

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

TESI DOCTORAL

**Cid, la variant centromèrica de la histona H3 de *Drosophila*:
mecanismes de deposició i anàlisi funcional**

Olga Moreno Moreno

Desembre de 2006

Programa de Bioquímica i Biologia Molecular (Opció A)

**Cid, la variant centromèrica de la histona H3 de *Drosophila*:
mecanismes de deposició i anàlisi funcional**

Memòria presentada per Olga Moreno Moreno per aspirar al grau de Doctora en Bioquímica. Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del Dr. Ferran Azorín Marín al Departament de Biologia Molecular i Cel·lular de l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC).

Vist i plau del director:

Vist i plau de la tutora:

Dr. Ferran Azorín Marín

Dra. M^a Carmen Martínez

AGRAÏMENTS

Res és etern en aquesta vida però va arribar un moment en què vaig pensar que aquesta tesi seria l' excepció. Afortunadament, després de tants anys, en els que he passat períodes de tots colors, això ha arribat a la seva fi. És doncs el moment de fer memòria de tota la gent que ha anat passant Com que no ha sigut pas poca, d'entrada vull demanar disculpes per si m'oblido a algú.

En primer lloc voldria donar-li les gràcies a en Ferran, el meu director de tesi, per haver confiat en mi i haver-me donat la oportunitat de poder fer el que m'agrada: treballar en el món científic.

En segon lloc vull donar-li les gràcies al Xavi Marsellach, a la Lorena, a l'Ester Valls i a la Sara Sánchez per ser més que companys de feina, per ser els meus amics. A en Xavi, company de laboratori al 514 i ara d'U al PBA3, vull donar-li les gràcies per ser com és i estar sempre disposat a ajudar. A la Lorena, gràcies per ser la meva confident. A l'Ester, gràcies per haver-me acollit al teu pis quan sortíem de festa i haver compartit tantes estones lliures al CID. A la Sara, gràcies per fer dels dinars una estona tan divertida. I, com no: gràcies a la Naiara, la Conchi i la Marta "Orxeta", les noves incorporacions a l'hora de dinar, per totes les converses i rialles compartides.

Gràcies a tots aquells que em van ajudar als meus inicis i que ja no són al laboratori: a l'Iván, a la Sílvia Canudas, a la Sara Pagans i a l'Ana Kosoy (mai oblidaré que em vas acollir a casa teva aquell dia que Terrassa va quedar incomunicada per la neu).

També haig de donar les gràcies a tots els postdocs i jefes del laboratori. En especial vull donar-li les gràcies a la Dori, per haver-me contagiats la il·lusió per la investigació durant les meves pràctiques al laboratori, i a la Mònica, per ser la meva companya de batalles amb Cid. Gràcies al Carles per haver-me ajudat en tantíssimes ocasions i per haver-me alegrat tantes estones al 519 amb la seva música. Gràcies a la Lluïsa, per tots els protocols que m'ha passat, per tots el cafès que hem compartit, per tenir sempre un somriure a la cara.... A l'Antonio, per ser tan bon mestre. Al Jordi, a la Marian, al Josep, al Clément, a l'Àlex i a l'Elena per aportar tantes idees durant els seminaris.

No vull oblidar-me de les tècniques perquè sense elles aquesta feina encara seria més difícil. En especial gràcies a la Gemma i l'Alicia (no us imagineu com us vaig enyorar quan estava a Alemanya), i a l'Esther Fuentes (gràcies per haver-me ajudat a ampliar els estocs de

mosques). Gràcies a la Maite, per esperar sempre a que li portés “el niño” abans de tancar l'autoclau. Sense ella no hagués estat tan divertit arribar d'hora al CID. Gràcies a la Jenny per tota l'ajuda que ens va proporcionar amb les columnes d'HPLC. Com li vam fer patir amb la pressió!!! Gràcies a la Lúdia Bardia en general per la seva ajuda amb els microscopis i, en concret, per la seva ajuda amb els *time-lapse*.

I per descomptat haig de donar les gràcies a tota la resta de la gran família del PBA3: al Marc, a la Marta Rojas, al Joan, al Xavi Aran (quants viatges Terrassa-Barcelona vam arribar a compartir????!!! Gràcies), a la Noemí, al David, a la Marta Blanch, a la Bet (l'explicació que em vas donar per reconèixer els cervells de les larves no l'oblidaré mai!!!), a la Sílvia Pérez i a la Marta Batlle. Tots en un moment o altra m'heu fet un favor: m'heu tret una transferència, m'heu fet la foto d'un gel, m'heu passat cèl·lules.... Gràcies a tots per ser tan bons companys de laboratori. Qui no estaria content de treballar amb gent així?

Gràcies a tota la gent del departament amb que he compartit aquests anys. Als que ja han marxat: a la Sílvia Villamarín, a la Sílvia Marín, a la Sylvia, a la Sonia Trigueros, a la Sonia Gil, a la Natalia i a la Raquel Torras. A en Benjamí i al David “levadura”. Als cristal·lògrafs: a l'Eva, al Xavi Carpena, al Dani, a la Raquel i l'Àlex. Als “mosques”: al Jordi Casanovas, al Nico, al Marc, a la Marta Ll., a la Carol, a la Gemma, al Jose, a la Carlota i a la Raquel. Al Sergi, al Nacho, a la Iria, al Jordi C., a la Lúdia, al Roberto, a la Flora, al Nicolai... I, també als companys al PCB: al Carlos, a la Georgina, a l'Héctor...

Per la gent de fóra d'aquest peculiar món científic és molt difícil entendre el tipus de vida que portem. És per això que qui més es mereix aquests agraïments és la meva família. Gràcies a les meves germanes i al meu cunyat Jordi per haver-me donat el seu suport durant tot aquest temps. A les meves nebodes, Laia i Anna, dues preciositats que contagien d'alegria a tot aquell que les envolta. I, sobretot, gràcies als meus pares per haver-ho donat tot en aquesta vida per la seva família. Sense ells jo no hagués pogut arribar fins aquí.

I, per últim, però no per això la persona menys important per a mi, gràcies a en Javi. Vas arribar a la meva vida en un moment crucial per lo que respecta a aquesta tesi. Ets la única persona que sap com ho he passat realment durant tot aquest temps. Gràcies per haver-me aguantat. Sense el teu suport, la teva confiança en mi i els teus ànims no sé si hagués tingut forces suficients per arribar al final. T'haig de donar les gràcies per moltes més coses però no ho faré ara per dos raons: perquè no és el lloc adequat per fer-ho i perquè ja et pots imaginar com estic mentre escric això.

Als meus pares,

a en Javi

I.- ÍNDEX

ÍNDEX DE MATÈRIES

I.- ÍNDEX	1
ÍNDEX DE MATÈRIES	3
ÍNDEX DE FIGURES	9
ABREVIATURES	13
II.- INTRODUCCIÓ	15
1.- EL CENTRÒMER	17
1.1.- Els diferents tipus de centròmers	17
1.1.1.- El cromosoma holocèntric de <i>Caenorhabditis elegans</i>	17
1.1.2.- El centròmer puntual de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
1.1.3.- Els centròmers regionals	19
1.2.- La cromatina centromèrica	21
1.3.- Identitat centromèrica i epigenètica	24
2.- LES VARIANTS CENTROMÈRIQUES DE LA HISTONA H3	29
2.1.- Estructura de les variants centromèriques de la histona H3 (CenH3)	30
2.1.1.- El domini HFD és el responsable de la localització centromèrica	31
2.1.2.- Quina és la funció de l'extrem amino-terminal?	32
2.2.- CenH3 substitueix a la histona H3 als nucleosomes centromèrics?	33
2.2.1.- Evidències experimentals de l'existència de nucleosomes que contenen CenH3	33
2.2.2.- Estructura d'un possible nucleosoma amb CenH3	35
2.3.- Deposició de CenH3 a la regió centromèrica	35
2.3.1.- La deposició de CenH3 és independent de replicació	37
2.3.2.- La deposició de CenH3 requereix la funció d'altres proteïnes	40
2.4.- Modificacions post-traduccionals	43
III.- OBJECTIUS	47

IV.- MATERIALS I MÈTODES	51
1.- MATERIALS	53
1.1.- Soques i línies cel·lulars	53
1.1.1.- Soques bacterianes d' <i>Eschericia coli</i>	53
1.1.2.- Línies cel·lulars eucariotes: cèl·lules Kc de <i>Drosophila melanogaster</i>	53
1.2.- DNAs plasmídics utilitzats en aquest treball	53
1.2.1.- Vectors de clonatge	54
1.2.2.- Vectors d'expressió a <i>Eschericia coli</i>	56
1.2.3.- Vectors d'expressió a Kc	57
1.3.- Oligonucleòtids	60
2.- MÈTODES	61
2.1.- MÈTODES DE MANIPULACIÓ DE DNA	61
2.1.1.- Mètodes d'obtenció de DNA	61
2.1.1.1.- Minipreparacions de DNA	61
2.1.1.2.- Maxipreparacions de DNA	61
2.1.2.- Transformació de DNA en bacteris	61
2.2.- TÈCNIQUES DE RNA	62
2.2.1.- Extracció de RNA	62
2.2.2.- RT-PCR	62
2.3.- TÈCNIQUES BÀSIQUES PER A L'ESTUDI DE PROTEÏNES	63
2.3.1.- Expressió i purificació de proteïnes solubles fusionades a una cua d'histidines	63
2.3.2.- Expressió i purificació de proteïnes fusionades a GST	66
2.3.3.- Electroforesis de proteïnes en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	69
2.3.4.- <i>Western blot</i>	70
2.4.- ASSAIG D'INTERACCIÓ PROTEÏNA-PROTEÏNA IN VITRO: GST-PULLDOWN	70
2.4.1.- Transcripció-traducció <i>in vitro</i> en lisats de reticulòcits	71
2.4.2.- Unió de les proteïnes fusionades a GST amb la Glutatió Sefarosa	72
2.4.3.- Assaig GST-pulldown	73

2.5.- OBTENCIÓ I PURIFICACIÓ D'ANTICOSSOS	74
2.5.1.- Obtenció d'anticossos policlonals	74
2.5.2.- Purificació d'anticossos per afinitat	76
2.6.- MÈTODES DE TREBALL AMB LES CÈL·LULES Kc	76
2.6.1.- Manteniment de les cèl·lules	76
2.6.1.1.- Creixement	76
2.6.1.2.- Congelació	77
2.6.1.3.- Descongelació	77
2.6.2.- Transfecció pel mètode de fosfat càlcic	77
2.6.3.- Anàlisi de la transfecció per microscòpia de fluorescència	78
2.6.4.- Tractament amb Tritó X-100	79
2.6.5.- Separació de les cèl·lules deslocalitzades mitjançant citometria de flux i anàlisi per microscòpia de fluorescència	80
2.6.6.- Tractament amb l'inhibidor de proteosoma MG132	81
2.6.7.- Immunolocalitzacions	81
2.6.8.- Seguiment <i>in vivo</i> del cultiu amb el microscopi confocal	83
2.7.- MÈTODES DE TREBALL AMB <i>Drosophila melanogaster</i>	83
2.7.1.- Extracció de DNA genòmic	83
2.7.2.- Obtenció d'extractes proteics d'embrions	84
2.7.3.- Immunolocalitzacions a embrions	84
2.7.4.- Preparació de neuroblastes	85
2.7.5.- Immunolocalitzacions a neuroblastes	86
V.- RESULTATS	89
1.- ANÀLISI DELS FACTORS I MECANISMES QUE DETERMINEN LA LOCALITZACIÓ CENTROMÈRICA DE Cid	91
1.1.- Expressió transitòria de Cid	91
1.2.- Estudi de la contribució dels dominis N i C-terminal (HFD) a la localització centromèrica de Cid	93
1.2.1.- Expressió transitòria de N _{Cid} i HFD _{Cid}	94
1.2.2.- Expressió transitòria de les proteïnes quimèriques N _{Cid} HFD _{H3} i N _{H3} HFD _{Cid}	96

1.2.3.- Expressió transitòria de proteïnes quimèriques portadores dels dominis N-terminals d'altres variant CenH3	97
1.3.- Anàlisi de l'evolució dels patrons de localització de Cid en funció del temps de cultiu de les cèl·lules	99
1.4.- Anàlisi de la contribució del proteosoma a la localització centromèrica de Cid	104
1.4.1.- Estudi de la localització de Cid-YFP en cèl·lules transfectades i tractades amb l'inhibidor del proteosoma MG132	105
1.4.2.- Estudi de la localització de Cid en mutants del proteosoma	108
2.- ESTUDI DE LA INTERACCIÓ DE Cid I Ppa	113
2.1.- Estudi <i>in vitro</i> de la interacció Cid-Ppa mitjançant assajos de GST-pulldown	115
2.2.- Estudi <i>in vivo</i> de la interacció Cid-Ppa	118
3.- ANÀLISI DELS EFECTES DE LA DESLOCALITZACIÓ DE Cid SOBRE LA PROGRESSIÓ DEL CICLE CEL·LULAR	121
3.1.- Determinació de l'efecte de la deslocalització de Cid sobre l'índex mitòtic	121
3.2.- Estudi <i>in vivo</i> de l'efecte de la deslocalització de Cid sobre la divisió cel·lular	124
VI.- DISCUSSIÓ	129
1.- FACTORS I MECANISMES QUE DETERMINEN LA LOCALITZACIÓ CENTROMÈRICA DE Cid	131
1.1.- Patrons de localització de Cid	131
1.2.- Implicació dels diferents dominis	133
1.3.- El procés de degradació proteolítica de Cid	134
1.3.1.- Estan els nivells de Cid regulats per degradació via proteosoma?	134
1.3.2.- Està la proteïna F-box Ppa implicada en la degradació de Cid?	140
2.- EFECTES DE LA SOBREEXPRESSIÓ DE Cid SOBRE EL CICLE CEL·LULAR	143
VII.- CONCLUSIONS	145

VIII.- BIBLIOGRAFIA	149
IX.- APÈNDIX	171
1.- MAPES DEL VECTORS YFP	173
2.- SEQÜÈNCIES	174
Cid-YFP	174
N _{Cid} -YFP	176
HFD _{Cid} -YFP	178
N _{Cid} HFD _{H3} -YFP	180
N _{H3} HFD _{Cid} -YFP	182
N _{Cnp1} HFD _{Cid} -YFP	184
N _{Cse4} HFD _{Cid} -YFP	186

ÍNDEX DE TAULES I FIGURES

ÍNDEX DE TAULES

Taula M.1.- Resum dels principals plasmidis emprats en aquest treball	59
Taula M.2.- Llistat dels oligonucleòtids emprats en aquest treball	60

ÍNDEX DE FIGURES

Figura I.1.- Estructura dels centròmers de diferents organismes	18
Figura I.2.- Estructura i organització de la cromatina centromèrica	23
Figura I.3.- Observacions que suggereixen l'existència d'un mecanisme de control epigenètic de la funció centromèrica	24
Figura I.4.- Formació de neocentròmers	26
Figura I.5.- Localització de la variant centromèrica de la histona H3 a cromosomes metafàsics	27
Figura I.6.- Relació entre les diferents proteïnes centromèriques pel que fa a la localització	30
Figura I.7.- Estructura de les variants centromèriques de la histona H3 (CenH3)	31
Figura I.8.- Trets estructurals de la regió d'interacció entre CENP-A i la histona H4	34
Figura I.9.- Model proposat per l'ensamblatge del tetràmer H3/H4 durant la replicació del DNA	36
Figura I.10.- Models per la propagació de la identitat centromèrica	38
Figura I.11.- Factors responsables de la localització centromèrica de Cnp1, la variant centromèrica de la histona H3 de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	41
Figura I.12.- Hipòtesi sobre la possible funció de Ams2 al centròmer de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	42
Figura I.13.- Possibles modificacions post-traduccionals de les variants centromèriques de la histona H3	45
Figura M.1.- Purificació de la proteïna de fusió CidNt-His	66
Figura M.2.- Marcatge amb ³⁵ S-Met mitjançant transcripció-traducció <i>in vitro</i>	72

Figura M.3.- Obtenció de proteïnes fusionades a GST	73
Figura M.4.- Especificitat del sèrum α -CidNt	75
Figura R.1.- Patrons de localització obtinguts a l'expressar transitòriament Cid-YFP a cèl·lules Kc	92
Figura R.2.- Immunolocalitzacions amb anticossos α -CidNt a cèl·lules transfectades amb pCid-YFP	92
Figura R.3.- Tractament amb Tritó X-100 de cèl·lules Kc transfectades amb pCid-YFP	93
Figura R.4.- Transfecció de cèl·lules Kc amb pN _{Cid} -YFP	94
Figura R.5.- Transfecció de cèl·lules Kc amb pHFD _{Cid} -YFP	95
Figura R.6.- Transfecció de cèl·lules Kc amb pN _{H3} HFD _{Cid} -YFP i pN _{Cid} HFD _{H3} -YFP	96
Figura R.7.- Transfecció de cèl·lules Kc amb pN _{CenH3} HFD _{Cid} -YFP	98
Figura R.8.- Seguiment del cultiu de cèl·lules transfectades amb pCid-YFP al llarg del temps	100
Figura R.9.- Anàlisi de l'evolució dels patrons de localització d'un cultiu enriquit en cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada	101
Figura R.10.- Seguiment <i>in vivo</i> del procés de localització centromèrica	102
Figura R.11.- Anàlisi del patró de localització al llarg del cultiu cel·lular	103
Figura R.12.- Determinació dels nivells d'mRNA de Cid-YFP	105
Figura R.13.- Tractament amb MG132 de cèl·lules transfectades amb pCid-YFP	106
Figura R.14.- Tractament amb MG132 d'un cultiu enriquit en cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada	108
Figura R.15.- Anàlisi de l'efecte de mutacions al proteosoma sobre la localització de Cid a neuroblastes	109
Figura R.16.- Esquemes de l'estructura de la proteïna Ppa i del mecanisme d'ubiquitinació	114
Figura R.17.- Esquema de les proteïnes emprades en l'assaig de GST- <i>pulldown</i>	116
Figura R.18.- Estudi de la interacció Cid-Ppa mitjançant un assaig de GST- <i>pulldown</i>	117

Figura R.19.- Determinació dels nivells proteics de Cid a mutants homozigots <i>Ppa²⁰/Ppa²⁰</i> mitjançant <i>Western blot</i>	119
Figura R.20.- Anàlisi de la localització de Cid a mutants homozigots <i>Ppa²⁰/Ppa²⁰</i> mitjançant immunolocalitzacions a embrions	120
Figura R.21.- Immunolocalitzacions amb α -PSer ¹⁰ H3 a cèl·lules Kc transfectades amb pCid-YFP	122
Figura R.22.- Immunolocalitzacions amb α -PSer ¹⁰ H3 a cèl·lules Kc transfectades amb pHFD _{Cid} -YFP, pN _{Cnp1} HFD _{Cid} -YFP i pN _{Cid} HFD _{H3} -YFP	123
Figura R.23.- Seguiment <i>in vivo</i> de cèl·lules Kc no transfectades	124
Figura R.24.- Seguiment <i>in vivo</i> d'una cèl·lula transfectada amb Cid-YFP localitzada al centròmer	125
Figura R.25.- Seguiment <i>in vivo</i> d'una cèl·lula transfectada amb Cid-YFP deslocalitzada al llarg de tota la cromatina	126
Figura R.26.- Seguiment <i>in vivo</i> d'una cèl·lula transfectada amb Cid-YFP amb un patró de localització mixta	127
Figura D.1.- Models per la deposició de CenH3	132
Figura D.2.- Hipòtesi de l'existència d'un mecanisme de degradació via proteosoma que contribueix a la localització centromèrica de Cid	136

ABREVIATURES

AT	Adenina-Timina
ATPasa	Hidrolasa d'adenosin trifosfat
BSA	Albúmina sèrica bovina
CenH3	Variant centromèrica de la histona H3
Cid	<i>Centromere identifier</i>
C-terminal	Carboxi-terminal
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrat
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DNasa I	Desoxiribonucleasa
dNTP	Desoxinucleòtid trifosfat
DO	Densitat òptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Àcid etilen-diamino-tetracètic
EGTA	Àcid etilen-glicol-tetracètic
EYFP	<i>Enhancer yellow fluorescent protein</i>
FBS	Sèrum fetal boví
GST	Glutació S-transferasa
HEPES	Àcid N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfònic
HFD	<i>Histone fold domain</i>
IP	Iodur de propidi
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranòsid
IVT	Transcripció i traducció <i>in vitro</i>
Kb	Quilobases (1 Kb = 1000 pb)
LB	Medi de cultiu de Luria Bertani
LRRs	<i>Leucine rich repeats</i>
MCS	<i>Multicloning site</i>
mRNA	RNA missatger
N	Amino-terminal

NP-40	Nonidet P-40
N-terminal	Amino-terminal
o/n	<i>Overnight</i>
pb	Parells de bases
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	Reacció en cadena de la DNA polimerasa
PIPES	Àcid Piperazina-N,N'-bis-2-etanosulfònic
PLB	<i>Protein loading buffer</i>
PMSF	Fluor Fenilmetilsulfonil
Ppa	<i>Partner of Paired</i>
PSA	Persulfat amònic
RC	Acoblat a replicació
RI	Independent de replicació
RNA	Àcid ribonucleic
RNasa	Ribonucleasa
RNA_i	RNA d'interferència
RNA pol	RNA polimerasa
rpm	Revolucions per minut
RT-PCR	Transcripció reversa i PCR
SDS	Dodecil sulfat sòdic
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida-SDS
TC	Acoblat a transcripció
TE	Tampó Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-(tetrametil)-etilendiamino
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

II.- INTRODUCCIÓ

1.- EL CENTRÒMER

El centròmer és una estructura especialitzada del cromosoma que juga un paper fonamental en la correcta segregació cromosòmica durant la mitosi i la meiosi (Choo 1997). Entre les múltiples funcions que té destaquen que està implicat en l'organització del cinetocor, en la interacció de les cromàtides germanes i en el control del cicle cel·lular.

1.1.- Els diferents tipus de centròmers

Tot i que la funció centromèrica està conservada en totes les espècies, els centròmers presenten una gran variabilitat estructural que va des de cromosomes holocèntrics, on els microtúbuls s'uneixen al llarg de les cromàtides, fins a cromosomes amb centròmers localitzats, on els microtúbuls s'uneixen a una única regió. A més, pel que fa als centròmers localitzats es poden distingir dos tipus: els puntuals i els regionals (Figura I.1).

1.1.1.- El cromosoma holocèntric de *Caenorhabditis elegans*

Els cromosomes holocèntrics són típics de varis insectes, plantes i nematodes. L'únic que ha estat caracteritzat molecularment ha estat el del nematode *Caenorhabditis elegans*. Durant la mitosi, a les espècies holocèntriques s'ensamblen cinetocors al llarg de la cara externa de cadascuna de les cromàtides germanes, és a dir, no sembla haver-hi una seqüència de DNA específica que dirigeixi l'ensamblatge del cinetocor sinó que aquest es pot formar a moltes àrees del genoma de *C. elegans* (Figura I.1.A). La composició i l'estructura d'aquests cinetocors són molt semblants a la dels cromosomes monocèntrics (Oegema *et al.* 2001; Cheeseman *et al.* 2004). Algunes de les proteïnes que s'han identificat fins el moment són: HCP-3 (*Holocentric centromere protein 3*), la variant centromèrica de la histona H3 (Buchwitz *et al.* 1999) que es troba a la part més interna del cinetocor; KNL-1 (*Kinetochore null 1*), una proteïna de la part externa (Desai *et al.* 2003); i HCP-4 (*Holocentric centromere protein 4*), la homòloga de la proteïna d'humans CENP-C (*Centromere protein C*) (Moore and Roth 2001).

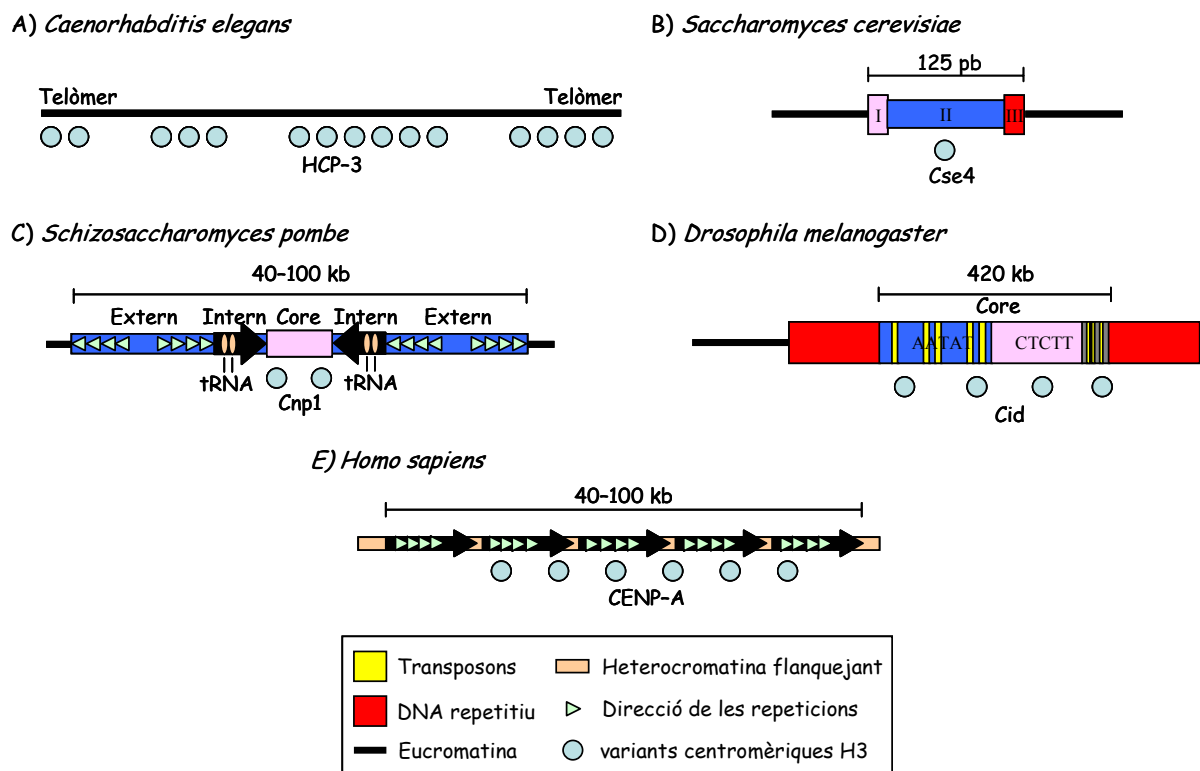


Figura I.1. Estructura dels centròmers de diferents organismes. La seqüència del DNA centromèric no es troba conservada entre espècies però el que sí tenen en comú és la presència d'una variant de la histona H3. **A)** A *Caenorhabditis elegans* el cinetocor s'ensambla al llarg de cada cromosoma. **B)** A *Saccharomyces cerevisiae* la funció centromèrica és exercida per una regió de només 125 pb que conté tres elements conservats: CDEI, CDEII i CDEIII. **C)** A *Schizosaccharomyces pombe* el centròmer està compost per una regió central, on es troba Cnp1, la variant centromèrica de la histona H3, envoltada per uns dominis de repeticions inverses que es troben conservats. **D)** Al minicromosoma Dp1187 de *Drosophila melanogaster* s'ha identificat com a centròmer una regió d'unes 420 kb que consta d'una part central amb satèl·lits de 5 pb i transposons envoltada per altres DNAs repetitius. **E)** A humans el principal component dels centròmers és el satèl·lit alfa, el qual es troba repetit en tàndem (Sullivan et al. 2001).

1.1.2.- El centròmer puntual de *Saccharomyces cerevisiae*

En el cas de *Saccharomyces cerevisiae* als 16 cromosomes aproximadament 125 pb són suficients per dur a terme la funció centromèrica. Aquesta regió es pot dividir en tres elements conservats: CDEI, CDEII i CDEIII (Figura I.1.B) (Murphy and Fitzgerald-Hayes 1990). CDEI consta de 8 pb, també està present en el promotor de molts gens i interacciona amb Cbf1 (*centromere-binding factor 1*), una proteïna que a part d'estar implicada en la segregació cromosòmica també actua com a factor de transcripció (Baker and Masison 1990). CDEIII té 25 pb i és absolutament necessària per la funció centromèrica. Interacciona amb el

complex proteic CBF3 (Lechner and Carbon 1991), el qual està format per les proteïnes Ndc10 (*Nuclear division cycle 10*), Cep3 (*Centromere protein 3*), Ctf13 i Skp1. Ctf13 és activitat per fosforilació via Skp1 i, a la vegada és regulat negativament per degradació via ubiquitinació (Kaplan *et al.* 1997). Skp1 també forma part del complex ubiquitina lligasa SCF. És per això que es creu que Skp1 representa l'enllaç molecular que facilita la interacció entre el complex del cinetocor i la maquinària reguladora del cicle cel·lular i que l'activació i la degradació de Ctf13 estan acoblades per tenir un control estricte de la quantitat de CBF3. CDEI i CDEIII estan separades per CDEII, una regió de 78 a 86 pb rica en AT la seqüència primària de la qual no està conservada però la seva longitud és important per la funció centromèrica (Gaudet and Fitzgerald-Hayes 1987). És amb aquesta regió on interacciona Cse4 (*Chromosome segregation 4*), la variant centromèrica de la histona H3.

1.1.3.- Els centròmers regionals

Els centròmers regionals consten de quilobases de DNA i inclouen tant seqüències úniques com repetitives. A *Schizosaccharomyces pombe* els tres centròmers contenen una seqüència central de DNA no repetitiu rica en AT de 4 a 7 kb que està envoltada per un domini que conté tant repeticions directes com inverses (20–100 kb) (Clarke *et al.* 1986) (Nakaseko *et al.* 1986) (Nakaseko *et al.* 1987) (Takahashi *et al.* 1992) (Steiner *et al.* 1993; Wood *et al.* 2002) (Figura I.1.C). En contrast amb *Saccharomyces cerevisiae*, les seqüències centromèriques estan significativament menys conservades als diferents cromosomes. Al nucli central del centròmer del cromosoma 2 li manca un tros de 3.3 kb que sí està present als cromosomes 1 i 3 i, els elements flanquejants presents a poques quilobases del nucli (repeticions internes) són diferents a cada centròmer. Les repeticions externes estan formades per elements *dg* i *dh*, també coneguts com repeticions *K* i *L*, i presenten un elevat grau de conservació a tots tres centròmers, tot i que estan organitzades de diferent manera.

Es poden distingir dos dominis, tant funcionalment com citològicament (Kniola *et al.* 2001; Appelgren *et al.* 2003). S'ha vist que la funció centromèrica, és a dir, la formació del cinetocor, requereix una seqüència mínima de 25 kb, que conté el nucli central no repetitiu i els dominis repetitius interns (Hahnenberger *et al.* 1991; Murakami *et al.* 1991; Baum *et al.* 1994), mentre que l'heterocromatina flanquejant (les repeticions externes) és necessària per la cohesió de les cromàtides germanes. Aquests dos dominis també es diferencien pel diferent contingut en proteïnes (Partridge *et al.* 2000; Pidoux and Allshire 2004). La regió central es

caracteritza per la presència de la variant centromèrica de la histona H3, Cnp1 (*Centromere protein 1*), i altres proteïnes com Mis6 (*Mis-segregation 6*) (Saitoh *et al.* 1997; Takahashi *et al.* 2000), Mis12 (*Mis-segregation 12*) (Goshima *et al.* 1999) i Sim4 (*Silencing in the middle of the centromere 4*) (Pidoux *et al.* 2003). El domini extern conté les proteïnes amb cromodomini Chp1 (*Chromodomain protein 1*) (Sadaie *et al.* 2004) i Swi6 (*Switching gene 6*) (Ekwall *et al.* 1995), la homòloga de Hp1 (*Heterochromatin protein 1*), i Abp1 (*ARS binding protein 1*) (Nakagawa *et al.* 2002), la homòloga de CENP-B (*Centromere protein B*).

En *Drosophila melanogaster* i humans els centròmers també estan localitzats en zones de DNA repetitiu. Pel que fa a *D. melanogaster*, l'únic centròmer que s'ha definit molecularment i funcionalment ha estat identificat a partir del minicromosoma Dp1187 d'1,3 Mb derivat del cromosoma X, on s'ha vist que una regió de 420 kb que conté DNA repetitiu és suficient per conferir una segregació cromosòmica normal (Murphy and Karpen 1995; Sun *et al.* 1997)(Figura I.1.d). Aquesta regió consta bàsicament de dos grans blocs dels DNA satèl·lit AATAT i TTCTC, havent-hi 5 transposons inserits dins de la regió d'AATAT (Sun *et al.* 2003). Als centròmers de *Drosophila* també es poden distingir dos dominis, un encarregat de l'ensamblatge del cinetocor, on localitza la variant centromèrica de la histona H3, Cid (*Centromere identifier*), i un altre implicat en la cohesió de les cromàtides germanes, on es trobarien proteïnes com Mei-S332 (*Meiotic-S332*). Aquests dominis es troben envoltats d'heterocromatina que conté proteïnes com Prod (*Proliferation disrupter*), implicada en la condensació de la regió centromèrica, i Hp1 (*Heterochromatin protein 1*) (Blower and Karpen 2001).

Als centròmers humans, el principal DNA repetitiu és el satèl·lit alfa, que consisteix en un monòmer de 171 pb que es repeteix en tàndem fins arribar a ocupar dominis des de 100 kb fins a megabases (Tyler-Smith and Willard 1993)(Figura I.1.e). No tot aquest tàndem sembla estar implicat en l'ensamblatge del cinetocor ja que anticossos contra proteïnes del cinetocor localitzen només en una porció del satèl·lit alfa (Warburton *et al.* 1997). A més, cromosomes als que naturalment o artificialment s'ha deletat la majoria d'aquest satèl·lit alfa poden encara ensamblar el cinetocor i segregar correctament (Wevrick *et al.* 1990; Mills *et al.* 1999; Yang *et al.* 2000). Als centròmers humans també es troba la variant centromèrica de la histona H3, CENP-A (*Centromere protein A*), juntament amb altres proteïnes centromèriques com CENP-B i CENP-C, en una regió citològicament distingible de la regió heterocromàtica que conté Hp1 (Sun *et al.* 2003).

Les regions centromèriques d'algunes plantes s'assemblen a les de mamífers en el fet que ambdues són riques en repeticions en tàndem, freqüentment d'una mida aproximadament nucleosomal. Concretament, a *Arabidopsis thaliana* els centròmers contenen un domini central d'1,1 a 2.9 Mb amb repeticions de 180 pb envoltat per zones riques en retrotransposons, DNA ribosomal i altres seqüències moderadament repetitives (Round *et al.* 1997; Copenhaver *et al.* 1999; Heslop-Harrison *et al.* 1999). És més, les repeticions de 180 pb d'un costat del nucli central estan orientades de forma oposada a les de l'altre, de manera semblant a l'organització dels centròmers de *S. pombe*. Ara bé, per determinar aquests centròmers es van basar en les dades obtingudes a partir del mapatge genètic i la supressió de recombinació enlloc de la funció centromèrica. És a dir, podria ser que aquest estudi hagin sobreestimat el tamany de la localització centromèrica ja que la supressió de recombinació és una propietat de l'heterocromatina flanquejant, més que una característica intrínseca del lloc de formació del cinetocor (Szauter 1984).

1.2.- La cromatina centromèrica

A la majoria d'organismes la cromatina centromèrica es pot distingir citològicament de la resta del cromosoma. En metafase es veu com una constricció primària i els cromosomes romanen units per aquest lloc. A interfase, al tenyir la cèl·lula amb DAPI els centròmers corresponen a la senyal més intensa, indicant la presència d'una cromatina constitutivament condensada. Només amb això un ja es pot fer a la idea que el centròmer presenta una estructura cromatínica específica que el diferencia de la resta del cromosoma.

Com ja s'ha mencionat abans, una característica comuna a tots els centròmers, a excepció de *S. cerevisiae*, és que es troben envoltats o inserits en heterocromatina. L'heterocromatina és una regió repetitiva, amb pocs gens, que roman condensada al llarg del cicle cel·lular, replica tard en la fase S i reprimeix l'expressió de gens que es troben a les seves proximitats, fenomen conegut com "*position effect variegation*" (Reuter and Spierer 1992; Dillon and Festenstein 2002) (Richards and Elgin 2002). Una de les propietats que es coneixen és el seu enriquiment en DNAs altament repetitius (DNAs satèl·lit) i, es creu que, donada la gran diversitat de satèl·lits centromèrics, la seva contribució a l'estructura i funció de l'heterocromatina centromèrica es basa en l'estructura secundària que adopten. El fet que es trobi flanquejant la regió centromèrica suggereix que deu estar implicada en la cohesió de

les cromàtides germanes (Bernard *et al.* 2001; Pidoux and Allshire 2005). A més, és possible que contribueixi a la integritat de la cromatina centromèrica fent de barrera per prevenir l'expansió o la barreja de la cromatina que conté CenH3 amb la que conté exclusivament la histona H3, tal i com s'ha observat a la formació de neocentròmers a *Drosophila* (Maggert and Karpen 2001).

Hi ha evidències bioquímiques de la presència d'una estructura particular als centròmers de llevats, mamífers i *Drosophila*. Inclús a *Saccharomyces cerevisiae* una regió de 220-250 pb de la regió centromèrica es troba protegida de la digestió amb nucleases i els nucleosomes flanquejants es troben posicionats respecte a aquesta estructura (Saunders *et al.* 1988; Saunders *et al.* 1990)

A *S. pombe*, el DNA centromèric central, és a dir el corresponent al nucli central i les repeticions internes, no sembla tenir un espaiament regular de nucleosomes (Polizzi and Clarke 1991). S'ha vist que aquesta regió conté una cromatina especialitzada ja que al digerir-la amb nucleasa micrococcal dona un patró de llapissada mentre que les repeticions externes donen el patró regular de nucleosomes (Polizzi and Clarke 1991; Takahashi *et al.* 2000). Aquest patró no és degut a la seqüència de DNA ja que només s'obté amb centròmers funcionals i, al delectonar proteïnes involucrades en la funció centromèrica, com Mis6, es disromp aquesta estructura produint un patró nucleosomal normal (Saitoh *et al.* 1997).

Anàlisis amb fibres de cromatina a *Drosophila* i humans han revelat que la regió centromèrica en realitat no està composta exclusivament per nucleosomes que contenen la variant centromèrica de la H3 (CenH3) sinó que hi ha una distribució en blocs interposats de nucleosomes amb H3 i nucleosomes amb CenH3 (Blower *et al.* 2002) (Figura I.2.A). El fet que a cromosomes metafàsics només es detecti CenH3 a la cara externa del cromosoma i H3 a l'interior ha portat a suggerir un model segons el qual la cromatina centromèrica estaria plegada formant un cilindre de manera que els diferents blocs de CenH3 estarien a la cara externa del cilindre per ensamblar el cinetocor (Figura I.2.B). Estudis amb arròs indiquen que la presència d'H3 a la cromatina centromèrica està conservada (Nagaki *et al.* 2004). A més, aquesta cromatina centromèrica presenta un patró de modificacions post-traduccionals peculiar: l'heterocromatina flanquejant presenta di i trimetilació de la lisina 9 de la histona H3, a més d'un estat hipoacetilat d'H3 i H4, mentre que la cromatina centromèrica que conté CenH3 i H3 intercalades presenta, a part de l'estat hipoacetilat de H3 i H4, dimetilació de la lisina 4 de la histona H3, una modificació que fins ara era característica de les regions

euromàtiques obertes però no actives (Sullivan and Karpen 2004) (Figura I.2.a). Podria ser que la presència d'aquesta modificació crees una estructura cromatínica permissiva que permetés l'ensamblatge de CenH3 de manera independent de replicació (veure apartat 2.3). Ara bé, cal dir que aquest patró de modificacions potser no està conservat a tots els organismes ja que a la regió centromèrica de l'arròs sí s'ha trobat dimetilació de la lisina 9 de la histona H3 dins del domini que conté CenH3 (Nagaki *et al.* 2004).

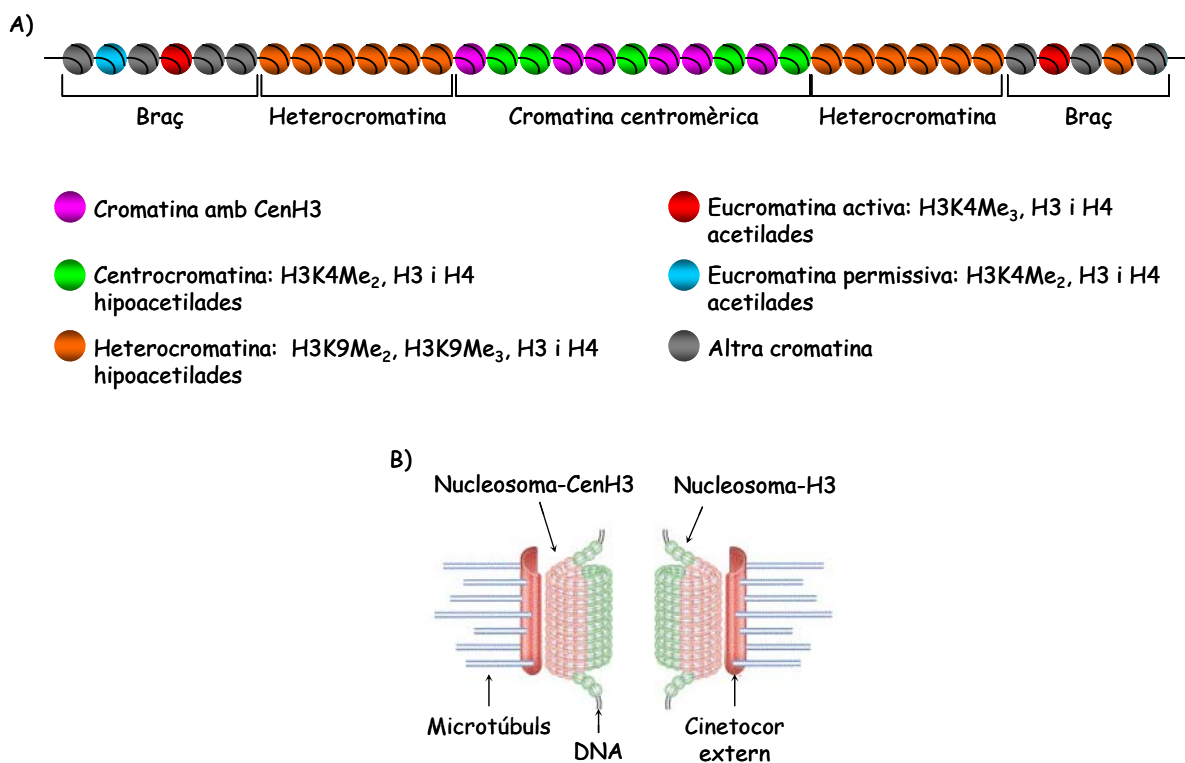
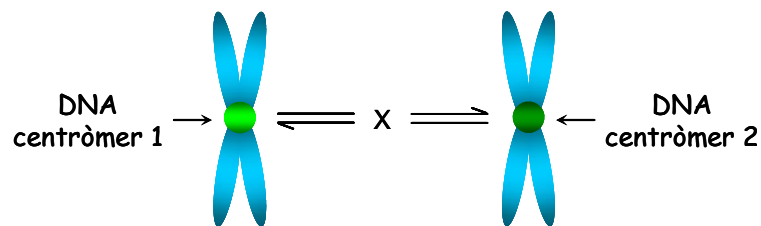


Figura I.2.- Estructura i organització de la cromatina centromèrica. A) Representació d'una fibra de cromatina en la que el domini centromèric està marcat per la presència de nucleosomes que contenen CENP-A (color fucsia) intercalats amb nucleosomes amb H3 (color verd), els quals es caracteritzen per un estat hipocetilat dels extrems N-terminals d'H3 i H4 i dimetilació de la lisina 4 de la histona H3. L'heterocromatina flanquejant (taronja) es caracteritza per un estat hipocetilat de les histones H3 i H4 i di i trimetilació de la lisina 9 de la histona H3 (Dunleavy *et al.* 2005). B) Organització tridimensional de la cromatina centromèrica en humans i *Drosophila*. La fibra de cromatina que es mostra a A) s'organitzaria tridimensionalment en forma cilíndrica de manera que els nucleosomes que contenen CenH3 es troben a la cara externa formant la base per la creació del cinetocor (Blower *et al.* 2002).

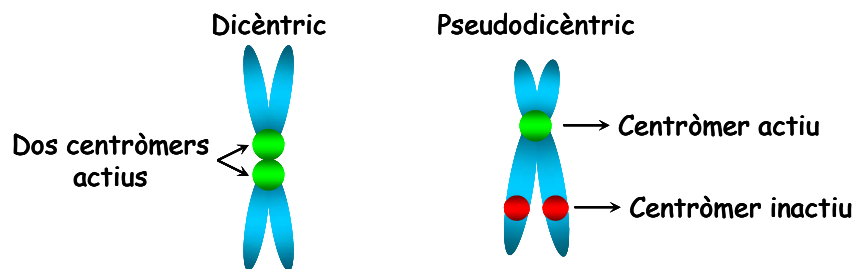
1.3.- Identitat centromèrica i epigenètica

L'absència de conservació tant pel que fa a la mida com a la seqüència de DNA ha fet pensar que a la funció centromèrica hi ha clarament un component epigenètic. A part d'aquesta observació n'hi ha d'altres a favor d'aquesta hipòtesi.

A) Absència de conservació en la seqüència centromèrica



B) Existència de cromosomes dicèntrics/pseudodicèntrics



C) Existència de neocentròmers

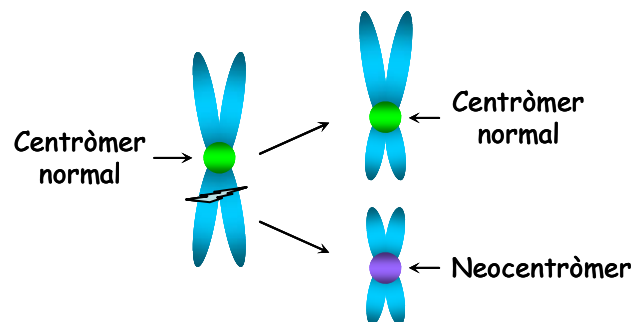


Figura 1.3.- Observacions que suggereixen l'existència d'un mecanisme de control epigenètic de la funció centromèrica. A) Absència de conservació en la seqüència de DNA centromèric. B) Existència de cromosomes dicèntrics. Si els dos centròmers es troben molt separats un d'ells es troba inactiu. C) Formació de neocentròmers a regions no centromèriques molt variades. (Choo 2000)

Una primera dada s'obté a partir de la construcció de cromosomes artificials humans, on no tot el tàndem de DNA satèl·lit alfa forma centròmers (Harrington *et al.* 1997; Ikeno *et al.* 1998), indicant que altres seqüències o factors són requerits per ensamblar i mantenir centròmers humans funcionals. No obstant, l'ensamblatge *de novo* sembla ser més eficient quan s'introdueix DNA satèl·lit alfa a línies cel·lulars humanes (Harrington *et al.* 1997; Ikeno *et al.* 1998), indicant que aquest DNA repetitiu deu ser millor motlle per la formació de nous centròmers en cèl·lules en cultiu.

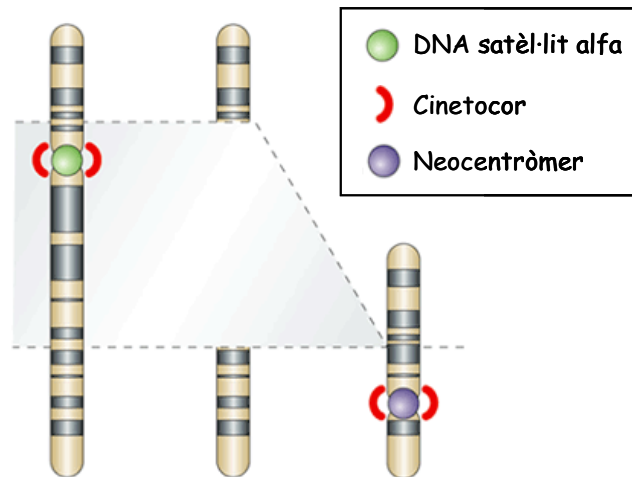
En segon lloc, l'existència a humans i mosques de cromosomes dicèntrics que es transmeten establement gràcies a la inactivació funcional d'un dels centròmers (Sullivan and Schwartz 1995; Faulkner *et al.* 1998; Sullivan and Willard 1998; Agudo *et al.* 2000) (Figura I.3.B). Als cromosomes dicèntrics humans mitòticament estables els dos centròmers contenen regions idèntiques de satèl·lit alfa centromèric tot i que només un d'ells és actiu (Sullivan and Willard 1998; Higgins *et al.* 1999), demostrant que la presència de DNA centromèric en un cromosoma no és suficient per la funció centromèrica.

Una última observació seria l'existència a humans i *Drosophila* de neocentròmers que reflecteixen el cas invers dels cromosomes dicèntrics: l'habilitat de DNA normalment no centromèric per adquirir i mantenir l'activitat centromèrica (Murphy and Karpen 1995; du Sart *et al.* 1997; Williams *et al.* 1998; Barry *et al.* 2000) (Figura I.3.C). La formació de neocentròmers humans està associada generalment a una reordenació cromosomal. L'ordre en que succeeix no es té clar. Potser primer té lloc una deleció cromosomal, seguida de la formació d'un neocentròmer o, primer es forma el neocentròmer i això dona lloc a la formació d'un cromosoma dicèntric que pateix una reordenació cromosomal (Figura I.4.A).

Estudis detallats demostren que 22 proteïnes que es troben als centròmers humans també es troben als neocentròmers (Saffery *et al.* 2000). S'han identificat més de 40 neocentròmers que es formen en 15 cromosomes diferents, indicant que moltes regions genòmiques són aptes per crear un centròmer actiu. Els 3 neocentròmers estudiats fins el moment presenten un 100% d'identitat pel que fa a seqüència respecte el locus parental i cap d'ells ha adquirit DNA satèl·lit alfa (Lo *et al.* 2001; Lo *et al.* 2001). Aquests neocentròmers no presenten homologia significativa entre si però sí tenen característiques comunes: són rics en AT (> 60%), en elements retrovirals i repeticions en tàndem (Murphy and Karpen 1998). Així doncs, sembla que diferents seqüències poden adquirir funció centromèrica però per

aquelles riques en AT o DNA repetitiu deu ser més fàcil adquirir la conformació necessària per dur a terme activitat centromèrica i ensamblar el cinetocor.

A) Cromosoma humà 10



B) *Drosophila melanogaster*

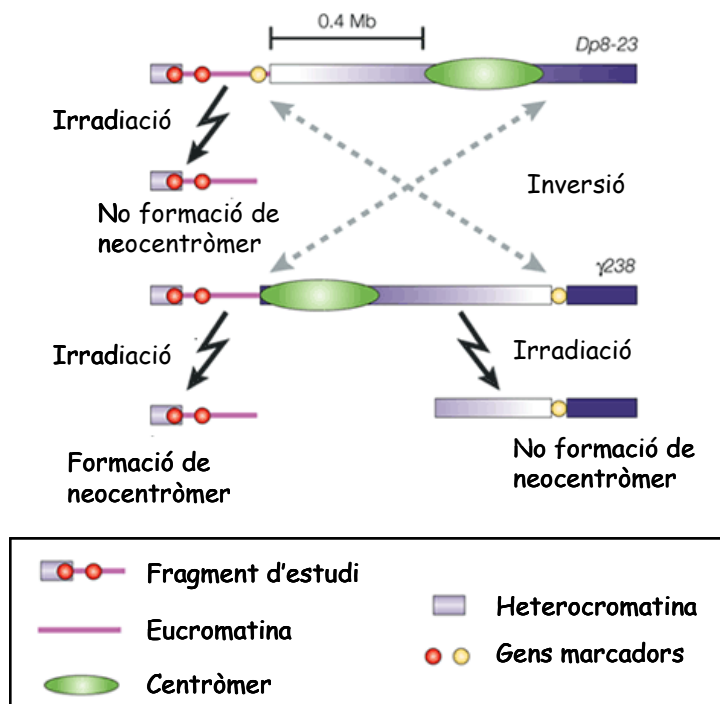


Figura I.4.- Formació de neocentròmers. A) Neocentròmer humà del cromosoma 10. B) Formació de neocentròmers a *Drosophila melanogaster*. Requereix la proximitat d'un centròmer funcional.(Sullivan et al. 2001)

A *D. melanogaster* s'ha vist que la formació artificial de neocentròmers requereix la proximitat d'un centròmer funcional i probablement té lloc mitjançant l'expansió en *cis* de proteïnes centromèriques a llocs de DNA no centromèric però, només succeeix quan s'ha eliminat l'heterocromatina flanquejant (Maggert and Karpen 2001) (Figura I.4.B). Un cop s'ha establert un neocentròmer aquest és heretat correctament a través de mitosi i meiosi.

Així doncs, totes aquestes observacions indiquen que la identitat centromèrica deu establir-se i propagar-se mitjançant mecanismes epigenètics. Podria tractar-se de modificacions post-traduccionals de la cromatina. De fet, com hem vist a l'apartat 1.2, una característica de l'heterocromatina i la cromatina centromèrica és la hipoacetilació de les histones H3 i H4, a part de presentar metilació de les lisines 9 i 4 de la histona H3, respectivament. Ara bé, també podria tractar-se de la presència de determinades proteïnes específiques com són la proteïna Hp1 (*Heterochromatin protein 1*), que reconeix la metilació de la lisina 9 de l'H3, o les variants centromèriques de la histona H3.

Aquestes últimes, donada la seva homologia amb la histona H3 i la seva presència al centròmer de tots els organismes al llarg del cicle cel·lular (Figura I.5), són un fort candidat a ser la proteïna que especifica i propaga el lloc d'ensamblatge del cinetocor. A més, s'ha detectat la seva presència en tots els centròmers funcionals, inclús els neocentròmers (Saffery *et al.* 2000), i són absents dels centròmers inactius.

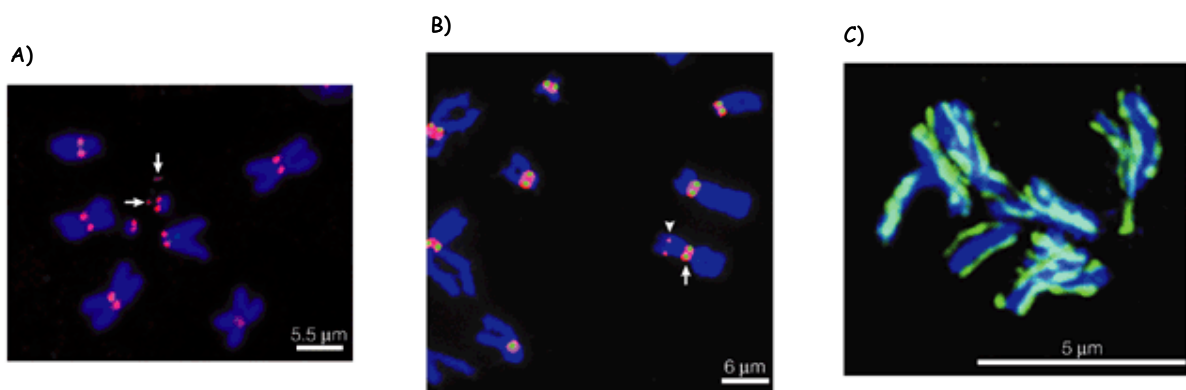


Figura I.5.- Localització de la variant centromèrica de la histona H3 a cromosomes metafàsics. A) *Drosophila melanogaster*. B) Humans. C) *Caenorhabditis elegans*. (Sullivan *et al.* 2001)

2.- LES VARIANTS CENTROMÈRIQUES DE LA HISTONA H3

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

A *S. cerevisiae*, mutacions en Cse4 provoquen no-disjunció cromosòmica i aturada de la mitosi (Stoler *et al.* 1995). En canvi, a *S. pombe* l'absència de Cnp1 no provoca aturada en mitosi però sí elevats nivells de no-disjunció cromosòmica que donen lloc a aneuploidia i inviabilitat de les cèl·lules filles (Takahashi *et al.* 2000). A *C. elegans*, experiments amb RNA d'interferència demostren que l'absència de HCP-3 és letal, presentant els embrions absència de segregació cromosòmica ja a la primera divisió mitòtica (Buchwitz *et al.* 1999). A mamífers, embrions de ratolí nuls per CENP-A també tenen greus problemes mitòtics i presenten un fenotip de letalitat (Howman *et al.* 2000). En conclusió, la manca de CenH3 comporta problemes mitòtics i es podria dir que la seva funció és essencial per tal que tingui lloc una correcta segregació cromosòmica.

La seva presència al centròmer és necessària per la deposició d'altres proteïnes centromèriques, una altra dada al seu favor per ser el factor epigenètic que determina la identitat centromèrica (Figura I.6). Per exemple, a ratolins *knock-outs* de CENP-A i al fer RNA_i a *C. elegans* contra HCP-3, la proteïna centromèrica CENP-C (*Centromere protein C*) no localitza al centròmer (Howman *et al.* 2000; Moore and Roth 2001; Oegema *et al.* 2001). En canvi, la disrupció de CENP-C a *C. elegans* no afecta a la localització de CENP-A. És a dir, CENP-A es troba per sobre de CENP-C a la via d'ensamblatge del cinetocor en cucs i ratolins. A *C. elegans* altres proteïnes del cinetocor, com són BUB-1 (*Budding uninhibited by benzimidazoles 1*), MCAK (*Mitotic centromere associated kinesin*) i HCP-1 (*Holocentric centromere protein 1*), també es deslocalitzen al fer RNA_i contra HCP-3 (Figura I.6.A). De manera similar, a *D. melanogaster* varies proteïnes del cinetocor extern, com Polo, Bub1 (*Budding uninhibited by benzimidazoles 1*), CENP-meta, Rod (*Rough deal*) i MEI-S332 també es deslocalitzen a embrions i cèl·lules en cultiu quan Cid és eliminada mitjançant RNA_i (Figura I.6.B).

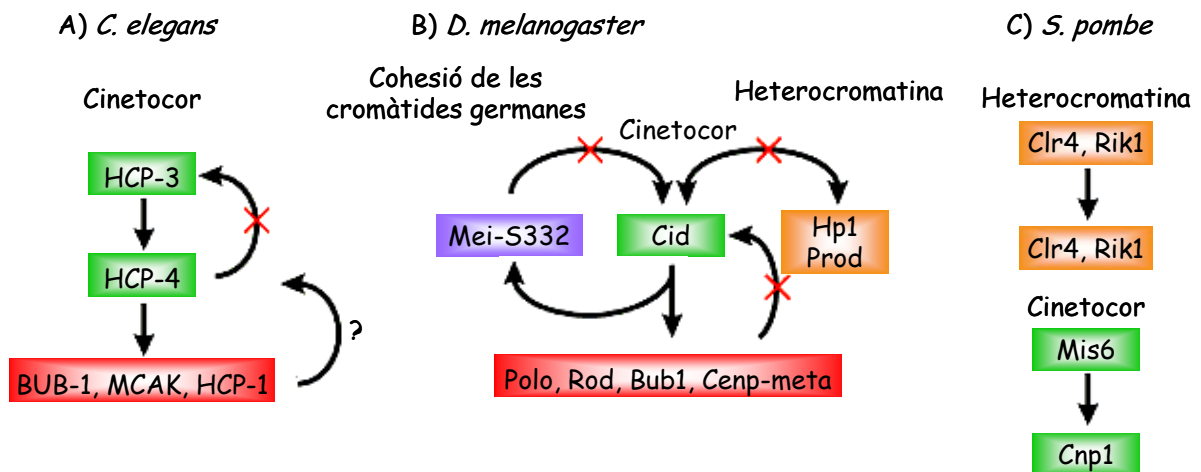


Figura I.6.- Relació entre les diferents proteïnes centromèriques pel que fa a la localització. Es resumeix la relació de dependència que hi ha entre les diferents proteïnes centromèriques pel que fa a la localització. **A)** A *C. elegans* el reclutament de les proteïnes de la part externa del cinetocor depèn de la presència d'HCP-4, qui a la vegada requereix la presència d'HCP-3 per a la seva localització, però no a la inversa. **B)** A *D. melanogaster* es requereix Cid pel reclutament de totes les proteïnes del cinetocor extern i les proteïnes necessàries per a la cohesió de les cromàtides germanes, però no per la localització de proteïnes a l'heterocromatina flanquejant. Cid localitza al centròmer en absència de totes aquestes proteïnes. **C)** *S. pombe* és l'únic organisme on s'ha vist que la deposició de la variant centromèrica de la histona H3 (Cnp1) depengui d'un altra proteïna: Mis6.(Sullivan et al. 2001)

No obstant, cal dir que a *S. pombe* sí que s'ha vist que la deposició de la variant centromèrica de la H3 (Cnp1) depèn de la presència d'una altra proteïna: Mis6 (veure apartat 2.3.2).

2.1.- Estructura de les variants centromèriques de la histona H3 (CenH3)

Les variants centromèriques de la histona H3 (CenH3) es caracteritzen per tenir un domini C-terminal amb plegament tipus histona (HFD) molt conservat, amb un 48% d'identitat entre elles i un 57% respecte la histona H3 i, en canvi, un extrem N-terminal, que va des de 27 fins a 196 aminoàcids, que no mostra una homologia significativa entre sí ni amb el de la histona H3 (Figura I.7). Una altra característica comuna als diferents homòlegs és que presenten una inserció de 2 a 6 aminoàcids al *loop* 1 entre les hèlixs 1 i 2 del domini C-terminal.

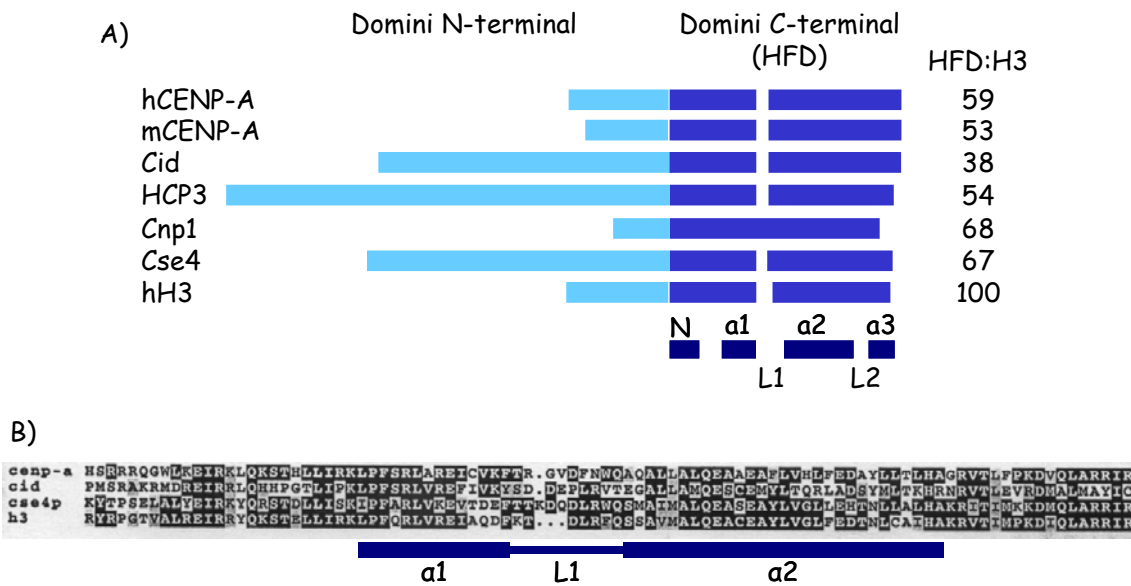


Figura 1.7.- Estructura de les variants centromèriques de la histona H3 (CenH3). **A)** Esquema de l'estructura de la família de les variants centromèriques de la histona H3. En blau fosc es mostra l'organització que adopta el domini C-terminal amb plegament tipus histona. A la dreta es mostra el percentatge d'homologia entre cada domini amb plegament tipus histona respecte el de la histona H3 (HFD:H3). **B)** Alineament del domini C-terminal amb plegament tipus histona de les variants centromèriques d'humans (CENP-A), *D. melanogaster* (CID) i *S. cerevisiae* (Cse4) respecte la histona H3. (Henikoff et al. 2000)

2.1.1.- El domini HFD és el responsable de la localització centromèrica

Donat que és en el domini N-terminal on les variants centromèriques presenten una major diferència respecte la histona H3 és fàcil pensar que és el responsable de la seva exclusiva localització centromèrica. Ara bé, estudis amb proteïnes quimèriques de CENP-A i H3 mostren que és el domini C-terminal amb plegament tipus histona (HFD) el que es requereix per la localització centromèrica de la proteïna (Sullivan *et al.* 1994). És més, estudis més recents amb proteïnes quimèriques, consistents en la proteïna Cid de *Drosophila bipectinata* amb substitucions al seu domini HFD pels corresponents residus de *Drosophila melanogaster*, han identificat el *loop 1* (Figura 1.7.B) com la regió responsable de la localització centromèrica (Vermaak *et al.* 2002).

Segons l'estructura cristal·logràfica que es va resoldre per un nucleosoma amb H3 (Luger *et al.* 1997), el *loop 1* de la histona H3 juntament amb el *loop 2* de la histona H4 formen un lloc d'unió a DNA (Figura 1.8 a l'apartat 2.2). Tal i com s'ha mencionat abans, les variants centromèriques presenten una inserció de 2 a 6 aminoàcids al *loop 1* entre les hèlixs 1

i 2 del HFD. A més, estudis amb *D. melanogaster* demostren que aquesta regió ha patit una adaptació evolutiva (Malik and Henikoff 2001; Malik *et al.* 2002). Llavors, podria ser que realment el HFD de CenH3 tingui un paper en el reconeixement específic de DNA centromèric.

A *S. cerevisiae* no s'ha estudiat directament com afecta a la localització però sí s'ha determinat que al llarg del HFD hi ha residus que són essencials per una correcta segregació cromosòmica, és a dir, que es requereixen per la funció centromèrica (Keith *et al.* 1999; Glowczewski *et al.* 2000).

2.1.2.- Quina és la funció de l'extrem amino-terminal?

Segons el que hem explicat a l'apartat anterior, l'extrem N-terminal de la variant centromèrica de la histona H3 no sembla ser el responsable de l'exclusiva localització d'aquestes proteïnes. Però no es pot descartar que tingui una funció, diferent que l'extrem N-terminal de la H3, relacionada amb la funció centromèrica. Per analogia a l'estructura de la H3 en un nucleosoma estàndard, l'extrem N-terminal deu estar situat fora del nucli nucleosomal i llavors, podria interaccionar, per exemple, amb proteïnes involucrades en les modificacions post-traduccionals de la cromatina, en l'ensamblatge del cinetocor o en la cohesió de les cromàtides germanes. A *S. cerevisiae* s'ha vist que l'extrem N-terminal és necessari per la viabilitat cel·lular (Keith *et al.* 1999) i que hi ha una part, un domini anomenat END de 33 aminoàcids, que sembla ser important perquè tinguin lloc interaccions entre Cse4 i el complex cinetocòric Ctf19-Mcm21-Okp1 (Ortiz *et al.* 1999; Chen *et al.* 2000). A més, en experiments de sobreexpressió de CENP-A a cèl·lules de mamífer, s'ha vist que l'extrem N-terminal és necessari pel reclutament ectòpic de CENP-C i HZwint-1, dos components del cinetocor (Van Hooser *et al.* 2001). Recentment, tot i que no s'ha demostrat que l'extrem N-terminal sigui el responsable, sí s'ha vist que quan Cid és sobreexpressada es deslocalitza i recluta proteïnes del cinetocor a llocs euromàtics (Heun *et al.* 2006).

Anàlisis evolutius amb diferents espècies de *Drosophila* han identificat 3 blocs conservats en l'extrem N-terminal de Cid (Malik *et al.* 2002). Dos d'ells, per analogia amb el domini END de Cse4, proposen que estan implicats en la interacció amb altres proteïnes del cinetocor. A més, en algunes espècies de *Drosophila* el domini N-terminal presenta una expansió d'oligopèptids que s'assemblen a motius d'unió al solc petit del DNA, com és el cas del motiu SPKK, present a les cues d'altres histones. Llavors, podria ser que l'extrem N-

terminal de les variants centromèriques de la H3 s'unissin al solc petit del DNA produint el mateix efecte que la histona H1: una neutralització de les càrregues dels fosfats que permetés el plegament de la superhèlix de DNA formant una estructura cromatínica més compacta.

2.2.- CenH3 substitueix a la histona H3 als nucleosomes centromèrics?

La contribució de la histona H3 a l'estructura del nucleosoma és molt important ja que forma part del seu nucli proteic central. Llavors, és molt probable que els nucleosomes que presenten una variant centromèrica de la histona H3 tinguin unes propietats específiques que siguin essencials per les característiques estructurals i funcionals de la cromatina centromèrica.

2.2.1- Evidències experimentals de l'existència de nucleosomes que contenen CenH3

Aquestes variants tenen propietats bioquímiques similars a les de la histona H3 i, és per això que s'ha suggerit que probablement la substitueixen en els nucleosomes centromèrics. De fet, durant el procés de purificació de CENP-A a partir de cèl·lules humanes aquesta cofracciona progressivament amb els nucleosomes, les histones i el tetràmer H3/H4 (Palmer *et al.* 1991). A més, hi ha varies evidències que suporten aquesta hipòtesi:

- En assajos d'immunoprecipitació amb anticossos contra CENP-A de la cromatina associada al cinetocor s'ha trobat que CENP-A està unida a seqüències de DNA d'aproximadament la mida nucleosomal, havent-se identificat el satèl·lit alfa com la principal seqüència present (Vafa and Sullivan 1997).
- Experiments amb CENP-A (Shelby *et al.* 1997) i Cse4 (Keith *et al.* 1999) han demostrat que ambdues proteïnes són capaces de formar homodímers *in vivo*.
- L'evidència més important és la demostració que CENP-A pot substituir la histona H3 en un sistema de reconstitució nucleosomal *in vitro*, formant una estructura nucleosomal que conté de 120 a 150 pb i quantitats equimolars d'histones H2A, H2B i H4 (Yoda *et al.* 2000).
- *In vivo* hi ha l'evidència de la interacció genètica entre Cse4 i la histona H4 (Glowczewski *et al.* 2000; Yoda *et al.* 2000).
- La proteïna de fusió Cid-GFP és reclutada específicament als centròmers mentre que H3-GFP és exclosa (Ahmad and Henikoff 2001).

– A cèl·lules humanes s'ha trobat que una regió de 330 kb de un neocentròmer està enriquida en CENP-A mentre que, a la vegada, està empobrida en histona H3 (Lo *et al.* 2001).

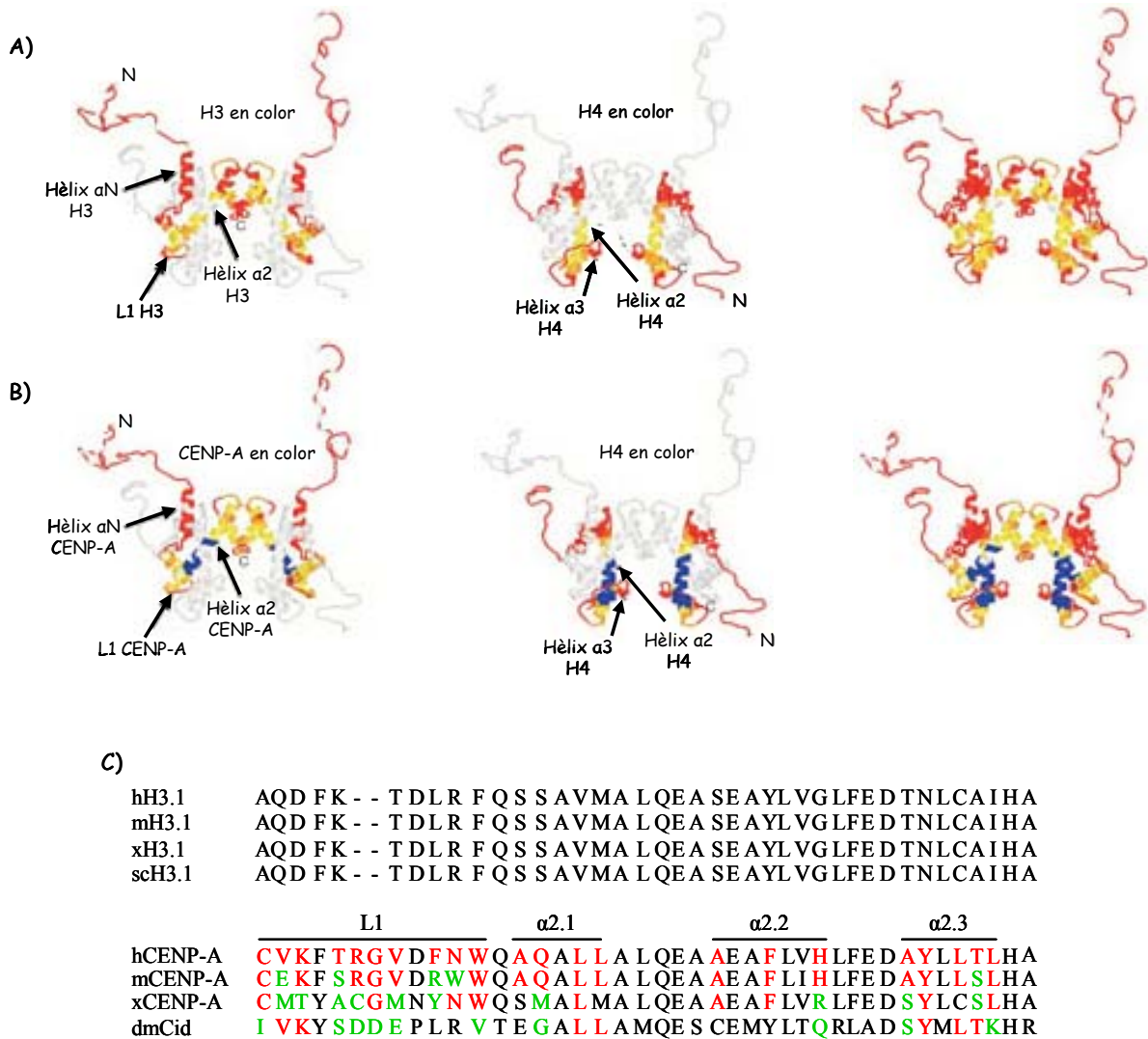


Figura 1.8.- Trets estructurals de la regió d'interacció entre CENP-A i la histona H4. **A, B)** Les dades d'intercanvi de deuteri estan representades a sobre de l'estructura coneguda del tetràmer H3-H4 i del model proposat pel tetràmer CENP-A-H4. El colors vermell, groc i blau indiquen una velocitat d'intercanvi ràpida, mitja o lenta, respectivament. **C)** Es mostra l'alineament de l'hèlix α_2 i el loop L1 de la histona H3 i variants centromèriques de diferents espècies. En vermell es marquen els llocs en que es diferencien respecte la H3 però estan conservats als diferents ortòlegs. En verd s'indiquen les substitucions que no es conserven ni respecte la histona H3 ni entre les diferents variants centromèriques (Black *et al.* 2004). dm, *Drosophila melanogaster*; h, human; m, mouse; sc, *Saccharomyces cerevisiae*; x, *Xenopus*.

2.2.2.- Estructura d'un possible nucleosoma amb CenH3

Mitjançant estudis d'espectrometria de masses i intercanvi de deuteri acoblats a mesures hidrodinàmiques s'ha determinat que CENP-A i la histona H4 formen tetràmers més compactes i conformacionalment més rígids que no pas els tetràmers H3·H4 (Black *et al.* 2004). Si tenim en compte el model cristal·logràfic pels tetràmers H3·H4 i CENP-A·H4 es pot observar com la interacció té lloc mitjançant l'hèlix $\alpha 2$ de la H3/CENP-A i les $\alpha 2$ i $\alpha 3$ de la H4 (Figura I.8). Precisament la regió que envolta aquesta unió, una tros de l'hèlix $\alpha 2$ i la regió *linker* del *loop* 1, es troba molt conservada a la histona H3 però és molt diferent respecte les variants centromèriques i, com s'ha mencionat abans, és la responsable de la localització centromèrica (veure apartat 2.1.1 d'aquest capítol). És aquesta regió la que dona rigidesa i compactació al nucleosoma als estudis *in vitro*. Podria ser que la presència d'aquests nucleosomes més compactes tingués com a funció la creació d'una plataforma amb la suficient rigidesa com perquè serveixi de base per la creació del cinetocor.

2.3.- Deposició de CenH3 a la regió centromèrica

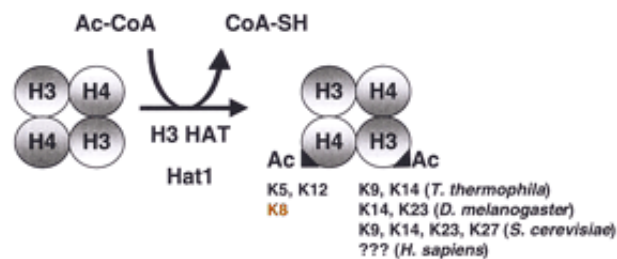
El mecanisme de deposició de les histones ha estat molt estudiat. Durant la fase S, alhora que es duplica el DNA i els nucleosomes parentals es reparteixen entre les cadenes filles, s'expressen en abundància noves histones que són immediatament incorporades. És a dir, la seva deposició és un procés lligat a replicació (Verreault 2000).

L'ensamblatge *de novo* de nucleosomes depenent de replicació és un procés que té lloc en varis passos. En primer lloc, les histones H3 i H4 acabades de sintetitzar s'associen entre elles i són acetilades als seus extrems N-terminal (Figura I.9.A). La histona H4 s'acetila a les lisines 5, 8 i 12 i aquest patró d'acetilació està molt conservat i s'ha trobat en organismes tan diversos com protozoous (*Tetrahymena*), *Drosophila* i humans (Sobel *et al.* 1995). L'enzim responsable de l'acetilació de les lisines 5 i 12 és Hat1, una histona acetiltransferasa tipus B (Verreault *et al.* 1998; Imhof and Wolffe 1999). A diferència de la histona H4, l'acetilació de la histona H3 quan és acabada de sintetitzar no presenta cap patró conservat entre espècies.

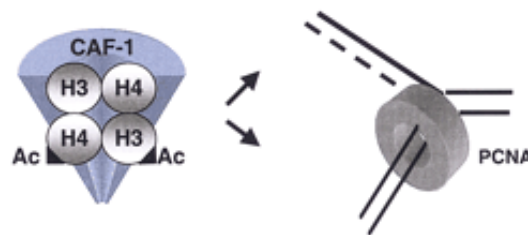
Un cop acetilades, el tetràmer H3·H4 s'uneix al complex de factors d'ensamblatge de cromatina CAF1 (*Chromatin assembly factor 1*) (Adams and Kamakaka 1999; Ridgway and Almouzni 2000) i és incorporat al DNA replicat (Figura I.9.B). Aquest complex sembla ser reclutat per la unió a PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*), que envolta el DNA motlle

a cada forqueta de replicació (Shibahara and Stillman 1999). Immediatament, les histones H3 i H4 són desacetilades. PCNA també porta a la forqueta de replicació la metiltransferasa Dnmt1 (Chuang *et al.* 1997), responsable del manteniment de la metilació de les illes CpG, la qual també s'uneix a la desacetilasa HDCA1 (Fuks *et al.* 2000). Sembla possible doncs que la interacció entre Dnmt1 i HDAC1 faciliti la desacetilació de les noves histones (Figura I.9.C).

A) Acetilació per HATs tipus B



B) Reclutament a la forqueta de replicació



C) Alliberament de CAF-1 i desacetilació d'histones

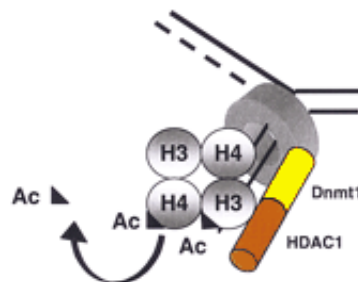


Figura I.9.- Model proposat per l'ensamblatge del tetràmer H3/H4 durant la replicació del DNA. A) Els dominis N-terminals de les histones H3 i H4 són acetilats. No se sap si l'acetilació té lloc abans o després de la formació del tetràmer. **B)** CAF-1 forma un complex estable amb les noves H3/H4 acetilades i les porta a la forqueta de replicació via PCNA. **C)** Després de la seva deposició, enzims amb activitat HDAC deuen desacetilar les noves H3/H4. Encara no s'ha demostrat però es creu que HDAC1 podria ser reclutada cap al nou DNA a l'interaccionar amb la metiltransferasa Dnmt1, un enzim que s'uneix a PCNA a la forqueta de replicació (Verreault 2000).

Finalment, després que s'hagin depositat els tetràmers d'H3·H4, s'afegeixen els dímers H2A·H2B. La seva deposició també sembla requerir la participació de factors d'ensamblatge. Hi ha varies evidències experimentals que suggereixen que una petita proteïna àcida, coneguda com a NAP-1 (*Nucleosome assembly protein 1*) podria ser la responsable (Ito *et al.* 1996; Chang *et al.* 1997; Ito *et al.* 1997).

2.3.1.- La deposició de CenH3 és independent de replicació

CENP-A ha de competir amb un excés d'histona H3 per la unió a la histona H4 i un cop formats els tetràmers CENP-A·H4 aquests han de competir amb els tetràmers H3·H4 per la seva deposició. Llavors, quin és el mecanisme que segueix la cèl·lula per aconseguir que la deposició de CenH3 tingui lloc exclusivament al centròmer? Al llarg d'aquests anys han sorgit varies hipòtesis. Un dels models suggerits per solucionar aquest problema de competició proposa que la identitat centromèrica deu ser propagada gràcies a que la replicació de la cromatina que conté CenH3 està acoblada a la seva síntesi al final de la fase S, quan els nivells d'histona H3 són més baixos i la resta de la cromatina ja no s'està replicant (Shelby *et al.* 1997) (Figura I.10.A). Ara bé, hi ha tota una sèrie de dades experimentals a varis organismes que estarien en contra d'aquest model ja que mostren que la replicació del DNA centromèric no té lloc d'una forma aïllada al final de la fase S i, que la deposició de CenH3 és independent de replicació.

A *S. cerevisiae* s'ha vist que el DNA centromèric replica al principi de la fase S (McCarroll and Fangman 1988). Els centròmers no són les primeres seqüències en replicar. De fet, s'ha vist que repliquen aproximadament quan porta un terç de la fase S juntament amb altres seqüències no centromèriques (McCarroll and Fangman 1988). Cse4 s'expressa a nivells baixos al llarg de tot el cicle cel·lular (Stoler *et al.* 1995), però no hi ha cap dada sobre quin és el moment en que és depositada a la cromatina i, per tant, si l'ensamblatge del centròmer està o no unit a la replicació del DNA.

El moment exacte de la replicació del DNA centromèric a *S. pombe* encara no s'ha descrit, no obstant tot sembla indicar que la deposició de CenH3 és independent de replicació. Cnp1 s'expressa des de la fase M fins a G1/S abans que tingui lloc el pic d'expressió de la histona H3 al començament de la fase S (Takahashi *et al.* 2000).

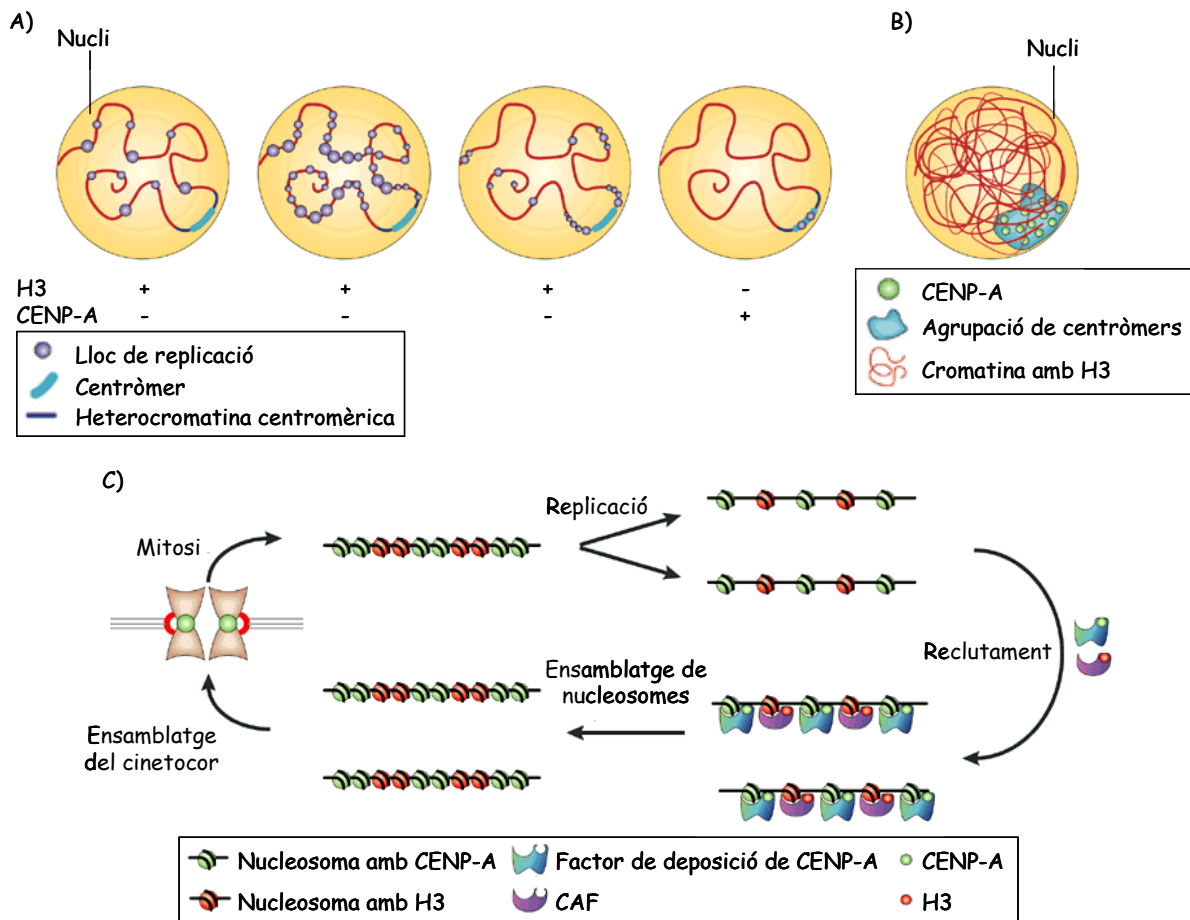


Figura I.10.- Models per la propagació de la identitat centromèrica. **A)** Model lligat a replicació segons el qual la regió centromèrica replica al final de la fase S, quan no hi ha H3 i sí CENP-A. **B)** Model lligat a l'organització nuclear segons el qual els centròmers es troben units i segrestats en dominis, sent els únics llocs on es dona l'ensamblatge de CENP-A. **C)** Model segons el qual durant la replicació CENP-A i H3 segreguen a les cromàtides germanes i els llocs són omplerts gràcies a factors d'ensamblatge que distingeixen entre CENP-A i H3 (Sullivan et al. 2001).

Estudis de l'expressió de CENP-A en cèl·lules humanes (Shelby et al. 2000) han mostrat que, mentre el pic d'expressió de la histona H3 té lloc a la primera meitat de la fase S, els nivells de CENP-A, tant d'mRNA com de proteïna, són alts al final de la fase S i G2. L'expressió inapropiada de CENP-A al principi de la fase S elimina la seva especificitat pel centròmer, indicant que la síntesi i/o la deposició deuen estar regulades de forma diferent a la de la resta d'histones per permetre la seva exclusiva localització centromèrica (Shelby et al. 1997). Podríem pensar que aquests resultats proporcionen evidències a favor del model per la

incorporació de CENP-A al centròmer acoblada a la replicació d'aquest (Figura I.10.A). No obstant, s'ha vist que la cromatina que conté CENP-A, a l'igual que a *S. cerevisiae*, no és ni la primera ni la última en replicar. Els centròmers humans repliquen de forma asincrònica durant la segona meitat de la fase S, alhora que altres DNAs no centromèrics (Shelby *et al.* 2000). És més, CENP-A és incorporada als centròmers en la fase G2 (Shelby *et al.* 1997; Shelby *et al.* 2000). Així doncs, la replicació del DNA centromèric a humans té lloc de forma asincrònica durant la fase S abans que CENP-A s'incorpori a la cromatina. Com a confirmació de la hipòtesi que l'ensamblatge de la cromatina centromèrica no està lligat a replicació, s'ha vist que CENP-A pot incorporar-se al centròmer inclús quan s'inhibeix la replicació de DNA (Shelby *et al.* 2000).

Pel que fa a *D. melanogaster* hi ha certa controvèrsia respecte el moment en què replica la regió centromèrica. Estudis *in vivo* mostren com els centròmers de *Drosophila* repliquen asincrònicament durant la segona meitat de la fase S, alhora que la cromatina que conté H3 (Sullivan and Karpen 2001). Ara bé, a estudis amb cèl·lules s'ha vist com els centròmers repliquen d'hora en el cicle cel·lular, mentre l'eucromatina s'està replicant, en dominis aïllats dins de l'heterocromatina, la qual replica més tard (Ahmad and Henikoff 2001; Ahmad and Henikoff 2002). Així doncs, no estan d'acord en el moment del cicle cel·lular en que la cromatina centromèrica és replicada però sí en que ho fa alhora que algunes regions eucromàtiques. És a dir, l'exclusiva deposició de Cid tampoc sembla estar lligada a replicació. És més, una altra dada a favor de la incorporació de Cid de forma independent de replicació és que, a l'igual que CENP-A, en experiments on s'inhibeix la replicació del DNA Cid és igualment incorporada al centròmer (Ahmad and Henikoff 2001).

Com s'ha explicat abans, la histona H3 és incorporada de forma dependent de replicació però existeix una variant, la histona H3.3 que és depositada a la cromatina d'una manera independent (Ahmad and Henikoff 2002). La histona H3.3 només varia respecte de la H3 en 4 aminoàcids (1 a l'extrem N-terminal i 3 al C-terminal) i localitza exclusivament a les regions transcripcionalment actives (Fretzin *et al.* 1991; Akhmanova *et al.* 1995). Així doncs, precisament aquest fet de poder ser incorporades de manera independent de replicació podria ser el que donés lloc a l'exclusiva localització de les dues variants de la histona H3.

2.3.2.- La deposició de CenH3 requereix la funció d'altres proteïnes

Un altre model per la propagació de la identitat centromèrica es basa en la organització nuclear i suggereix que la incorporació específica de CenH3 ve donada gràcies a que els centròmers es troben units en dominis aïllats del nucli on hi ha factors específics pel seu ensamblatge (Ahmad and Henikoff 2001) (Figura I.10.B), cosa que impediria la incorporació d'H3 als nucleosomes centromèrics. Estudis amb cèl·lules humanes i de *Drosophila* en interfase mostren que els centròmers no són segregats en dominis de replicació específics ni dominis nuclears (Sullivan and Shelby 1999; Shelby *et al.* 2000; Sullivan and Karpen 2001) però, en organismes com *S. pombe* sí s'han identificat proteïnes que són necessàries per la correcta deposició de Cnp1, cosa que dona suport a l'existència de factors d'ensamblatge específics (Figura I.10.C).

A *S. pombe* s'han identificat 2 complexos, Mis6-Mis15-Mis17-Sim4 i Mis16-Mis18, i el factor de transcripció Ams2 com a factors implicats en la correcta localització de Cnp1 al centròmer (Figura I.11). Mis6 s'uneix constitutivament a la regió central del centròmer (Saitoh *et al.* 1997) formant un complex amb Sim4 (Pidoux *et al.* 2003), Mis15 i Mis17 (Hayashi *et al.* 2004). La deleció de qualsevol d'elles provoca una reducció significativa de la localització de Cnp1 al centròmer i una disrupció del patró específic de digestió amb nucleasa micrococcal de la cromatina centromèrica. Recentment, també s'ha demostrat que el complex Mis6-Sim4 és necessari per la resposta a *check-point* d'unió al fus mitòtic depenent de Mad2 (Saitoh *et al.* 2005). Així doncs, el complex Mis6-Sim4 tindria una doble funció al centròmer: la incorporació de Cnp1 al centròmer i l'acumulació de Mad2 en la superfície dels cinetocors que no s'han unit al fus mitòtic. És a dir, aquest complex podria actuar com un intermediari que transmet la informació respecte el lloc d'unió del fus mitòtic i la via de deposició de Cnp1 (Saitoh *et al.* 2005). S'han trobat homòlegs de Mis6 des de llevats fins a humans. Ara bé, els homòlegs de Mis6 a pollastre (CENP-I) i *S. cerevisiae* (Ctf13) no semblen ser necessaris per la localització de la respectiva variant centromèrica de la histona H3 (Measday *et al.* 2002; Nishihashi *et al.* 2002).

Mis16 i Mis18 també es troben units a la regió centromèrica formant un complex que és essencial per la deposició de Cnp1 (Hayashi *et al.* 2004). Són el primer factor en la via d'ensamblatge del cinetocor ja que es troben associats al centròmer a tots els mutants de proteïnes cinetocòriques (Hayashi *et al.* 2004). És a dir, el complex Mis16-Mis18 és requerit tant per la localització centromèrica del complex Mis6-Sim4 com per la localització de Cnp1.

Mis16 és una proteïna amb repeticions WD, conservada evolutivament i que presenta un 50-53% d'identitat amb les proteïnes humanes RbAp46 i RbAp48 (Hayashi *et al.* 2004). RbAp48, a part de trobar-se unida a la proteïna supressora de tumors de retinoblastoma (Rb), ha sigut identificada com a component del factor d'ensamblatge de cromatina CAF-1 (Smith and Stillman 1989) i, com a component de varis complexos amb activitat desacetilasa d'histones, com són HD1 (Taunton *et al.* 1996), Mi2-NuRD (Tong *et al.* 1998; Wade *et al.* 1999) i Sin3 (Bird and Wolffe 1999). A *S. pombe* els nucleosomes de la regió centromèrica es caracteritzen pel seu estat hipoacetilat i s'ha vist que per mantenir aquest estat és necessari el complex Mis16-Mis18 (Hayashi *et al.* 2004). Així, podria ser que l'estat hipoacetilat de les histones centromèriques fos un requisit per la deposició de Cnp1 i es podria aconseguir gràcies al reclutament de desacetilases via Mis16.

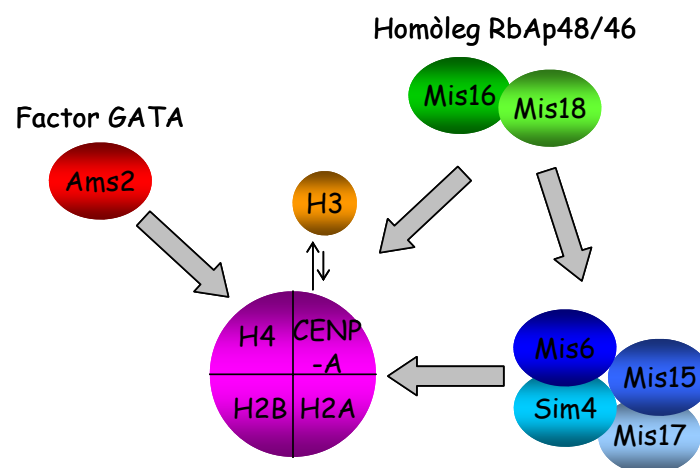


Figura I.11.- Factors responsables de la localització centromèrica de Cnp1, la variant centromèrica de la histona H3 de *Schizosaccharomyces pombe*. Ams2 és un factor de transcripció tipus GATA que s'encarrega de la deposició de Cnp1 acoblada a replicació i de l'activació de la transcripció dels gens de les histones. Mis6-Sim4 formen part d'un subcomplex centromèric constituït que és necessari per la localització de Cnp1 al llarg del cicle cel·lular. El complex Mis16-Mis18 és necessari per la unió de Cnp1 i el complex de Mis6 als centròmers i, a més, té un paper important en el manteniment de l'estat hipoacetilat de les histones a la regió central dels centròmers. (Takahashi *et al.* 2005)

L'altre component de la via de deposició de Cnp1 és Ams2, un factor GATA regulat pel cicle cel·lular (Chen *et al.* 2003). La localització centromèrica de Cnp1 disminueix al deletar el gen *ams2*⁺, i al sobreexpressar Ams2, Cnp1 es relocalitza, però no afecta a la

localització d'altres proteïnes centromèriques com són Mis6 i Mis12. Mitjançant assajos d'immunoprecipitació de cromatina s'ha vist que aquest probable factor de transcripció, que pertany a una família de proteïnes implicades en la remodelació de nucleosomes, s'uneix a la regió central del centròmer. Potser Ams2 desestabilitza el contacte entre el DNA centromèric i els octàmers d'H3 incorrectament incorporats i aquesta remodelació augmenta l'eficàcia del reclutament de Cnp1 al centròmer (Figura I.12.A). Ara bé, tot i que el centròmer s'ha considerat en general com una regió transcripcionalment inactiva, s'ha vist que la regió centromèrica externa transcriu RNAs que són processats per la maquinària de RNA d'interferència i que estan implicats en la formació d'heterocromatina (Reinhart and Bartel 2002; Volpe *et al.* 2002). Llavors, és possible que el factor de transcripció Ams2 estigui directament involucrat en la transcripció d'algun RNA centromèric no identificat, el qual ajudi a la incorporació de Cnp1 (Figura I.12.B). És a dir, la transcripció i/o la remodelació de nucleosomes podrien ser importants per la correcta incorporació de Cnp1 al centròmer de *S. pombe*.

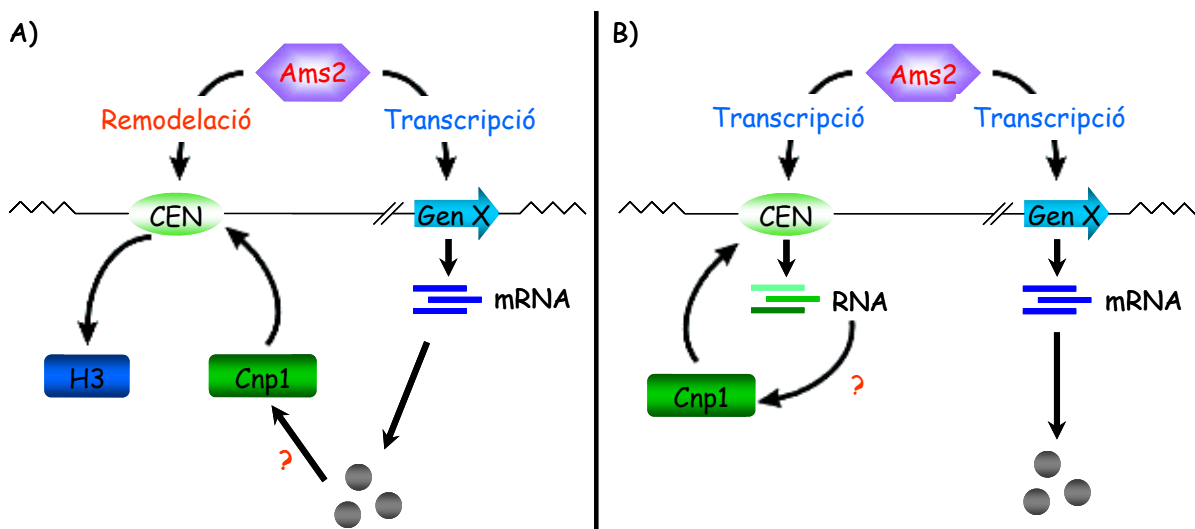


Figura I.12.- Hipòtesi sobre la possible funció d'Ams2 al centròmer de *Schizosaccharomyces pombe*.
A) Ams2 pot estar actuant com un remodelador de la cromatina centromèrica a la vegada que pot estar activant la transcripció de gens implicats en la deposició de Cnp1, la variant centromèrica de la histona H3. **B)** Ams2 pot estar activant la transcripció d'algun RNA centromèric involucrat en la deposició de Cnp1. (Chen *et al.* 2003)

A *S. cerevisiae* una de les proteïnes que formen part del complex centromèric CBF3, Cbfl, també és un factor de transcripció (Hemmerich *et al.* 2000), cosa que podria donar suport a aquesta teoria que relaciona la transcripció en la regió centromèrica amb la deposició de CenH3s.

Una altra proteïna implicada en la deposició de Cnp1 és Hrp1 (*helicase-related protein*) però el fet que el seu mutant i el de Ams2 no presentin efectes acumulatius en el creixement suggereix que formen part de la mateixa via (Walfridsson *et al.* 2005). Mitjançant assajos d'immunoprecipitació de cromatina s'ha vist que es troba unida a la regió central dels centròmers i el seu mutant presenta una disminució dels nivells de Cnp1. Hrp1 pertany a la família de proteïnes remodeladors de cromatina CHD (*Chromo-helicase/ATPase DNA binding*)-Mi2. A humans hi ha quatre proteïnes CHD de les quals dues, CHD3 i CHD4, formen part del complex Mi2 (Zhang *et al.* 1998), el qual es sap que s'uneix als centròmers (Brown *et al.* 1997) (Kim *et al.* 1999). El complex CHD-Mi2 va ser copurificat a humans i *Xenopus* juntament amb HDACs i RbAp46/48, suggerint que els factors remodeladors de cromatina faciliten la desacetilació de les histones (Tong *et al.* 1998; Wade *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1998). És més, en experiments *in vitro*, s'ha demostrat que l'activitat remodeladora de cromatina de Mi2 és necessària per la subseqüent desacetilació d'histones. Així, podria ser que Hrp1, a l'igual que s'ha mencionat abans per Mis16, promoguéssin l'activitat de les desacetilases donant lloc a un estat hipoacetilat de les histones que afavoreix la incorporació de Cnp1.

Per últim, a *S. pombe* s'ha vist que Cnp1 pot incorporar-se al DNA en dos moments del cicle cel·lular: durant la fase S i durant G2, just abans d'entrar a la fase M, i les proteïnes implicades són Ams2 i Mis6, respectivament (Takahashi *et al.* 2005).

2.4.- Modificacions post-traduccionals

Els extrems N-terminal de les histones H2A, H2B, H3 i H4 pateixen una sèrie de modificacions post-traduccionals. La gran diversitat química d'aquestes, incloent acetilació, metilació, ribosilació, fosforilació i ubiquitinació, ha portat a la creació de la hipòtesi sobre l'existència d'un codi d'histones (Strahl and Allis 2000). Segons aquesta hipòtesi les modificacions creen canvis en la densitat de càrrega de les cues de les histones, la qual cosa modula la interacció amb el DNA, amb altres histones i amb altres proteïnes, tenint cada

modificació i cada conjunt de modificacions una funció diferent. Per exemple, com ja s'ha mencionat anteriorment, la metilació de la lisina 4 de la histona H3 es troba associada amb cromatina transcripcionalment activa mentre que la metilació de la lisina 9, també de la histona H3, es correlaciona amb una cromatina transcripcionalment silenciada (Fischle *et al.* 2003) (Jenuwein and Allis 2001). A més, diferents estats de metilació d'un mateix aminoàcid proporciona una manera més de regulació. Per exemple, la dimetilació de la lisina 4 de la histona H3 està associada a cromatina "permissiva", és a dir, que és potencialment activa, i la trimetilació a activitat transcripcional (Bernstein *et al.* 2002) (Santos-Rosa *et al.* 2002; Schneider *et al.* 2004). I, la di-trimetilació de la lisina 9 de la H3 marquen l'heterocromatina facultativa i constitutiva, respectivament (Peters *et al.* 2003; Rice *et al.* 2003).

Pel que fa a les variants centromèriques de la histona H3, mitjançant programes informàtics s'han predit també moltes modificacions post-traduccionals als seus extrems N-terminals (Figura I.13.B) però experimentalment les úniques que s'ha trobat són la fosforilació de la serina 7 de CENP-A a humans (Zeitlin *et al.* 2001) i la fosforilació de la serina 50 a blat de moro (Zhang *et al.* 2005).

Tot i que l'extrem N-terminal de CENP-A presenta molt poca homologia tant respecte als altres membres de la família com a la histona H3, un domini d'11 aminoàcids al voltant de la serina 7 es troba conservat al voltant de la serina 10 de la histona H3 i als extrems N-terminals d'altres variants centromèriques, com és el cas de Cid (Figura I.13.A).

La quinasa responsable de la fosforilació de la serina 10 de la histona H3 i de la serina 7 de CENP-A és Aurora B, la qual es localitza al centròmer durant la metafase i a l'anafase se'n va al fus (Hsu *et al.* 2000; Giet and Glover 2001; Zeitlin *et al.* 2001). Ara bé, les seves fosforilacions no tenen lloc alhora sinó que es poden distingir 3 fases: primer té lloc la fosforilació de la histona H3 de l'heterocromatina pericentromèrica al final de G2, després s'estén al llarg dels braços cromosomals (Hendzel *et al.* 1997) i, per últim, té lloc la fosforilació de CENP-A, la qual comença a detectar-se a profase, es manté a metafase i comença a desaparèixer a anafase, abans que es completi la defosforilació de la histona H3, sent les dues indetectables a telofase (Zeitlin *et al.* 2001).

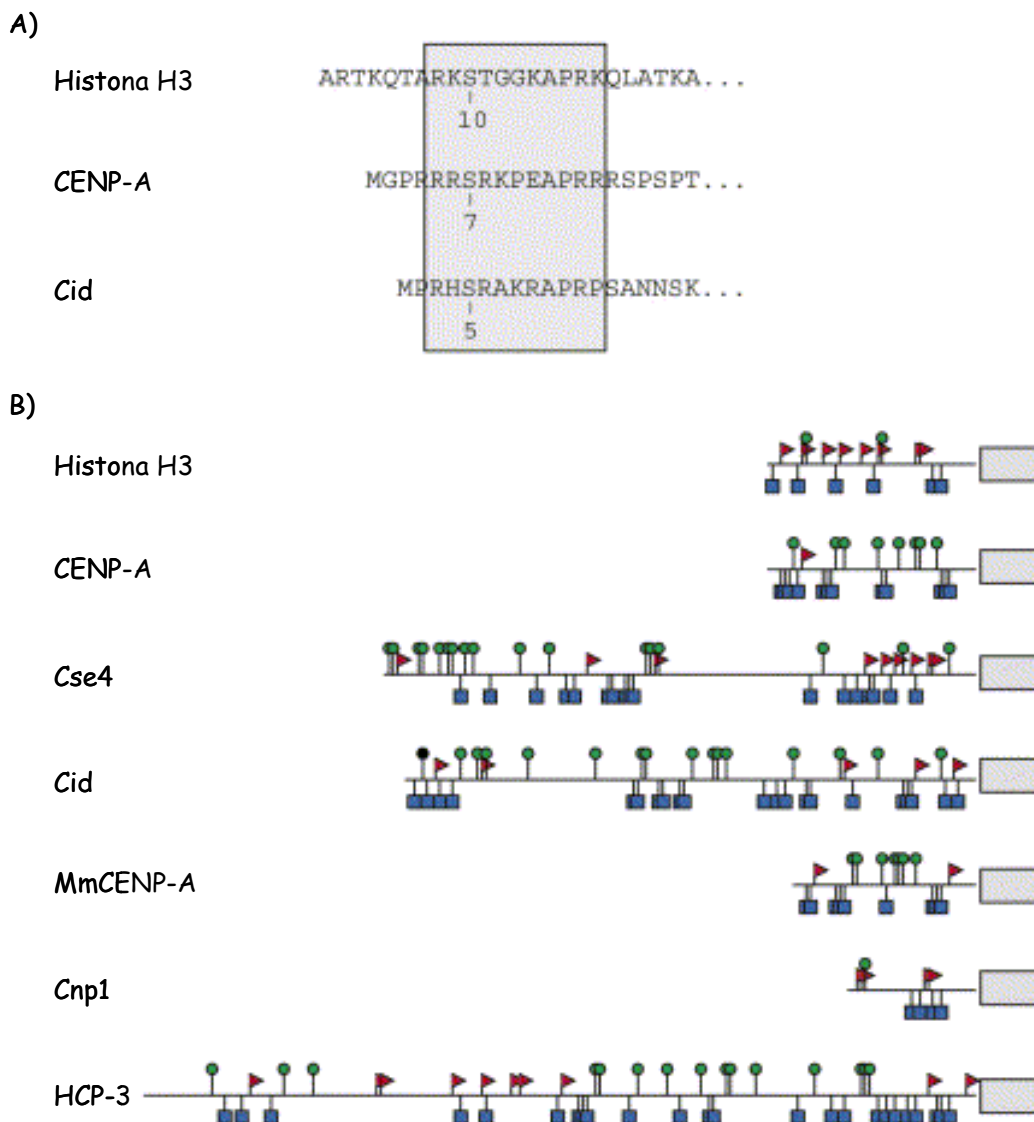


Figura I.13.- Possibles modificacions post-traduccionals de les variants centromèriques de la histona H3. A) L'alineament de la seqüència amino-terminal de la histona H3, CENP-A i Cid mostra la similitud en la regió al voltant del possible lloc de fosforilació. En el cas de la histona H3 i de CENP-A ha estat demostrat. **B)** Possibles llocs de modificació post-traduccionals a l'extrem amino-terminal de les variants centromèriques de la histona H3. En vermell es marquen les lisines, les serines en verd i les arginines en blau (Smith 2002).

La fosforilació de la serina 10 de la histona H3 té un paper important en la condensació dels cromosomes mitòtics (Wei *et al.* 1998; Wei *et al.* 1999; Hsu *et al.* 2000). En absència de la fosforilació de la serina 10 de la histona H3 la condensació cromosòmica és incompleta i la separació dels cromosomes a anafase presenta molts defectes (Wei *et al.* 1999;

Hsu *et al.* 2000). La fosforilació de CENP-A s'observa després de la duplicació del centròmer però abans de la unió dels microtúbuls, per tant, no sembla tenir cap paper en l'ensamblatge de la cromatina centromèrica però sí podria estar implicada en l'ensamblatge o la maduració del cinetocor ja que és necessària pel correcte alineament dels cromosomes (Kunitoku *et al.* 2003).

Com s'ha mencionat abans, aquest motiu consens de fosforilació per Aurora B no es troba a totes les variants centromèriques de la histona H3. Ara bé, totes presenten als seus extrems N-terminals regions riques en lisines, arginines, serines i treonines, és a dir, potencials llocs per acetilació, metilació i fosforilació, respectivament (Figura I.12.b). Llavors, podria ser que la funció de la fosforilació de la serina 7 de CENP-A l'estigui exercint la modificació d'un altre residu de l'extrem N-terminal. La fosforilació de la serina 50 de la variant centromèrica de la histona H3 a blat de moro podria ser un exemple (Zhang *et al.* 2005). Aquesta modificació és l'equivalent de la fosforilació de la serina 28 de la histona H3, la qual comença a detectar-se a profase i també és realitzada per Aurora B (Goto *et al.* 2002).

III.- OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball ha estat aprofundir en el coneixement de l'estructura i funció de la cromatina centromèrica que, tal i com s'ha discutit a la introducció, té una contribució essencial en la segregació cromosòmica. Aquest treball s'ha centrat en l'estudi de la variant centromèrica de la histona H3 de *Drosophila melanogaster* (Cid). Concretament, hem volgut aprofundir en els mecanismes que determinen la localització centromèrica de Cid.

IV.- MATERIALS I MÈTODES

1.- MATERIALS

1.1.- Soques i línies cel·lulars

1.1.1.- Soques bacterianes d'*Escherichia coli*

A continuació es detallen les soques bacterianes emprades en aquest treball (Sambrook *et al.* 1989):

• Soques per a l'amplificació de plasmidis:

• HB101 → *supE44 hsdS20* ($r^-_B m^-_B$) *recA13 ara14 proA2 lacY1 galk2 rpsL20 xyl-5 mtl-1*

• DH5 α → *deoR endA1 gyrA96 hsdR17* ($r^-_K m^-_K$) *recA1 relA1 supE44 thi-1 F'*[*traD36 proAB⁺ lac1^q lacZ Δ M15*]

• Soques per a l'expressió de proteïnes:

• BL21 (DE3) → *BF⁻ dcm ompT hsdS* ($r^-_B m^-_B$) *gal λ* (DE3)

• BL21 (DE3) LysS → *BF⁻ dcm ompT hsdS* ($r^-_B m^-_B$) *gal λ* (DE3) [*pLysS/E Cam^r*]

1.1.2.- Línies cel·lulars eucariotes: cèl·lules Kc de *Drosophila melanogaster*

La línia cel·lular Kc (Kc(167)) va ser una de les primeres línies de *Drosophila melanogaster* establertes per cultius *in vitro* (Echalier and Ohanessian 1969) i actualment és la més emprada, junt amb la línia Schneider 2 (SL2 o S2). Deriva de cèl·lules d'embrions de 8 a 12 hores de la segona generació filial obtinguda del creuament entre mosques mutants *ebony* i *sepia*. Són d'aspecte esfèric, creixen en suspensió formant grumolls i el seu cicle cel·lular és d'aproximadament 20 hores.

1.2.- DNAs plasmídics utilitzats en aquest treball

A continuació es detalla com es van obtenir cadascun dels plasmidis emprats en aquest treball i a la taula M1 (al final d'aquest apartat) es resumeixen les principals característiques dels vectors més importants i els experiments en què s'han emprat, indicant l'apartat del capítol de resultats on es descriuen.

1.2.1.- Vectors de clonatge

- **pBluescript II SK (+)** (Stratagene). Aquest vector ha estat utilitzat com a pas intermedi de clonatge.

- **pBSCid** → Vector on es va clonar i seqüenciar el cDNA de Cid. Aquest cDNA va ser amplificat per PCR a partir de DNA genòmic de *Drosophila melanogaster* (veure apartat 2.7.1) mitjançant els oligonucleòtids CID5 i CID3. Aquests oligonucleòtids contenen mutacions respecte la seqüència original de manera que generen dianes pels enzims de restricció XbaI i BamHI, respectivament. El fragment de PCR va ser clonat al vector pBluescript II SK per aquestes mateixes dianes.

- **pBSPpa** → Vector cedit pel Dr. Michael Weir. Conté el cDNA de Ppa clonat entre les dianes NotI i HindII.

- **pGEM[®]-T *easy vector*** (Promega). Aquest vector permet el clonatge de fragments que han sigut amplificats per PCR mitjançant enzims que, com la Taq polimerasa, generen productes amb una desoxiadenina protuberant a l'extrem 3'.

- **pGEM-Cid** → El cDNA de Cid va ser amplificat per PCR a partir del vector pBSCid amb els oligonucleòtids pBSCid23 i pBSCid704, els quals contenen mutacions respecte la seqüència original de manera que generen dianes pels enzims de restricció SmaI i Sall.

- **pGEM-CidNt bis** → El cDNA de l'extrem amino-terminal de Cid va ser amplificat a partir del plasmidi pBSCid mitjançant els oligonucleòtids pBSCid23 i pBSCid3N. Aquests contenen dianes pels enzims de restricció SmaI i KpnI, respectivament.

- **pGEM-CidCt** → L'extrem carboxi-terminal de Cid va ser amplificat a partir del vector pBSCid mitjançant els oligonucleòtids CidCt5 i pBSCid3, els quals presenten dianes per NdeI i BglII, respectivament.

- **pGEM-Ppa** → El cDNA de Ppa va ser amplificat amb els oligonucleòtids Ppa-dir i LRR3' fent servir com a DNA motlle el plasmidi pBSPpa. Aquests encebadors contenen dianes pels enzims de restricció EcoRI i BglII, respectivament.

- **pGEM-ΔLRRs** → El domini ΔLRRs de Ppa va ser amplificat a partir del vector pBSPpa fent servir els oligonucleòtids ΔLRR5' i ΔLRR3', els quals contenen dianes pels enzims NdeI i BglII, respectivament.

- **pGEM-LRRs** → El domini LRRs de Ppa va ser amplificat a partir del vector pBSPpa fent servir els oligonucleòtids LRR5' i LRR3', els quals contenen dianes pels enzims NdeI i BglII, respectivament.
- **pGEM-ΔLRRs bis** → El domini ΔLRRs va ser amplificat a partir del vector pBSPpa fent servir els oligonucleòtids Ppa-dir i ΔLRR3', els quals contenen dianes pels enzims EcoRI i BglII, respectivament.
- **pGEM-LRRs bis** → El domini LRRs va ser amplificat a partir del vector pBSPpa fent servir els oligonucleòtids Ppa-LRR i LRR3', els quals contenen dianes pels enzims de restricció EcoRI i BglII, respectivament.
- **pGEM-CidProm** → El promotor de Cid va ser amplificat a partir de DNA genòmic de mosques *oregon* de *D. melanogaster* mitjançant els oligonucleòtids Cidprom5 i Cidprom3, els quals contenen dianes pels enzims de restricció XbaI i NheI, respectivament.
- **pGEM-N_{H3}** → L'extrem amino-terminal de la histona H3 de *D. melanogaster* es va amplificar amb els oligonucleòtids Nt(H3)5' i Nt(H3)3', els quals contenen dianes pels enzims de restricció NheI i NdeI, fent servir com a motlle DNA genòmic de mosques *oregon* de *D. melanogaster*.
- **pGEM-HFD_{H3}** → L'extrem carboxi-terminal de la histona H3 de *D. melanogaster* es va amplificar amb els oligonucleòtids HFD(H3)5' i HFD(H3)3', els quals contenen dianes per l'enzim de restricció BamHI, fent servir com a motlle DNA genòmic de mosques *oregon* de *D. melanogaster*.
- **pGEM-N_{H3}HFD_{Cid}** → L'extrem amino-terminal de la histona H3 va ser obtingut per digestió NheI/NdeI a partir del vector pGEM-N_{H3}, i l'extrem carboxi-terminal de Cid va ser obtingut a partir de pET-CidCt per digestió amb NdeI/BglII. Després van ser lligats i el producte es va amplificar per PCR amb els oligonucleòtids Nt(H3)5' i pBSCid3.
- **pGEM-N_{CSE4}** → L'extrem amino-terminal de la variant centromèrica de la histona H3 de *S. cerevisiae* va ser amplificat a partir de DNA genòmic cedit pel Dr. Francesc Xavier Marsellach mitjançant els oligonucleòtids Nt(Cse4p)5' i Nt(Cse4p)3', els quals contenen dianes pels enzims de restricció NheI i VspI, respectivament.
- **pCR[®]2.1-TOPO[®]** (Invitrogen). Aquest vector, a l'igual que el pGEM[®]-T *easy vector* (Promega), permet el clonatge de fragments amplificats per PCR amb enzims que, com la Taq polimerasa, generen productes amb una desoxiadenina protuberant a l'extrem 3'.

- **pTOPO-N_{CSE4}HFD_{Cid}** → L'extrem amino-terminal de la variant centromèrica de la histona H3 de *S. cerevisiae* va ser obtingut a partir del vector pGEM-N_{CSE4} per digestió amb NheI/VspI, i l'extrem carboxi-terminal de Cid va ser obtingut a partir de pET-CidCt per digestió amb NdeI/BglII. Després van ser lligats (VspI i NdeI tenen dianes amb extrem compatibles) i el producte es va amplificar per PCR amb els oligonucleòtids Nt(Cse4p)5' i pBSCid3.

- **pTOPO-N_{CNP1}HFD_{Cid}** → Per obtenir l'extrem amino-terminal de la variant centromèrica de la histona H3 de *S. pombe* es van dissenyar dos oligonucleòtids, Nt(Cnp1)5 i Nt(Cnp1)3, de manera que a l'hibridar-los entre ells s'obtenia la seqüència desitjada amb l'extrem 3' rom i un extrem 5' protuberant que contenia una diana per l'enzim de restricció NheI. L'extrem carboxi-terminal de Cid va ser obtingut a partir de pET-CidCt per digestió amb NdeI/BglII. Es van lligar tots dos i el producte va ser amplificat amb els oligonucleòtids Nt(Cnp1)5 i pBSCid3.

1.2.2.- Vectors d'expressió a *Escherichia coli*

- **pET29b** (Novagen). Aquest plasmidi permet l'obtenció de proteïnes fusionades amb una cua de 6 histidines en posició carboxi-terminal.

- **pET-Cid** → El cDNA de Cid va ser amplificat a partir del vector pBSCid amb els oligonucleòtids pBSCid5 i pBSCid3, els quals contenen dianes pels enzims de restricció NdeI i BglIII, respectivament. El producte obtingut va ser digerit amb aquests enzims i clonat al pET29b per les mateixes dianes.

- **pET-CidNt** → L'extrem amino-terminal de Cid va ser amplificat a partir del vector pBSCid amb els oligonucleòtids pBSCid5 i pBSCid3N, els quals contenen dianes pels enzims de restricció NdeI i KpnI, respectivament. El producte obtingut va ser digerit amb aquests enzims i clonat al pET29b per les mateixes dianes.

- **pET-CidCt** → L'extrem carboxi-terminal de Cid va ser obtingut per digestió del vector pGEM-CidCt amb els enzims de restricció NdeI i BglII i clonat al pET29b per les mateixes dianes.

- **pET-ΔLRRs** → El domini ΔLRRs de Ppa va ser obtingut a partir del vector pGEM-ΔLRRs per digestió NdeI/BglII i inserit al pET29b per les mateixes dianes.

- **pET-LRRs** → El domini LRRs de Ppa va ser obtingut a partir del vector pGEM-LRRs per digestió NdeI/BglII i clonat al pET29b per les mateixes dianes.

- **pGEX-KG** (Amersham-Pharmacia-Biotech). Vector que permet l'expressió de proteïnes fusionades pel seu extrem amino-terminal a la Glutatió S-transferasa (GST).

- **pGST-Cid** → El cDNA de Cid va ser obtingut a partir del vector pGEM-Cid per digestió SmaI/SalI i clonat al pGEX-KG per les mateixes dianes.

- **pGST-CidNt** → L'extrem amino-terminal de Cid va ser obtingut a partir del vector pGBT-CidNt per digestió amb SmaI/SalI i clonat al pGEX-KG per les mateixes dianes.

- **pGST-Ppa** → Ppa va ser obtingut a partir del vector pBSPpa per digestió amb NdeI i SacI. L'extrem NdeI es va fer rom amb *Klenow* i es clonar al pGEX-KG per SmaI/SacI.

- **pGST-ΔLRRs** → El domini ΔLRRs de Ppa va ser obtingut a partir del vector pET-ΔLRRs per digestió NdeI/BglII. Llavors, es van fer els extrems roms amb *Klenow* i es va clonar al pGEX-KG per SmaI.

- **pGEX-4T-3** (Amersham-Pharmacia-Biotech). Vector que permet l'expressió de proteïnes fusionades pel seu extrem amino-terminal a la Glutatió S-transferasa (GST).

- **pGST-CidCt** → L'extrem carboxi-terminal de Cid va ser obtingut per digestió EcoRI a partir del plasmidi pGEM-CidCt. Es van fer els extrems roms amb *Klenow* i es va clonar al pGEX-4T-3 per SmaI.

- **pGST-LRRs** → El domini LRRs de Ppa va ser obtingut per digestió amb EcoRI a partir del plasmidi pGEM-LRRs. Es van fer els extrems roms amb *Klenow* i es va inserir al pGEX-4T-3 per SmaI.

1.2.3.- Vectors d'expressió a Kc

- **pEYFP-N1** (Clontech). Plasmidi que permet l'expressió a cèl·lules eucariotes de proteïnes fusionades pel seu extrem carboxi-terminal a EYFP (*Enhancer Yellow fluorescent protein*). EYFP és una variant de la proteïna fluorescent GFP (*Green fluorescent protein*) d'*Aequorea victoria* que conté 4 substitucions aminoacídiques.

- **pYFP** → A aquest plasmidi el promotor de CMV (Cytomegalovirus) present al vector pEYFP-N1 original va ser substituït pel promotor de Cid. Per això, es va obtenir el promotor de Cid per digestió XbaI/NheI a partir del plasmidi pGEM-Cidprom i es va fer rom amb *Klenow* l'extrem originat per la digestió amb XbaI. Llavors, es va clonar al pEYFP-N1, el qual s'havia digerit amb VspI, s'havia fet l'extrem rom amb *Klenow* i s'havia digerit amb NheI per eliminar el promotor de CMV i crear extrems compatibles pel de Cid.

• **pCid-YFP** → El cDNA de Cid va ser obtingut a partir de pET-Cid per digestió amb NdeI i BglII, havent fet rom amb T4 polimerasa l'extrem corresponent a la digestió amb NdeI. Aleshores va ser clonat al vector pYFP, el qual es va digerir amb NheI, es va fer l'extrem rom amb T4 polimerasa i es va digerir amb BglII. Finalment, aprofitant que les digestions amb BglII i BamHI deixen extrems compatibles, es va digerir el vector obtingut amb aquests enzims per tal d'eliminar el gran tros de MCS (*Multicloning site*) que quedaria entre Cid i YFP.

• **pN_{Cid}-YFP** → L'extrem amino-terminal de Cid va ser obtingut a partir del vector pGEM-CidNt bis per digestió amb SmaI i KpnI, havent fet rom amb T4 polimerasa l'extrem corresponent a la digestió amb KpnI. Aleshores va ser clonat al vector pYFP per SmaI.

• **pHFD_{Cid}-YFP** → L'extrem carboxi-terminal de Cid va ser obtingut a partir de pET-CidCt per digestió amb NdeI i BglII, havent fet rom amb T4 polimerasa l'extrem corresponent a la digestió amb NdeI. Aleshores va ser clonat al vector pYFP, el qual es va digerir amb NheI, es va fer l'extrem rom amb T4 polimerasa i es va digerir amb BglII. Finalment, aprofitant que les digestions amb BglII i BamHI deixen extrems compatibles, es va digerir el vector obtingut amb aquests enzims per tal d'eliminar el gran tros de MCS (*Multicloning site*) que quedaria entre l'extrem C-terminal de Cid i YFP.

• **pN_{Cid}HFD_{H3}-YFP** → L'extrem carboxi-terminal de la histona H3 va ser obtingut a partir del plasmidi pGEM-HFD_{H3} per digestió amb BamHI i clonat al pN_{Cid}-YFP per la mateixa diana.

• **pN_{H3}HFD_{Cid}-YFP** → La proteïna quimèrica N_{H3}HFD_{Cid} va ser obtinguda a partir del vector pGEM-N_{H3}HFD_{Cid} per digestió NheI/BglII i clonada al pYFP per les mateixes dianes. Finalment, aprofitant que les digestions amb BglII i BamHI deixen extrems compatibles, es va digerir el vector obtingut amb aquests enzims per tal d'eliminar el gran tros de MCS (*Multicloning site*) que quedaria entre la proteïna quimèrica i YFP.

• **pN_{CSE4}HFD_{Cid}-YFP** → La proteïna quimèrica N_{CSE4}HFD_{Cid} va ser obtinguda a partir del vector pTOPO-N_{CSE4}HFD_{Cid} per digestió NheI/BglII i clonada al pYFP per les mateixes dianes. Finalment, aprofitant que les digestions amb BglII i BamHI deixen extrems compatibles, es va digerir el vector obtingut amb aquests enzims per tal d'eliminar el gran tros de MCS (*Multicloning site*) que quedaria entre la proteïna quimèrica i YFP.

• **pN_{CNP1}HFD_{Cid}-YFP** → La proteïna quimèrica N_{CNP1}HFD_{Cid} va ser obtinguda a partir del vector pTOPO-N_{CNP1}HFD_{Cid} per digestió NheI/BglII i clonada al pYFP per les

mateixes dianes. Finalment, aprofitant que les digestions amb BglIII i BamHI deixen extrems compatibles, es va digerir el vector obtingut amb aquests enzims per tal d'eliminar el gran tros de MCS (*Multicloning site*) que quedaria entre la proteïna quimèrica i YFP.

Plasmidi	Característiques	Ús
pBSPpa	Transcripció del cDNA de Ppa sota el control del promotor de la RNA pol T7	IVT (apartat 2.1)
pET-ALRRs	Transcripció del cDNA de Δ LRRs de Ppa sota el control del promotor de la RNA pol T7	IVT (apartat 2.1)
pET-LRRs	Transcripció del cDNA de LRRs de Ppa sota el control del promotor de la RNA pol T7	IVT (apartat 2.1)
pGST-Ppa	Expressió de Ppa fusionada a GST	GST-pulldown (apartat 2.1)
pGST-ΔLRRs	Expressió de Δ LRRs de Ppa fusionat a GST	GST-pulldown (apartat 2.1)
pGST-LRRs	Expressió de LRRs de Ppa fusionat a GST	GST-pulldown (apartat 2.1)
pET-Cid	Transcripció del cDNA de Cid sota el control del promotor de la RNA pol T7	IVT (apartat 2.1)
pET-CidNt	Expressió de N _{Cid} fusionat a histidines	Obtenció d'anticossos (apartats 1.1, 1.2.1, 1.2.3, 1.4.2 i 2.2)
pET-CidCt	Transcripció de N _{Cid} sota el control del promotor de la RNA pol T7	IVT (apartat 2.1)
pET-CidCt	Transcripció de HFD _{Cid} sota el control del promotor de la RNA pol T7	IVT (apartat 2.1)
pGST-Cid	Expressió de Cid fusionada a GST	GST-pulldown (apartats 2.1)
pGST-CidNt	Expressió de N _{Cid} fusionat a GST	GST-pulldown (apartat 2.1)
pGST-CidCt	Expressió de HFD _{Cid} fusionat a GST	GST-pulldown (apartat 2.1)
pCid-YFP	Expressió de Cid fusionada a EYFP	Transfecció a Kc (apartats 1.1, 1.3, 1.4.1, 3.1 i 3.2)
pN_{Cid}-YFP	Expressió de N _{Cid} de Cid fusionat a EYFP	Transfecció a Kc (apartat 1.2.1)
pHFD_{Cid}-YFP	Expressió de HFD _{Cid} fusionat a EYFP	Transfecció a Kc (apartats 1.2.1, 1.3 i 3.1)
pN_{Cid}HFD_{H3}-YFP	Expressió de N _{Cid} HFD _{H3} fusionada a EYFP	Transfecció a Kc (apartats 1.2.2, 1.3 i 3.1)
pN_{H3}HFD_{Cid}-YFP	Expressió de N _{H3} HFD _{Cid} fusionada a EYFP	Transfecció a Kc (apartats 1.2.2, 1.3)
pN_{Cse4}HFD_{Cid}-YFP	Expressió de N _{Cse4} HFD _{Cid} fusionada a EYFP	Transfecció a Kc (apartats 1.2.3, 1.3)
pN_{Cnp1}HFD_{H3}-YFP	Expressió de N _{Cnp1} HFD _{Cid} fusionada a EYFP	Transfecció a Kc (apartats 1.2.3, 1.3 i 3.1)

Taula M.1.- Resum dels principals plasmidis emprats en aquest treball. S'indica la principal característica de cadascun d'ells i en quin experiment han sigut emprats, indicant entre parèntesi l'apartat del capítol de resultats on es troben.

1.3.- Oligonucleòtids

Els oligonucleòtids descrits a la taula M.2 es van fer servir com a encebadors, bé per seqüenciar plasmidis o per l'amplificació de fragments de PCR i RT-PCR.

Nom	Seqüència (5' → 3')	Diana de restricció
CID5	AGCGGGAATTCT <u>Tag</u> AAAAATATTTTAAGC	XbaI
CID3	CAAATAACTAAAC <u>gg</u> ATCCTAAACTTCTC	BamHI
pBSCid23	TTTAAGCAA <u>acc</u> CgGgAAATTTG	SmaI
pBSCid409	GCTCATGGG <u>G</u> TcGaCCGCTTTGCG	Sall
pBSCid704	GGAATAAAATTG <u>t</u> CGACCCCGGTCGC	Sall
pBSCid5	GAAAATTTG <u>c</u> AtATGCCACGACAC	NdeI
pBSCid3	CTAAAATTGC <u>a</u> GAtCtCGGTTCGAC	BglII
pBSCid3N	TCTGCTCATG <u>G</u> tAccGGCCGCTTTG	KpnI
CidCt5	GCCAATC <u>at</u> ATGAGCAGAGCC	NdeI
Ppa-dir	TTGATGA <u>A</u> TtcCATATGGCGACC	EcoRI
Ppa-LRR	CGCTTAAGG <u>Aa</u> TTcGTCCTGGGC	EcoRI
LRR5'	TCGCTTAAG <u>c</u> ATaTGCTCTGGGC	NdeI
LRR3'	CAGCCAG <u>A</u> GatCtAGGTTGAGCTTC	BglII
ΔLRR5'	CTTGATGAGTAG <u>C</u> ATATGGCGACC	NdeI
ΔLRR3'	AGAGAGGTC <u>A</u> GAtCtGGAACGCCC	BglII
Cidprom5	<u>gctctaga</u> CGACATGGCTGTATCTTCAG	XbaI
Cidprom3	<u>cgctagc</u> TTTTCAAATTTTCGGTATTTGC	NheI
Nt(H3)5'	<u>tagctagc</u> ATGGCTCGTACCAAG	NheI
Nt(H3)3'	<u>tacatatg</u> GTGGGGCTTCTTCAC	NdeI
HFD(H3)5'	<u>tggatcct</u> CGCTATCGCCCTGGAACC	BamHI
HFD(H3)3'	<u>taggatcc</u> AAAGCACGCTCGCCGCAATG	BamHI
Nt(Cse4p)5'	<u>gcgctagc</u> ATGTCAAGTAAACAACAATG	NheI
Nt(Cse4p)3'	<u>gcattaa</u> ICTTTTTCGACGCGCTTTAAGC	VspI
Nt(Cnp1)5'	<u>gcgctagc</u> ATGGCAAAGAAATCTTTAATGGCTGAGCCTGGAGATCC	NheI
Nt(Cnp1)3'	GGATCTCCAGGCTCAGCCATTAAAGATTTCTTTGCCAT	---
EGFP-N	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG	---
Act for	TCTGGCACCACCTTCTACAATG	---
Act rev	GCTCTGGCGGGGCAATGAT	---

Taula M.2.- Llistat dels oligonucleòtids emprats en aquest treball. En minúscula es representen les bases mutades respecte la seqüència original i es subratllen les dianes de restricció generades.

2.- MÈTODES

2.1.- MÈTODES DE MANIPULACIÓ DE DNA

Per a l'obtenció dels plasmidis emprats en aquest treball (veure apartat 1.2 d'aquest capítol) es van seguir les tècniques bàsiques de Biologia Molecular (Sambrook *et al.* 1989) i van ser comprovats per seqüenciació automàtica al Servei de Seqüenciació de l'IBMB-CSIC.

2.1.1.- Mètodes d'obtenció de DNA

2.1.1.1.- Minipreparacions de DNA

Per a l'obtenció de petites quantitats de plasmidis es va emprar el mètode de lisi alcalina (Sambrook *et al.* 1989). El DNA va ser resuspès en 50 µl de tampó TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8) en presència d'1 µg de RNAsa A i es va incubar 15 minuts a 37°C.

2.1.1.2.- Maxipreparacions de DNA

Per a l'obtenció de grans quantitats de DNA plasmídic i amb un alt grau de puresa vam emprar columnes comercials de Quiagen seguint les instruccions del fabricant, resuspenent el DNA en tampó TE.

2.1.2.- Transformació de DNA en bacteris

Les cèl·lules competents van ser prèviament preparades mitjançant el mètode de clorur càlcic (Sambrook *et al.* 1989), al·lquotades i congelades a -80°C fins el moment de ser utilitzades. Llavors, es van transformar per xoc tèrmic amb els diferents DNAs plasmídics. Les cèl·lules es van descongelar en gel, es va afegir 100 µl sobre el DNA a transformar, es van incubar 30 minuts en gel i a continuació es va fer un xoc tèrmic de 2 minuts 30 segons a 42°C. Els bacteris es van recuperar en presència de 400 µl de medi LB (triptona 10 g/l, extracte de llevat 5 g/l, NaCl 10 g/l, NaOH 1 mM) durant 30 minuts a 37°C, i finalment es van plaquejar en plaques de LB (LB + agar 15 g/l) amb el corresponent antibiòtic: 100 µg/ml d'ampicil·lina, 50 µg/ml de kanamicina o 25 µg/ml de cloramfenicol, afegint-se aquest últim a la placa just abans de fer-la servir. Les plaques es van incubar durant tota la nit a 37°C.

2.2.- TÈCNIQUES DE RNA

2.2.1.- Extracció d'RNA

L'extracció d'RNA la vam realitzar 24, 48 i 72 hores després de transfectar cèl·lules Kc de *D. melanogaster* amb pCid-YFP (veure apartat 2.6.2 d'aquest capítol), així com amb cèl·lules no transfectades. En tots els casos l'extracció es va dur a terme mitjançant el reactiu *ULTRASPEC™ RNA Isolation System* (Biotecx). Per cada $5 \cdot 10^6$ cèl·lules es va fer servir 1 ml d'*ULTRASPEC* i es va seguir el protocol recomanat pel fabricant. Un cop obtingut l'RNA es va resuspendre en 50 μ l d'aigua estèril lliure de RNases.

Finalment, per eliminar qualsevol traça de DNA que pugui haver a les mostres i que ens interferiria en el resultat de les RT-PCRs, es van tractar els RNAs amb DNaseI. Així doncs, es van afegir 10 μ l de tampó M (Boehringer), 1 μ l de DNaseI (Boehringer), es portar la reacció fins a 100 μ l amb H₂O i es va incubar durant 2 hores a 37°C. Transcorregut aquest temps, es van afegir 100 μ l de fenol:cloroform (1:1) i es va centrifugar durant 2 minuts a 14000 rpm. Es va transferir la fase aquosa (fase superior) a un *ependorf* nou i l'RNA va ser precipitat amb NaAc 0,3 M i 3 volums d'etanol 100%. Es van deixar les mostres uns 15-20 minuts a -20°C i es van centrifugar durant 15 minuts a 14000 rpm a 4°C. Després de fer un rentat amb etanol 70%, les mostres van ser resuspeses amb 10 μ l d'H₂O.

2.2.2.- RT-PCR

Les RT-PCRs es van realitzar utilitzant com a motlle RNA obtingut tal i com s'explica a l'apartat anterior. En cada cas (24, 48 i 72 hores després de la transfecció i cèl·lules no transfectades) es van utilitzar dos quantitats d'RNA: 0,5 i 5 ng. Per tal d'amplificar específicament el mRNA de la proteïna recombinant Cid-YFP es van emprar els oligonucleòtids CidCt5 i EGFP-N. Com a control intern es va amplificar també el mRNA de l'actina 5C amb els oligonucleòtids Act *forward* i Act *reverse*, cedits per Joan Font i Marta Lloret-Llinares.

Per dur a terme les reaccions de les RT-PCRs es va utilitzar el kit *QIAGEN® One Step RT-PCR*, seguint les instruccions del fabricant, i es van realitzar al termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)*. Les condicions de PCR emprades van ser:

- 1 min a 94°C
 - 1 min a 55°C
 - 1 min a 72°C
 - 10 min a 72°C
- } 30 cicles

Com a control i per descartar que l'amplificació fos deguda a la presència de DNA, per a tots els punts es van realitzar reaccions idèntiques a les de la RT-PCR però amb la diferència que els oligonucleòtids es van afegir després de que tingués lloc la transcripció reversa.

2.3.- TÈCNiques BÀSIQUES PER A L'ESTUDI DE PROTEÏNES

2.3.1.- Expressió i purificació de proteïnes solubles fusionades a una cua d'histidines

L'expressió de proteïnes clonades als vectors pET es troba sota el control de senyals de transcripció i traducció del bacteriòfag T7. Les soques d'*E. coli* emprades per expressar (BL21 o BL21 LysS) contenen una còpia cromosomal del gen de la T7 RNA Polimerasa sota el control del promotor *lacUV5*, el qual és induïble per IPTG. Gràcies a l'elevada activitat de l'RNA Polimerasa T7, després d'unes poques hores d'inducció la proteïna que volem expressar pot constituir més del 50 % del contingut proteic total bacterià. Ara bé, inclús en absència d'inducció amb IPTG hi ha transcripció basal i, segons la proteïna recombinant que s'expressa, pot ser tòxic per la cèl·lula. La soca BL21 LysS conté el plasmidi pLys que proporciona petites quantitats del lisozim T7, un inhibidor de la T7 RNA Polimerasa. La presència d'aquest inhibidor permet eliminar aquesta transcripció basal. El plasmidi pLysS és compatible amb els diferents plasmidis pET i confereix resistència al cloramfenicol.

En el nostre cas es va expressar l'extrem N-terminal de Cid fusionat a una cua d'histidines pel costat C-terminal amb l'objectiu de purificar-lo i fer-lo servir en l'obtenció d'anticossos policlonals específics per la variant centromèrica, que no reconeguessin la histona H3. Per aquest motiu es va construir el plasmidi d'expressió pET-CidNt (veure apartat 1.2.2 d'aquest capítol) i la proteïna de fusió recombinant va ser expressada a la soca BL21 LysS.

• Proves d'expressió:

Primer es va fer una prova d'expressió a petita escala per trobar les condicions d'inducció més adients. Així doncs, després de transformar la soca BL21 LysS amb el plasmidi pET-CidNt, es van inocular 3 cultius de 4 ml de LB/kanamicina 50 µg/ml/cloramfenicol 25 µg/ml amb 3 colònies aïllades i es van deixar créixer a 37°C durant tota la nit. Al dia següent es van utilitzar 200 µl d'aquests per reinocular minicultius nous, els quals es van deixar créixer a 37°C fins que van arribar a una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Llavors es va induir l'expressió amb IPTG 1 mM.

Es van agafar alíquotes de 400 µl just abans d'induir el cultiu i 1, 2 i 3 hores després. Es van centrifugar durant 1 minut a 9000 rpm, es van resuspendre en 100 µl de tampó de càrrega PLB 5x (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 21,75%, SDS 5%, blau de bromofenol 0,25%) i un 10% de β-mercaptoetanol, i finalment es van sonicar durant 5 segons. A continuació es van analitzar 25 µl de cadascuna de les alíquotes per SDS-PAGE (veure apartat 2.3.3 d'aquest capítol).

• Expressió a gran escala:

Un cop determinades les condicions d'expressió es va procedir a la producció de grans quantitats de l'extrem N-terminal de Cid fusionat a una cua d'histidines. Es va tornar a transformar la soca BL21 LysS amb el plasmidi pET-CidNt i es va inocular un cultiu de 4 ml de LB/kanamicina 50 µg/ml/cloramfenicol 25 µg/ml amb 3 colònies aïllades, el qual es va deixar créixer a 37°C durant tota la nit. Al dia següent es va inocular 500 ml de LB amb el minicultiu i es va deixar créixer a 37°C fins a una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Llavors, es va agafar una alíquota de 400 µl (veure proves d'expressió) i es va induir l'expressió amb IPTG 1 mM, deixant créixer el cultiu a 37°C durant 3 hores més. Es va agafar una altra alíquota de 400 µl i es van recollir les cèl·lules centrifugant durant 10 minuts a 4000 rpm en el rotor JA-14 (Beckman) a 4°C. El sediment cel·lular es va resuspendre en 100 ml de STE (NaCl 0,1 M, Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) i es va tornar a centrifugar. El sediment cel·lular que es va obtenir es va congelar en neu carbònica i es va guardar a -80°C durant tota la nit per facilitar la lisi.

Al dia següent es va resuspendre amb 10 ml de tampó de lisi (NaCl 0,5 M, glicerol 20%, Hepes 20 mM pH 7,9, EDTA 1 mM, β-Mercaptoetanol 20 mM, PMSF 1 mM, NP-40 0,1%) i es va lisar sonicant en gel fins que la mostra adquireix una consistència més líquida i

un color més fosc. Es va utilitzar el sonicador Digital Sonifier[®] (Branson) i es va sonicar en gel amb el tip gruixut (12 mm de diàmetre), fent 10 cicles de 10 segons cadascun, amb intervals de descans de 30 segons i un valor de sortida entre 50 i 60 W. Llavors, es va centrifugar a 35000 rpm amb el rotor SW41 (Beckman) durant 1 hora a 4°C per tal de separar les fases solubles i insoluble (sobrenedant i sediment, respectivament). Finalment, es van congelar amb neu carbònica i es van guardar a -80°C.

Per analitzar si la proteïna d'interès s'ha expressat en forma soluble o formant cossos d'inclusió es van carregar 10 µl de la fracció soluble i una mica de sediment (es va agafar una mica amb una punta groga, es va resuspendre en 400 µl de tampó de càrrega i es van analitzar 10 µl i 10 µl d'una dilució 1/10), juntament a 25 µl de les mostres d'abans i després d'induir.

• Purificació a partir de la fracció soluble:

La utilització d'una cua d'histidines com a *tag* permet la purificació de la proteïna de fusió mitjançant cromatografia d'afinitat amb una columna de Ni²⁺, el qual interacciona amb els grups imidazol de les histidines fent que aquestes quedin retingudes a la columna.

En el nostre cas es va fer la purificació a 4°C utilitzant 0,5 ml de la reïna *Ni-NTA Agarose* (Qiagen), la qual es va empaquetar en una columna *Econocolumn* (Biorad) i es va equilibrar amb 10 ml de tampó de lisi. Aquest pas i els posteriors es van realitzar amb l'ajut d'una bomba peristàltica *LKB Pump P-1* (Pharmacia) a una velocitat entre 6 i 8 de la posició 1.

Un cop empaquetada la reïna, es van passar fins a 3 cops els 10 ml de la mostra corresponent a la fracció soluble i es va recollir la fracció *Flow Through* (FT). Posteriorment, es van fer dos rentats: el primer amb 10 ml de tampó de lisi (fracció R1) i el segon amb 5 ml de tampó D (glicerol 20%, Hepes 20 mM pH 7,9, KCl 0,1 M, EDTA 0,2 mM, PMSF 0,1 mM, DTT 0,5 mM) (fracció R2).

Finalment s'elueix la proteïna per competició amb imidazol en un procés de 3 passos. Primer es va fer una preelució amb 3 ml de tampó D/Imidazol 20 mM, recollint fraccions d'1 ml (PE1, PE2, PE3). Aquest pas amb baixa concentració d'Imidazol serveix per eliminar contaminants que s'uneixen a la reïna amb una afinitat menor que la cua d'histidines. Després es va eluir amb 5 ml de tampó D/Imidazol 100 mM i 5 ml de tampó D/Imidazol 500 mM, recollint també fraccions d'1 ml (E1-E10).

A continuació, per comprovar el funcionament de la cromatografia es van analitzar 10 µl de cadascuna de les fraccions per SDS-PAGE (Figura M1). La resta de les mostres es van congelar amb neu carbònica i es van guardar a -80°C.

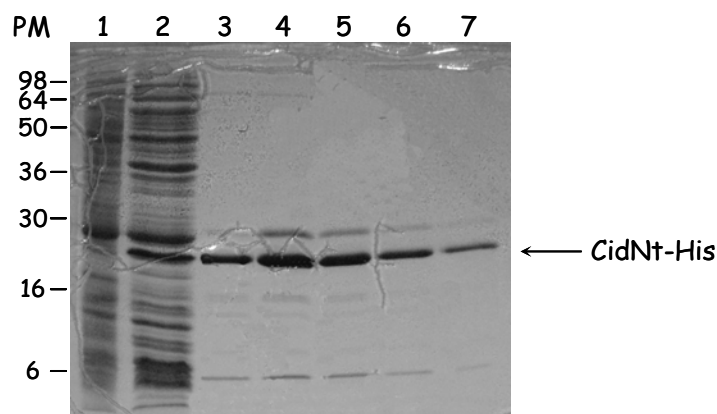


Figura M1.- Purificació de la proteïna de fusió CidNt-His. L'extrem N-terminal de Cid va ser clonat al vector pET29b amb l'objectiu d'expressar-lo fusionat a una cua d'histidines. Així doncs, es va expressar a la soca d'*E. coli* BL21 LysS i la proteïna de fusió va ser purificada mitjançant cromatografia d'afinitat amb la reïna Ni-NTA Agarose (Qiagen) a partir de la fracció soluble. Aquesta figura mostra l'anàlisi per SDS-PAGE de: 25 µl de les mostres corresponents al cultiu abans i després d'induir (carrils 1 i 2) i 10 µl de les primeres cinc fraccions d'elució (carrils 3-7).

2.3.2.- Expressió i purificació de proteïnes fusionades a GST

La Glutatió S-transferasa de *Schistosoma japonicum* és una proteïna d'alta afinitat pel glutatió, cosa que permet la purificació de proteïnes fusionades a ella mitjançant la reïna *Glutathione Sepharose 4B*. Per l'obtenció de les proteïnes de fusió d'interès es van fer servir vectors d'expressió pGEX (Amersham-Pharmacia-Biotech), els quals estan dissenyats per la producció de grans quantitats de proteïna sota el control del promotor *tac*, induïble per IPTG.

El nostre objectiu era estudiar la possible interacció entre Cid i Ppa. És per això que es van clonar les proteïnes senceres així com els seus dominis en els vectors pGEX, donant lloc als plasmidis: pGST-Cid, pGST- CidNt, pGST-CidCt, pGST-Ppa, pGST-LRRs i pGST-ΔLRRs (veure apartat 1.2.2 d'aquest capítol).

En tots els casos les proteïnes de fusió es van expressar en la soca d'*E. coli* BL21.

- Proves d'expressió:

A l'igual que amb les proteïnes fusionades a una cua d'histidines (apartat 2.3.1 d'aquest capítol), primer es va fer una prova d'expressió a petita escala per trobar les condicions d'inducció més adients. Així doncs, després de transformar la soca BL21 amb el plasmidi corresponent es van inocular 3 cultius de 4 ml de LB/ampicil·lina 25 µg/ml amb 3 colònies aïllades i es van deixar créixer a 37°C durant tota la nit. Al dia següent es van utilitzar 200 µl d'aquests per reinocular minicultius nous, els quals es van deixar créixer a 37°C fins que van arribar a una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Llavors es va induir l'expressió amb IPTG 0,2 mM. Es van agafar alíquotes de 400 µl just abans d'induir el cultiu i 1, 2 i 3 hores després. Es van centrifugar durant 1 minut a 9000 rpm, es van resuspendre en 100 µl de tampó de càrrega PLB 5x (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 21,75%, SDS 5%, blau de bromofenol 0,25%) i un 10% de β-mercaptoetanol i, finalment es van sonicar durant 5 segons. A continuació es van analitzar 25 µl de cadascuna de les alíquotes per SDS-PAGE (veure apartat 2.3.3 d'aquest capítol).

- Expressió a gran escala:

Es van transformar els vectors en 200 µl de cèl·lules BL21 competents i es van plaquejar en LB/Ampicil·lina 100 µg/µl. Es va inocular un cultiu de 4 ml de LB/Ampicil·lina amb 3 colònies aïllades i es va deixar créixer a 37°C durant tota la nit. Al dia següent es va inocular aquest minicultiu en 200 ml de LB/Ampicil·lina i es va deixar créixer a 37°C fins a una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Llavors es va induir amb IPTG 0,2 mM durant 3 hores més a 37°C. Es van agafar alíquotes de 400 µl abans i després de la inducció, les quals es van processar igual que per l'expressió de proteïnes fusionades a una cua d'histidines.

Passat aquest temps es van recollir les cèl·lules centrifugant a 4000 rpm en el rotor JA-14 (Beckman) durant 10 minuts i a 4°C. El sediment cel·lular es va resuspendre amb 50 ml de STE (NaCl 0,1 M, Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) i es va tornar a centrifugar. El sediment que s'obté es pot congelar en neu carbònica i guardar-se a -80°C.

A continuació es va resuspendre amb 10 ml de tampó NETN (Tris-HCl 200 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, NP-40 0,5%, PMSF 1 mM, Leupeptina 1 µg/ml) i es va lisar amb el sonicador *Digital Sonifier*[®] (Branson), sonicant en gel, amb el tip gruixut (12 mm de diàmetre), fent 10 cicles de 10 segons cadascun amb intervals de descans de 30 segons i un

valor de sortida entre 50 i 60 W. Es va centrifugar a 10000 rpm amb el rotor JA-25.50 (Beckman) durant 15 minuts a 4°C i el sobrenedant es va guardar a 4°C.

Es va fer una segona extracció resuspenent el sediment amb 5 ml de tampó NETN/sarcosil 2%. Es va tornar a sonicar però aquest cop amb el tip petit i només durant 5 cicles de 10 segons. Es va centrifugar a 10000 rpm amb el rotor JA-25.50 (Beckman) durant 10 minuts a 4°C i el sobrenedant obtingut es va ajuntar amb el primer.

Per comprovar si l'expressió havia funcionat es van analitzar per SDS-PAGE 25 µl de les alíquotes d'abans i després d'induir, 10 µl de la fracció soluble i una mica del sediment de la fracció insoluble (es va agafar una mica amb una punta groga, es va resuspendre en 200 µl de tampó de càrrega i es van analitzar per SDS-PAGE 10 µl i 10 µl d'una dilució 1/10).

• Purificació a partir de la fracció soluble:

Es van empaquetar 400 µl de reïna *Glutathione Sepharose 4B* (Amersham-Pharmacia-Biotech) en una *Econocolumn* (Biorad) i es va equilibrar amb 10 ml de tampó NETN. Tota la cromatografia es va dur a terme a 4°C i amb l'ajut d'una bomba peristàltica *LKB Pump P-1* (Pharmacia) a velocitat 6-8 de la posició 1.

Es va carregar la mostra, recollint la fracció *Flow Through* (FT), i a continuació es van fer tres rentats de 5 ml cadascun: amb tampó NETN (W1), tampó NETN-NaCl 0,7 M (W2) i tampó NETN (W3).

Després es va fer una preelució amb 5 ml de tampó TST (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tritó X-100 0.1%, DTT 5 mM), fent una mica de vòrtex suau (fracció PE). Finalment, es va eluir amb 5 ml de tampó TST-glutatió reduït 20 mM, afegint el tampó de ml en ml, fent cada cop un vòrtex suau, deixant la columna 1 minut a 4°C i deixant eluir per gravetat (E1-E5).

La cromatografia es va analitzar per SDS-PAGE carregant 10 µl de cadascuna de les fraccions. La resta de les mostres es van congelar amb neu carbònica i es van guardar congelades a -80°C.

Cal dir que per a dur a terme l'assaig de *pulldown* és millor no eluir la proteïna a l'hora de purificar-la perquè després al tornar-la a enganxar a les boletes s'obté una eficiència molt baixa (veure apartat 2.4.2 d'aquest capítol).

2.3.3.- Electroforesi de proteïnes en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

L'electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS és una tècnica que permet separar les proteïnes segons el seu pes molecular. El SDS desnaturalitza les proteïnes i cobreix la seva superfície amb càrregues negatives de manera que elimina els possibles efectes de la càrrega intrínseca de cadascuna. Així doncs, en un camp elèctric les proteïnes migren en funció del seu pes molecular.

Els gels de poliacrilamida-SDS estan formats per dues fases: la fase superior o gel d'apilament, i la fase inferior o gel separador. Cadascuna d'elles presenta un pH i un percentatge d'acrilamida diferent, havent sigut aquest últim un 5% pel gel d'apilament i d'un 10 a un 18% pel separador, depenent del pes molecular de les proteïnes a analitzar.

Composició del gel apilador:

acrilamida:bisacrilamida 29:1 5%

Tris-HCl 0,125 M pH 6.8

SDS 0,1%

6 µl PSA 10%/ml solució

3 µl TEMED/ml solució

Composició del gel separador:

acrilamida:bisacrilamida 29:1 10-18%

Tris-HCl 0,4 M pH 8,7

SDS 0,1%

6 µl PSA 10%/ml solució

3 µl TEMED/ml solució

A les mostres se'ls hi va afegir tampó de càrrega desnaturalitzant de proteïnes PLB 5x (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 21,75%, SDS 5%, blau de bromofenol 0,25%) i un 10% de β-mercaptoetanol, es van escalfar 5 minuts a 95°C i es van carregar immediatament. Com a tampó d'electroforesi es va utilitzar Laemmli 1x (SDS 0,1%, glicina 200 mM, Tris base 25 mM, pH 8,3-8,5) i es van córrer a 25 o a 60 mA segons si es tractava d'un gel tipus *Mini-Protean* (8,5x8,5 cm) o gels grans de 20x20 cm, respectivament.

Un cop migrats, els gels van ser tenyits amb blau de Coomassie o es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa (veure el següent apartat). Per la tinció amb blau de Coomassie els gels es van incubar uns 20 minuts en la solució de tinció CBB (*Coomassie blue brilliant* 0,05%, etanol 40%, àcid acètic 10%) i després, per eliminar l'excés de colorant, es van destenyir amb una solució d'àcid acètic 10%.

2.3.4.- Western blot

Aquesta tècnica 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. Així doncs, com a primer pas es va dur a terme una electroforesi SDS-PAGE (veure apartat anterior) i posteriorment es va transferir el gel a una membrana de nitrocel·lulosa Optitran (Schleicher & Schuell). Aquest pas es va realitzar emprant 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 i amb agitació constant.

Un cop finalitzada la transferència, es va incubar la membrana en agitació durant 1 hora o tota la nit amb la solució de bloqueig (PBS 1x (NaCl 125 mM, Na₂HPO₄ 17 mM, NaH₂PO₄ 8 mM), llet en pols 5%, Tween 20 0,1%, azida sòdica 0,01%) per tal d'evitar la unió inespecífica dels anticossos a la membrana. Posteriorment, es van fer 3 rentats de 5 minuts amb PBST (PBS 1x, Tween 20 0,1%) i es va incubar amb la dilució d'anticòs primari adient en cada cas durant 1 hora, a temperatura ambient i amb agitació constant (la dilució es va fer amb PBST). Llavors, es van fer 3 rentats més de 5 minuts amb PBST i es va incubar amb la dilució adequada d'anticòs secundari (diluït amb PBST) durant 1 hora, a temperatura ambient i amb agitació constant. Finalment, es van fer 5 rentats de 5 minuts amb PBST i es va procedir a la detecció mitjançant quimioluminescència.

Per a la detecció de l'anticòs secundari fusionat a la peroxidasa de rave (HRP) es van barrejar 10 ml de Solució de Luminol (Tris-HCl 0,1 M pH 8,6, luminol sòdic 1,25 mM, H₂O₂ 2,7 mM) amb 10 µl de Solució Enhancer (àcid p-hidroxicumarínic 0,1% en DMSO), es va aplicar sobre la membrana i es va incubar durant 1 minut. Després es va assecar la membrana i es va exposar amb una pel·lícula fotogràfica Agfa Curix RP2 el temps adient per obtenir un senyal òptim.

2.4.- ASSAIG D'INTERACCIÓ PROTEÏNA-PROTEÏNA *IN VITRO*: *GST-PULLDOWN*

L'assaig de *GST-pulldown* permet analitzar la interacció entre dues proteïnes en condicions *in vitro*. Es tracta d'expressar una de les proteïnes fusionada a GST (Glutació S-transferasa) i unir-la a la reïna *Glutathione Sepharose 4B* de manera que s'obté una columna d'afinitat. Aleshores s'incuba amb un extracte proteic i s'analitzen les proteïnes que queden

retingudes. La detecció de les proteïnes que interaccionen específicament amb la columna pot ser realitzada mitjançant *Western blot* o amb marcatge radioactiu. En aquest treball es va fer servir el segon mètode donada la seva major sensibilitat i la manca de soroll de fons.

2.4.1.- Transcripció-traducció *in vitro* en lisats de reticulòcits

Per marcar radioactivament les proteïnes a estudiar amb ^{35}S -Met es va utilitzar el sistema de transcripció-traducció *in vitro* TNT[®] *Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega). Aquest mètode permet l'obtenció d'una proteïna marcada, mitjançant la incorporació d'aminoàcids precursors marcats radioactivament, a partir d'un plasmidi que conté el gen d'interès sota el control d'un promotor específic de l'RNA polimerasa T7. La maquinària necessària per dur a terme tot aquest procés de transcripció i traducció és proporcionada per un sistema de lisat de reticulòcits de conill.

Així doncs, es van clonar els cDNAs que codifiquen per les proteïnes senceres de Cid i Ppa, així com els seus diferents dominis (Cid-Nt, Cid-Ct, Ppa-LRRs i Ppa- Δ LRRs) en vectors que contenen un promotor específic de l'RNA polimerasa T7, com són el pBluescript II SK (Stratagene) i el pET-29b. És a dir, per poder dur a terme la reacció de transcripció-traducció *in vitro* i obtenir les proteïnes marcades radioactivament, es van construir els plasmidis: pET-Cid, pET-CidNt, pET-CidCt, pBSPpa, pET- Δ LRRs i pET-LRRs (veure apartats 12.1 i 1.2.2 d'aquest capítol).

Per dur a terme la reacció de transcripció-traducció *in vitro* es van barrejar en un *eppendorf*:

- 12,5 μl de lisat de reticulòcits de conill TNT[®]
- 1 μl de tampó de reacció TNT[®]
- 0,5 μl de la barreja de reacció d'aminoàcids sense metionina TNT[®]
- 2 μl de *Redivue*TM L-[^{35}S]-metionina a 10 mCi/ml (Amersham Biosciences)
- 0,5 μl de RNAsin[®] (inhibidor de ribonucleases) (Promega) a 40 U/ μl
- 0,5 μg de DNA motlle
- 0,5 μl de RNA Polimerasa T7 TNT[®]
- H₂O estèril lliure de nucleases fins a 25 μl

És molt important que el DNA estigui lliure d'etanol, calci, RNases i sals ja que sinó es pot inhibir la reacció.

Un cop mesclats, es va deixar incubant a 30°C durant 1 hora i 15 minuts i es va guardar a -20°C fins el moment de fer el *pulldown*. Per determinar l'eficiència de traducció i de marcatge es va analitzar 1 µl de cada reacció. Per això, es van carregar les diferents mostres en un gel SDS-PAGE al 12%, el qual es va transferir a una membrana de nitrocel·lulosa i es va exposar durant tota la nit a -80°C amb una pel·lícula d'autoradiografia BIOMAX-MS (Kodak) (Figura M.2).

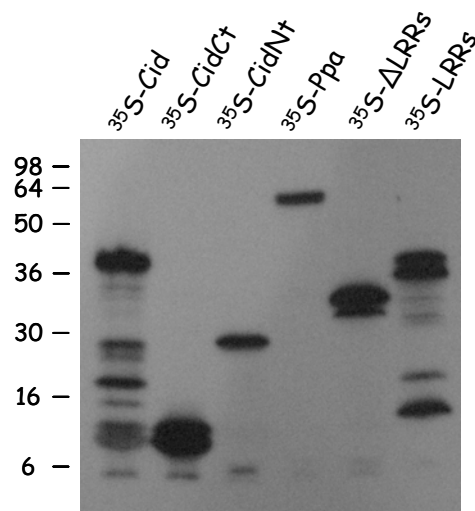


Figura M.2.- Marcatge amb ^{35}S -Met mitjançant transcripció-traducció *in vitro*. Els cDNAs de les construccions indicades van ser clonats al vector pET29b, excepte Ppa que es va clonar al pBluescript II SK (+), els quals contenen promotors específics de la T7 RNA polimerasa. Llavors, es va realitzar la transcripció-traducció *in vitro* amb el kit TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) i Redivue[™] L-[^{35}S]-metionina, de forma que es van obtenir les proteïnes marcades radioactivament amb ^{35}S -Met. La figura mostra l'anàlisi per SDS-PAGE d'1 µl de cadascuna de les reaccions.

2.4.2.- Unió de les proteïnes fusionades a GST amb la Glutatió Sefarosa

Per dur a terme l'assaig d'interacció proteïna-proteïna es van expressar tant Cid i Ppa senceres com els seus dominis fusionats a GST (veure apartat 2.3.2 d'aquest capítol), així com el GST sol a partir del vector pGEX-KG.

Ara bé, donat que la purificació de les proteïnes fusionades a GST es fa mitjançant la mateixa reïna *Glutathione Sepharose 4B* que s'utilitza per l'assaig de *pulldown*, a l'hora de purificar les proteïnes, enlloc d'eluir-les i després tornar-les a immobilitzar, després del tercer

rentat: es va recollir la reïna en un *ependorf*, es va rentar 2 cops amb 1 ml de NETN (veure apartat 2.3.2 d'aquest capítol) centrifugant 2 minuts a 3000 rpm i es va guardar a 4°C (amb una mica de volum perquè no pot assecar-se).

Llavors, es van analitzar 10 µl de cada reïna mitjançant SDS-PAGE amb un gel del 12% per determinar de forma aproximada les concentracions de proteïnes presents i poder igualar-les a l'hora de fer el *pulldown* (Figura M.3).

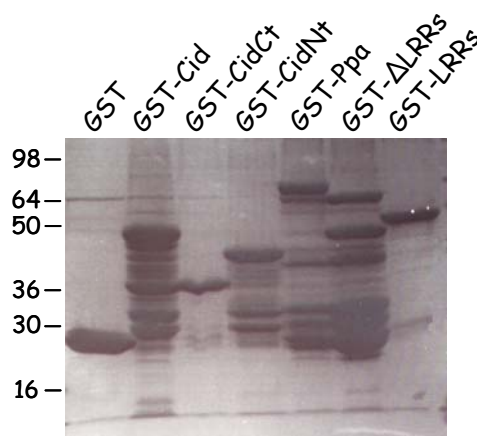


Figura M.3.- Obtenció de proteïnes fusionades a GST. Per dur a terme l'assaig de GST-pull-down es van expressar a la soca d'*E. coli* les proteïnes indicades fusionades a GST, així com GST sol, i es van purificar mitjançant cromatografia d'afinitat amb la reïna Glutathione Sepharose 4B. Per realitzar l'assaig les proteïnes no es van eluir i es van analitzar 10 µl de cada reïna per SDS-PAGE i tinció amb coomassie.

2.4.3.- Assaig GST-pull-down

Per realitzar l'assaig de *pull-down*, les reïnes de Glutatió Sefarosa amb les proteïnes GST unides van ser incubades amb les proteïnes marcades amb ^{35}S -Met. Es van fer totes les combinacions possibles d'ambdues proteïnes: Cid i els seus dominis marcats amb ^{35}S -Met respecte les diferents fusions de Ppa amb GST i a l'inrevés. Com a control negatiu es va utilitzar GST.

En un *ependorf* d'1,5 ml es van barrejar 20 µl de cadascuna de les reïnes amb les proteïnes de fusió immobilitzades (0,5-1 µg) amb:

- 200 µl de tampó Z' (Hepes 25 mM pH 7,5, MgCl₂ 12,5 mM, glicerol 20%, NP40 0,1%, KCl 150 mM)
- 1 µl de DTT 200 mM
- 6 µl de BSA 5 mg/ml

Es va preincubar durant 10 minuts a temperatura ambient i en rotació en una nòria. Aleshores es van afegir 0,5-10 µl de les proteïnes marcades amb ³⁵S-Met i es va deixar una hora més, també rodant a temperatura ambient. Llavors, es va centrifugar la reïna de sefarosa 1 minut a 3000 rpm i es van fer 4 rentats amb 1 ml de tampó NETN (veure composició a l'apartat 2.3.2 d'aquest capítol) per eliminar la radioactivitat no incorporada. Finalment, es van resuspendre les boletes en 20 µl de tampó de càrrega de proteïnes PLB 5x (veure composició a l'apartat 2.3.3 d'aquest capítol), es van desnaturalitzar durant 3 minuts a 95°C (moment en que la proteïna es desenganxa de la reïna i queda al sobrenedant) i es van carregar totes les mostres en un gel de poliacrilamida-SDS, junt a un *input* corresponent al 20% de la proteïna marcada que s'havia afegit als *pulldowns*. Es va transferir a una membrana de nitrocel·lulosa i es va exposar durant tota la nit a -80°C amb una pel·lícula d'autoradiografia BIOMAX-MS (Kodak).

2.5.- OBTENCIÓ I PURIFICACIÓ D'ANTICOSSOS

2.5.1.- Obtenció d'anticossos policlonals

Es van obtenir anticossos policlonals específics contra l'extrem N-terminal de Cid injectant la proteïna recombinant CidNt-His en conills. Per això es va expressar la proteïna de fusió a *E. coli* (veure apartat 2.3.1 d'aquest capítol). Com que l'extrem N-terminal de Cid és relativament petit (només té uns 41 aminoàcids), per evitar que els anticossos es generessin contra la cua de 6 histidines, es van digerir uns 800 µg de proteïna amb 24 unitats de Trombina (Amersham-Pharmacia-Biotech) en PBS 1x i un volum de reacció de 2,4 ml, és a dir, 0,028 unitats Trombina/µg proteïna i 0,01 unitats Trombina/µl digestió. La reacció es va dur a terme durant tota la nit a 37°C. Al dia següent es va aturar la reacció amb ½ volums de Solució d'aturada (PMSF 20 mM, PLB 3x, β-mercaptoetanol 2,8M) i es va carregar la mostra en un gel de poliacrilamida-SDS del 15%, de 20x20 cm i un gruix d'1,5 mm, fent servir com a pou una pinta dels *MiniProtean* posada al revés. El gel es va tenyir amb una solució fresca de Coomassie 0,05% en aigua durant uns deu minuts i es va retallar la banda d'interès.

Llavors, es va tallar en trossos petits i es va passar per una xeringa de 2 ml, dipositant-la en un *ependorff* de 1.5 ml. Per tal que l'acrilamida quedés el més fina possible i així evitar possibles obturacions de l'agulla a l'hora de la immunització del conill, es va fer un forat amb una agulla a la base d'aquest tub, es va col·locar dins d'un altre i es va centrifugar a 14000 rpm durant 2 minuts. Aquest procés es repeteix dos vegades més, disminuint cada cop el tamany del forat de la base de l'*ependorff*. Finalment, es resuspen la mostra amb 1 volum de PBS 1x (veure composició a l'apartat 2.3.4 d'aquest capítol) fent vòrtex. Ha de quedar una solució viscosa que s'ha de poder agafar amb la pipeta, sinó se li afegeix més PBS.

Les immunitzacions van ser realitzades en conills de forma subcutània per la Dra. Josefina Casas de l'estabulari del CID-CSIC (Barcelona). Es va fer una primera immunització amb l'antigen i 1 volum d'adjuvant de Freund complet (Sigma). Després, es van fer dos recordatoris amb intervals de 15 dies, aquests ja amb adjuvant incomplet (Sigma). L'adjuvant de Freund és una emulsió d'oli mineral-aigua preparada amb olis no metabolitzables que protegeix l'immunogen d'una degradació accelerada. L'adjuvant complet es diferencia de l'incomplet per la presència del muramil dipèptid del bacteri *Mycobacterium tuberculosis*, que fa incrementar el nivell de limfoquines generant una resposta immune primària més forta.

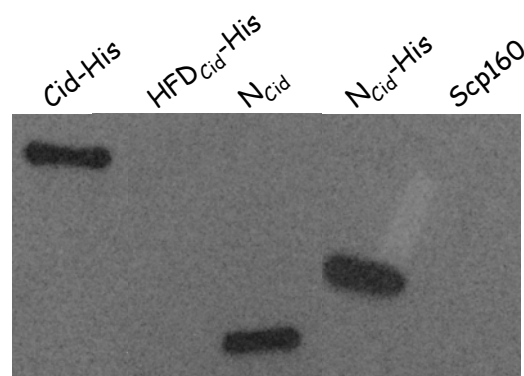


Figura M.4.- Especificitat del sèrum α -CidNt. Per determinar l'especificitat del sèrum α -CidNt vam realitzar un anàlisi per Western blot amb diferents proteïnes recombinants: Cid fusionat a una cua d'histidines (Cid-His), l'extrem C-terminal de Cid fusionat a una cua d'histidines (HFD_{Cid}-His), l'extrem N-terminal de Cid que havia estat digerit amb trombina per eliminar la cua d'histidines (N_{Cid}), l'extrem N-terminal de Cid fusionat a una cua d'histidines (N_{Cid}-His) i, com a control negatiu, Scp160, que és una proteïna amb múltiples dominis KH de *S. cerevisiae* (cedida pel Dr. Francesc Xavier Marsellach). El sèrum es va utilitzar a una dilució 1:5000.

Uns 10 dies després de l'última immunització es van realitzar sagnats durant tres dies consecutius. Per processar la sang extreta dels conills, primer es va deixar reposant durant un parell d'hores a temperatura ambient. Posteriorment, es va centrifugar a 2000 rpm durant 10 minuts a 4°C i es va recollir la fase superior, que és la corresponent al sèrum. Es va afegir azida sòdica a una concentració final de 0,02%, es va aliquotar, es va congelar amb neu carbònica i es va guardar a -80°C.

Finalment, per comprovar l'especificitat de l'anticòs es va realitzar un *Western blot* amb proteïna recombinant (Figura M.4).

2.5.2.- Purificació d'anticossos per afinitat

Per aconseguir anticossos específics contra l'extrem N-terminal de Cid es va purificar per afinitat el sèrum obtingut de la immunització dels conills. Consisteix en unir l'antigen utilitzat a un suport sòlid sobre el qual s'aplica el sèrum policlonal. D'aquesta manera només són retinguts a la columna els anticossos específics, els qual poden ser eluïts posteriorment.

Concretament, es va unir la proteïna de fusió recombinant CidNt-His (veure apartat 2.3.1 d'aquest capítol) a la reïna *Ni-NTA Agarose* (Qiagen). Llavors, es va rentar la columna amb 10 ml de Tampó B (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4) i es van passar 2 ml de sèrum. Posteriorment, es van fer dos rentats amb 10 ml de Tampó B i un tercer amb 10 ml de Tampó C (NaCl 2 M, Tris-HCl 50 mM pH 7,4). Finalment, s'elueix amb una solució de MgCl₂ 4 M.

Per comprovar si la purificació havia funcionat es va realitzar un *Western blot* amb proteïna recombinant fent servir l'eluït de la columna com a anticòs primari i comparant-lo amb el sèrum.

2.6.- MÈTODES DE TREBALL AMB LES CÈL·LULES Kc

2.6.1.- Manteniment de les cèl·lules

2.6.1.1.- Creixement

Les cèl·lules Kc es van créixer a 25°C sense CO₂ amb medi *Schneider* (Sigma) suplementat amb 100 µg/ml d'estreptomicina (Gibco), 100 unitats/ml de penicil·lina (Gibco) i un 10% de sèrum fetal boví (FBS) (Gibco), el qual s'ha d'inactivar 30 minuts a 56°C.

Es van anar mantenint en flascons Corning de 75 cm² a una densitat de 1-8·10⁶ cèl·lules/ml en un volum de 5-6 ml, fent dilucions 1/6 o 1/8 cada 3-4 dies. Per obtenir grans quantitats de cèl·lules per transfectar es va preparar un flascó de 175 cm² fent una dilució 1/6 en un volum final de 30 ml a partir de cèl·lules bastant crescudes i es va deixar créixer durant 3-4 dies.

2.6.1.2.- Congelació

Per congelar les cèl·lules es va créixer un flascó de 75 cm² fins a una densitat de 5·10⁶ cèl·lules/ml. Per recollir les cèl·lules es va transferir el cultiu a un *falcon* de 15 ml i es va centrifugar 2 minuts a 1300 rpm a temperatura ambient. Llavors, es va eliminar el sobrenedant i es va resuspendre el sediment cel·lular amb 900 µl de FBS. Es va passar a un criotub i es va afegir gota a gota 100 µl de DMSO. El procés de congelació ha de ser lent. Per això, primer es va guardar el criotub durant 2 hores a -20°C, després tota la nit a -80°C i, finalment es va guardar en nitrogen líquid.

2.6.1.3.- Descongelació

Es va agafar un criotub de cèl·lules Kc guardat en nitrogen líquid i es va descongelar ràpidament entre les mans. Llavors, es va passar a un *falcon* de 15 ml amb 5 ml de medi temperat, es va centrifugar 2 minuts a 1300 rpm a temperatura ambient i es va resuspendre el sediment cel·lular amb 5 ml de medi. Finalment, es va passar a un flascó Corning de 75 cm² i es va deixar créixer durant 3-4 dies.

2.6.2.- Transfecció pel mètode de fosfat càlcic

Per transfectar transitòriament els DNA plasmídics es va fer servir el mètode de fosfat càlcic. Aquest facilita la seva entrada dins de la cèl·lula mitjançant la formació de precipitats de DNA-fosfat. El fet que la transfecció sigui transitòria fa que s'hagi d'analitzar en un període de 24 a 72 hores.

Per obtenir suficient cèl·lules per transfectar es van créixer a una densitat d'aproximadament 6·10⁶ cèl·lules/ml en un volum de 30 ml en flascons de 175 cm². Un cop quantificada la concentració exacta mitjançant un comptatge amb la càmera de Neubauer, es

van inocular $2 \cdot 10^6$ cèl·lules en plaques de cultiu de 60 mm^2 (Corning) en un volum final de 5 ml i es van incubar 24 hores a 25°C .

Per cada placa es van transfectar 10 μg de DNA (obtingut a partir de maxipreparacions amb columnes de Quiagen) en un volum final de 50 μl . Com que cada transfecció es va fer per duplicat les barreges es van preparar escalades a 2,5 transfeccions.

Així doncs, al dia següent de plaquejar les cèl·lules es van preparar en *ependorfs* les quantitats de DNAs necessàries en un volum final de 125 μl i a cadascun es va afegir 1 ml de CaCl_2 0,25 M esterilitzat per filtració amb un filtre de 22 μm . En un tub *falcon* de 15 ml es va afegir 1 ml de HeBS 2x (NaCl 250 mM, KCl 9 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM, glucosa 10 mM, HEPES 50 mM pH 7,1), esterilitzat també per filtració. Llavors, mentre es vortejava suaument es va afegir gota a gota la barreja de DNA- CaCl_2 sobre el HeBS 2x per produir precipitats de tamany petit i aspecte blanquinós. Aquests precipitats es van incubar durant 35 minuts a 25°C i, transcorregut aquest temps, es van afegir 850 μl per placa. Les plaques es van incubar durant 24, 48 i 72 hores a 25°C .

2.6.3.- Anàlisi de la transfecció per microscòpia de fluorescència

Per determinar l'eficiència de la transfecció i la localització de les proteïnes d'interès fusionades a YFP es va utilitzar microscòpia de fluorescència. Per això, un cop transfectades i transcorregut el temps desitjat (24, 48 o 72 hores) es van impactar les cèl·lules sobre portaobjectes mitjançant citocentrifugació. Primer es van desenganxar suaument de la placa de transfecció amb l'ajut d'un raspador i es van barrejar 300 μl de cèl·lules amb 1 ml de medi hipotònic MAC (glicerol 50 mM, KCl 5 mM, NaCl 10 mM, CaCl_2 0,8 mM, sacarosa 10 mM). Llavors, es van incubar durant uns 5 minuts per tal que les cèl·lules s'inflessin a l'incorporar aigua, però sense passar-se del temps perquè poden acabar rebentant. Ràpidament, es van col·locar, amb molt de compte per tal que no es formessin bombolles, 200 μl d'aquesta barreja als embuts de la citocentrífuga acoblats als portaobjectes. Es van centrifugar durant 10 minuts a 500 rpm amb acceleració baixa a una citocentrífuga *ThermoShandon Cytospin 4*. Per acoblar els embuts i els portaobjectes es fan servir uns clips i entre ells es posa un filtre (Shandon). Així, amb aquest sistema, les cèl·lules queden impactades en un petit cercle del portaobjectes que coincideix amb la sortida de l'embut i un forat que té el filtre.

Després, es van deixar assecar el portaobjectes durant una hora a temperatura ambient i es van fixar les cèl·lules posant uns 50 μl de paraformaldehid 3,6% (diluït en PBS 1x)

directament sobre el cercle. Es van incubar durant 10 minuts a temperatura ambient i es van rentar amb PBS 1x durant 15 minuts. En aquest punt els portaobjectes es van guardar secs a 4°C embolicats en paper de plata fins al moment en que s'havien de fer servir.

Quan es van voler mirar al microscopi de fluorescència es van temperar, es va afegir 10 µl de medi de muntatge *Mowiol* (Calbiochem-Novabiochem) al qual s'havia afegit DAPI (500 µl *Mowiol* + 50 µl DAPI 2 ng/ml). Llavors, l'observació es va realitzar en el microscopi de fluorescència Eclipse E-800 (Nikon) i les fotografies es van fer amb una càmera *Colorview* 12 utilitzant com a *software* el programa *Analysis*. Finalment, les imatges van ser analitzades amb l'*Adobe Photoshop* i els comptatges es van fer manualment. Per cadascuna de les transfeccions es va determinar, a partir d'aproximadament 1000 cèl·lules totals, el número de cèl·lules no transfectades i el número de cèl·lules transfectades que presentaven cadascun dels patrons de localització (L, M i D) i es va calcular:

- l'eficiència de transfecció: $(n^{\circ} \text{ total cèl·lules transfectades} / n^{\circ} \text{ total de cèl·lules}) \times 100$
- percentatge de cèl·lules amb patró L: $(n^{\circ} \text{ total cèl·lules L} / n^{\circ} \text{ total de cèl·lules transfectades}) \times 100$
- percentatge de cèl·lules amb patró M: $(n^{\circ} \text{ total cèl·lules M} / n^{\circ} \text{ total de cèl·lules transfectades}) \times 100$
- percentatge de cèl·lules amb patró D: $(n^{\circ} \text{ total cèl·lules D} / n^{\circ} \text{ total de cèl·lules transfectades}) \times 100$

Els resultats presentats són la mitja de tres experiments independents.

2.6.4.- Tractament amb Tritó X-100

Per determinar si les proteïnes sobreexpressades es trobaven unides o no al DNA es va fer un tractament amb Tritó X-100, el qual solubilitza les no unides. En aquest cas el procés per obtenir les mostres va ser diferent. Així doncs, 24 hores després de la transfecció es van posar uns 20 µl de concanavalina 0,5 mg/ml sobre cobreobjectes de 12 mm i es van deixar assecar durant 1 hora a temperatura ambient dins de la campana de flux laminar. Passat aquest temps es van introduir als pous d'una placa d'Elisa de 24 pouets, es van afegir 600.000 cèl·lules/pou en un volum de 0,5-1 ml i es van deixar creixent 24 hores més a 25°C. Al dia següent, es va eliminar el medi de cultiu i, dins del mateix pou, es van afegir 200 µl de Tritó X-100 0,5%. Es va incubar durant 10 minuts, es va fer un rentat amb PBS 1x i es va fixar amb

paraformaldehid 3,6% durant 10 minuts. Es va fer un últim rentat amb PBS 1x de 10 minuts i es van muntar sobre un portaobjectes amb 5 µl del medi de muntatge Mowiol-DAPI (500 µl Mowiol (Calbiochem-Novabiochem) + 50 µl DAPI 2 ng/ml).

2.6.5.- Separació de les cèl·lules deslocalitzades mitjançant citometria de flux i anàlisi per microscòpia de fluorescència

La citometria de flux permet l'anàlisi de partícules en funció de la seva fluorescència i la seva mida. Nosaltres vam emprar aquesta tècnica per separar la població de cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada. Per això es va utilitzar el citòmetre de flux *MoFlo* dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. És un FACS (*Fluorescence Analyzer Cell Sorter*) que permet purificar poblacions cel·lulars d'unes determinades característiques, en aquest cas la fluorescència que emeten.

Així doncs, es van transfectar unes 10 plaques de 60 mm² de cèl·lules Kc amb 10 µg de pCID-YFP, seguint el protocol de precipitats de fosfat càlcic, i es va procedir a la separació 48 hores després. Les cèl·lules es van desenganxar de les plaques amb l'ajut d'un raspador, es van passar a un *falcon* de 50 ml i es van centrifugar durant 2 minuts a 1300 rpm i temperatura ambient. Llavors, es va resuspendre el sediment cel·lular en un petit volum de medi, es va determinar la concentració comptant amb la càmera de Neubauer i es va ajustar per tal de tenir uns 2 ml amb 10⁷ cèl·lules/ml.

Primer es va fer un anàlisi de cèl·lules Kc sense transfectar per determinar els nivells d'autofluorescència i poder escollir a partir de quin nivell de fluorescència separàvem per poder obtenir una població rica en cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada. Les cèl·lules separades es van recollir en una placa d'Elisa de 6 pouets que contenien 1 ml de medi i es van afegir unes 300.000 cèl·lules per pou. També es van recollir unes 300.000 cèl·lules de les descartades, que en realitat són una barreja de cèl·lules no transfectades i cèl·lules transfectades que donen poca fluorescència. Com que les cèl·lules surten diluïdes amb PBS 1x, es van recollir centrifugant-les durant 2 minuts a 1300 rpm, es van resuspendre en 300 µl de medi i es van posar en pous d'una placa d'Elisa de 24.

Per poder analitzar les cèl·lules per microscòpia de fluorescència, com que teníem un número de cèl·lules molt petit, es van enganxar en cobreobjectes de 12 mm tractats amb concanavalina. Així doncs, es van posar uns 20 µl de concanavalina 0,5 mg/ml sobre els cobreobjectes i es van deixar assecar durant 1 hora a temperatura ambient dins de la campana

de flux laminar. Passat aquest temps es van introduir als pous de la placa d'Elisa i es van afegir les cèl·lules. Per analitzar la localització de Cid-YFP a les cèl·lules transfectades just al moment de separar-les es van incubar amb el cobreobjectes durant 2 hores. Per mirar la localització 24 hores després de la separació, es van incubar durant tota la nit.

Transcorregut el temps d'incubació corresponent, es va eliminar el medi del pou, es va fixar amb paraformaldehyd 3,6% i es va rentar amb PBS 1x. Finalment, es van muntar amb 5 µl de medi de muntatge Mowiol-DAPI (500 µl Mowiol (Calbiochem-Novabiochem) + 50 µl DAPI 2 ng/ml). Les mostres van ser analitzades per microscòpia de fluorescència tal i com s'explica a l'apartat 2.6.3 d'aquest capítol i es van realitzar els mateixos càlculs.

2.6.6.- Tractament amb l'inhibidor de proteosoma MG132

Per determinar si Cid-YFP pateix un procés de degradació proteosòmica es va utilitzar l'inhibidor de proteosoma MG132. Així doncs, les cèl·lules es van transfectar seguint el mateix protocol de sempre però 39 hores després de la transfecció es va començar el tractament, afegint MG132 (Sigma) al medi de cultiu a una concentració final de 10 µM a les 39, a les 42 i a les 45 hores. 48 hores després de la transfecció, és a dir, després de 3, 6 i 9 hores de tractament, es van recollir les cèl·lules tractades amb MG132 i cèl·lules no tractades, analitzant-se la localització de Cid-YFP per microscòpia de fluorescència tal i com s'ha explicat a l'apartat 2.6.3 d'aquest capítol. En cadascun dels moments en que es va afegir l'inhibidor també es van recollir alíquotes de cèl·lules, les quals també van ser analitzades per microscòpia de fluorescència.

En el cas de les cèl·lules separades per citometria de flux (apartat 2.6.5 d'aquest capítol), 18 hores després de la separació es va afegir MG132 10 µM al medi de cultiu i es van incubar les cèl·lules durant 6 hores més a 25°C abans del seu anàlisi per microscòpia de fluorescència.

2.6.7.- Immunolocalitzacions

Les immunolocalitzacions de Cid i de la fosfoserina 10 de la histona H3 (PSer¹⁰H3) van ser realitzades en cèl·lules Kc transfectades amb els plasmidis d'expressió d'interès. Les cèl·lules van ser processades igual que per analitzar la transfecció per microscòpia de fluorescència (veure apartat 2.6.3 d'aquest capítol) però, després de guardar els portes secs a 4°C enlloc d'afegir el medi de muntatge es va fer la immunolocalització.

Per permeabilitzar les cèl·lules i facilitar l'entrada dels anticossos, es van fer 2 rentats de 10 minuts amb PBT-BSA (PBS 1x, BSA (Fracció V) 0,1%, Tween 20 0,2%). Aleshores es van col·locar a sobre de les cèl·lules 10 µl del corresponent anticòs primari diluït també amb PBT-BSA. Es va posar al damunt un cobreobjectes i es va incubar dins d'una càmera humida durant 1 hora a temperatura ambient i tota la nit a 4°C.

Els anticossos primaris emprats van ser: una dilució 1:50 de α -CidNt purificat per afinitat, una dilució 1:250 de sèrum α -CidNt i una dilució 1:500 de α -PSer¹⁰H3 (Upstate).

Al dia següent es van fer 2 rentats de 10 minuts amb PBT-BSA i es va fer la incubació amb l'anticòs secundari. Es van afegir 10 µl de l'anticòs, es va posar un cobreobjectes i es va incubar durant 45 minuts a temperatura ambient dins d'una càmera humida. L'anticòs secundari que es va emprar va ser una dilució 1:400 en PBT-BSA d'un anticonill conjugat amb el fluorocrom Cy3 (Jackson ImmunoResearch).

Posteriorment, es van fer 2 rentats de 10 minuts amb PBT-BSA per eliminar l'excés de secundari i després 2 més amb PBS 1x. Finalment, es van afegir 10 µl del medi de muntatge *Mowiol*-DAPI (veure apartat 2.6.3 d'aquest capítol) i es va col·locar un cobreobjectes.

L'observació es va realitzar en el microscopi de fluorescència Eclipse E-800 (Nikon) i les fotografies es van fer amb una càmera *Colorview* 12 utilitzant com a *software* el programa *Analysis*. Les imatges van ser analitzades amb l'*Adobe Photoshop* i els comptatges es van fer manualment. D'aquesta manera es van realitzar els següents càlculs:

- percentatge de cèl·lules no transfectades que donen senyal amb α -PSer¹⁰H3:

$$(n^{\circ} \text{ cèl·lules no transfectades amb } \alpha\text{-PSer}^{10} / n^{\circ} \text{ total de cèl·lules no transfectades}) \times 100$$

- percentatge de cèl·lules amb patró de localització L que donen senyal amb α -PSer¹⁰H3:

$$(n^{\circ} \text{ cèl·lules amb patró L amb } \alpha\text{-PSer}^{10} / n^{\circ} \text{ total de cèl·lules amb patró L}) \times 100$$

- percentatge de cèl·lules amb patró de localització M que donen senyal amb α -PSer¹⁰H3:

$$(n^{\circ} \text{ cèl·lules amb patró M amb } \alpha\text{-PSer}^{10} / n^{\circ} \text{ total de cèl·lules amb patró M}) \times 100$$

- percentatge de cèl·lules amb patró de localització D que donen senyal amb α -PSer¹⁰H3:

$$(n^{\circ} \text{ cèl·lules amb patró D amb } \alpha\text{-PSer}^{10} / n^{\circ} \text{ total de cèl·lules amb patró D}) \times 100$$

Els resultats presentats són la mitja de tres experiments independents on a cadascun dels quals s'han comptat un mínim de 1000 cèl·lules totals.

2.6.8.- Seguiment *in vivo* del cultiu amb el microscopi confocal

Per tal d'estudiar el cicle cel·lular de les cèl·lules Kc transfectades amb pCid-YFP i el procés de localització de la proteïna de fusió Cid-YFP es va fer un seguiment *in vivo* amb el microscopi confocal.

Primer de tot es van transfectar les cèl·lules mitjançant precipitats de fosfat càlcic (veure apartat 2.6.2 d'aquest capítol) i es van deixar 48 hores a 25°C. Transcorregut aquest temps, es van recollir les cèl·lules, desenganxant-les de la placa amb l'ajut d'un raspador i centrifugant-les durant 2 minuts a 1300 rpm. Es va resuspendre el sediment cel·lular en 2 ml de medi nou i es van comptar en una càmera de Neubauer. Llavors, es van afegir $1,2 \cdot 10^6$ cèl·lules en un volum total de 2 ml en una placa de 35 mm de diàmetre, la qual té un pouet de 14 mm de diàmetre amb un vidre de 0,16-0,19 mm de gruix (MatTek), tractada prèviament amb concanavalina 0.5 mg/ml. Després d'incubar les cèl·lules durant 4 hores a 25°C es va canviar el medi per 2 ml de medi nou amb 0,3% d'agar (a partir d'un estoc autoclavat d'agar al 3%). Es va incubar durant 1 hora més a 25°C i ja està llest per ser estudiat al microscopi confocal.

L'obtenció de les imatges *in vivo* es va realitzar amb un microscopi confocal Leica TCS SP2-AOBS utilitzant el làser 488, amb el pic d'excitació a 514 nm per excitar el YFP de la proteïna de fusió transfectada, i captant també imatges de transmissió. Les fotografies es van captar durant un total de 16 hores amb intervals de 5 minuts i, es va agafar un gruix total de 13.5 µm dividit en 9 seccions de 1.5 µm. Per processar les imatges es va utilitzar l'*Adobe Photoshop* i el vídeo es va muntar amb el programa *ImageJ*.

2.7.- MÈTODES DE TREBALL AMB *Drosophila melanogaster*

2.7.1.- Extracció de DNA genòmic

Per obtenir DNA genòmic de *Drosophila melanogaster* es van utilitzar mosques de la soca *oregon*. Es va agafar una mosca i es va aixafar dins d'un *ependorf* amb l'ajut d'una punta de pipeta. Aleshores es van afegir 50 µl de tampó SB (Tris-HCl 10 mM pH 8,1, EDTA 1mM, NaCl 25 mM, Proteïnasa K 200 µg/ml) i es va incubar durant 20-30 minuts de 25 a 37°C. Per desnaturalitzar la Proteïnasa K es va incubar durant 1 o 2 minuts a 95°C i, finalment, es va donar un pols de centrifuga i es va guardar el sobrenedant (conté el DNA genòmic) a -20°C.

2.7.2.- Obtenció d'extractes proteics d'embrions

Per estudiar els nivells proteics de Cid endogen a mosques mutants de *Partner of Paired, Ppa*²⁰, es van obtenir extractes proteics d'embrions de 0 a 12 hores per poder realitzar un *Western blot*. Per això es van preparar nius de posta i després d'aproximadament uns 3 dies a 25°C es van començar a recollir plaques. Cal dir que es va fer tant amb les mosques mutants com amb mosques salvatges *oregon*.

Les plaques de posta les vam anar guardant a -80°C, precintades amb *parafilm* per evitar que els embrions s'hidratessin, fins que vam tenir unes 4. Llavors, es van decorionitzar els embrions incubant-los amb lleixiu durant 2 o 3 minuts i es van desenganxar amb l'ajut d'un pinzell. Aleshores, es van rentar amb PBS/Tritó X-100 0,1% sobre un embut de buit que té una membrana com a filtre per retenir els embrions, i després 2 cops més amb Tris 10 mM pH 7,5. Amb el pinzell net es van recollir els embrions de la membrana, es van posar en un *ependorf* i es van resuspendre amb tampó ENB (sacarosa 10%, Tris 10 mM pH 8, CaCl₂ 1 mM, PMSF 0.1 mM). El volum emprat va ser d'1 ml de tampó ENB per cada 100 µl d'embrions.

Es va transferir la solució a un *Dounce* tipus L i es van fer unes 10-20 passades en gel. Es va filtrar l'homogenat a través de dos gases, es va centrifugar 5 minuts a 5000 rpm a 4°C i, finalment, es va resuspendre el sediment en tampó urea (Urea 8 M, Tris 10 mM pH 8, PMSF 0,1 mM). Les mostres es van guardar a -20°C.

2.7.3.- Immunolocalitzacions a embrions

Per estudiar la localització de Cid endogen a les mosques mutants *Ppa*²⁰, es van realitzar immunolocalitzacions a embrions de 0 a 12 hores. Per això es van preparar nius i després d'aproximadament uns 3 dies a 25°C es van començar a recollir plaques de posta. Cal dir que es va fer tant amb les mosques mutants com amb mosques *oregon* salvatges.

Per recollir els embrions de la placa i decorionitzar-los es va afegir lleixiu i es van desenganxar amb l'ajut d'un pinzell. El lleixiu es va deixar durant 2-3 minuts i llavors es van rentar els embrions amb PBS/Tritó X-100 0,1% sobre un embut de buit que té una membrana com a filtre per retenir els embrions. Amb el pinzell net es van recollir els embrions de la membrana i es van posar en un vial que contenia: 2 ml de PEM (PIPES 0,1 M pH 6,9, MgSO₄ 2 mM, EGTA 1 mM), 2 ml d'heptà i 250 µl de formaldehid. Es va deixar en agitació durant 20 minuts i es va extreure el PEM (fase inferior) sense agafar els embrions, els quals es

queden a la interfase. Llavors, se'ls hi van afegir 2 ml de metanol i es van vortejar durant 20 segons. Els embrions que són bons per fer immunolocalitzacions són aquells que han estat fecundats i han perdut la membrana vitel·lina i són els que baixen al fons del tub. Així doncs, es van recollir els embrions que queden al fons amb l'ajut d'una pipeta *Pasteur* i es van passar a un *ependorff*. Finalment, es van rentar 2 o 3 cops amb metanol i es van guardar a 4°C, també en metanol, fins la seva utilització.

Per realitzar la immunolocalització es va eliminar el metanol i es van fer 3 rentats ràpid amb PBS/Tritó X-100 0,1%. És important mantenir els embrions en metanol i canviar-los a PBS/Tritó X-100 0,1% just al moment de fer la immunolocalització ja que el PBS es contamina amb molta facilitat. Posteriorment es va bloquejar fent 2 incubacions de 30 minuts amb agitació en la nòria amb PBS/Tritó X-100 0,1%/BSA 1%. Després es van incubar durant tota la nit, també a 4°C i amb agitació en la nòria, amb l'anticòs primari diluït en la mateixa solució de bloqueig. En el cas de Cid es va utilitzar una dilució 1:100 de α -CidNt purificat per afinitat.

Al dia següent es va treure l'anticòs primari i es van fer 3 rentats de 15 minuts amb la mateixa solució de bloqueig. Aquestes incubacions també es van fer amb agitació en la nòria però aquest cop a temperatura ambient. Llavors, es van incubar els embrions amb una dilució 1:400 de l'anticòs secundari en PBS/Tritó X-100 0,1% durant 2 hores a temperatura ambient i amb agitació. Com que l'anticòs secundari emprat està conjugat amb un fluorocrom, en el nostre cas Cy2 (Jackson immunoresearch), a partir d'aquest moment els *ependorfs* s'han de protegir de la llum amb paper d'alumini. Finalment, es van fer 3 rentats de 15 minuts amb PBS/Tritó X-100 0,1% i un últim rentat amb PBS 1x.

Per tenyir el DNA en aquest cas enlloc de DAPI es va emprar una tinció amb iodur de propidi. Per això, primer es van incubar els embrions durant 2 hores amb RNasa 0,2 mg/ml a temperatura ambient i després es van rentar 3 cops durant 15 minuts amb PBS 1x. Llavors, es van incubar a temperatura ambient durant 10 minuts amb iodur de propidi 3 μ g/ml (Sigma). Finalment, es van fer 3 rentats de 5 minuts amb PBS 1x i es van muntar sobre un portaobjectes utilitzant com a medi de muntatge 30 μ l de *Mowiol* (Calbiochem-Novabiochem) i cobreobjectes de 24x40 mm.

L'observació es va realitzar en el microscopi confocal Leica i les imatges van ser analitzades posteriorment amb l'*Adobe Photoshop*.

2.7.4.- Preparació de neuroblastes

Per determinar *in vivo* si els nivells proteics de Cid es veuen afectats per un mecanisme de degradació via proteosoma, vam fer immunolocalitzacions a neuroblastes obtinguts a partir de mosques heterozigotes *Pros26¹/TM3* (*Pros26[1]pb[1]p[p]/TM3, Sb[1]Ser[1]*), les quals presenten una mutació dominant letal sensible a temperatura per la subunitat $\beta 6$ del proteosoma. Com a control es van utilitzar també mosques salvatges *oregon*.

Vam posar el creuament de 20 mascles i 20 femelles heterozigotes *Pros26¹* i ho vam deixar 24 hores a 25°C. Transcorregut aquest temps vam treure les mosques adultes i vam passar el tub a la temperatura restrictiva de 29°C fins que 5 o 6 dies després les larves han arribat a l'estadi 3. És en aquest moment en el que es disseccionen els cervells de les larves per tal de preparar els neuroblastes.

Així doncs, vam disseccionar els cervells de larves a l'estadi 3 en 50 μ l de medi salí NaCl 0,7% i els vam rentar en aquest mateix medi durant uns 5 minuts. Després, per tal de poder observar metafases vam tractar durant 1-2 hores amb 100 μ l de colcemida 5 μ g/ μ l (Roche) en medi salí a les fosques i en cambra humida a temperatura ambient. Llavors, vam fer un xoc hipotònic amb citrat sòdic 0,5% a temperatura ambient durant 10 minuts i vam fixar els cervells amb formaldehid al 3,7% durant 30 minuts, preparant la dilució en aigua just al moment de fer-la servir. A continuació vam transferir els cervells a un cobreobjectes siliconat que conté uns 16 μ l d'àcid acètic 60%, vam col·locar a sobre el portaobjectes i vam fer un *squash*. Fer un *squash* consisteix en picar sobre el cobreobjectes amb un punxó fins que desapareixen les taques blanques corresponents als cervells, després es posa a sobre un tros de paper i s'apreta fort amb el dit gros durant uns 10 segons. Finalment, submergim en N₂ líquid i guardem els portes en PBS-T (PBS 1x, Tritó X-100 1%) per seguir amb la immunolocalització.

2.7.5.- Immunolocalitzacions a neuroblastes

Els neuroblastes es van preparar tal i com s'explica a l'apartat anterior (2.7.4).

Primer de tot es va bloquejar durant 1 hora amb PBS-T-llet (PBS 1x, Tritó X-100 1%, llet en pols 1%) i seguidament es va incubar amb l'anticòs primari. En aquest cas vam utilitzar una dilució 1:300 en PBS-T-llet de sèrum α -CidNt. Concretament es va incubar amb 25 μ l de l'anticòs, fent servir cobreobjectes de 24x40 mm, en una cambra humida, durant una hora a temperatura ambient i o/n a 4°C.

Al dia següent es van rentar les preparacions 2 cops durant 10 minuts amb PBS-T-llet i es van incubar durant 45 minuts, en una cambra humida i a temperatura ambient, amb una dilució 1:400 en PBS-T-llet de l'anticòs secundari Cy3 (anti-conill). Igual que amb el primari, per la incubació es van utilitzar cobreobjectes de 24x40 mm i 25 µl d'anticòs. A continuació es van fer 2 rentats de 10 minuts amb PBS-T-llet i 2 més amb PBS 1x. Per últim, es van muntar amb 30 µl de Mowiol-DAPI (50 µl DAPI 2 ng/µl en 500 µl *Mowiol*), utilitzant també cobreobjectes de 24x40 mm.

L'observació es va realitzar en el microscopi de fluorescència Eclipse E-800 (Nikon) i les fotografies es van fer amb una càmera *Colorview 12* utilitzant com a *software* el programa *Analysis*. Finalment, les imatges van ser analitzades amb l'*Adobe Photoshop*.

V.- RESULTATS

1.- ANÀLISI DELS FACTORS I MECANISMES QUE DETERMINEN LA LOCALITZACIÓ CENTROMÈRICA DE Cid

L'estudi dels determinants de la localització centromèrica de Cid es va realitzar mitjançant experiments d'expressió transitòria a cèl·lules en cultiu. Amb aquesta finalitat es va fusionar Cid, diverses formes truncades i proteïnes quimèriques, a la proteïna fluorescent EYFP. Les proteïnes de fusió es van expressar sota el control del promotor de Cid, per tal de mimetitzar el màxim possible el nivell i el patró d'expressió de la proteïna endògena, i es van determinar els patrons de localització de les diferents proteïnes per microscòpia de fluorescència.

1.1.- Expressió transitòria de Cid

Per estudiar la localització centromèrica de Cid vam construir el plasmidi pCid-YFP (veure apartat 1.2.3 de Materials i Mètodes), el qual permet l'expressió de la proteïna de fusió Cid-YFP sota el control del promotor de Cid. Aleshores, es van transfectar cèl·lules Kc amb 10 µg d'aquest plasmidi mitjançant precipitats de fosfat càlcic, seguint el protocol de l'apartat 2.6.2 de Materials i Mètodes, i 48 hores després de la transfecció es van recollir les cèl·lules i es van analitzar per microscòpia de fluorescència (veure apartat 2.6.3 de Materials i Mètodes).

Es van observar tres patrons de localització, tant a interfase com a metafase (Figura R1). Unes cèl·lules presentaven un patró de punts que correspon molt probablement a una localització centromèrica (Figura R1, L), a altres es veia Cid-YFP deslocalitzada per tot el nucli (Figura R1, D) i, a altres es veia un fons de deslocalització sobre el qual s'observava localització centromèrica, les quals vam anomenar de localització mixta (Figura R1, M). Recentment, altres grups han descrit resultats similars (Heun *et al.* 2006).

Primer de tot, per comprovar si realment el patró de punts (L) que observàvem es corresponia a una localització centromèrica, vam fer immunolocalitzacions amb anticossos α -CidNt, que reconeixen específicament el domini N-terminal de Cid. Òbviament, aquests anticossos reconeixen tant la proteïna endògena (serveixen com a marcador de la posició del centròmer) com la transfectada. El fet que la senyal de fluorescència (YFP) coincideixi amb les senyals obtingudes amb α -CidNt (Figura R.2), i que no es vegin llocs on hi hagi senyal

d'anticòs i no de YFP suggereix que, efectivament, el patró de punts (L) observat amb Cid-YFP correspon a una localització centromèrica.

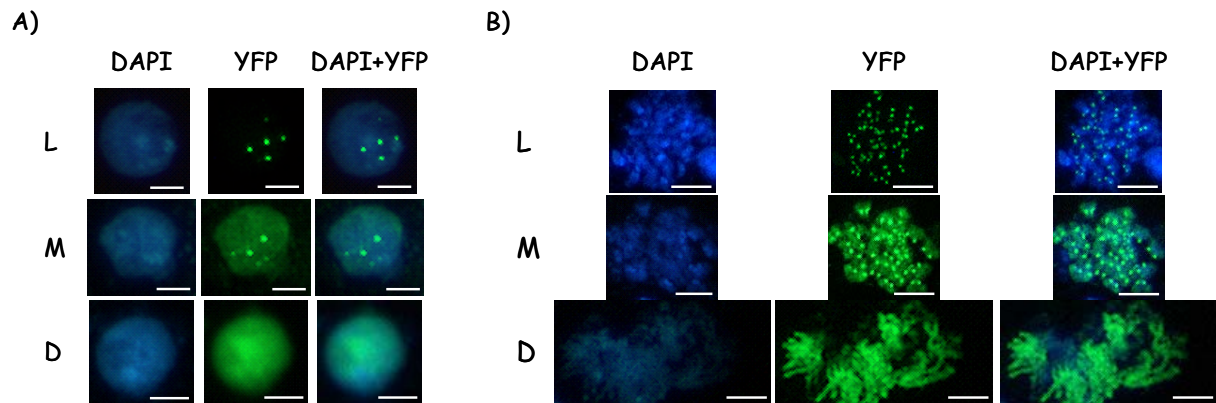


Figura R.1.- Patrons de localització obtinguts a l'expressar transitòriament Cid-YFP a cèl·lules Kc. A l'expressar la proteïna de fusió Cid-YFP, sota el control del promotor de Cid, es van obtenir 3 patrons de localització: un patró de punts corresponent a una localització centromèrica (L), un patró de localització mixta (M), on s'observa el patró de punts per sobre d'un fons de deslocalització, i un patró de deslocalització (D). Aquests patrons es van observar tant en cèl·lules en interfase (A) com en mitosi (B). El DNA es va teñir amb DAPI (blau) i en verd es mostra la senyal de fluorescència deguda a la fusió Cid-YFP. Les barres corresponen a 5 μ m.

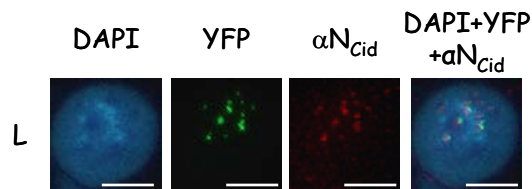


Figura R.2.- Immunolocalitzacions amb anticòssos α -CidNt a cèl·lules transfectades amb pCid-YFP. α -CidNt reconeix tant la proteïna endògena, utilitzada com a marcador de centròmer, com la transfectada. Es pot observar com totes les senyals d'anticòs (vermell) coincideixen amb senyals de YFP (verd), suggerint que no hi ha cap centròmer sense Cid-YFP. El DNA es va teñir amb DAPI (blau). Les barres corresponen a 5 μ m.

L'observació de cromosomes metafàsics amb senyal de YFP al llarg de tot el cromosoma (Figura R.1.B) suggereix que la senyal deslocalitzada (D) a interfase correspon a l'associació de Cid-YFP al llarg de la cromatina. Per confirmar aquesta hipòtesi, vam realitzar un tractament amb el detergent no iònic Tritó X-100, el qual solubilitza les proteïnes que no

es troben unides al DNA. Així doncs, es va analitzar la localització de Cid-YFP a cèl·lules Kc crescudes sobre cobreobjectes amb concanavalina, tractades o no amb Tritó X-100 (veure apartat 2.6.4 de Materials i Mètodes). Tal i com es pot observar a la Figura R.3, el tractament amb Tritó X-100 no altera els patrons de localització de Cid-YFP, observant-se els mateixos tres patrons: L, M i D (Figura R.3.B). Aquest mateix tractament solubilitza la proteïna N_{Cid}-YFP (Figura R.4), indicant que és efectiu. Tot plegat aquests resultats suggereixen que el patró de deslocalització (D) obtingut amb Cid-YFP correspon realment a una deposició al llarg de tota la cromatina.

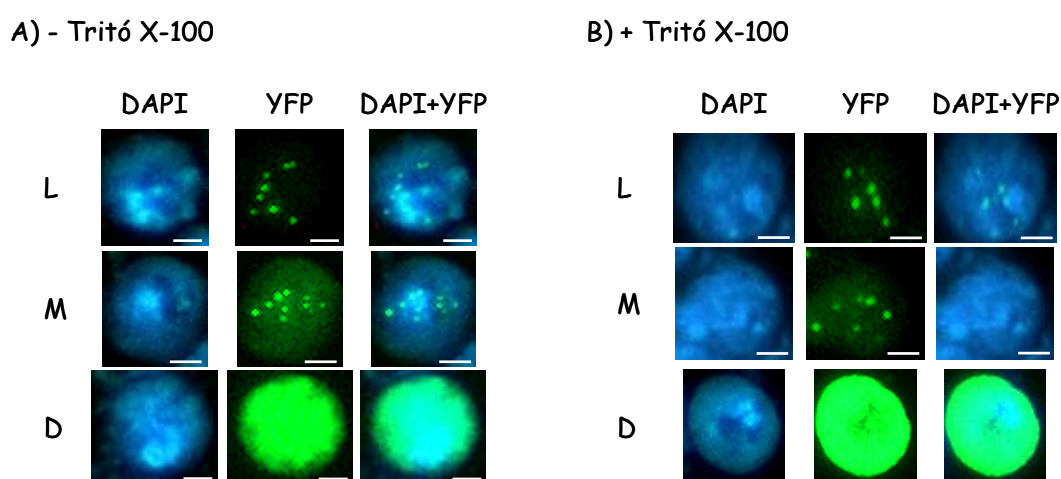


Figura R.3.- Tractament amb Tritó X-100 de cèl·lules Kc transfectades amb pCid-YFP. Cèl·lules Kc van ser transfectades amb pCid-YFP i es van créixer sobre cobreobjectes amb concanavalina. **A)** A les cèl·lules no tractades amb Tritó X-100 s'obtenen els mateixos patrons de localització L, M i D, descrits a la Figura R.1. **B)** A les cèl·lules Kc tractades amb Tritó X-100, el qual solubilitza les proteïnes no unides a DNA, s'observen els mateixos patrons de localització. En blau es mostra el DNA tenyit amb DAPI i en verd la senyal de fluorescència deguda a la proteïna de fusió Cid-YFP. Les barres corresponen a 2 μ m.

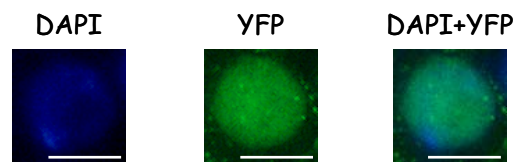
1.2.- Estudi de la contribució dels dominis N i C-terminal (HFD) a la localització centromèrica de Cid

Per tal de determinar el paper que poden jugar cadascun dels dominis estructurals de Cid en la seva localització centromèrica vam seguir una aproximació experimental similar a la descrita a l'apartat anterior. En aquest cas, però, es van expressar transitòriament a cèl·lules Kc els dominis N i C-terminal (HFD) de Cid i diverses proteïnes quimèriques, tots fusionats a YFP i sota el control del promotor de Cid.

1.2.1.-Expressió transitòria de N_{Cid} i HFD_{Cid}

Vam transfectar el plasmidi pN_{Cid} -YFP i vam fer el mateix que amb $pCid$ -YFP (apartat 1.1). Així doncs, 48 hores després de transfectar vam recollir les cèl·lules i vam analitzar la localització de la proteïna de fusió mitjançant microscòpia de fluorescència. El que vam observar va ser que, en totes les cèl·lules transfectades, N_{Cid} -YFP es deslocalitza per tot el nucli (Figura R.4.A). Això s'explica ja que, per homologia amb la histona H3 canònica, el domini de dimerització per la formació de nucleosomes i el d'unió a DNA és el C-terminal, és a dir, l'extrem N-terminal per si sol no pot ser incorporat al nucleosoma i, per tant, no pot ser depositat a la cromatina. Llavors, en aquest cas la deslocalització és deguda a una dispersió per tot el nucli de la proteïna expressada. Queda també demostrat pel fet que al tractar amb Tritó X-100 cèl·lules transfectades amb pN_{Cid} -YFP i crescudes sobre cobreobjectes tractats amb concanavalina la senyal es perd, donada la solubilització de les proteïnes nuclears no unides a DNA (Figura R.4.B). Aquest resultat a més serveix per validar l'obtingut amb el tractament amb Tritó X-100 de les cèl·lules transfectades amb $pCid$ -YFP (Figura R.3).

A) - Tritó X-100



B) + Tritó X-100

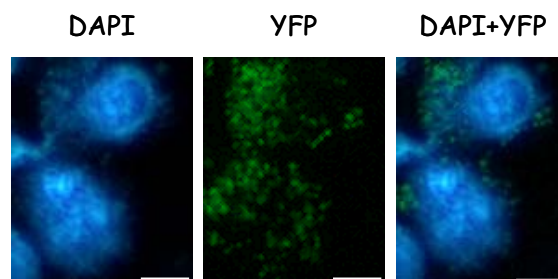


Figura R.4.- Transfecció de cèl·lules Kc amb pN_{Cid} -YFP. A) Patró de localització a l'expressar transitòriament N_{Cid} -YFP a cèl·lules Kc. A l'expressar la proteïna de fusió N_{Cid} -YFP sota el control del promotor de Cid es deslocalitza per tot el nucli. B) Tractament amb Tritó X-100. Al tractar amb Tritó X-100 la senyal deslocalitzada desapareix del nucli i s'observa sobre el citoplasma. El DNA es va tenir amb DAPI (blau) i en verd es mostra la fluorescència deguda a N_{Cid} -YFP. Les barres d'escala corresponen a 5 μ m.

Amb el plasmidi pHFD_{Cid}-YFP vam seguir també el mateix procediment i el resultat obtingut a les 48 hores després de transfectar va ser el mateix que per Cid-YFP, observant-se els mateixos tres patrons de localització (Figura R.5): cèl·lules amb localització exclusivament centromèrica (L), cèl·lules amb deslocalització per tot el nucli (D) i, cèl·lules amb un fons de deslocalització sobre el qual es veu una localització centromèrica (M). Així doncs, aquest resultat ens indicaria que el determinant estructural que fa que Cid es depositi al centròmer es troba al seu domini C-terminal. Cal dir que en estudis anteriors amb Cid i CENP-A ja s'havien obtingut resultats que suggereixen el mateix (Sullivan *et al.* 1994; Van Hooser *et al.* 2001; Vermaak *et al.* 2002).

En aquest cas, a l'igual que amb Cid-YFP, vam fer immunolocalitzacions amb l'anticòs α -CidNt per comprovar que realment el patró de punts correspon a una localització centromèrica. El resultat també va ser el mateix: les senyals de YFP i de α -CidNt coincideixen en tots els punts (Figura R.5). Cal remarcar que en aquest cas l'anticòs, donat que reconeix específicament l'extrem N-terminal de Cid, només ens està reconeixent la proteïna endògena i no la fusió HFD_{Cid}-YFP. Llavors, en aquest cas la colocalització ens està confirmant sense dubtes que el patró de punts (L i M) correspon a una localització centromèrica.

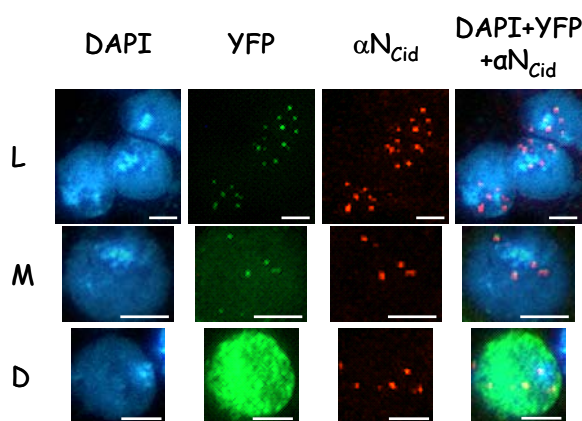


Figura R.5.- Transfecció de cèl·lules Kc amb pHFD_{Cid}-YFP. A l'expressar transitòriament la proteïna de fusió HFD_{Cid}-YFP sota el control del promotor de Cid s'observen els mateixos 3 patrons que amb Cid-YFP: localització centromèrica (L), localització mixta (M) i deslocalització per tot el nucli (D). A aquesta figura a més es mostra com els punts de YFP dels patrons L i M colocalitzen amb la senyal obtinguda amb α -CidNt, el qual reconeix només Cid endogen. El DNA es va tenyir amb DAPI (blau), en verd es mostra la senyal de fluorescència deguda HFD_{Cid}-YFP i en vermell la senyal corresponent a α -CidNt. Les barres d'escala corresponen a 5 μ m.

1.2.2.-Expressió transitòria de les proteïnes quimèriques $N_{Cid}HFD_{H3}$ i $N_{H3}HFD_{Cid}$

Per intentar analitzar si el domini N-terminal de Cid té alguna contribució a la localització centromèrica de la proteïna, vam construir els plasmidis d'expressió $pN_{H3}HFD_{Cid}$ -YFP i $pN_{Cid}HFD_{H3}$ -YFP (veure apartat 1.2.3 de Materials i Mètodes), els quals permeten l'expressió sota el control del promotor de Cid de les proteïnes quimèriques $N_{H3}HFD_{Cid}$ i $N_{Cid}HFD_{H3}$ fusionades a YFP, respectivament (Figura R.6.A).

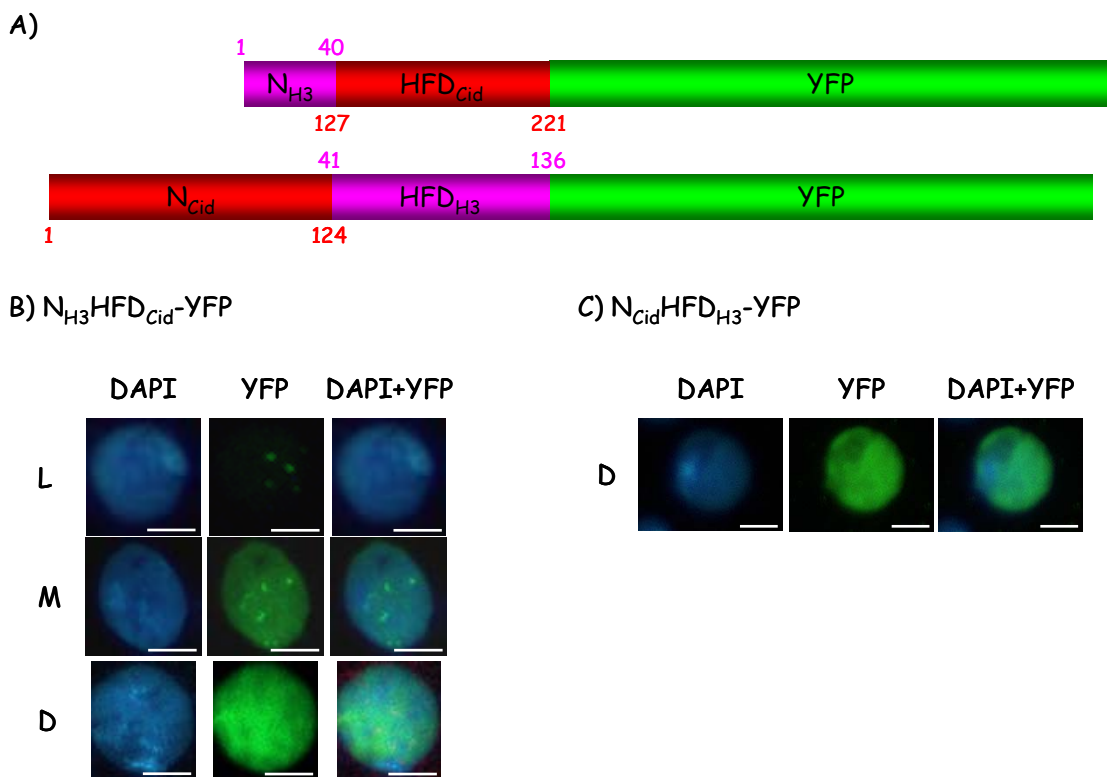


Figura R.6.- Transfecció de cèl·lules Kc amb $pN_{H3}HFD_{Cid}$ -YFP i $pN_{Cid}HFD_{H3}$ -YFP. A) Esquema estructural de les proteïnes quimèriques $N_{H3}HFD_{Cid}$ -YFP i $N_{Cid}HFD_{H3}$ -YFP. $N_{H3}HFD_{Cid}$ -YFP està formada pels primers 40 aminoàcids de la histona H3.1 (fúcsia) i el domini C-terminal de Cid (vermell), que aniria de l'aminoàcid 127 al 221. $N_{Cid}HFD_{H3}$ -YFP està formada pels primers 124 aminoàcids de Cid (vermell) i el domini C-terminal de la histona H3.1 (fúcsia), que aniria de l'aminoàcid 41 al 136. B) Transfecció de cèl·lules Kc amb $pN_{H3}HFD_{Cid}$ -YFP. L'expressió de $N_{H3}HFD_{Cid}$ -YFP dona els mateixos patrons de localització observats per Cid-YFP: localització centromèrica (L), deslocalització (D) i mixta (M). C) Transfecció de cèl·lules Kc amb $pN_{Cid}HFD_{H3}$ -YFP. L'expressió de $N_{Cid}HFD_{H3}$ -YFP dona senyal per tot el nucli (D), degut a la presència de l'extrem C-terminal de la histona H3.1 que pot depositar-se al llarg de la cromatina. En B i C es pot veure el DNA tenyit amb DAPI (blau) i en verd la senyal de fluorescència deguda a l'expressió de les proteïnes quimèriques (YFP). Les barres d'escala corresponen a 5 μ m.

En tots dos casos vam seguir el mateix procediment que per Cid-YFP, N_{Cid}-YFP i HFD_{Cid}-YFP: vam transfectar cèl·lules Kc amb el plasmidi d'interès i 48 hores després vam estudiar la localització de les proteïnes expressades transitòriament per microscòpia de fluorescència (veure apartats 2.6.2 i 2.6.3 de Materials i Mètodes).

L'expressió de N_{H3}HFD_{Cid}-YFP dona els mateixos tres patrons de localització observats amb Cid-YFP (Figura R.6.B): cèl·lules amb localització exclusivament centromèrica (L), cèl·lules amb deslocalització per tot el nucli (D) i, cèl·lules amb un fons de deslocalització sobre el qual es veu una localització centromèrica (M). Això indica que la substitució del domini N-terminal de Cid pel N-terminal de la histona H3.1 no afecta a la localització de la proteïna, especialment a la seva localització centromèrica.

Aquest resultat suggereix que el domini important per la localització de Cid és el C-terminal, igual que amb l'expressió de HFD_{Cid}-YFP, i que la presència d'un extrem N-terminal diferent del seu, en aquest cas el de la histona H3.1, no li afecta.

El patró de localització de la proteïna quimèrica N_{Cid}HFD_{H3}-YFP és ben diferent: està deslocalitzada pel nucli a totes les cèl·lules transfectades (Figura R.6.C). Això, suggereix que, en aquest cas, és l'extrem C-terminal de la histona H3.1 qui determina que la proteïna es depositi al llarg de tota la cromatina i que la presència de l'extrem N-terminal de Cid no afecta a aquesta deposició.

És a dir, segons els resultats obtinguts fins el moment semblaria que l'extrem N-terminal de Cid no té cap paper en la localització centromèrica i que l'únic responsable d'aquesta localització és l'extrem C-terminal amb plegament tipus histona (HFD).

1.2.3.- Expressió transitòria de proteïnes quimèriques portadores dels dominis N-terminals d'altres variant CenH3

També vam voler veure com afectava la presència de l'extrem N-terminal d'altres variants centromèriques de la histona H3 a la localització centromèrica de Cid. Per això, vam construir els plasmidis d'expressió pN_{Cse4}HFD_{Cid}-YFP i pN_{Cnp1}HFD_{Cid}-YFP (veure apartat 1.2.3 de Materials i Mètodes), els quals permeten l'expressió de les proteïnes quimèriques d'interès sota el control del promotor de Cid (Figura R.7.A) i, seguint el mateix procediment experimental que per les construccions emprades amb anterioritat, vam estudiar la seva localització (veure apartats 2.6.2 i 2.6.3 de Materials i Mètodes).

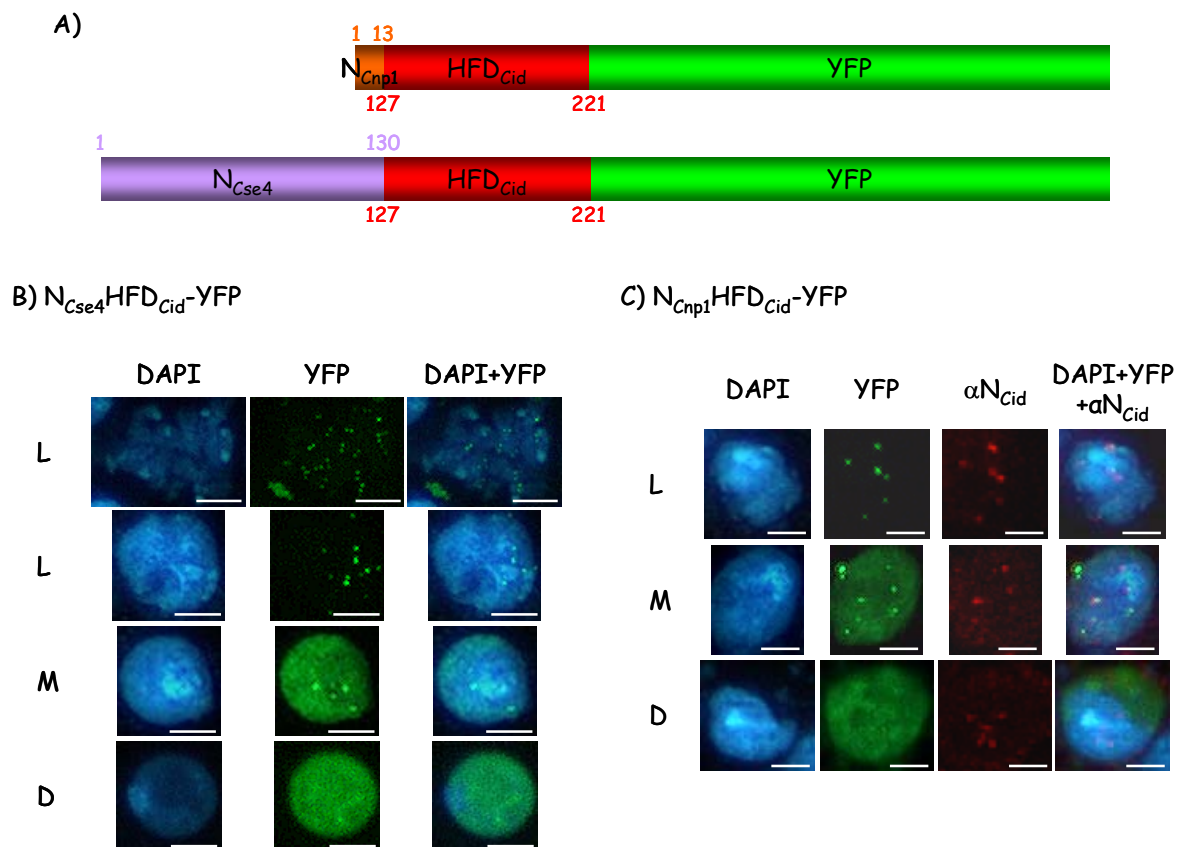


Figura R.7.- Transfecció de cèl·lules Kc amb $pN_{CenH3}HFD_{Cid}-YFP$. **A)** Esquema estructural de les proteïnes quimèriques $N_{Cnp1}HFD_{Cid}-YFP$ i $N_{Cse4}HFD_{Cid}-YFP$. $N_{Cnp1}HFD_{Cid}-YFP$ està formada pels primers 13 aminoàcids de la variant centromèrica de *S. pombe* (N_{Cnp1} , en taronja) i el domini C-terminal de Cid (HFD_{Cid} , aminoàcids 127 a 221, en vermell). $N_{Cse4}HFD_{Cid}-YFP$ està formada pels primers 130 aminoàcids de la variant centromèrica de *S. cerevisiae* (N_{Cse4} , en lila) i el domini C-terminal de Cid (HFD_{Cid} , aminoàcids 127 a 221, en vermell). **B)** Transfecció de cèl·lules Kc amb $pN_{Cse4}HFD_{Cid}-YFP$. L'expressió de $N_{Cse4}HFD_{Cid}-YFP$ dona els mateixos tres patrons de localització que Cid-YFP: el típic patró de punts corresponent a una localització centromèrica (L), un patró de localització mixta on s'observa una localització centromèrica per sobre d'un fons de deslocalització (M) i un patró de deslocalització (D). **C)** Transfecció de cèl·lules Kc amb $pN_{Cnp1}HFD_{Cid}-YFP$. L'expressió de $N_{Cnp1}HFD_{Cid}-YFP$ dona també al mateix tipus de localització. En aquest cas, a més, la immunolocalització amb α -CidNt demostra una colocalització amb la proteïna endògena als centròmers. En B i C es pot veure el DNA tenyit amb DAPI (blau) i en verd la senyal de fluorescència deguda a l'expressió de les proteïnes quimèriques (YFP). La senyal vermella en B correspon a la immunolocalització amb α -CidNt. Les barres d'escala corresponen a 5 μ m.

$pN_{Cse4}HFD_{Cid}-YFP$ codifica pels primers 130 aminoàcids de la variant centromèrica de la histona H3 de *S. cerevisiae* (Cse4p) fusionats al domini C-terminal de Cid (HFD, aminoàcids 127 a 221) (Figura 7.A). L'expressió d'aquesta proteïna quimèrica dona lloc al mateix patró de localització de Cid-YFP i $HFD_{Cid}-YFP$ (Figura R.7.B): cèl·lules amb localització exclusivament centromèrica (L), cèl·lules amb deslocalització per tot el nucli (D)

i cèl·lules amb un fons de deslocalització sobre el qual es veu una localització centromèrica (M).

pN_{Cnp1}HFD_{Cid}-YFP codifica pels primers 13 aminoàcids de la variant centromèrica de la histona H3 de *S. pombe* (Cnp1) fusionats al domini C-terminal de Cid (HFD, aminoàcids 127 a 221) (Figura 7.A). La seva expressió dona els mateixos tres patrons de localització descrits fins ara (Figura 7.C): localització centromèrica (L), deslocalització per tot el nucli (D) i un patró mixt en el que s'observa localització centromèrica per sobre d'un fons de proteïna deslocalitzada (M). En aquest cas, la immunolocalització amb l'anticòs α -CidNt, que reconeix específicament l'extrem N-terminal de Cid, confirmen un altre cop que el patró de punts observats amb les proteïnes fusionades a YFP correspon a una localització centromèrica (Figura R.7.C).

Així doncs, els resultats obtinguts amb aquestes proteïnes quimèriques suggereixen que la presència de l'extrem N-terminal de la variant centromèrica de la histona H3 d'altres espècies tampoc afecta a la localització centromèrica de Cid.

1.3.- Anàlisi de l'evolució dels patrons de localització de Cid en funció del temps de cultiu de les cèl·lules

Tal i com hem descrit a l'apartat 1.1 d'aquest capítol, l'expressió de Cid dona lloc a tres patrons de localització. El fet que coexisteixin els patrons de localització centromèrica (L) i de deslocalització (D), patró que hem anomenat M, ens va obrir la possibilitat de que hi hagués una evolució dels patrons D a L. Per adreçar aquesta qüestió vam estudiar com progressa la localització de Cid-YFP al llarg del cultiu cel·lular.

Així doncs, vam transfectar cèl·lules Kc amb pCid-YFP (veure apartat 2.6.2 de Materials i Mètodes) i vam seguir el cultiu fins a 96 hores després de la transfecció. Vam recollir mostres 24, 48, 72 i 96 hores després de la transfecció i les vam analitzar per microscòpia de fluorescència (apartat 2.6.3 de Materials i Mètodes). Vam determinar el número de cèl·lules que hi havia amb cadascun dels patrons de localització i vam calcular el percentatge respecte el total de cèl·lules transfectades (Figura R.8.A). El que vam observar va ser que el percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica (L) augmentava al llarg del temps de cultiu. A les 24 hores la majoria de cèl·lules presentava Cid-YFP deslocalitzada

mentre que a mesura que avançava el cultiu cel·lular augmentava el número de cèl·lules ben localitzades, i de les 48 a les 96 hores ja eren majoritàries.

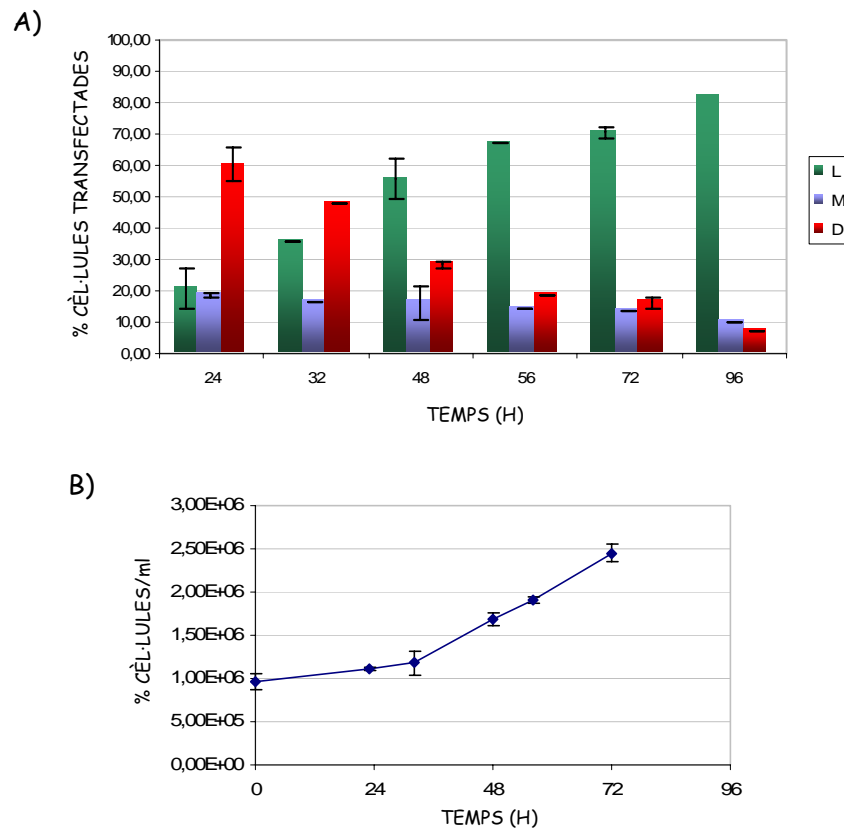


Figura R.8.- Seguiment del cultiu de cèl·lules transfectades amb pCid-YFP al llarg del temps. A) Anàlisi de l'evolució dels patrons de localització. Vam determinar el número de cèl·lules transfectades que presentaven cadascun dels patrons de localització (L en verd, M en blau i D en vermell) per cada temps i vam establir el percentatge respecte el número total de cèl·lules transfectades. A les 24 hores a la majoria de les cèl·lules transfectades Cid-YFP es troba deslocalitzada mentre que a mesura que avança el cultiu va augmentant el percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica (L), sent ja majoritàries a les 48 hores. **B) Corba de creixement.** Per tal d'obtenir la corba de creixement del cultiu vam determinar el número total de cèl·lules per mil·lilitre a diferents temps mitjançant comptatges amb la càmera de Neubauer.

Aquesta observació podria ser deguda a varis motius. Primer, si tenim en compte que Cid està implicat en la formació del cinetocor, la seva deslocalització pot provocar problemes a l'hora de la divisió cel·lular i llavors, l'augment del percentatge de cèl·lules transfectades amb localització centromèrica pot ser degut simplement a que es divideixin més ràpid. Segon,

les diferències en localització podrien correlacionar amb diferències en la quantitat de proteïna i llavors, podria ser que fos degut a un simple efecte de la dilució del plasmidi que es pot donar al dividir-se la cèl·lula (menys plasmidi, menys proteïna). Tercer, també hi ha la possibilitat que les cèl·lules que presenten un patró deslocalitzat (D) progressin fins a convertir-se en cèl·lules amb una correcta localització centromèrica (L).

En contra de les dues primeres hipòtesis està el fet que no hi ha una correlació entre el creixement del cultiu i l'augment del percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica (Figura R.8). De les 24 a les 72 hores l'increment de cèl·lules amb patró L és d'aproximadament 3,5 vegades (Figura R.8.A) mentre que el cultiu només es duplica (Figura R.8.B). És a dir, el procés de localització no sembla estar acoblat al creixement del cultiu i això és encara més evident si ens fixem en els canvis de les 24 a les 32 hores, on el percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica (L) augmenta 1,5 vegades (Figura R.8.A) tot i que el cultiu no creix (Figura R.8.B).

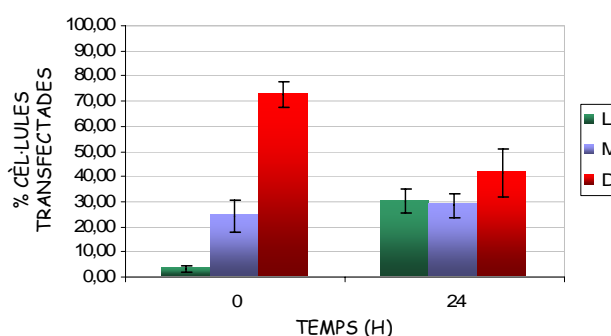


Figura R.9.- Anàlisi de l'evolució dels patrons de localització d'un cultiu enriquit en cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada (D). 48 hores després de transfectar cèl·lules Kc amb pCid-YFP vam separar per citometria de flux aquelles cèl·lules que emeten més fluorescència, obtenint d'aquesta manera un cultiu enriquit en cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada (D). Llavors, mitjançant un anàlisi per microscòpia de fluorescència vam determinar el número de cèl·lules que presentava cadascun dels tres patrons de localització (L en verd, M en blau i D en vermell) en el moment de la separació i vam calcular el percentatge respecte el total de cèl·lules transfectades. Després d'haver incubat el cultiu durant 24 hores a 25°C vam realitzar els mateixos càlculs. Tal i com es pot observar a la gràfica, el número de cèl·lules amb localització centromèrica augmenta d'un 3%, al moment de la separació, a un 30% 24 hores després.

Altres observacions confirmen que les cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada (patró D) evolucionen fins a convertir-se en cèl·lules amb localització centromèrica (patró L). Primer, el procés de pas del patró D al patró L es pot seguir en cèl·lules separades per FACS (Figura

R.9). 48 hores després de transfectar cèl·lules Kc amb pCid-YFP vam separar les cèl·lules amb el patró de deslocalització (D) mitjançant citometria de flux, gràcies a les diferències de fluorescència (apartat 2.6.5 de Materials i Mètodes). Llavors, vam determinar el número de cèl·lules amb cadascun dels patrons de localització (L, M i D) en el moment de la separació mitjançant microscòpia de fluorescència (apartat 2.6.5 de Materials i Mètodes) i vam calcular el percentatge respecte el total de cèl·lules transfectades. Vam incubar el cultiu 24 hores més a 25°C i vam tornar a realitzar els mateixos càlculs. El que vam observar va ser que el número de cèl·lules amb localització centromèrica augmentava del 3%, que hi havia en el moment de la separació, fins al 30% després de les 24 hores de cultiu addicionals (Figura R.9).

Una segona observació és l'obtinguda fent un seguiment *in vivo* del cultiu de cèl·lules transfectades on, tal i com es pot veure a l'exemple de la Figura R.10, hi ha cèl·lules en interfase amb Cid-YFP deslocalitzada per tot el nucli (patró D) que evolucionen fins a convertir-se en cèl·lules amb localització centromèrica (patró L), sense que hagi tingut lloc cap divisió cel·lular. Al moment de començar el seguiment *in vivo* (Figura R.10, temps 0) la cèl·lula presenta Cid-YFP deslocalitzada per tot el nucli i 1 hora 40 minuts després ja es comença a veure com va desapareixent la senyal de YFP, convertint-se entre les 3 hores 20 minuts i les 5 hores en una cèl·lula amb un patró de punts (patró L), el qual es manté fins el final del seguiment *in vivo*. Durant aquest temps no hi ha hagut divisió cel·lular.

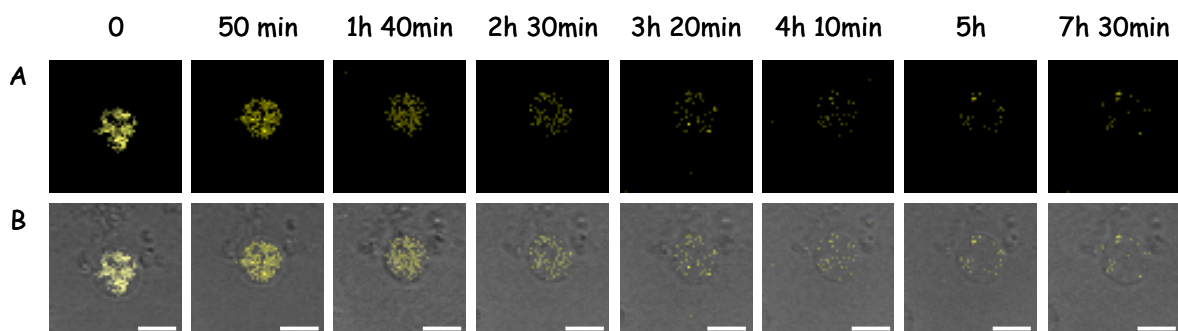


Figura R.10.- Seguiment *in vivo* del procés de localització centromèrica. Al fer un seguiment *in vivo* d'un cultiu de cèl·lules Kc transfectades amb pCid-YFP es pot observar com cèl·lules en interfase amb Cid-YFP deslocalitzada per tot el nucli (patró D) progressen fins a convertir-se en cèl·lules amb localització centromèrica (patró L), sense que tingui lloc cap divisió cel·lular. En A es pot veure la senyal deguda a YFP i en B la superposició amb la imatge de transmissió. La barra d'escala correspon a 5 μ m. Aquesta figura correspon al vídeo suplementari R10.

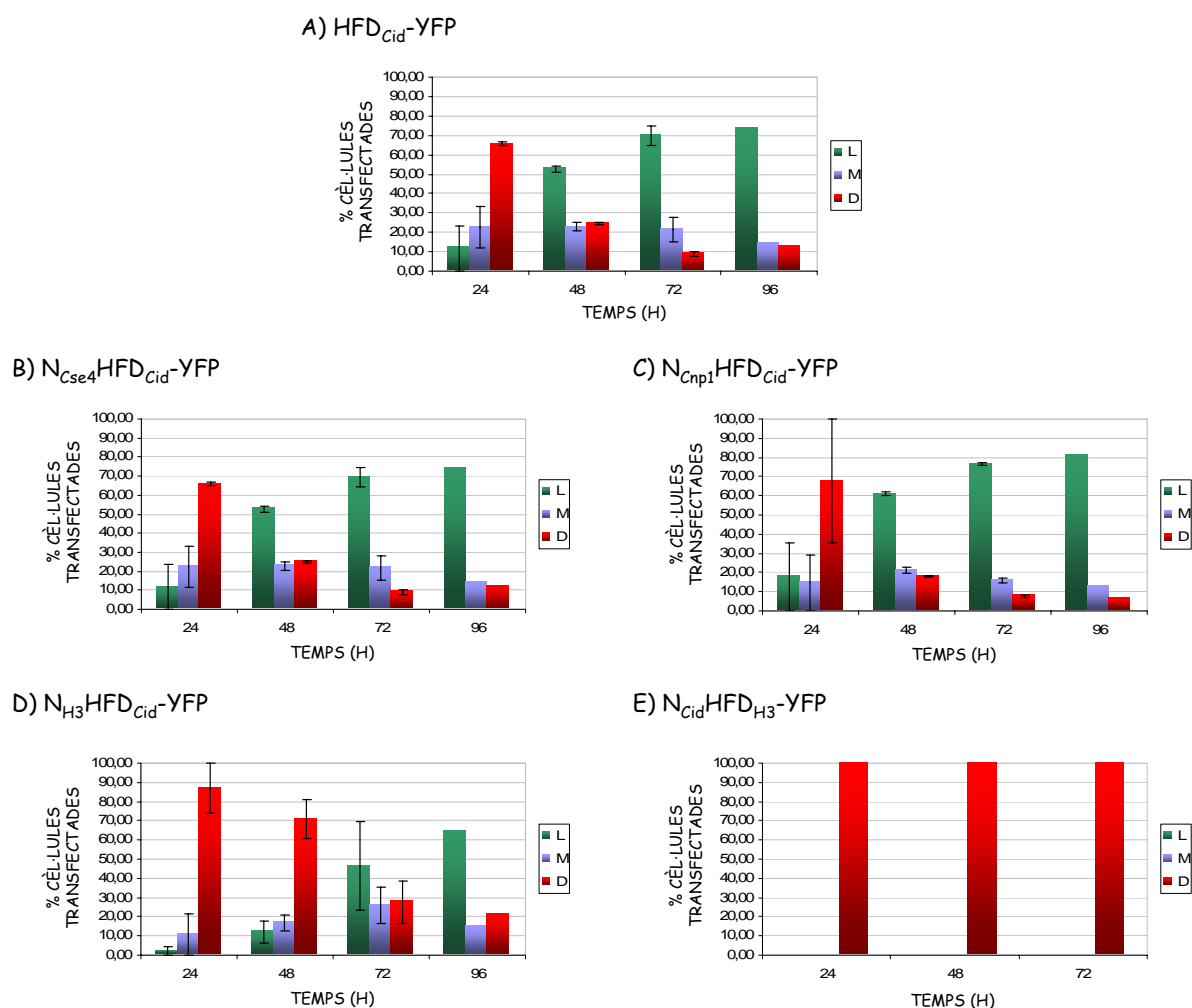


Figura R.11.- Anàlisi del patró de localització al llarg del cultiu cel·lular. A) HFD_{Cid} -YFP. B) $N_{Cse4}HFD_{Cid}$ -YFP. C) $N_{Cnp1}HFD_{Cid}$ -YFP. D) $N_{H3}HFD_{Cid}$ -YFP. E) $N_{Cid}HFD_{H3}$ -YFP. Vam determinar el número de cèl·lules transfectades que presentaven cadascun dels patrons de localització (L en verd, M en blau i D en vermell) 24, 48 i 72 hores després de la transfecció i vam establir el percentatge respecte el número total de cèl·lules transfectades. En A, B, C i D, on s'observen els tres patrons de localització, a les 24 hores a la majoria de les cèl·lules transfectades la corresponent proteïna quimèrica es troba deslocalitzada mentre que a mesura que avança el cultiu va augmentant el percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica, sent ja majoritàries a les 48 hores, excepte en el cas de $N_{H3}HFD_{Cid}$ -YFP que és a les 72 hores. En E es pot veure com $N_{Cid}HFD_{H3}$ -YFP es manté sempre deslocalitzada.

L'anàlisi de l'evolució dels patrons de localització també es va dur a terme amb HFD_{Cid} -YFP i proteïnes quimèriques amb diferents dominis N-terminals: $N_{Cse4}HFD_{Cid}$ -YFP, $N_{Cnp1}HFD_{Cid}$ -YFP i $N_{H3}HFD_{Cid}$ -YFP. A l'apartat 1.2 d'aquest capítol s'ha mostrat com aquestes construccions donen lloc als tres patrons de localització L, M i D ja descrits amb anterioritat. A més, també es va realitzar l'estudi amb la proteïna quimèrica $N_{Cid}HFD_{H3}$ -YFP, que només dona el patró deslocalitzat D. En tots els casos vam fer el seguiment durant 96

hores, excepte per $N_{Cid}HFD_{H3}$ -YFP on va ser de 72 hores, recollint mostres a intervals de 24 hores (Figura R.11). A l'igual que amb Cid-YFP, per cada temps vam determinar mitjançant microscòpia de fluorescència el número de cèl·lules que presentava cadascun dels patrons de localització (L, M i D) i vam calcular el percentatge respecte el número total de cèl·lules transfectades.

Es pot observar com les construccions que donen un patró de localització com el de Cid-YFP també presenten canvis al llarg del temps. Les cèl·lules transfectades amb HFD_{Cid} -YFP, $N_{Cse4}HFD_{Cid}$ -YFP i $N_{Cnp1}HFD_{Cid}$ -YFP a les 24 hores són majoritàriament deslocalitzades mentre que a mesura que transcorre el cultiu va augmentant el número de cèl·lules amb una correcta localització centromèrica, sent majoritàries a les 48-72 hores (Figura R.11.A-C). Ara bé, el cultiu de cèl·lules transfectades amb $N_{H3}HFD_{Cid}$ -YFP també es va enriquint en cèl·lules amb localització centromèrica però de manera més retardada ja que no són majoritàries fins a les 72 hores (Figura R.11.D). En canvi, la construcció $N_{Cid}HFD_{H3}$ -YFP, que només dona el patró deslocalitzat (D), no presenta aquesta evolució (Figura R.11.E).

1.4.- Anàlisi de la contribució del proteosoma a la localització centromèrica de Cid

Els resultats anteriors indiquen que quan s'expressa transitòriament Cid a cèl·lules Kc s'obtenen dos tipus de localitzacions: per tota la cromatina (patró D, deslocalitzat) i només a les regions centromèriques (patró L, localitzat). A més, les cèl·lules que presenten Cid deslocalitzada per tota la cromatina evolucionen a un patró on Cid es localitza exclusivament a les regions centromèriques. Aquest procés de localització suposa una dràstica disminució dels nivells proteics de Cid al passar de D a L, a jutjar a partir dels canvis en fluorescència, suggerint l'existència d'un mecanisme de regulació dels nivells d'expressió de Cid.

Per tal d'analitzar si aquesta regulació té lloc a nivell transcripcional, vam determinar mitjançant RT-PCR (apartat 2.2 de Materials i Mètodes) els nivells d'mRNA de Cid-YFP a les 24, 48 i 72 hores després de la transfecció (Figura R.12). Per tal de detectar només l'mRNA corresponent a la proteïna de fusió Cid-YFP i no a l'endògena vam utilitzar oligonucleòtids que amplificaven la regió del YFP. Com a control intern de la quantitat de RNA total emprat en cada reacció es va amplificar una regió del mRNA de l'actina 5C i, per

descartar que l'amplificació fos deguda a la presència de DNA, es va fer simultàniament un control amb una sèrie de reaccions amb les mateixes condicions que per la RT-PCR però afegint els oligonucleòtids després de que tingués lloc la reacció de la transcriptasa reversa. A les 24 hores ja es detecta l'mRNA de Cid-YFP, els nivells augmenten a les 48 i són similars a les 72 hores (Figura R.12). Ara bé, aquest canvis, i sobretot la petita disminució observada a les 72 hores, no semblen ser suficientment significatius com per explicar els canvis en la quantitat de proteïna existent entre les cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada (D) i les que presenten un patró de localització centromèrica (L) que hi ha a jutjar pels canvis en l'intensitat de fluorescència (Figura R.2). Això suggereix que la regulació dels nivells de Cid no té lloc a nivell transcripcional i, per tant, que molt probablement té lloc a nivell proteic.

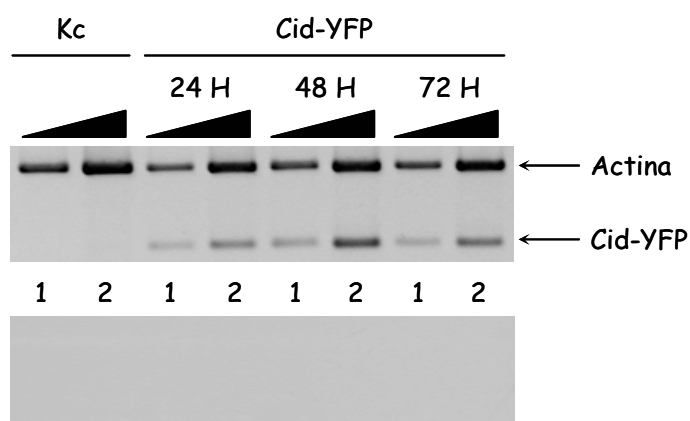


Figura R.12.- Determinació dels nivells d'mRNA de Cid-YFP. Es va determinar la quantitat d'mRNA de Cid-YFP 24, 48 i 72 hores després de la transfecció (Cid-YFP), utilitzant com a control oligonucleòtids específics per l'actina 5C (Actina). En tots el casos es van emprar quantitats creixents d'RNA total: 0,5 ng (carrils 1) i 5 ng (carrils 2). Com a control negatiu per descartar la presència de DNA es van dur a terme les mateixes reaccions però afegint els oligonucleòtids després de la retrotranscripció però abans de la PCR (panel inferior). Kc correspon a les cèl·lules sense transfectar i Cid-YFP a les cèl·lules transfectades.

1.4.1.- Estudi de la localització de Cid-YFP en cèl·lules transfectades i tractades amb l'inhibidor del proteosoma MG132

Per intentar determinar si realment l'augment de cèl·lules amb Cid-YFP localitzada al centròmer es deu a que en cèl·lules on és deslocalitzada per tot el nucli té lloc un procés de

degradació, vam dur a terme diferents assajos amb l'inhibidor reversible del proteosoma MG132.

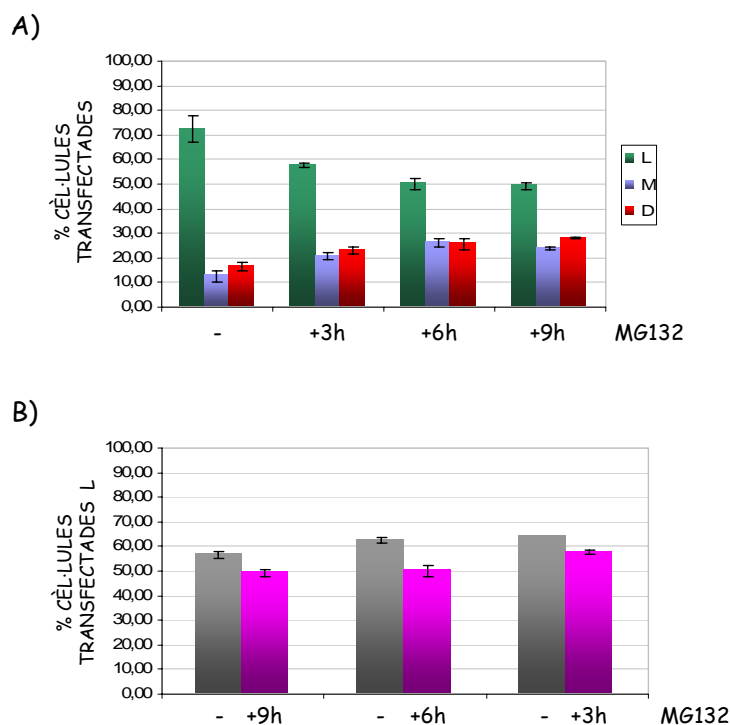


Figura R.13.- Tractament amb MG132 de cèl·lules transfectades amb pCid-YFP. Es van transfectar cèl·lules Kc amb pCid-YFP i 48 hores després es va determinar, per microscòpia de fluorescència, el nombre de cèl·lules que presentaven cadascun dels tres patrons de localització (L en verd, M en blau i D en vermell), després d'haver tractat el cultiu durant 3, 6 o 9 hores amb l'inhibidor del proteosoma MG132 i sense tractar. Es van calcular els percentatges respecte el nombre total de cèl·lules transfectades. **A)** En aquest gràfic es pot observar com el percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica (L, verd) disminueix d'un 72%, quan les cèl·lules no es tracten, fins a un 58, 50 o 49% si el cultiu es tracta amb l'inhibidor del proteosoma MG132 durant 3, 6 o 9 hores, respectivament. **B)** En aquesta gràfica es compara el percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica (L) en el moment d'iniciar el tractament amb MG132 (barres de color gris) i a les 48 hores, després de 9, 6 i 3 hores de tractament, respectivament (barres de color fúcia). Es pot observar com, en tots tres casos, després del tractament amb l'inhibidor MG132 el percentatge de cèl·lules amb un patró de localització centromèrica (L) és inferior al que hi havia en el moment d'afegir-lo.

En primer lloc, vam transfectar cèl·lules Kc amb pCid-YFP (apartat 2.6.2 de Materials i Mètodes) i 39 hores després vam començar a tractar amb MG132. Concretament, vam realitzar el tractament afegint l'inhibidor 39, 42 o 45 hores després de la transfecció i analitzant la localització de Cid-YFP a les 48 hores, cosa que representa una durada dels

tractaments de 9, 6 i 3 hores, respectivament (apartat 2.6.6 de Materials i Mètodes). Llavors, mitjançant microscòpia de fluorescència vam determinar el número de cèl·lules que presentava cadascun dels patrons de localització (D, L o M) a les 48 hores després de transfectar sense haver tractat amb MG132 i havent tractat, així com en el moment d'afegir l'inhibidor al cultiu.

A la Figura R.13 s'observa com el percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica (L) 48 hores després de transfectar disminueix al tractar el cultiu amb l'inhibidor del proteosoma. Així, el percentatge de cèl·lules amb Cid localitzada als centròmers a les 48 hores és d'un 72% en absència de tractament i d'un 58, 50 i 49% després de tractar amb MG132 durant 3, 6 i 9 hores, respectivament (Figura R.13.A). És més, al tractar amb MG132 el número de cèl·lules amb localització centromèrica (L) a les 48 hores és inferior que el que hi havia en el moment d'afegir l'inhibidor al cultiu (Figura R.13.B). Això es dona amb els 3 temps de tractament: al tractament de 3 hores passa d'un 64% en el moment d'iniciar el tractament (45 hores) a un 57%; al tractament de 6 hores passa d'un 62% (a les 42 hores) a un 50% i al tractament de 9 hores passa d'un 56% (a les 39 hores) a un 49%.

Els estudis anteriors estan realitzats amb tot el cultiu de cèl·lules transfectades, on en realitat tenim una barreja de cèl·lules no transfectades i cèl·lules amb diferents tipus de localitzacions. Tal i com s'ha vist abans (apartat 1.3 d'aquest capítol), les cèl·lules amb un patró de deslocalització (D) separades per citometria de flux evolucionen fins a convertir-se en cèl·lules amb localització centromèrica (patró L). Llavors, vam voler veure quin era l'efecte del tractament amb l'inhibidor del proteosoma a aquests cultius enriquits en cèl·lules D. Així doncs, 18 hores després de la separació vam afegir MG132 al medi de cultiu i vam determinar el percentatge de cèl·lules amb cadascun dels patrons de localització (D, L o M) després de 6 hores de tractament, és a dir, 24 hores després de la separació. Si el cultiu es deixa sense tractar el percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica (L) augmenta des d'un 3%, al moment de la separació, fins a un 30%. En canvi, al realitzar el tractament de 6 hores amb MG132 només augmenta fins a un 12% (Figura R.14), suposant un 60% menys de cèl·lules amb localització centromèrica (L).

Aquests resultats indiquen que existeix un mecanisme de degradació proteolítica que regula els nivells de Cid-YFP a cèl·lules Kc.

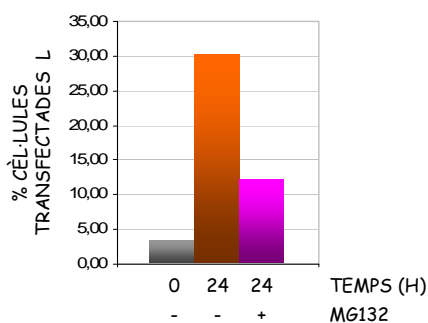


Figura R.14.- Tractament amb MG132 d'un cultiu enriquit en cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada (D). Mitjançant citometria de flux es va obtenir un cultiu enriquit en cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada, es va determinar el percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica (temps 0, color gris), i es va analitzar com canvia aquest percentatge després d'incubar el cultiu 24 hores més a 25°C i havent-lo tractat (barra de color fucsia) o no (barra taronja) durant 6 hores amb l'inhibidor del proteosoma MG132. Igual que en els experiments anteriors, el número de cèl·lules amb localització centromèrica (L) es va determinar per microscòpia de fluorescència i es va calcular el percentatge respecte el número total de cèl·lules transfectedes. El que es pot observar és que al tractar el cultiu amb MG132 el percentatge només augmenta d'un 3 a un 12%, un 60% menys que si el cultiu no es tracta amb cap inhibidor.

1.4.2.- Estudi de la localització de Cid en mutants del proteosoma

Tots els experiments exposats fins al moment han estat realitzats mitjançant transfeccions transitòries en cèl·lules Kc de *D. melanogaster*. Hi ha la possibilitat, doncs, de que els resultats obtinguts siguin simplement l'efecte ocasionat per la sobreexpressió de Cid i que la degradació via proteosoma no sigui un mecanisme que contribueixi a la localització centromèrica de la proteïna endògena. Per analitzar aquesta possibilitat vam decidir analitzar els efectes de mutacions del proteosoma sobre els nivells i la localització de Cid.

El proteosoma (proteosoma 26S) és un gran complex de proteïnases altament conservat (Tanaka *et al.* 1992) encarregat de degradar aquelles proteïnes que han sigut poliubiquitinades. A eucariotes es pot trobar tant al citosol com al nucli i consisteix en una estructura cilíndrica formada per múltiples proteases ensamblades en quatre anells (proteosoma 20S), els llocs actius de les quals formen una càmera central on són processades les proteïnes a degradar. Els dos anells interns estan formats cadascun per set subunitats tipus β diferents ($\beta 1$ - $\beta 7$) mentre els dos externs estan compostats per set subunitats tipus α ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) (Baumeister *et al.* 1998; Unno *et al.* 2002). Als extrems un grup de polipèptids amb activitat ATPasa (partícules 19S) contenen un lloc d'unió a les cadenes d'ubiquitina i actuen com a selectors de les proteïnes que han de ser degradades.

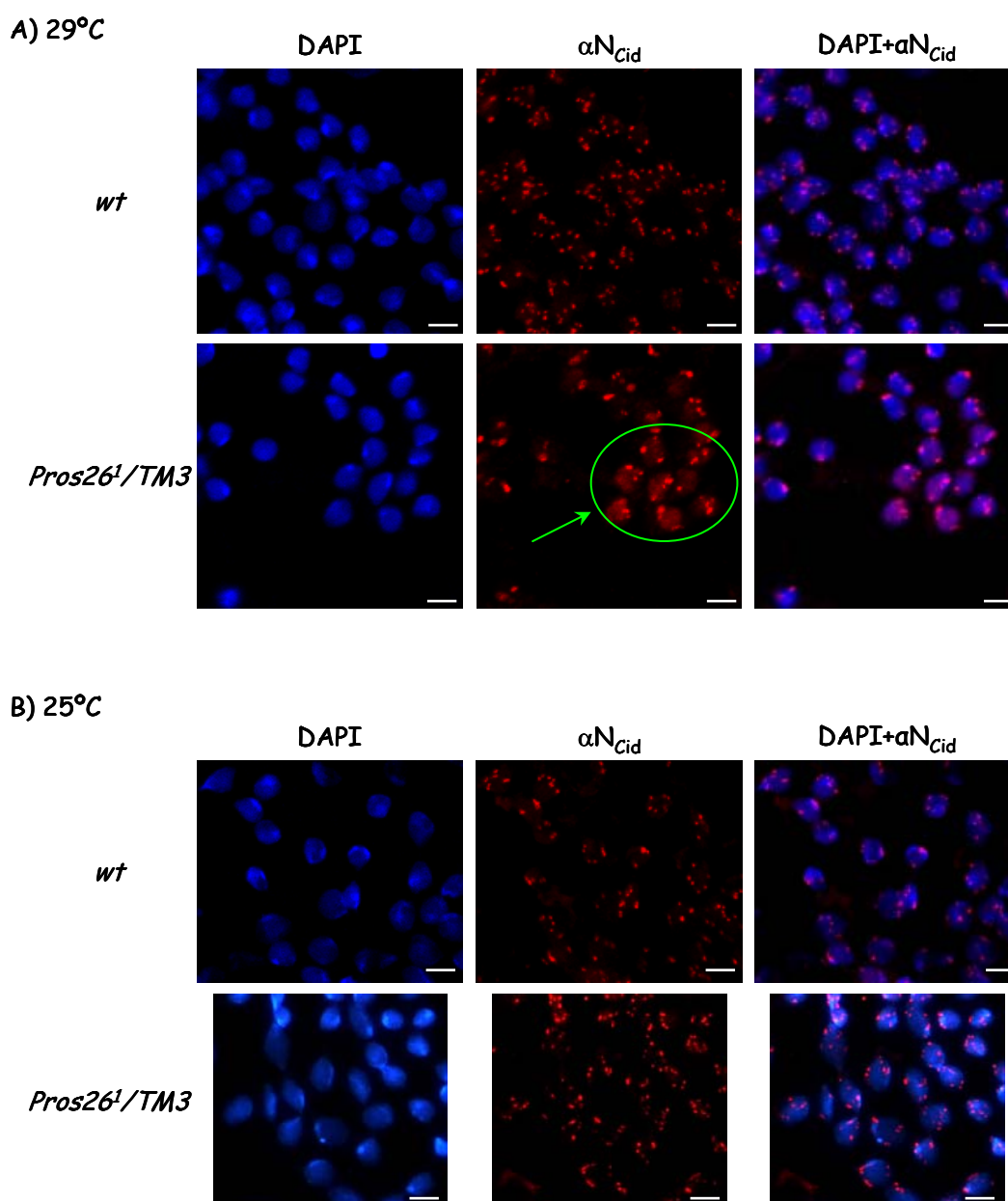


Figura R.15.- Anàlisi de l'efecte de mutacions al proteosoma sobre la localització de Cid a neuroblastes. Es van preparar neuroblastes a partir de larves salvatges oregon (*wt*) i de larves mutants *Pros26¹* heterozigotes (*Pros26¹/TM3*), les quals van ser crescudes a la temperatura restrictiva de 29°C (A) o a la permissiva de 25°C (B). Per fer la immunolocalització es va utilitzar l'anticòs α -CidNt, que reconeix específicament l'extrem N-terminal de Cid. En blau es pot veure el DNA tenyit amb DAPI i en vermell la senyal de l'anticòs. En A es senyala amb fletxa i cercle verds les cèl·lules amb un patró de localització mixta. Les barres d'escala corresponen a 5 μ m.

En aquest treball vam utilitzar el mutant *Pros26¹*. L'al·lel *Pros26¹* codifica per la subunitat $\beta 6$ del proteosoma 20S contenint una mutació que produeix un polipèptid termolàbil

(Saville and Belote 1993). Concretament, només hi ha una diferència en la regió codificant respecte la salvatge que dona lloc a la substitució d'una treonina per una leucina a la posició 47. El fenotip d'aquest mutant en homozigosi és letal, ja que mosques *Pros26^l/Pros26^l* crescudes a 25°C moren durant l'estadi de larva 1. Ara bé, en heterozigosi presenten un fenotip dominant letal sensible a temperatura, ja que mosques *Pros26^l/+* crescudes a 29°C no arriben a adults mentre que a 25°C la viabilitat és normal. Aquestes mosques heterozigotes crescudes a la temperatura restrictiva de 29°C moren a pupa, amb la part anterior de l'adult completament diferenciada però presentant defectes al desenvolupament del segment abdominal. Cal dir que el període sensible a temperatura d'aquests mutants comença a l'estadi de larva 3 i finalitza a pupa (Holden and Suzuki 1973).

Així doncs, per estudiar si l'absència d'activitat proteosomal afecta als nivells i la localització de Cid vam creuar a 25°C 20 mascles heterozigots *Pros26^l/TM3* i 20 femelles heterozigotes *Pros26^l/TM3* i després de 24 hores a 25 °C, moment en el que comença l'estadi de larva 1, vam treure els adults i vam posar els tubs a 29°C. Després de 5 o 6 dies, quan les larves ja havien arribat a estadi L3, es van dissecionar els cervells per preparar neuroblastes (apartat 2.7.4 de Materials i Mètodes), just abans de que arribessin a pupa i morissin. *TM3* és un cromosoma 3 balancejat que conté múltiples inversions (*In(3LR)TM3*) que suprimeixen la recombinació i, l'emprat en aquest estudi, conté com a marcadors mutacions en els gens *Stubble (Sb)* i *Serrate (Ser)*. Aquestes mutacions en heterozigosi donen lloc als fenotips de quetes curtes i ales trencades, respectivament, i provoquen letalitat embrionària en homozigosi. És a dir, tota la progènie del creuament de mosques heterozigotes *Pros26^l/TM3* correspondrà a mosques *Pros26^l/TM3* perquè ni les mosques *Pros26^l/Pros26^l*, les quals moren a larva 1, ni les *TM3/TM3* són viables. Com a control vam realitzar el mateix procediment amb mosques salvatges *oregon*.

Un cop obtinguts els neuroblastes vam realitzar immunolocalitzacions amb l'anticòs α -CidNt (apartat 2.7.5 de Materials i Mètodes). Com es pot observar a la Figura R.15.A, mentre als neuroblastes de larves salvatges (*wt*) crescudes a la temperatura restrictiva de 29°C s'observa el típic patró de punts corresponent a una localització exclusivament centromèrica, al preparar neuroblastes a partir de les larves mutants (*Pros26^l/TM3*), també crescudes a 29°C, alguns presenten un patró mixt de localització (M) com el que havíem observat amb els experiments de transfecció, tot i que a la majoria dels neuroblastes la localització de Cid és exclusivament centromèrica. Concretament, el percentatge de neuroblastes en el que

s'observa aquesta deslocalització és d'aproximadament un 8 % (N = 6566). Cal remarcar que aquest efecte no s'observa quan les larves mutants han crescut a la temperatura permissiva de 25°C (N = 3250) (Figura R.15.B) ni amb larves salvatges (*wt*) crescudes a 29°C (N = 3960) o a 25°C (N = 1206) (Figura R.15.A-B). En aquests casos cap de les cèl·lules analitzades presentava deslocalització de Cid.

És a dir, aquest resultat suggeriria que, efectivament, un mecanisme de degradació via proteosoma contribueix a la localització centromèrica de Cid endògena i que les observacions anteriors no són degudes a una sobreexpressió de la proteïna.

2.- ESTUDI DE LA INTERACCIÓ DE Cid I Ppa

A l'apartat 1 d'aquest capítol hem vist com a l'expressar Cid-YFP a cèl·lules Kc s'obtenen tres patrons de localització: localització centromèrica (L), deslocalització al llarg de tota la cromatina (D) i un patró mixt (M). Mitjançant seguiments *in vivo* del cultiu i anàlisis de la localització al llarg del temps, amb tot el cultiu de cèl·lules transfectades i amb cultius rics en cèl·lules amb un patró de deslocalització (D), hem observat com cèl·lules amb un patró D evolucionen fins a convertir-se en cèl·lules amb localització centromèrica (L) i que aquest procés disminueix al tractar el cultiu amb l'inhibidor del proteosoma MG132. És més, a neuroblastes obtinguts a partir de larves de les mosques mutants pel proteosoma *Pros26^l* també hem observat com Cid es deslocalitza. És a dir, els resultats descrits a l'apartat 1 d'aquest capítol indiquen que un mecanisme de degradació proteolítica via proteosoma contribueix a la localització centromèrica de Cid. És en aquest context que guanyen especial interès els nostres treballs anteriors on, mitjançant un assaig de dos híbrids a llevat (*S. cerevisiae*) (Moreno 2002), vàrem observar que l'extrem N-terminal de Cid interaccionava amb els darrers 92 aa de Ppa (*Partner of paired*).

Ppa és una proteïna F-box implicada en la degradació del factor de transcripció Paired (Raj *et al.* 2000). Té una seqüència de 538 aminoàcids i conté un domini ric en alanina, histidina i prolina, un domini F-box i 11 dominis rics en leucina (LRRs) (Figura R.16.A). La presència d'un domini ric en alanina, histidina i prolina és un tret diferencial de Ppa respecte altres proteïnes F-box descrites fins el moment. De fet és una regió similar als dominis rics en alanina identificats a alguns repressors transcripcionals. El domini F-box és un domini d'interacció amb la proteïna Skp1, la qual s'associa també a la proteïna Cdc53/Cullin i a Rbx1 formant el complex SCF (Skp1/Cullin/F-box) (Figura R.16.B). El complex SCF actua com un enzim ubiquitina–lligasa E3 que catalitza la transferència de l'ubiquitina des de l'enzim de conjugació E2 fins la proteïna substrat, la qual és poliubiquitinada i degradada via proteosoma. Les proteïnes F-box es divideixen en dos grups segons el domini d'interacció proteïna–proteïna amb el que reconeixen el substrat: WD40 o LRR. Ppa pertany a aquest últim grup, és una proteïna F-box amb dominis LRRs. Els dominis rics en leucina són dominis de 20 a 29 residus implicats en interacció proteïna–proteïna i que es troben presents a moltes proteïnes amb diverses funcions biològiques (Kobe and Deisenhofer 1994). A l'assaig

de dos híbrids anteriorment mencionat concretament es va trobar que Cid era capaç d'interaccionar amb els 3 últims LRRs de Ppa.

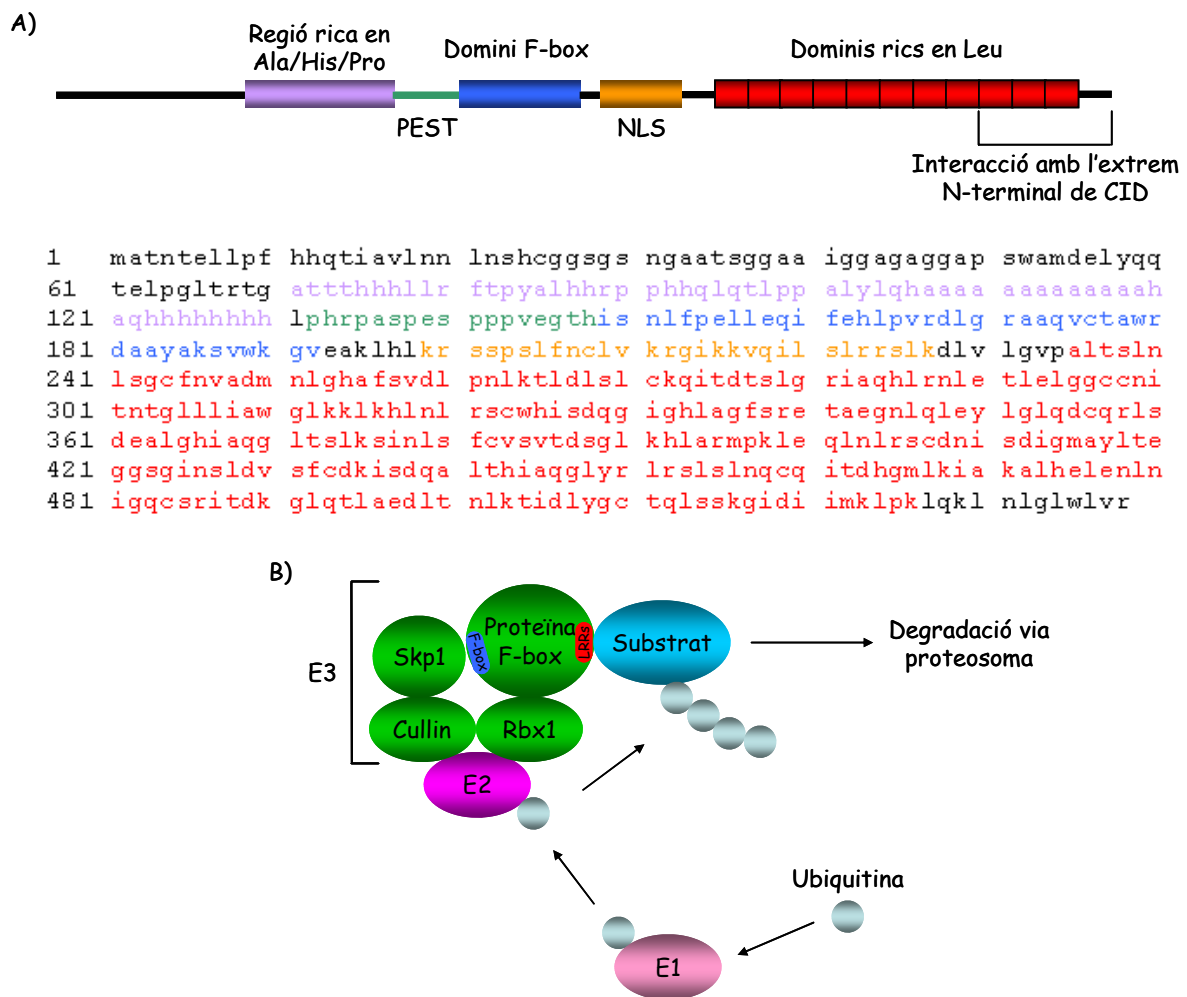


Figura R.16.- A) Esquema de l'estructura de la proteïna Ppa. A dalt es representen esquemàticament cadascun dels dominis que conformen Ppa i a sota la seqüència de la proteïna, on seguint el mateix patró de colors es diferencien cadascun dels dominis que conté. A la il·lustració esquemàtica a més es senyala la zona de possible interacció amb l'extrem N-terminal de CID que es va trobar mitjançant un assaig dos híbrids. **B) Mecanisme d'ubiquitinació.** El complex SCF (Skp1/Cullin/F-box protein) actua com a ubiquitina-lligasa (E3) catalitzant la transferència d'ubiquitina des de l'enzim de conjugació (E2) a la proteïna substrat, la qual és poliubiquitinada mitjançant aquest procés i degradada via proteosoma.

En assajos de coimmunoprecipitació i de dos híbrids a llevat s'ha demostrat que Ppa efectivament és capaç d'interaccionar amb Skp1 mitjançant el seu domini F-box (Raj *et al.* 2000). Així doncs, Ppa formaria part del complex nuclear ubiquitina–lligasa SCF i interaccionaria mitjançant el seu domini LRRs amb el substrat a marcar mitjançant poliubiquitinació per tal que sigui degradat via proteosoma.

Tot i haver una certa especificitat de substrat, estudis d'altres proteïnes F-box suggereixen que cadascuna d'elles tenen múltiples substrates (Patton *et al.* 1998). De moment, l'únic substrat descrit per Ppa és el factor de transcripció Paired, un membre dels gens de segmentació implicats en la formació de l'eix antero–posterior embrionari a *Drosophila* (Raj *et al.* 2000). Ara bé, els mutants de Ppa presenten asincronia en les divisions cel·lulars al cicle 13 del desenvolupament embrionari (Das *et al.* 2002). Podria ser doncs que Ppa, a part d'estar involucrada en la degradació de Paired, estigués també implicada en la degradació de proteïnes relacionades amb la regulació del cicle cel·lular, a l'igual que el seu homòleg a *S. cerevisiae* Grr1 (*Glucose repression regulator 1*) (Barral *et al.* 1995; Li and Johnston 1997), responsable de la degradació de ciclines.

Per això, i tenint en compte la hipòtesi de degradació via proteosoma sorgida dels assajos d'expressió transitòria de Cid-YFP a cèl·lules Kc, vam decidir analitzar amb detall la interacció Cid-Ppa i intentar determinar la seva possible contribució a la localització centromèrica de Cid.

2.1.- Estudi *in vitro* de la interacció Cid-Ppa mitjançant assajos de GST-pulldown

La interacció entre Cid i Ppa es va identificar en un crivellatge per proteïnes que interaccionessin amb el domini N-terminal de Cid mitjançant un assaig de dos híbrids a *S.cerevisiae* basat en el sistema LexA (Moreno 2002). En aquest crivellatge es va identificar un pèptid de la regió C-terminal de Ppa que contenia els 3 últims dominis LRR com capaç d'interaccionar amb la regió N-terminal de Cid.

Per tal de confirmar aquesta interacció *in vitro* vàrem realitzar assajos de GST-pulldown. Aquest mètode consisteix en construir proteïnes de fusió amb GST i immobilitzar-les a la reïna de *Glutathione Sepharose 4B* generant una columna d'afinitat específica. Després d'incubar la reïna amb un extracte proteic marcat radioactivament, que conté les

proteïnes amb les quals es vol analitzar la interacció, s'analitzen les proteïnes retingudes degut a la interacció específica amb la proteïna immobilitzada. Per això per una part vam expressar les dues proteïnes senceres, Cid i Ppa, així com els diferents dominis: Cid-Nt, Cid-ΔNt, Ppa-LRRs i Ppa-ΔLRRs, fusionades a la Glutatió S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*, i per una altra part les mateixes proteïnes (sense fusionar a GST) es van marcar radioactivament amb ^{35}S -Met, mitjançant un sistema de transcripció-traducció *in vitro* en lisat de reticulòcits de conill (veure apartats 2.4.1 i 2.4.2 de Materials i Mètodes). La figura R.17 recull esquemàticament les proteïnes emprades.

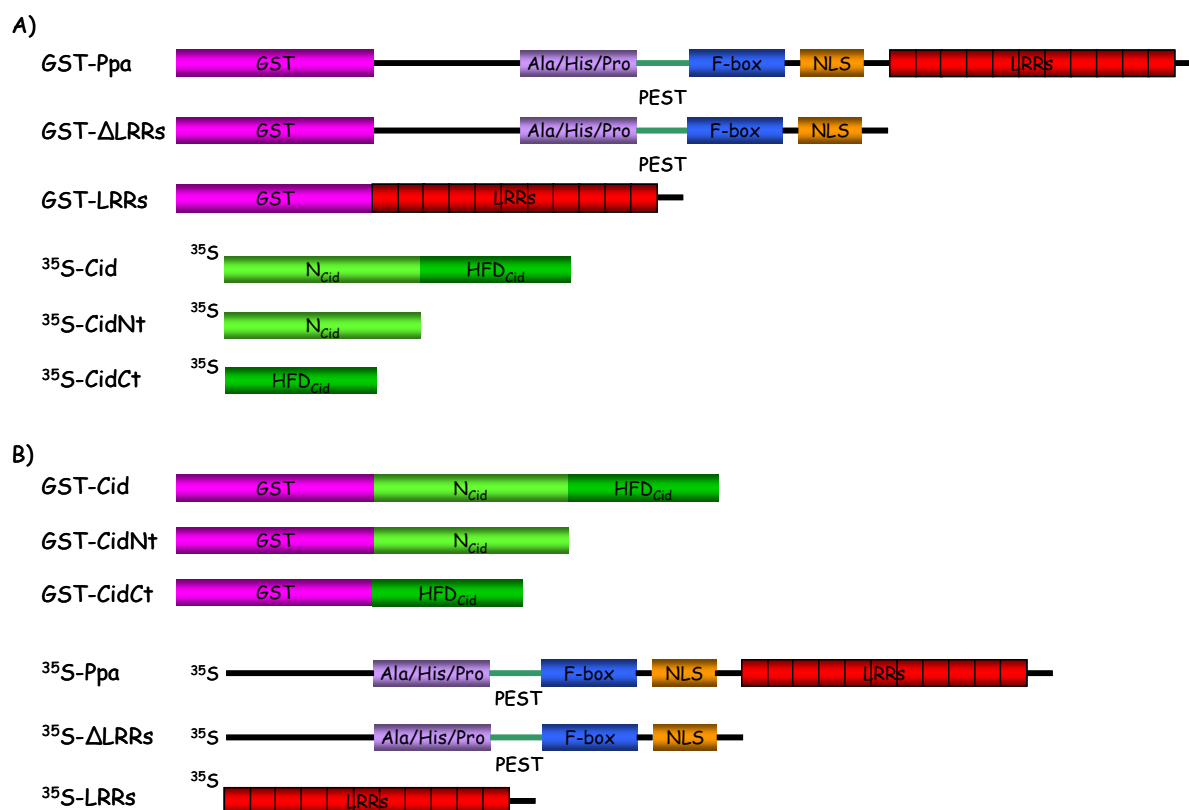


Figura R.17.- Esquema de les proteïnes emprades en l'assaig de GST-pulldown. L'assaig de GST-pulldown es va fer tant amb les proteïnes senceres com amb els seus dominis. Ppa es va dividir en 2 dominis: ΔLRRs, constituït pels primers 234 aminoàcids, i LRRs, constituït pels darrers 304 aminoàcids que corresponen als seus 11 dominis rics en leucina. Cid es va dividir en el seu domini N-terminal (de l'aminoàcid 1 al 125) i el C-terminal (del 127 al 221). Llavors, es va analitzar la interacció fusionant Ppa o els seus dominis a GST i marcant radioactivament Cid (A), i a l'inrevés (B).

Per dur a terme l'assaig de *pull-down*, les reïnes de Glutatió Sefarosa amb les proteïnes GST unides van ser incubades amb les proteïnes marcades amb ^{35}S -Met, realitzant totes les combinacions possibles (veure apartat 2.4.3 de Materials i Mètodes). Com a control negatiu es va utilitzar una reïna amb GST. La Figura R.18 recull els resultats obtinguts. Es pot observar com la fusió GST-Ppa reté específicament ^{35}S -Cid (carril 3) i viceversa, la fusió GST-Cid reté ^{35}S -Ppa (carril 8), indicant que, en efecte, Cid i Ppa interaccionen *in vitro*. És important destacar l'absència de senyal a l'incubar les proteïnes marcades radioactivament amb la proteïna GST, una clara indicació de l'especificitat de les interaccions observades.

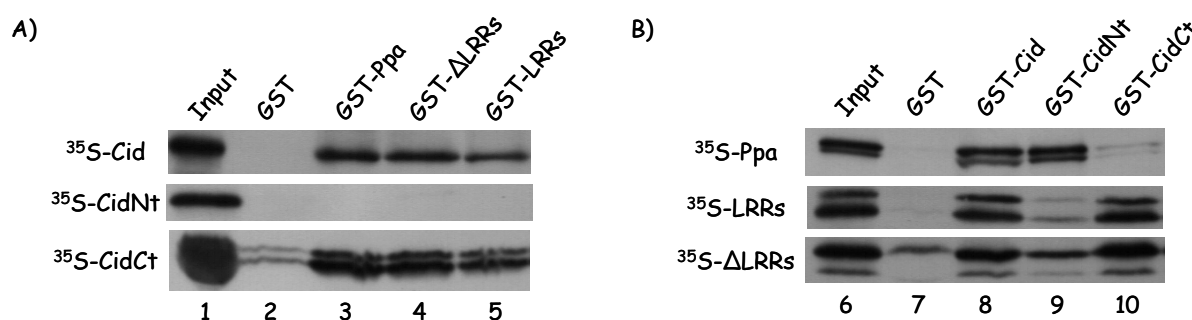


Figura R.18.- Estudi de la interacció Cid-Ppa mitjançant un assaig de GST-pull-down. Es va realitzar en tots dos sentits: marcant radioactivament Cid o cadascun dels seus dominis i fusionant Ppa o els seus dominis a GST (A) i, a la inversa, marcant radioactivament Ppa i els seus dominis i fusionant Cid a GST (B). L'input (carrils 1 i 6) correspon a un 20% de la proteïna total utilitzada a les reaccions i com a control negatiu es va utilitzar GST (carrils 2 i 7).

Ara bé, la interacció Cid-Ppa no sembla dependre exclusivament dels últims tres dominis LRRs de Ppa doncs ^{35}S -Cid és retingut tant per la fusió GST-LRRs (carril 5) com per la fusió GST-ΔLRRs (carril 4). Igualment, les proteïnes ^{35}S -LRRs i ^{35}S -ΔLRRs són retingudes per la fusió GST-Cid (carril 8). D'altra banda la interacció tampoc sembla dependre exclusivament del domini N-terminal de Cid doncs la proteïna ^{35}S -CidCt és retinguda tant per la fusió GST-Ppa (carril 3) com per les fusions GST-LRRs (carril 5) i GST-ΔLRRs (carril 4) i, a la inversa, ^{35}S -LRRs i ^{35}S -ΔLRRs són retingudes per la fusió GST-CidCt (carril 10).

El resultat amb l'extrem N-terminal, en canvi, no és tan clar. ^{35}S -CidNt no és retingut per cap fusió GST, ni GST-Ppa (carril 3), ni GST- Δ LRRs (carril 4), ni GST-LRRs (carril 5). En canvi, amb GST-CidNt sí s'observa interacció, tant amb ^{35}S -Ppa com ^{35}S -LRRs i ^{35}S - Δ LRRs (carril 9), tot i que en aquest últim cas la interacció sembla ser més lleugera ja que els nivells de retenció de GST-CidNt (carril 9) són molt similars als obtinguts amb GST (carril 7). El fet que amb ^{35}S -CidNt no s'observi cap interacció podria ser degut a que la proteïna no estigués estructurada correctament.

Cal dir que, tot i que en els assajos realitzats amb les proteïnes ^{35}S -CidCt i ^{35}S - Δ LRRs sí que s'observa retenció al realitzar l'assaig amb GST (el control negatiu), com que és inferior a l'observada amb les fusions, podem afirmar que les interaccions observades són específiques.

Així doncs, els assajos de GST-*pulldown* indiquen que Cid i Ppa interaccionen. Ara bé, tot i que per l'assaig de dos híbrids basat en el sistema LexA es va observar una interacció entre el domini N-terminal de Cid i els últims 3 LRRs de Ppa, aquesta interacció no sembla ser la única responsable de la interacció Cid-Ppa *in vitro*.

2.2.- Estudi *in vivo* de la interacció Cid-Ppa

Per veure si la interacció Cid-Ppa realment es dona *in vivo*, vam estudiar l'efecte de la manca de Ppa sobre els nivells proteics i la localització de Cid. En concret, vam utilitzar el mutant *Ppa*²⁰ (cedit pel Dr. Michael Weir). Aquest mutant conté una deleció cromosomal que elimina la ORF de Ppa (des de la posició -345 a la +304) i va ser generat mitjançant la mobilització d'un element P inserit a la regió 3' no traduïda de Ppa. Els mutants homozigots sobreviuen fins a adults però amb una viabilitat molt reduïda. El seu fenotip inclou un retard en la progressió al llarg del desenvolupament embrionari i asincronia de les divisions nuclears al cicle 13, cosa que ens podria estar indicant la presència de defectes en la segregació cromosòmica.

En primer lloc, vam determinar si l'absència de Ppa causa cap canvi en el nivells proteics de Cid a mutants homozigots *Ppa*²⁰. Vam partir del creuament de mosques heterozigotes *Ppa*²⁰/*SM5*. *SM5* és un balancejador del cromosoma 2 que porta com a marcador *CyO* (*curly wings*), és a dir, dóna lloc a ales arrissades. Una característica comuna a tots els balancejadors és el fenotip de letalitat en homozigosi. Llavors, la progènie d'aquest

creuament seran mosques homozigotes Ppa^{20}/Ppa^{20} i heterozigotes $Ppa^{20}/SM5$, distingint aquestes últimes per les seves ales arrissades. Per al nostre experiment vam creuar femelles verges i mascles Ppa^{20}/Ppa^{20} . Així doncs, a partir de mosques homozigotes Ppa^{20}/Ppa^{20} vam preparar nius de posta, vam recollir embrions de 0 a 12 hores, a partir dels quals vam realitzar extractes proteics i vam determinar els nivells de Cid mitjançant *Western blot* (apartat 2.7.2 de Materials i Mètodes). Com a control vam utilitzar extractes proteics d'embrions de mosques salvatges *oregon*. En teoria, si Ppa està implicat en la degradació de Cid, en la seva absència Cid no es podria degradar i, per tant, augmentarien els seus nivells proteics. A la Figura R.19 es pot veure com la senyal obtinguda amb el mutant de Ppa és similar a l'obtinguda per les mosques *oregon* (*wt*). Si quantifiquem les bandes s'obté un lleuger increment d'1,22 vegades, que no sembla molt significatiu.

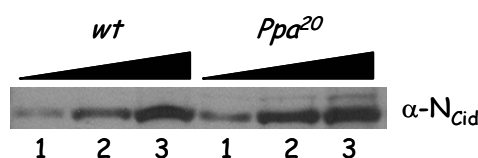


Figura R.19.- Determinació dels nivells proteics de Cid a mutants homozigots Ppa^{20}/Ppa^{20} mitjançant *Western Blot*. Es van preparar nius de posta, tant de mosques homozigotes Ppa^{20}/Ppa^{20} com de mosques salvatges *oregon* (*wt*), i es van recollir embrions de 0 a 12 hores. A partir d'aquests embrions vam realitzar extractes proteics i vam determinar els nivells de Cid mitjançant *Western blot*, utilitzant l'anticòs α -CidNt. En tots dos casos es van analitzar quantitats creixents d'extracte proteic: 7,5, 15 i 30 μ g (carrils 1, 2 i 3, respectivament).

Per veure si aquests petits canvis en els nivells proteics de Cid es reflectien en canvis en la localització vam realitzar immunolocalitzacions amb embrions homozigots Ppa^{20}/Ppa^{20} de 0 a 12 hores, utilitzant també com a control embrions *oregon*. La Figura R.20 conté imatges corresponents a diferents moments del desenvolupament embrionari, des de blastoderm (Figura R.20.1-4) a gàstrula (Figura R.20.5-6). A totes elles es pot veure com, tant als embrions salvatges com als mutants homozigots Ppa^{20} , Cid presenta una localització exclusivament centromèrica.

Així doncs, en el seu conjunt, aquests resultats no permeten concloure que Ppa estigui implicat en la degradació proteolítica de Cid *in vivo*.

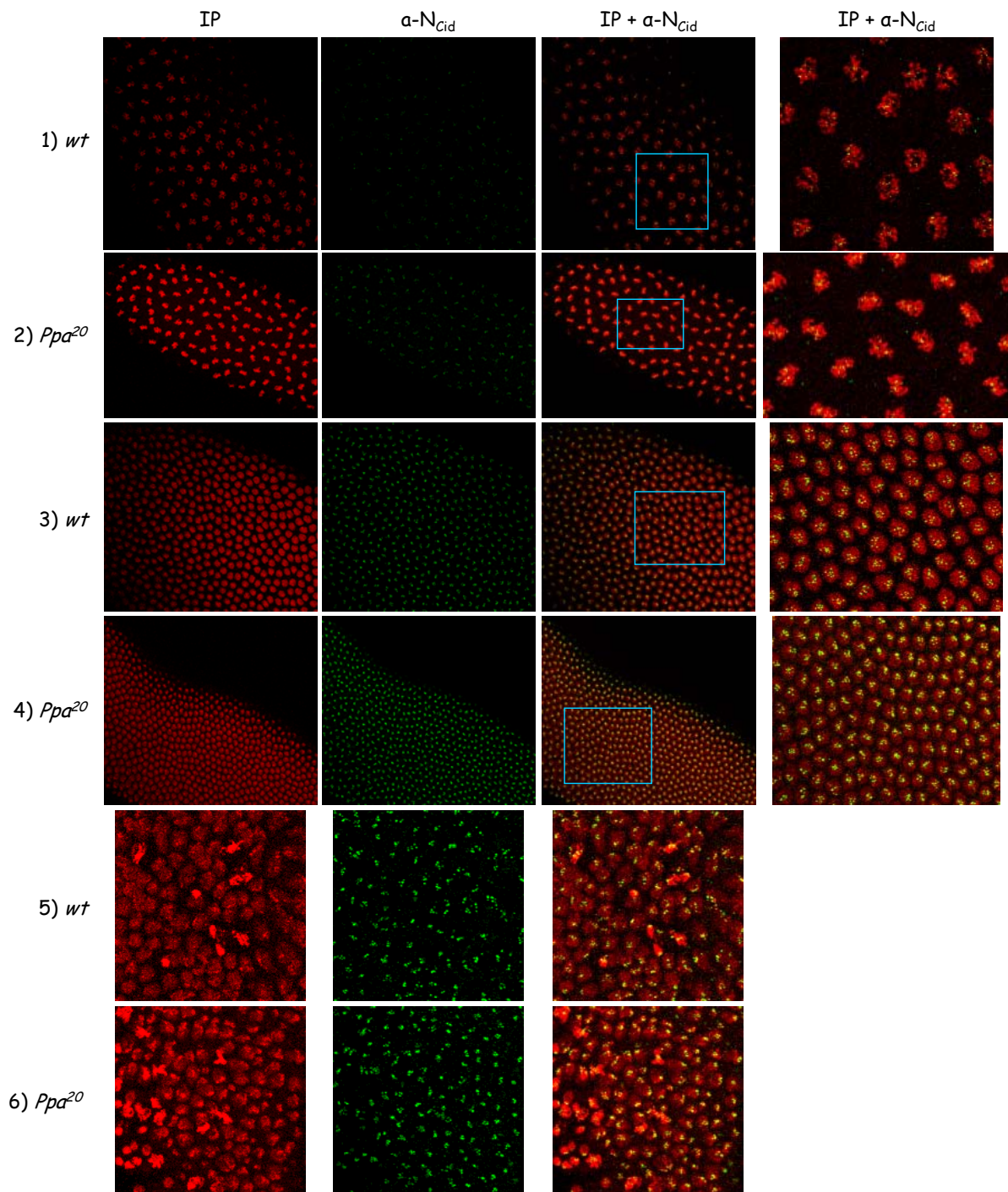


Figura R.20.- Anàlisi de la localització de Cid a mutants homozigots Ppa^{20}/Ppa^{20} mitjançant immunolocalitzacions a embrions. Es van recollir embrions de 0 a 12 hores de mutants homozigots Ppa^{20}/Ppa^{20} i es van realitzar immunolocalitzacions amb l'anticòs α -CidNt, que reconeix específicament l'extrem N-terminal de Cid. Com a control es va dur a terme el mateix experiment amb embrions salvatges oregon (wt). Es pot observar com en tots dos casos (wt i Ppa^{20}) la localització de Cid és exclusivament centromèrica, tant a l'estadi de blastoderm (1-4) com a gàstrula (5 i 6). En vermell es pot veure el DNA tenyit amb iodur de propidi (IP) i en verd la senyal corresponent a l'anticòs α -CidNt. Els quadres blaus senyalen la zona de la imatge que és amplificada al costat.

3.- ANÀLISI DELS EFECTES DE LA DESLOCALITZACIÓ DE Cid SOBRE LA PROGRESSIÓ DEL CICLE CEL·LULAR

A l'apartat 1.1. d'aquest capítol hem vist com a l'expressar transitòriament Cid-YFP a cèl·lules Kc de *D. melanogaster* s'obtenen tres patrons de localització: localització exclusivament centromèrica (L), deslocalització al llarg de tota la cromatina (D) i un patró mixt on es veu localització centromèrica sobre un fons de deslocalització (M). Donat que Cid és una proteïna essencial per la funció centromèrica, una de les preguntes que ens vam fer va ser si les cèl·lules que tenien Cid-YFP deslocalitzada per tota la cromatina progressaven normalment al llarg del cicle cel·lular o bé presentaven algun problema a l'hora de la divisió. Per això, vam voler estudiar l'índex mitòtic del cultiu de cèl·lules transfectades mitjançant immunolocalitzacions amb α -PSer¹⁰H3 i, a més, vam analitzar la progressió del cicle cel·lular *in vivo*.

3.1.- Determinació de l'efecte de la deslocalització de Cid sobre l'índex mitòtic

Com ja s'ha esmentat a la introducció, a tots els eucariotes la serina 10 de la histona H3 es fosforila durant mitosi. Aquesta fosforilació afecta a tot el genoma i correlaciona amb la condensació cromosòmica durant la divisió cel·lular. Comença a tenir lloc a la fase G2 a la cromatina pericentromèrica i, a mesura que la mitosi progressa, s'expandeix al llarg de tota la cromatina, completant-se a profase. Al final de la mitosi, la histona H3 és desfosforilada.

Així doncs, com que la fosforilació de la serina 10 de la histona H3 és un marcador de mitosi, vam realitzar immunolocalitzacions amb l'anticòs α -PSer¹⁰H3 per determinar l'índex mitòtic dels cultius de cèl·lules transfectades (veure apartat 2.6.7 de Materials i Mètodes).

Vam transfectar cèl·lules Kc amb pCid-YFP i a les 48 hores vam realitzar immunolocalitzacions amb α -PSer¹⁰H3. Després de realitzar l'anàlisi per microscòpia de fluorescència, vam comptar el número de cèl·lules transfectades amb cadascun dels patrons de localització (L, M i D) que donaven senyal per α -PSer¹⁰H3, així com el número de cèl·lules no transfectades que en donaven, i vam determinar en cada cas el percentatge respecte el total de cèl·lules del corresponent tipus.

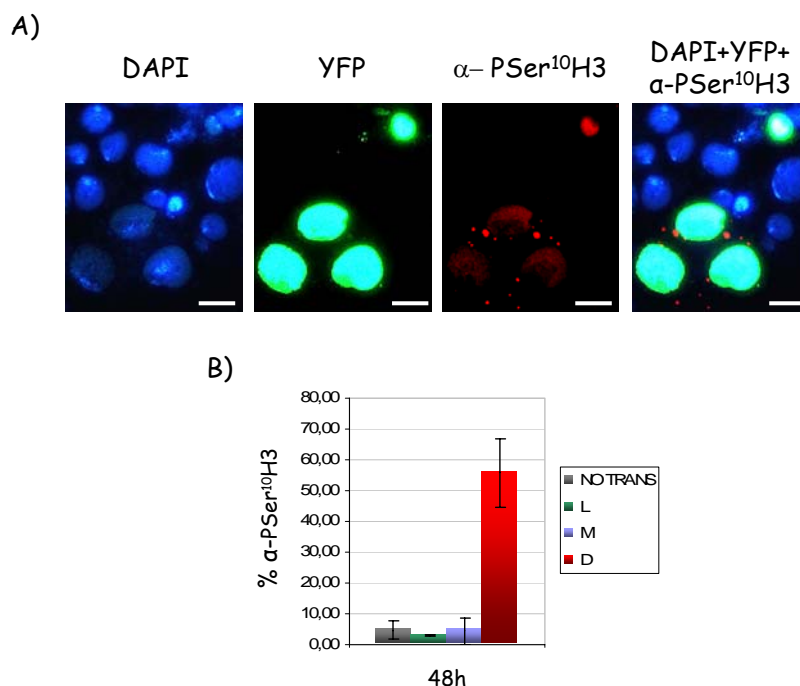


Figura 21.- Immunolocalitzacions amb α -PSer¹⁰H3 a cèl·lules Kc transfectades amb pCid-YFP. A) Imatge de cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada per tota la cromatina que donen senyal per α -PSer¹⁰H3. En blau es mostra la tinció del DNA amb DAPI, en verd la senyal de fluorescència corresponent a Cid-YFP i en vermell la senyal corresponent a l'anticòs α -PSer¹⁰H3. La barra d'escala correspon a 10 μ m. B) En aquesta gràfica es mostra el percentatge de cèl·lules que donen senyal amb α -PSer¹⁰H3. Concretament, es va determinar per les cèl·lules no transfectades (gris), les cèl·lules amb localització centromèrica (L, verd), per les de patró mixt (M, blau) i per les de patró de deslocalització (D, vermell). En cadascun dels casos es va calcular el percentatge de cèl·lules que dona senyal amb α -PSer¹⁰H3 respecte el total de cèl·lules del mateix tipus. Es pot veure com el percentatge de cèl·lules amb patró de deslocalització (D) que donen senyal amb α -PSer¹⁰H3 és molt elevat (aproximadament un 56%), mentre que per les cèl·lules amb localització centromèrica (L) i amb patró mixt (M) és igual de baix que per les cèl·lules sense transfectar (al voltant d'un 3%).

Com es mostra a la imatge de la Figura R.21.A, les cèl·lules on Cid està deslocalitzada per tota la cromatina són freqüentment reactives amb α -PSer¹⁰H3. Aproximadament el 56% de les cèl·lules transfectades que contenen Cid-YFP deslocalitzada per tota la cromatina dona senyal amb α -PSer¹⁰H3, cosa que contrasta amb el baix número de cèl·lules positives per α -PSer¹⁰H3 amb localització centromèrica, aproximadament un 3%, o no transfectades, un 4,7% (Figura 21.B). Així doncs, sembla que la deslocalització de Cid afecta a la progressió del cicle cel·lular ja que aquest resultat suggereix que les cèl·lules on Cid està deslocalitzada estan aturades a final de G2 o profase. El que és interessant de remarcar és que les cèl·lules que presenten un patró de localització de Cid-YFP mixt sembla que progressen correctament al

llarg del cicle cel·lular ja que el percentatge de cèl·lules que donen senyal amb α -PSer¹⁰H3 és molt semblant al de les cèl·lules no transfectades i al de les que presenten una localització de Cid-YFP exclusivament centromèrica, un 4,3%.

Per tal de determinar si aquest efecte era específic de la deslocalització de Cid-YFP, vam dur a terme el mateix anàlisi amb cèl·lules que expressaven les proteïnes HFD_{Cid}-YFP, N_{Cnp1}HFD_{Cid}-YFP i N_{Cid}HFD_{H3}-YFP. Cal recordar que HFD_{Cid}-YFP i N_{Cnp1}HFD_{Cid}-YFP donen els mateixos tres patrons de localització (L, M i D) que Cid (Figures R.5, R.7.C i R.1, respectivament), però que N_{Cid}HFD_{H3}-YFP només dóna el patró D ja que la proteïna es deposita al llarg de tota la cromatina (Figura R.6.C). En els casos de HFD_{Cid}-YFP i N_{Cnp1}HFD_{Cid}-YFP el resultat obtingut va ser el mateix que per Cid-YFP (Figura R.22): un alt percentatge de cèl·lules amb patró deslocalitzat (D) donen senyal amb α -PSer¹⁰H3, un 44% i un 36%, respectivament, mentre que les cèl·lules amb localització centromèrica (L), amb localització mixta i les no transfectades ho fan en un percentatge molt baix. En canvi, pel que fa a N_{Cid}HFD_{H3}-YFP, la qual com hem vist abans es troba sempre deslocalitzada (Figura R.6.C), el percentatge de cèl·lules transfectades que donen senyal amb α -Pser¹⁰H3 és igual de baix que el de les cèl·lules no transfectades, 5 i 4,6%, respectivament, (Figura R.22).

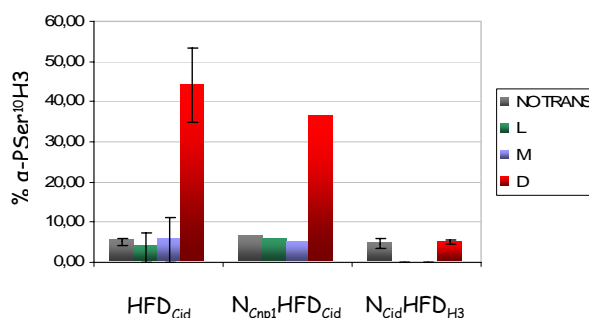


Figura R.22.- Immunolocalitzacions amb α -PSer¹⁰H3 a cèl·lules *Kc* transfectades amb pHFD_{Cid}-YFP, pN_{Cnp1}HFD_{Cid}-YFP i pN_{Cid}HFD_{H3}-YFP. En la gràfica es representa el percentatge de cèl·lules no transfectades (gris) i de les transfectades amb cadascun dels patrons de localització (L en verd, M en blau i D en vermell) que donen senyal per α -PSer¹⁰H3 respecte el total de cèl·lules de cada tipus. Es pot observar com, tant per HFD_{Cid}-YFP com per N_{Cnp1}HFD_{Cid}-YFP, un alt percentatge de les cèl·lules amb un patró de deslocalització (D) dóna senyal amb α -PSer¹⁰H3, mentre que les que presenten una localització centromèrica o mixta ho fan en un percentatge igual de baix que les cèl·lules no transfectades. En canvi, a les cèl·lules que expressen N_{Cid}HFD_{H3}-YFP, la qual es troba sempre deslocalitzada, el percentatge de cèl·lules amb senyal de α -PSer¹⁰H3 és igual de baix que a les cèl·lules no transfectades.

Així doncs, en el seu conjunt aquests resultats indiquen que l'aturada del cicle cel·lular observada a les cèl·lules que presenten Cid-YFP deslocalitzada és específica d'aquesta proteïna.

3.2.- Estudi *in vivo* de l'efecte de la deslocalització de Cid sobre la divisió cel·lular

Una altra manera d'analitzar els efectes de la deslocalització de Cid sobre el cicle cel·lular és el seguiment *in vivo* del cultiu. Així doncs, vam transfectar cèl·lules Kc amb pCid-YFP i 48 hores després vam començar a agafar imatges cada 5 minuts durant un total de 16 hores (veure apartat 2.6.8 de Materials i Mètodes). Amb aquest estudi vam poder fer un seguiment *in vivo* tant de cèl·lules no transfectades com de cèl·lules transfectades amb tots tres patrons de localització (L, M i D).

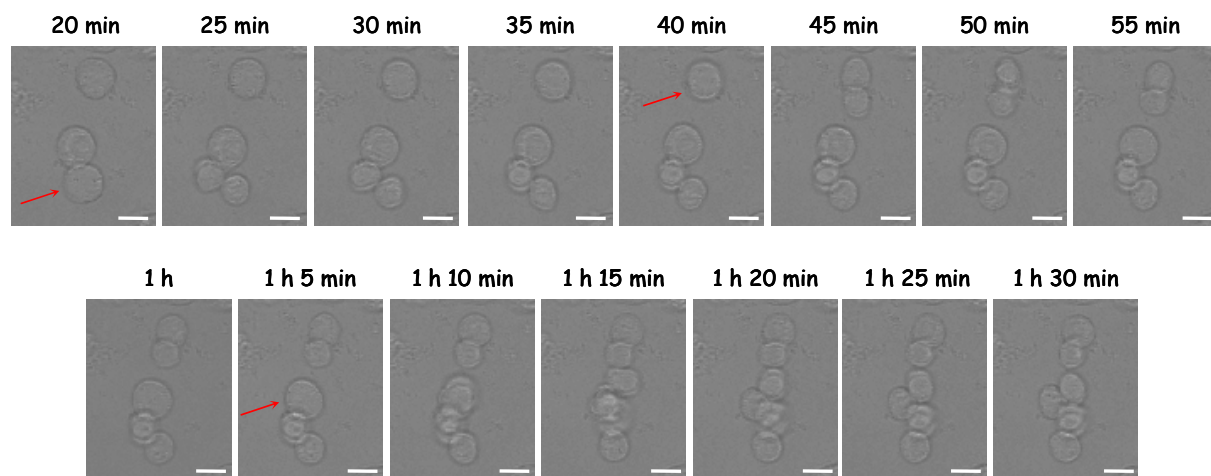


Figura R.23.- Seguiment *in vivo* de cèl·lules Kc no transfectades. En aquesta sèrie d'imatges de transmissió s'observa com cèl·lules Kc no transfectades es divideixen. Amb les fletxes vermelles s'indica la cèl·lula que es divideix en cada moment. Les barres d'escala corresponen a 5 μ m. Aquesta figura correspon al vídeo suplementari R23.

Tant les cèl·lules no transfectades com aquelles on Cid-YFP es troba localitzada exclusivament al centròmer es divideixen normalment. Si ens fixem en la figura R.23 podem observar gràcies a les imatges de transmissió com varies cèl·lules no transfectades (marcades

amb fletxes vermelles) es divideixen. A la figura R.24 trobem un exemple d'una cèl·lula transfectada on Cid-YFP es troba localitzada al centròmer (0 min) i que es divideix aparentment de forma correcta ja que les senyals de fluorescència corresponents als diferents centròmers es reparteixen entre les dues cèl·lules filles (25-50 min).

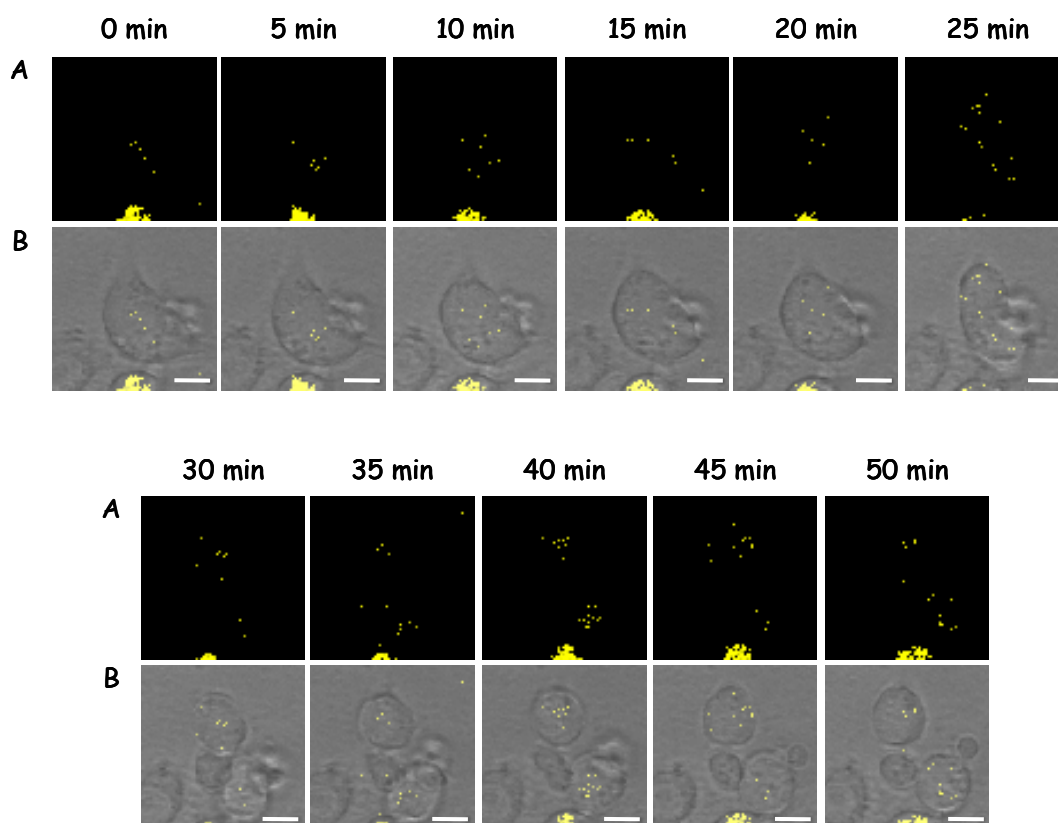


Figura R.24.- Seguiment *in vivo* d'una cèl·lula transfectada amb Cid-YFP localitzada al centròmer. En A es pot veure la senyal de fluorescència deguda a Cid-YFP i en B la superposició amb la corresponent imatge de transmissió. Es pot observar com una cèl·lula amb un patró de localització centromèrica (L) es divideix correctament. Les barres d'escala corresponen a 5 μ m. Aquesta figura correspon al vídeo suplementari R24.

En canvi, aquelles cèl·lules on Cid-YFP es troba deslocalitzada al llarg de tota la cromatina no es divideixen, i les que ho fan no duen a terme una correcta segregació cromosòmica. Per exemple, a la Figura R.25 es pot observar com una cèl·lula amb Cid-YFP deslocalitzada (2h 45 min) es divideix però amb deficiències de segregació cromosòmica ja

que, segons la senyal de fluorescència (A), tot el material genètic és heretat exclusivament per una de les cèl·lules filles, és a dir, dona lloc a una cèl·lula filla sense nucli (3h 35min) que més tard es destrueix (11h 40 min). És probable que la deslocalització de Cid interfereixi en la correcta formació del cinetocor i això provoqui problemes a l'hora de la divisió cel·lular. Ara bé, les cèl·lules que mostren una localització mixta de Cid es divideixen correctament. A la figura R.26 es pot veure un exemple on una cèl·lula amb un patró de localització mixt (20 min) entra en divisió i la senyal de fluorescència es reparteix equitativament entre les dues cèl·lules filles (50 min), presentant també totes dues un patró de localització mixt (1h 10 min). Això suggereix que mentre la quantitat de Cid es mantingui per sota d'un determinat llindar no interfereix amb la progressió del cycle. Aquest llindar potser és similar a la concentració que normalment hi ha als centròmers.

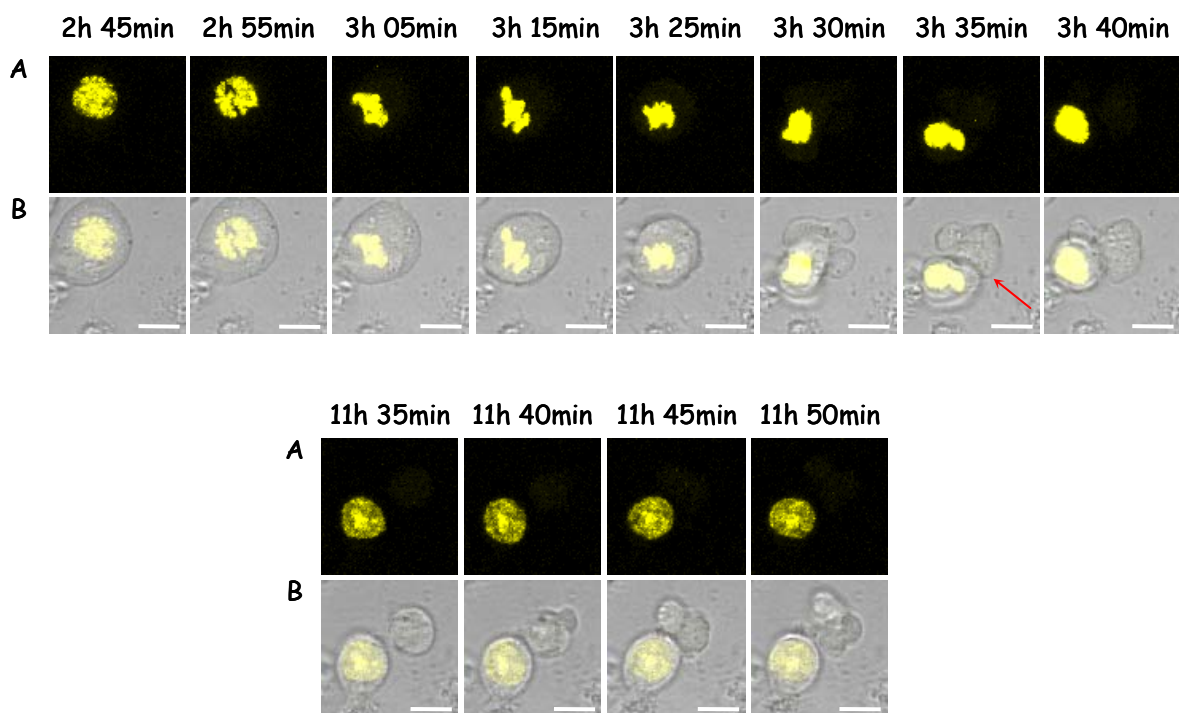


Figura R.25.- Seguiment in vivo d'una cèl·lula transfectada amb Cid-YFP deslocalitzada al llarg de tota la cromatina. En aquesta sèrie d'imatges es pot observar com una cèl·lula amb Cid-YFP deslocalitzada al llarg de tota la cromatina (patró D) es divideix incorrectament donant lloc a una cèl·lula filla sense nucli (marcada amb fletxa vermella) que acaba morint (11h 40min). En A es pot veure la senyal de fluorescència deguda a Cid-YFP i en B la superposició amb la corresponent imatge de transmissió. Les barres d'escala corresponen a 5 µm. Aquesta figura correspon al vídeo suplementari R25.

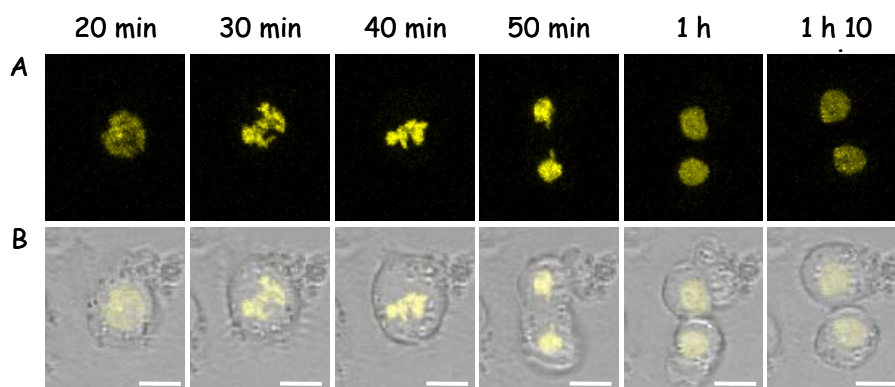


Figura R.26.- Seguiment in vivo d'una cèl·lula transfectada amb Cid-YFP amb un patró de localització mixta. En aquesta sèrie d'imatges es pot observar com una cèl·lula amb un patró de localització mixta (M) es divideix sense cap problema aparent. En A es pot veure la senyal de fluorescència deguda a Cid-YFP i en B la superposició amb la corresponent imatge de transmissió. Les barres d'escala corresponen a 5 μ m. Aquesta figura correspon al vídeo suplementari R26.

Cal remarcar que aquestes observacions coincideixen amb els resultats obtinguts a l'analitzar l'índex mitòtic dels cultius mitjançant immunolocalitzacions amb α -PSer¹⁰H3, on les cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada al llarg de tota la cromatina (D) semblen estar aturades a G2, mentre les de patró mixt (M) i de localització centromèrica (L) presenten uns índex mitòtics similars a les cèl·lules no transfectades.

VI.- DISCUSSIÓ

1.- FACTORS I MECANISMES QUE DETERMINEN LA LOCALITZACIÓ CENTROMÈRICA DE Cid

Com ja s'ha esmentat a la Introducció, una característica comuna de tots els centròmers és la presència d'una variant de la histona H3. Es creu que és el determinant epigenètic de la identitat centromèrica, sent la seva presència necessària per l'ensamblatge del cinetocor (Howman *et al.* 2000; Moore and Roth 2001; Oegema *et al.* 2001; Heun *et al.* 2006) i per una correcta segregació cromosòmica (Stoler *et al.* 1995; Buchwitz *et al.* 1999; Howman *et al.* 2000; Takahashi *et al.* 2000; Heun *et al.* 2006). Ara bé, encara es coneix ben poc sobre el mecanisme pel qual aquestes variants es localitzen exclusivament als centròmers. Per això, el principal objectiu d'aquest treball ha estat l'estudi dels factors i mecanismes involucrats en la seva localització mitjançant transfeccions transients a cèl·lules Kc de *Drosophila melanogaster*.

1.1.- Patrons de localització de Cid

Cid va ser expressada sota el control del seu propi promotor, per tal de mimetitzar l'expressió de la proteïna endògena, i es va fusionar pel seu extrem C-terminal a la proteïna YFP. L'expressió d'aquesta proteïna de fusió dona lloc a tres patrons de localització, tant a interfase com a mitosi. A algunes cèl·lules es localitza exclusivament al centròmer mentre que a d'altres es troba deslocalitzada al llarg de la cromatina. A més, hi ha cèl·lules que presenten un patró de localització mixt, és a dir, presenten Cid-YFP localitzada al centròmer sobre un fons de deslocalització. El fet que s'observin metafases amb senyal de YFP al llarg dels cromosomes i que al tractar les cèl·lules amb Tritó X-100, el qual solubilitza les proteïnes no unides a DNA, continuïn havent cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada per tot el nucli suggereix que la deslocalització de Cid correspon a una deposició al llarg de tota la cromatina.

Els diferents patrons de localització es podrien atribuir a diferències en els nivells de proteïna. La deslocalització de les variants centromèriques de la histona H3 al llarg de la cromatina ja ha sigut observada en altres experiments de sobreexpressió amb CENP-A, la variant centromèrica d'humans (Sullivan *et al.* 1994; Van Hooser *et al.* 2001), i més recentment amb Cid (Heun *et al.* 2006). Inclús es troben exemples de deslocalització en casos de càncer de colon, on les cèl·lules presenten elevats nivells de CENP-A i aquesta es troba associada a regions no centromèriques (Tomonaga *et al.* 2003). Així doncs, mantenir els

nivells de CenH3 per sota d'un determinat llindar pot ser molt important per evitar la seva deposició al llarg de la cromatina.

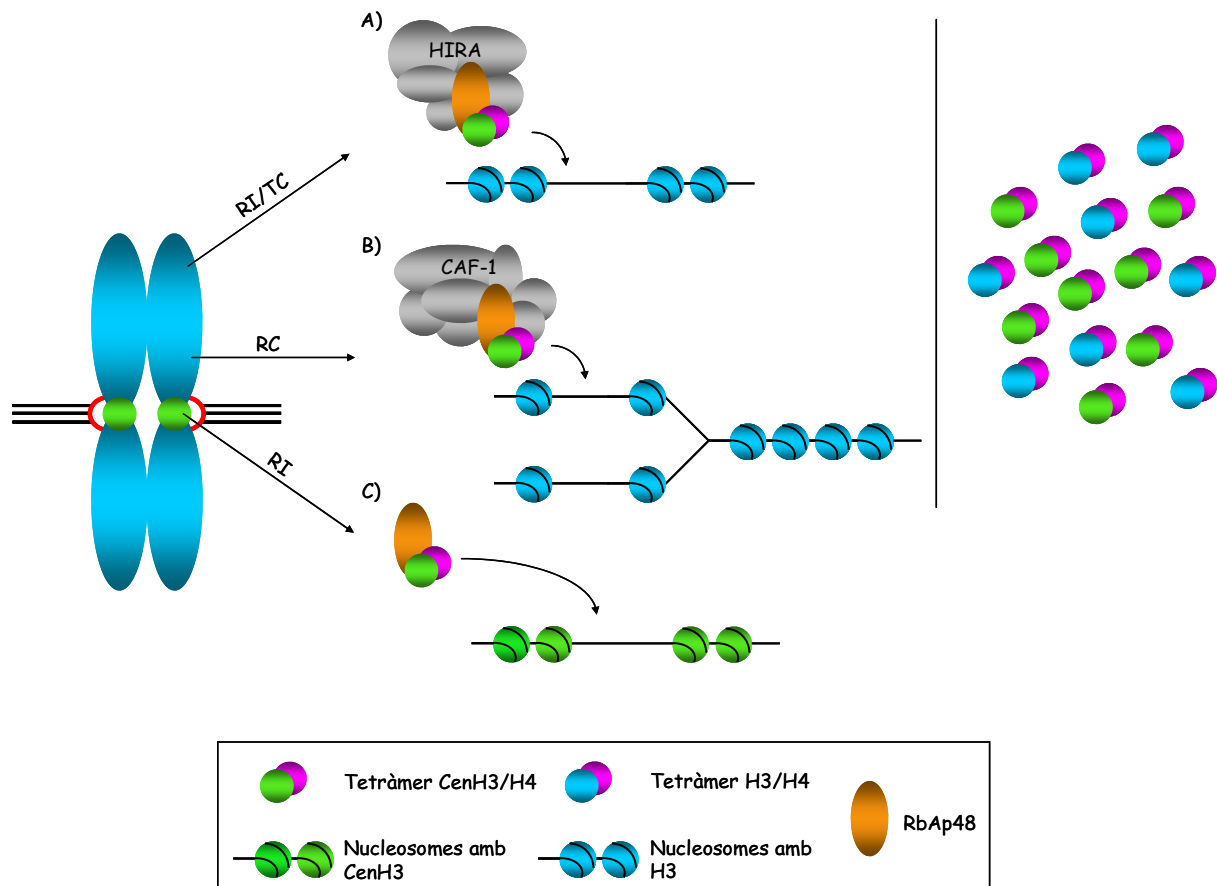


Figura D.1.- Models per la deposició de CenH3. CenH3 és depositada a la regió centromèrica de manera independent de replicació (C), probablement mitjançant una maquinària específica que podria estar formada exclusivament per RbAp48 i el tetràmer CenH3/H4. RbAp48 també forma part dels complexos CAF-1 (B) i HIRA (A), els quals estan implicats, respectivament, en la deposició d'H3.1 de manera dependent de replicació i en la deposició d'H3.3 acoblada a transcripció. Llavors, quan CenH3 és sobreexpressada els dímers CenH3/H4 podrien competir amb els dímers H3/H4 per la unió als complexos CAF-1 (B) i HIRA (A), via RbAp48. D'aquesta manera es podria explicar la deposició de CenH3 a regions eucromàtiques observada als nostres experiments.

Se sap que la localització centromèrica de CENP-A és independent de replicació (Shelby *et al.* 2000; Ahmad and Henikoff 2001; Ahmad and Henikoff 2002) i, per tant, és molt probable que existeixi un mecanisme de deposició diferent al de la histona H3.1. Això ja succeeix amb la histona H3.3: mentre que l'H3 canònica és depositada mitjançant el complex CAF-1 (Adams and Kamakaka 1999; Ridgway and Almouzni 2000; Verreault 2000) d'una manera dependent de replicació, l'H3.3 és depositada a regions transcripcionalment actives mitjançant el complex HIRA (Ahmad and Henikoff 2002). Una característica comuna a aquests dos complexes de xaperones és la presència de RbAp48 (Tagami *et al.* 2004). La seva homòloga a *S. pombe*, Mis16, és necessària per la localització centromèrica de Cid (Hayashi *et al.* 2004), i a *D. melanogaster* s'ha trobat recentment formant part d'un hipotètic complex de deposició de Cid (Furuyama *et al.* 2006; Furuyama and Henikoff 2006), constituït únicament per Cid, la histona H4 i RbAp48. És més, en aquest complex s'ha vist que RbAp48 interacciona tant amb la histona H4, igual que als complexos CAF-1 i HIRA, com amb Cid. Així doncs, potser Cid és depositada al centròmer mitjançant un complex específic però quan és sobreexpressada podria ser que fos depositada al llarg de tota la cromatina mitjançant els complexos de deposició de les altres histones. És a dir, en condicions normals hi ha molta més histona H3 que Cid, però al sobreexpressar aquesta última pot competir amb l'H3 per la formació del tetràmer amb l'H4 i d'aquesta manera, al haver-hi un excés de (Cid-H4)₂ aquest podria ser depositat a l'eucromatina per CAF-1 i/o HIRA via interacció Cid-RbAp48 (Figura D.1).

1.2.- Implicació dels diferents dominis

Per estudiar la importància de cadascun dels dominis de Cid per la seva correcta localització vam construir una sèrie de proteïnes quimèriques, totes fusionades igualment a YFP i expressades sota el control del promotor de Cid: els diferents dominis sols (N_{Cid} i HFD_{Cid}); l'extrem C-terminal de Cid fusionat als extrems N-terminals de la histona H3 (N_{H3}HFD_{Cid}) i de les variants centromèriques de *S. cerevisiae* (N_{Cse4}HFD_{Cid}) i *S. pombe* (N_{Cnp1}HFD_{Cid}); i l'extrem N-terminal de Cid fusionat al C-terminal de la histona H3 (N_{Cid}HFD_{H3}). Llavors, vam transfectar transitòriament cèl·lules Kc de *D. melanogaster* i vam analitzar la seva localització mitjançant microscòpia de fluorescència.

Totes les proteïnes de fusió que contenen el domini C-terminal de Cid, inclús HFD_{Cid}-YFP, presenten els mateixos tres patrons de localització que Cid (localització centromèrica, deslocalització al llarg de tota la cromatina i mixt), mentre que N_{Cid}HFD_{H3}-YFP sempre es troba depositada per tot el DNA. Així doncs, l'anàlisi per microscòpia de fluorescència ens permet dir que el domini C-terminal per si sol és suficient per la localització centromèrica. Aquest resultat corrobora l'observat amb proteïnes quimèriques de CENP-A i H3 (Sullivan *et al.* 1994), on també mostren que és el domini C-terminal amb plegament tipus histona el que es requereix per la localització centromèrica de les variants, i amb experiments a *Drosophila* on descriuen la regió L1/α2 del domini C-terminal com la responsable de la localització centromèrica de Cid (Vermaak *et al.* 2002).

En canvi, el domini N-terminal no sembla ser el factor determinant de la localització de la proteïna. Ell sol (N_{Cid}-YFP) no s'incorpora a la cromatina, donat que li manca el domini d'interacció amb altres histones i amb el DNA, i fusionat a l'extrem C-terminal de l'H3 (N_{Cid}HFD_{H3}-YFP) es deposita al llarg de la cromatina, fenomen ja observat en el cas de CENP-A (Van Hooser *et al.* 2001). És més, en els nostres assajos la localització centromèrica de Cid no es veu afectada per la presència de l'extrem N-terminal d'altres CenH3 (N_{Cse4}HFD_{Cid}-YFP i N_{Cnp1}HFD_{Cid}-YFP) ni de la histona H3 (N_{H3}HFD_{Cid}-YFP), suggerint també que el domini N-terminal de Cid no és necessari per la localització centromèrica de la proteïna.

1.3.- El procés de degradació proteolítica de Cid

1.3.1.- Estan els nivells de Cid regulats per degradació via proteosoma?

Al fer un seguiment al llarg del temps de cultiu de cèl·lules transfectades amb Cid-YFP vam veure com el percentatge de cèl·lules amb un patró de deslocalització anava disminuint. A l'apartat 1.1 del capítol de Resultats i al d'aquesta Discussió s'ha mostrat com, tot i que és probable que existeixin uns factors específics de deposició independents de replicació (Furuyama *et al.* 2006; Furuyama and Henikoff 2006), Cid té certa facilitat a ser depositada al llarg de tota la cromatina quan els seus nivells proteics són superiors als habituals. Donada la importància del seu paper en events com la formació del cinetocor i la segregació cromosòmica és lògic pensar que a part d'aquests factors específics de deposició deuen existir mecanismes alternatius per garantir que Cid s'incorpori exclusivament als

centròmers. Com hem mencionat abans, les diferències en els patrons de localització poden ser degudes a diferències en els nivells de proteïna. Llavors, aquesta evolució, des d'un cultiu on majoritàriament hi ha cèl·lules amb un patró de deslocalització (D) fins a un on són majoritàries les cèl·lules amb Cid localitzada exclusivament al centròmer (L), podria explicar-se per l'existència d'un mecanisme de degradació proteolítica (Figura D.2).

No obstant, també podríem pensar que aquesta progressió podria ser deguda simplement a un efecte de dilució del plasmidi. És a dir, al dividir-se les cèl·lules cada cop contenen menys còpies del plasmidi i, per tant, s'expressa menys proteïna i no es deslocalitza. Ara bé, dels nostres experiments es desprenen vàries dades que van en contra d'aquesta possibilitat. En primer lloc, l'increment del percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica no està acoblat al creixement del cultiu: mentre el percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica augmenta 3,5 vegades de les 24 a les 72 hores després de la transfecció, el cultiu només es duplica. Inclús de les 24 a les 32 hores ja veiem un augment del percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica sense que el cultiu hagi crescut. En segon lloc, els canvis en els nivells de proteïna no semblen estar acoblats a canvis a nivell transcripcional ja que la quantitat d'mRNA de Cid-YFP no es modifica significativament al llarg del cultiu cel·lular. A l'analitzar mitjançant RT-PCR els nivells d'mRNA de Cid-YFP entre les 24 i les 72 hores després de la transfecció s'observen petites diferències, que no són suficients com per explicar els grans canvis que sembla haver en la quantitat de proteïna segons els anàlisis per microscòpia de fluorescència.

L'anàlisi de l'evolució dels patrons de localització en funció del temps de cultiu està realitzat amb tot el cultiu de cèl·lules transfectades. Així doncs, encara podria haver-hi una altra hipòtesi: l'increment del percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica pot ser degut a que les cèl·lules amb Cid deslocalitzada al llarg de tota la cromatina (D) poden presentar problemes a l'hora de la divisió cel·lular i que, per tant, les cèl·lules amb localització centromèrica (L) es divideixen més ràpid. Igual que amb la hipòtesi anterior, dels nostres experiments deriven dades que permeten rebatre-la. La primera torna a ser el fet que l'increment de cèl·lules amb localització centromèrica no està acoblat al creixement del cultiu. Però encara són més aclaridores les dades obtingudes gràcies a la separació de cèl·lules mitjançant citometria de flux i al seguiment *in vivo* del cultiu. Per un costat, al realitzar el mateix seguiment de l'evolució dels patrons de localització però partint d'un cultiu enriquit en cèl·lules amb Cid deslocalitzada obtingut mitjançant citometria de flux, s'observa com un

cultiu amb només un 3% de cèl·lules amb localització centromèrica (L) passa a tenir un 30% en només 24 hores i sense que el cultiu es divideixi. Per una altra banda, el seguiment *in vivo* del cultiu permet veure com una cèl·lula en interfase amb Cid-YFP deslocalitzada al llarg de tota la cromatina (D) evoluciona fins a convertir-se en una cèl·lula amb localització centromèrica (L) sense arribar a dividir-se.

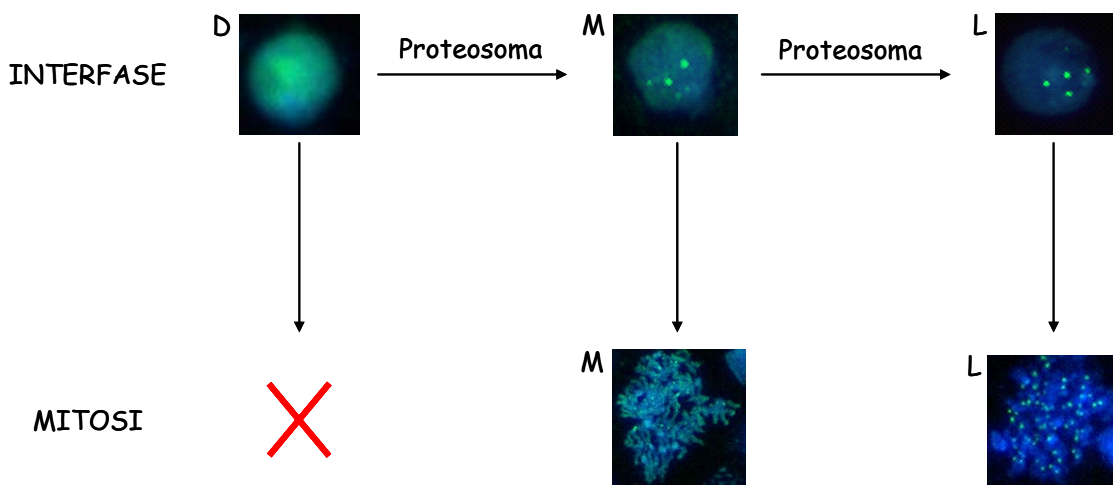


Figura D.2.- Hipòtesi de l'existència d'un mecanisme de degradació via proteosoma que contribueix a la localització centromèrica de Cid. Els resultats obtinguts al llarg d'aquest treball suggereixen que quan els nivells proteics de Cid són molt elevats aquesta pot ser incorporada al llarg de tota la cromatina (D i M) i que un mecanisme de degradació via proteosoma contribueix a la progressió d'aquestes cèl·lules fins a obtenir una localització centromèrica de Cid (L). Els nostres resultats també suggereixen que el manteniment dels nivells de Cid per sota d'un determinat llindar és molt important per tal que la cèl·lula progressi correctament al llarg del cicle cel·lular, donat que les cèl·lules amb Cid deslocalitzada (D) no es divideixen o ho fan però amb problemes de segregació cromosòmica, mentre que les cèl·lules amb un patró de localització mixta (M) o Cid localitzada al centròmer (L) es divideixen correctament.

És a dir, totes aquestes dades suggereixen que, efectivament, les cèl·lules amb un patró de deslocalització (D) progressen fins a convertir-se en cèl·lules amb localització centromèrica (L) i que els canvis observats en els nivells de Cid-YFP deuen ser deguts a un procés de regulació post-transcripcional com és la degradació proteolítica via proteosoma (Figura D.2, part superior). Aquesta hipòtesi de l'existència d'un mecanisme de degradació via proteosoma que contribueix a la localització centromèrica de Cid ha estat confirmada tant

amb experiments *in vitro*, tractant cèl·lules transfectades amb pCid-YFP amb l'inhibidor del proteosoma MG132, com *in vivo*, estudiant els efectes de mutacions al proteosoma sobre la localització de la proteïna Cid endògena.

Pel que fa als experiments *in vitro*, al tractar tot el cultiu de cèl·lules transfectades amb l'inhibidor MG132 el percentatge de cèl·lules amb localització centromèrica no augmenta al llarg del temps del cultiu. És més, aquest percentatge inclús és inferior que el que hi ha en el moment d'afegir l'inhibidor al medi. Així doncs, semblaria que el mecanisme de degradació via proteosoma no té lloc exclusivament quan hi ha una sobreexpressió de la proteïna sinó que també estaria involucrat en la regulació dels nivells proteics de Cid-YFP a les cèl·lules amb un patró de localització centromèrica. A més, el tractament amb MG132 d'un cultiu de cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada aïllades per citometria de flux aporta un resultat més evident a favor de la hipòtesi de degradació via proteosòmica: en un cultiu enriquit en cèl·lules amb un patró de deslocalització aproximadament un 30% d'elles progressen fins a convertir-se en cèl·lules amb un patró de localització centromèrica i aquest fenomen es veu inhibit en presència de MG132.

La contribució del proteosoma a la regulació dels nivells de Cid i conseqüentment a la seva localització també queda demostrada als experiments *in vivo* amb els mutants del proteosoma *Pros26¹*. A diferència de les mosques salvatges *oregon*, a aquests mutants s'observa com alguns neuroblastes presenten el mateix patró mixt de localització que havíem observat als experiments de transfecció transitòria a cèl·lules Kc. El proteosoma, entre d'altres funcions, està involucrat en el control de la progressió del cicle cel·lular i la seva activitat és essencial per la viabilitat. Quan aquests mutants creixen a la temperatura restrictiva de 29°C arriben fins a l'estadi de larva 3 i moren a pupa. El proteosoma és heretat maternalment, cosa que assegura la supervivència durant l'embriogènesi (Haass and Kloetzel 1989) i el període de sensibilitat a temperatura comença a l'estadi de larva 3 (Holden and Suzuki 1973), punt en el que vam preparar els neuroblastes. És a dir, en el moment del desenvolupament en el que hem analitzat els nivells de Cid és probable que l'activitat del proteosoma no estigui anul·lada en la seva totalitat. Això podria explicar el fet que s'observi un patró de localització mixt enlloc de deslocalització i, a més, que aquest efecte es doni només a alguns neuroblastes. Donada la letalitat d'aquest mutant no podem realitzar l'anàlisi en un estadi més avançant on probablement l'activitat proteosomal ja ha estat anul·lada per complet. Una manera de solventar aquest problema seria utilitzant mosques transgèniques que només expressessin la

subunitat mutada del proteosoma en un teixit específic mitjançant el sistema UAS/GAL4, sense provocar doncs letalitat (Belote and Fortier 2002). Aquest sistema consisteix en creuar mosques que contenen el gen de GAL4 sota el control d'*enhancers* específics de teixit amb mosques que contenen el gen d'interès, en el nostre cas el que codifica per la forma mutada de la subunitat $\beta 6$ del proteosoma, sota el control de seqüències UAS. La unió de GAL4 a aquestes seqüències UAS dóna lloc a l'activació transcripcional. D'aquesta manera a la progènie d'aquest creuament només hi haurà expressió de la subunitat $\beta 6$ termolàbil a aquells teixits on també s'expressi GAL4. D'aquesta manera podríem comparar en un mateix individu els efectes de la presència o absència d'activitat proteosomal sobre els nivells de Cid endògena. Inclús, si sobre aquest fons mutant obtenim transgènics que expressin a tots els teixits Cid fusionada, per exemple, a la proteïna GFP, podríem seguir la seva expressió i posterior degradació mitjançant microscòpia de fluorescència (Neuburger *et al.* 2006).

Per tal que les proteïnes siguin degradades via proteosoma cal que prèviament siguin poliubiquitinades (veure apartat 1.3.2 d'aquesta Discussió). Llavors, per acabar de demostrar que els canvis observats en els nivells de Cid són deguts a un efecte directe de la inhibició del proteosoma, un altre experiment interessant seria determinar si a les cèl·lules tractades amb l'inhibidor MG132 i/o als neuroblastes dels mutants *Pros26^l* s'acumulen formes poliubiquitinades de Cid.

L'existència d'un mecanisme de degradació de CenH3 ja ha estat descrita a *S. cerevisiae* (Collins *et al.* 2004). Quan Cse4p, la variant centromèrica de la histona H3 de *S. cerevisiae*, és sobreexpressada també es deposita a llocs eucromàtics i després és eliminada d'aquestes regions mitjançant un mecanisme de degradació via proteosoma, el qual a diferència de les histones canòniques és independent de Rad53. En aquest cas, igual que el que hem observat nosaltres amb Cid, la proteïna no desapareix del centròmer indicant que es troba protegida, potser per la formació del cinetocor o per la formació d'una estructura cromàtica més compacta que dóna certa inaccessibilitat. En humans també s'ha observat una degradació via proteosoma de CENP-A endògena com a resultat de l'expressió de la proteïna vírica ICP0 del virus *herpes simplex* tipus 1, implicada en la regulació de la transició d'infecció latent a infecció lítica. En aquest cas sí hi ha degradació de la proteïna localitzada al centròmer. Ara bé, aquesta dada no va en contra de la nostra hipòtesi que la regió centromèrica confereix protecció a Cid i Cse4p evitant que siguin degradades ja que també s'ha observat la degradació via proteosoma de CENP-C, component essencial del cinetocor,

sugerint la possibilitat que l'estructura centromèrica es trobi alterada. Aquest exemple de degradació de CENP-A també corrobora la nostra hipòtesi que el mecanisme de degradació via proteosoma no actua únicament quan CenH3 es troba sobreexpressada, sorgida a partir dels experiments amb MG132 i amb els mutants del proteosoma *Pros26^l*.

Com s'ha mencionat a la Introducció, a humans i *Drosophila* s'ha descrit l'existència de cromosomes dicèntrics que es transmeten establement gràcies a la inactivació d'un dels centròmers (Sullivan and Schwartz 1995; Faulkner *et al.* 1998; Sullivan and Willard 1998; Agudo *et al.* 2000), al qual no es detecta la presència de CenH3. Podria ser doncs que en aquest procés també estigués implicat el mecanisme de degradació via proteosoma que hem plantejat en aquest treball.

La degradació proteolítica de les histones no és exclusiva de les variants centromèriques de la histona H3. Durant la fase S les cèl·lules sintetitzen histones en excés per tal d'assegurar una ràpida deposició després de la replicació. Ara bé, donada la seva càrrega positiva, les histones poden interaccionar inespecíficament amb el DNA i interferir en processos com, per exemple, la transcripció. Experiments *in vitro* mostren que un petit excés estequiomètric d'histones respecte el DNA és suficient per provocar una agregació de la cromatina i bloquejar la transcripció (Steger and Workman 1999). Inclús poden interferir en processos com la modificació post-traducciona de les histones cromosomals sense unir-se al DNA, simplement competint amb elles per la unió amb l'enzim implicat (Doyon and Cote 2004). És per això que la cèl·lula ha desenvolupat una sèrie de mecanismes per regular els nivells d'histones lliures, sent un d'ells la degradació proteolítica depenent de Rad53 (Gunjan and Verreault 2003). Cal dir que les histones cromosomals són extremadament estables, és a dir, només es degraden les histones lliures. Llavors, potser el que estem observant és una substitució dels nucleosomes amb Cid per nucleosomes amb H3, o H3.3, i una degradació del Cid-YFP lliure que hi ha en excés. L'existència d'aquest mecanisme passiu de substitució podria explicar el fet que la disminució dels nivells de Cid-YFP observada al fer el seguiment *in vivo* de les cèl·lules transfectades mitjançant microscòpia de fluorescència tingui lloc en un interval de temps llarg. I, el fet d'observar cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada a totes les fases de la mitosi ens pot indicar que la degradació no és depenent de cicle, lligant també amb la hipòtesi del mecanisme passiu de substitució nucleosomal.

Un últim aspecte a ressaltar dels resultats obtinguts en aquest treball amb el seguiment de l'evolució dels patrons de localització en funció del temps de cultiu és el fet que la

disminució del percentatge de cèl·lules amb un patró de deslocalització es dona inclús amb HFD_{Cid} sol. Això suggereix que l'extrem N-terminal no és necessari en aquest procés. Ara bé, aquest fenomen de relocalització centromèrica sembla estar afectat negativament per la presència de l'extrem N-terminal de la histona H3, sent més lent que en el cas de Cid-YFP i que en presència de l'extrem N-terminal d'altres variants centromèriques. Cal remarcar que en estudis realitzats amb CENP-A s'han obtingut observacions similars: la proteïna quimèrica N_{H3}HFD_{CENP-A} també localitza al centròmer però hi ha un major nombre de cèl·lules deslocalitzades que amb CENP-A (Sullivan *et al.* 1994). Seria interessant aprofundir en aquesta observació determinant quina o quines són les regions implicades en la degradació proteolítica de Cid i identificar els residus involucrats.

1.3.2.- Està la proteïna F-box Ppa implicada en la degradació de Cid?

La degradació via proteosoma requereix la poliubiquitinació de la proteïna a degradar. La conjugació de les molècules d'ubiquitina té lloc a les lisines mitjançant una cascada enzimàtica. L'enzim activador E1 forma un enllaç tioèster amb l'ubiquitina, després la transfereix a l'enzim conjugador E2 mitjançant una etapa de transesterificació i, finalment, és transferida al substracte a degradar amb l'ajut de l'enzim ubiquitina-lligasa E3, el qual s'encarrega del seu reconeixement (Figura R.16.B).

L'enzim ubiquitina-lligasa E3 és un complex multiproteic i existeixen diferents famílies. Els dos exemples més coneguts són els complexos SCF (*Skp1-Cullin-F-box protein complex*) i APC (*Anaphase promoting complex*), necessaris per la transició G1-S i metafase-anafase, respectivament. El complex SCF està format per tres subunitats invariables (Skp1, Cull1 i Rbx1/Roc1) i una quarta, una proteïna F-box, que dona l'especificitat de substracte. A més, les proteïnes F-box es divideixen en dos grups segons el domini d'interacció proteïna-proteïna amb el que reconeixen el substrat: WD40 o LRR.

Mitjançant un assaig de dos híbrids a llevat realitzat amb anterioritat a aquest treball havíem trobat que Cid interaccionava amb Ppa (*Partner of Paired*), una proteïna F-box amb dominis LRRs (Moreno 2002). Per això ens vam plantejar la possibilitat que Ppa fos la proteïna involucrada en el reconeixement de Cid per la seva degradació via proteosoma.

La interacció Cid-Ppa ha estat confirmada *in vitro* mitjançant assajos de *GST-pulldown*. No obstant, tot i que a l'assaig de dos híbrids es va trobar la interacció entre el domini N-terminal de Cid i els 3 últims dominis LRRs de Ppa, segons el nostre assaig de

GST-*pulldown* la interacció no es dona exclusivament entre aquests dos dominis. En el nostre assaig hem demostrat com l'extrem N-terminal de Cid també interacciona, tot i que lleugerament, amb el domini Δ LRRs i com l'extrem C-terminal de Cid ho fa amb tots dos dominis de Ppa (Δ LRRs i LRRs).

Ara bé, no hem pogut demostrar que Ppa estigui involucrada en la degradació de Cid *in vivo*. A l'analitzar els nivells d'expressió de Cid als mutants *Ppa*²⁰, tant per *Western blot* com per immunolocalitzacions a embrions, no hem detectat cap canvi. De totes maneres, donat que mantenir regulats els nivells de Cid sembla ser molt important per evitar la seva deposició a llocs eucromàtics i els efectes que això ocasiona, podria ser que existissin varis mecanismes de regulació i que, llavors, la manca de Ppa estigui pal·liada pel funcionament d'una altra proteïna F-box o d'una altra via.

Les cues de les histones pateixen un gran número de modificacions post-traduccional. A diferència de l'acetilació, la metilació i la fosforilació, de la ubiquitinació se sap ben poc. Pel que fa a la histona H2A, la seva ubiquitinació està implicada en regulació transcripcional (Jason *et al.* 2002; Wang *et al.* 2004; Cao *et al.* 2005) i en la inactivació del cromosoma X (de Napoles *et al.* 2004; Fang *et al.* 2004). La ubiquitinació de la histona H2B, a part d'estar també implicada en regulació transcripcional (Henry *et al.* 2003; Kao *et al.* 2004), és necessària per la metilació de H3K4 i H3K79 (Briggs *et al.* 2002; Dover *et al.* 2002; Ng *et al.* 2002; Sun and Allis 2002) i es troba involucrada en recombinació meiótica i en el *checkpoint* per dany en el DNA (Yamashita *et al.* 2004; Giannattasio *et al.* 2005). Recentment, també s'ha descrit que les histones H3 i H4 són ubiquitinades i que aquestes modificacions també estan implicades en les respostes cel·lulars al dany al DNA (Wang *et al.* 2006). Així doncs, podria ser que la interacció Cid-Ppa tingués com a objectiu la ubiquitinació de Cid però no amb la finalitat que sigui degradada via proteosoma sinó perquè actuï com a senyal post-traduccional involucrada en algun altre procés cel·lular. Això explicaria que no veiéssim canvis en els nivells proteics de Cid als mutants de Ppa.

2.- EFECTES DE LA SOBREEXPRESSIÓ DE Cid SOBRE EL CICLE CEL·LULAR

Donat que les variants centromèriques de l'H3 tenen un important paper en la formació del cinetocor i la segregació cromosòmica (Stoler *et al.* 1995; Buchwitz *et al.* 1999; Howman *et al.* 2000; Takahashi *et al.* 2000; Moore and Roth 2001; Oegema *et al.* 2001; Heun *et al.* 2006), ens va sorgir la hipòtesi que la deslocalització de Cid al llarg de tota la cromatina pogués afectar la progressió al llarg del cicle cel·lular. Aquesta hipòtesi ha estat confirmada tant mitjançant l'anàlisi dels nivells mitòtics de les cèl·lules transfectades amb pCid-YFP com amb el seguiment *in vivo* del cultiu.

Tal i com s'ha esmentat amb anterioritat en aquest treball, la fosforilació de la serina 10 de la histona H3 es dona a tots els eucariotes i té un paper important en la condensació dels cromosomes mitòtics: comença a ser fosforilada per Aurora B a la fase G2 però només a la cromatina pericentromèrica i, a mesura que la mitosi progressa, s'expandeix al llarg dels cromosomes i es completa a profase, sent desfosforilada per PP1 al final de la mitosi. A l'anàlitzar els nivells mitòtics de les cèl·lules transfectades amb pCid-YFP mitjançant immunolocalitzacions amb l'anticòs contra la serina 10 fosforilada de la histona H3 (α -PSer¹⁰H3) s'observa que hi ha un percentatge molt elevat de cèl·lules amb Cid deslocalitzada (D) que donen senyal, mentre que a les que es troba localitzada exclusivament al centròmer (L), i a les que presenten un patró de localització mixt (M), el percentatge és igual de baix que a les cèl·lules no transfectades. Aquesta dada ens indicaria que un gran nombre de cèl·lules amb Cid deslocalitzada estan aturades, probablement a G2. Ara bé, aquesta observació caldria confirmar-la amb un anàlisi de cicle mitjançant citometria de flux.

Podríem pensar que aquest efecte s'associa simplement a la sobreexpressió de qualsevol proteïna. No obstant, la sobreexpressió de N_{Cid}HFD_{H3}-YFP dona uns valors d'índex mitòtic igual de baixos que el de les cèl·lules no transfectades, cosa que ens permet dir que el que estem veient és un efecte específic de la sobreexpressió de Cid i, més concretament, de l'extrem C-terminal de Cid (HFD_{Cid}). Una de les possibles funcions de Cid és el reclutament de proteïnes del cinetocor. Llavors, podria ser que aquesta aturada a G2 sigui deguda a que està reclutant proteïnes cinetocòriques a llocs ectòpics, interferint d'aquesta manera en la correcta formació del cinetocor i, per tant, produint una aturada del cicle cel·lular. De fet, en

un estudi publicat recentment observen que, efectivament, Cid és capaç de reclutar proteïnes del cinetocor a llocs eucromàtics (Heun *et al.* 2006).

Per analogia amb la histona H3, l'extrem N-terminal de Cid deu quedar situat fora del nucli nucleosomal i interaccionar amb altres proteïnes. A *S. cerevisiae* s'ha vist que hi ha una part de l'extrem N-terminal, un domini anomenat END de 33 aminoàcids, que sembla ser important perquè tinguin lloc interaccions entre Cse4 i el complex cinetocòric Ctf19-Mcm21-Okp1 (Ortiz *et al.* 1999; Chen *et al.* 2000). I, en experiments de sobreexpressió de CENP-A a cèl·lules de mamífer s'ha vist que l'extrem N-terminal és necessari pel reclutament ectòpic de CENP-C i HZwint-1, dos components del cinetocor (Van Hooser *et al.* 2001). Ara bé, al nostre anàlisi HFD_{Cid} i $N_{Cnp1}HFD_{Cid}$ també presenten un percentatge elevat de cèl·lules deslocalitzades amb senyal per α -PSer¹⁰H3 mentre que $N_{Cid}HFD_{H3}$ no, cosa que ens indicaria, com hem mencionat abans, que l'extrem N-terminal no està implicat en aquesta aturada del cicle cel·lular.

Els problemes que comporta la deslocalització de Cid són també visibles al fer un seguiment *in vivo* del cultiu. La majoria de les cèl·lules amb Cid-YFP deslocalitzada no entren en mitosi i les que es divideixen tenen greus problemes de segregació cromosòmica, donant lloc inclús a cèl·lules filles anucleades. Els nostres resultats estan d'acord amb l'estudi publicat recentment per Heun *et al.* (2006) on també mostren mitjançant seguiment *in vivo* com les cèl·lules amb Cid deslocalitzada presenten problemes de segregació cromosòmica.

A partir d'aquest seguiment *in vivo* del cultiu de cèl·lules transfectades hem obtingut un altre resultat interessant: les cèl·lules amb un patró de localització mixt es divideixen correctament (Figura D.2; 5). És a dir, que mentre els nivells de Cid es mantinguin per sota d'un determinat llindar la deslocalització no provoca cap efecte sobre la progressió del cicle cel·lular. Això ens podria estar indicant doncs que per tal que es formi el cinetocor és necessari que s'acumuli una certa quantitat de Cid. Com ja s'ha explicat a la introducció, estudis *in vitro* indiquen que la regió formada per una part de l'hèlix $\alpha 2$ i el *loop* 1 del domini C-terminal, que envolta el lloc d'unió amb la histona H4, dóna rigidesa i compactació al nucleosoma (Black *et al.* 2004). És possible doncs que es necessiti la concentració d'un determinat número de nucleosomes amb la variant centromèrica de la histona H3 per poder crear una plataforma amb la suficient rigidesa com perquè es pugui ensamblar a sobre el cinetocor i suporti les forces de la divisió mitòtica.

VII.- CONCLUSIONS

1.- L'expressió transitòria a cèl·lules Kc de Cid, la variant centromèrica de la histona H3 de *Drosophila*, dóna lloc a tres patrons de localització: exclusivament centromèrica (L), al llarg de tota la cromatina (D) i un patró mixt (M), on Cid presenta una deslocalització parcial. El domini C-terminal amb plegament tipus histona (HFD_{Cid}) és suficient per la localització centromèrica de Cid.

2.- L'anàlisi de l'evolució de la localització de Cid en funció del temps de cultiu indica que les cèl·lules on Cid es troba deslocalitzada al llarg de tota la cromatina progressen fins a mostrar una localització exclusivament centromèrica. Aquest procés de localització de Cid no està acoblat al creixement del cultiu, pot tenir lloc al llarg de tot el cicle cel·lular i no depèn del domini N-terminal de Cid, donat que es dóna també amb formes truncades que contenen només el HFD_{Cid} i amb proteïnes quimèriques on el domini N-terminal de Cid és substituït pel domini N-terminal d'altres variants centromèriques de la histona H3 (N_{Cse4}HFD_{Cid} i N_{Cnp1}HFD_{Cid}) o de la pròpia H3 (N_{H3}HFD_{Cid}), tot i que en aquest darrer cas es dóna més lentament.

3.- Les cèl·lules on Cid es troba deslocalitzada al llarg de tota la cromatina presenten concentracions proteïques de Cid superiors a les d'aquelles que mostren una localització exclusivament centromèrica, indicant l'existència d'un mecanisme de regulació dels nivells d'expressió de Cid. L'anàlisi dels nivells d'mRNA de Cid en funció del temps de cultiu indica que aquesta regulació té lloc a nivell post-transcripcional.

4.- La presència al cultiu de l'inhibidor del proteosoma MG132 interfereix amb el procés de localització centromèrica de Cid indicant que la regulació dels nivells d'expressió de Cid al llarg del cultiu té lloc mitjançant un mecanisme de degradació proteolítica via proteosoma que contribueix a la localització centromèrica de Cid.

5.- Neuroblastes de larves mutants *Pros26^l*, les quals presenten una mutació termosensible a la subunitat β6 del proteosoma, mostren una deslocalització parcial de Cid a temperatura no permissiva indicant que, també *in vivo*, els nivells d'expressió de Cid i la seva localització centromèrica estan regulats per degradació proteolítica via proteosoma.

6.- Els resultats anteriors indiquen que mantenir els nivells proteics de Cid per sota d'un determinat llindar resulta essencial per garantir la seva deposició específica a les regions centromèriques.

7.- Tant *in vitro* com en assajos de dos híbrids a llevat, Cid interacciona amb Ppa, una proteïna F-box que forma part del complex ubiquitina-ligasa SCF, suggerint que aquesta interacció pot contribuir a la degradació proteolítica de Cid. No obstant, ni els nivells de Cid ni la seva localització centromèrica es veuen afectats a embrions mutants *Ppa*²⁰.

8.- Un alt percentatge de cèl·lules on Cid està deslocalitzada al llarg de tota la cromatina són reactives amb α -PSer¹⁰H3 indicant que la deslocalització de Cid provoca una aturada del cicle cel·lular en G2 o a l'inici de la mitosi. D'acord amb aquests resultats les cèl·lules on Cid està deslocalitzada al llarg de tota la cromatina no es divideixen o, si ho fan, presenten greus problemes de segregació cromosòmica

9.- Pel contrari, les cèl·lules que presenten un patró mixt de localització, on Cid està només parcialment deslocalitzada, progressen normalment al llarg del cicle cel·lular i es divideixen correctament.

10.- Els resultats anteriors suggereixen que la deslocalització de Cid interfereix amb la funció centromèrica, probablement com a conseqüència de l'ensamblatge parcial de cinetocors ectòpics a regions no centromèriques, i que aquesta interferència funcional requereix d'una determinada concentració local de Cid.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- Adams, C. R. and R. T. Kamakaka** (1999). *Chromatin assembly: biochemical identities and genetic redundancy*. **Curr Opin Genet Dev** **9(2)**: 185-90.
- Agudo, M., J. P. Abad, I. Molina, A. Losada, P. Ripoll and A. Villasante** (2000). *A dicentric chromosome of Drosophila melanogaster showing alternate centromere inactivation*. **Chromosoma** **109(3)**: 190-6.
- Ahmad, K. and S. Henikoff** (2001). *Centromeres are specialized replication domains in heterochromatin*. **J Cell Biol** **153(1)**: 101-10.
- Ahmad, K. and S. Henikoff** (2002). *Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly*. **Proc Natl Acad Sci U S A** **99 Suppl 4**: 16477-84.
- Ahmad, K. and S. Henikoff** (2002). *The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly*. **Mol Cell** **9(6)**: 1191-200.
- Akhmanova, A. S., P. C. Bindels, J. Xu, K. Miedema, H. Kremer and W. Hennig** (1995). *Structure and expression of histone H3.3 genes in Drosophila melanogaster and Drosophila hydei*. **Genome** **38(3)**: 586-600.
- Appelgren, H., B. Kniola and K. Ekwall** (2003). *Distinct centromere domain structures with separate functions demonstrated in live fission yeast cells*. **J Cell Sci** **116(Pt 19)**: 4035-42.
- Baker, R. E. and D. C. Masison** (1990). *Isolation of the gene encoding the Saccharomyces cerevisiae centromere-binding protein CPI*. **Mol Cell Biol** **10(6)**: 2458-67.
- Barral, Y., S. Jentsch and C. Mann** (1995). *G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast*. **Genes Dev** **9(4)**: 399-409.
- Barry, A. E., M. Bateman, E. V. Howman, M. R. Cancilla, K. M. Tainton, D. V. Irvine, R. Saffery and K. H. Choo** (2000). *The 10q25 neocentromere and its inactive progenitor have identical primary nucleotide sequence: further evidence for epigenetic modification*. **Genome Res** **10(6)**: 832-8.
- Baum, M., V. K. Ngan and L. Clarke** (1994). *The centromeric K-type repeat and the central core are together sufficient to establish a functional Schizosaccharomyces pombe centromere*. **Mol Biol Cell** **5(7)**: 747-61.

Baumeister, W., J. Walz, F. Zuhl and E. Seemuller (1998). *The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease*. **Cell** **92(3)**: 367-80.

Belote, J. M. and E. Fortier (2002). *Targeted expression of dominant negative proteasome mutants in Drosophila melanogaster*. **Genesis** **34(1-2)**: 80-2.

Bernard, P., J. F. Maure, J. F. Partridge, S. Genier, J. P. Javerzat and R. C. Allshire (2001). *Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres*. **Science** **294(5551)**: 2539-42.

Bernstein, B. E., E. L. Humphrey, R. L. Erlich, R. Schneider, P. Bouman, J. S. Liu, T. Kouzarides and S. L. Schreiber (2002). *Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes*. **Proc Natl Acad Sci U S A** **99(13)**: 8695-700.

Bird, A. P. and A. P. Wolffe (1999). *Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin*. **Cell** **99(5)**: 451-4.

Black, B. E., D. R. Foltz, S. Chakravarthy, K. Luger, V. L. Woods, Jr. and D. W. Cleveland (2004). *Structural determinants for generating centromeric chromatin*. **Nature** **430(6999)**: 578-82.

Blower, M. D. and G. H. Karpen (2001). *The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions*. **Nat Cell Biol** **3(8)**: 730-9.

Blower, M. D., B. A. Sullivan and G. H. Karpen (2002). *Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans*. **Dev Cell** **2(3)**: 319-30.

Briggs, S. D., T. Xiao, Z. W. Sun, J. A. Caldwell, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, C. D. Allis and B. D. Strahl (2002). *Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin*. **Nature** **418(6897)**: 498.

Brown, K. E., S. S. Guest, S. T. Smale, K. Hahm, M. Merkenschlager and A. G. Fisher (1997). *Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin*. **Cell** **91(6)**: 845-54.

Buchwitz, B. J., K. Ahmad, L. L. Moore, M. B. Roth and S. Henikoff (1999). *A histone-H3-like protein in C. elegans*. **Nature** **401(6753)**: 547-8.

Cao, R., Y. Tsukada and Y. Zhang (2005). *Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing*. **Mol Cell** **20(6)**: 845-54.

Clarke, L., H. Amstutz, B. Fishel and J. Carbon (1986). *Analysis of centromeric DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe**. **Proc Natl Acad Sci U S A** **83(21)**: 8253-7.

Collins, K. A., S. Furuyama and S. Biggins (2004). *Proteolysis contributes to the exclusive centromere localization of the yeast *Cse4/CENP-A* histone H3 variant*. **Curr Biol** **14(21)**: 1968-72.

Copenhaver, G. P., K. Nickel, T. Kuromori, M. I. Benito, S. Kaul, X. Lin, M. Bevan, G. Murphy, B. Harris, L. D. Parnell, W. R. McCombie, R. A. Martienssen, M. Marra and D. Preuss (1999). *Genetic definition and sequence analysis of *Arabidopsis* centromeres*. **Science** **286(5449)**: 2468-74.

Chang, L., S. S. Loranger, C. Mizzen, S. G. Ernst, C. D. Allis and A. T. Annunziato (1997). *Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells*. **Biochemistry** **36(3)**: 469-80.

Cheeseman, I. M., S. Niessen, S. Anderson, F. Hyndman, J. R. Yates, 3rd, K. Oegema and A. Desai (2004). *A conserved protein network controls assembly of the outer kinetochore and its ability to sustain tension*. **Genes Dev** **18(18)**: 2255-68.

Chen, E. S., S. Saitoh, M. Yanagida and K. Takahashi (2003). *A cell cycle-regulated GATA factor promotes centromeric localization of CENP-A in fission yeast*. **Mol Cell** **11(1)**: 175-87.

Chen, E. S., M. Yanagida and K. Takahashi (2003). *Does a GATA factor make the bed for centromeric nucleosomes?* **Cell Cycle** **2(4)**: 277-8.

Chen, Y., R. E. Baker, K. C. Keith, K. Harris, S. Stoler and M. Fitzgerald-Hayes (2000). *The N terminus of the centromere H3-like protein *Cse4p* performs an essential function distinct from that of the histone fold domain*. **Mol Cell Biol** **20(18)**: 7037-48.

Choo, K. H. (1997). *Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation*. **Am J Hum Genet** **61(6)**: 1225-33.

Choo, K. H. (2000). *Centromerization*. **Trends Cell Biol** **10(5)**: 182-8.

Chuang, L. S., H. I. Ian, T. W. Koh, H. H. Ng, G. Xu and B. F. Li (1997). *Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1.* **Science 277(5334):** 1996-2000.

Das, T., C. Purkayastha-Mukherjee, J. D'Angelo and M. Weir (2002). *A conserved F-box gene with unusual transcript localization.* **Dev Genes Evol 212(3):** 134-40.

de Napoles, M., J. E. Mermoud, R. Wakao, Y. A. Tang, M. Endoh, R. Appanah, T. B. Nesterova, J. Silva, A. P. Otte, M. Vidal, H. Koseki and N. Brockdorff (2004). *Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation.* **Dev Cell 7(5):** 663-76.

Desai, A., S. Rybina, T. Muller-Reichert, A. Shevchenko, A. Hyman and K. Oegema (2003). *KNL-1 directs assembly of the microtubule-binding interface of the kinetochore in C. elegans.* **Genes Dev 17(19):** 2421-35.

Dillon, N. and R. Festenstein (2002). *Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility.* **Trends Genet 18(5):** 252-8.

Dover, J., J. Schneider, M. A. Tawiah-Boateng, A. Wood, K. Dean, M. Johnston and A. Shilatifard (2002). *Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6.* **J Biol Chem 277(32):** 28368-71.

Doyon, Y. and J. Cote (2004). *The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex.* **Curr Opin Genet Dev 14(2):** 147-54.

du Sart, D., M. R. Cancilla, E. Earle, J. I. Mao, R. Saffery, K. M. Tainton, P. Kalitsis, J. Martyn, A. E. Barry and K. H. Choo (1997). *A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA.* **Nat Genet 16(2):** 144-53.

Dunleavy, E., A. Pidoux and R. Allshire (2005). *Centromeric chromatin makes its mark.* **Trends Biochem Sci 30(4):** 172-5.

Echalier, G. and A. Ohanessian (1969). *[Isolation, in tissue culture, of Drosophila melangaster cell lines].* **C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D 268(13):** 1771-3.

Edwards, N. S. and A. W. Murray (2005). *Identification of xenopus CENP-A and an associated centromeric DNA repeat.* **Mol Biol Cell 16(4):** 1800-10.

Ekwall, K., J. P. Javerzat, A. Lorentz, H. Schmidt, G. Cranston and R. Allshire (1995). *The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres*. **Science** **269**(5229): 1429-31.

Fang, J., T. Chen, B. Chadwick, E. Li and Y. Zhang (2004). *Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation*. **J Biol Chem** **279**(51): 52812-5.

Faulkner, N. E., B. Vig, C. J. Echeverri, L. Wordeman and R. B. Vallee (1998). *Localization of motor-related proteins and associated complexes to active, but not inactive, centromeres*. **Hum Mol Genet** **7**(4): 671-7.

Fischle, W., Y. Wang and C. D. Allis (2003). *Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond*. **Nature** **425**(6957): 475-9.

Fretzin, S., B. D. Allan, A. van Daal and S. C. Elgin (1991). *A Drosophila melanogaster H3.3 cDNA encodes a histone variant identical with the vertebrate H3.3*. **Gene** **107**(2): 341-2.

Fuks, F., W. A. Burgers, A. Brehm, L. Hughes-Davies and T. Kouzarides (2000). *DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity*. **Nat Genet** **24**(1): 88-91.

Furuyama, T., Y. Dalal and S. Henikoff (2006). *Chaperone-mediated assembly of centromeric chromatin in vitro*. **Proc Natl Acad Sci U S A** **103**(16): 6172-7.

Furuyama, T. and S. Henikoff (2006). *Biotin-tag affinity purification of a centromeric nucleosome assembly complex*. **Cell Cycle** **5**(12): 1269-74.

Gaudet, A. and M. Fitzgerald-Hayes (1987). *Alterations in the adenine-plus-thymine-rich region of CEN3 affect centromere function in Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** **7**(1): 68-75.

Giannattasio, M., F. Lazzaro, P. Plevani and M. Muzi-Falconi (2005). *The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1*. **J Biol Chem** **280**(11): 9879-86.

Giet, R. and D. M. Glover (2001). *Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis*. **J Cell Biol** **152**(4): 669-82.

Glowczewski, L., P. Yang, T. Kalashnikova, M. S. Santisteban and M. M. Smith (2000). *Histone-histone interactions and centromere function*. **Mol Cell Biol** **20(15)**: 5700-11.

Goshima, G., S. Saitoh and M. Yanagida (1999). *Proper metaphase spindle length is determined by centromere proteins Mis12 and Mis6 required for faithful chromosome segregation*. **Genes Dev** **13(13)**: 1664-77.

Goto, H., Y. Yasui, E. A. Nigg and M. Inagaki (2002). *Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation*. **Genes Cells** **7(1)**: 11-7.

Gunjan, A. and A. Verreault (2003). *A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in S. cerevisiae*. **Cell** **115(5)**: 537-49.

Haass, C. and P. M. Kloetzel (1989). *The Drosophila proteasome undergoes changes in its subunit pattern during development*. **Exp Cell Res** **180(1)**: 243-52.

Hahnenberger, K. M., J. Carbon and L. Clarke (1991). *Identification of DNA regions required for mitotic and meiotic functions within the centromere of Schizosaccharomyces pombe chromosome I*. **Mol Cell Biol** **11(4)**: 2206-15.

Harrington, J. J., G. Van Bokkelen, R. W. Mays, K. Gustashaw and H. F. Willard (1997). *Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes*. **Nat Genet** **15(4)**: 345-55.

Hayashi, T., Y. Fujita, O. Iwasaki, Y. Adachi, K. Takahashi and M. Yanagida (2004). *Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres*. **Cell** **118(6)**: 715-29.

Hemmerich, P., T. Stoyan, G. Wieland, M. Koch, J. Lechner and S. Diekmann (2000). *Interaction of yeast kinetochore proteins with centromere-protein/transcription factor Cbfl*. **Proc Natl Acad Sci U S A** **97(23)**: 12583-8.

Henzel, M. J., Y. Wei, M. A. Mancini, A. Van Hooser, T. Ranalli, B. R. Brinkley, D. P. Bazett-Jones and C. D. Allis (1997). *Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation*. **Chromosoma** **106(6)**: 348-60.

Henikoff, S., K. Ahmad, J. S. Platero and B. van Steensel (2000). *Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins*. **Proc Natl Acad Sci U S A** **97**(2): 716-21.

Henry, K. W., A. Wyce, W. S. Lo, L. J. Duggan, N. C. Emre, C. F. Kao, L. Pillus, A. Shilatifard, M. A. Osley and S. L. Berger (2003). *Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8*. **Genes Dev** **17**(21): 2648-63.

Heslop-Harrison, J. S., M. Murata, Y. Ogura, T. Schwarzacher and F. Motoyoshi (1999). *Polymorphisms and genomic organization of repetitive DNA from centromeric regions of Arabidopsis chromosomes*. **Plant Cell** **11**(1): 31-42.

Heun, P., S. Erhardt, M. D. Blower, S. Weiss, A. D. Skora and G. H. Karpen (2006). *Mislocalization of the Drosophila centromere-specific histone CID promotes formation of functional ectopic kinetochores*. **Dev Cell** **10**(3): 303-15.

Higgins, A. W., M. G. Schueler and H. F. Willard (1999). *Chromosome engineering: generation of mono- and dicentric isochromosomes in a somatic cell hybrid system*. **Chromosoma** **108**(4): 256-65.

Holden, J. J. and D. T. Suzuki (1973). *Temperature-sensitive mutations in Drosophila melanogaster. XII. The genetic and developmental effects of dominant lethals on chromosome 3*. **Genetics** **73**(3): 445-58.

Howman, E. V., K. J. Fowler, A. J. Newson, S. Redward, A. C. MacDonald, P. Kalitsis and K. H. Choo (2000). *Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice*. **Proc Natl Acad Sci U S A** **97**(3): 1148-53.

Hsu, J. Y., Z. W. Sun, X. Li, M. Reuben, K. Tatchell, D. K. Bishop, J. M. Grushcow, C. J. Brame, J. A. Caldwell, D. F. Hunt, R. Lin, M. M. Smith and C. D. Allis (2000). *Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PPI phosphatase in budding yeast and nematodes*. **Cell** **102**(3): 279-91.

Ikeno, M., B. Grimes, T. Okazaki, M. Nakano, K. Saitoh, H. Hoshino, N. I. McGill, H. Cooke and H. Masumoto (1998). *Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes*. **Nat Biotechnol** **16**(5): 431-9.

Imhof, A. and A. P. Wolffe (1999). *Purification and properties of the Xenopus Hat1 acetyltransferase: association with the 14-3-3 proteins in the oocyte nucleus*. **Biochemistry** **38**(40): 13085-93.

Ito, T., M. Bulger, R. Kobayashi and J. T. Kadonaga (1996). *Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays.* **Mol Cell Biol** **16**(6): 3112-24.

Ito, T., J. K. Tyler and J. T. Kadonaga (1997). *Chromatin assembly factors: a dual function in nucleosome formation and mobilization?* **Genes Cells** **2**(10): 593-600.

Jason, L. J., S. C. Moore, J. D. Lewis, G. Lindsey and J. Ausio (2002). *Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds?* **Bioessays** **24**(2): 166-74.

Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). *Translating the histone code.* **Science** **293**(5532): 1074-80.

Kao, C. F., C. Hillyer, T. Tsukuda, K. Henry, S. Berger and M. A. Osley (2004). *Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B.* **Genes Dev** **18**(2): 184-95.

Kaplan, K. B., A. A. Hyman and P. K. Sorger (1997). *Regulating the yeast kinetochore by ubiquitin-dependent degradation and Skp1p-mediated phosphorylation.* **Cell** **91**(4): 491-500.

Keith, K. C., R. E. Baker, Y. Chen, K. Harris, S. Stoler and M. Fitzgerald-Hayes (1999). *Analysis of primary structural determinants that distinguish the centromere-specific function of histone variant Cse4p from histone H3.* **Mol Cell Biol** **19**(9): 6130-9.

Kim, J., S. Sif, B. Jones, A. Jackson, J. Koipally, E. Heller, S. Winandy, A. Viel, A. Sawyer, T. Ikeda, R. Kingston and K. Georgopoulos (1999). *Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes.* **Immunity** **10**(3): 345-55.

Kniola, B., E. O'Toole, J. R. McIntosh, B. Mellone, R. Allshire, S. Mengarelli, K. Hultenby and K. Ekwall (2001). *The domain structure of centromeres is conserved from fission yeast to humans.* **Mol Biol Cell** **12**(9): 2767-75.

Kobe, B. and J. Deisenhofer (1994). *The leucine-rich repeat: a versatile binding motif.* **Trends Biochem Sci** **19**(10): 415-21.

Kunitoku, N., T. Sasayama, T. Marumoto, D. Zhang, S. Honda, O. Kobayashi, K. Hatakeyama, Y. Ushio, H. Saya and T. Hirota (2003). *CENP-A phosphorylation by*

Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. Dev Cell **5(6)**: 853-64.

Lechner, J. and J. Carbon (1991). *A 240 kd multisubunit protein complex, CBF3, is a major component of the budding yeast centromere. Cell* **64(4)**: 717-25.

Li, F. N. and M. Johnston (1997). *Grr1 of Saccharomyces cerevisiae is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. Embo J* **16(18)**: 5629-38.

Lo, A. W., J. M. Craig, R. Saffery, P. Kalitsis, D. V. Irvine, E. Earle, D. J. Magliano and K. H. Choo (2001). *A 330 kb CENP-A binding domain and altered replication timing at a human neocentromere. Embo J* **20(8)**: 2087-96.

Lo, A. W., D. J. Magliano, M. C. Sibson, P. Kalitsis, J. M. Craig and K. H. Choo (2001). *A novel chromatin immunoprecipitation and array (CIA) analysis identifies a 460-kb CENP-A-binding neocentromere DNA. Genome Res* **11(3)**: 448-57.

Lomonte, P., K. F. Sullivan and R. D. Everett (2001). *Degradation of nucleosome-associated centromeric histone H3-like protein CENP-A induced by herpes simplex virus type 1 protein ICP0. J Biol Chem* **276(8)**: 5829-35.

Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. Nature* **389(6648)**: 251-60.

Maggert, K. A. and G. H. Karpen (2001). *The activation of a neocentromere in Drosophila requires proximity to an endogenous centromere. Genetics* **158(4)**: 1615-28.

Malik, H. S. and S. Henikoff (2001). *Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in Drosophila. Genetics* **157(3)**: 1293-8.

Malik, H. S., D. Vermaak and S. Henikoff (2002). *Recurrent evolution of DNA-binding motifs in the Drosophila centromeric histone. Proc Natl Acad Sci U S A* **99(3)**: 1449-54.

McCarroll, R. M. and W. L. Fangman (1988). *Time of replication of yeast centromeres and telomeres. Cell* **54(4)**: 505-13.

Measday, V., D. W. Hailey, I. Pot, S. A. Givan, K. M. Hyland, G. Cagney, S. Fields, T. N. Davis and P. Hieter (2002). *Ctf3p, the Mis6 budding yeast homolog, interacts with Mcm22p and Mcm16p at the yeast outer kinetochore.* **Genes Dev** **16(1)**: 101-13.

Mills, W., R. Critcher, C. Lee and C. J. Farr (1999). *Generation of an approximately 2.4 Mb human X centromere-based minichromosome by targeted telomere-associated chromosome fragmentation in DT40.* **Hum Mol Genet** **8(5)**: 751-61.

Moore, L. L. and M. B. Roth (2001). *HCP-4, a CENP-C-like protein in Caenorhabditis elegans, is required for resolution of sister centromeres.* **J Cell Biol** **153(6)**: 1199-208.

Moreno, O. (2002). Identificació, mitjançant un assaig de dos híbrids a llevat, de proteïnes que interaccionin amb l'extrem N-terminal de la histona H3 centromèrica de *Drosophila melanogaster* (CID).

Murakami, S., T. Matsumoto, O. Niwa and M. Yanagida (1991). *Structure of the fission yeast centromere cen3: direct analysis of the reiterated inverted region.* **Chromosoma** **101(4)**: 214-21.

Murphy, M. and M. Fitzgerald-Hayes (1990). *Cis- and trans-acting factors involved in centromere function in Saccharomyces cerevisiae.* **Mol Microbiol** **4(3)**: 329-36.

Murphy, T. D. and G. H. Karpen (1995). *Localization of centromere function in a Drosophila minichromosome.* **Cell** **82(4)**: 599-609.

Murphy, T. D. and G. H. Karpen (1998). *Centromeres take flight: alpha satellite and the quest for the human centromere.* **Cell** **93(3)**: 317-20.

Nagaki, K., Z. Cheng, S. Ouyang, P. B. Talbert, M. Kim, K. M. Jones, S. Henikoff, C. R. Buell and J. Jiang (2004). *Sequencing of a rice centromere uncovers active genes.* **Nat Genet** **36(2)**: 138-45.

Nakagawa, H., J. K. Lee, J. Hurwitz, R. C. Allshire, J. Nakayama, S. I. Grewal, K. Tanaka and Y. Murakami (2002). *Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by promoting heterochromatin-specific histone tail modifications.* **Genes Dev** **16(14)**: 1766-78.

- Nakaseko, Y., Y. Adachi, S. Funahashi, O. Niwa and M. Yanagida (1986).** *Chromosome walking shows a highly homologous repetitive sequence present in all the centromere regions of fission yeast.* **Embo J 5(5):** 1011-21.
- Nakaseko, Y., N. Kinoshita and M. Yanagida (1987).** *A novel sequence common to the centromere regions of Schizosaccharomyces pombe chromosomes.* **Nucleic Acids Res 15(12):** 4705-15.
- Neuburger, P. J., K. J. Saville, J. Zeng, K. A. Smyth and J. M. Belote (2006).** *A genetic suppressor of two dominant temperature-sensitive lethal proteasome mutants of Drosophila melanogaster is itself a mutated proteasome subunit gene.* **Genetics 173(3):** 1377-87.
- Ng, H. H., R. M. Xu, Y. Zhang and K. Struhl (2002).** *Ubiquitination of histone H2B by Rad6 is required for efficient Dot1-mediated methylation of histone H3 lysine 79.* **J Biol Chem 277(38):** 34655-7.
- Nishihashi, A., T. Haraguchi, Y. Hiraoka, T. Ikemura, V. Regnier, H. Dodson, W. C. Earnshaw and T. Fukagawa (2002).** *CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells.* **Dev Cell 2(4):** 463-76.
- Oegema, K., A. Desai, S. Rybina, M. Kirkham and A. A. Hyman (2001).** *Functional analysis of kinetochore assembly in Caenorhabditis elegans.* **J Cell Biol 153(6):** 1209-26.
- Ortiz, J., O. Stemmann, S. Rank and J. Lechner (1999).** *A putative protein complex consisting of Ctf19, Mcm21, and Okp1 represents a missing link in the budding yeast kinetochore.* **Genes Dev 13(9):** 1140-55.
- Palmer, D. K., K. O'Day, H. L. Trong, H. Charbonneau and R. L. Margolis (1991).** *Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone.* **Proc Natl Acad Sci U S A 88(9):** 3734-8.
- Partridge, J. F., B. Borgstrom and R. C. Allshire (2000).** *Distinct protein interaction domains and protein spreading in a complex centromere.* **Genes Dev 14(7):** 783-91.
- Patton, E. E., A. R. Willems and M. Tyers (1998).** *Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis.* **Trends Genet 14(6):** 236-43.

Peters, A. H., S. Kubicek, K. Mechtler, R. J. O'Sullivan, A. A. Derijck, L. Perez-Burgos, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Tachibana, Y. Shinkai, J. H. Martens and T. Jenuwein (2003). *Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin*. **Mol Cell** **12(6)**: 1577-89.

Pidoux, A. L. and R. C. Allshire (2004). *Kinetochore and heterochromatin domains of the fission yeast centromere*. **Chromosome Res** **12(6)**: 521-34.

Pidoux, A. L. and R. C. Allshire (2005). *The role of heterochromatin in centromere function*. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** **360(1455)**: 569-79.

Pidoux, A. L., W. Richardson and R. C. Allshire (2003). *Sim4: a novel fission yeast kinetochore protein required for centromeric silencing and chromosome segregation*. **J Cell Biol** **161(2)**: 295-307.

Polizzi, C. and L. Clarke (1991). *The chromatin structure of centromeres from fission yeast: differentiation of the central core that correlates with function*. **J Cell Biol** **112(2)**: 191-201.

Raj, L., P. Vivekanand, T. K. Das, E. Badam, M. Fernandes, R. L. Finley, R. Brent, L. F. Appel, S. D. Hanes and M. Weir (2000). *Targeted localized degradation of Paired protein in Drosophila development*. **Curr Biol** **10(20)**: 1265-72.

Reinhart, B. J. and D. P. Bartel (2002). *Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats*. **Science** **297(5588)**: 1831.

Reuter, G. and P. Spierer (1992). *Position effect variegation and chromatin proteins*. **Bioessays** **14(9)**: 605-12.

Rice, J. C., S. D. Briggs, B. Ueberheide, C. M. Barber, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, Y. Shinkai and C. D. Allis (2003). *Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains*. **Mol Cell** **12(6)**: 1591-8.

Richards, E. J. and S. C. Elgin (2002). *Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects*. **Cell** **108(4)**: 489-500.

Ridgway, P. and G. Almouzni (2000). *CAF-1 and the inheritance of chromatin states: at the crossroads of DNA replication and repair*. **J Cell Sci** **113 (Pt 15)**: 2647-58.

- Round, E. K., S. K. Flowers and E. J. Richards** (1997). *Arabidopsis thaliana* centromere regions: genetic map positions and repetitive DNA structure. **Genome Res** **7(11)**: 1045-53.
- Sadaie, M., T. Iida, T. Urano and J. Nakayama** (2004). A chromodomain protein, *Chp1*, is required for the establishment of heterochromatin in fission yeast. **Embo J** **23(19)**: 3825-35.
- Saffery, R., D. V. Irvine, B. Griffiths, P. Kalitsis, L. Wordeman and K. H. Choo** (2000). Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of >20 functionally important kinetochore-associated proteins. **Hum Mol Genet** **9(2)**: 175-85.
- Saitoh, S., K. Ishii, Y. Kobayashi and K. Takahashi** (2005). Spindle checkpoint signaling requires the mis6 kinetochore subcomplex, which interacts with mad2 and mitotic spindles. **Mol Biol Cell** **16(8)**: 3666-77.
- Saitoh, S., K. Takahashi and M. Yanagida** (1997). *Mis6*, a fission yeast inner centromere protein, acts during G1/S and forms specialized chromatin required for equal segregation. **Cell** **90(1)**: 131-43.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis** (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos-Rosa, H., R. Schneider, A. J. Bannister, J. Sherriff, B. E. Bernstein, N. C. Emre, S. L. Schreiber, J. Mellor and T. Kouzarides** (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. **Nature** **419(6905)**: 407-11.
- Saunders, M., M. Fitzgerald-Hayes and K. Bloom** (1988). Chromatin structure of altered yeast centromeres. **Proc Natl Acad Sci U S A** **85(1)**: 175-9.
- Saunders, M. J., E. Yeh, M. Grunstein and K. Bloom** (1990). Nucleosome depletion alters the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae* centromeres. **Mol Cell Biol** **10(11)**: 5721-7.
- Saville, K. J. and J. M. Belote** (1993). Identification of an essential gene, *l(3)73Ai*, with a dominant temperature-sensitive lethal allele, encoding a *Drosophila* proteasome subunit. **Proc Natl Acad Sci U S A** **90(19)**: 8842-6.

Schneider, R., A. J. Bannister, F. A. Myers, A. W. Thorne, C. Crane-Robinson and T. Kouzarides (2004). *Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes*. **Nat Cell Biol** **6**(1): 73-7.

Shelby, R. D., K. Monier and K. F. Sullivan (2000). *Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication*. **J Cell Biol** **151**(5): 1113-8.

Shelby, R. D., O. Vafa and K. F. Sullivan (1997). *Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites*. **J Cell Biol** **136**(3): 501-13.

Shibahara, K. and B. Stillman (1999). *Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-I-coupled inheritance of chromatin*. **Cell** **96**(4): 575-85.

Smith, M. M. (2002). *Centromeres and variant histones: what, where, when and why?* **Curr Opin Cell Biol** **14**(3): 279-85.

Smith, S. and B. Stillman (1989). *Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro*. **Cell** **58**(1): 15-25.

Sobel, R. E., R. G. Cook, C. A. Perry, A. T. Annunziato and C. D. Allis (1995). *Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4*. **Proc Natl Acad Sci U S A** **92**(4): 1237-41.

Steger, D. J. and J. L. Workman (1999). *Transcriptional analysis of purified histone acetyltransferase complexes*. **Methods** **19**(3): 410-6.

Steiner, N. C., K. M. Hahnenberger and L. Clarke (1993). *Centromeres of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* are highly variable genetic loci*. **Mol Cell Biol** **13**(8): 4578-87.

Stoler, S., K. C. Keith, K. E. Curnick and M. Fitzgerald-Hayes (1995). *A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis*. **Genes Dev** **9**(5): 573-86.

Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). *The language of covalent histone modifications*. **Nature** **403**(6765): 41-5.

Sullivan, B. and G. Karpen (2001). *Centromere identity in Drosophila is not determined in vivo by replication timing*. **J Cell Biol** **154**(4): 683-90.

Sullivan, B. A., M. D. Blower and G. H. Karpen (2001). *Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths*. **Nat Rev Genet** **2**(8): 584-96.

Sullivan, B. A. and G. H. Karpen (2004). *Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin*. **Nat Struct Mol Biol** **11**(11): 1076-83.

Sullivan, B. A. and S. Schwartz (1995). *Identification of centromeric antigens in dicentric Robertsonian translocations: CENP-C and CENP-E are necessary components of functional centromeres*. **Hum Mol Genet** **4**(12): 2189-97.

Sullivan, B. A. and H. F. Willard (1998). *Stable dicentric X chromosomes with two functional centromeres*. **Nat Genet** **20**(3): 227-8.

Sullivan, K. F., M. Hechenberger and K. Masri (1994). *Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere*. **J Cell Biol** **127**(3): 581-92.

Sullivan, K. F. and R. D. Shelby (1999). *Using time-lapse confocal microscopy for analysis of centromere dynamics in human cells*. **Methods Cell Biol** **58**: 183-202.

Sun, X., H. D. Le, J. M. Wahlstrom and G. H. Karpen (2003). *Sequence analysis of a functional Drosophila centromere*. **Genome Res** **13**(2): 182-94.

Sun, X., J. Wahlstrom and G. Karpen (1997). *Molecular structure of a functional Drosophila centromere*. **Cell** **91**(7): 1007-19.

Sun, Z. W. and C. D. Allis (2002). *Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast*. **Nature** **418**(6893): 104-8.

Szauter, P. (1984). *An analysis of regional constraints on exchange in Drosophila melanogaster using recombination-defective meiotic mutants*. **Genetics** **106**(1): 45-71.

Tagami, H., D. Ray-Gallet, G. Almouzni and Y. Nakatani (2004). *Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis*. **Cell** **116**(1): 51-61.

Takahashi, K., E. S. Chen and M. Yanagida (2000). *Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast.* **Science** **288(5474)**: 2215-9.

Takahashi, K., S. Murakami, Y. Chikashige, H. Funabiki, O. Niwa and M. Yanagida (1992). *A low copy number central sequence with strict symmetry and unusual chromatin structure in fission yeast centromere.* **Mol Biol Cell** **3(7)**: 819-35.

Takahashi, K., Y. Takayama, F. Masuda, Y. Kobayashi and S. Saitoh (2005). *Two distinct pathways responsible for the loading of CENP-A to centromeres in the fission yeast cell cycle.* **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** **360(1455)**: 595-606; discussion 606-7.

Talbert, P. B., R. Masuelli, A. P. Tyagi, L. Comai and S. Henikoff (2002). *Centromeric localization and adaptive evolution of an Arabidopsis histone H3 variant.* **Plant Cell** **14(5)**: 1053-66.

Tanaka, K., T. Tamura, T. Yoshimura and A. Ichihara (1992). *Proteasomes: protein and gene structures.* **New Biol** **4(3)**: 173-87.

Taunton, J., C. A. Hassig and S. L. Schreiber (1996). *A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p.* **Science** **272(5260)**: 408-11.

Tomonaga, T., K. Matsushita, S. Yamaguchi, T. Oohashi, H. Shimada, T. Ochiai, K. Yoda and F. Nomura (2003). *Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer.* **Cancer Res** **63(13)**: 3511-6.

Tong, J. K., C. A. Hassig, G. R. Schnitzler, R. E. Kingston and S. L. Schreiber (1998). *Chromatin deacetylation by an ATP-dependent nucleosome remodelling complex.* **Nature** **395(6705)**: 917-21.

Tyler-Smith, C. and H. F. Willard (1993). *Mammalian chromosome structure.* **Curr Opin Genet Dev** **3(3)**: 390-7.

Unno, M., T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka and T. Tsukihara (2002). *The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution.* **Structure** **10(5)**: 609-18.

Vafa, O. and K. F. Sullivan (1997). *Chromatin containing CENP-A and alpha-satellite DNA is a major component of the inner kinetochore plate.* **Curr Biol** **7(11)**: 897-900.

Van Hooser, A. A., Ouspenski, II, H. C. Gregson, D. A. Starr, T. J. Yen, M. L. Goldberg, K. Yokomori, W. C. Earnshaw, K. F. Sullivan and B. R. Brinkley (2001). *Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A*. **J Cell Sci** 114(Pt 19): 3529-42.

Vermaak, D., H. S. Hayden and S. Henikoff (2002). *Centromere targeting element within the histone fold domain of Cid*. **Mol Cell Biol** 22(21): 7553-61.

Verreault, A. (2000). *De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle*. **Genes Dev** 14(12): 1430-8.

Verreault, A., P. D. Kaufman, R. Kobayashi and B. Stillman (1998). *Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase*. **Curr Biol** 8(2): 96-108.

Volpe, T. A., C. Kidner, I. M. Hall, G. Teng, S. I. Grewal and R. A. Martienssen (2002). *Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi*. **Science** 297(5588): 1833-7.

Wade, P. A., A. Geggion, P. L. Jones, E. Ballestar, F. Aubry and A. P. Wolffe (1999). *Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation*. **Nat Genet** 23(1): 62-6.

Wade, P. A., P. L. Jones, D. Vermaak and A. P. Wolffe (1998). *A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from Xenopus laevis cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase*. **Curr Biol** 8(14): 843-6.

Walfridsson, J., P. Bjerling, M. Thalen, E. J. Yoo, S. D. Park and K. Ekwall (2005). *The CHD remodeling factor Hrp1 stimulates CENP-A loading to centromeres*. **Nucleic Acids Res** 33(9): 2868-79.

Wang, H., L. Wang, H. Erdjument-Bromage, M. Vidal, P. Tempst, R. S. Jones and Y. Zhang (2004). *Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing*. **Nature** 431(7010): 873-8.

Wang, H., L. Zhai, J. Xu, H. Y. Joo, S. Jackson, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, Y. Xiong and Y. Zhang (2006). *Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage*. **Mol Cell** 22(3): 383-94.

Warburton, P. E., C. A. Cooke, S. Bourassa, O. Vafa, B. A. Sullivan, G. Stetten, G. Gimelli, D. Warburton, C. Tyler-Smith, K. F. Sullivan, G. G. Poirier and W. C. Earnshaw (1997). *Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres*. *Curr Biol* 7(11): 901-4.

Wei, Y., C. A. Mizzen, R. G. Cook, M. A. Gorovsky and C. D. Allis (1998). *Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7480-4.

Wei, Y., L. Yu, J. Bowen, M. A. Gorovsky and C. D. Allis (1999). *Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation*. *Cell* 97(1): 99-109.

Wevrick, R., W. C. Earnshaw, P. N. Howard-Peebles and H. F. Willard (1990). *Partial deletion of alpha satellite DNA associated with reduced amounts of the centromere protein CENP-B in a mitotically stable human chromosome rearrangement*. *Mol Cell Biol* 10(12): 6374-80.

Williams, B. C., T. D. Murphy, M. L. Goldberg and G. H. Karpen (1998). *Neocentromere activity of structurally acentric mini-chromosomes in Drosophila*. *Nat Genet* 18(1): 30-7.

Wood, V., R. Gwilliam, M. A. Rajandream, M. Lyne, R. Lyne, A. Stewart, J. Sgouros, N. Peat, J. Hayles, S. Baker, D. Basham, S. Bowman, K. Brooks, D. Brown, S. Brown, T. Chillingworth, C. Churcher, M. Collins, R. Connor, A. Cronin, P. Davis, T. Feltwell, A. Fraser, S. Gentles, A. Goble, N. Hamlin, D. Harris, J. Hidalgo, G. Hodgson, S. Holroyd, T. Hornsby, S. Howarth, E. J. Huckle, S. Hunt, K. Jagels, K. James, L. Jones, M. Jones, S. Leather, S. McDonald, J. McLean, P. Mooney, S. Moule, K. Mungall, L. Murphy, D. Niblett, C. Odell, K. Oliver, S. O'Neil, D. Pearson, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, S. Rutter, D. Saunders, K. Seeger, S. Sharp, J. Skelton, M. Simmonds, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, R. G. Taylor, A. Tivey, S. Walsh, T. Warren, S. Whitehead, J. Woodward, G. Volckaert, R. Aert, J. Robben, B. Grymonprez, I. Weltjens, E. Vanstreels, M. Rieger, M. Schafer, S. Muller-Auer, C. Gabel, M. Fuchs, A. Dusterhoft, C. Fritze, E. Holzer, D. Moestl, H. Hilbert, K. Borzym, I. Langer, A. Beck, H. Lehrach, R. Reinhardt, T. M. Pohl, P. Eger, W. Zimmermann, H. Wedler, R. Wambutt, B. Purnelle, A. Goffeau, E. Cadieu, S. Dreano, S. Gloux, V. Lelaure, S. Mottier, F. Galibert, S. J. Aves, Z. Xiang, C. Hunt, K. Moore, S. M. Hurst, M. Lucas, M. Rochet, C. Gaillardin, V. A. Tallada, A. Garzon, G. Thode, R. R. Daga, L. Cruzado, J. Jimenez, M. Sanchez, F. del Rey, J. Benito, A. Dominguez, J. L. Revuelta, S. Moreno, J. Armstrong, S. L. Forsburg, L. Cerutti, T. Lowe, W. R. McCombie, I. Paulsen, J. Potashkin, G. V. Shpakovski, D. Ussery, B. G. Barrell and P. Nurse (2002). *The genome sequence of Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415(6874): 871-80.

Yamashita, K., M. Shinohara and A. Shinohara (2004). *Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis*. **Proc Natl Acad Sci U S A** **101(31)**: 11380-5.

Yang, J. W., C. Pendon, J. Yang, N. Haywood, A. Chand and W. R. Brown (2000). *Human mini-chromosomes with minimal centromeres*. **Hum Mol Genet** **9(12)**: 1891-902.

Yoda, K., S. Ando, S. Morishita, K. Houmura, K. Hashimoto, K. Takeyasu and T. Okazaki (2000). *Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro*. **Proc Natl Acad Sci U S A** **97(13)**: 7266-71.

Zeitlin, S. G., C. M. Barber, C. D. Allis and K. F. Sullivan (2001). *Differential regulation of CENP-A and histone H3 phosphorylation in G2/M*. **J Cell Sci** **114(Pt 4)**: 653-61.

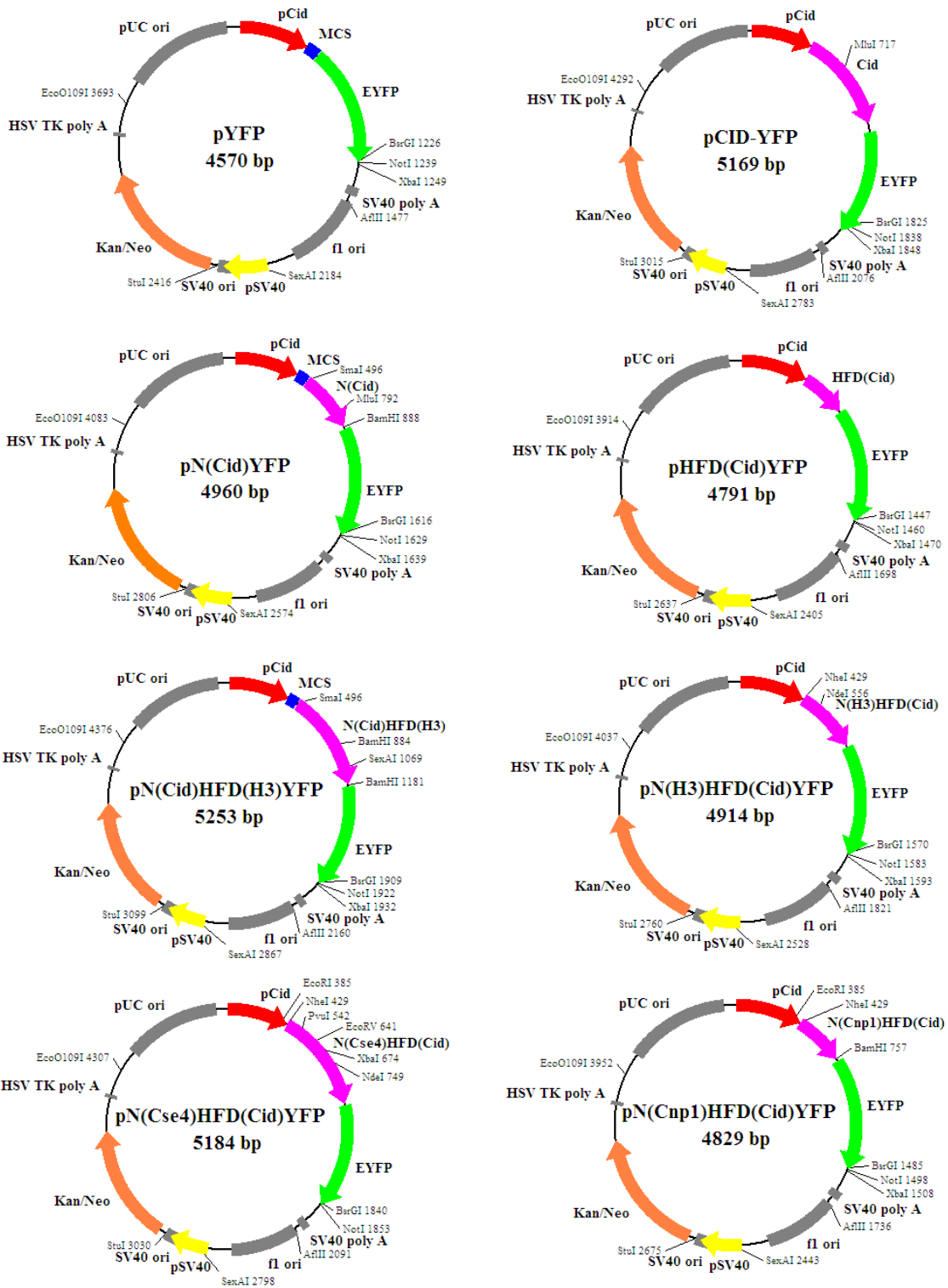
Zeitlin, S. G., R. D. Shelby and K. F. Sullivan (2001). *CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis*. **J Cell Biol** **155(7)**: 1147-57.

Zhang, X., X. Li, J. B. Marshall, C. X. Zhong and R. K. Dawe (2005). *Phosphoserines on maize CENTROMERIC HISTONE H3 and histone H3 demarcate the centromere and pericentromere during chromosome segregation*. **Plant Cell** **17(2)**: 572-83.

Zhang, Y., G. LeRoy, H. P. Seelig, W. S. Lane and D. Reinberg (1998). *The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities*. **Cell** **95(2)**: 279-89.

IX.- APÈNDIX

1.- MAPES DEL VECTORS YFP EMPRATS EN AQUESTS EXPERIMENTS



2.- SEQÜÈNCIES

En aquest apèndix s'inclouen les seqüències nucleotídiques dels diferents vectors emprats en aquest treball per expressar a cèl·lules Kc de *D. melanogaster* les proteïnes d'interès fusionades a YFP. A més, s'inclouen les seqüències aminoacídiques, indicant l'extrem N-terminal de la proteïna d'interès en negreta i cursiva, l'extrem C-terminal subratllat i la seqüència corresponent al YFP amb un doble subratllat.

Cid-YFP

407	caa ata ccg aaa att tga aaa GCT AGt atg cca cga cac agc aga	451
	<i><u>M P R H S R</u></i>	6
452	gcc aag cgc gca ccc agg ccg tcg gcg aac aac tca aag tcg ccg	496
7	<i><u>A K R A P R P S A N N S K S P</u></i>	21
497	aac gac gac gac acg gcc ttc cgc tcg ccg gag cca gaa gac ggc	541
22	<i><u>N D D D T A F R S P E P E D G</u></i>	36
542	acc gac tac ggc ctc gaa ttc acc acc agc caa ctg acg ctt cag	586
37	<i><u>T D Y G L E F T T S Q L T L Q</u></i>	51
587	gac aac aat cgg cgt tcc tcg acg ttg cgc agg gac gcc gga cgg	631
52	<i><u>D N N R R S S T L R R D A G R</u></i>	66
632	agg cag ccg gca gcg aga gac agc tcc acc agt ggc gag gag gag	676
67	<i><u>R Q P A A R D S S T S G E E E</u></i>	81
677	gac cag gag aat cgc tat ccc aca acc aga tcg ccg cag acg cgt	721
82	<i><u>D Q E N R Y P T T R S P Q T R</u></i>	96
722	cga atg acc gtg cag cag gaa agc aaa acg cga gca gca ggg cca	766
97	<i><u>R M T V Q Q E S K T R A A G P</u></i>	111
767	gtt gct gcg caa aac cag acc agg ccg cgc aaa gcg gcc aat ccc	811
112	<i><u>V A A Q N Q T R R R K A A N P</u></i>	126
812	atg agc aga gcc aag aga atg gat cgt gag atc ccg cga ctg cag	856
127	<i><u>M S R A K R M D R E I R R L Q</u></i>	141
857	cac cat ccc ggc aca ctg ata ccc aag ctg ccg ttc tcg cgt cta	901
142	<i><u>H H P G T L I P K L P F S R L</u></i>	156
902	gtg cgc gag ttc atc gtg aag tac agc gac gac gag ccg cta agg	946
157	<i><u>V R E F I V K Y S D D E P L R</u></i>	171
947	gtc acc gaa ggc gcc cta ttg gcc atg cag gag tcg tgc gag atg	991
172	<i><u>V T E G A L L A M Q E S C E M</u></i>	186
992	tac ttg acg cag cgg ctc gcc gac tcc tac atg cta acc aag cat	1036
187	<i><u>Y L T Q R L A D S Y M L T K H</u></i>	201
1037	cgc aat cgc gtc aca ctg gag gtg cgc gac atg gca ttg atg gcc	1081
202	<i><u>R N R V T L E V R D M A L M A</u></i>	216

1082	tac atc tgc gac cga	GAT CCA CCG GTC GCC ACC ATG GTG AGC AAG	1126
217	<u>Y I C D R</u>	<u>D P P V A T M V S K</u>	231
1127	GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG		1171
232	<u>G E E L F T G V V P I L V E L</u>		246
1172	GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC		1216
247	<u>D G D V N G H K F S V S G E G</u>		261
1217	GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC		1261
262	<u>E G D A T Y G K L T L K F I C</u>		276
1262	ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC		1306
277	<u>T T G K L P V P W P T L V T T</u>		291
1307	TTC GGC TAC GGC CTG CAG TGC TTC GCC CGC TAC CCC GAC CAC ATG		1351
292	<u>F G Y G L Q C F A R Y P D H M</u>		306
1352	AAG CAG CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCC ATG CCC GAA GGC TAC GTC		1396
307	<u>K Q H D F F K S A M P E G Y V</u>		321
1397	CAG GAG CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC AAG ACC		1441
322	<u>Q E R T I F F K D D G N Y K T</u>		336
1442	CGC GCC GAG GTG AAG TTC GAG GGC GAC ACC CTG GTG AAC CGC ATC		1486
337	<u>R A E V K F E G D T L V N R I</u>		351
1487	GAG CTG AAG GGC ATC GAC TTC AAG GAG GAC GGC AAC ATC CTG GGC		1531
352	<u>E L K G I D F K E D G N I L G</u>		366
1532	CAC AAG CTG GAG TAC AAC TAC AAC AGC CAC AAC GTC TAT ATC ATG		1576
367	<u>H K L E Y N Y N S H N V Y I M</u>		381
1577	GCC GAC AAG CAG AAG AAC GGC ATC AAG GTG AAC TTC AAG ATC CGC		1621
382	<u>A D K Q K N G I K V N F K I R</u>		396
1622	CAC AAC ATC GAG GAC GGC AGC GTG CAG CTC GCC GAC CAC TAC CAG		1666
397	<u>H N I E D G S V Q L A D H Y Q</u>		411
1667	CAG AAC ACC CCC ATC GGC GAC GGC CCC GTG CTG CTG CCC GAC AAC		1711
412	<u>Q N T P I G D G P V L L P D N</u>		426
1712	CAC TAC CTG AGC TAC CAG TCC GCC CTG AGC AAA GAC CCC AAC GAG		1756
427	<u>H Y L S Y Q S A L S K D P N E</u>		441
1757	AAG CGC GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC GTG ACC GCC GCC GGC		1801
442	<u>K R D H M V L L E F V T A A G</u>		456
1802	ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TAA AGC GGC CGC GAC		1846
457	<u>I T L G M D E L Y K</u>	*	

N_{Cid}-YFP

497	gga aat ttg aaa atg cca cga cac agc aga gcc aag cgc gca ccc	541
	M P R H S R A K R A P	11
542	agg ccg tcg gcg aac aac tca aag tcg ccg aac gac gac gac acg	586
12	R P S A N N S K S P N D D D T	26
587	gcc ttc cgc tcg ccg gag cca gaa gac ggc acc gac tac ggc ctc	631
27	A F R S P E P E D G T D Y G L	41
632	gaa ttc acc acc agc caa ctg acg ctt cag gac aac aat cgg cgt	676
42	E F T T S Q L T L Q D N N R R	56
677	tcc tcg acg ttg cgc agg gac gcc gga cgg agg cag ccg gca gcg	721
57	S S T L R R D A G R R Q P A A	71
722	aga gac agc tcc acc agt ggc gag gag gag gac cag gag aat cgc	766
72	R D S S T S G E E E D Q E N R	86
767	tat ccc aca acc aga tcg ccg cag acg cgt cga atg acc gtg cag	811
87	Y P T T R S P Q T R R M T V Q	101
812	cag gaa agc aaa acg cga gca gca ggg cca gtt gct gcg caa aac	856
102	Q E S K T R A A G P V A A Q N	116
857	cag acc agg cgg cgc aaa gcg gcc ggt acc cGG GAT CCA CCG GTC	901
117	Q T R R R K A A G T R D P P V	131
902	GCC ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG	946
132	<u>A T M V S K G E E L F T G V V</u>	146
947	CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC	991
147	<u>P I L V E L D G D V N G H K F</u>	161
992	AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG	1036
162	<u>S V S G E G E G D A T Y G K L</u>	176
1037	ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG	1081
177	<u>T L K F I C T T G K L P V P W</u>	191
1082	CCC ACC CTC GTG ACC ACC TTC GGC TAC GGC CTG CAG TGC TTC GCC	1126
192	<u>P T L V T T F G Y G L Q C F A</u>	206
1127	CGC TAC CCC GAC CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCC	1171
207	<u>R Y P D H M K Q H D F F K S A</u>	221
1172	ATG CCC GAA GGC TAC GTC CAG GAG CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC	1216
222	<u>M P E G Y V Q E R T I F F K D</u>	236
1217	GAC GGC AAC TAC AAG ACC CGC GCC GAG GTG AAG TTC GAG GGC GAC	1261
237	<u>D G N Y K T R A E V K F E G D</u>	251
1262	ACC CTG GTG AAC CGC ATC GAG CTG AAG GGC ATC GAC TTC AAG GAG	1306
252	<u>T L V N R I E L K G I D F K E</u>	266
1307	GAC GGC AAC ATC CTG GGG CAC AAG CTG GAG TAC AAC TAC AAC AGC	1351
267	<u>D G N I L G H K L E Y N Y N S</u>	281
1352	CAC AAC GTC TAT ATC ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC GGC ATC AAG	1396
282	<u>H N V Y I M A D K Q K N G I K</u>	296

1397	GTG AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC ATC GAG GAC GGC AGC GTG CAG	1441
297	<u>V N F K I R H N I E D G S V Q</u>	311
1442	CTC GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC GAC GGC CCC	1486
312	<u>L A D H Y Q Q N T P I G D G P</u>	326
1487	GTG CTG CTG CCC GAC AAC CAC TAC CTG AGC TAC CAG TCC GCC CTG	1531
327	<u>V L L P D N H Y L S Y Q S A L</u>	341
1532	AGC AAA GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG	1576
342	<u>S K D P N E K R D H M V L L E</u>	356
1577	TTC GTG ACC GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC	1621
357	<u>F V T A A G I T L G M D E L Y</u>	371
1622	AAG TAA AGC GGC CGC GAC TCT AGA TCA TAA TCA GCC ATA CCA CAT	1666
372	<u>K</u> *	

HFD_{Cid}-YFP

407	caa ata ccg aaa att tga aaa GCT AGt atg agc aga gcc aag aga	451
	<u>M S R A K R</u>	6
452	atg gat cgt gag atc cgg cga ctg cag cac cat ccc ggc aca ctg	496
7	<u>M D R E I R R L Q H H P G T L</u>	21
497	ata ccc aag ctg ccg ttc tcg cgt cta gtg cgc gag ttc atc gtg	541
22	<u>I P K L P F S R L V R E F I V</u>	36
542	aag tac agc gac gac gag ccg cta agg gtc acc gaa ggc gcc cta	586
37	<u>K Y S D D E P L R V T E G A L</u>	51
587	ttg gcc atg cag gag tcg tgc gag atg tac ttg acg cag cgg ctc	631
52	<u>L A M Q E S C E M Y L T Q R L</u>	66
632	gcc gac tcc tac atg cta acc aag cat cgc aat cgc gtc aca ctg	676
67	<u>A D S Y M L T K H R N R V T L</u>	81
677	gag gtg cgc gac atg gca ttg atg gcc tac atc tgc gac cga GAT	721
82	<u>E V R D M A L M A Y I C D R D</u>	96
722	CCA CCG GTC GCC ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC	766
97	<u>P P V A T M V S K G E E L F T</u>	111
767	GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC	811
112	<u>G V V P I L V E L D G D V N G</u>	126
812	CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC	856
127	<u>H K F S V S G E G E G D A T Y</u>	141
857	GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC	901
142	<u>G K L T L K F I C T T G K L P</u>	156
902	GTG CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC TTC GGC TAC GGC CTG CAG	946
157	<u>V P W P T L V T T F G Y G L Q</u>	171
947	TGC TTC GCC CGC TAC CCC GAC CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC TTC	991
172	<u>C F A R Y P D H M K Q H D F F</u>	186
992	AAG TCC GCC ATG CCC GAA GGC TAC GTC CAG GAG CGC ACC ATC TTC	1036
187	<u>K S A M P E G Y V Q E R T I F</u>	201
1037	TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC AAG ACC CGC GCC GAG GTG AAG TTC	1081
202	<u>F K D D G N Y K T R A E V K F</u>	216
1082	GAG GGC GAC ACC CTG GTG AAC CGC ATC GAG CTG AAG GGC ATC GAC	1126
217	<u>E G D T L V N R I E L K G I D</u>	231
1127	TTC AAG GAG GAC GGC AAC ATC CTG GGG CAC AAG CTG GAG TAC AAC	1171
232	<u>F K E D G N I L G H K L E Y N</u>	246
1172	TAC AAC AGC CAC AAC GTC TAT ATC ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC	1216
247	<u>Y N S H N V Y I M A D K Q K N</u>	261
1217	GGC ATC AAG GTG AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC ATC GAG GAC GGC	1261
262	<u>G I K V N F K I R H N I E D G</u>	276
1262	AGC GTG CAG CTC GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC	1306
277	<u>S V Q L A D H Y Q Q N T P I G</u>	291

1307	GAC GGC CCC GTG CTG CTG CCC GAC AAC CAC TAC CTG AGC TAC CAG	1351
292	<u>D G P V L L P D N H Y L S Y Q</u>	306
1352	TCC GCC CTG AGC AAA GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG GTC	1396
307	<u>S A L S K D P N E K R D H M V</u>	321
1397	CTG CTG GAG TTC GTG ACC GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC	1441
322	<u>L L E F V T A A G I T L G M D</u>	336
1442	GAG CTG TAC AAG TAA AGC GGC CGC GAC TCT AGA TCA TAA TCA GCC	1486
337	<u>E L Y K</u> *	

N_{Cid}HFD_{H3}-YFP

497	gga aat ttg aaa atg cca cga cac agc aga gcc aag cgc gca ccc	541
	M P R H S R A K R A P	11
542	agg ccg tcg gcg aac aac tca aag tcg ccg aac gac gac gac acg	586
12	R P S A N N S K S P N D D D T	26
587	gcc ttc cgc tcg ccg gag cca gaa gac ggc acc gac tac ggc ctc	631
27	A F R S P E P E D G T D Y G L	41
632	gaa ttc acc acc agc caa ctg acg ctt cag gac aac aat cgg cgt	676
42	E F T T S Q L T L Q D N N R R	56
677	tcc tcg acg ttg cgc agg gac gcc gga cgg agg cag ccg gca gcg	721
57	S S T L R R D A G R R Q P A A	71
722	aga gac agc tcc acc agt ggc gag gag gag gac cag gag aat cgc	766
72	R D S S T S G E E E D Q E N R	86
767	tat ccc aca acc aga tcg ccg cag acg cgt cga atg acc gtg cag	811
87	Y P T T R S P Q T R R M T V Q	101
812	cag gaa agc aaa acg cga gca gca ggg cca gtt gct gcg caa aac	856
102	Q E S K T R A A G P V A A Q N	116
857	cag acc agg cgg cgc aaa gcg gcc ggg gat cct cgc tat cgc cct	901
117	Q T R R R K A A G D P R Y R P	131
902	gga acc gtg gcc ttg cgt gaa att cgt cgc tac caa aag agc acc	946
132	<u>G T V A L R E I R R Y Q K S T</u>	146
947	gag ctt cta atc cgc aag ctg cct ttc cag cgt ctg gtg cgt gaa	991
147	<u>E L L I R K L P F Q R L V R E</u>	161
992	atc gct cag gac ttt aag acg gac ttg cga ttc cag agc tcg gcg	1036
162	<u>I A Q D F K T D L R F Q S S A</u>	176
1037	gtt atg gct ctg cag gaa gct agc gaa gcc tac ctg gtt ggt ctc	1081
177	<u>V M A L Q E A S E A Y L V G L</u>	191
1082	ttc gaa gat acc aac ttg tgt gcc att cat gcc aag cgt gtc acc	1126
192	<u>F E D T N L C A I H A K R V T</u>	206
1127	ata atg ccc aaa gac atc cag tta gcg cga cgc att cgc ggc gag	1171
207	<u>I M P K D I Q L A R R I R G E</u>	221
1172	cgt gct ttg GAT CCA CCG GTC GCC ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG	1216
222	<u>R A L D P P V A T M V S K G E</u>	236
1217	GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC	1261
237	<u>E L F T G V V P I L V E L D G</u>	251
1262	GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC	1306
252	<u>D V N G H K F S V S G E G E G</u>	266
1307	GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC	1351
267	<u>D A T Y G K L T L K F I C T T</u>	281
1352	GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC TTC GGC	1396
282	<u>G K L P V P W P T L V T T F G</u>	296

1397	TAC GGC CTG CAG TGC TTC GCC CGC TAC CCC GAC CAC ATG AAG CAG	1441
297	<u>Y G L Q C F A R Y P D H M K Q</u>	311
1442	CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCC ATG CCC GAA GGC TAC GTC CAG GAG	1486
312	<u>H D F F K S A M P E G Y V Q E</u>	326
1487	CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC GGC AAC TAC AAG ACC CGC GCC	1531
327	<u>R T I F F K D D G N Y K T R A</u>	341
1532	GAG GTG AAG TTC GAG GGC GAC ACC CTG GTG AAC CGC ATC GAG CTG	1576
342	<u>E V K F E G D T L V N R I E L</u>	356
1577	AAG GGC ATC GAC TTC AAG GAG GAC GGC AAC ATC CTG GGG CAC AAG	1621
357	<u>K G I D F K E D G N I L G H K</u>	371
1622	CTG GAG TAC AAC TAC AAC AGC CAC AAC GTC TAT ATC ATG GCC GAC	1666
372	<u>L E Y N Y N S H N V Y I M A D</u>	386
1667	AAG CAG AAG AAC GGC ATC AAG GTG AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC	1711
387	<u>K Q K N G I K V N F K I R H N</u>	401
1712	ATC GAG GAC GGC AGC GTG CAG CTC GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC	1756
402	<u>I E D G S V Q L A D H Y Q Q N</u>	416
1757	ACC CCC ATC GGC GAC GGC CCC GTG CTG CTG CCC GAC AAC CAC TAC	1801
417	<u>T P I G D G P V L L P D N H Y</u>	431
1802	CTG AGC TAC CAG TCC GCC CTG AGC AAA GAC CCC AAC GAG AAG CGC	1846
432	<u>L S Y Q S A L S K D P N E K R</u>	446
1847	GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC GTG ACC GCC GCC GGG ATC ACT	1891
447	<u>D H M V L L E F V T A A G I T</u>	461
1892	CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TAA AGC GGC CGC GAC TCT AGA	1936
462	<u>L G M D E L Y K</u> *	

N_{H3}HFD_{Cid}-YFP

407	caa ata ccg aaa att tga aaa Gct agc atg gct cgt acc aag caa	451
	<u>M A R T K Q</u>	6
452	act gct cgc aaa tcg act ggt gga aag gcg cca cgc aaa caa ctg	496
7	<u>T A R K S T G G K A P R K Q L</u>	21
497	gct act aag gcc gct cgc aag agt gct cca gcc acc gga ggt gtg	541
22	<u>A T K A A R K S A P A T G G V</u>	36
542	aag aag ccc cac cat atg agc aga gcc aag aga atg gat cgt gag	586
37	<u>K K P H H M S R A K R M D R E</u>	51
587	atc cgg cga ctg cag cac cat ccc ggc aca ctg ata ccc aag ctg	631
52	<u>I R R L Q H H P G T L I P K L</u>	66
632	ccg ttc tcg cgt cta gtg cgc gag ttc atc gtg aag tac agc gac	676
67	<u>P F S R L V R E F I V K Y S D</u>	81
677	gac gag ccg cta agg gtc acc gaa ggc gcc cta ttg gcc atg cag	721
82	<u>D E P L R V T E G A L L A M Q</u>	96
722	gag tcg tgc gag atg tac ttg acg cag cgg ctc gcc gac tcc tac	766
97	<u>E S C E M Y L T Q R L A D S Y</u>	111
767	atg cta acc aag cat cgc aat cgc gtc aca ctg gag gtg cgc gac	811
112	<u>M L T K H R N R V T L E V R D</u>	126
812	atg gca ttg atg gcc tac atc tgc gac cga GAT CCA CCG GTC GCC	856
127	<u>M A L M A Y I C D R D P P V A</u>	141
857	ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC	901
142	<u>T M V S K G E E L F T G V V P</u>	156
902	ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC	946
157	<u>I L V E L D G D V N G H K F S</u>	171
947	GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC	991
172	<u>V S G E G E G D A T Y G K L T</u>	186
992	CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG CCC	1036
187	<u>L K F I C T T G K L P V P W P</u>	201
1037	ACC CTC GTG ACC ACC TTC GGC TAC GGC CTG CAG TGC TTC GCC CGC	1081
202	<u>T L V T T F G Y G L Q C F A R</u>	216
1082	TAC CCC GAC CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCC ATG	1126
217	<u>Y P D H M K Q H D F F K S A M</u>	231
1127	CCC GAA GGC TAC GTC CAG GAG CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC	1171
232	<u>P E G Y V Q E R T I F F K D D</u>	246
1172	GGC AAC TAC AAG ACC CGC GCC GAG GTG AAG TTC GAG GGC GAC ACC	1216
247	<u>G N Y K T R A E V K F E G D T</u>	261
1217	CTG GTG AAC CGC ATC GAG CTG AAG GGC ATC GAC TTC AAG GAG GAC	1261
262	<u>L V N R I E L K G I D F K E D</u>	276
1262	GGC AAC ATC CTG GGG CAC AAG CTG GAG TAC AAC TAC AAC AGC CAC	1306
277	<u>G N I L G H K L E Y N Y N S H</u>	291

1307	AAC GTC TAT ATC ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC GGC ATC AAG GTG	1351
292	<u>N V Y I M A D K Q K N G I K V</u>	306
1352	AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC ATC GAG GAC GGC AGC GTG CAG CTC	1396
307	<u>N F K I R H N I E D G S V Q L</u>	321
1397	GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC GAC GGC CCC GTG	1441
322	<u>A D H Y Q O N T P I G D G P V</u>	336
1442	CTG CTG CCC GAC AAC CAC TAC CTG AGC TAC CAG TCC GCC CTG AGC	1486
337	<u>L L P D N H Y L S Y Q S A L S</u>	351
1487	AAA GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC	1531
352	<u>K D P N E K R D H M V L L E F</u>	366
1532	GTG ACC GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG	1576
367	<u>V T A A G I T L G M D E L Y K</u>	381
1577	TAA AGC GGC CGC GAC TCT AGA TCA TAA TCA GCC ATA CCA CAT TTG	1621
382	*	

N_{Cnp1}HFD_{Cid}-YFP

407	caa ata ccg aaa att tga aaa Gct agc atg gca aag aaa tct tta	451
	M A K K S L	6
452	atg gct gag cct gga gat cct atg agc aga gcc aag aga atg gat	496
7	M A E P G D P M S R A K R M D	21
497	cgt gag atc cgg cga ctg cag cac cat ccc ggc aca ctg ata ccc	541
22	R E I R R L Q H H P G T L I P	36
542	aag ctg ccg ttc tcg cgt cta gtg cgc gag ttc atc gtg aag tac	586
37	K L P F S R L V R E F I V K Y	51
587	agc gac gac gag ccg cta agg gtc acc gaa ggc gcc cta ttg gcc	631
52	S D D E P L R V T E G A L L A	66
632	atg cag gag tcg tgc gag atg tac ttg acg cag cgg ctc gcc gac	676
67	M Q E S C E M Y L T Q R L A D	81
677	tcc tac atg cta acc aag cat cgc aat cgc gtc aca ctg gag gtg	721
82	S Y M L T K H R N R V T L E V	96
722	cgc gac atg gca ttg atg gcc tac atc tgc gac cga GAT CCA CCG	766
97	R D M A L M A Y I C D R D P P	111
767	GTC GCC ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG	811
112	V A T M V S K G E E L F T G V	126
812	GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG	856
127	V P I L V E L D G D V N G H K	141
857	TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG	901
142	F S V S G E G E G D A T Y G K	156
902	CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC	946
157	L T L K F I C T T G K L P V P	171
947	TGG CCC ACC CTC GTG ACC ACC TTC GGC TAC GGC CTG CAG TGC TTC	991
172	W P T L V T T F G Y G L Q C F	186
992	GCC CGC TAC CCC GAC CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC TTC AAG TCC	1036
187	A R Y P D H M K Q H D F F K S	201
1037	GCC ATG CCC GAA GGC TAC GTC CAG GAG CGC ACC ATC TTC TTC AAG	1081
202	A M P E G Y V Q E R T I F F K	216
1082	GAC GAC GGC AAC TAC AAG ACC CGC GCC GAG GTG AAG TTC GAG GGC	1126
217	D D G N Y K T R A E V K F E G	231
1127	GAC ACC CTG GTG AAC CGC ATC GAG CTG AAG GGC ATC GAC TTC AAG	1171
232	D T L V N R I E L K G I D F K	246
1172	GAG GAC GGC AAC ATC CTG GGG CAC AAG CTG GAG TAC AAC TAC AAC	1216
247	E D G N I L G H K L E Y N Y N	261
1217	AGC CAC AAC GTC TAT ATC ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC GGC ATC	1261
262	S H N V Y I M A D K Q K N G I	276
1262	AAG GTG AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC ATC GAG GAC GGC AGC GTG	1306
277	K V N F K I R H N I E D G S V	291

1307	CAG CTC GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC GAC GGC	1351
292	<u>Q L A D H Y Q Q N T P I G D G</u>	306
1352	CCC GTG CTG CTG CCC GAC AAC CAC TAC CTG AGC TAC CAG TCC GCC	1396
307	<u>P V L L P D N H Y L S Y Q S A</u>	321
1397	CTG AGC AAA GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG GTC CTG CTG	1441
322	<u>L S K D P N E K R D H M V L L</u>	336
1442	GAG TTC GTG ACC GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG	1486
337	<u>E F V T A A G I T L G M D E L</u>	351
1487	TAC AAG TAA AGC GGC CGC GAC TCT AGA TCA TAA TCA GCC ATA CCA	1531
352	<u>Y K</u> *	

N_{Cse4}HFD_{Cid}-YFP

407	caa ata ccg aaa att tga aaa Gct agc atg tca agt aaa caa caa	451
	<u>M S S K Q Q</u>	6
452	tgg gtt agt tct gct att caa agt gat tcg agt gga aga tca ctc	496
7	<u>W V S S A I Q S D S S G R S L</u>	21
497	agt aac gtc aac agg ctt gca gga gac caa caa tct att aac gat	541
22	<u>S N V N R L A G D Q Q S I N D</u>	36
542	cgt gcg tta tcg tta ttg cag aga aca aga gcg aca aag aac ctg	586
37	<u>R A L S L L Q R T R A T K N L</u>	51
587	ttt cca aga aga gag gaa aga aga cgt tat gaa agc tca aaa agt	631
52	<u>F P R R E E R R R Y E S S K S</u>	66
632	gac cta gat atc gaa aca gac tac gaa gac caa gca ggt aat cta	676
67	<u>D L D I E T D Y E D Q A G N L</u>	81
677	gaa atc gag aca gaa aat gaa gaa gaa gct gaa atg gaa act gaa	721
82	<u>E I E T E N E E E A E M E T E</u>	96
722	gta cct gca cca gtg cga act cat tca tat gcc tta gac aga tat	766
97	<u>V P A P V R T H S Y A L D R Y</u>	111
767	gtt aga cag aaa agg agg gaa aaa caa aga aag cag agc tta aag	811
112	<u>V R Q K R R E K Q R K Q S L K</u>	126
812	cgc gtc gaa aag att atg agc aga gcc aag aga atg gat cgt gag	856
127	<u>R V E K I M S R A K R M D R E</u>	141
857	atc cgg cga ctg cag cac cat ccc ggc aca ctg ata ccc aag ctg	901
142	<u>I R R L Q H H P G T L I P K L</u>	156
902	ccg ttc tcg cgt cta gtg cgc gag ttc atc gtg aag tac agc gac	946
157	<u>P F S R L V R E F I V K Y S D</u>	171
947	gac gag ccg cta agg gtc acc gaa ggc gcc cta ttg gcc atg cag	991
172	<u>D E P L R V T E G A L L A M Q</u>	186
992	gag tcg tgc gag atg tac ttg acg cag cgg ctc gcc gac tcc tac	1036
187	<u>E S C E M Y L T Q R L A D S Y</u>	201
1037	atg cta acc aag cat cgc aat cgc gtc aca ctg gag gtg cgc gac	1081
202	<u>M L T K H R N R V T L E V R D</u>	216
1082	atg gca ttg atg gcc tac atc tgc gac cga GAT CCA CCG GTC GCC	1126
217	<u>M A L M A Y I C D R D P P V A</u>	231
1127	ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC	1171
232	<u>T M V S K G E E L F T G V V P</u>	246
1172	ATC CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC	1216
247	<u>I L V E L D G D V N G H K F S</u>	261
1217	GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC TAC GGC AAG CTG ACC	1261
262	<u>V S G E G E G D A T Y G K L T</u>	276
1262	CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG CCC	1306
277	<u>L K F I C T T G K L P V P W P</u>	291

1307	ACC CTC GTG ACC ACC TTC GGC TAC GGC CTG CAG TGC TTC GCC CGC	1351
292	<u>T L V T T F G Y G L Q C F A R</u>	306
1352	TAC CCC GAC CAC ATG AAG CAG CAC GAC TTC TTC AAG TCC GCC ATG	1396
307	<u>Y P D H M K Q H D F F K S A M</u>	321
1397	CCC GAA GGC TAC GTC CAG GAG CGC ACC ATC TTC TTC AAG GAC GAC	1441
322	<u>P E G Y V Q E R T I F F K D D</u>	336
1442	GGC AAC TAC AAG ACC CGC GCC GAG GTG AAG TTC GAG GGC GAC ACC	1486
337	<u>G N Y K T R A E V K F E G D T</u>	351
1487	CTG GTG AAC CGC ATC GAG CTG AAG GGC ATC GAC TTC AAG GAG GAC	1531
352	<u>L V N R I E L K G I D F K E D</u>	366
1532	GGC AAC ATC CTG GGG CAC AAG CTG GAG TAC AAC TAC AAC AGC CAC	1576
367	<u>G N I L G H K L E Y N Y N S H</u>	381
1577	AAC GTC TAT ATC ATG GCC GAC AAG CAG AAG AAC GGC ATC AAG GTG	1621
382	<u>N V Y I M A D K Q K N G I K V</u>	396
1622	AAC TTC AAG ATC CGC CAC AAC ATC GAG GAC GGC AGC GTG CAG CTC	1666
397	<u>N F K I R H N I E D G S V Q L</u>	411
1667	GCC GAC CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GGC GAC GGC CCC GTG	1711
412	<u>A D H Y Q Q N T P I G D G P V</u>	426
1712	CTG CTG CCC GAC AAC CAC TAC CTG AGC TAC CAG TCC GCC CTG AGC	1756
427	<u>L L P D N H Y L S Y Q S A L S</u>	441
1757	AAA GAC CCC AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG GTC CTG CTG GAG TTC	1801
442	<u>K D P N E K R D H M V L L E F</u>	456
1802	GTG ACC GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG	1846
457	<u>V T A A G I T L G M D E L Y K</u>	471
1847	TAA AGC GGC CGC GAC TCT AGA TCA TAA TCA GCC ATA CCA CAT TTG	1891
472	*	