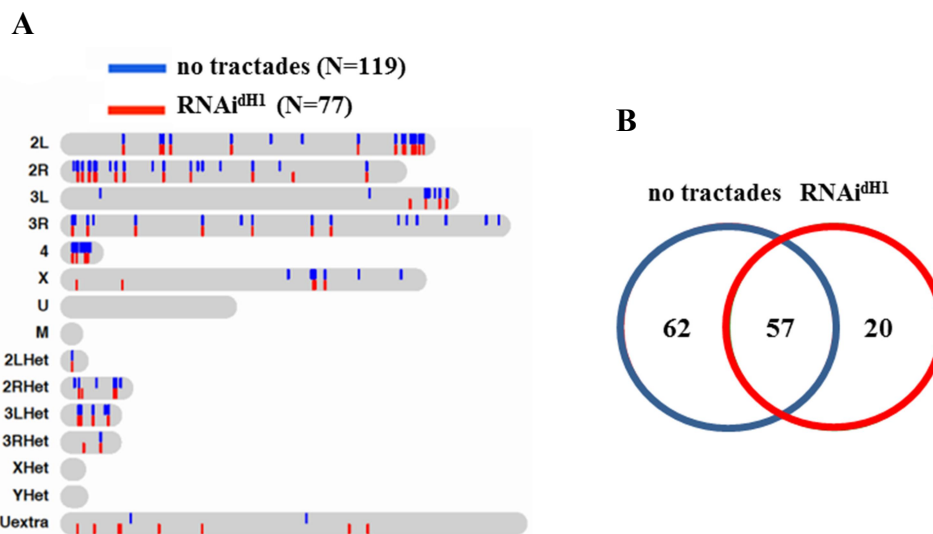
d'histona dH1 presenten aproximadament ~2.5 vegades més intercanvis entre cromàtides germanes que les cèl·lules no tractades o incubades amb un dsRNA contra LacZ.

Pel que fa a la localització genòmica dels intercanvis, es va veure que els intercanvis tendien a donar-se preferentment en regions pròximes al centròmer i als extrems dels cromosomes metafàsics. El nivell de resolució d'aquesta tècnica, però, és relativament baix i no permet anar més enllà i determinar amb més exactitud la localització genòmica dels intercanvis.

Globalment, tot això suggeria que, associat a l'increment de trencaments del DNA, les cèl·lules deplecionades de d'histona dH1 presenten hiperrecombinació genòmica, presumiblement derivada d'una inestabilitat genòmica.

### D.1.4. L'absència d'histona dH1 provoca una acumulació de $\gamma$ H2Av en seqüències repetitives

Amb l'objectiu de conèixer més bé la naturalesa d'aquest dany del DNA, es van dur a terme immunoprecipitacions de cromatina amb un anticòs contra  $\gamma$ H2Av (*Rockland*). Per tal de determinar en quines regions del genoma s'acumulava  $\gamma$ H2Av en interferir l'expressió de la histona dH1.



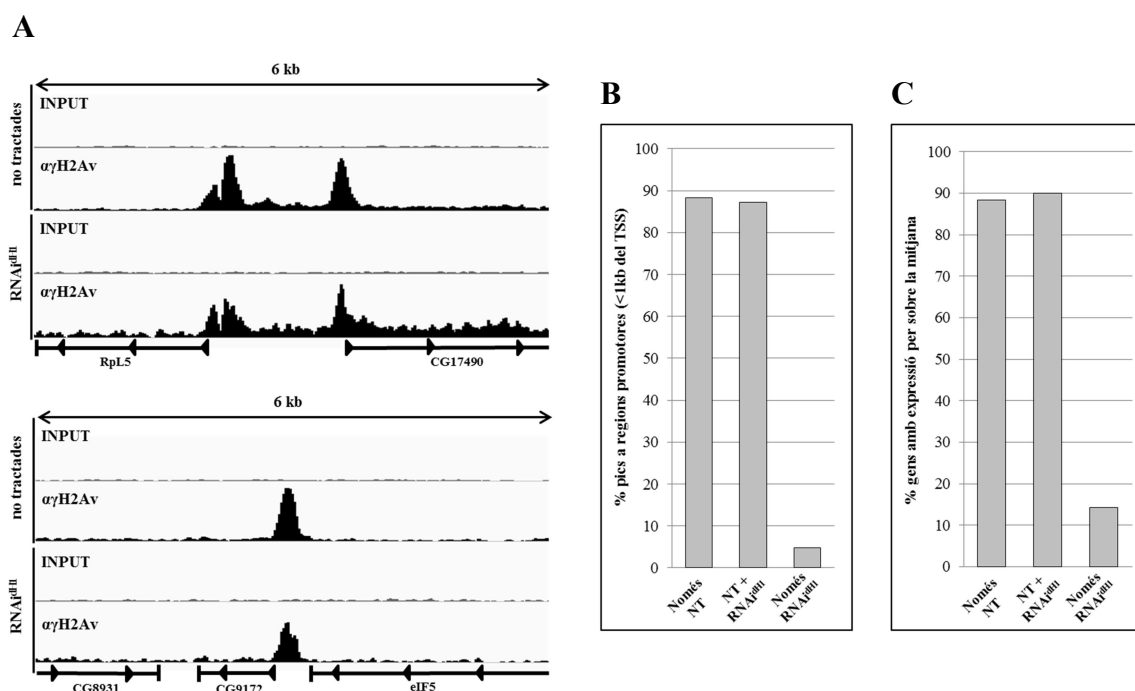
**Figura 42. Localització genòmica de les regions enriquides en  $\gamma$ H2Av.** A) Es mostra la distribució per cromosomes de les regions del genoma en que es detecta un enriquiment de  $\gamma$ H2Av en cèl·lules no tractades (línies blaves) i cèl·lules deplecionades d'histona dH1 (línies vermelles). B) Es mostra un diagrama de Venn es que es pot apreciar el nombre de regions enriquides que són comunes entre les dues condicions i les que són específiques de cada condició.

En primer lloc, es va comprovar que l'anticòs funcionava per immunoprecipitació. Un cop comprovat, es va dur a terme un ChIP-seq (immunoprecipitació de la cromatina seguida de seqüenciació) contra  $\gamma$ H2Av en cèl·lules no tractades i en cèl·lules interferides per la variant somàtica d'histona dH1. Aquest experiment va permetre mapar  $\gamma$ H2Av al genoma de *D. melanogaster* en ambdues condicions.

La posterior anàlisi bioinformàtica dels resultats d'aquest assaig va identificar 119 regions enriquides significativament en  $\gamma$ H2Av en la condició control i 77 que ho estaven en la condició

interferida d'histona dH1 (Fig. 42A). De forma interessant, no totes les 77 regions identificades en les cèl·lules deplecionades formaven part dels 119 identificats en la condició no tractada. Concretament, només 57 de les 77 regions identificades en les cèl·lules mutants també eren significatives en la condició control (Fig. 42B).

Una anàlisi més profunda de les regions enriquides va permetre observar que tant aquelles regions que es trobaven significativament enriquides només en la condició control com aquelles que es trobaven enriquides significativament en ambdues condicions tendien a aparèixer en >80% a les regions promotores de gens (Fig. 43A i B) que presenten una expressió per damunt de la mitjana d'expressió a SL2 (Fig. 43C). A més a més, també existia una clara tendència a que aquestes regions enriquides es localitzessin majoritàriament en regions pericentromèriques dels cromosomes 2 i 3, i al cromosoma 4 (Fig. 42A).



**Figura 43.** Es detecta un enriquiment de  $\gamma$ H2Av a les regions promotores de gens pericentromèrics que s'expressen per sobre la mitjana d'expressió a cèl·lules SL2. A) Es mostra exemples de gens que presenten un enriquiment de  $\gamma$ H2Av a la seva regió promotora. A la imatge es pot observar els resultats obtinguts per ChIP-seq contra  $\gamma$ H2Av a la regió promotora dels gens RpL5 i CG17490 (imatge superior) i CG9172 i eIF5 (imatge inferior). B) Es mostra la quantificació del percentatge de regions enriquides en  $\gamma$ H2Av que apareixen en regions promotores. C) Es mostra el percentatge de gens que presenten  $\gamma$ H2Av a la seva regió promotora que s'expressen per sobre la mitjana d'expressió a SL2. Les quantificacions s'han dut a terme per les regions enriquides en  $\gamma$ H2Av únicament en una de les dues condicions (n=62 (Només NT); n=20 (Només RNAi<sup>dH1</sup>)) i per a les que apareixen enriquides en totes dues (n=57 (NT+RNAi<sup>dH1</sup>)).

En canvi, les regions que apareixen enriquides significativament únicament quan es depleciona dH1 (n=20) presentaven unes propietats totalment diferents. En primer lloc, no colocalitzaven en absolut amb regions promotores de gens (<5%) (Fig. 43B). En segon lloc, eren molt més amples. Mentre que les regions enriquides en  $\gamma$ H2Av en ambdues condicions o només en cèl·lules no tractades, tendien a ser estretes (<1 kb), les específiques de la condició interferida d'histona dH1 tendien a ser molt amples (>1 kb) (Fig. 43A i 44). En tercer lloc, moltes d'elles apareixien al cromosoma *Uextra*, un cromosoma

artificial generat amb seqüències que per les seves característiques repetitives no s'ha pogut determinar la seva posició en el genoma (Fig. 42A).

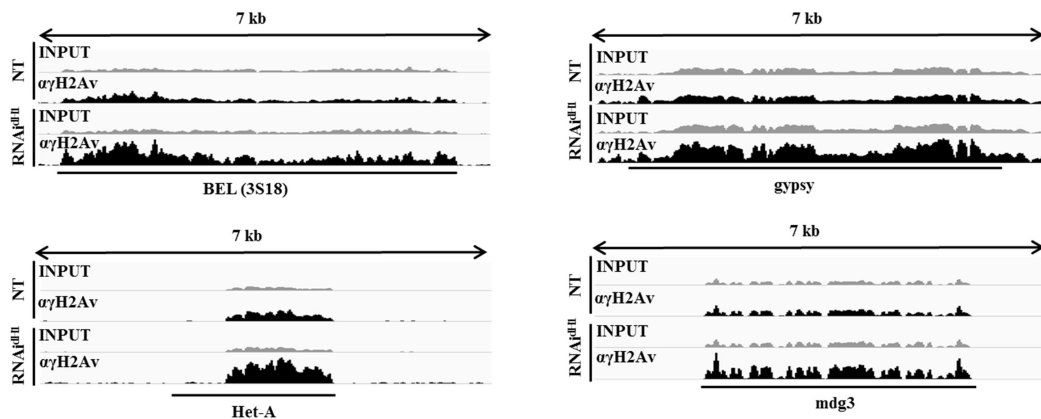


Figura 44. La depleció d'histona dH1 provoca una acumulació de  $\gamma$ H2Av en seqüències repetitives. Es mostren exemples d'elements repetitius enriquits en  $\gamma$ H2Av. A la imatge es pot veure els resultats obtinguts per ChIP-seq contra  $\gamma$ H2Av en els retrotransposons BEL (3S18), Het-A, gypsy i mdg3 per cadascuna de les dues condicions analitzades.

Donada la naturalesa repetitiva d'aquestes regions, es va analitzar la seqüència de DNA de cadascuna d'aquestes regions amb el software *RepeatMasker* [149], un programa en línia que permet identificar seqüències repetitives.

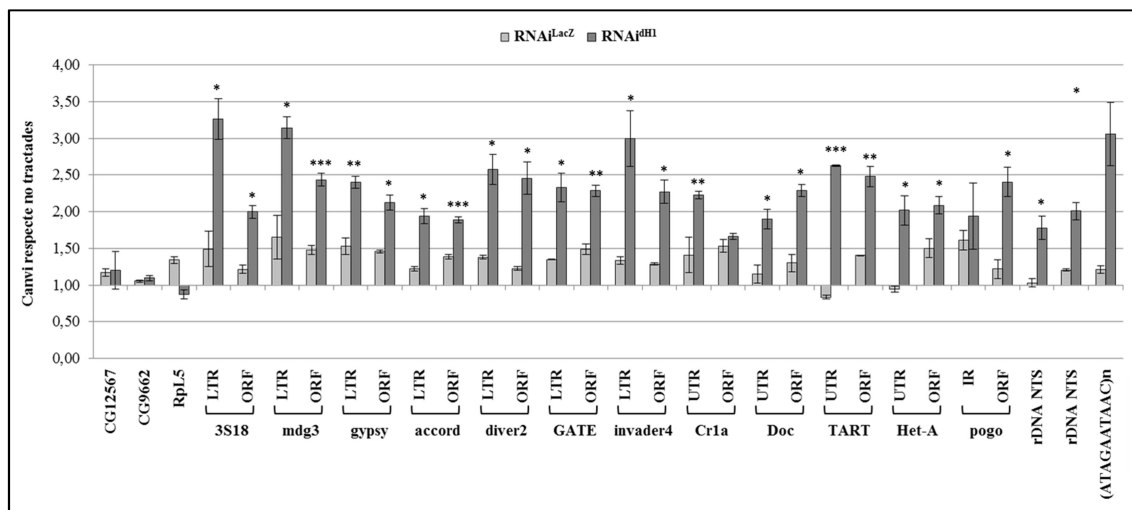
Elements repetitius identificats pel software <i>RepeatMasker</i> a les seqüències enriquides en $\gamma$ H2Av únicament en la condició RNAi <sup>dH1</sup>	
Element repetitiu	Classe/família de l'element repetitiu
BEL (3S18)	Transposó/Retrotransposó tipus LTR
gypsy	Transposó/Retrotransposó tipus LTR
mdg3	Transposó/Retrotransposó tipus LTR
accord	Transposó/Retrotransposó tipus LTR
HeT-A	Transposó/Retrotransposó tipus LINE
Doc	Transposó/Retrotransposó tipus LINE
TART	Transposó/Retrotransposó tipus LINE
Cr1a	Transposó/Retrotransposó tipus LINE
transib5	Transposó/Transposó de DNA
piggyBac	Transposó/Transposó de DNA
(ATAGAATAAC) <sub>n</sub>	Repetició simple
(ATAGA) <sub>n</sub>	Repetició simple
(TTTA) <sub>n</sub>	Repetició simple
DMSAT6	Satèl·lit
rDNA NTS	DNA ribosòmic/Espaiador no transcrit de l'rDNA

Taula 6. Elements repetitius identificats enriquits en  $\gamma$ H2Av específicament en deplecionar la histona dH1.

D'aquesta manera, es va comprovar que les regions genòmiques que apareixien enriquides en  $\gamma$ H2Av únicament quan s'interferia l'expressió de la histona dH1 corresponien bàsicament a seqüències repetitives. Concretament, a transposons, repeticions simples, satèl·lits i DNA ribosòmic (Taula 6). Entre els transposons identificats, hi havia retrotransposons de tipus LTR (BEL(3S18), gypsy, mdg3 i accord),

retrotransposons de tipus LINE (Het-A, Doc, TART i Cr1a) i transposons de DNA (transib5 i piggyBac). Els transposons van representar el grup més nombrós de seqüències repetitives identificades, però també es van detectar específicament enriquides en  $\gamma$ H2Av en deplecionar la histona dH1 repeticions simples ((ATAGAATAAC)<sub>n</sub>, (ATAGA)<sub>n</sub> i (TTTA)<sub>n</sub>), seqüències de DNA satèl·lit (DMSAT6) i el DNA ribosòmic (espaiador no transcrit de l'rDNA) (Taula 6).

En base a aquests resultats, a continuació es va comprovar mitjançant PCR quantitativa l'enriquiment de  $\gamma$ H2Av en transposons, repeticions simples, satèl·lits i DNA ribosòmic quan les cèl·lules estaven deplecionades de la histona dH1. En aquest cas, es va afegir a l'anàlisi també cèl·lules tractades amb dsRNA contra LacZ com a control de l'experiment. Pels que fa als transposons, es va analitzar regions terminals (LTR, LINE o IR, segons el cas) i codificants (ORF) de cadascun d'ells. En general, les cèl·lules en que s'havia interferit l'expressió de la histona dH1 presentaven, per a les regions identificades per CHIPseq, un enriquiment en  $\gamma$ H2Av al voltant de ~2-3 vegades superior al contingut en  $\gamma$ H2Av d'aquestes mateixes seqüències en cèl·lules no tractades. En canvi, les cèl·lules tractades en les mateixes condicions però amb un dsRNA contra LacZ, presentaven una valors entre ~1-1,5 vegades superior pel que fa al contingut en  $\gamma$ H2Av d'aquestes regions genòmiques respecte les cèl·lules no tractades (Fig. 45).



**Figura 45.** L'anàlisi de la immunoprecipitació de cromatina enriquida en  $\gamma$ H2Av mitjançant PCR quantitativa confirma que la depleció d'histona dH1 provoca una acumulació de  $\gamma$ H2Av en seqüències repetitives. Es mostra un gràfic amb el grau d'enriquiment en  $\gamma$ H2Av respecte les cèl·lules no tractades que presenten les diferents seqüències repetitives identificades mitjançant el ChIP-seq contra  $\gamma$ H2Av en interferir la histona dH1 (n=4 per cada condició i parella de primers). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA contra la histona dH1 respecte la condició tractada amb un dsRNA inespecífic contra LacZ (\*< 0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.005; test t-Student de dues cues).

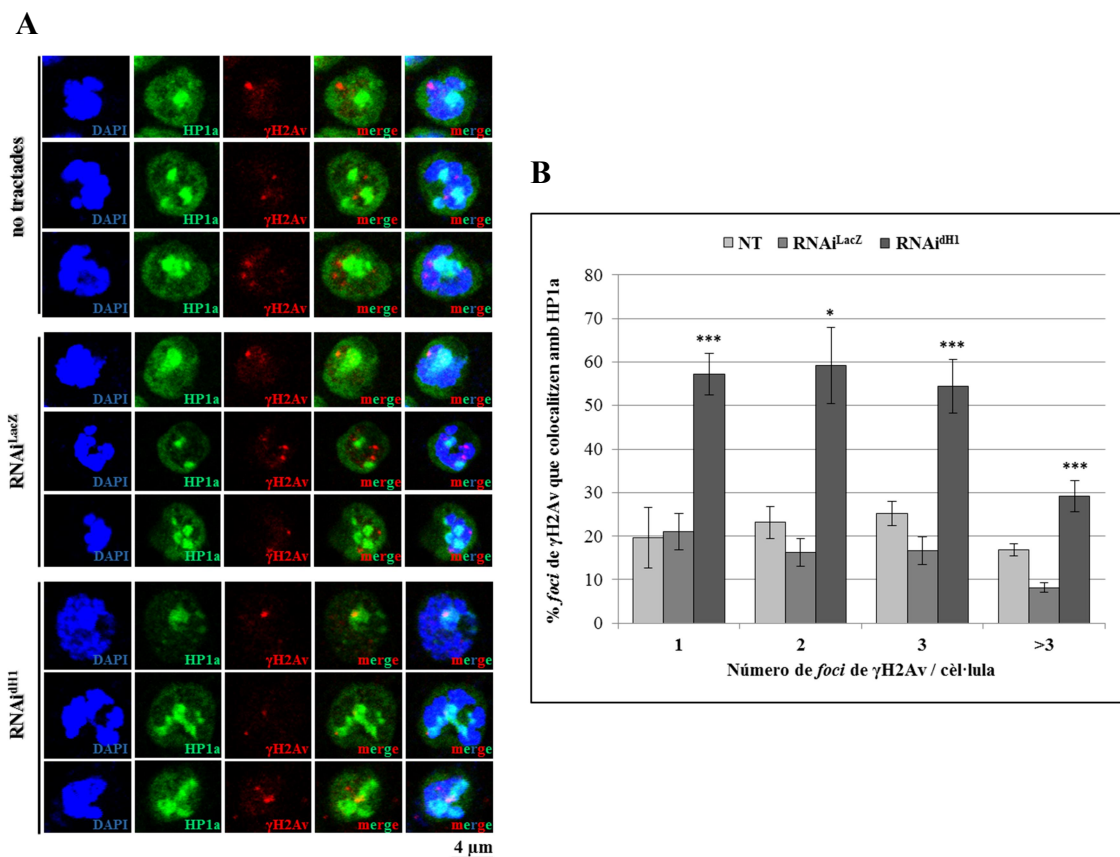
Mitjançant PCR quantitativa també es va analitzar les regions promotores d'alguns dels gens que mostraven un enriquiment de  $\gamma$ H2Av en aquestes regions tant en cèl·lules no tractades com interferides d'histona dH1. Concretament, es va estudiar les regions promotores dels gens CG12567, CG9662 i RplL5. Aquesta anàlisi va permetre observar que, si bé existia un increment notable del contingut en  $\gamma$ H2Av en regions repetitives en interferir l'expressió de la histona dH1, aquest no era el cas en les regions promotores dels gens estudiats. En aquestes regions, tant les cèl·lules tractades amb un dsRNA contra LacZ com les cèl·lules deplecionades presentaven uns valors d'enriquiment al voltant de ~1 respecte les

cèl·lules no tractades, suggerint que no existia un increment notable en el contingut de  $\gamma$ H2Av en aquestes regions quan es redueix el contingut d'histona dH1 (Fig 45, gens CG12567, CG9662, RpL5).

En resum, la depleció de la histona dH1 resulta en un increment en el contingut de  $\gamma$ H2Av en seqüències repetitives. Aquest increment específic de la depleció de la histona dH1 suggereix que en aquestes condicions s'acumulen trencaments de doble cadena en aquest tipus de seqüències.

### D.1.5. Els *foci* de $\gamma$ H2Av resultat de la depleció d'histona dH1 tendeixen a colocalitzar amb HP1a

Les seqüències repetitives identificades mitjançant els experiments d'immunoprecipitació de la cromatina es troben principalment a l'heterocromatina [43, 45]. Per aquesta raó, a continuació es van dur a terme assajos d'immunolocalització contra  $\gamma$ H2Av i HP1a, una proteïna marcador d'heterocromatina [150] (Fig. 46A).



**Figura 46.** En condicions de depleció d'histona dH1 s'observa colocalització entre  $\gamma$ H2Av i HP1a. A) Es mostren exemples dels resultats obtinguts en dur a terme tincions contra  $\gamma$ H2Av i HP1a, per cadascuna de les condicions. B) Es mostra la quantificació de la colocalització entre  $\gamma$ H2Av i HP1a expressada com a percentatge de *foci* de  $\gamma$ H2Av que colocalitzen amb HP1a en funció del nombre de *foci* que presenten les cèl·lules ( $n > 50$  per condició i nombre de *foci*). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA (RNAi<sup>lacZ</sup> i RNAi<sup>dH1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) (\* $< 0.05$ , \*\* $< 0.01$ , \*\*\* $< 0.005$ ; test t-Student de dues cues).

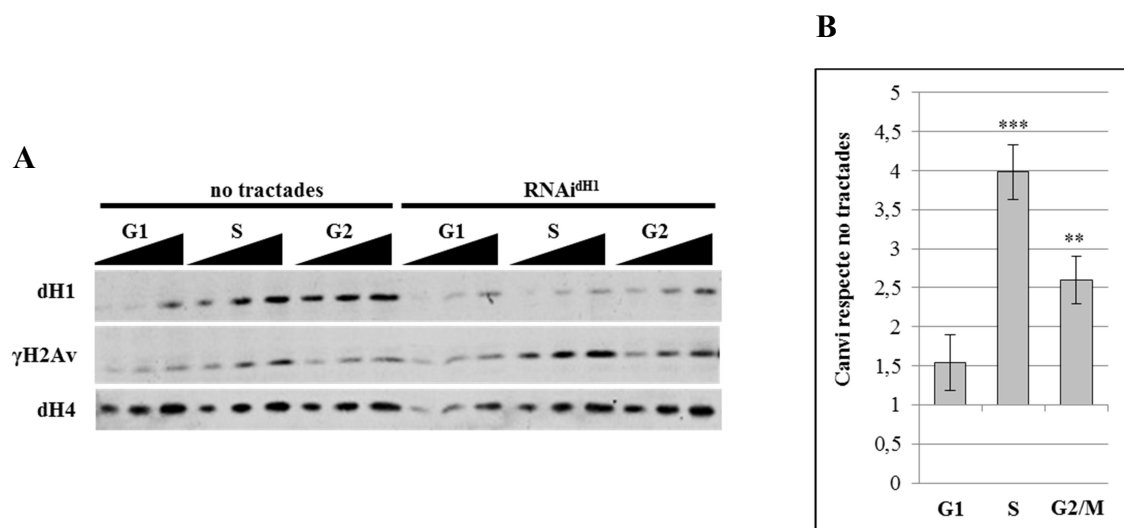


Com es pot observar a la figura 46B, en cèl·lules deplecionades d'histona dH1 amb pocs *foci* de  $\gamma$ H2Av (<3), existeix un alt percentatge de *foci* de  $\gamma$ H2Av que colocalitzen amb HP1a. En aquests casos, vora el ~60% dels *foci* de  $\gamma$ H2Av colocalitzen amb HP1a mentre que la colocalització gira al voltant del 20% dels *foci* en cèl·lules incubades amb dsRNA contra LacZ i cèl·lules no tractades. Això representa una colocalització ~3 vegades superior en condicions de depleció d'histona dH1 respecte cèl·lules intactes i cèl·lules tractades amb dsRNA contra LacZ, i suggereix que la generació del dany en reduir el contingut d'histona dH1 té lloc preferentment a l'heterocromatina. Aquesta freqüència de colocalització, però, disminueix bastant quan la cèl·lula presenta un nombre molt alt de *foci* de  $\gamma$ H2Av (>3).

Conjuntament amb els resultats obtinguts mitjançant assajos d'immunoprecipitació de la cromatina, aquests resultats confirmen que la depleció de la histona dH1 resulta en una acumulació de dany al DNA en regions positives per HP1a i, per tant, heterocromàtiques.

### D.1.6. El dany al DNA produït per la depleció de la histona dH1 apareix preferentment a fase S

Un cop determinada la generació de dany al DNA com a conseqüència de la depleció de la histona dH1, es va analitzar en quin moment al llarg del cicle cel·lular es generava aquest dany.



**Figura 47. El dany al DNA es produeix preferentment en la fase S del cicle cel·lular a cèl·lules deplecionades de dH1.** A) Western blot de cèl·lules prèviament separades segons la fase del cicle cel·lular en que es troben contra  $\gamma$ H2Av. B) Quantificació de l'enriquiment de la relació  $\gamma$ H2Av/dH4 respecte cèl·lules no tractades, normalitzades a valor 1, per cadascuna de les fases del cicle cel·lular (n>9 per cada fase i condició). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de la condició tractada amb dsRNA contra la histona dH1 (RNAi<sup>dH1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) (\*< 0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.005; test t-Student de dues cues).

Mitjançant *western blot* es va veure que l'increment més important de  $\gamma$ H2Av en condicions de depleció d'histona dH1 respecte cèl·lules no tractades es dona a fase S (Fig. 47A). Com es pot observar en les quantificacions del *western blot* a la figura 48B, les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 presenten un enriquiment respecte la condició no tractada de la relació  $\gamma$ H2Av/dH4 que gira al voltant de  $\sim 1.5$  a G1, i entorn a  $\sim 2.5$  a G2/M. En canvi, a fase S aquest valor s'enfila fins al voltant de  $\sim 4$ .

Les condicions control també presenten un cert enriquiment en el contingut de  $\gamma$ H2Av a fase S com es pot apreciar a la figura 47A, probablement com a resultat de petits problemes en la replicació del DNA. Fins i tot en condicions normals, la replicació del DNA ha de superar nombrosos obstacles per completar-se [77], per això no és d'estranyar que a les condicions control es detecti un mínim enriquiment en  $\gamma$ H2Av a fase S. De fet, mentre el número de *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula en les condicions control es troba al voltant de  $\sim 0.25$  i  $\sim 1$  a G1 i G2/M, respectivament, a fase S el contingut gira entorn a  $\sim 1-1.5$  *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula, suggerint que l'increment del dany associat a la replicació del DNA en aquestes cèl·lules és mínim.

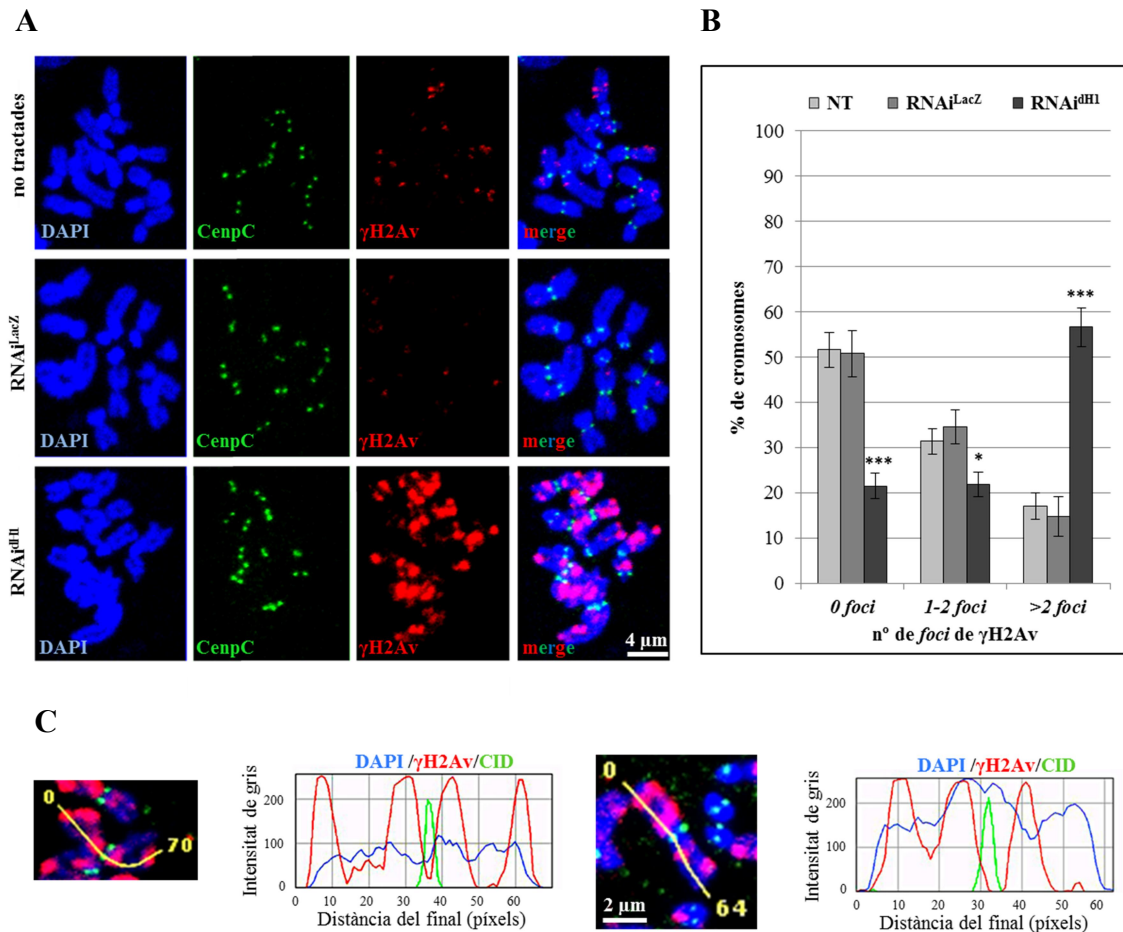
Aquests resultats mostren que l'increment més important en contingut de  $\gamma$ H2Av en condicions de depleció d'histona dH1 es dona a fase S i suggereix, per tant, que aquest augment està probablement associat a problemes durant la replicació del DNA.

### **D.1.7. La depleció de la histona dH1 també provoca un increment del senyal de $\gamma$ H2Av en cromosomes metafàsics i problemes en la segregació cromosòmica**

Donada l'acumulació del senyal de  $\gamma$ H2Av en cèl·lules deplecionades d'histona dH1 a fase S però també lleugerament a G2/M, es va plantejar l'anàlisi de cromosomes metafàsics per tal d'esbrinar si el dany que semblava originar-se associat a replicació persistia a mitosi.

En primer lloc, es van realitzar coimmunotincions contra  $\gamma$ H2Av i Cenp-C, una variant de la histona dH3 específica del centròmer [135], en cèl·lules tractades amb un medi hipotònic que permetia una visualització clara dels cromosomes mitòtics (Fig. 48A). En analitzar les imatges resultat d'aquesta tinció, es va observar que els cromosomes metafàsics de les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 també presentaven una acumulació de  $\gamma$ H2Av superior als cromosomes de les condicions control. Mentre que a les condicions control, el percentatge de cromosomes que presenten més de 2 *foci* de  $\gamma$ H2Av es troba al voltant d'un  $\sim 15\%$ , en interferir l'expressió de la proteïna aquest percentatge es troba al voltant del  $\sim 50\%$  (Fig. 48B).

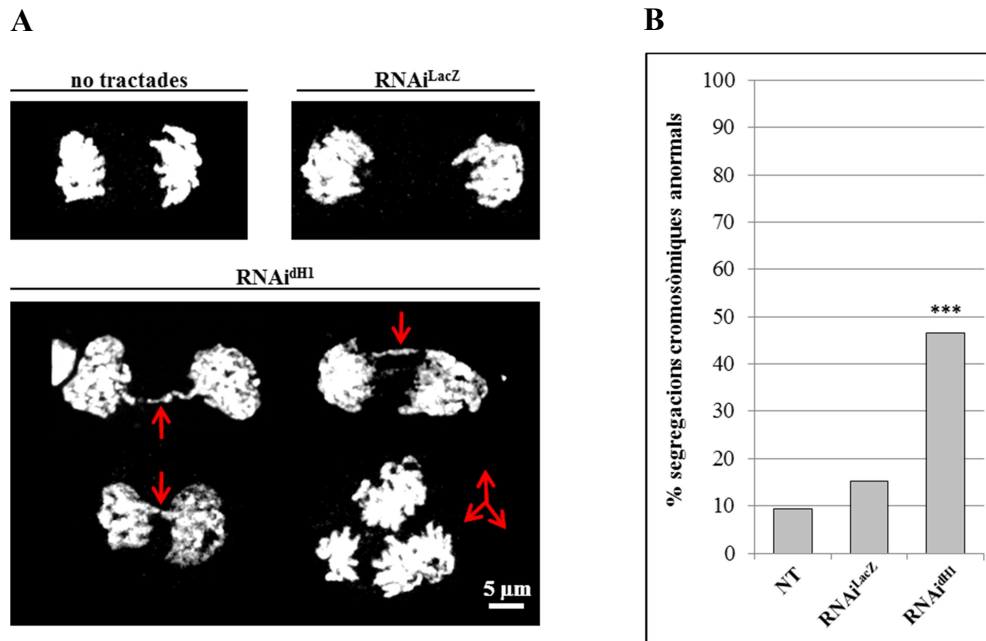
Pel que fa a la localització genòmica dels *foci* de  $\gamma$ H2Av, es va observar que els *foci* de  $\gamma$ H2Av tendien a aparèixer preferentment en regions pròximes al centròmer o als extrems dels cromosomes metafàsics (Fig. 48C). Tot i així, igual com passa amb l'assaig d'intercanvi de cromàtides, el poder de resolució d'aquesta tècnica també és baix i no permet anar més enllà i determinar amb més exactitud la localització genòmica dels *foci* de  $\gamma$ H2Av.



**Figura 48.** L'increment de  $\gamma$ H2Av en interferir l'expressió de la histona dH1 també es pot detectar en cromosomes metafàsics i presenta un patró de localització que està d'acord amb els resultats obtinguts mitjançant ChIP-seq contra  $\gamma$ H2Av. A) Es mostren exemples de cromosomes metafàsics de cadascuna de les condicions analitzades tenyits contra  $\gamma$ H2Av i Cenp-C, com a marcador del centròmer. B) Es mostra una quantificació del grau de dany que presenten els cromosomes mitòtics per cada condició. Per cada cas, es mostra el percentatge de cromosomes metafàsics que presenten 0, entre 1 i 2, o més de 2 foci de  $\gamma$ H2Av ( $n > 100$  per cada condició). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA (RNAi<sup>LacZ</sup> i RNAi<sup>dH1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) (\* $< 0.05$ , \*\* $< 0.01$ , \*\*\* $< 0.005$ ; test t-Student de dues cues). C) Es mostren dos exemples de cromosomes metafàsics en que es pot apreciar clarament l'enriquitment de  $\gamma$ H2Av a les regions heterocromàtiques pericentromèriques, al voltant del senyal de la variant centromèrica d'H3, CID (verd), i telomèriques, als extrems dels cromosomes. Al costat de cada imatge, es mostra el perfil de cadascun dels canals del sistema RGB per la regió indicada en el cromosoma metafàsic mitjançant una línia groga.

La presència de  $\gamma$ H2Av en cromosomes mitòtics feia pensar que podrien existir també problemes durant la segregació cromosòmica en condicions d'interferència de l'expressió de la histona dH1. Per determinar si això era així, es va quantificar el nombre de segregacions cromosòmiques en que es podien apreciar problemes. En relació amb això, es va observar que en deplecionar la histona dH1 existia un increment significatiu del nombre de segregacions cromosòmiques aberrants (Fig. 49A). Concretament, en vora el 45% de les segregacions cromosòmiques en condicions de depleció d'histona dH1 es podia observar algun problema de segregació (Fig. 49B). Com es pot observar a la figura 49A, aquests problemes es donen majoritàriament en forma de ponts anafàsics, tot i que puntualment també s'observen algunes segregacions amb més de dos pols cap on migren els cromosomes. En canvi, en cèl·lules no tractades o tractades amb un dsRNA contra LacZ rarament s'observen aquests fenòmens i els

percentatges de segregacions amb problemes es troba al voltant d'un ~10-15% en aquests casos, respectivament.



**Figura 49.** Les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 presenten problemes de segregació cromosòmica. A) Es mostren alguns exemples de segregacions cromosòmiques per cadascuna de les condicions visualitzades mitjançant la tinció del DNA amb DAPI. B) Quantificació del percentatge de mitosis que presenten algun tipus d'aberració (n>40 per cada condició). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA (RNAi<sup>LacZ</sup> i RNAi<sup>dH1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) (\*<0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.005; test F de Fisher de dues cues).

Tot això suggereix que el dany al DNA conseqüència de la depleció de la histona dH1 persisteix fins a fase M i també s'observa en cromosomes metafàsics, majoritàriament al voltant del centròmer i als telòmers. A més a més, conjuntament amb la presència de dany als cromosomes mitòtics, també s'aprecia un increment notable del nombre de problemes durant la segregació cromosòmica a anafase. Ambdues observacions són característiques de situacions d'estrès replicatiu [77].

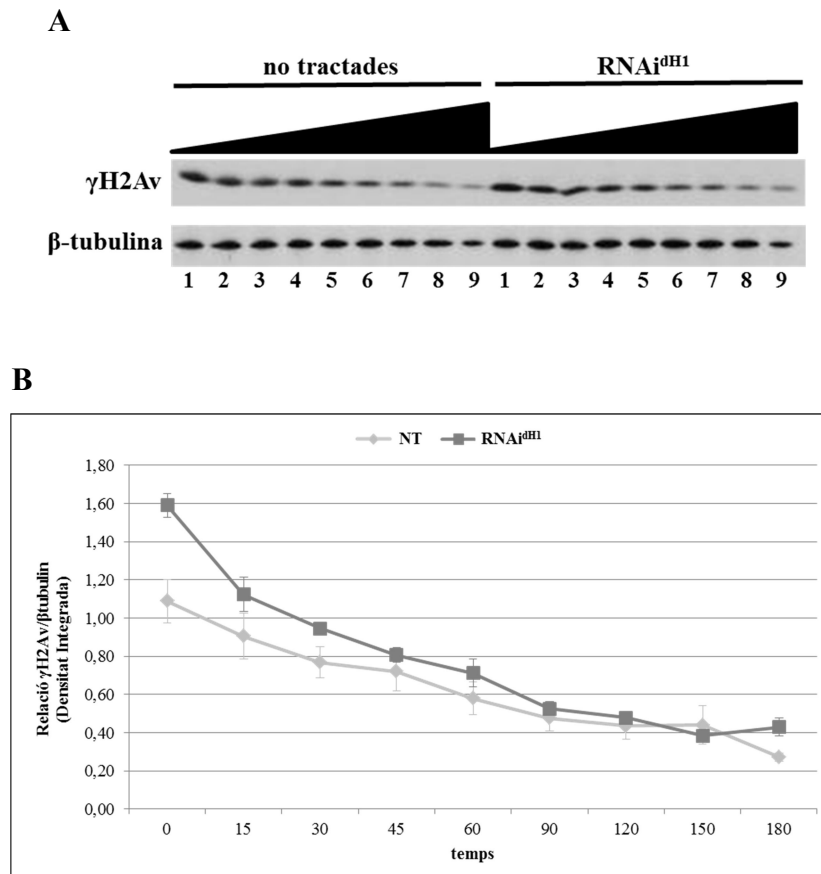
## D.2. Causes del dany al DNA generat en deplecionar la variant somàtica la histona dH1

La segona part del treball va consistir fonamentalment en intentar determinar les causes de la generació del dany al DNA observat en interferir l'expressió de la histona dH1.

### D.2.1. L'eficiència en la reparació del DNA no està afectada en deplecionar la histona dH1

En primer lloc, es va estudiar la possibilitat que el dany generat fos conseqüència de problemes en la reparació del DNA.

Per això, es van irradiar cèl·lules no tractades i cèl·lules en que s'havia interferit l'expressió de la histona dH1 amb una dosi de 10Gy de rajos X i es va analitzar la cinètica de desaparició del  $\gamma$ H2Av induït per irradiació mitjançant *western blot* (Fig. 50A).



**Figura 50. La reparació del DNA no està afectada depleccionar la histona dH1.** A) Anàlisi per *western blot* del contingut en  $\gamma$ H2Av i  $\beta$ tubulina a diferents temps després d'irradiar les cèl·lules amb 10Gy. B) Es mostra la quantificació de l'evolució de la relació  $\gamma$ H2Av/ $\beta$ tubulina al llarg del temps després d'irradiar (n=3 per cada condició).

Per començar, es va observar que la quantitat inicial de  $\gamma$ H2Av era superior en el cas de les cèl·lules depleccionades de la histona dH1. Si bé les cèl·lules no tractades presentaven una relació  $\gamma$ H2Av/ $\beta$ tubulina al voltant de  $\sim 0.8$ , les cèl·lules interferides mostraven una relació que girava entorn a  $\sim 1.6$  (Fig. 50B). Ben bé, les cèl·lules depleccionades presentaven el doble de contingut en  $\gamma$ H2Av que les no tractades. Aquests resultats, però, estaven d'acord amb treballs previs en que havia estat descrit a mamífers que la senyalització del dany és més potent en cèl·lules que presenten un 50% del contingut normal d'histona H1 [151].

En segon lloc es va comprovar que el  $\gamma$ H2Av no desapareixia més lentament en depleccionar la histona dH1. Com es pot observar a la figura 50B, el pendent de la corba de desaparició de  $\gamma$ H2Av en interferir l'expressió de la proteïna no era inferior al pendent de la corba de la condició control, suggerint que la reparació del DNA no era més lenta en aquestes condicions. De fet, el pendent fins i tot era més gran en depleccionar la histona dH1, indicant que la reparació del dany era inclús més eficient en reduir el contingut d'histona dH1. En qualsevol cas, aquests resultats posaven de manifest que la reparació del dany al DNA no estava dificultada en interferir l'expressió de la histona dH1 i, per tant, l'acumulació de

$\gamma$ H2Av observada en les cèl·lules mutants no podia ser deguda a defectes en la reparació del DNA, sinó a que es genera més dany en aquestes condicions.

### **D.2.2. La depleció de la histona dH1 genera R-loops a l'heterocromatina**

Conjuntament amb el seu paper essencial per a l'establiment de l'heterocromatina a *D. melanogaster* [70], també s'ha constatat que en condicions de depleció d'histona dH1 existeix un increment en l'expressió de l'heterocromatina [71, 74]. En relació amb això, ha estat àmpliament demostrat que la retenció anormal dels transcrits d'RNA a la cromatina induïx la formació d'R-loops i que aquestes estructures constitueixen una font freqüent d'inestabilitat genòmica [108]. Donat que ja havia estat descrit un increment en l'expressió de seqüències heterocromàtiques en interferir l'expressió de la histona dH1, es va decidir estudiar si la inestabilitat genòmica induïda en deplecionar la histona dH1 estava associada a un increment en la formació d'R-loops.

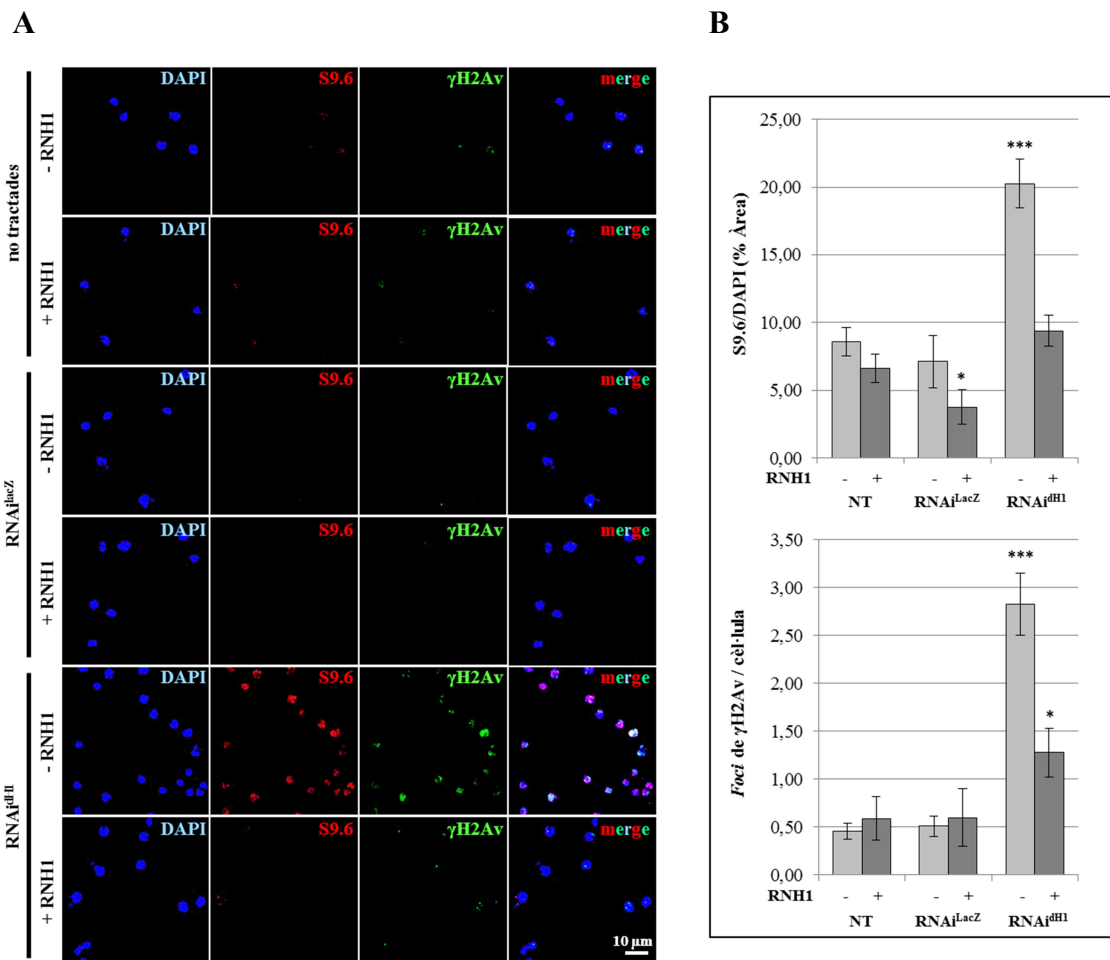
En primer lloc, es van realitzar immunotincions amb l'anticòs S9.6, un anticòs que reconeix els híbrids RNA:DNA [137]. En aquestes immunolocalitzacions, es va observar que les cèl·lules deplecionades de la histona dH1 presentaven un increment del senyal de l'anticòs, suggerint una acumulació d'híbrids RNA:DNA en aquestes condicions (Fig. 51A, files marcades -RNH1). Mentre les cèl·lules no tractades i les incubades amb un dsRNA contra LacZ presentaven uns valors de la relació S9.6/DAPI entorn a un ~7.5%, les deplecionades d'histona dH1 mostraven uns valors d'aquest paràmetre al voltant del ~20% (Fig. 51B, gràfic superior).

Per comprovar que el senyal de l'anticòs S9.6 correspon a R-loops, generalment es sobreexpressa l'enzim RNasa H1 (RNH1) i s'analitza si en aquestes condicions el senyal de l'anticòs disminueix [86, 121]. L'RNasa H1 és una ribonucleasa que degrada la cadena d'RNA dels híbrids RNA:DNA associats a la transcripció [86, 152, 153]. Per tant, si el senyal detectat per l'anticòs correspon a R-loops, aquest senyal hauria de desaparèixer en sobreexpressar l'enzim.

Per aquesta raó, per comprovar que el senyal detectat per l'anticòs corresponia a R-loops, es van transfectar cèl·lules amb una construcció que permetia l'expressió de l'RNasa H1 humana sota control del promotor del citomegalovirus. En sobreexpressar aquest enzim es va observar que el senyal disminuïa, confirmant que en deplecionar la histona dH1 existia una acumulació d'R-loops (Fig. 51A, files marcades +RNH1). A la figura 51B (gràfic superior), es pot observar clarament aquest fenomen. Mentre la relació S9.6/DAPI es troba entorn a un 20% en absència d'RNasa H1, en sobreexpressar l'enzim la relació disminueix notablement a valors al voltant d'un 10%.

En paral·lel amb aquesta disminució del senyal de l'anticòs S9.6, també es pot observar una disminució del senyal de  $\gamma$ H2Av en cèl·lules que sobreexpressen RNasa H1, suggerint que l'acumulació dels R-loops és causa de la generació de dany al DNA (Fig. 51A). Si bé el valor de *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula no varien pràcticament en transfectar cèl·lules de les condicions control amb el plasmidi per sobreexpressar l'RNasa H1 i es troben al voltant de ~0.5 *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula, en transfectar les cèl·lules en que s'ha interferit l'expressió de la histona dH1 els valors de *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula

disminueixen de forma important des de valors pròxims a  $\sim 3$  foci de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula fins a valors entorn a  $\sim 1.25$  foci de  $\gamma$ H2Av (Fig.51B, gràfic inferior).



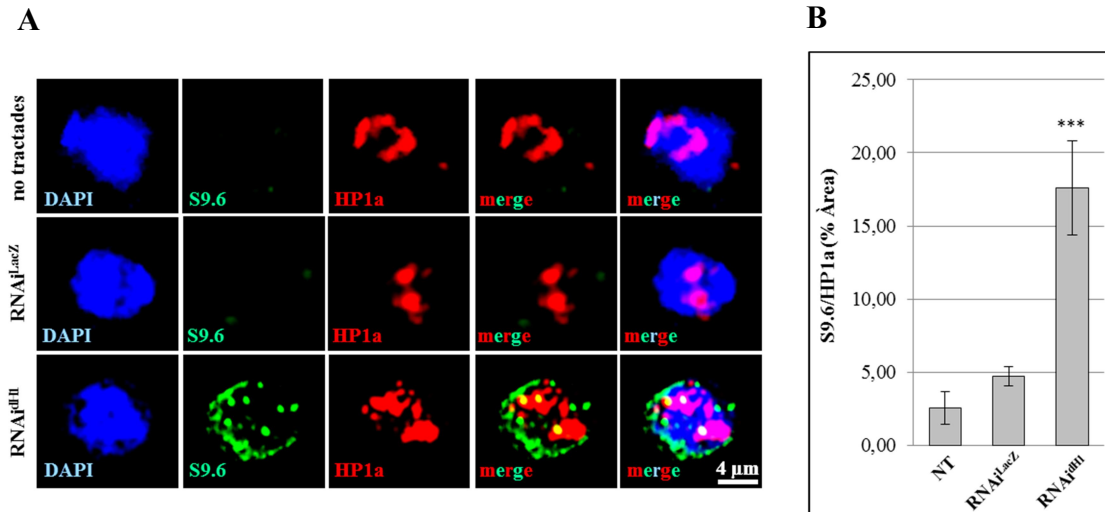
**Figura 51. La causa del dany generat en deplecionar la histona dh1 es deguda a l'acumulació d'R-loops.** A) Immunotincions contra  $\gamma$ H2Av i R-loops (S9.6) de cèl·lules de cadascuna de les condicions transfectades amb un plàsmid control (-RNH1) o un plàsmid que conté el gen de l'RNasa H1 humana (+RNH1). B) Es mostra la quantificació dels nivells d'R-loops (gràfic superior) i  $\gamma$ H2Av (gràfic inferior) per cadascuna de les condicions en cadascun dels tractaments ( $n > 50$ , per condició i tractament). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA (RNAi<sup>LacZ</sup> i RNAi<sup>dh1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) en absència d'RNasa H1 (\* $< 0.05$ , \*\* $< 0.01$ , \*\*\* $< 0.005$ ; test t-Student de dues cues).

Globalment, aquests resultats posen de manifest que es genera una acumulació important d'R-loops en interferir l'expressió de la histona dh1 a cèl·lules SL2. A més a més, aquests resultats també mostren que els R-loops són responsables de la generació de dany al DNA en aquestes condicions.

Donat que la interferència de la histona dh1 provoca una increment de  $\gamma$ H2Av preferentment a l'heterocromatina (Resultats D.1.5.), a continuació es va analitzar si també existia una acumulació preferent dels R-loops a l'heterocromatina.

En primer lloc, es van dur a terme immunolocalitzacions simultànies amb l'anticòs S9.6 i emprant anti-HP1a com a marcador d'heterocromatina, i es va mesurar la freqüència de colocalització. Efectivament, el senyal dels R-loops tendeix a colocalitzar més freqüentment amb HP1a en condicions de depleció d'histona dh1 (Fig.52A). Com es pot apreciar a la figura 52B, les quantificacions de la colocalització entre el senyal de l'anticòs S9.6 i HP1a, expressada com el percentatge de l'àrea del senyal

nuclear de l'anticòs S9.6 que colocalitza amb HP1a respecte l'àrea total del senyal nuclear de l'anticòs S9.6, posen de manifest aquest fenomen. Mentre que els valors de colocalització es troben entorn a un 2.5-5% en les condicions control, aquest percentatge augmenta fins a valors pròxims a un ~20% en les cèl·lules deplecionades de la histona dH1 (Fig. 52B).



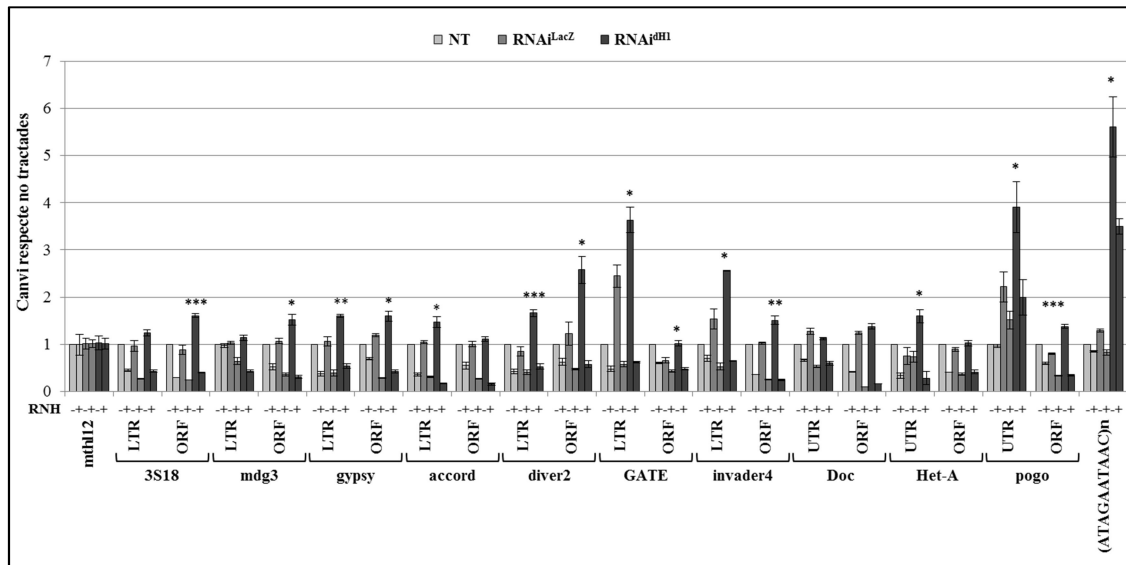
**Figura 52.** Els R-loops induïts en deplecionar la histona dH1 colocalitzen amb HP1a. A) Immunotincions contra R-loops (S9.6) i HP1a de cèl·lules de cadascuna de les condicions. B) Es mostra la quantificació de la colocalització entre els R-loops i HP1a (n>50, per condició). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA (RNAi<sup>lacZ</sup> i RNAi<sup>dH1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) (\*< 0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.005; test t-Student de dues cues). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA respecte la condició no tractada (\*< 0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.005; test t-Student de dues cues).

Paral·lelament, també es va dur a terme una immunoprecipitació d'híbrids RNA:DNA i anàlisi del DNA immunoprecipitat per PCR quantitativa (DRIP-qPCR). Utilitzant aquesta metodologia, també es va observar una acumulació d'aquestes estructures en les seqüències repetitives heterocromàtiques on s'havia detectat un increment en  $\gamma$ H2Av en cèl·lules deplecionades d'histona dH1 (Resultats D.1.4.). En el gràfic presentat en la figura 54 es pot apreciar que mentre les cèl·lules tractades amb un RNA inespecífic presenten uns valors d'enriquiment respecte la condició no tractada al voltant de ~1 per la majoria de casos, suggerint que pràcticament no hi ha diferències significatives entre aquesta condició i les cèl·lules no tractades, les cèl·lules deplecionades de la histona dH1 presenten valors d'enriquiment respecte la condició no tractada notablement superiors en molts casos. Per exemple, en la parella d'oligonucleòtids que permet amplificar una regió d'un dels ORF del retrotransposó diver2 es pot apreciar un enriquiment altament significatiu que es troba pròxim a ~3. De la mateixa manera, també es poden apreciar enriquiments significatius respecte la condició no tractada en els retrotransposons 3S18, mdg3, gypsy, accord, GATE, invader4 i Het-A, el transposó de DNA pogo i la regió satèl·lit corresponent a repeticions (ATAGAATAAC)<sub>n</sub> amb valors d'enriquiment en un rang entre ~1.5 i ~6.

A més a més, en aquest assaig també es pot observar que la immunoprecipitació de material enriquit en híbrids RNA:DNA és específica ja que en tractar les mostres amb RNasa H prèviament a la immunoprecipitació els valors d'enriquiment respecte les mateixes mostres no tractades amb RNasa H disminueix dràsticament. A mode d'exemple, a la figura 53 es pot apreciar amb la parella de primers que permeten amplificar una regió d'un dels ORF del retrotransposó diver2 que el valor d'enriquiment



respecte la cèl·lules no tractades amb cap dsRNA ni RNasa H disminueix considerablement des de valors pròxims a ~3 a valors entorn a ~0.5 en tractar les mostres de cèl·lules deplecionades d'histona dH1 amb RNasa H abans de dur a terme la immunoprecipitació. Resultats similars s'obtenen també amb la resta de seqüències repetitives analitzades. Com a control negatiu, es pot observar que amb una parella d'oligonucleòtids que permet amplificar un tros de la regió promotora del gen *mthl12*, un gen que no s'expressa a cèl·lules SL2, no s'observen variacions de l'enriquiment de la condició interferida d'histona dH1 respecte la condició no tractada, ni canvis en aquests valors en tractar les mostres amb RNasa H abans d'immunoprecipitar, suggerint que no hi ha acumulació d'R-loops en aquesta regió genòmica.



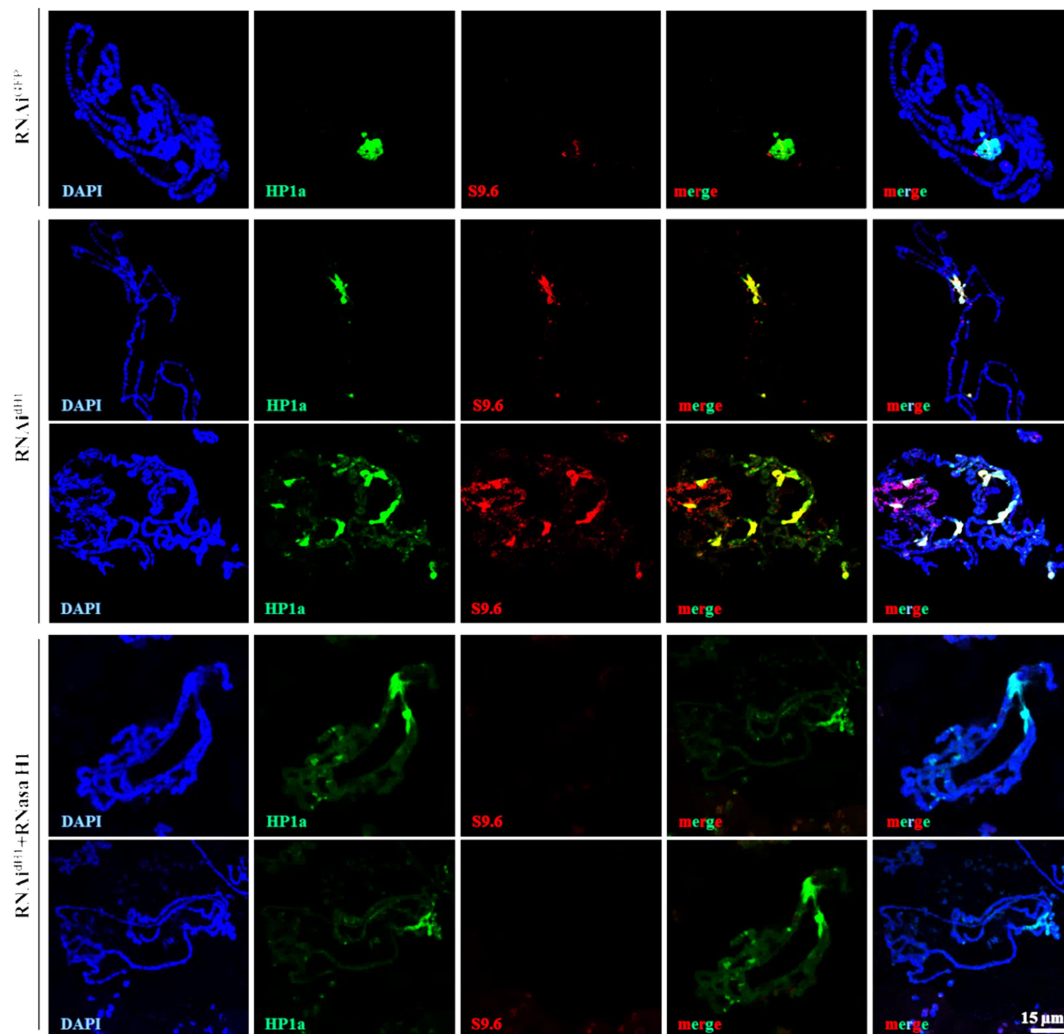
**Figura 53.** En deplecionar la histona dH1 hi ha una acumulació d'híbrids RNA:DNA a les seqüències repetitives. Es mostra els resultats de l'anàlisi mitjançant PCR quantitativa de la immunoprecipitació d'híbrids RNA:DNA per algunes de les seqüències en que es genera dany quan falta histona dH1. Com a control de confirmació de l'especificitat de l'anticòs pels híbrids RNA:DNA, les mostres van ser tractades amb RNasa H (+RNH) prèviament a la immunoprecipitació per comprovar que es tracta d'híbrids RNA:DNA. Els resultats estan expressats respecte una zona de la regió promotora del gen *mthl12* ( $n \geq 3$ , per cada condició, tractament i regió analitzada), un gen que no s'expressa a cèl·lules SL2. Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA contra la histona dH1 respecte la condició tractada amb un dsRNA inespecífic contra LacZ (\* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.005$ ; test t-Student de dues cues).

Conjuntament, tot això suggereix que en reduir el contingut d'histona dH1 es dona una acumulació d'R-loops en aquestes seqüències repetitives pròpies de l'heterocromatina.

La depleció de la histona dH1 a la regió del *pouch* del disc imaginal d'ala de la mosca també provoca un increment del senyal de  $\gamma$ H2Av [71]. A més a més, també ha estat descrit que aquest dany al DNA induïx l'apoptosi i, en conseqüència, dona lloc a una ala de mida molt reduïda [71]. D'acord amb això, a continuació, es va estudiar si, tal com s'havia observat en els experiments amb cèl·lules SL2, els R-loops també estaven al darrera del dany al DNA generat en deplecionar la proteïna a la mosca.

En primer lloc, es van dur a terme interferències de l'expressió de la histona dH1 i interferències control contra el gen que codifica per GFP i, per tant, sense efecte a *Drosophila*, per analitzar si també es podia detectar una acumulació d'R-loops a l'heterocromatina a la mosca en deplecionar la proteïna. Aquests experiments es van dur a terme mitjançant els sistema UAS-GAL4 utilitzant el *driver nubGAL4*; UAS-Dic2. Aquesta línia permet l'expressió de gens sota control d'una seqüència UAS a la regió promotora a la regió del *pouch* del disc imaginal d'ala i a glàndules salivals [154] i, a més a més,

augmenta l'eficiència de la depleció en combinar-la amb mosques que contenen un RNAi sota control d'una seqüència UAS als teixits en que s'expressa el driver donat que conté el gen que codifica per Dicer 2, l'enzim que ajuda en el tall dels siRNAs.



**Figura 54.** La interferència d'histona dH1 a glàndules salivals provoca una acumulació d'R-loops a l'heterocromatina. Es mostren immunotincions contra HP1a i R-loops en cromosomes politènics de mosques control que expressen un RNAi contra GFP (*nubGal4/UAS-RNAi<sup>GFP</sup>*; UAS-Dic2, panell superior), mosques que presenten interferència d'histona dH1 a glàndules salivals (*UAS-RNAi<sup>dH1</sup>*; *nubGal4/UAS-RNAi<sup>GFP</sup>*; UAS-Dic2, panells intermitjos) i mosques que presenten sobreexpressió d'RNasa H1 humana alhora que estan deplecionades d'histona dH1 a glàndules salivals (*UAS-RNAi<sup>dH1</sup>*; *nubGal4/UAS-Dic2/UAS-RNH1*, panells inferiors).

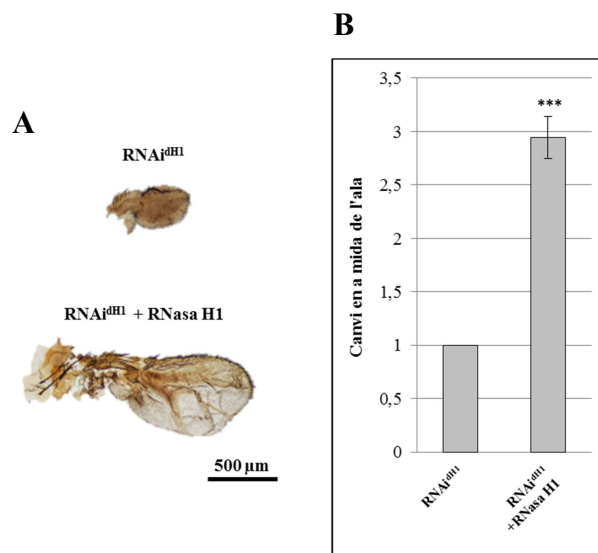
Per començar, es van creuar mosques femelles verges *nubGAL4*; UAS-Dic2 amb mascles UAS-RNAi<sup>dH1</sup>, o en el cas dels creuaments control amb UAS-RNAi<sup>GFP</sup>. Després, entre la descendència es va seleccionar les larves en tercer estadi femelles, donat que l'RNAi contra la histona dH1 es troba al cromosoma X dels progenitors mascles i, per tant, únicament les femelles de la descendència presentaven interferència de l'expressió de la proteïna.

Un cop seleccionades les femelles de la descendència, es van realitzar preparacions de cromosomes politènics. Als cromosomes politènics de les glàndules salivals, l'heterocromatina centromèrica es troba formant una estructura característica anomenada cromocentre fàcilment identificable [39]. Per aquesta raó, es va realitzar bona part de l'estudi a la mosca en aquest teixit.

A continuació, es van dur a terme conjuntament immunotincions amb l'anticòs S9.6 contra híbrids RNA:DNA i contra HP1a. En analitzar les preparacions mitjançant microscòpia confocal es va observar la depleció de la histona dH1 a les glàndules salivals de la mosca també provocava un increment significatiu del senyal de l'anticòs S9.6 que colocalitzava àmpliament amb el senyal d'HP1a, concentrada fonamentalment en el cromocentre (Fig. 54, panell intermig). A més a més, tal i com havia estat prèviament descrit [70], en alguns casos, probablement els més extrems, la depleció de la histona dH1 portava a una disgregació del senyal d'HP1a que apareixia en diverses regions dels cromosomes (Fig. 54, panell intermig), indicant una clara afectació de l'heterocromatina i el cromocentre.

Aquests resultats suggerien que en deplecionar la proteïna existia un increment d'híbrids RNA:DNA a l'heterocromatina també a la mosca. Per determinar que el senyal de l'anticòs S9.6 corresponia efectivament a R-loops, es van dur a terme nous creuaments que permetessin la sobreexpressió de l'RNasa H1 humana alhora que la interferència de l'expressió de la histona dH1. Per fer-ho, es van creuar mosques femelles verges *nubGAL4; UAS-Dic2* amb mascles *UAS-RNAi<sup>dH1</sup>; UAS-RNH1*. Com abans, entre la descendència es va seleccionar únicament les larves en tercer estadi femelles, i es van dur a terme preparacions de cromosomes politènics i immunotincions amb l'anticòs S9.6 i contra HP1a. Com es pot observar a la figura 54 (panell inferior), la sobreexpressió simultània de l'RNasa H1 humana amb la interferència de la histona dH1 resulta en una disminució molt important del senyal de l'anticòs S9.6, suggerint que es tracta d'R-loops.

Conjuntament, aquests resultats suggereixen que la depleció de la histona dH1 a glàndules salivals a la mosca també provoca una acumulació d'R-loops a l'heterocromatina.

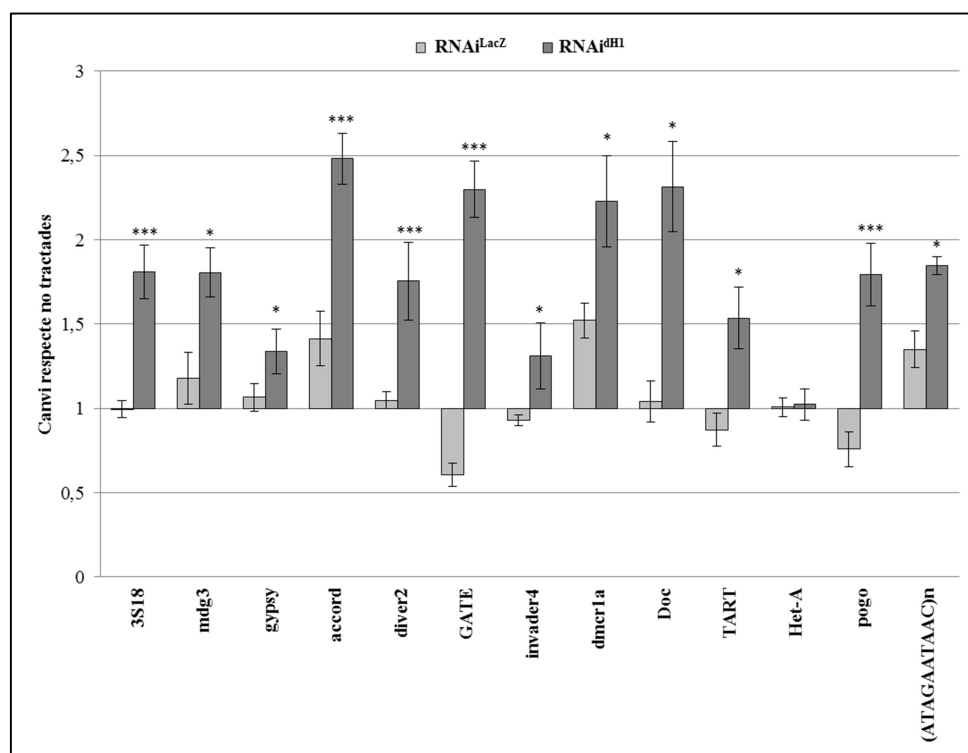


**Figura 55. La sobreexpressió de l'RNasa H1 humana en condicions d'interferència d'histona dH1 a disc imaginal d'ala permet un rescat parcial de l'ala.** A l'esquerra, es mostren exemples de l'ala de mosques interferides d'histona dH1 (*UAS-RNAi<sup>dH1</sup>; nubGal4/UAS-RNAi<sup>GFP</sup>; UAS-Dic2*) i mosques que alhora que estan interferides d'histona dH1 sobreexpressen RNasa H1 humana (*UAS-RNAi<sup>dH1</sup>; nubGal4; UAS-Dic2/UAS-RNH1*). A la dreta, quantificació de l'àrea de les ales en mosques interferides d'histona dH1 que també sobreexpressen RNasa H1 humana expressada de forma relativa respecte l'àrea en mosques en que simplement s'ha interferit l'expressió de la histona dH1, normalitzada a valor 1 ( $n > 15$  per cada condició). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb RNAi contra la histona dH1 que alhora sobreexpressa l'RNasa H1 humana respecte la condició tractada únicament amb un RNAi contra la histona dH1 (\* $< 0.05$ , \*\* $< 0.01$ , \*\*\* $< 0.005$ ; test t-Student de dues cues).

En segon lloc, es va analitzar si la sobreexpressió de l'RNasa H1 humana alhora que s'interferia l'expressió de la histona permetia rescatar la mida de l'ala. Si tal i com havia estat observat anteriorment, els R-loops també eren els inductors del dany a l'organisme en aquestes condicions, cabia esperar que la sobreexpressió de l'RNasa H1 alhora que s'interferia l'expressió de la histona dH1 permetés eliminar la font de dany al DNA i, per tant, rescatar la mida de l'ala. Per estudiar aquesta possibilitat, es van dur a terme creuaments entre mosques femelles *nubGAL4*; UAS-Dic2 amb mascles UAS-RNAi<sup>dH1</sup> o mascles UAS-RNAi<sup>dH1</sup>;UAS-RNH1 i es va mesurar la mida de l'ala. Com en els anteriors creuaments, només es va tenir en compte les femelles de la descendència, donat que l'RNAi contra la histona dH1 es troba al cromosoma X dels progenitors mascles.

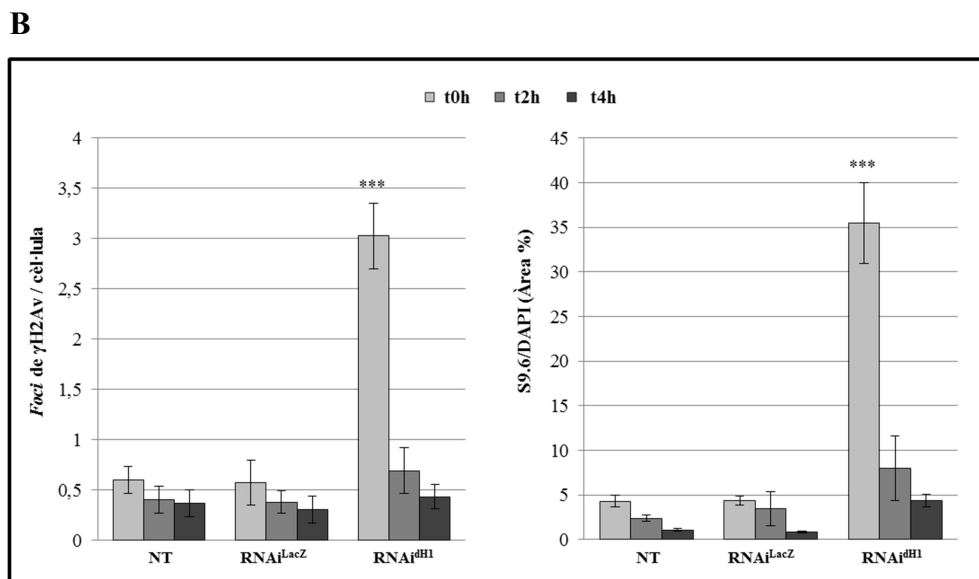
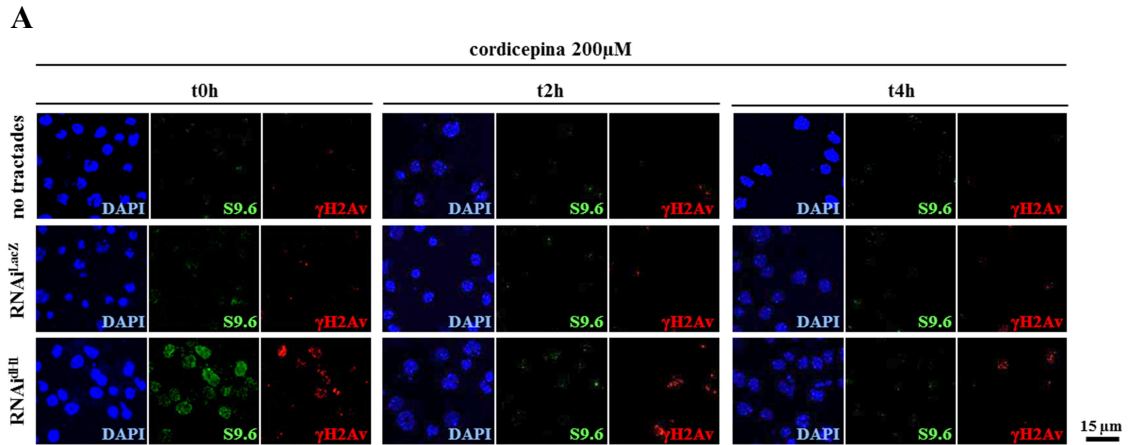
Com es pot observar en els exemples presentats a la figura 55A, les ales de les mosques que sobreexpressen l'RNasa H1 humana alhora que expressen un RNAi contra la histona dH1 són notablement més grans que les ales de les mosques en que simplement està interferida l'expressió de la variant. De fet, en quantificar la mida de l'ala, s'observa que les ales són fins a 3 vegades més grans en sobreexpressar l'RNasa H1 humana (Fig. 55B). En altres paraules, la sobreexpressió de l'RNasa permet eliminar, fins a cert punt, la font del problema que acaba donant lloc a unes ales de mida reduïda. Aquest rescat parcial de la mida de l'ala suggereix que els R-loops també podrien estar darrera el dany al DNA generat a la mosca en deplecionar la proteïna que acaba donant lloc a una ala anormalment petita.

En general, la formació dels R-loops a l'heterocromatina requereix transcripció activa de les seqüències heterocromàtiques. Per confirmar que això era així, a continuació es van dur a terme dos experiments més en paral·lel.



**Figura 56. La depleció d'histona dH1 comporta una sobreexpressió de les seqüències repetitives.** Es mostra l'expressió relativa de les seqüències repetitives respecte el gen de l'actina ( $n \geq 3$  per condició i regió analitzada). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA contra la histona dH1 respecte la condició tractada amb un dsRNA inespecífic contra LacZ (\* $< 0.05$ , \*\* $< 0.01$ , \*\*\* $< 0.005$ ; test t-Student de dues cues).

En primer lloc, es va analitzar l'expressió de les seqüències repetitives enriquides en R-loops per comprovar que en reduir el contingut d'histona dH1 estaven sobreexpressades. Efectivament, en interferir aquesta histona en cèl·lules SL2 s'obtenen uns valors d'increment de l'expressió que es troben entre ~1.5 i ~2.5 per a la majoria de casos com es pot veure a la figura 56. Per exemple, en aquesta figura es pot observar que l'expressió dels retrotransposons *accord*, *Doc*, *GATE* i *Cr1a* augmenta respecte la condició no tractada al voltant de ~2.5 vegades. De la mateixa manera, altres treballs també han posat de manifest que la depleció de la histona dH1 provoca una sobreexpressió de les seqüències repetitives [71, 74].



**Figura 57. La transcripció és necessària per a la generació del dany.** A) Es mostra alguns exemples de la tinció contra R-loops i  $\gamma$ H2Av en cèl·lules tractades amb cordicepina per cadascuna de les condicions a diferents punts temporals de tractament (t0', t2h, t4h). B) Es mostra la quantificació de l'evolució dels *foci* de  $\gamma$ H2Av (gràfic esquerra) i el contingut en R-loops (gràfic dret) per cèl·lula en inhibir la transcripció en els punts de temps analitzats (t0', t2h, t4h) (n>50 per cada condició i tractament). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA (RNAi<sup>LacZ</sup> i RNAi<sup>dH1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) a t0h (\*< 0.05, \*\*\*<0.001, \*\*\*<0.005; test t-Student de dues cues).

En segon lloc, es va realitzar un experiment d'inhibició de la transcripció utilitzant cordicepina, un anàleg d'adenosina que en incorporar-se a la molècula d'mRNA provoca la terminació prematura de la transcripció [155], i es va analitzar els nivells d'R-loops i  $\gamma$ H2Av en aquestes condicions (Fig. 57). En

aquests experiments, es va observar que les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 presenten uns valors de contingut d'R-loops i *foci* de  $\gamma$ H2Av a temps 0 min molt superiors als que presenten les cèl·lules no tractades o incubades amb un dsRNA contra LacZ. Aquest enriquiment en el contingut d'R-loops i  $\gamma$ H2Av que presenten les cèl·lules deplecionades de la histona dH1 a temps 0 min, però, disminueix significativament a mesura que les cèl·lules són tractades amb cordicepina. Pel que fa a les condicions control, en ambdues només es pot observar una certa disminució molt lleugera d'ambdós paràmetres, com és d'esperar donat que no presenten pràcticament acumulació ni d'R-loops ni de  $\gamma$ H2Av.

En resum, aquests experiments confirmen que els R-loops s'acumulen a l'heterocromatina provocant la generació de dany al DNA en aquestes regions genòmiques quan s'interfereix l'expressió de la histona dH1 i que aquesta acumulació d'R-loops requereix transcripció activa de les seqüències heterocromàtiques sobre les que es generen aquestes estructures.

### D.2.3. La depleció d'HP1a no provoca una acumulació d'R-loops

La depleció de la histona dH1 provoca una desorganització de l'heterocromatina que pot arribar a resultar, per exemple, en la pèrdua de l'estructura del cromocentre dels cromosomes politènics [70, 74]. D'acord amb aquests resultats, existia la possibilitat que l'efecte observat fos un resultat indirecte provocat per la desorganització de l'heterocromatina en aquestes condicions, fet observat en cromosomes politènics en els casos més extrems (Fig. 54). Per aquesta raó, es va analitzar si la depleció d'HP1a, una proteïna estructural de l'heterocromatina [29, 156], provocava el mateix fenotip que la depleció de la histona dH1. En aquest sentit, utilitzant el sistema UAS-GAL4, es van dur a terme creuaments entre mosques femelles verges *nubGAL4*; UAS-Dic2 amb mascles UAS-RNAi<sup>HP1a</sup>, i es va analitzar les femelles de la descendència.

D'una banda, es van dur a terme preparacions de cromosomes politènics i es van realitzar immunotincions contra HP1a, dH1 i amb l'anticòs S9.6.

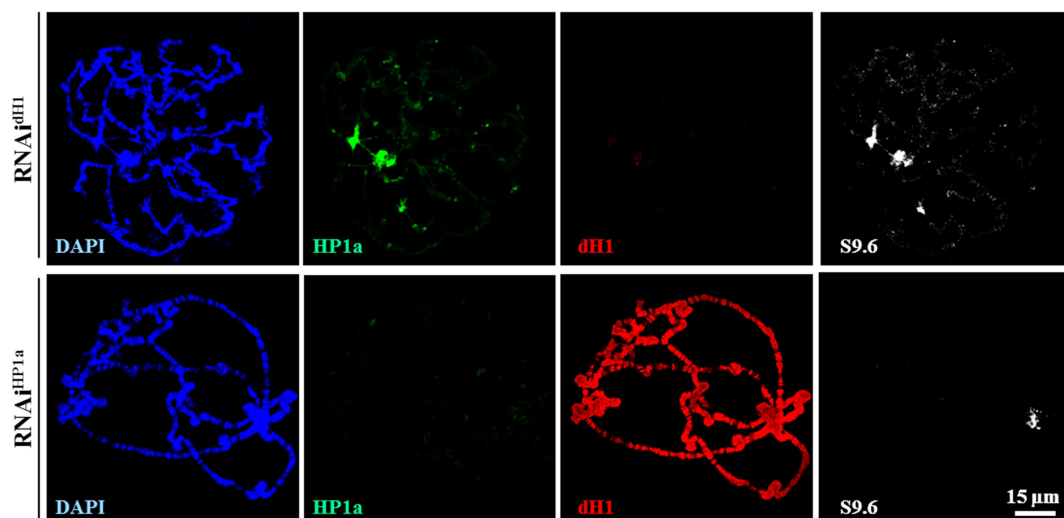
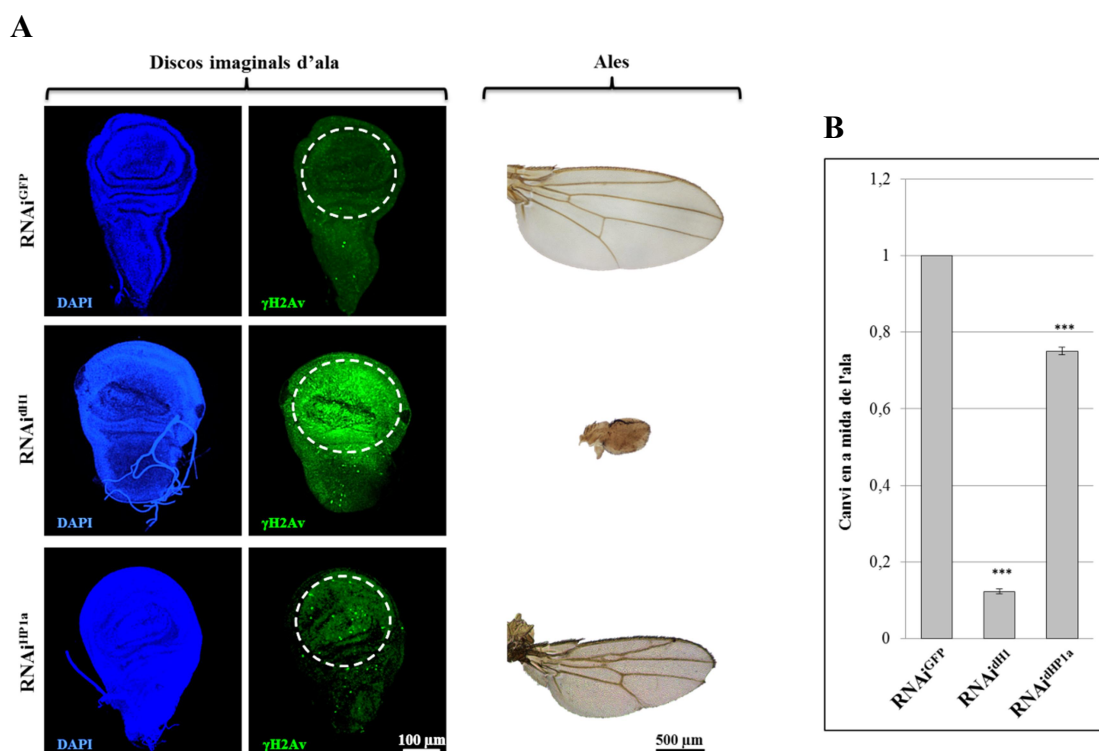


Figura 58. La depleció d'HP1a no provoca una acumulació d'R-loops a cromosomes politènics. Es mostren alguns exemples de cromosomes politènics tenyits contra HP1a, R-loops i dH1 en glàndules salivals interferides d'histona dH1 (UAS-RNAi<sup>dH1</sup>; *nubGal4*; UAS-Dic2, panells superiors) o contra HP1a (*nubGal4*/UAS-RNAi<sup>HP1a</sup>; UAS-Dic2, panells inferiors).

Com es pot veure a la figura 58, comparat amb l'efecte de la depleció de la histona dH1, la interferència de l'expressió d'HP1a no resulta en una acumulació tan gran del senyal de l'anticòs S9.6 al cromocentre. Això suggereix que, malgrat també afectar la formació de l'heterocromatina, la depleció d'HP1a no té el mateix efecte que la histona dH1 sobre l'acumulació d'R-loops a l'heterocromatina. A més a més, també es pot observar que el senyal de la histona dH1 no desapareix en deplecionar HP1a, reforçant la idea que la presència de la histona és necessària per evitar l'acumulació d'aquestes estructures.

D'altra banda, també es van dur a terme immunotincions contra  $\gamma$ H2Av a discos imaginals d'ala de larves en tercer estadi de desenvolupament, i es va analitzar les mides de les ales en aquestes condicions.



**Figura 59. La depleció d'HP1a no provoca una acumulació de  $\gamma$ H2Av al disc imaginal d'ala i l'ala adulta només resulta lleugerament afectada.** A) Immunotinció contra  $\gamma$ H2Av en discos imaginals de larves de tercer estadi interferides a la regió del *pouch* (destacada per cercles de línia discontinua blanca) contra GFP (*nubGal4/UAS-RNAi<sup>GFP</sup>*; UAS-Dic2, panell superior), histona dH1 (*UAS-RNAi<sup>dH1</sup>*; *nubGal4*; UAS-Dic2, panell intermig) o HP1a (*nubGal4/UAS-RNAi<sup>HP1a</sup>*; UAS-Dic2, panell inferior). B) Es mostra la quantificació de l'àrea de l'ala en interferir la histona dH1 o HP1a respecte la de mosques control que sobreexpressen un RNAi contra GFP (RNAi<sup>GFP</sup>), normalitzada a valor 1 (n>15 per cada condició). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb RNAi contra la histona dH1 o HP1a respecte la condició tractada amb un RNAi contra GFP (\*< 0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.005; test t-Student de dues cues).

En primer lloc, es va observar que la depleció d'HP1a no provocava pràcticament acumulació de  $\gamma$ H2Av a la regió del *pouch* del disc imaginal d'ala, suggerint que la interferència de l'expressió d'aquesta proteïna no resultava en una acumulació de dany al DNA. Com es pot veure a la figura 59A, mentre la depleció de la histona dH1 resulta en un augment important del senyal de  $\gamma$ H2Av a la regió del *pouch* del disc imaginal d'ala, la interferència d'HP1a no provoca un augment important de la marca en aquesta regió

En segon lloc, en la mateixa direcció que els resultats obtinguts en les immunotincions contra  $\gamma$ H2Av en discos imaginals d'ala, es va veure que la depleció d'HP1a no feia que les ales de l'organisme adult presentessin una mida extremadament reduïda (Fig. 59A). A diferència del que s'observava en deplecionar la histona dH1, en deplecionar la HP1a la mida de l'ala només resulta lleugerament afectada. Mentre a les mosques en que s'ha interferit l'expressió de la histona, les ales presenten una mida de l'ala al voltant d'un ~15% de la mida normal, quan s'elimina la proteïna HP1a la mida augmenta fins a un ~75% (Fig. 59B).

### **D.2.4. Els R-loops generats en deplecionar la histona dH1 causen dany al DNA durant la replicació**

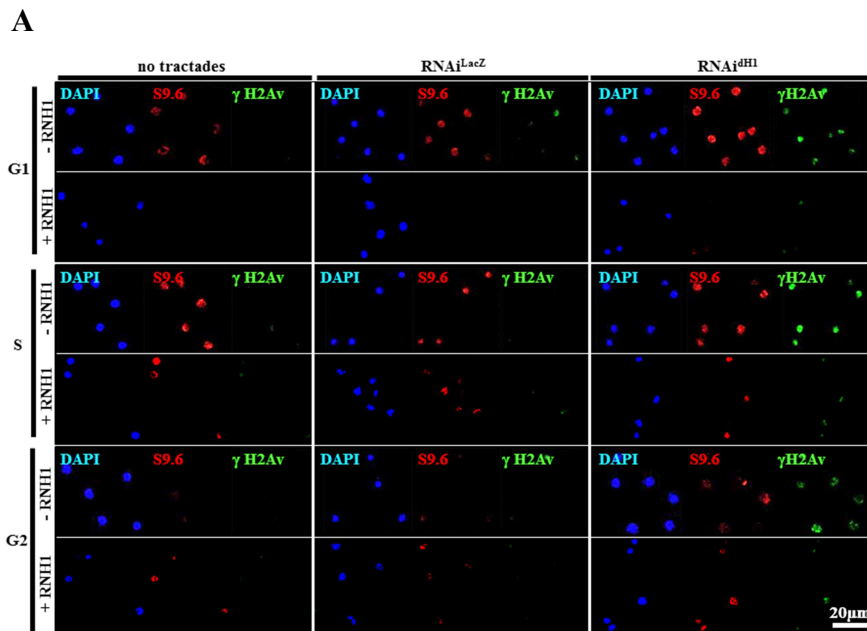
Els R-loops representen un obstacle important per a la progressió de la forqueta de replicació [108]. Per determinar si l'acumulació d'R-loops era la responsable de la generació de dany a fase S observada, es va separar les cèl·lules en funció de si es trobaven en fase G1, S o G2/M del cicle cel·lular i es van dur a terme immunolocalitzacions amb l'anticòs S9.6 i contra  $\gamma$ H2Av. De la mateixa manera que en experiments anteriors, per estar segurs que el senyal nuclear de l'anticòs S9.6 corresponia a R-loops en cada fase del cicle cel·lular, en paral·lel es va dur a terme el mateix experiment amb cèl·lules transfectades amb un plasmidi per sobreexpressar l'RNasa H1 humana.

Com es pot observar a la figura 60, en deplecionar la histona dH1 únicament es pot observar un increment significatiu del senyal de l'anticòs S9.6 respecte les condicions control a fase G1. A fase S i G2, en canvi, el senyal observat en interferir l'expressió de la histona dH1 no varia gaire de l'observat en les condicions control. Sorprenentment, el senyal de l'anticòs únicament sembla sensible a l'RNasa H1 humana a fase G1. El fet que a fase S i G2/M el contingut en R-loops sigui similar en totes tres condicions i que a més no disminueixi en sobreexpressar l'RNasa H1 humana fa pensar que probablement l'anticòs estigui reconeixent híbrids RNA:DNA que, per qualsevol raó, no poden ser degradats per l'enzim RNasa H1 humana.

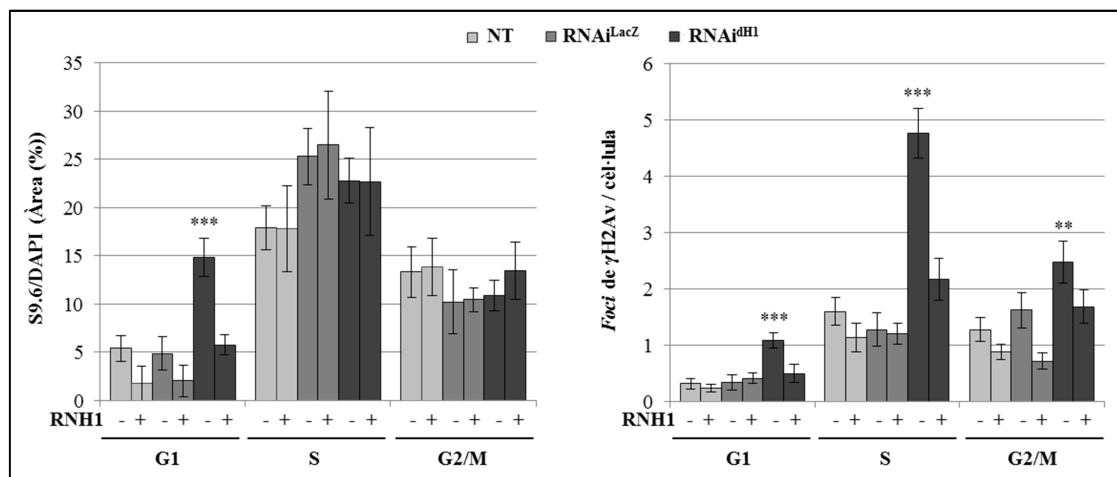
Pel que fa al contingut en  $\gamma$ H2Av, s'observa un augment notable del número *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula en deplecionar la histona dH1 respecte les condicions control en totes tres fases. D'acord amb els resultats obtinguts anteriorment mitjançant *western blot* (Fig. 47), però, l'enriquiment més important en *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula s'observa a fase S (Fig. 60). Malgrat només observar-se una disminució del senyal de l'anticòs S9.6 a fase G1 en transfectar les cèl·lules amb l'RNasa H1 humana, en el cas del contingut en  $\gamma$ H2Av s'aprecia una disminució significativa del dany a les tres fases, sobretot a fase S (Fig. 60).

En global, aquests resultats demostren que en deplecionar la histona dH1 es genera dany preferentment durant la fase S del cicle cel·lular i que aquest dany és degut a l'acumulació d'R-loops donat que en sobreexpressar l'RNasa H1 humana i eliminar aquestes estructures el dany disminueix notablement. Tanmateix, la presència dels R-loops a fase S no pot ser confirmada donat que en sobreexpressar l'enzim el senyal de l'anticòs S9.6 no disminueix. En aquest sentit, l'assaig només permet confirmar l'existència d'una acumulació d'R-loops a G1.





**B**



**Figura 60.** Els R-loops comencen a acumular-se a G1, però el principal increment de dany no es visible fins fase S. A) Es mostra alguns exemples de la tinció contra R-loops i  $\gamma$ H2Av en cèl·lules transfectades amb un plàsmid control (- RNH1) o amb un plàsmid que permet la sobreexpressió de l'RNasa H1 (+RNH1) prèviament separades segons la fase del cicle cel·lular en que es troben. B) Es mostra la quantificació dels nivells d'R-loops (gràfic esquerre) i de foci de  $\gamma$ H2Av (gràfic dret) al llarg del cicle cel·lular, en funció de si les cèl·lules han estat transfectades amb un plàsmid control (-RNH1) o un que permet sobreexpressar l'RNasa H1 (+RNH1) (n>50 per condició, fase i tractament). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA (RNAi<sup>LacZ</sup> i RNAi<sup>dH1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) en absència d'RNasa H1 (-RNH1) (\*< 0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.005; test t-Student de dues cues).

**D.3. Alteracions del patró temporal de replicació del DNA causades per la depleció de la histona dH1**

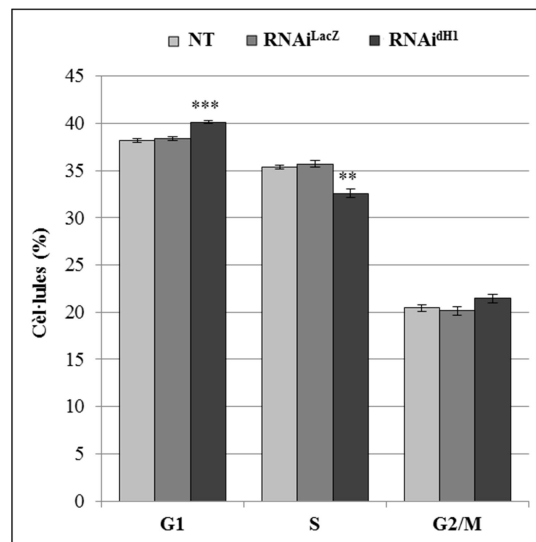
Les alteracions en la dinàmica normal de replicació del DNA generen estrès replicatiu que, en última instància, pot donar lloc a dany al DNA [77, 80, 95]. La depleció de la histona dH1 provoca un increment del dany al DNA associat a fase S, com es pot apreciar a l'apartat D.2.4. dels Resultats. La fase

S del cycle cel·lular es caracteritza per ser la fase del cycle en que té lloc la replicació del DNA. Per aquesta raó, la generació de dany durant aquesta fase suggereix l'existència de problemes durant la replicació del DNA.

En relació amb això, es va analitzar els efectes que podia tenir la depleció de la histona dH1 sobre la dinàmica de la replicació del DNA.

### D.3.1. El cycle cel·lular només està lleugerament afectat en les cèl·lules deplecionades d'histona dH1

En primer lloc, es va analitzar si la interferència de l'expressió de la histona dH1 provocava una acumulació de cèl·lules a fase S com a conseqüència de problemes en la progressió de la replicació del DNA. Per adreçar aquesta qüestió, es va estudiar el perfil del cycle cel·lular obtingut per citometria de flux per cadascuna de les condicions.

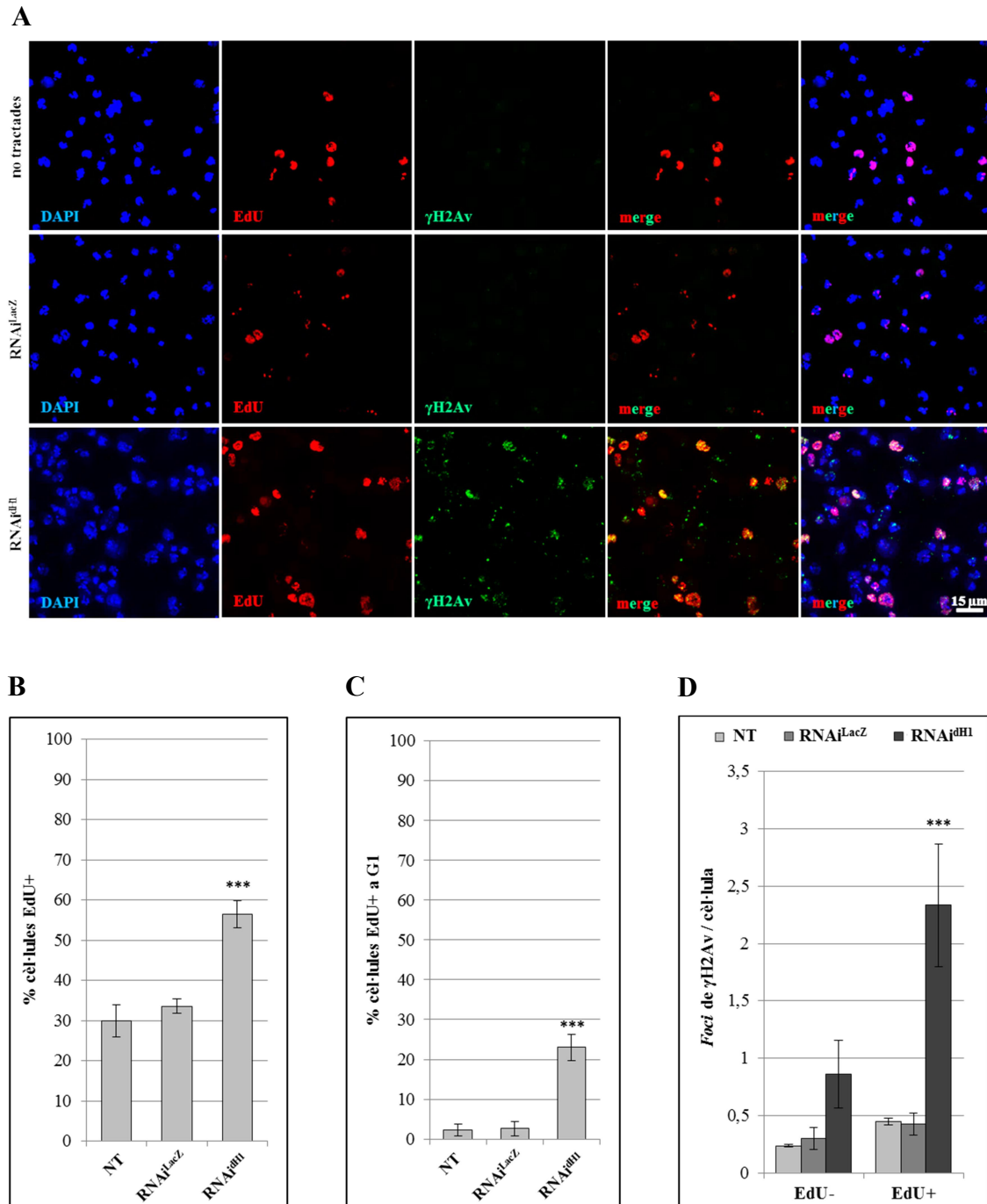


**Figura 61.** El perfil del cycle cel·lular mostra una petita acumulació de cèl·lules a G1 en interferir l'expressió d'histona dH1. Es mostra els percentatges de cèl·lules en cadascuna de les fases del cycle cel·lular per cada condició (n=3 per cada condició). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA (RNAi<sup>LacZ</sup> i RNAi<sup>dH1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) (\*< 0.05, \*\*< 0.01, \*\*\*< 0.005; test t-Student de dues cues).

En analitzar aquest perfil, es va observar que el cycle cel·lular només estava lleugerament afectat en cèl·lules deplecionades (Fig. 61). En aquestes condicions, es podia apreciar una petita però significativa acumulació de cèl·lules a G1. El percentatge de cèl·lules que es trobaven en aquesta fase del cycle cel·lular passava d'un ~37% de les condicions control a un ~40% en interferir l'expressió d'histona dH1. A fase S, en canvi, s'observava una disminució d'un 3-4%, passant d'un 35% de les condicions control a un ~32%, una diferència de nou baixa però estadísticament significativa. Finalment, a G2/M, només hi havia un petit increment d'un 1% en la condició deplecionada, però en aquest cas no arribava a

ser significatiu. Val a dir, però, que en cèl·lules no tractades o incubades amb un dsRNA contra LacZ no s'observen aquestes diferències.

En general, l'anàlisi del contingut cel·lular en cada fase del cicle cel·lular suggereix una petita acumulació de cèl·lules a G1 en deplecionar la histona dH1 associada a una disminució del percentatge de cèl·lules a fase S en aquesta condició.



**Figura 62.** En deplecionar la histona dH1 es detecta un increment de cèl·lules EdU positives. A) Detecció de la incorporació d'EdU i immunolocalització de  $\gamma$ H2Av en cadascuna de les condicions. B) Es mostra la quantificació del percentatge de cèl·lules EdU positives per cada condició ( $n > 50$  per cada condició). C) Es mostra la quantificació del número de foci de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula que es troben en regions positives per EdU (EdU+) o negatives (EdU-) ( $n > 50$  per cada condició). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA (RNAi<sup>LacZ</sup> i RNAi<sup>dH1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) (\* $< 0.05$ , \*\* $< 0.01$ , \*\*\* $< 0.005$ ; test t-Student de dues cues).

Conjuntament amb aquestes anàlisis del cicle cel·lular mitjançant citometria de flux, també es van dur a terme marcatges cel·lulars utilitzant l'anàleg de timina 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU). La incorporació d'aquest nucleòtid modificat i la seva posterior detecció mitjançant una reacció química dependent de coure permet visualitzar quines cèl·lules estan duent a terme la replicació del DNA. En analitzar la quantitat de cèl·lules en que detectàvem incorporació d'EdU després d'una incubació de 10 minuts en medi de cultiu que contenia EdU 10 $\mu$ M, es va observar que hi havia un augment significatiu del percentatge de cèl·lules que eren positives per EdU en interferir l'expressió de la histona dH1 (Fig 62A). Com es pot observar a la figura 62B, mentre a les condicions control un ~30% de les cèl·lules són positives per EdU en la condició deplecionada aquest valor s'enfilava fins a un ~60%. Això suggeria un increment del nombre de cèl·lules duent a terme la replicació del DNA en aquesta condició. Tal i com s'ha mostrat anteriorment, però, el perfil del cicle cel·lular pràcticament no resultava alterat. Per aquesta raó, es va analitzar el contingut de cèl·lules EdU positives fora de fase S. Sorprenentment, es va observar un increment important en el contingut de cèl·lules positives per EdU a fase G1 en deplecionar la histona dH1 (Fig. 62C).

A més a més, conjuntament amb la detecció de l'EdU, també es van dur a terme immunotincions contra  $\gamma$ H2Av. En analitzar els resultats obtinguts, es va observar que el dany tendeix a colocalitzar amb regions nuclears EdU positives, suggerint de nou que la generació de dany està associada a la replicació del DNA (Fig. 62A). Concretament, s'observa una mitjana al voltant de ~2-2.5 *foci* de  $\gamma$ H2Av que colocalitzen amb EdU per cèl·lula en deplecionar la histona dH1, mentre que en les condicions control aquests valors es troben entorn a ~0.5 (Fig. 62D). Això representa un increment al voltant de ~4-5 en la condició deplecionada respecte les condicions control. En canvi, pel que fa al nombre de *foci* de  $\gamma$ H2Av que no colocalitzen amb EdU per cèl·lula, els valors es troben entorn a ~0.5-1 en deplecionar la proteïna, mentre que en les condicions control estan entre ~0-0.5 (Fig. 62D). Per tant, l'increment relatiu de la condició interferida d'histona dH1 respecte les condicions control pel que fa al número de *foci* de  $\gamma$ H2Av que no colocalitzen amb EdU per cèl·lula es troba al voltant de ~1. De nou, aquests resultats posen de manifest que el principal increment de  $\gamma$ H2Av que té lloc en eliminar la histona es dona associat a la replicació del DNA.

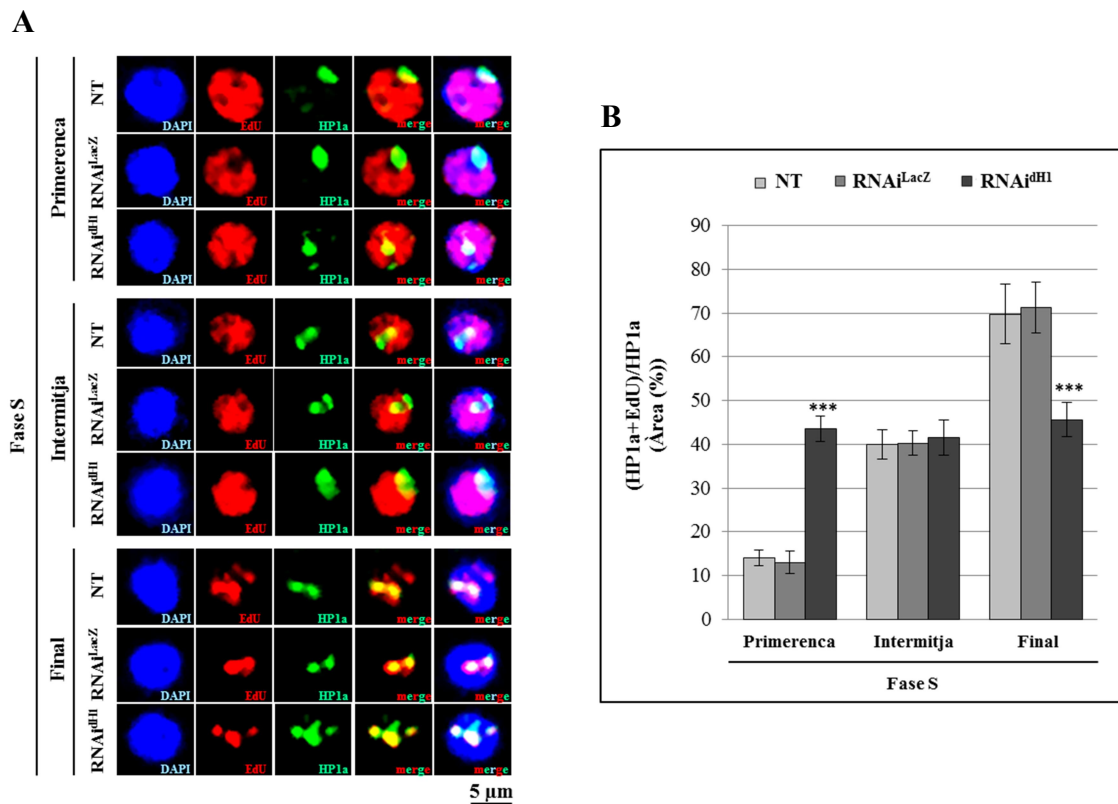
### **D.3.2. L'heterocromatina es replica anormalment d'hora a fase S en cèl·lules deplecionades d'histona dH1**

A continuació, donat que la generació de dany es concentra a l'heterocromatina, es va estudiar si el patró temporal de replicació d'aquest tipus de cromatina es trobava alterat en deplecionar la histona dH1.

L'heterocromatina és una regió genòmica que es caracteritza, entre altres, per replicar-se tard a fase S [25]. Per determinar si existien problemes amb el patró temporal de replicació de l'heterocromatina en la condició deplecionada d'histona dH1, es va dur a terme conjuntament la detecció d'EdU i immunotincions contra HP1a en cèl·lules que es trobaven a l'inici, al mig o al final de fase S.

En primer lloc, es van incubar les cèl·lules de les condicions control i de la condició interferida en medi de cultiu amb EdU 10 $\mu$ M durant 10 minuts i, a continuació, es van separar les cèl·lules en funció

de si es trobaven al principi, a la meitat o al final de fase S per citometria de flux. Acte seguit es va dur a terme conjuntament la immunolocalització d'HP1a i la detecció d'EdU (Fig. 63A).



**Figura 63. L'heterocromatina es replica anormalment d'hora a fase S en depleccionar la histona dH1.** A) Es mostra alguns exemples de la tinció d'EdU i HP1a en cèl·lules seleccionades per citometria de flux en tres subfases de la fase S: primerenca, intermitja i final. B) Es mostra la quantificació de la colocalització entre HP1a i EdU ( $n > 50$  per cada subfase i condició). Les barres d'error representen l'error estàndard de la mitjana (SEM). S'indiquen els p-valors de les condicions tractades amb dsRNA (RNAi<sup>LacZ</sup> i RNAi<sup>dH1</sup>) respecte la condició no tractada (NT) (\* $< 0.05$ , \*\* $< 0.01$ , \*\*\* $< 0.005$ ; test t-Student de dues cues).

A les condicions control, es va observar que la freqüència de colocalització augmentava a mesura que s'avança a fase S, obtenint un valor màxim de colocalització pròxim al ~70% al final de fase S, tal i com caldria esperar donat que l'heterocromatina es caracteritza per replicar-se tard a fase S (Fig. 63B). En canvi, quan s'interferia l'expressió de la histona dH1 s'observava un gran increment de la colocalització d'EdU i HP1a a principi de fase S. A diferència de les condicions control en que la colocalització es troba al voltant d'un ~15%, a les cèl·lules en que s'havia interferit l'expressió de la histona dH1 la colocalització entre HP1a i EdU a principi de fase S girava al voltant d'un ~45% (Fig. 63B). A la subfase intermitja de fase S, en canvi, les cèl·lules en que s'havia interferit l'expressió de la histona dH1 presentaven valors de colocalització similars als observats en les condicions control. En aquest cas, els valors es trobaven entorn a un 40% en totes tres condicions (Fig. 63B). Finalment, també es va observar una certa disminució de la colocalització en les cèl·lules depleccionades respecte les condicions control a final de fase S. En el tram final de fase S, les cèl·lules depleccionades d'histona dH1 presentaven uns valors de colocalització entorn al ~45%. En canvi, tant les cèl·lules no tractades com les cèl·lules tractades amb un dsRNA contra LacZ mostraven valors pròxims a un ~70% (Fig. 63B).

En resum, aquests resultats posen de manifest que la depleció de la histona dH1 provoca que les regions d'heterocromatina, que en condicions normals haurien de presentar una certa tendència a replicar-se tard a fase S, tendeixen a ser replicades anormalment d'hora.

## **E. DISCUSSIÓ**





A diferència de la majoria de metazous, *D. melanogaster*, només conté una única variant somàtica d'histona H1, dH1. Aquesta propietat fa que sigui un organisme idoni d'entre els eucariotes superiors per a l'estudi funcional d'aquesta proteïna. En aquest organisme, s'ha descrit que la histona dH1 és essencial per al desenvolupament i que és necessària per a la formació de l'heterocromatina [70]. En relació amb això últim, s'ha observat que la histona dH1 funciona com un supressor de la variegació i que en la seva absència l'estructura dels cromosomes politènics de les glàndules salivals queda greument afectada [70]. En aquest sentit, s'ha vist que el cromocentre, estructura fàcilment identificable en cromosomes politènics pel seu elevat nivell de compactació formada per la convergència en una mateix punt de l'heterocromatina pericentromèrica dels diferents cromosomes, pot resultar greument afectat en deplecionar la histona dH1.

Estudis més recents han permès determinar que aquesta histona pot contribuir de dues formes a la formació de l'heterocromatina. D'una banda, s'ha observat que la histona dH1 pot contribuir a la formació de l'heterocromatina mitjançant el reclutament de Su(var)3-9 [74], una metiltransferasa que metila la histona H3 a la lisina 9 generant H3K9me<sub>2/3</sub>. De l'altra, també ha estat descrit que pot contribuir-hi mitjançant un mecanisme independent de la metilació d'H3K9, a través de la única proteïna de la família STAT a *D. melanogaster*, STAT29E [75]. Per tant, sembla que existeixen dues vies per a la formació de l'heterocromatina a *D. melanogaster*, una implicant HP1a i Su(Var)3-9 i l'altra STAT92E i HP1a. En ambdós casos, ha estat suggerit que la histona dH1 dirigeix la formació de l'heterocromatina a través d'interaccions directes amb HP1a, STAT29E i Su(Var)3-9. Tot i això, encara no està clar què provoca finalment la formació d'heterocromatina només a determinades regions del genoma ni com es tria entre ambdues vies.

En relació amb el seu paper en la condensació de les regions heterocromàtiques riques en seqüències repetitives, s'ha observat que la histona dH1 actua principalment com a repressor transcripcional dels elements heterocromàtics [71, 74]. En aquest sentit, s'ha vist que la depleció de la histona dH1 només provoca la sobreexpressió d'entre un 5-10% dels gens del genoma. Aquest petit grup de gens, però, correspon majoritàriament a elements heterocromàtics [71]. De nou, aquesta observació suggereix que la presència de la histona dH1 sembla necessària per a l'establiment de l'heterocromatina i el consegüent silenciament de les seqüències repetitives que conté [70, 71, 74].

Una altra conseqüència de la depleció de la histona dH1 a *D. melanogaster* és la generació de dany al DNA [71]. En aquest sentit, s'ha observat que la depleció de la histona dH1 a la regió del *pouch* del disc imaginal d'ala provoca un increment molt notable de  $\gamma$ H2Av en aquesta regió.

## **E.1. La depleció de la histona H1 de *D. melanogaster*, dH1, provoca dany al DNA a l'heterocromatina i inestabilitat genòmica**

En aquest treball, s'ha observat que la depleció de la histona dH1 a cèl·lules SL2 de *D. melanogaster* provoca un increment de la fosforilació d'H2Av a la serina 137. Inicialment aquesta modificació, referida habitualment com a  $\gamma$ H2Av, es va correlacionar amb la presència de trencaments de doble cadena del DNA [98, 102]. Tanmateix, recentment s'ha observat que es tracta d'una modificació més complexa que també actuaria com una marca d'activació de l'expressió gènica en gens dependents de PARP-1 [157]. Fins i tot, a mamífers, s'ha vist que l'homòleg de  $\gamma$ H2Av,  $\gamma$ H2AX, també es correlaciona amb la presència de forquetes de replicació aturades [100].

En qualsevol cas, donat que una acumulació d'aquest senyal generalment s'associa a dany al DNA, l'increment de  $\gamma$ H2Av observat en deplecionar la histona dH1 suggeria la generació de dany al DNA. Per tal de confirmar aquest punt de forma directa, s'ha emprat l'assaig de *Comet Assay* amb el qual s'ha pogut observar que efectivament la depleció d'aquesta histona provoca un increment important de trencaments del DNA, principalment trencaments de doble cadena (Fig. 40B i C). Aquest fet confirma que l'acumulació de  $\gamma$ H2Av observada en deplecionar la histona dH1 està associada a un increment del dany al DNA en aquestes condicions.

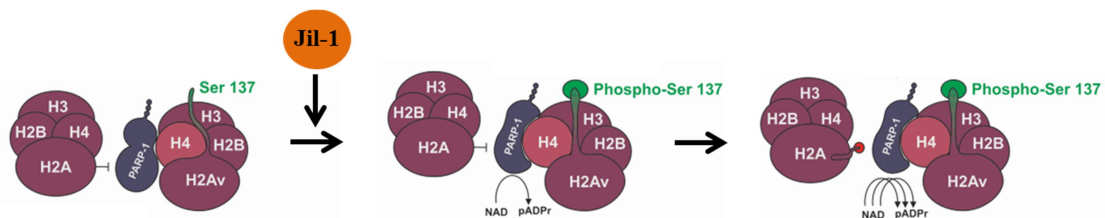
Associat a aquest dany també s'ha observat un fenomen d'hiperrecombinació manifest en un increment notable d'intercanvis entre cromàtides germanes en interferir l'expressió de la histona dH1. Aquest increment suggereix també l'existència d'inestabilitat genòmica fruit del dany al DNA generat en aquestes condicions. Això està d'acord amb el fenotip d'hiperrecombinació observat en mutants nuls per *Hho1*, l'ortòleg de la histona dH1 a *S. cerevisiae* [158].

Quant a la localització genòmica d'aquest dany, els resultats publicats prèviament d'un efecte preferent sobre l'heterocromatina de la depleció de la histona dH1 [70, 71, 74] feien pensar en una acumulació del dany en aquestes regions. En relació amb això, mitjançant la immunoprecipitació de la cromatina enriquida en  $\gamma$ H2Av, s'ha observat que en deplecionar la histona dH1 existeix una acumulació preferent de  $\gamma$ H2Av en seqüències repetitives. Concretament, s'ha detectat aquest increment en transposons, repeticions simples, satèl·lits i DNA ribosòmic (Taula 6). Aquestes seqüències repetitives són característiques de l'heterocromatina [34], i suggereixen que el dany originat per la manca d'histona dH1 es genera en regions heterocromàtiques. Malgrat no haver-se obtingut un gran número de regions enriquides en  $\gamma$ H2Av mitjançant l'anàlisi de ChIP-seq en cap de les dues condicions (Fig.42), els resultats obtinguts apunten clarament cap a un enriquiment de la marca epigenètica en aquestes regions en condicions de depleció d'histona dH1. En suport d'aquesta hipòtesi, mitjançant immunoprecipitació de la cromatina seguida de l'anàlisi per PCR quantitativa s'ha confirmat aquest enriquiment i la seva especificitat per la condició interferida d'histona dH1.

A més a més, també s'han obtingut altres resultats que apunten en la mateixa direcció. En primer lloc, s'ha vist que en condicions de depleció d'histona dH1 els *foci* de  $\gamma$ H2Av tendeixen a colocalitzar més freqüentment amb HP1a, una proteïna estructural de l'heterocromatina [150, 156]. Com es pot apreciar a la figura 46, entorn a un ~60% dels *foci* de  $\gamma$ H2Av colocalitzen amb el senyal d'aquesta proteïna, mentre que a les condicions control aquesta colocalització només es troba al voltant d'un ~20% (Fig. 46B). Si es té en compte que les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 contenen al voltant de ~3

*foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula (Fig. 39B), això indica que aproximadament  $\sim 2$  de cada  $\sim 3$  d'aquests *foci* colocalitzen amb el senyal d'HP1a. En canvi, les cèl·lules no tractades o incubades amb un dsRNA contra LacZ només contenen al voltant de  $\sim 0.5$  *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula (Fig. 39B), dels quals només un  $\sim 20\%$ , és a dir,  $\sim 0.1$  *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula, es troben en regions positives per HP1a. Aquestes observacions posen de manifest que malgrat l'increment principal de *foci* de  $\gamma$ H2Av es dona en regions HP1a positives, també hi ha un cert increment en el nombre de *foci* fora d'aquestes regions. En qualsevol cas, aquest increment en regions HP1a negatives és menor comparat amb l'augment que s'observa en regions on hi ha HP1a. Mentre que en regions HP1a negatives, el número de *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula passa de  $\sim 0.4$  a  $\sim 1$ , la qual cosa representa un increment aproximadament al voltant de  $\sim 2$ , en les regions positives per HP1a el número de *foci* passa de  $\sim 0.1$  a  $\sim 2$ , augmentant entorn a  $\sim 20$  vegades en aquestes regions. Aquest augment del dany en regions que no contenen HP1a podria ser degut al fet que la histona dH1 també és necessària per evitar la generació de dany en algunes regions euromàtiques concretes o al fet que el dany s'acumula en altres regions heterocromàtiques que no es caracteritzen per la presència d'HP1a [37]. Sigui com sigui, els resultats suggereixen que en deplecionar la histona dH1 es genera dany i que aquest dany tendeix a acumular-se preferentment en regions heterocromàtiques que contenen HP1a.

En segon lloc, també s'ha observat que els intercanvis observats en deplecionar la proteïna entre cromàtides germanes semblen donar-se preferentment al voltant del centròmer i a prop dels extrems dels cromosomes, zones típicament heterocromàtiques [43] (Fig. 41). Finalment, els resultats obtinguts en immunotincions contra  $\gamma$ H2Av en cromosomes mitòtics també mostren clarament que els *foci* de  $\gamma$ H2Av tendeixen a aparèixer en aquestes mateixes regions (Fig. 48). Globalment, totes aquestes observacions suggereixen que el dany generat en deplecionar la histona dH1 es genera preferentment en regions heterocromàtiques.



**Figura 64. Model molecular de l'activació de PARP-1 per les histones del nucleosoma.** PARP-1 i JIL-1 es troben preferentment units a les regions promotores a través de l'associació amb nucleosomes que contenen H2Av. PARP-1 es manté inactiu mitjançant la interacció amb els nucleosomes veïns que contenen H2A, mentre que l'acetilació de la lisina 5 d'H2A elimina l'efecte inhibitor d'H2A. L'aparició d'un factor de transcripció en resposta a un estímul extern induïx canvis moleculars que condueixen a l'activació de JIL-1. Aquesta quinasa interacciona amb un nucleosoma que conté H2Av i fosforila H2A a la serina 137. Aquesta fosforilació incrementa la força de l'interacció entre PARP-1 i H4, i s'inicia la producció de pADPr (poliADPribosilació). Canvis en l'estructura nucleosomal conseqüència d'aquesta modificació provoquen l'obertura de la cromatina i activació de la transcripció. Imatge adaptada de [157].

Cal destacar que mitjançant immunoprecipitació de la cromatina també es detecta  $\gamma$ H2Av associat a les regions promotores de gens que es troben majoritàriament en regions pericentromèriques i que s'expressen per sobre de la mitjana d'expressió a SL2 (Fig. 43). En aquest cas, però, aquesta modificació associada a promotors apareix tant en cèl·lules controls com deplecionades d'histona dH1, sense diferències importants quan a la seva intensitat en funció de la condició. En relació amb aquesta observació, recentment s'ha descrit a *D. melanogaster* que l'expressió gènica pot ser activada mitjançant

la fosforilació de la serina 137 d'H2Av dels nucleosomes de les regions promotores dels gens dependents de PARP-1 [157, 159] (Fig. 64). A diferència de les situacions de dany al DNA, en que H2Av és fosforilada per ATM i/o ATR, en aquest cas sembla que JIL-1 és la responsable de fosforilar H2Av en aquesta situació [157]. Per tant, podria ser que l'enriquiment de  $\gamma$ H2Av que s'observa en algunes regions promotores tant en la situació control com en depleccionar la histona dH1 no fos un indicador de dany al DNA sinó d'activació de l'expressió gènica.

D'altra banda, donat que es tracta de gens que presenten un nivell de transcripció elevat tot i trobar-se en un context heterocromàtic (Figs. 42A i 43C), generalment associat a silenciament gènic, no es pot descartar que es tracti de locus altament sensibles on s'acumuli dany al DNA fàcilment.

Sigui com sigui, el fet que no s'observin diferències importants en la quantitat de  $\gamma$ H2Av acumulat en aquestes regions entre ambdues condicions implica que la depleció de la histona dH1 no afecta de forma important l'establiment de la marca en aquestes situacions.

## **E.2. La depleció de la histona dH1 provoca una acumulació d'R-loops a l'heterocromatina que són la causa del dany al DNA observat**

Pel que fa a l'origen del dany al DNA generat en depleccionar la histona dH1, una possibilitat inicial era que fos degut a problemes en la reparació del DNA en aquestes condicions. Aquesta situació, però, sembla poc probable donat que les cèl·lules depleccionades d'histona dH1 reparen el DNA trencat físicament mitjançant rajos X molt eficientment, fins i tot més que les cèl·lules control (Fig. 50). De fet, el pendent de la corba de desaparició dels nivells de  $\gamma$ H2Av al llarg del temps després de la irradiació és més gran en interferir l'expressió de la histona dH1, suggerint que el dany desapareix a una velocitat més elevada. D'acord amb això, a mamífers, ha estat descrit que el dany al DNA es senyalitza més potentment en condicions de depleció d'histona dH1 fent que les cèl·lules esdevinguin hiperressistents al dany [151]. Aquesta sobresenyalització podria estar relacionada amb el fet que les cèl·lules depleccionades d'histona dH1 reparen el dany al DNA més eficientment que les cèl·lules control donat que just després d'irradiar les cèl·lules per igual les cèl·lules interferides contra histona dH1 presenten uns nivells més elevats de  $\gamma$ H2Av (Fig. 50) tot i que a nivell físic el nombre de trencaments hauria de ser el mateix. Aquí caldria tenir en compte que les cèl·lules depleccionades d'histona dH1 també presenten un component endogen extra de  $\gamma$ H2Av fruit de la pròpia depleció. Tot i això, la quantitat de  $\gamma$ H2Av induït per la interferència d'histona dH1 és menor comparat amb el generat en irradiar les cèl·lules amb 10 Gy.

En relació amb això, una situació que també es podria plantejar és que la senyalització del dany estigui incrementada quan els nivells d'histona dH1 són baixos a *D. melanogaster* donat que les regions de DNA danyat són més fàcilment accessibles per a la maquinària de reparació. Malgrat això, l'evident increment de la quantitat de trencaments del DNA observat mitjançant la tècnica del *Comet Assay* (Fig. 40) descarta que l'increment es degui exclusivament a una potenciació de la senyalització.

Descartades les dues possibilitats anteriors com a causa de l'increment de  $\gamma$ H2Av, tot semblava apuntar cap a un increment en la inducció de dany al DNA en interferir l'expressió de la histona dH1. L'estrès replicatiu constitueix una font important de dany endogen al DNA a les cèl·lules. En aquest

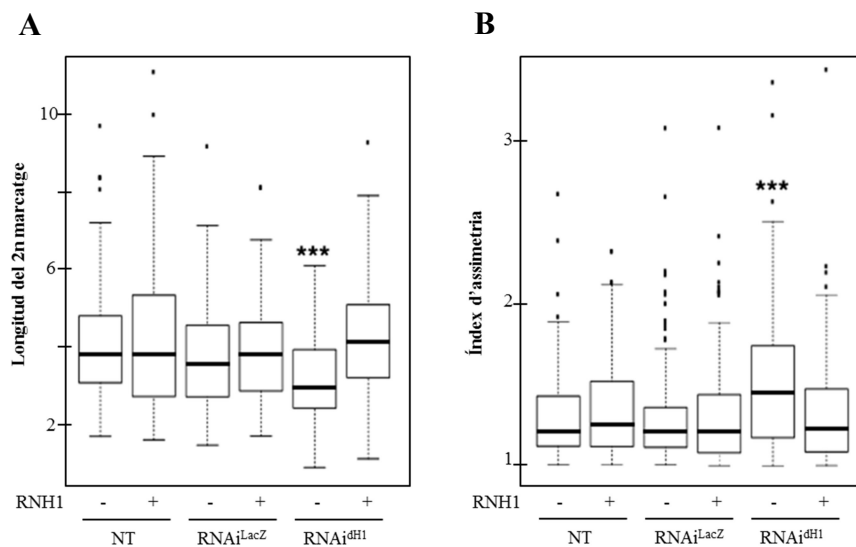
sentit, la inducció d'unes condicions cel·lulars d'estrès replicatiu en deplecionar la histona dH1 podria explicar l'increment de dany al DNA observat. L'estrès replicatiu pot ser causat per diversos factors [77]. Entre ells trobem l'activació inadequada dels orígens de replicació, obstacles per al progrés de la forqueta de replicació, unes condicions metabòliques inapropiades o la interferència entre els programes de transcripció i replicació. En relació amb això, s'ha descrit prèviament que la depleció d'histona dH1 a *D. melanogaster* provoca una derepressió de les seqüències heterocromàtiques [71, 74]. Així, s'ha observat que la interferència de la histona dH1 a cèl·lules SL2 també induïx l'expressió d'elements heterocromàtics. Per aquesta raó, era raonable pensar que en condicions de depleció de la histona dH1 podria existir una situació d'estrès replicatiu deguda a problemes entre les maquinàries de transcripció i replicació fruit de l'increment de l'expressió de les seqüències repetitives. En general, l'estrès replicatiu fruit de problemes entre ambdues maquinàries es relaciona amb la formació anòmala d'híbrids RNA:DNA que es generen durant la transcripció quan l'RNA roman anellat a la cadena de DNA motlle, deixant la cadena no motlle desaparellada. Aquestes estructures es coneixen amb el nom d'R-loops i constitueixen una font important d'inestabilitat genòmica [95, 160]. Tot i això, aquestes estructures també es generen de forma natural a les cèl·lules on actuen regulant l'expressió gènica d'alguns gens a través de diversos mecanismes. Perquè alguns R-loops són processats a trencaments de doble cadena del DNA mentre que altres són d'alguna manera protegits no està gaire clar. En qualsevol cas, està àmpliament descrit que aquelles alteracions que afecten el correcte funcionament del procés de transcripció provocant una acumulació anòmala d'aquestes estructures són una font de dany al DNA i inestabilitat genòmica [88, 89, 123]. Una situació similar sembla donar-se en interferir l'expressió de la histona dH1.

En deplecionar la proteïna, s'observa un increment en la reactivitat de l'anticòs S9.6, generat contra els híbrids RNA:DNA [137]. Ha estat descrit que aquest anticòs també pot reconèixer altres estructures d'àcids nucleics, tot i que amb una afinitat menor [146]. Per aquesta raó, l'assaig per determinar la presència d'R-loops sempre ha d'anar acompanyat d'un control que permeti confirmar l'especificitat de l'anticòs pels híbrids en cada experiment. Generalment, s'utilitza com a control la sobreexpressió d'RNasa H1. Aquesta ribonucleasa degrada la cadena d'RNA dels híbrids generats associats a la transcripció [152, 161]. Per aquesta raó, quan efectivament es tracta d'R-loops, s'observa una disminució significativa de la reactivitat de l'anticòs S9.6 en sobreexpressar aquest enzim. En relació amb això, el senyal de l'anticòs S9.6 observat en cèl·lules deplecionades d'histona dH1 disminueix significativament en transfectar les cèl·lules amb un plàsmid per sobreexpressar la RNasa H1 humana, confirmant que es tracta d'una acumulació d'R-loops.

L'estudi realitzat en cromosomes politènics ha permès observar que la depleció de la histona dH1 a l'organisme també provoca un increment del senyal de l'anticòs S9.6 a l'heterocromatina, concretament a la regió del cromocentre (Fig. 54). Aquesta reactivitat, igual com s'observa en cèl·lules, també és sensible a l'RNasa H1 humana. A més a més, la sobreexpressió d'aquest enzim permet un rescat parcial del fenotip conseqüència de la depleció d'histona dH1. La interferència de la histona dH1 a la regió del *pouch* del disc imaginal d'ala resulta en una ala molt atrofiada a conseqüència de la generació de dany al DNA i la posterior inducció de l'apoptosi [71]. La sobreexpressió de l'RNasa H1 humana en aquestes condicions d'interferència d'histona dH1 ajuda a eliminar la causa del dany al DNA, els R-loops. Això fa que l'ala es pugui desenvolupar, fins a cert punt, i dona lloc a una mida de l'ala notablement més

gran. Aquest rescat posa de manifest que els R-loops també estan al darrere del fenotip observat en condicions de depleció d'histona dH1 a la mosca.

Existeixen diverses hipòtesis sobre com aquestes estructures indueixen la generació de dany en forma de trencaments de doble cadena al DNA. D'una banda, s'ha descrit que aquestes estructures representen un obstacle molt important per a la progressió de la maquinària de replicació [129]. L'aturada de les forquetes de replicació s'ha associat amb la generació de trencaments de doble cadena del DNA a través de diversos mecanismes [80]. Per aquesta raó, és probable que l'acumulació dels R-loops observada interfereixi en la progressió de les forquetes de replicació i, en conseqüència, provoqui la generació de trencaments de doble cadena al DNA.



**Figura 65. La replicació del DNA de les cèl·lules interferides d'histona dH1 tendeix a estar alentida i a aturar-se [162].** Es mostra els resultats de l'anàlisi de fibres de DNA marcades amb un doble pols d'anàlegs de nucleòtids en forma de diagrama de caixes (n>100 per cada condició i tractament). A) Es mostra la longitud del segon marcatge per cada condició. B) Es mostra l'índex d'asimetria per cada condició com a indicador de la tendència a aturar-se que presenten les forquetes. S'indiquen els p-valors de totes les condicions respecte la condició no tractada (NT) quan no sobreexpressa RNasa H1 (-RNH1) (\*< 0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.005; test Willcoxon de dues cues).

Per determinar si els R-loops generats en deplecionar la histona dH1 impedeixen la progressió normal de les forquetes de replicació, s'han dut a terme al nostre laboratori experiments de marcatge de fibres de DNA amb un doble pols d'anàlegs de timina. Aquesta tècnica permet la detecció de problemes en la progressió normal de la replicació del DNA. Breument, per dur a terme aquest assaig, s'incuba les cèl·lules amb un anàleg de timina, generalment 5-iodo-2'-desoxiuridina (IdU), durant un temps concret, i passat aquest temps, es reemplaça el medi per un altre que conté un anàleg diferent, normalment 5-cloro-2'-desoxiuridina (CldU), o viceversa, i s'incuba les cèl·lules durant un nou període de temps específic. La detecció d'aquests anàlegs de timina mitjançant anticossos específics de cadascun d'ells permet obtenir fibres de DNA doblement marcades. Finalment s'analitza aquelles regions de les fibres en que es pot observar el doble marcatge de forma consecutiva, és a dir, un immediatament a continuació de l'altre. El doble marcatge permet estar segur que la incorporació del segon anàleg de la timina en aquesta regió de la fibra ha començat a temps 0 de la incubació. De no ser així, en aquelles regions de la fibra en que només

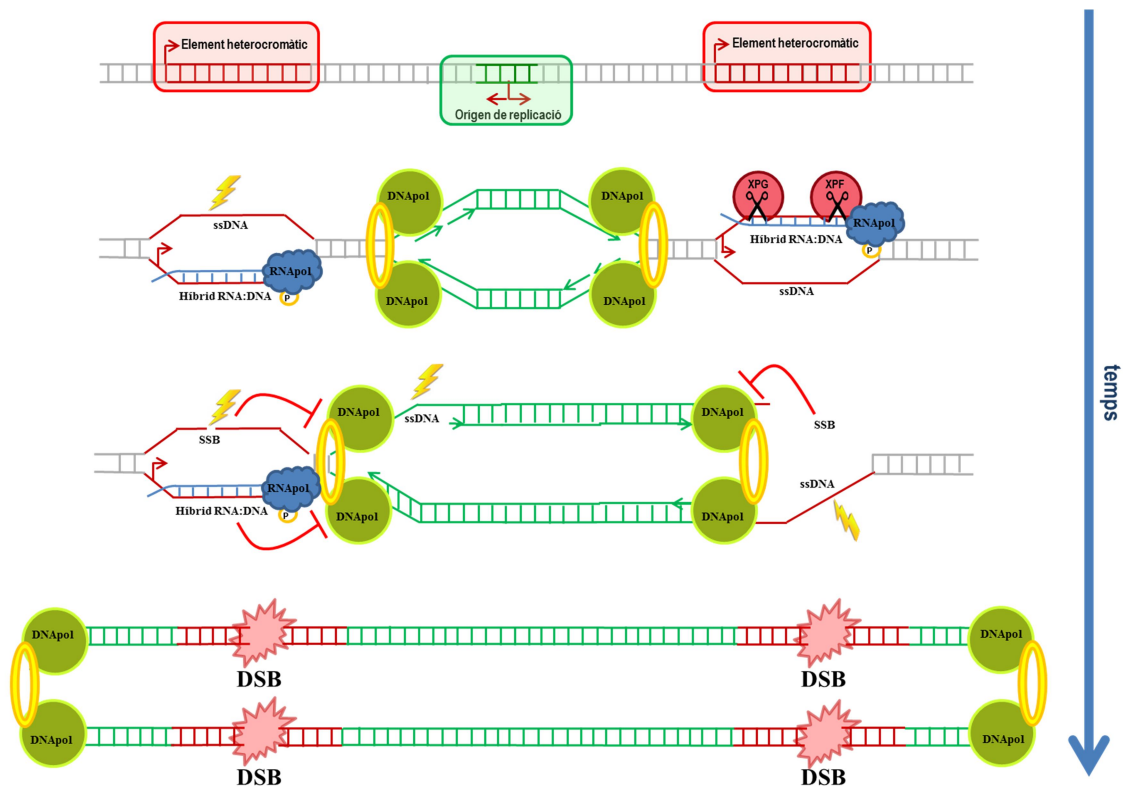
es detecta marcatge d'un anàleg, no es pot saber en quin punt temporal de la incubació ha començat la incorporació. Entre altres, aquesta metodologia permet determinar la velocitat de la replicació, la tendència a aturar-se o la quantitat d'òrigens de replicació actius. En els experiments realitzats al laboratori, duts a terme pel Dr. Jordi Bernués, s'ha utilitzat aquesta tècnica per detectar problemes en la progressió de la replicació del DNA en deplecionar la histona dH1 mitjançant l'anàlisi de la longitud del segon marcatge i l'índex d'asimetria, la relació entre la longitud de cadascun dels marcatges en regions que presenten doble marcatge consecutiu. El primer paràmetre permet estimar la velocitat de la replicació del DNA, mentre que el segon permet determinar la freqüència a aturar-se que presenten les forquetes de replicació. A la figura 65, es pot observar com les cèl·lules interferides d'histona dH1 presenten una longitud del segon marcatge clarament inferior a les condicions control (Fig. 65A), i un índex d'asimetria notablement superior en aquestes condicions (Fig. 65B). A més a més, en aquests experiments també s'ha pogut demostrar que els R-loops acumulats en deplecionar la proteïna són els responsables de les alteracions observades en la progressió de la replicació del DNA donat que aquestes desapareixen en transfectar les cèl·lules amb un plasmidi que permet la sobreexpressió de l'RNasa H1 humana (Fig. 65, mostres +RNH1).

D'altra banda, una altra possibilitat és que la font mutacional resideixi en la pròpia estructura de l'R-loop. En aquest sentit, existeixen diverses possibilitats al respecte. En primer lloc, s'ha descrit que la cadena de DNA no motlle que queda desaparellada és un element d'aquesta estructura particularment vulnerable degut a l'existència de nucleases específiques de DNA de cadena senzilla [108, 127]. Per exemple, ha estat descrit que en mutacions de membres del complex THO que donen lloc a la formació d'R-loops existeix una acumulació de mutacions induïdes per AID (*Activation-Induced Cytidine Deaminase*) a la cadena no motlle dels R-loops [127]. Aquest enzim provoca la conversió de residus de desoxicitosina a desoxiuracil específicament en el DNA de cadena senzilla [163]. Alhora, aquesta modificació fa el DNA susceptible a l'enzim de reparació per excisió de bases DNA glicosilasa [164]. Aquest últim elimina les bases d'uracil del DNA creant llocs abàsics i, per tant, generant una lesió al DNA que pot acabar donant lloc a trencaments de doble cadena en arribar-hi la forqueta de replicació.

A banda d'això, s'ha especulat amb dues possibilitats més respecte la generació de trencaments de doble cadena al DNA a causa dels R-loops. En ambdós casos, el processament dels R-loops sembla jugar-hi un paper important. Per començar, s'ha observat que els R-loops poden ser processats activament a trencaments de doble cadena mitjançant XPF i XPG, dues endonucleases implicades en la reparació per excisió de nucleòtid (NER) [117]. L'eliminació de l'híbrid RNA:DNA tallant en ambdós extrems del DNA de l'híbrid mitjançant aquestes nucleases generaria un buit de cadena senzilla de DNA que donaria lloc a un trencament de doble cadena, ja sigui mitjançant l'acció de nucleases sobre la cadena senzilla de DNA o en arribar-hi la forqueta de replicació. En segon lloc, també s'han descrit estudis *in vitro* en que s'ha observat que R-loops sintètics poden ser tallats en ambdues cadenes de DNA mitjançant XPG i XPF purificades [128]. Per tant, podria ser que l'acció d'aquests enzims donés lloc directament a trencaments de doble cadena del DNA. Aquesta possibilitat no implicaria necessàriament la participació de la forqueta de replicació per a la formació del trencament de doble cadena. Aquesta última opció no semblaria ser la principal font de trencaments de doble cadena en deplecionar la histona dH1 donat que a G1 ja es pot observar un increment significatiu de la quantitat d'R-loops sense que aquesta resulti en un increment

important de  $\gamma$ H2Av. El principal increment de  $\gamma$ H2Av apareix a fase S, suggerint que la replicació del DNA és necessària per a la generació dels trencaments. Si bé és cert que també existeix un petit increment de  $\gamma$ H2Av a G1, aquesta pujada és molt menor comparada amb l'increment que s'observa a fase S. En la mateixa línia, també s'ha observat que l'increment en número de *foci* de  $\gamma$ H2Av per cèl·lula induït per la depleció de la histona dH1 es dona preferentment en regions positives per EdU. Per tot això, sembla que la replicació del DNA és necessària per a que els R-loops donin lloc a l'increment de  $\gamma$ H2Av observat en deplecionar la histona dH1.

Tot això suggereix que els R-loops generats en condicions de depleció d'histona dH1 provoquen problemes durant la replicació del DNA que acaben resultant en trencaments de doble cadena (Fig. 66).



**Figura 66. Model de la generació de dany al DNA en condicions de depleció d'histona dH1.** En deplecionar la histona dH1, els elements heterocromàtics estan sobreexpressats i es generen R-loops a l'heterocromatina. Aquests R-loops poden ser processats mitjançant la maquinària del sistema de reparació per excisió de bases lligat a transcripció (TC-NER) deixant un forat de DNA de cadena senzilla (SSB) que dona lloc a un trencament de doble cadena (DSB) en quan la forqueta de replicació troba aquest forat (a la imatge, forqueta avançant cap a la dreta). Alternativament, la persistència d'aquestes estructures pot tenir dos efectes més. D'una banda, la cadena de DNA desaparellada pot ser diana d'enzims com la Desaminasa de Citidina Activada per Inducció (AID) i acabar donant lloc a un forat en la cadena de DNA. De nou, en aquest cas, es generaria un trencament de doble cadena en arribar la forqueta de replicació. D'altra banda, els R-loops persistents en el DNA també poden obstaculitzar l'avanç de les forquetes provocant la seva aturada prolongada i fent que finalment col·lapsin. En aquest sentit, els forats de cadena senzilla probablement també provoquen l'aturada i posterior col·lapse de la forqueta. Quan una forqueta col·lapsa, també es poden generar trencaments de doble cadena.

Probablement, l'increment d'R-loops observat en aquestes condicions saturi la capacitat de reparació i/o protecció d'aquestes estructures per part de la cèl·lula provocant que, en tenir lloc la replicació del DNA, les forquetes de replicació es trobin amb forats de cadena senzilla fruit de l'eliminació de l'híbrid RNA:DNA per part de la maquinària cel·lular de reparació [108] o l'acció de nucleases sobre la cadena de DNA desplaçada [127] i R-loops intactes que no han pogut ser processats. Probablement, en ambdós casos la forqueta quedi aturada donat que representen un bloqueig per a la seva



progressió. En el cas dels R-loops que no han pogut ser processats, el bloqueig provocaria l'aturada de les forquetes fent-les altament vulnerables [80, 95]. En l'altre cas, a més a més del risc que comporta el propi forat de cadena senzilla al DNA, el bloqueig de la progressió de la forqueta de replicació incrementaria encara més el risc de generar-se dany al DNA. A més a més, és probable que la situació sigui encara més complexa donat que no és gens descartable que tot això vagi acompanyat de l'activació d'orígens dorments addicionals [77] i fins i tot que els propis R-loops iniciïn la replicació pel seu compte [165] contribuint d'aquesta manera a incrementar la situació d'estrès replicatiu que pateix la cèl·lula.

La hipòtesi que els R-loops bloquegin l'avanç de la forqueta de replicació implica la presència dels R-loops a fase S també. Malgrat això, cal recordar que l'increment del senyal de l'anticòs S9.6 que s'observa tant a fase S com a G2 no desapareix en presència d'RNasa H1 humana. Per aquesta raó, no es disposa d'una evidència directa de la presència dels R-loops a fase S. Cal recordar que l'anticòs S9.6 ha estat generat contra híbrids d'RNA:DNA petits [137] i que també presenta una certa afinitat per certes estructures d'RNA [146], per la qual cosa existeix la possibilitat que a fase S estigui reconeixent els híbrids d'RNA:DNA que formen els primers d'RNA dels fragments d'Okazaki en unir-se al DNA. De fet, a mamífers existeixen dos tipus de ribonucleases que poden degradar les cadenes d'RNA dels híbrids RNA:DNA, la RNasa H1 i la RNasa H2 [166]. Mentre que l'RNasa H1 generalment s'associa amb la degradació de les cadenes d'RNA dels híbrids d'RNA:DNA resultat del procés de la transcripció [153], l'RNasaH2 tendeix a relacionar-se amb l'eliminació de l'RNA dels híbrids resultat de la unió dels primers d'RNA dels fragments d'Okazaki al DNA [161]. Donat que sembla que l'RNasa H1 actua principalment sobre els híbrids d'RNA:DNA associats a la transcripció i que el tractament de les cèl·lules per comprovar que es tracta d'R-loops es duu a terme amb l'RNasa H1 humana, podria ser que el senyal de l'anticòs no desaparegués en transfectar les cèl·lules amb l'RNasa H1 humana perquè l'anticòs està reconeixent principalment híbrids RNA:DNA associats a replicació, altament abundants a fase S, que no són degradats per aquest enzim. En canvi, a fase G1, només es donarien principalment els R-loops associats al procés de transcripció que si que podrien ser degradats per l'enzim. Aquest raonament, però, seria difícilment aplicable al senyal de l'anticòs insensible a l'RNasa H1 humana observat a fase G2, donat que la replicació del DNA té lloc principalment a fase S i no hauria d'haver-hi un alt contingut en fragments d'Okazaki en aquesta fase. Una altra possibilitat seria que simplement els híbrids no fossin accessibles a l'RNasa H1 humana a fase S i G2 per alguna altra raó o que l'anticòs estigués reconeixent alguna altra estructura que no és diana de l'RNasa H1 en aquestes fases donada la seva lleugera inespecificitat [146]. Aquesta segona possibilitat sembla més probable donat que, en cas d'estar reconeixent híbrids associats a la replicació del DNA, esperaríem que almenys una part del senyal de l'anticòs S9.6, el corresponent a híbrids associats a la transcripció de les seqüències repetitives, desaparegués i això resultés en una disminució parcial del senyal total de l'anticòs a fase S i G2 en sobreexpressar l'RNasa H1 humana. En qualsevol cas, el tractament de les cèl·lules amb RNasa H1 provoca una disminució clara del  $\gamma$ H2Av observat a fase S. Això suggereix que els R-loops són els responsables del dany al DNA generat a fase S en aquestes condicions, malgrat no poder-se confirmar la presència de les estructures en aquesta fase.

A conseqüència del dany al DNA generat en condicions d'estrès replicatiu, sovint es pot observar inestabilitat genòmica en aquestes condicions. Normalment, quan això passa es poden observar

una major freqüència d'intercanvis entre cromàtides germanes i problemes en la segregació dels cromosomes a mitosi [77]. En aquest sentit, donat que la depleció de la histona dH1 dona lloc a una situació d'estrès replicatiu fruit de l'increment d'R-loops, caldria esperar un augment d'ambdues situacions. En efecte, s'ha observat que la interferència de la histona dH1 dona lloc a un augment del nombre d'intercanvis de DNA entre cromàtides germanes (Fig. 41). A més a més, en deplecionar la histona dH1 també existeix un increment en la tendència a que hi hagi problemes en la segregació cromosòmica a mitosi. En aquest sentit, s'ha pogut constatar que vora el ~45% de les mitosis presenten problemes de segregació en aquestes condicions (Fig. 49B). En relació amb això, també s'ha observat que els cromosomes mitòtics tendeixen a presentar un major senyal de  $\gamma$ H2Av en deplecionar la histona dH1 suggerint la presència de dany al DNA als cromosomes metafàsics (Fig. 48B). Això és congruent amb el fet que s'observin problemes en la segregació donat que encara es pot detectar dany al DNA quan la cèl·lula entra a mitosi. Probablement, la cèl·lula arriba a G2/M arrossegant encara problemes associats a la replicació del DNA a causa dels R-loops. De ser així, sembla sorprenent que la cèl·lula no aturi el cicle cel·lular i continuï endavant entrant finalment a mitosi malgrat existir encara dany al DNA. Tot i així, existeixen diverses evidències, des de llevat fins a humans, que les cèl·lules en cultiu són capaces d'adaptar-se i saltar-se els punts de control i entrar a mitosi inclús en presència de dany irreparable al DNA [167]. Sembla que les cèl·lules en cultiu poden aturar el cicle cel·lular en presència de dany al DNA per donar temps per reparar el dany, però si un cop passat un temps prudencial el dany persisteix, la cèl·lula es capaç de saltar-se el punt de control i continuar el cicle cel·lular. Aquest procés es coneix amb el nom d'adaptació del punt de control i es creu que representa la via més efectiva de mort cel·lular en cèl·lules que no són propenses a entrar en apoptosi. No està clar, però, fins a quin punt les condicions de cultiu *in vitro* influeixen en aquesta adaptació ni si aquestes situacions es donen realment *in vivo*. En aquest sentit, podria ser que les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 s'adaptin i acabin entrant a mitosi malgrat presentar dany al DNA de forma similar al que ha estat descrit en altres organismes. Això explicaria perquè s'observa dany en cromosomes metafàsics i problemes en la segregació dels cromosomes en condicions de depleció d'histona dH1 (Fig. 48A i 49A). De la mateixa manera, aquest raonament també seria aplicable a les cèl·lules no tractades i incubades amb un dsRNA contra LacZ i explicaria perquè es poden detectar, tot i que significativament en molt menor mesura, dany en cromosomes mitòtics i problemes de segregació cromosòmica fins i tot en aquestes condicions (Figs. 48A i 49A).

En condicions normals, es poden detectar R-loops a les regions promotores d'alguns gens on actuen regulant l'expressió gènica [108]. En aquests casos, sembla que els R-loops no provoquen la generació de dany al DNA. Perquè uns R-loops indueixen la formació de dany al DNA i altres no es desconeix. En qualsevol cas, el que sí està clar és que les alteracions que afecten el correcte processament dels transcrits poden donar lloc a una acumulació d'R-loops que acaben provocant l'aparició de dany al DNA. En aquest sentit, podria ser que el senyal de  $\gamma$ H2Av que presenten al promotor alguns gens senyalitzi la presència de dany fruit d'una acumulació local anòmala d'aquestes estructures en aquestes regions. D'una banda, una possibilitat seria que aquests gens presentin R-loops al promotor de forma natural, com ha estat descrit en altres casos [109], i que fruit d'aquesta presència es generi dany al DNA en aquestes zones de forma recurrent sense que aquest arribi a representar una amenaça per a l'estabilitat

del genoma. Tot i així, sembla difícil d'imaginar que s'acumuli dany a les regions promotores de tants gens sense que això repercuteixi en la viabilitat cel·lular.

Presentin o no R-loops de forma habitual, alternativament, també podria ser que aquestes regions fossin particularment sensibles a l'acumulació d'R-loops degut a les característiques particulars que presenten els gens en que s'ha detectat  $\gamma$ H2Av a la seva regió promotora. D'acord amb els resultats obtinguts, aquests gens es troben en regions heterocromàtiques, generalment associades a silenciament gènic, però presenten una elevada expressió gènica (Fig. 43B i C). Aquestes propietats podrien fer que aquests gens presentessin una certa tendència a acumular R-loops a la seva regió promotora que seria suficient per provocar dany al DNA induït per una acumulació anòmala d'R-loops en aquestes regions.

En qualsevol cas, la histona dH1 no estaria implicada en aquest procés donat que el senyal de  $\gamma$ H2Av està present en aquestes zones independentment de si s'està interferint l'expressió de la histona dH1 o no. Això no és d'estranyar donat que es tracta de gens que presenten una expressió per sobre la mitjana d'expressió de cèl·lules SL2 (Fig. 43C) i s'ha descrit, tant a *Drosophila* com a humans, que el contingut d'histona H1 és baix en regions promotores de gens que presenten una elevada expressió [168, 169]. Per tant, probablement aquestes zones ja tendeixin a presentar un contingut baix d'histona dH1 de per si i, per aquesta raó, no resulten pràcticament afectades en interferir l'expressió de la proteïna.

### **E.3. El patró temporal de replicació del DNA està alterat en deplecionar la histona dH1**

D'acord amb els resultats obtinguts, el perfil del cicle cel·lular no resulta pràcticament alterat en condicions de depleció de la histona dH1. Com es pot apreciar a la figura 61, en deplecionar la histona dH1 només s'observa una lleugera acumulació de cèl·lules a G1 i una disminució a fase S. En ambdós casos les diferències són estadísticament significatives però realment molt petites. Sorprenentment, però, en interferir l'expressió de la histona dH1 sí que s'observa un increment clar i important del nombre de cèl·lules que estan replicant el DNA, identificades mitjançant la detecció de la incorporació al DNA de l'anàleg de la timina 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) (Fig. 62). Indirectament, donat que no hi ha diferències gaire importants en el contingut de cèl·lules a fase S i en qualsevol cas les petites diferències que es poden observar suggereixen una disminució del contingut de cèl·lules a fase S en deplecionar la histona dH1, això implica que l'increment en cèl·lules EdU positives ha de ser degut a cèl·lules que són positives per EdU però no es troben a fase S. En aquest sentit, també s'ha observat un increment important de cèl·lules EdU positives en condicions de depleció en cèl·lules que es troben a fase G1 (Fig. 62C). Concretament, s'ha vist que les cèl·lules en que s'ha interferit l'expressió de la histona dH1 presenten entorn un ~25% de cèl·lules que són positives per EdU a fase G1, mentre que en les condicions control aquests percentatges es troben al voltant del ~3%. Una possible explicació a aquest fenomen podria ser que les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 són capaces d'iniciar la replicació del DNA però, degut als problemes en la progressió de les forquetes de replicació que presenten aquestes cèl·lules descrits a la figura 66, els costa progressar. Aquests problemes farien que les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 que acaben d'iniciar la replicació del DNA no puguin progressar eficientment donant lloc a una acumulació de cèl·lules a fase G1 que no són capaces de sintetitzar prou eficientment suficient DNA

com per detectar-les com a cèl·lules de fase S en analitzar el contingut de DNA mitjançant citometria de flux, però sí siguin capaces d'incorporar EdU donat que hi ha un mínim de replicació efectiva. Això podria explicar perquè hi ha un increment de cèl·lules EdU positives a fase G1 i l'efecte observat sobre el contingut de cèl·lules a fase G1 i S. Tot i així, es fa difícil d'imaginar que un increment en el contingut de cèl·lules a fase G1 d'un ~3% (Fig. 61) pugui explicar un augment tan gran del número de cèl·lules positives per EdU en aquesta fase. Això fa pensar que probablement, a més d'aquests problemes evidents en la progressió de la replicació que podrien explicar l'efecte sobre el cicle cel·lular i part de l'augment de cèl·lules positives per EdU observat a G1 en interferir la histona dH1, la depleció de la histona dH1 podria tenir algun altre efecte sobre la replicació del DNA que provoqui un increment global de la quantitat de cèl·lules que estan replicant el DNA a G1. En aquest sentit, podria ser que la depleció provoqués un inici prematur de la replicació del DNA a més dels problemes en la progressió responsables de l'acumulació de cèl·lules a G1. Això explicaria perquè s'observa un increment tan gran de cèl·lules EdU positives a G1 i justificaria l'increment general observat en quantificar el percentatge total de cèl·lules positives per EdU en interferir l'expressió de la histona dH1 (Fig. 62).

D'altra banda, en aquest treball també s'ha determinat que la depleció de la histona dH1 provoca una replicació prematura de l'heterocromatina (Fig. 63). Als organismes eucariotes, la replicació del DNA s'inicia en uns orígens de replicació concrets distribuïts al llarg dels cromosomes, assegurant la duplicació completa del genoma en una única fase S [170, 171] en la qual l'heterocromatina es caracteritza per replicar-se tard [172]. Recentment, però, s'ha descrit un nou procés de replicació independent dels orígens iniciat per la transcripció a llevat [165]. En aquest organisme, s'ha demostrat que l'alteració de la transcripció dependent de l'RNA polimerasa I eliminant les activitats RNasa H i Top1 dona lloc a una acumulació d'R-loops al locus del DNA ribosòmic que poden actuar com a encebadors de la replicació al locus del DNA ribosòmic [165]. D'acord amb aquestes observacions recents, podria ser que l'acumulació dels R-loops a l'heterocromatina observada en deplecionar la histona dH1 sigui la responsable de la replicació prematura de la heterocromatina. Donat que els R-loops ja estan presents a G1, podria ser que la seva presència a l'inici de fase S iniciés prematurament la replicació dels elements heterocromàtics independentment dels orígens de replicació. Això explicaria perquè s'observa un increment significatiu de la colocalització entre HP1a i EdU d'hora a fase S en deplecionar la histona dH1 (Fig. 63B). De la mateixa manera, els R-loops podrien estar també al darrere de la replicació prematura de l'heterocromatina observada en deplecionar la histona H1 a *Physarum* [173].

Aquesta replicació induïda pels R-loops també podria ser la responsable de l'increment de la quantitat total de cèl·lules positives per EdU observat en condicions de depleció de la histona dH1 (Fig. 62B). En aquest sentit, podria ser que l'acumulació d'R-loops observada a G1 en interferir l'expressió de la proteïna (Fig. 60B, gràfic esquerre) induís una replicació prematura del DNA. Això explicaria perquè s'observa un increment clar i significatiu de cèl·lules que són positives per EdU en deplecionar la histona dH1 en aquesta fase del cicle cel·lular i a nivell general. Aquest augment dels esdeveniments d'inici de la replicació, però, no aniria acompanyat d'un augment en la quantitat de cèl·lules a fase S (Fig. 61) ja sigui perquè la replicació iniciada mitjançant aquest sistema és poc eficient, pels problemes que presenten les cèl·lules deplecionades d'histona dH1 en la progressió de la replicació o ambdues coses.

Una altra possibilitat podria ser que l'increment en el contingut de cèl·lules EdU positives fos degut a esdeveniments de reparació del DNA que impliquen una certa incorporació de nucleòtids. Aquesta hipòtesi, però, sembla poc probable donat que el dany al DNA es genera principalment durant fase S (Figs. 47B i 60B, gràfic dret). Indirectament, això també descarta que aquests esdeveniments d'iniciació de la replicació del DNA independent d'origens observats a G1 siguin fruit d'invasions de regions homòlogues per reparar trencaments de doble cadena del DNA mitjançant recombinació homòloga. A més a més, també cal tenir en compte que a G1 encara no hi ha una cromàtide germana amb la que poder dur a terme la recombinació homòloga, per la qual cosa aquests esdeveniments haurien de donar-se entre regions homòlogues dins la mateixa cromàtide o en altres cromosomes. Tot això fa que aquesta possibilitat sigui molt remota.

### E.4. La histona dH1 prevé l'acumulació d'R-loops de forma específica

Els resultats obtinguts en deplecionar HP1a (Figs. 58 i 59) també suggereixen que aquesta prevenció de l'acumulació d'R-loops a l'heterocromatina per a la que s'ha observat que és necessària la presència de la histona dH1 podria ser una funció específica de la histona dH1. Recentment, s'ha descrit a *D. melanogaster* que la histona dH1 és necessària per a la formació de l'heterocromatina [70, 74, 75]. En aquest sentit, s'ha suggerit que la histona dH1 pot induir la formació de l'heterocromatina mitjançant el reclutament de Su(var)3-9 o STAT29E. En la seva absència, l'heterocromatina perd la seva estructura compacta característica. En base a això, es podria pensar que l'efecte observat en deplecionar-la sigui degut a un efecte indirecte fruit de la descompactació de l'heterocromatina. De ser així, caldria esperar que la depleció d'altres factors necessaris per a la formació de l'heterocromatina provoqués el mateix fenotip. La depleció d'una proteïna estructural de l'heterocromatina com HP1a [150, 156], però, no resulta en el mateix fenotip. En primer lloc, la mida de l'ala només està lleugerament afectada en aquestes condicions encara que la depleció d'HP1a és molt important (Fig. 59A i B). A més a més, tampoc es detecta un increment notable de  $\gamma$ H2Av a la regió del *pouch* del disc imaginal d'ala com en deplecionar la histona dH1. Finalment, també es pot apreciar que la depleció d'HP1a no provoca un augment important de la reactivitat de l'anticòs S9.6 al cromocentre dels cromosomes politènics (Fig. 58). Tenint en compte que HP1a promou el silenciament gènic associat a la formació d'heterocromatina [174], en la seva absència caldria esperar una sobreexpressió de l'heterocromatina, igual com passa amb la depleció de la histona dH1. Certament, per exemple, ha estat descrit que la depleció de la proteïna HP1a a ovaris provoca una sobreexpressió dels transposons [175]. A més a més, en altres experiments duts a terme al laboratori s'ha observat que això també és així en interferir l'expressió de la proteïna a cèl·lules SL2 [162]. Tot això suggereix que també existiria una sobreexpressió d'aquestes seqüències en deplecionar HP1a a l'organisme. Per tant, semblaria que malgrat existir una sobreexpressió de l'heterocromatina no s'observa un increment en la detecció d'R-loops en aquestes condicions. Tot això fa pensar que probablement es tracti d'una funció específica de la histona dH1 més que no pas un efecte indirecte resultat de la sobreexpressió de les seqüències repetitives fruit de la descompactació de l'heterocromatina.

En suport d'aquesta hipòtesi, cal destacar que la histona dH1 continua present als cromosomes politènics en que s'ha deplecionat HP1a (Fig. 58). De no ser així, es podria considerar la possibilitat que els R-loops no s'acumulessin a l'heterocromatina en provocar una sobreexpressió de les seqüències repetitives degut a algun altre factor. Donat que la histona dH1, però, continua present en interferir l'expressió d'HP1a, no hi hauria una acumulació d'R-loops malgrat existir una sobreexpressió de l'heterocromatina. Aquests resultats donen encara més força a la possibilitat que es tracti d'una funció específica de la histona dH1. Caldrien més experiments, però, per determinar fins a quin punt la contribució de la histona dH1 a evitar l'acumulació dels R-loops a l'heterocromatina és específica.

Una possibilitat podria ser que la histona dH1 fos necessària per al reclutament de factors que impedeixin l'acumulació d'aquestes estructures, ja sigui evitant-ne la formació o promovent-ne l'eliminació quan es formen (Fig. 67). En aquest aspecte, caldria dur a terme una anàlisi de la contribució de les proteïnes que poden interaccionar amb la histona dH1 al processament dels R-loops.

En aquest sentit, s'han identificat diverses proteïnes que interaccionen amb la histona dH1 a *D. melanogaster*. D'una banda, s'ha descrit que la histona dH1 interacciona amb algunes proteïnes ribosomals i hnRNPs [141]. De l'altra, també es pot aconseguir alguna informació del *Drosophila Protein Interaction Map (DPiM)*, un projecte que pretén establir un mapa complet d'interaccions entre proteïnes basat en l'aïllament i anàlisi mitjançant espectrometria de masses dels complexos proteics obtinguts per co-immunoprecipitació (CoIP) associats a proteïnes marcades amb epítops de forma individual [176]. Aquesta base de dades permet consultar quines proteïnes s'ha observat que interaccionen amb una proteïna concreta de *D. melanogaster* mitjançant la metodologia explicada. Malgrat no haver-se realitzat aquest assaig amb el marcatge de la histona dH1, la base de dades permet identificar amb quines de les proteïnes analitzades fins al moment s'hi ha detectat associada la histona dH1 en les CoIPs. En realitzar aquesta cerca, s'obté una llarga llista de proteïnes amb les quals ha coimmunoprecipitat la histona dH1, algunes de les quals presenten o estan relacionades amb proteïnes que presenten activitats enzimàtiques que podrien participar en una hipotètica prevenció de l'acumulació d'R-loops dependent d'histona dH1 (Taula 7).

L'acumulació anòmala d'R-loops sovint és el resultat d'alteracions en factors implicats en el procés de transcripció [88, 89, 123]. En aquest sentit, es sap que mutacions en diverses proteïnes d'unió a l'mRNA implicades en la biogènesi de les complexos ribonucleoproteics formats per l'mRNA i proteïnes d'unió a l'mRNA donen lloc a una acumulació d'R-loops. D'altra banda, alteracions en proteïnes amb activitat helicasa d'RNA:DNA, ribonucleasa d'RNA:DNA o topoisomerasa també poden tenir el mateix efecte. Per exemple, en cèl·lules humanes s'ha descrit que alteracions en les proteïnes ASF, AQR, SETX, BRCA1, BRCA2 o la topoisomerasa I provoquen una acumulació d'aquestes estructures [87, 118, 121, 124, 125]. Totes aquestes alteracions provoquen una retenció anòmala de la cadena d'RNA sobre el DNA donant lloc a la formació d'R-loops. En relació amb això, existeixen diverses proteïnes que interaccionen amb la histona dH1 que presenten alguna d'aquestes activitats. Totes aquestes proteïnes són possibles candidats a prevenir una acumulació anòmala d'R-loops de forma dependent d'histona dH1. Tot i així, donat que el dany induït per l'acumulació d'R-loops observat en deplecionar la histona dH1 es concentra a l'heterocromatina, hi ha algunes proteïnes que presenten una activitat important a l'heterocromatina i són per tant els candidats més directes a poder exercir aquesta hipotètica funció de prevenció de

l'acumulació d'R-loops a l'heterocromatina dependent d'histona dH1. Entre elles, trobem les proteïnes hnRNP36 (Hrb87F), hnRNP48 (Hrb27C) i Su(var)2-10 (Fig. 67).

Proteïnes que interaccionen amb la histona dH1 segons el <i>DPiM</i> relacionades amb activitats enzimàtiques que podrien estar implicades en la prevenció de l'acumulació d'R-loops		
Símbol	Nom	Activitats enzimàtiques pròpies o relacionades
Upfl	<i>up-frameshift suppressor 1</i>	Helicasa d'RNA
Su(var)2-10	<i>Suppressor of Variegation 2-10</i>	Helicasa d'RNA
l(2)35Df	<i>Lethal (2) 35 Df</i>	Helicasa d'RNA
Dbp21E2	<i>DEAD box protein 21E2</i>	Helicasa d'RNA
Hel25E	<i>Helicase at 25E</i>	Helicasa d'RNA
Dbp73D	<i>Dead box protein 73D</i>	Helicasa d'RNA
CG9630	-	Helicasa d'RNA
CG7878	-	Helicasa d'RNA
CG6227	-	Helicasa d'RNA
CG4901	-	Helicasa d'RNA
CG3561	-	Helicasa d'RNA
rept	<i>Reptin</i>	Helicasa de DNA
Psf3	<i>polypyrimidine tract-binding protein (PTB)-associated splicing factor 3</i>	Helicasa de DNA
pont	<i>pontin</i>	Helicasa de DNA
Mcm5	<i>Minichromosome maintenance 5</i>	Helicasa de DNA
Mcm7	<i>Minichromosome maintenance 7</i>	Helicasa de DNA
scf	<i>supercoiling factor</i>	DNA topoisomerasa
pho	<i>pleiohomeotic</i>	DNA topoisomerasa
thoc5	<i>THO complex subunit 5</i>	Transport de l'RNA
CG5857	<i>Nucleoporin Ndc1 Ortholog (S. cerevisiae)</i>	Transport de l'RNA
PCID2	<i>PCI domain-containing protein 2 homolog</i>	Transport de l'RNA
CG5382	<i>Zinc finger protein-like 1 homolog</i>	Transport de l'RNA
CG4572	-	Transport de l'RNA
CG5053	-	Transport de l'RNA
CG8671	-	Transport de l'RNA
CG11266	-	Processament de l'mRNA
CG16941	-	Processament de l'mRNA
CG17540	-	Processament de l'mRNA
CG5454	-	Processament de l'mRNA
CG6227	-	Processament de l'mRNA
CG6995	-	Processament de l'mRNA
U2af50	<i>U2 small nuclear riboprotein auxiliary factor 50</i>	Processament de l'mRNA
asf1	<i>anti-silencing factor 1</i>	Processament de l'mRNA
CG10909	-	Processament de l'rRNA
CG12301	-	Processament de l'rRNA
NHP2	<i>H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2-like protein</i>	Processament de l'rRNA
CG1542	-	Processament de l'rRNA
CG6712	-	Processament de l'rRNA
dbe	<i>Dribble</i>	Processament de l'rRNA

Taula 7. Llista de proteïnes en que s'hi ha detectat associada la histona H1 segons la base de dades del projecte *DPiM* que presenten o poden interaccionar amb altres proteïnes que presenten activitats enzimàtiques que podrien estar implicades en la prevenció de l'acumulació d'R-loops. Es mostra el símbol del gen, el nom del gen i els processos amb que han estat relacionades cadascuna d'aquestes proteïnes.

A les cèl·lules eucariotes, els transcrits naixents que són produïts per l'RNA polimerasa II són sotmesos a un processament extens abans no es produeix un mRNA funcional. Aquests precursors d'mRNA es coneixen com a àcids ribonucleics nuclears heterogenis (hnRNAs), un terme que sovint és sinònim de pre-mRNA [177]. Cal afegir, però, que només un grup d'aquests hnRNAs serveixen com a precursors de l'mRNA. Des del moment en que els hnRNAs són produïts per l'RNA polimerasa II i fins a la seva maduració a mRNAs, els hnRNAs estan associats a grans complexos proteics. Col·lectivament,

aquestes proteïnes d'unió a hnRNAs s'anomenen hnRNPs [177]. Aquestes proteïnes són multifuncionals. Participen en processos com l'splicing, i són essencials per a una correcta exportació, localització, traducció i estabilitat de l'mRNA. En la mateixa línia, la proteïna Su(var)2-10 també podria estar implicada en el processament del pre-mRNA. Bioinformàticament s'ha predit que es podria unir a helicases d'RNA del tipus DEAD/H-box (FlyBase, 1992), per la qual cosa és possible que es tracti d'una proteïna important alhora de reclutar helicases d'aquest tipus que evitin una retenció anòmala de la cadena d'RNA naixent sobre la cadena de DNA motlle. Tan en un en el cas de la proteïna Su(var)2-10 com en el de les proteïnes hnRNPs, la seva inacció podria provocar una acumulació d'R-loops, igual com s'ha vist per multitud de factors implicats en el processament del pre-mRNA [108].

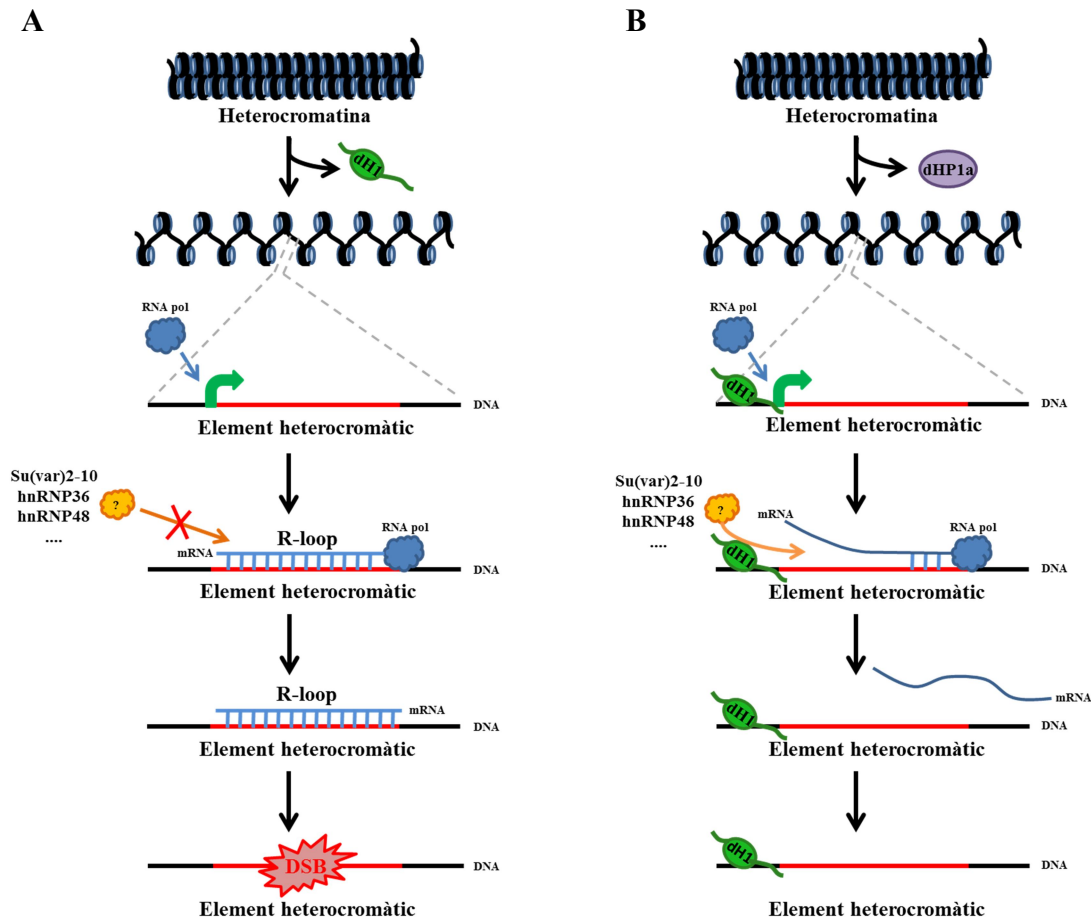
A més a més, també existeixen diverses evidències que suggereixen que aquestes proteïnes exerceixen la seva funció, o part d'ella, a l'heterocromatina. En primer lloc, s'ha descrit que totes tres proteïnes estan presents a l'heterocromatina. En preparacions de cromosomes politènics s'ha observat un clar senyal de totes tres proteïnes a la regió del cromocentre, suggerint la seva presència a l'heterocromatina [178-180]. En segon lloc, també ha estat demostrat que almenys dues d'elles, Su(var)2-10 i hnRNP36, actuen com a supressors de la variegació [178, 179]. En el cas de l'hnRNP48, no s'ha estudiat si podria actuar en aquest sentit, però tenint en compte que existeix una acumulació important de la proteïna al cromocentre en cromosomes politènics és molt probable que així sigui també. Per tant, sembla que es tracta de proteïnes que presenten una part important de la seva activitat a l'heterocromatina.

En resum, hnRNP36 (Hrb87F), hnRNP48 (Hrb27C) i Su(var)2-10 són clars candidats a exercir aquesta funció de prevenció de l'acumulació d'R-loops dependent d'histona dH1 ja que a més d'interaccionar amb la histona dH1 i presentar unes activitats enzimàtiques importants de cara a evitar l'acumulació d'R-loops també es tracta de proteïnes que concentren part de la seva activitat a l'heterocromatina.

Malgrat trobar-se distribuïda per tot el genoma, els resultats obtinguts en aquest treball posen de manifest que la histona dH1 és necessària per a evitar l'acumulació dels R-loops principalment a l'heterocromatina. En aquest sentit, els experiments d'immunolocalització duts a terme en cèl·lules SL2 i en cromosomes politènics posen de manifest que en deplecionar la histona dH1 hi ha una acumulació d'aquestes estructures preferentment a l'heterocromatina, tot i tractar-se de tècniques amb un poder de resolució a nivell genòmic limitat. En ambdós casos, però, no s'observa un augment important del senyal de l'anticòs S9.6 fora de l'heterocromatina en deplecionar la histona dH1. Probablement, aquesta restricció de la prevenció de l'acumulació d'R-loops a l'heterocromatina estigui lligada a la funció de silenciament gènic de les regions heterocromàtiques descrita per la histona dH1. Ha estat àmpliament descrit que la depleció de la histona dH1 provoca una sobreexpressió genòmica principalment de l'heterocromatina, sense afectar pràcticament l'expressió de les seqüències eucromàtiques. En aquest sentit, podria ser que en deplecionar la histona dH1 hi hagués una tendència a formar R-loops preferentment en aquelles regions que resulten sobreexpressades, és a dir, les seqüències heterocromàtiques. Tot i així, els resultats obtinguts en aquest treball posen de manifest que la sobreexpressió de l'heterocromatina és necessària però no suficient per donar lloc a una acumulació d'R-loops en aquestes regions, donat que en deplecionar HP1a també hi ha una sobreexpressió de les



seqüències repetitives però, en aquest cas, no dona lloc a una acumulació d'R-loops, probablement degut a que la histona dH1 pot estar present. Per tant, és molt probable que en deplecionar la histona dH1 es formin R-loops fruit de la sobreexpressió de l'heterocromatina i de la impossibilitat de reclutar alguna de les activitats enzimàtiques prèviament mencionades (Fig. 67A). En deplecionar HP1a, també es donaria una sobreexpressió de les seqüències repetitives que podria donar lloc a una acumulació d'R-loops però en poder-se reclutar aquestes activitats enzimàtiques que previndrien l'acumulació d'R-loops, no es donaria una acumulació d'aquestes estructures a l'heterocromatina (Fig. 67B).



**Figura 67. Hipotètic model que explicaria perquè la depleció de la histona dH1, però no la d'HP1a, provoca una acumulació d'R-loops a l'heterocromatina.** A) En deplecionar la histona dH1, hi ha una sobreexpressió de les seqüències heterocromàtiques que dona lloc a una acumulació d'R-loops en aquestes regions que no pot ser evitada mitjançant el reclutament d'alguna activitat enzimàtica (Su(var)2-10, hnRNP36, hnRNP48,...) implicada en la prevenció de l'acumulació d'R-loops. B) En deplecionar HP1a, també hi ha una sobreexpressió de les seqüències heterocromàtiques. En aquest cas, però, sí que es podrien reclutar aquestes activitats enzimàtiques gràcies a la presència de la histona dH1 i s'evitaria l'acumulació d'R-loops en aquestes regions.

El reclutament dependent d'histona dH1 d'aquestes activitats enzimàtiques que prevenen l'acumulació d'R-loops podria donar-se a nivell de tot el genoma o estar restringit a l'heterocromatina. En el primer cas, però, donat que l'expressió de les seqüències eucromàtiques no resulta pràcticament alterada en deplecionar la histona dH1, la seva acció no seria necessària en aquest sentit i únicament resultaria en una acumulació d'R-loops a l'heterocromatina. Alternativament, la histona dH1 també podria induir el reclutament d'aquestes activitats enzimàtiques específicament a

l'heterocromatina de forma similar a com fa amb Su(var)3-9. En el cas de Su(var)3-9, s'ha proposat que el factor diferencial que faria que la histona dH1 reclutés Su(var)3-9 només a les regions en que s'ha de formar l'heterocromatina podria ser una major relació H1:nucleosoma [74]. De la mateixa manera, la histona dH1 podria induir el reclutament d'activitats enzimàtiques implicades en la prevenció de l'acumulació d'R-loops específicament a l'heterocromatina mitjançant un increment de la relació H1:nucleosoma en aquestes regions. Globalment, tot això podria explicar perquè malgrat trobar-se per tot el genoma, en depleccionar la histona dH1 s'observa una acumulació d'R-loops preferentment a l'heterocromatina.

Finalment, cal destacar que malgrat l'efecte clarament negatiu que té per a la cèl·lula de *D. melanogaster* una reducció important del contingut d'histona dH1 descrit en aquest treball, no totes les cèl·lules eucariotes presenten valors similars de la relació H1:nucleosoma. A la natura, s'ha observat que aquest ratio varia entre 0.5 i 1.4 [181, 182]. Per exemple, s'ha observat que aquesta relació és de 0.5 a cèl·lules mare embrionàries, 0.8 en moltes cèl·lules somàtiques o inclús 1.3 en eritròcits de pollastre. Sembla sorprenent que alguns tipus cel·lulars puguin presentar una relació H1:nucleosoma tan baixa sense que això repercuteixi en l'estabilitat del genoma. D'acord amb els resultats obtinguts en aquest treball, en aquestes condicions, esperaríem que el genoma esdevingués inestable, però la realitat és que el genoma es manté estable. Per exemple, les cèl·lules embrionàries presenten uns ratios H1:nucleosoma de 0.5, relativament baixos comparat amb altres tipus cel·lulars, però en cap cas associat a aquest baix contingut d'histona H1 s'observen fenòmens d'inestabilitat genòmica. En el mateix sentit, en cèl·lules de pollastre de la línia DT40 on s'han eliminat totes les isoformes d'histona dH1 s'ha observat que la viabilitat cel·lular pràcticament no es veu afectada per la falta d'histona dH1 [183]. En relació amb aquestes observacions, es podrien plantejar diverses hipòtesis per explicar aquests fenòmens. D'una banda, podria ser que en alguns organismes existeixin altres proteïnes, a més de la histona H1, capaces de contribuir en la prevenció de l'acumulació d'R-loops a l'heterocromatina. Aquest podria ser el cas de les cèl·lules DT40 de pollastre nul·les d'histona H1. En aquestes cèl·lules, s'ha observat que hi ha un augment important de la quantitat d'HMG1/2 [183]. Igual com la histona H1, les proteïnes HMG (*High Mobility Group*) també s'uneixen al DNA connector a prop de l'eix del nucleosoma on el DNA connector entra i surt del nucleosoma i poden contribuir a la organització de l'estructura de la cromatina [184]. En aquest sentit, podria ser que, en absència d'histona H1, hi hagués un augment de les proteïnes HMG1/2 que podrien substituir parcialment la histona H1 en aquesta hipotètica funció de prevenció de l'acumulació d'R-loops a l'heterocromatina. Això podria explicar perquè aquestes cèl·lules són viables, tot i que creixen més lentament [183]. En suport d'aquesta possibilitat, recentment també ha estat descrit a llevat que la proteïna de la família de les HMGs, HMO1, funciona com una histona H1 en aquest organisme [185]. Alternativament, també podria ser que els nivells d'histona H1 variïn entre diferents tipus cel·lulars fruit, per exemple, dels diferents estats de diferenciació que poden presentar les cèl·lules, però sempre mantenint la relació H1:nucleosoma a per sobre un llindar concret a les seqüències repetitives. De fet, en organismes que presenten un contingut baix d'histona H1, com *S. cerevisiae* [186], s'ha observat que efectivament la proteïna tendeix a acumular-se a les regions més repetitives, com el DNA ribosòmic [186], on també prevé la hiperrecombinació [187]. Una situació similar podria donar-se en les cèl·lules embrionàries de mamífer. Aquestes cèl·lules presenten unes relacions entorn a 0.5 però,

en canvi, viuen perfectament sense patir inestabilitat genòmica. Podria ser que al tractar-se de cèl·lules poc diferenciades no necessitessin uns grans nivells d'histona H1 donat que no han d'establir un programa de diferenciació concret. Això sí, malgrat no requerir un elevat contingut d'histona H1 per ajustar l'expressió gènica a un patró de diferenciació concret, el contingut d'histona H1 en seqüències repetitives hauria de mantenir-se sempre per damunt d'un mínim concret per evitar la generació de dany associada a una acumulació anòmala d'R-loops en aquestes regions. D'aquesta manera, globalment les cèl·lules presentarien una relació H1:nucleosoma baixa, però el contingut d'histona H1 seria suficient per evitar l'acumulació d'R-loops a les seqüències repetitives. De fet, en experiments realitzats al laboratori emprant cèl·lules mare embrionàries de ratolí control i en que s'ha deletat tres variants somàtiques de la histona H1 [188] s'ha observat mitjançant immunotincions que les cèl·lules triplement deletades presenten una acumulació notable del senyal de  $\gamma$ H2AX i R-loops que no s'observa a les cèl·lules control. Aquests resultats posen de manifest que malgrat tractar-se de cèl·lules que presenten unes relacions H1:nucleosoma típicament baixes, els nivells d'histona H1 són suficients per evitar una acumulació anòmala d'R-loops que pugui conduir a un escenari d'inestabilitat genòmica. Això sí, en fer baixar el contingut d'histona H1 encara més per sota d'un llindar concret, no es podria arribar a acumular a les seqüències repetitives el mínim d'aquesta proteïna necessari per prevenir la inestabilitat genòmica induïda per l'acumulació d'R-loops.

En resum, els resultats obtinguts posen de manifest que la histona dH1 de *D. melanogaster* és necessària per evitar el dany al DNA i la inestabilitat genòmica de l'heterocromatina associat a l'acumulació d'R-loops. A més a més, també indiquen que la histona dH1 és necessària per a que l'heterocromatina es repliqui correctament tard a fase S. D'altra banda, també suggereixen que es podria tractar d'una funció específica de la histona dH1. El mecanisme molecular a través del qual la histona dH1 prevé l'acumulació dels R-loops, però, no està clar i calen més experiments en aquest sentit.



## **F. CONCLUSIONS**



Atenent als resultats obtinguts en aquest treball, s'ha arribat a les següents conclusions:

- 1) La depleció de la variant somàtica de la histona H1 de *D. melanogaster*, dH1, en la línia cel·lular SL2 provoca un increment en la reactivitat de l'anticòs contra  $\gamma$ H2Av, una marca epigenètica associada al dany i, sense que la reparació del dany estigui afectada, un augment de la quantitat de trencaments en la cadena de DNA.
- 2) El dany genòmic generat per la depleció de la histona dH1 s'acumula principalment a l'heterocromatina. Mitjançant immunoprecipitació de la cromatina amb anticòs contra  $\gamma$ H2Av s'observa que aquesta modificació es troba enriquida en transposons, satèl·lits, repeticions simples i DNA ribosòmic. A més a més, aquest senyal presenta una clara tendència a colocalitzar amb HP1a, una proteïna estructural de l'heterocromatina.
- 3) Tant en les cèl·lules no tractades com en les cèl·lules interferides d'histona dH1, existeix una acumulació de  $\gamma$ H2Av a les regions promotores de gens que s'expressen per sobre la mitjana d'expressió a cèl·lules SL2 i es troben majoritàriament en regions pericentromèriques. En aquest cas, no s'observa un augment en la intensitat d'aquest senyal en deplecionar la histona dH1.
- 4) En condicions de depleció d'histona dH1, s'observa un major nombre d'intercanvis entre cromàtides germanes. Aquest increment posa de manifest que el genoma és inestable en aquestes condicions i presenta un fenomen d'hiperrecombinació somàtica.
- 5) El dany ocasionat per la depleció de la histona dH1 també provoca alteracions a mitosi amb un augment notable de la quantitat de *foci* de  $\gamma$ H2Av en cromosomes metafàsics i problemes en la segregació dels cromosomes, probablement com a resultat de l'estrès replicatiu causat pel dèficit en histona dH1.
- 6) Conjuntament amb l'acumulació de dany al DNA, la depleció de la histona dH1 també provoca una acumulació d'R-loops. Aquests R-loops són la causa principal del dany al DNA generat en interferir l'expressió de la histona dH1.
- 7) L'acumulació dels R-loops és detectable a la fase G1 i provoca la generació de dany al DNA principalment durant la fase S del cicle cel·lular, suggerint que la replicació del DNA és necessària per a la generació del dany.
- 8) La replicació del DNA també està alterada en condicions de depleció d'histona dH1. Quan s'interfereix aquesta proteïna es pot observar un increment en el nombre de cèl·lules en replicació i que les seqüències heterocromàtiques passen a replicar-se anormalment d'hora a fase S enlloc de fer-ho tard com seria normal.

- 9) Igual com succeeix en interferir l'expressió de la histona dH1, la depleció d'HP1a també provoca la sobreexpressió de les seqüències heterocromàtiques. En aquest cas, però, no s'observa ni una acumulació d'R-loops ni un augment del senyal de dany al DNA ( $\gamma$ H2Av) a l'heterocromatina.
  
- 10) En conjunt, els nostres resultats indiquen que la histona dH1 prevé la generació de dany al DNA induïda per una acumulació anòmala d'R-loops a l'heterocromatina.



## **G. REFERÈNCIES**



1. Annunziato, A., *DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin*. Nature Education, 2008. **1**((1):26).
2. Cutter, A.R. and J.J. Hayes, *A brief review of nucleosome structure*. FEBS Lett, 2015. **589**(20 Pt A): p. 2914-22.
3. Soboleva, T.A., et al., *Histone variants at the transcription start-site*. Trends Genet, 2014. **30**(5): p. 199-209.
4. Bednar, J., A. Hamiche, and S. Dimitrov, *H1-nucleosome interactions and their functional implications*. Biochim Biophys Acta, 2015.
5. MBInfo, c. *Solenoid (A) and zigzag (B) models of intermediate chromatin condensation.*; <http://www.mechanobio.info/figure/figure/1389942837319.jpg.html>; MBInfo Wiki 2014
6. Ricci, M.A., et al., *Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo*. Cell, 2015. **160**(6): p. 1145-58.
7. Lewin, B., *Chapter 28.5: Eukaryotic DNA Has Loops and Domains Attached to a Scaffold*, in *Genes IX*, B. Lewin, Editor. 2008, Jones & Bartlett Learning: Sudbury, United States.
8. Griffiths, A.J.F., *Chapter 2.4: The Nature of Eukaryotic Nuclear Chromosomes*, in *Modern Genetic Analysis*, A.J.F. Griffiths, Editor. 1999, W. H. Freeman: New York, United States.
9. Nelson, W.G., et al., *The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA*. Annu Rev Biophys Biophys Chem, 1986. **15**: p. 457-75.
10. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet, 2003. **33** Suppl: p. 245-54.
11. Goldberg, A.D., C.D. Allis, and E. Bernstein, *Epigenetics: a landscape takes shape*. Cell, 2007. **128**(4): p. 635-8.
12. Talbert, P.B. and S. Henikoff, *Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(4): p. 264-75.
13. Hagood, J.S., *Beyond the genome: epigenetic mechanisms in lung remodeling*. Physiology (Bethesda), 2014. **29**(3): p. 177-85.
14. Robertson, K.D., *DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5361-79.
15. Ptak, C. and A. Petronis, *Epigenetics and complex disease: from etiology to new therapeutics*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008. **48**: p. 257-76.
16. Rottach, A., H. Leonhardt, and F. Spada, *DNA methylation-mediated epigenetic control*. J Cell Biochem, 2009. **108**(1): p. 43-51.
17. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
18. Yun, M., et al., *Readers of histone modifications*. Cell Res, 2011. **21**(4): p. 564-78.
19. Smallwood, A., et al., *Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing*. Genes Dev, 2007. **21**(10): p. 1169-78.
20. Wang, J., et al., *The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 125-9.
21. Zhao, Q., et al., *PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(3): p. 304-11.

22. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
23. Natoli, G. and J.C. Andrau, *Noncoding transcription at enhancers: general principles and functional models*. Annu Rev Genet, 2012. **46**: p. 1-19.
24. Zlatanova, J., et al., *The nucleosome family: dynamic and growing*. Structure, 2009. **17**(2): p. 160-71.
25. Holmquist, G.P., *Role of replication time in the control of tissue-specific gene expression*. Am J Hum Genet, 1987. **40**(2): p. 151-73.
26. Craig, J.M., *Heterochromatin--many flavours, common themes*. Bioessays, 2005. **27**(1): p. 17-28.
27. Oberdoerffer, P. and D.A. Sinclair, *The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(9): p. 692-702.
28. Dernburg, A.F., et al., *Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions*. Cell, 1996. **85**(5): p. 745-59.
29. Grewal, S.I. and S. Jia, *Heterochromatin revisited*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(1): p. 35-46.
30. Yamada, T., et al., *The nucleation and maintenance of heterochromatin by a histone deacetylase in fission yeast*. Mol Cell, 2005. **20**(2): p. 173-85.
31. Jia, S., K. Noma, and S.I. Grewal, *RNAi-independent heterochromatin nucleation by the stress-activated ATF/CREB family proteins*. Science, 2004. **304**(5679): p. 1971-6.
32. Kim, H.S., et al., *Regulation of Swi6/HP1-dependent heterochromatin assembly by cooperation of components of the mitogen-activated protein kinase pathway and a histone deacetylase Clr6*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42850-9.
33. Lu, B.Y., et al., *Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in Drosophila*. Genetics, 2000. **155**(2): p. 699-708.
34. Weiler, K.S. and B.T. Wakimoto, *Heterochromatin and gene expression in Drosophila*. Annu Rev Genet, 1995. **29**: p. 577-605.
35. Piacentini, L., et al., *Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in Drosophila euchromatin*. J Cell Biol, 2003. **161**(4): p. 707-14.
36. Vakoc, C.R., et al., *Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin*. Mol Cell, 2005. **19**(3): p. 381-91.
37. Filion, G.J., et al., *Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells*. Cell, 2010. **143**(2): p. 212-24.
38. Ho, J.W., et al., *Comparative analysis of metazoan chromatin organization*. Nature, 2014. **512**(7515): p. 449-52.
39. Heitz, E., *The heterochromatin in moss*. Jahrb Wiss Botanik, 1928. **69**: p. 762-818.
40. Elgin, S.C., *Heterochromatin and gene regulation in Drosophila*. Curr Opin Genet Dev, 1996. **6**(2): p. 193-202.
41. Miklos, G.L. and J.N. Cotshell, *Chromosome structure at interfaces between major chromatin types: alpha- and beta-heterochromatin*. Bioessays, 1990. **12**(1): p. 1-6.
42. Macgregor, H.C., *Introduction to Animal Cytogenetics*. Springer, 1993.

43. Hoskins, R.A., et al., *Heterochromatic sequences in a Drosophila whole-genome shotgun assembly*. *Genome Biol*, 2002. **3**(12): p. RESEARCH0085.
44. Pimpinelli, S., et al., *Transposable elements are stable structural components of D. melanogaster heterochromatin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(9): p. 3804-8.
45. Lohe, A.R., A.J. Hilliker, and P.A. Roberts, *Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of D. melanogaster*. *Genetics*, 1993. **134**(4): p. 1149-74.
46. Kharchenko, P.V., et al., *Comprehensive analysis of the chromatin landscape in D. melanogaster*. *Nature*, 2011. **471**(7339): p. 480-5.
47. Harshman, S.W., et al., *H1 histones: current perspectives and challenges*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(21): p. 9593-609.
48. Zhou, B.R., et al., *Structural Mechanisms of Nucleosome Recognition by Linker Histones*. *Mol Cell*, 2015. **59**(4): p. 628-38.
49. Zhou, B.R., et al., *Structural insights into the histone H1-nucleosome complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(48): p. 19390-5.
50. Allan, J., et al., *Roles of H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location*. *J Mol Biol*, 1986. **187**(4): p. 591-601.
51. Hendzel, M.J., et al., *The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin in vivo*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(19): p. 20028-34.
52. Oberg, C. and S. Belikov, *The N-terminal domain determines the affinity and specificity of H1 binding to chromatin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **420**(2): p. 321-4.
53. Vyas, P. and D.T. Brown, *N- and C-terminal domains determine differential nucleosomal binding geometry and affinity of linker histone isoforms H1(0) and H1c*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(15): p. 11778-87.
54. Roque, A., et al., *DNA-induced secondary structure of the carboxyl-terminal domain of histone H1*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(37): p. 32141-7.
55. Caterino, T.L., H. Fang, and J.J. Hayes, *Nucleosome linker DNA contacts and induces specific folding of the intrinsically disordered H1 carboxyl-terminal domain*. *Mol Cell Biol*, 2011. **31**(11): p. 2341-8.
56. Clark, D.J., et al., *Alpha-helix in the carboxy-terminal domains of histones H1 and H5*. *EMBO J*, 1988. **7**(1): p. 69-75.
57. Hamiche, A., et al., *Linker histone-dependent DNA structure in linear mononucleosomes*. *J Mol Biol*, 1996. **257**(1): p. 30-42.
58. Roque, A., I. Ponte, and P. Suaud, *Role of charge neutralization in the folding of the carboxy-terminal domain of histone H1*. *J Phys Chem B*, 2009. **113**(35): p. 12061-6.
59. Fang, H., D.J. Clark, and J.J. Hayes, *DNA and nucleosomes direct distinct folding of a linker histone H1 C-terminal domain*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(4): p. 1475-84.
60. Lu, X., et al., *Chromatin condensing functions of the linker histone C-terminal domain are mediated by specific amino acid composition and intrinsic protein disorder*. *Biochemistry*, 2009. **48**(1): p. 164-72.

61. Lu, X. and J.C. Hansen, *Identification of specific functional subdomains within the linker histone H10 C-terminal domain*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 8701-7.
62. Izzo, A., K. Kamieniarz, and R. Schneider, *The histone H1 family: specific members, specific functions?* Biol Chem, 2008. **389**(4): p. 333-43.
63. Mayor, R., et al., *Genome distribution of replication-independent histone H1 variants shows H1.0 associated with nucleolar domains and H1X associated with RNA polymerase II-enriched regions*. J Biol Chem, 2015. **290**(12): p. 7474-91.
64. Happel, N. and D. Doenecke, *Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function*. Gene, 2009. **431**(1-2): p. 1-12.
65. Marzluff, W.F., et al., *The human and mouse replication-dependent histone genes*. Genomics, 2002. **80**(5): p. 487-98.
66. Gunesdogan, U., H. Jackle, and A. Herzig, *A genetic system to assess in vivo the functions of histones and histone modifications in higher eukaryotes*. EMBO Rep, 2010. **11**(10): p. 772-6.
67. McKay, D.J., et al., *Interrogating the function of metazoan histones using engineered gene clusters*. Dev Cell, 2015. **32**(3): p. 373-86.
68. Bayona-Feliu, A., et al., *Histone H1: Lessons from Drosophila*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1859**(3): p. 526-32.
69. Isogai, Y., et al., *Transcription of histone gene cluster by differential core-promoter factors*. Genes Dev, 2007. **21**(22): p. 2936-49.
70. Lu, X., et al., *Linker histone H1 is essential for Drosophila development, the establishment of pericentric heterochromatin, and a normal polytene chromosome structure*. Genes Dev, 2009. **23**(4): p. 452-65.
71. Vujatovic, O., et al., *D. melanogaster linker histone dH1 is required for transposon silencing and to preserve genome integrity*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(12): p. 5402-14.
72. Hergeth, S.P. and R. Schneider, *The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle*. EMBO Rep, 2015. **16**(11): p. 1439-53.
73. Perez-Montero, S., et al., *The embryonic linker histone H1 variant of Drosophila, dBigH1, regulates zygotic genome activation*. Dev Cell, 2013. **26**(6): p. 578-90.
74. Lu, X., et al., *Drosophila H1 regulates the genetic activity of heterochromatin by recruitment of Su(var)3-9*. Science, 2013. **340**(6128): p. 78-81.
75. Xu, N., et al., *Drosophila linker histone H1 coordinates STAT-dependent organization of heterochromatin and suppresses tumorigenesis caused by hyperactive JAK-STAT signaling*. Epigenetics Chromatin, 2014. **7**: p. 16.
76. Bonet-Costa, C., et al., *Combined bottom-up and top-down mass spectrometry analyses of the pattern of post-translational modifications of D. melanogaster linker histone H1*. J Proteomics, 2012. **75**(13): p. 4124-38.
77. Magdalou, I., et al., *The causes of replication stress and their consequences on genome stability and cell fate*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 154-64.
78. Durkin, S.G. and T.W. Glover, *Chromosome Fragile Sites*. Annu. Rev. Genet., 2007. **41**(1): p. 169-192.

79. Debatisse, M., et al., *Common fragile sites: mechanisms of instability revisited*. Trends in Genetics, 2012. **28**(1): p. 22-32.
80. Zeman, M.K. and K.A. Cimprich, *Causes and consequences of replication stress*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(1): p. 2-9.
81. Mankouri, H.W., D. Huttner, and I.D. Hickson, *How unfinished business from S-phase affects mitosis and beyond*. EMBO J, 2013. **32**(20): p. 2661-2671.
82. Poli, J., et al., *dNTP pools determine fork progression and origin usage under replication stress*. The EMBO Journal, 2012. **31**(4): p. 883-894.
83. Rozenzhak, S., et al., *Rad3ATR Decorates Critical Chromosomal Domains with  $\gamma$ H2A to Protect Genome Integrity during S-Phase in Fission Yeast*. PLoS Genetics, 2010. **6**(7): p. e1001032.
84. Aguilera, A. and T. García-Muse, *R Loops: From Transcription Byproducts to Threats to Genome Stability*. Molecular Cell, 2012. **46**(2): p. 115-124.
85. Ginno, P.A., et al., *GC skew at the 5' and 3' ends of human genes links R-loop formation to epigenetic regulation and transcription termination*. Genome Res, 2013. **23**(10): p. 1590-600.
86. Huertas, P. and A. Aguilera, *Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination*. Mol Cell, 2003. **12**(3): p. 711-21.
87. Tuduri, S., et al., *Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(11): p. 1315-24.
88. Paulsen, R.D., et al., *A genome-wide siRNA screen reveals diverse cellular processes and pathways that mediate genome stability*. Mol Cell, 2009. **35**(2): p. 228-39.
89. Wahba, L., et al., *RNase H and multiple RNA biogenesis factors cooperate to prevent RNA:DNA hybrids from generating genome instability*. Mol Cell, 2011. **44**(6): p. 978-88.
90. Wilhelm, T., et al., *Spontaneous slow replication fork progression elicits mitosis alterations in homologous recombination-deficient mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(2): p. 763-8.
91. Lieber, M.R., *The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 181-211.
92. Deem, A., et al., *Break-induced replication is highly inaccurate*. PLoS Biol, 2011. **9**(2): p. e1000594.
93. Waters, L.S., et al., *Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance*. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(1): p. 134-54.
94. Khurana, S. and P. Oberdoerffer, *Replication Stress: A Lifetime of Epigenetic Change*. Genes (Basel), 2015. **6**(3): p. 858-77.
95. Aguilera, A. and B. Gomez-Gonzalez, *Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(3): p. 204-17.
96. Ozeri-Galai, E., et al., *Interplay between ATM and ATR in the regulation of common fragile site stability*. Oncogene, 2007. **27**(15): p. 2109-2117.
97. Fernandez-Capetillo, O., et al., *H2AX: the histone guardian of the genome*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 959-67.

98. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
99. Ciccia, A. and S.J. Elledge, *The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives*. Molecular Cell, 2010. **40**(2): p. 179-204.
100. Ward, I.M. and J. Chen, *Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 47759-62.
101. Sirbu, B.M., et al., *Analysis of protein dynamics at active, stalled, and collapsed replication forks*. Genes Dev, 2011. **25**(12): p. 1320-7.
102. Madigan, J.P., H.L. Chotkowski, and R.L. Glaser, *DNA double-strand break-induced phosphorylation of Drosophila histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(17): p. 3698-705.
103. Joyce, E.F., et al., *Drosophila ATM and ATR have distinct activities in the regulation of meiotic DNA damage and repair*. J Cell Biol, 2011. **195**(3): p. 359-67.
104. LaRocque, J.R., et al., *Reducing DNA polymerase alpha in the absence of Drosophila ATR leads to P53-dependent apoptosis and developmental defects*. Genetics, 2007. **176**(3): p. 1441-51.
105. Song, Y.H., et al., *The Drosophila ATM ortholog, dATM, mediates the response to ionizing radiation and to spontaneous DNA damage during development*. Curr Biol, 2004. **14**(15): p. 1354-9.
106. Hamperl, S. and K.A. Cimprich, *The contribution of co-transcriptional RNA:DNA hybrid structures to DNA damage and genome instability*. DNA Repair, 2014. **19**: p. 84-94.
107. Drolet, M., *The problem of hypernegative supercoiling and r-loop formation in transcription*. Frontiers in Bioscience, 2003. **8**(1-3): p. d210.
108. Sollier, J. and K.A. Cimprich, *Breaking bad: R-loops and genome integrity*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(9): p. 514-22.
109. Ginno, P.A., et al., *R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters*. Mol Cell, 2012. **45**(6): p. 814-25.
110. Skourti-Stathaki, K., Nicholas J. Proudfoot, and N. Gromak, *Human Senataxin Resolves RNA/DNA Hybrids Formed at Transcriptional Pause Sites to Promote Xrn2-Dependent Termination*. Molecular Cell, 2011. **42**(6): p. 794-805.
111. Mischo, H.E., et al., *Yeast Sen1 Helicase Protects the Genome from Transcription-Associated Instability*. Molecular Cell, 2011. **41**(1): p. 21-32.
112. Sun, Q., et al., *R-Loop Stabilization Represses Antisense Transcription at the Arabidopsis FLC Locus*. Science, 2013. **340**(6132): p. 619-621.
113. Powell, W.T., et al., *R-loop formation at Snord116 mediates topotecan inhibition of Ube3a-antisense and allele-specific chromatin decondensation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(34): p. 13938-13943.
114. Santos-Pereira, J.M. and A. Aguilera, *R loops: new modulators of genome dynamics and function*. Nat Rev Genet, 2015. **16**(10): p. 583-97.
115. Keskin, H., et al., *Transcript-RNA-templated DNA recombination and repair*. Nature, 2014. **515**(7527): p. 436-439.



116. Wahba, L., S.K. Gore, and D. Koshland, *The homologous recombination machinery modulates the formation of RNA–DNA hybrids and associated chromosome instability*. eLife, 2013. **2**.
117. Sollier, J., et al., *Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability*. Mol Cell, 2014. **56**(6): p. 777-85.
118. Sordet, O., et al., *Ataxia telangiectasia mutated activation by transcription- and topoisomerase I-induced DNA double-strand breaks*. EMBO Rep, 2009. **10**(8): p. 887-93.
119. El Hage, A., et al., *Loss of Topoisomerase I leads to R-loop-mediated transcriptional blocks during ribosomal RNA synthesis*. Genes & Development, 2010. **24**(14): p. 1546-1558.
120. Li, X., T. Niu, and J.L. Manley, *The RNA binding protein RNPS1 alleviates ASF/SF2 depletion-induced genomic instability*. RNA, 2007. **13**(12): p. 2108-2115.
121. Li, X. and J.L. Manley, *Inactivation of the SR protein splicing factor ASF/SF2 results in genomic instability*. Cell, 2005. **122**(3): p. 365-78.
122. Paulsen, R.D., et al., *A Genome-wide siRNA Screen Reveals Diverse Cellular Processes and Pathways that Mediate Genome Stability*. Molecular Cell, 2009. **35**(2): p. 228-239.
123. Stirling, P.C., et al., *R-loop-mediated genome instability in mRNA cleavage and polyadenylation mutants*. Genes Dev, 2012. **26**(2): p. 163-75.
124. Bhatia, V., et al., *BRCA2 prevents R-loop accumulation and associates with TREX-2 mRNA export factor PCID2*. Nature, 2014. **511**(7509): p. 362-5.
125. Hatchi, E., et al., *BRCA1 recruitment to transcriptional pause sites is required for R-loop-driven DNA damage repair*. Mol Cell, 2015. **57**(4): p. 636-47.
126. Yu, K., et al., *R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 442-51.
127. Gomez-Gonzalez, B. and A. Aguilera, *Activation-induced cytidine deaminase action is strongly stimulated by mutations of the THO complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(20): p. 8409-14.
128. Tian, M. and F.W. Alt, *Transcription-induced cleavage of immunoglobulin switch regions by nucleotide excision repair nucleases in vitro*. J Biol Chem, 2000. **275**(31): p. 24163-72.
129. Gan, W., et al., *R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression*. Genes & Development, 2011. **25**(19): p. 2041-2056.
130. Wellinger, R.E., F. Prado, and A. Aguilera, *Replication Fork Progression Is Impaired by Transcription in Hyperrecombinant Yeast Cells Lacking a Functional THO Complex*. Molecular and Cellular Biology, 2006. **26**(8): p. 3327-3334.
131. Alzu, A., et al., *Senataxin Associates with Replication Forks to Protect Fork Integrity across RNA-Polymerase-II-Transcribed Genes*. Cell, 2012. **151**(4): p. 835-846.
132. Brand, A.H. and N. Perrimon, *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development, 1993. **118**(2): p. 401-15.
133. Bischof, J., et al., *An optimized transgenesis system for Drosophila using germ-line-specific phiC31 integrases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3312-7.
134. Schneider, I., *Cell lines derived from late embryonic stages of D. melanogaster*. J Embryol Exp Morphol, 1972. **27**(2): p. 353-65.

135. Moreno-Moreno, O., M. Torras-Llort, and F. Azorin, *Proteolysis restricts localization of CID, the centromere-specific histone H3 variant of Drosophila, to centromeres*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(21): p. 6247-55.
136. Font-Burgada, J., et al., *Drosophila HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression*. Genes Dev, 2008. **22**(21): p. 3007-23.
137. Boguslawski, S.J., et al., *Characterization of monoclonal antibody to DNA:RNA and its application to immunodetection of hybrids*. J Immunol Methods, 1986. **89**(1): p. 123-30.
138. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2001, New York, United States: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
139. Worby, C.A., N. Simonson-Leff, and J.E. Dixon, *RNA interference of gene expression (RNAi) in cultured Drosophila cells*. Sci STKE, 2001. **2001**(95): p. p11.
140. Darzynkiewicz, Z., G. Juan, and E.F. Srouf, *Differential staining of DNA and RNA*. Curr Protoc Cytom, 2004. **Chapter 7**: p. Unit 7 3.
141. Ni, J.Q., et al., *Drosophila ribosomal proteins are associated with linker histone H1 and suppress gene transcription*. Genes Dev, 2006. **20**(14): p. 1959-73.
142. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
143. Olive, P.L. and J.P. Banath, *The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 23-9.
144. Konca, K., et al., *A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay*. Mutat Res, 2003. **534**(1-2): p. 15-20.
145. German, J. and B. Alhadeff, *Analysis of sister-chromatid exchanges*. Curr Protoc Hum Genet, 2001. **Chapter 8**: p. Unit 8 6.
146. Zhang, Z.Z., et al., *Complexities due to single-stranded RNA during antibody detection of genomic rna:dna hybrids*. BMC Res Notes, 2015. **8**: p. 127.
147. Koo, C.X., et al., *RNA polymerase III regulates cytosolic RNA:DNA hybrids and intracellular microRNA expression*. J Biol Chem, 2015. **290**(12): p. 7463-73.
148. Ashburner, M., *Drosophila: a Laboratory Manual*. 1989, New York, United States: Cold Spring Harbor Laboratory.
149. Chen, N., *Using RepeatMasker to identify repetitive elements in genomic sequences*. Curr Protoc Bioinformatics, 2004. **Chapter 4**: p. Unit 4 10.
150. James, T.C., et al., *Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of Drosophila*. Eur J Cell Biol, 1989. **50**(1): p. 170-80.
151. Murga, M., et al., *Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response*. J Cell Biol, 2007. **178**(7): p. 1101-8.
152. Stein, H. and P. Hausen, *Enzyme from calf thymus degrading the RNA moiety of DNA-RNA Hybrids: effect on DNA-dependent RNA polymerase*. Science, 1969. **166**(3903): p. 393-5.
153. Skourti-Stathaki, K. and N.J. Proudfoot, *A double-edged sword: R loops as threats to genome integrity and powerful regulators of gene expression*. Genes & Development, 2014. **28**(13): p. 1384-1396.

154. Hietakangas, V. and S.M. Cohen, *Re-evaluating AKT regulation: role of TOR complex 2 in tissue growth*. Genes Dev, 2007. **21**(6): p. 632-7.
155. Siev, M., R. Weinberg, and S. Penman, *The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in HeLa cells by cordycepin*. J Cell Biol, 1969. **41**(2): p. 510-20.
156. James, T.C. and S.C. Elgin, *Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in D. melanogaster and its gene*. Mol Cell Biol, 1986. **6**(11): p. 3862-72.
157. Thomas, C.J., et al., *Kinase-mediated changes in nucleosome conformation trigger chromatin decondensation via poly(ADP-ribosylation)*. Mol Cell, 2014. **53**(5): p. 831-42.
158. Downs, J.A., et al., *Suppression of homologous recombination by the Saccharomyces cerevisiae linker histone*. Mol Cell, 2003. **11**(6): p. 1685-92.
159. Kotova, E., et al., *Drosophila histone H2A variant (H2Av) controls poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) activation in chromatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(15): p. 6205-10.
160. Li, X. and J.L. Manley, *Cotranscriptional processes and their influence on genome stability*. Genes Dev, 2006. **20**(14): p. 1838-47.
161. Chon, H., et al., *RNase H2 roles in genome integrity revealed by unlinking its activities*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(5): p. 3130-43.
162. Bayona-Feliu, A., et al., *Linker histone H1 prevents R-loop accumulation and genome instability in heterochromatin*. Nat Comm (under revision), 2016.
163. Chaudhuri, J., et al., *Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme*. Nature, 2003. **422**(6933): p. 726-30.
164. Lindahl, T., *An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(9): p. 3649-53.
165. Stuckey, R., et al., *Role for RNA:DNA hybrids in origin-independent replication priming in a eukaryotic system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(18): p. 5779-84.
166. Cerritelli, S.M. and R.J. Crouch, *Ribonuclease H: the enzymes in eukaryotes*. FEBS J, 2009. **276**(6): p. 1494-505.
167. Harrison, J.C. and J.E. Haber, *Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint*. Annu Rev Genet, 2006. **40**: p. 209-35.
168. Millan-Arino, L., et al., *Mapping of six somatic linker histone H1 variants in human breast cancer cells uncovers specific features of H1.2*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(7): p. 4474-93.
169. Nalabothula, N., et al., *The chromatin architectural proteins HMGD1 and H1 bind reciprocally and have opposite effects on chromatin structure and gene regulation*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 92.
170. Mechali, M., *Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(10): p. 728-38.
171. Cayrou, C., P. Coulombe, and M. Mechali, *Programming DNA replication origins and chromosome organization*. Chromosome Res, 2010. **18**(1): p. 137-45.
172. Gilbert, D.M., *Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(3): p. 377-83.

173. Thiriet, C. and J.J. Hayes, *Linker histone phosphorylation regulates global timing of replication origin firing*. J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2823-9.
174. Eissenberg, J.C. and S.C. Elgin, *HP1a: a structural chromosomal protein regulating transcription*. Trends Genet, 2014. **30**(3): p. 103-10.
175. Wang, S.H. and S.C. Elgin, *Drosophila Piwi functions downstream of piRNA production mediating a chromatin-based transposon silencing mechanism in female germ line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(52): p. 21164-9.
176. Guruharsha, K.G., et al., *A protein complex network of D. melanogaster*. Cell, 2011. **147**(3): p. 690-703.
177. Dreyfuss, G., et al., *hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA*. Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 289-321.
178. Hari, K.L., K.R. Cook, and G.H. Karpen, *The Drosophila Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family*. Genes Dev, 2001. **15**(11): p. 1334-48.
179. Piacentini, L., et al., *Heterochromatin protein 1 (HP1a) positively regulates euchromatic gene expression through RNA transcript association and interaction with hnRNPs in Drosophila*. PLoS Genet, 2009. **5**(10): p. e1000670.
180. Matunis, M.J., E.L. Matunis, and G. Dreyfuss, *Isolation of hnRNP complexes from D. melanogaster*. J Cell Biol, 1992. **116**(2): p. 245-55.
181. Bates, D.L. and J.O. Thomas, *Histones H1 and H5: one or two molecules per nucleosome?* Nucleic Acids Res, 1981. **9**(22): p. 5883-94.
182. van Holde, K.E., *Chapter 7: Higher-Order Structure*, in *Chromatin*, K.E. van Holde, Editor. 1989, Springer-Verlag: New York, United States.
183. Hashimoto, H., et al., *Histone H1 null vertebrate cells exhibit altered nucleosome architecture*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(11): p. 3533-45.
184. Thomas, J.O. and K. Stott, *H1 and HMGB1: modulators of chromatin structure*. Biochem Soc Trans, 2012. **40**(2): p. 341-6.
185. Panday, A. and A. Grove, *The high mobility group protein HMO1 functions as a linker histone in yeast*. Epigenetics Chromatin, 2016. **9**: p. 13.
186. Freidkin, I. and D.J. Katcoff, *Specific distribution of the Saccharomyces cerevisiae linker histone homolog HHO1p in the chromatin*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(19): p. 4043-51.
187. Li, C., et al., *Linker histone H1 represses recombination at the ribosomal DNA locus in the budding yeast Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol, 2008. **67**(4): p. 906-19.
188. Fan, Y., et al., *Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation*. Cell, 2005. **123**(7): p. 1199-212.

## **H. ANNEX**





## Review

Histone H1: Lessons from *Drosophila*☆

Aleix Bayona-Feliu<sup>a,b</sup>, Anna Casas-Lamesa<sup>a,b</sup>, Albert Carbonell<sup>a,b</sup>, Paula Climent-Cantó<sup>a,b</sup>, Milos Tatarski<sup>a,b</sup>, Salvador Pérez-Montero<sup>a,b</sup>, Fernando Azorín<sup>a,b</sup>, Jordi Bernués<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Molecular Biology of Barcelona (IBMB-CSIC), Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac 4, 08028 Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Institute for Research in Biomedicine of Barcelona, Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 July 2015

Received in revised form 28 August 2015

Accepted 2 September 2015

Available online 7 September 2015

## ABSTRACT

Eukaryotic genomes are structured in the form of chromatin with the help of a set of five small basic proteins, the histones. Four of them are highly conserved through evolution, form the basic unit of the chromatin, the nucleosome, and have been intensively studied and are well characterized. The fifth histone, histone H1, adds to this basic structure through its interaction at the entry/exit site of DNA in the nucleosome and makes an essential contribution to the higher order folding of the chromatin fiber. Histone H1 is the less conserved histone and the less known of them. Though for long time considered as a general repressor of gene expression, recent studies in *Drosophila* have rejected this view and have contributed to uncover important functions on genome stability and development. Here we present some of the most recent data obtained in the *Drosophila* model system and discuss how the lessons learnt in these studies compare and could be applied to all other eukaryotes. This article is part of a Special Issue entitled: Histone H1, edited by Dr. Albert Jordan.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Chromatin is the structure of the genome in eukaryotic cells. It is organized by the repetition of a basic unit formed by about 146 bp of DNA that wraps around a protein octameric core formed by two copies of each of the so called core histones, H2A, H2B, H3 and H4, and making about 1.65 left-handed turns. The structure of this basic unit, the nucleosome, has been solved to high resolution using X-ray crystallography [29] and upon repetition results in the “beads-on-a-string” classical structure of the eukaryotic genome. An additional histone, the linker histone or histone H1, interacts with the DNA at the entry/exit site, seals the structure protecting some additional 20 bp, and completes the basic unit of the eukaryotic chromatin. Histone H1 is typically about 200 amino acid residues in length distributed in a short N-terminal domain, followed by ~70–80 amino acids structured in a globular domain and by an unstructured C-terminal domain of about 100 amino acid residues long highly enriched in lysines. Histone H1 stabilizes the nucleosome and facilitates the folding of the nucleosomal fiber into higher-order structures (reviewed in [3,18,40]). To date, the structure of the nucleosome containing histone H1 has not been solved by X-ray crystallography and the details of how histone H1 interacts are only indirectly known by other lower resolution techniques. In fact, while there is general consensus that histone H1 interacts with the portion of DNA that is between

nucleosomal core particles, the linker DNA, there are still discrepancies on the way it does and its precise location. Thus, several models located linker histone H1 (or the related chicken-specific linker histone H5) globular domain sitting on the nucleosome dyad axis and either making symmetric [1,2,54] or asymmetric contacts with the linker DNA at the entry and exit sides [2,5,59]. Yet, another study concluded that the original model invoking symmetric interaction with the linker DNAs was correct save that binding of the linker histone globular domain was itself asymmetric [59]. The apparent discrepancies among these different studies were likely due to the inherent assumption that different linker histones bound the same to nucleosome core particles. More recently, *Drosophila* histone H1 has been reported to interact with the nucleosome core particle in a way that is different to the previously published for other species histone H1, i.e. off-dyad [57]. Finally, the crystallographic structure of the nucleosome containing the globular domain of histone H5 at 3.5 Å resolution has just been published [58]. The structure confirms the location of the globular domain on the dyad axis, the interaction with both DNA linkers (at the entry and exit sides of the nucleosome), and identified the residues involved. Importantly, these residues are not conserved among all H1 isoforms and, using a combination of NMR and sedimentation techniques, the authors demonstrate that these differences explain their different binding. Moreover, the differential binding is shown to affect the degree of compaction of the chromatin and allows the authors to show that while human H1.0 and chicken H5 bind on-dyad axis and generate a highly compacted chromatin, human H1.4 and *Drosophila* H1 bind off-dyad axis and compacted chromatin to a lesser extent. An important prediction from this work is that human H1x and HILS1 (a germ-line specific linker histone), and

☆ This article is part of a Special Issue entitled: Histone H1, edited by Dr. Albert Jordan.

\* Corresponding author at: Institute for Molecular Biology of Barcelona (IBMB-CSIC), Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac 4, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: [jordi.bernues@ibmb.csic.es](mailto:jordi.bernues@ibmb.csic.es) (J. Bernués).

*Drosophila* germ-line specific BigH1 (see below) may still present alternative new nucleosome binding modes. Therefore, an important conclusion is that different H1 isoforms bind different and fold chromatin to form different higher-order structures [58]. These differences suggest implications for chromatin dynamics in vivo and will highlight the important contribution of the *Drosophila* model system on the study of the formation of higher-order chromatin structures in the absence of histone H1 isoforms.

In this review, we will focus on the lessons we have learnt from the study of histone H1 in the fruit fly *Drosophila melanogaster* and their relevance to all other eukaryotic species.

## 2. Lesson 1: a single somatic H1 is enough to support complex developmental programs

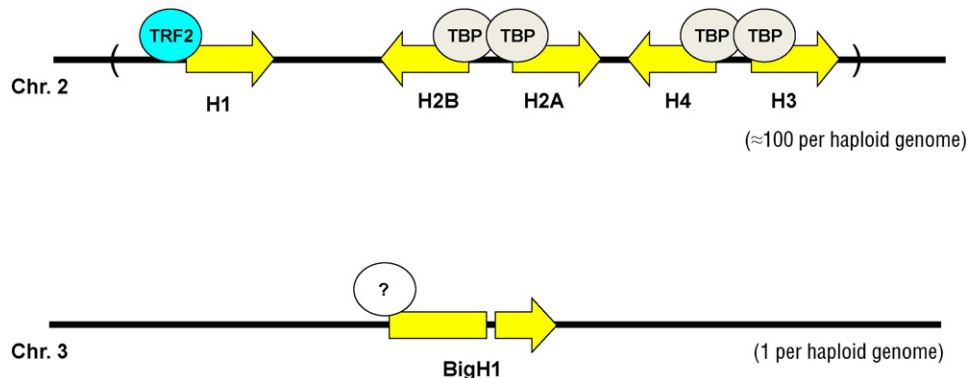
Metazoans typically present several somatic histone H1 isoforms (seven in vertebrates: H1a, b, c, d, e, 0 and X in mouse; H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, H1.5, H1.0 and H1.X in human) and at least a germline histone H1 isoform (four in vertebrates: three in testis H1t, T2, H1LS1; one in oocytes H1oo), all of them single copy genes in vertebrates located outside the core histones repeats. Some of them show a cell cycle-dependent expression at S phase in coordination with DNA replication and standard core histones (e.g. H1.1, H1.2, H1.3, H1.4, and H1.5, in human), while others are expressed out of S phase (e.g. H1.0 and H1.X in human), similarly as some other core histone variants do (e. g. H3.3) and are more related to differentiation states (reviewed in [18]). While recent data on genome-wide distribution of human histone H1 isoforms have shown some preferences [30,33], the existence of several somatic isoforms in vertebrates has led to the proposal they are partly redundant. Indeed, knockout of one or even two different histone genes has been shown to have no phenotype in mice [13,46]. However, a triple histone H1 gene knock-out, affecting H1c, d and e isoforms, results in death at embryo stages, suggesting that the four other isoforms present could not compensate for their lack [12]. Notably, embryonic stem cells have been isolated from triple knock-out mice and can be maintained in culture without displaying any abnormal phenotype clearly indicating that a 50% reduction in histone H1 content is not lethal to cells [12]. However, these cells are more resistant to spontaneous differentiation [56]. Another report showed that complete removal of all histone H1 somatic isoforms in chicken DT40 cell line only results in slow growth clearly indicating that in this cell line H1 histones are not required for cell life [19]. Together these results raise the intriguing question that all H1 histones might be dispensable for cellular life although they are required for metazoan development and differentiation.

At a difference, in *D. melanogaster* a single somatic histone H1 gene, present in about 100 copies (Chr. II), is necessary and sufficient to allow complex developmental programs (Fig. 1). Histone H1 genes are located inside the core histone repeat between H2B and H3 genes and this

disposition and the overall organization of the histone gene cluster is conserved in all *Drosophila* species [35,41]. Each repeat contains all regulatory sequences to allow expression of each histone genes. Recent reports making use of a novel approach have shown that only twelve histone repeats are enough to recapitulate normal histone expression levels in flies suggesting that likely not all copies are functional [17,31]. Since with this promising technique engineered repeats can be tested, the contribution of the different domains and residues of every histone can be assayed in vivo. Thus, it has already been reported that histone supply regulates S phase timing and cell cycle progression in *Drosophila* and also the contribution of certain lysines to replication, viability and cellular identity [31].

While in *Drosophila virilis* three highly similar histone H1 variants have been described ( $\geq 95\%$  identity among them) they do not seem to be orthologs to the vertebrate variants. Indeed, in *D. virilis* the histone repeats are split into three different locations where the three histone H1 variants are located as multicopy genes, likely as a result of recombination/transposition during evolution [35] and, so far, they should be considered as point mutations. Therefore, it can be concluded that the presence of a single somatic histone H1 isoform appears as a common feature of *Drosophila* species.

Notably, despite the insertion of histone H1 gene into the histone repeats, regulation of histone H1 expression is rather independent of core histones. In fact, *Drosophila* histone H1 genes are TATA-less (at a difference to the main human histone H1 isoforms [32]) and use TRF2 (TBP-related factor 2) instead of TBP (TATA-binding protein) that it is used for the TATA box-containing core histone genes (Fig. 1) [22]. A robust presence of TRF2 is detected on histone H1 genes all along the cell cycle suggesting that histone H1 might be expressed and regulated differentially to core histones on which RNA pol II and TBP accumulated at the S phase [22]. Indeed, histone H1 is transcribed throughout S phase whereas core histones are only transcribed in a short but intense pulse during early S phase. Importantly, aside from using TBP and TFIIA, other components of the transcription machinery used for core-histones transcription appear to be different from the used for all other RNA pol II genes. Another important difference is in the mRNAs half-life that is much shorter for H1 transcripts than for core-histones transcripts [16]. Thus, expression of histone H1 and core histones, while it must be coordinated at certain point, it also looks like that it must be uncoupled, possibly in a developmental-specific and/or cell type-specific manner. On the other hand, histone expression must be tightly regulated because excess of histones results in cytotoxic effects via multiple mechanisms as shown in yeast [43]. In this respect, a recent report showed that overexpression of a fusion histone H1-GFP in flies using the UAS/GAL4 system is only limited. Moreover, it is compensated by a decrease in endogenous H1 expression so that about normal amounts of total H1 are obtained. Remarkably, ectopically expressed H1-GFP fusion protein incorporated to chromatin and no free H1-GFP could be detected. Altogether, these results suggest a tight control



**Fig. 1.** Genomic organization of *Drosophila melanogaster* histone genes on chromosomes 2 (somatic histones) and 3 (germline histone dBigH1, showing a small intron). For somatic histones the use of TBP/TRF2 is indicated, for germline dBigH1 is unknown.



of H1 protein levels [45]. Core histone expression out of S phase is restricted to the single gene core histone variants located away from the histone repeats in all species including flies [21]. Interestingly, a crosstalk between histone variants H2Av and H3.3 and replication-dependent core histones has been reported in flies. The absence of H2Av prevented cleavage/polyadenylation of core histones pre-mRNAs because U7 snRNP, which is involved in core histones pre-mRNA maturation, fails to accumulate at the histone locus [51]. As expression of all histones is balanced and is a feature of the differentiation state, similar crosstalk between all of them should be expected. Also, since in *Drosophila* no somatic histone H1 variants exist, it would be interesting to study if there is histone H1 transcription out of S phase and how a balanced expression of histone H1 with respect to core histones is achieved (Fig. 2).

*Drosophila* demonstrates that a single somatic histone H1 isoform is enough to allow the complex development of metazoans and that histone H1 is essential because even a partial depletion in the whole organism already causes strong lethality [27,44,50]. From an evolutionary point of view *Drosophila* is unique among metazoans and looks like a simplified situation because while unicellular eukaryotes like *Saccharomyces cerevisiae* and *Tetrahymena thermophila* contain a single histone H1 isoform, metazoans usually present several H1 isoforms. Thus, *Caenorhabditis elegans* has eight, *Xenopus laevis* has five, *Danio rerio* has four and, in plants, *Nicotiana tabacum* has six [23]. Since similar to all eukaryotes *Drosophila* also presents core histone variants, the question of whether histone H1 variants appeared later in evolution or whether *Drosophila* have lost them during evolution is still unclear.

### 3. Lesson 2: germline development requires dedicated H1 isoforms

While for a long time presumed to be missing, *Drosophila* also presents a histone H1 germline-specific isoform encoded in a single-copy gene (dBigH1, CG3509, Chr. III) [38]. Germline-specific H1s have been reported in most metazoan species analyzed to date from echinoderms, echiura, and *Drosophila* to zebrafish, frogs, and mammals. In many cases, oocyte and testis-specific variants have been described, and the oocyte variants usually persist during the first stages of embryo development. In the sea urchin, a specific Cs-H1 variant, which is synthesized during oogenesis and deposited in the mature egg, is detected in the early embryo during the first cleavage stages before being replaced by somatic H1s. Oocyte-

specific H1 variants that persist during early embryogenesis have been also identified in echiura (H1M), *Drosophila* (dBigH1), zebrafish (H1M), *Xenopus* (B4/H1M), and mammals (H1oo) (see [37] for a recent review). In general, oocyte H1 variants are detected in the early embryo until the zygotic genome is activated (ZGA). At ZGA, oocyte H1 histones are generally replaced by somatic H1 variants. In *Drosophila*, this replacement occurs in all cells except in the primordial germ cells (PGC), which retain dBigH1 [38]. Expression of testis specific histone H1 variants is much more complex and frequently several variants exist. In *Drosophila*, the oocyte and early embryo dBigH1 variant is also present in testis, where its expression is largely restricted to spermatocytes [38]. Again in *Drosophila*, a single germline specific histone H1 variant, dBigH1, is enough. This variant presents an overall H1-like structure composed of three domains. A central winged-helix domain (WHD) bears resemblance to the central globular domain of histones H1 and is presumably globular. dBigH1 C-terminal domain is less rich in lysines than the same domain for somatic histone H1. On the other hand, the C-terminal tail shows a relative enrichment of R versus K residues and is presumably unstructured similar to somatic histone H1 C-terminal domain. At a difference, the N-terminal domain is much longer and presents a highly acidic subdomain containing about 90 additional amino acids. Remarkably, dBigH1 sequence does not show a high similarity to somatic histone H1 but it is similar to dBigH1 of several other *Drosophila* species (Fig. 3). Interestingly, most of them share the track of acidic residues at the N-terminus but not all. This is also a feature observed in many germline-specific histone H1 variants up to vertebrates and a subject of high speculation in the field. Notably, *C. elegans* germline variant H1.1/HIS-24 constitutes an exception since, being also present in somatic tissues, has a structural organization resembling that of somatic H1 histones.

Unlike somatic histones H1, germline H1 variants are usually encoded by intron containing genes and their transcripts have long UTRs and are polyadenylated. In fact, dBigH1 usually presents a small intron in many *Drosophila* species (and two small ones in *Drosophila persimilis* and *Drosophila grimshawi*). In addition, *Drosophila* germline H1s genes are single copy genes located outside of the histone clusters, where somatic H1s are generally located.

In the embryo, dBigH1 presents a strong maternal effect because it is mainly transcribed in ovaries. However, zygotic transcription during the first 2 h after fertilization has been reported under certain mutant

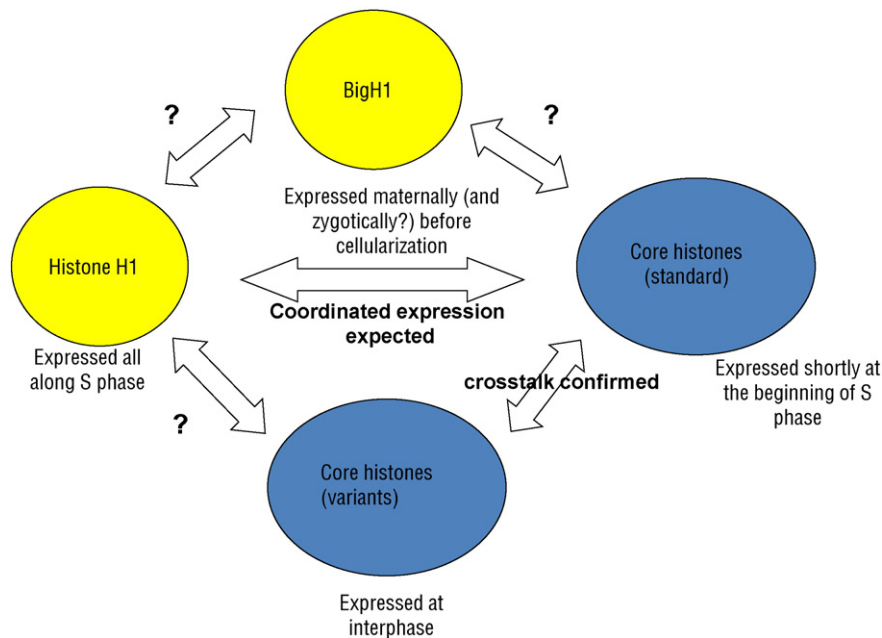


Fig. 2. Histone expression is balanced. Divided in four groups, histone transcription is indicated. Two-sense arrows indicate either known or likely expected coordinated expression between pairs.

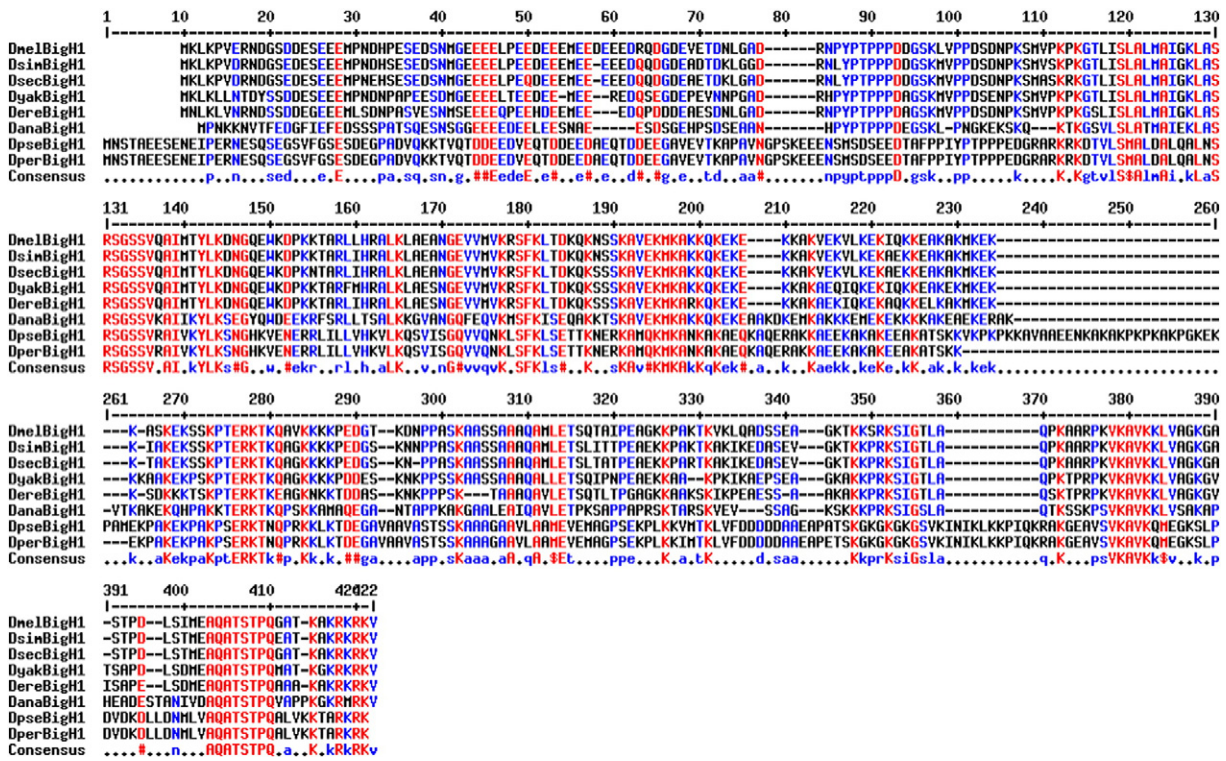


Fig. 3. Sequence alignment of dBigH1 ortholog proteins from several *Drosophila* species (see Fig. 5 for description of *Drosophila* species). Residues in red are highly conserved; residues in blue are moderately conserved; residues in black are not conserved.

conditions and the presence of elongating RNApol II has been detected on its promoter region in 0–2 h embryos [38]. Whether dBigH1 transcription is TBP or TRF2 dependent is unclear at present. However, dBigH1 promoter presents a consensus TATA box 17 bp upstream the TSS although no signal for TBP was reported in the modENCODE\_5022 ChIPseq performed using 0–8 h embryos. On the other hand, there is no data available for TRF2 on early embryos, only for *Drosophila* Schneider S2 cell line in which dBigH1 is not expressed [22].

dBigH1 regulates ZGA in *Drosophila*. Thus, the lack of dBigH1 results in activation of elongating RNA pol II and premature zygotic transcription of genes normally repressed in wild type embryos. Moreover, the lack of dBigH1 produces a prominent staining of  $\gamma$ H2Av (a bona fide marker for double strand DNA breakages (DSB)) and important mitotic defects [38].

Thus, *Drosophila* results seem to confirm that all metazoans will likely contain and need at least a germline histone H1 variant and provides a function for dBigH1 in specifically keeping genes silent prior to ZGA.

**4. Lesson 3: somatic histone H1 is required to silence heterochromatin**

The fact that somatic histone H1 is a unique isoform in *Drosophila* (although encoded by a multicopy gene) has simplified the study of histone H1 functions by allowing a general knockdown using the UAS-GAL4 system in combination with RNAi techniques. Using this approach several groups came to several important conclusions. Firstly, and contrary to the extended opinion that histone H1 was a general repressor, depletion of histone H1 does not lead to a general de-repression and to increased transcription. Instead, only few genes are up-regulated, mainly transposons, clearly suggesting that a primary function for H1 is on transposon silencing. Notably, up-regulated genes are usually silent genes preferentially located in heterochromatic regions [50] but, notably, some genes usually active in heterochromatic environments (like *concertina*, *light* and *rolled*) show down-regulation [27]. Moreover, histone H1 is essential for *Drosophila* because reduction of histone H1 content below a certain level is lethal for flies. Using tissue-specific conditions, histone H1

depletion has been shown to have a strong effect on the structure and alignment of salivary gland polytene chromosomes and on wing development [27,44,50]. Notably, similar phenotypes were also observed by the loss of function of the ISWI chromatin-remodeling factor that was proposed to regulate histone H1 association to salivary gland interphase chromosomes but not in replicating nuclei [44]. Also, histone H1 behaves as a suppressor of position effect variegation and is an essential component of pericentric heterochromatin. Histone H1 depletion was shown to affect the localization of HP1a and H3K9me2, two major markers of pericentric heterochromatin. In fact, while in wild type salivary gland polytene chromosomes HP1a and H3K9me2 accumulate at the chromocenter, a single spot where pericentric heterochromatin concentrates, in H1-depleted cells HP1a appears in two or more discrete and smaller spots in which H3K9me2 could not be detected anymore. Interestingly, HP1a and H3K9me2 protein levels increased in histone H1-depleted cells but their new distribution was not analyzed genomewide. HP1a was previously shown to specifically recognize H3K9me2. The lack of co-localization in histone H1-depleted conditions suggested that HP1a is deposited on polytene chromosomes by a mechanism not requiring H3K9 dimethylation [27]. Histone H3K9 dimethylation is carried out by lysine methyltransferase Su(var)3–9. Notably, Su(var)3–9 overexpression partially restores the reduced viability of flies caused by histone H1 depletion and Su(var)3–9 mutation enhances lethality caused by moderate histone H1 depletion. Moreover, since histone H1 directly interacts with both HP1a and Su(var)3–9 in *D. melanogaster*, it has been proposed that histone H1 can specifically recruit Su(var)3–9 to chromatin where it will methylate lysine 9 of histone H3 [28]. While by this mechanism the formation of heterochromatin might be explained it should be reminded that histone H1 is near ubiquitous in the genome while not all genome is heterochromatic. Since a higher abundance of histone H1 in heterochromatin has been reported [15,24,52] it was suggested that heterochromatin formation would be histone H1 concentration-dependent [28]. At this respect, a recent genome-wide analysis in *Drosophila* S2 cells confirmed that H1 preferentially accumulates at silent and heterochromatic regions. A reciprocal binding of

histone H1 and the architectural protein HMGD1 was shown, HMGD1 concentrating close to HS (DNase I hypersensitive sites, regions of open chromatin) and H1 concentrating far away from them, although both proteins can be found everywhere [36].

Recently, STAT92E (the only STAT protein in *Drosophila*) has been reported to interact directly and extensively with histone H1 and to be involved in the establishment or maintenance of a certain kind of heterochromatin structure independent of the H3K9 methylation by Su(var)3–9. Histone H1 appears to recruit STAT92E because histone H1 depletion causes the chromosomal loss of STAT92E, while neither depletion nor hyperactivation of STAT92E have any effect on histone H1 localization [55]. This study suggested the existence of at least two pathways of heterochromatin formation (Fig. 4), one involving HP1a and Su(var)3–9 and the other involving STAT92E and HP1a. The authors propose histone H1 to direct heterochromatin formation in both of them through direct interactions with HP1a, STAT92E and Su(var)3–9 [55]. However, it is still unclear what finally dictates heterochromatin formation at certain regions but not everywhere in the genome and how are the two pathways selected.

Histone H1 association to chromatin is highly dynamic in *Drosophila*, with half of the H1 undergoing exchange within 50 s, slightly faster than in mammalian cells that is in the few minutes range [34,44]. Similar to core histones, H1 dynamics in chromatin has been shown to rely on the use chaperones and remodeling complexes. Thus, histone H1 is expected to be assembled and removed in a controlled way. A candidate to carry out the job might be the ATP-dependent chromatin-remodeling factor ISWI. Expression of a negative dominant form of ISWI results in a dramatic alteration in higher-order chromatin structure affecting decondensation of both mitotic and polytenic chromosomes and causing a significant reduction in the level of the histone H1 associated to chromatin in vivo without causing defects in nucleosome assembly [9]. Another experimental evidence links histone H1 dynamics to the chromatin remodeler CHD1. Loss of CHD1, an ATP-dependent chromatin remodeler, results in alterations of global chromosome structure and in an increase of HP1a. Overexpression of CHD1 decreases HP1a levels and disrupt higher

order chromatin structure while overexpression of an ATPase inactive mutant does not suggesting that the action is through chromatin remodeling [7]. The connection to histone H1 has been recently suggested by a genetic screen performed to obtain modifiers of the lethal phenotype of histone H1 depletion in *Drosophila*. Among other miss-expression alleles, CHD1 was shown to strongly suppress the reduced viability phenotype. It was also shown that histone H1 and CHD1 have common transcriptional regulatory programs in vivo [25]. Altogether, while these results are showing interesting correlations it is unclear at present if they represent a direct effect.

In mammals a similar picture is emerging but the presence of several isoforms makes it more complex. Thus, the interaction between HP1 $\alpha$  and histone H1.4 has been shown to take place through methylated K26 of histone H1.4 and be blocked by the simultaneous phosphorylation of S27 by Aurora B. [8,10,20]. HP1 $\alpha$  was recently shown to interact also with histone H1.2 [8], which is enriched in lamina-associated chromatin domains, that correlate with gene repression, and intergenic regions [33]. Furthermore, the phosphatase PTEN, a tumor suppressor, was found to regulate chromatin condensation. PTEN was shown to interact with histone H1 and to be required for the correct binding of the H1-HP1 $\alpha$  complex to chromatin and for its maintenance. While the mechanism of action is not known yet, intriguingly, phosphatase activity was dispensable [8].

Altogether, the work in *Drosophila* has contributed decisively to the current view that histone H1 plays an important role on heterochromatin formation and/or maintenance, and that it is crucial for transposon silencing.

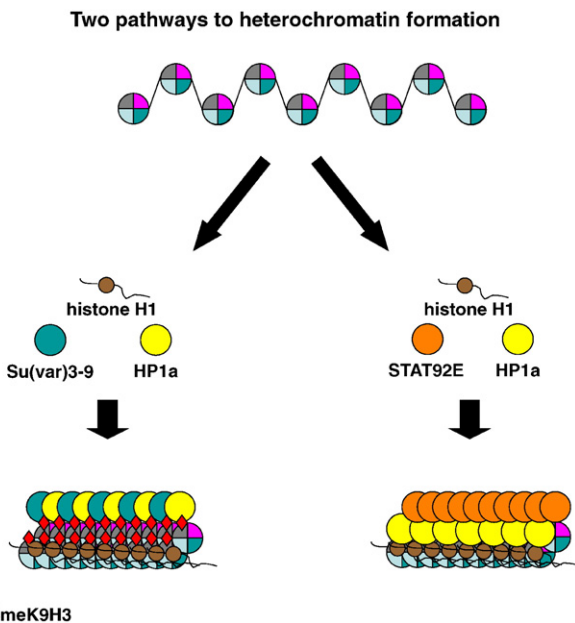
#### 5. Lesson 4: H1 and genome stability

Experiments carrying out depletion of histone H1 have revealed strong defects on polytene chromosomes and on heterochromatin as indicated above. A deeper analysis has shown that reduction in histone H1 content results in strongly atrophic wings in the adult. Notably, this phenotype can be partially rescued by ectopic expression of several human histone H1 isoforms in the fly and also by blocking apoptosis. Moreover, H1 depletion resulted in the appearance of extrachromosomal circular DNA molecules containing rDNA, a feature that is also observed in Su(var)3–9 loss-of-function mutants and that is a direct indication of genome instability. In addition, H1 depletion resulted in an increased  $\gamma$ H2Av staining suggesting DNA damage [50]. These results indicate that H1 somehow prevents DNA damage and contributes to the genome stability. Interestingly, a similar result was reported for the null mutation of *S. cerevisiae* histone H1 (HHO1, encoded in the *Hho1* gene) because, as in other unicellular eukaryotes, histone H1 is not essential in yeast [39,42,48]. *S. cerevisiae* histone H1 is rather peculiar in structure as it shows two globular central domains instead of the one observed for all metazoans H1 histones. But also its abundance, estimated between one molecule every four nucleosomes to one every 37 depending on the studies, is clearly lower than in metazoans [11,14]. While it is present all across the genome a preferential binding to rDNA has been reported. However, HHO1 does not contribute to repress rDNA transcription but its deletion induces a hyperrecombination phenotype at the rDNA locus [11,26]. A much higher chromatin enrichment of HHO1 has been observed during sporulation, a process in which it has been proposed to play a dual role as contributing to spore genome compaction and by facilitating the onset of meiosis [6].

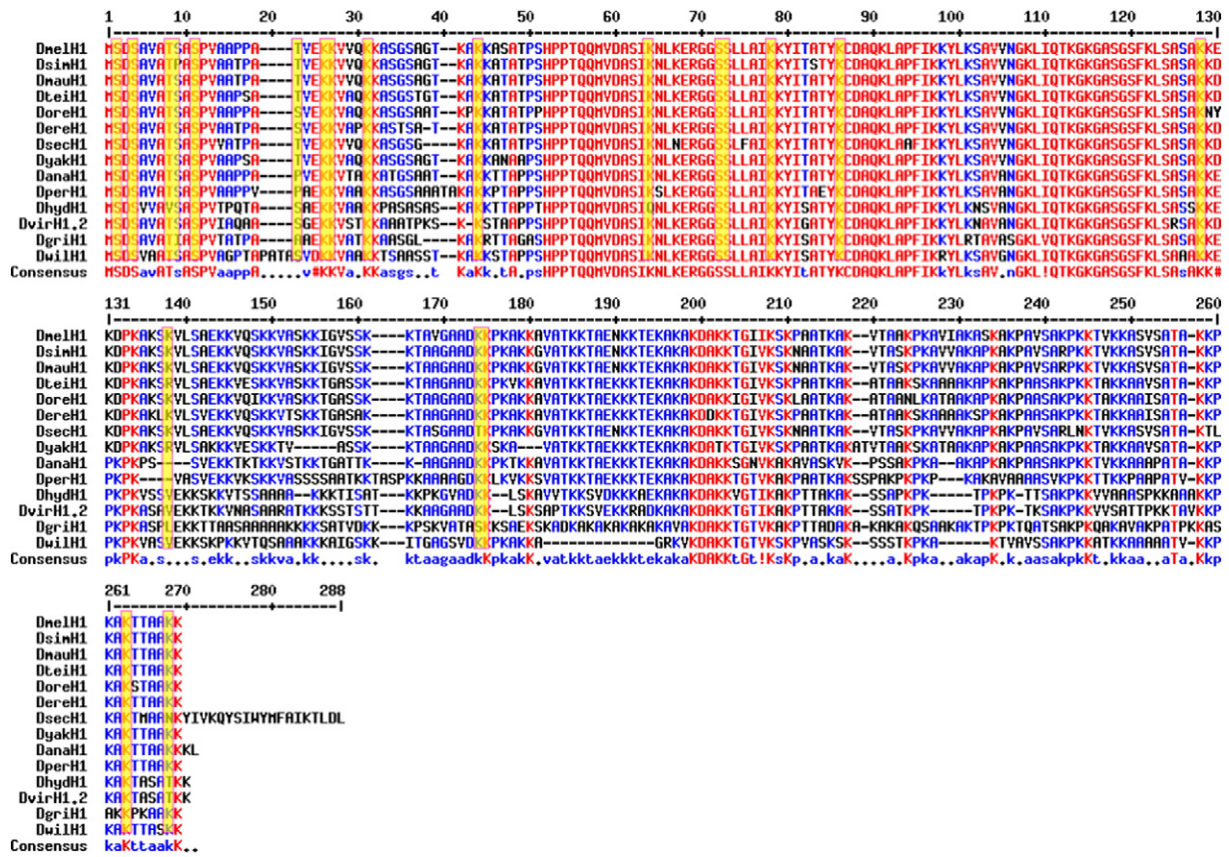
While the precise mechanisms that histone H1 uses to prevent genome instability are still unknown, further work in flies is expected to provide an appropriate explanation in the coming years.

#### 6. Lesson 5: Histone H1 is heavily modified

*Drosophila* core histones present many posttranslational modifications (PTMs) and several of them have assigned roles similarly as for many other eukaryotes. For linker histone H1 much less is known and



**Fig. 4.** Scheme of the two pathways to heterochromatin assembly proposed in *Drosophila*. Heterochromatin is assembled by histone H1 recruitment of Su(var)3–9 which in turn methylates histone H3 K9 and helps recruiting HP1a through interaction with 2,3meK9H3 and histone H1 (left) or through recruitment of HP1a by the action of STAT92E and then interaction with histone H1 (right). Nucleosome cores are depicted as 4-color circles (for histones H3, H4, H2A and H2B, where H3 is indicated in gray). Red diamonds indicate di-,tri-methylation of H3K9 introduced by Su(var)3–9 lysine methyltransferase activity (see text).



**Fig. 5.** Histone H1 PTMs take place on highly conserved residues in *Drosophila* species. Sequence alignment of histone H1 ortholog proteins from several *Drosophila* species with indication of residues posttranslationally modified (yellow boxes) as reported in S2 cell line [4]. *Dmel*: *D. melanogaster*; *Dsim*: *D. simulans*; *Dtei*: *D. teissieri*; *Dmau*: *D. mauritiana*; *Dore*: *D. oreana*; *Dere*: *D. erecta*; *Dsec*: *D. sechelia*; *Dyak*: *D. yakuba*; *Dana*: *D. ananassae*; *Dper*: *D. persimilis*; *Dhyd*: *D. hydei*; *Dvir*: *D. virilis*; *Dgr*: *D. grimshawi*; *Dwil*: *D. willinstonii*. Residues color code as for Fig. 3.

essentially no information on their role is available yet. A comprehensive study in mouse and human cells showed histone H1 variants to be rich in PTMs as well [53]. In *Drosophila* a systematic study performed with histone H1 from S2 cells revealed many PTMs including mono- and di-methylation, acetylation, phosphorylation, and ubiquitination [4]. Interestingly, most of them concentrate on the N-terminal and globular domains although a few were mapped to the C-terminal domain as well. Also remarkable is the high degree of conservation of the residues affected by PTMs in *Drosophila* species (Fig. 5). While characterization of all of them is still pending, dimethylation of K27 appeared to be particularly interesting because of its cell-cycle dependent behavior with a strong accumulation at G2/M. Notably, this residue appears to be highly conserved in somatic human histone isoforms H1.1 to H1.5. Moreover, it has been shown to be also dimethylated in H1.3 and H1.4 and acetylated in all of them [53]. On the other hand, mammalian histone H1 variants are highly phosphorylated during mitosis [47]. In *Drosophila* embryos major histone H1 phosphorylation takes place at Ser10 and it was reported to decrease as fly embryos progress from 0 to 12 h suggesting that it could be related to differentiation and/or cell cycle progression [49]. A recent study, however, showed that overexpression of either a H1S10A mutant or a H1S10E imitating phosphorylated serine has no effect on chromatin compaction and polytene chromosome structure and banding. Only a subtle effect on polytene chromosome size and DNA content was observed suggesting a potential effect on endoreplication [45]. *Drosophila* histone H1 is not heavily phosphorylated in embryos [49], but since several other phosphorylation sites for H1 were described in S2 cells it is still possible that phosphorylation could regulate histone H1 functions during mitosis [4]. Since *Drosophila* has no somatic histone H1 isoforms, it is tempting to speculate that PTMs might contribute to define and/or refine specific roles for *Drosophila* histone H1 as isoforms seem to specify for vertebrate H1 histones. This goal can

now be directly addressed using the new and powerful genetic tools recently developed in *Drosophila* [31].

In summary, as a model organism *Drosophila* has provided highly relevant information about features, properties, and functions of histone H1 genes and proteins. In a short future, many more lessons are expected from its continued study that will have a strong impact on the way we understand linker histones not only in flies but also in all other eukaryotes.

**Acknowledgements**

We apologize to colleagues whose work could not be cited here due to space limitations. Work in the authors' laboratory is supported by grants from MINECO (BFU2012-30724) and the Generalitat de Catalunya (SGR2014-204).

**References**

- [1] J. Allan, P.G. Hartman, C. Crane-Robinson, F.X. Avilés, The structure of histone H1 and its location in chromatin, *Nature* 288 (1980) 675–679.
- [2] W. An, S.H. Leuba, K. van Holde, J. Zlatanova, Linker histone protects linker DNA on only one side of the core particle and in a sequence-dependent manner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 3396–3401.
- [3] A. Basset, S.W. Cooper, C. Wu, A. Travers, The folding and unfolding of eukaryotic chromatin, *Curr. Op. Genet. Dev.* 19 (2009) 159–165.
- [4] C. Bonet-Costa, M. Vilaseca, C. Diema, O. Vujatovic, A. Vaquero, N. Omeñaca, L. Castejón, J. Bernués, E. Giralt, F. Azorin, Combined bottom-up and top-down mass spectrometry analyses of the pattern of post-translational modifications of *Drosophila melanogaster* linker histone H1, *J. Proteomics*. 75 (2012) 4124–4138.
- [5] D.T. Brown, T. Izard, T. Misteli, Mapping the interaction surface of linker histone H1(0) with the nucleosome of native chromatin in vivo, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13 (2006) 250–255.
- [6] J.M. Bryant, J. Govin, L. Zhang, G. Donahue, B.F. Pugh, S.L. Berger, The linker histone plays a dual role during gametogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 32 (2012) 2771–2783.

- [7] L. Bugga, I.E. McDaniel, L. Engie, J.A. Armstrong, The *Drosophila melanogaster* CHD1 chromatin remodeling factor modulates global chromosome structure and counteracts HP1a and H3K9me2, *PLoS One* 8 (2013), e59496.
- [8] Z.H. Chen, J.Y. Zhu, H. Liang, J. He, S. He, P. Wang, X. Kang, M.A. McNutt, Y. Yin, W.H. Shen, PTEN interacts with histone H1 and controls chromatin condensation, *Cell Rep.* 8 (2014) 2003–2014.
- [9] D.F.V. Corona, G. Siriaco, J.A. Armstrong, N. Snarskaya, S.A. McClymont, M.P. Scott, J.W. Tamkun, ISWI regulates higher-order chromatin structure and histone H1 assembly in vivo, *PLoS Biol.* 5 (2007) 2011–2021.
- [10] S. Daujat, U. Zeissler, T. Waldmann, N. Happel, R. Schneider, HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 38090–38095.
- [11] J.A. Downs, E. Kosmidou, A. Morgan, S.P. Jackson, Suppression of homologous recombination by the *Saccharomyces cerevisiae* linker histone, *Mol. Cell* 11 (2003) 1685–1692.
- [12] Y. Fan, T. Nikitina, J. Zhao, T.J. Fleury, R. Bhattacharyya, E.E. Bouhassira, A. Steina, C.L. Woodcock, A.I. Skoultchi, Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation, *Cell* 123 (2005) 1199–1212.
- [13] Y. Fan, A. Sirotkin, R.G. Russell, J. Ayala, A.I. Skoultchi, Individual somatic H1 subtypes are dispensable for mouse development even in mice lacking the H1(0) subtype, *Mol. Cell Biol.* 21 (2001) 7933–7943.
- [14] I. Freidkin, D.J. Katcoff, Specific distribution of the *Saccharomyces cerevisiae* linker histone homolog HHO1p in the chromatin, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 4043–4051.
- [15] S.A. Grigoryev, K.S. Spirin, I.A. Krashennnikov, Loosened nucleosome linker folding in transcriptionally active chromatin of chicken embryo erythrocyte nuclei, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 7397–7406.
- [16] B. Gugliemi, N. La Rochelle, R. Tjian, Gene-specific transcriptional mechanisms at the histone gene cluster revealed by single-cell imaging, *Mol. Cell* 51 (2013) 480–492.
- [17] U. Günesdogan, H. Jäckle, A. Herzig, A genetic system to assess in vivo the functions of histones and histone modifications in higher eukaryotes, *EMBO Rep.* 11 (2010) 772–776.
- [18] N. Happel, D. Doenecke, Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function, *Gene* 431 (2009) 1–12.
- [19] H. Hashimoto, Y. Takami, E. Sonoda, T. Iwasaki, H. Iwano, M. Tachibana, S. Takeda, T. Nakayama, H. Kimura, Y. Shinkai, Histone H1 null vertebrate cells exhibit altered nucleosome architecture, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 3533–3545.
- [20] S.P. Hergeth, M. Dunder, P. Tropberger, B.M. Zee, B.A. Garcia, S. Daujat, R. Schneider, Isoform-specific phosphorylation of human linker histone H1.4 in mitosis by the kinase Aurora B, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 1623–1628.
- [21] B. Horard, B. Loppin, Histone storage and deposition in the early *Drosophila* embryo, *Chromosoma* 124 (2015) 163–175.
- [22] Y. Isogai, S. Keles, M. Prestel, A. Hocheimer, R. Tjian, Transcription of histone gene cluster by differential core-promoters factors, *Genes Dev.* 21 (2007) 2936–2949.
- [23] A. Izzo, K. Kamieniarz, R. Schneider, The histone H1 family: specific members, specific functions? *Biol Chemistry* 389 (2008) 333–343.
- [24] R.T. Kamakaka, J.O. Thomas, Chromatin structure of transcriptionally competent and repressed genes, *EMBO J.* 9 (1990) 3997–4006.
- [25] H. Kavi, X. Lu, N. Xu, B.A. Bartholdy, E. Vershilova, A.I. Skoultchi, D.V. Fyodorov, A genetic screen and transcript profiling reveal a shared regulatory program for *Drosophila* linker histone H1 and chromatin remodeler CHD1, *Genes Genom. Genet.* 5 (2015) 677–687.
- [26] C. Li, J.E. Mueller, M. Elfline, M. Bryk, Linker histone H1 represses recombination at the ribosomal DNA locus in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Microbiol.* 67 (2008) 906–919.
- [27] X. Lu, S.N. Wontakal, A.V. Emelyanov, P. Morcillo, A.Y. Kovev, D.V. Fyodorov, A.I. Skoultchi, Linker histone H1 is essential for *Drosophila* development, the establishment of pericentric heterochromatin, and a normal polytene chromosome structure, *Genes Dev.* 23 (2009) 452–465.
- [28] X. Lu, S.N. Wontakal, H. Kavi, B.J. Kim, P.M. Guzzardo, A.V. Emelyanov, N. Xu, G.J. Hannon, J. Zavadil, D.V. Fyodorov, A.I. Skoultchi, *Drosophila* H1 regulates the genetic activity of heterochromatin by recruitment of Su(var)3–9, *Science* 340 (2013) 78–81.
- [29] K. Luger, A.W. Mäder, R.K. Richmond, D.F. Sargent, T.J. Richmond, Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution, *Nature* 389 (1997) 251–260.
- [30] R. Mayor, A. Izquierdo-Bouldstridge, L. Millán-Ariño, A. Bustillos, C. Sampaio, A. Luque, A. Jordan, Genome distribution of replication-independent histone H1 variants shows H1.0 associated with nucleolar domains and H1X associated with RNA polymerase II-enriched regions, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 7474–7491.
- [31] D.J. McKay, S. Klusza, T.J.R. Penke, M.P. Meers, K.P. Curry, S.L. McDaniel, P.Y. Malek, S.W. Cooper, D.C. Tatomer, J.D. Lieb, B.D. Strahl, R.J. Duronio, A.G. Matera, Interrogating the function of metazoan histones using engineered gene clusters, *Dev. Cell* 32 (2015) 373–386.
- [32] T. Meergans, W. Allbig, D. Doenecke, Conserved sequence elements in human main type-*H1* histone gene promoters: their role in *H1* gene expression, *Eur. J. Biochem.* 256 (1998) 436–446.
- [33] L. Millán-Ariño, A.B. Islam, A. Izquierdo-Bouldstridge, R. Mayor, J.M. Terme, N. Luque, M. Sancho, N. López-Bigas, A. Jordan, Mapping of six somatic linker histone H1 variants in human breast cancer cells uncovers specific features of H1.2, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 4474–4493.
- [34] T. Misteli, A. Gunjan, R. Hock, M. Bustin, D.T. Brown, Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells, *Nature* 408 (2000) 877–881.
- [35] S. Nagel, U. Grossbach, Histone H1 genes and histone gene clusters in the genus *Drosophila*, *J. Mol. Evol.* 51 (2000) 286–298.
- [36] N. Nalabothula, G. McVicker, J. Maiorano, R. Martin, J.K. Pritchard, Y.N. Fondufe-Mittendorf, The chromatin architectural proteins HMGD1 and H1 bind reciprocally and have opposite effects on chromatin structure and gene regulation, *BMC Genomics* 15 (2014) 92.
- [37] S. Pérez-Montero, A. Carbonell, F. Azorín, Germline-specific H1 variants: the “sexy” linker histones, *Chromosoma* Ahead of Print, 2015.
- [38] S. Pérez-Montero, A. Carbonell, T. Morán, A. Vaquero, F. Azorín, The embryonic linker histone H1 variant of *Drosophila*, dBigH1, regulates zygotic genome activation, *Dev. Cell* 26 (2013) 578–590.
- [39] A. Ramon, M.I. Muro-Pastor, C. Scazzocchio, R. Gonzalez, Deletion of the unique gene encoding typical histone H1 has no apparent phenotype in *Aspergillus nidulans*, *Mol. Microbiol.* 35 (2000) 223–233.
- [40] P.J.J. Robinson, D. Rhodes, Structure of the ‘30 nm’ chromatin fibre: a key role for the linker histone, *Curr. Op. Struct. Biol.* 16 (2006) 336–343.
- [41] Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G., and al., e. (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 797–813.
- [42] X. Shen, M.A. Gorovsky, Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription in vivo, *Cell* 86 (1996) 475–483.
- [43] R.K. Singh, D. Liang, U.R. Gajjalaihvan, M.-H.M. Kabbaj, J. Paik, A. Gunjan, Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms, *Cell Cycle* 9 (2010) 4236–4244.
- [44] G. Siriaco, R. Deuring, M. Chioda, P.B. Becker, J.W. Tamkun, *Drosophila* ISWI regulates the association of histone H1 with interphase chromosomes in vivo, *Genetics* 182 (2009) 661–669.
- [45] G. Siriaco, R. Deuring, G.D. Mawla, J.W. Tamkun, A novel approach for studying histone H1 function in vivo, *Genetics* 200 (2015) 29–33.
- [46] A.M. Sirotkin, W. Edelmann, G. Cheng, A. Klein-Szanto, R. Kucherlapati, A.I. Skoultchi, Mice develop normally without the H1(0) linker histone, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 6434–6438.
- [47] H. Talasz, W. Helliger, B. Puschendorf, H. Lindner, In vivo phosphorylation of histone H1 variants during the cell cycle, *Biochemistry* 35 (1996) 1761–1767.
- [48] S.C. Ushinsky, H. Bussey, A.A. Ahmed, Y. Wang, J. Friesen, B.A. Williams, R.K. Storms, Histone H1 in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 13 (1997) 151–161.
- [49] A. Villar-Garea, A. Imhof, Fine mapping of posttranslational modifications of the linker histone H1 from *Drosophila melanogaster*, *PLoS One* 3 (2008) 1–12 e1553.
- [50] O. Vujatovic, K. Zaragoza, A. Vaquero, O. Reina, J. Bernués, F. Azorín, *Drosophila melanogaster* linker histone dH1 is required for transposon silencing and to preserve genome integrity, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 5402–5414.
- [51] E.J. Wagner, B.D. Burch, A.C. Godfrey, H.R. Salzer, R.J. Duronio, W.F. Marzluff, A genome-wide RNA interference screen reveals that variant histones are necessary for replication-dependent histone pre-mRNA processing, *Mol. Cell* 28 (2007) 692–699.
- [52] H. Weintraub, Histone-H1-dependent chromatin superstructures and the suppression of gene activity, *Cell* 38 (1984) 17–27.
- [53] J.R. Wisniewski, A. Zougman, S. Krüger, M. Mann, Mass spectrometric mapping of linker histone H1 variants reveals multiple acetylations, methylations, and phosphorylations as well as differences between cell culture and tissue, *Mol. Cell Proteomics* 6 (2007) 72–87.
- [54] J.M. Wong, Q. Li, B.Z. Levi, Y.B. Shi, A.P. Wolffe, Structural and functional features of a specific nucleosome containing a recognition element for the thyroid hormone receptor, *EMBO J.* 16 (1997) 7130–7145.
- [55] N. Xu, A.V. Emelyanov, D.V. Fyodorov, A.I. Skoultchi, *Drosophila* linker histone H1 coordinates STAT-dependent organization of heterochromatin and suppresses tumorigenesis caused by hyperactive JAK-STAT signaling, *Epigenetics Chromatin* 7 (2014) 16.
- [56] Y. Zhang, M. Cooke, S. Panjwani, K. Cao, B. Krauth, P.-Y. Ho, M. Medrzycki, D.T. Berhe, C.G. Pan, T.C. McDevitt, Y. Fan, Histone H1 depletion impairs embryonic stem cell differentiation, *PLoS Genet.* 8 (2012) e1002691.
- [57] B.-R. Zhou, H. Feng, H. Kato, L. Dai, Y. Yang, T. Zhou, Y. Bai, Structural insights into the histone H1-nucleosome complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 19390–19395.
- [58] B.-R. Zhou, J. Jiang, H. Feng, R. Ghirlando, T.S. Xiao, Y. Bai, Structural mechanisms of nucleosome recognition by linker histones, *Mol. Cell* 59 (2015) 628–638.
- [59] Y.-B. Zhou, S.E. Gerchman, V. Ramakrishnan, A. Travers, S. Muyldermans, Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome, *Nature* 395 (1998) 402–405.





