

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

EL COMPLEJO HISTONA ACETILTRANSFERASA B DE LA
LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE

ANA MARÍA POVEDA GABALDÓN

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 25 de Octubre de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Luis Franco Vera
- D. Adelaida García Gimeno
- D^a. M^a Ángeles Martínez Balbás
- D^a. Amparo Pascual-Ahuir Giner
- D. Esteban Ballester Tarín

Va ser dirigida per:
D. Ramón Sendra Pérez

©Copyright: Servei de Publicacions
Ana María Poveda Gabaldón

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6373-6

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

El complejo histona acetiltransferasa B de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Ana María Poveda Gabaldón

Valencia, Julio de 2005

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en
Bioquímica por la Universitat de València



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



RAMÓN SENDRA PEREZ, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València,

CERTIFICA: que la presente tesis doctoral titulada “El complejo histona acetiltransferasa B de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*” ha sido realizada bajo su dirección por la licenciada en Bioquímica ANA MARÍA POVEDA GABALDÓN.

Fdo. Ramón Sendra Perez



A mis padres

Agradecimientos...hay tantos que resulta difícil empezar...

En primer lugar quiero dar las gracias a Ramón, mi director de tesis. Un jefe que se ha implicado en este trabajo día tras día, y que además me ha enseñado casi todo lo que sé sobre ciencia, desde como realizar experimentos, hasta la discusión de resultados. Con él he aprendido a disfrutar la ciencia...ha sido un verdadero placer trabajar con él.

También a todos los miembros del laboratorio de Acetilación, a Merche, Titín y Ana por sus consejos y su ayuda, tanto a nivel científico como personal, y a Lorena, mi compañera de siempre con la que tantas cosas he compartido y a la que le deseo lo mejor. Juntas nos embarcamos en esta historia...¡ya llegamos Lore! Ah!, y también quiero nombrar a Alex, siempre dispuesto a resolver mis dudas informáticas.

Los compañeros del laboratorio de arriba han sido muy especiales para mí durante toda mi tesis, M^a Angels, Inma, Elenita, Paco, Bárbara y Josep, y también Ethel que ahora está de postdoc. Ella y Susana han sido muy importantes, sobre todo durante mis inicios en este Departamento. A Emilia también le debo mucho. Y de la nueva generación, Elena y Lorena, dos chicas estupendas con las que he pasado ratos muy divertidos. Toda esta gente me ha ayudado mucho durante estos años, pero lo que más agradezco es su amistad. Y por último quiero mencionar a Geno y Anita, dos personas muy especiales...

Con Aurora, Anaj y Ana Saurí he compartido sentimientos y confianzas de final de tesis...¡las reuniones de pasillo de esa temporada fueron realmente divertidas!. Venga Ani...¡¡la siguiente eres tú!! ¡Lo hemos conseguido, chicas!

A Ignaci Lucas y Sergio Mars del Departamento de Genética, que hicieron los alineamientos de secuencias.

En general quiero dar las gracias a toda la gente que en algún momento, de una forma u otra, me ha ayudado: los compañeros del Departamento (los que están y los que ya no están), profesores, secretarios, técnicos y también a Paqui y Amparo, las señoras de la limpieza. Gente muy maja.

Al final, haciendo balance de estos años y a pesar de los malos momentos (que siempre los hay) me llevo un grato recuerdo de mi paso por el Departamento que nunca olvidaré, tanto por todo lo que he aprendido a nivel científico, como a nivel personal.

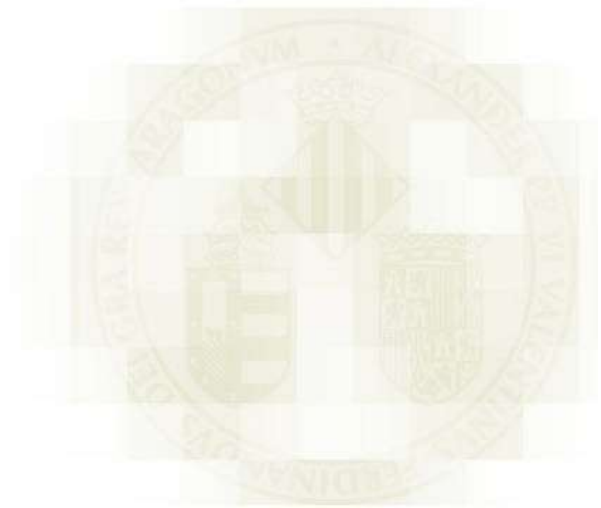
Y también a las personas más cercanas a mí, mis amig@s y mi familia. En especial, a mis hermanos, Quique (cuya ayuda con el ordenador es inestimable) y Marta (la autora del dibujo de la portada), y a Mau, mi cuñado. Pase lo que pase siempre están ahí. Y muy especialmente a mis padres a los que quiero con locura. Ellos nos lo han dado todo...¡unos papis geniales!. Y por supuesto a mi Xisco, por...por todo.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	15
INTRODUCCIÓN.....	17
La cromatina.....	19
Regulación de la actividad de la cromatina.....	22
Modificaciones postraduccionales de las histonas.....	23
Metilación.....	25
Fosforilación.....	29
Ubiquitinación y sumoilación.....	30
Acetilación.....	31
Histona acetiltransferasas.....	32
Histona Desacetilasas.....	35
Nomenclatura de modificaciones de histonas.....	38
Leyendo el código de histonas.....	40
Otros participantes en la regulación de la actividad de la cromatina.....	42
Metilación del DNA.....	42
Complejos remodeladores de la cromatina.....	44
Variantes de histonas.....	46
Dinámica de la cromatina y epigenética.....	49
Destino de las histonas.....	51
Complejos histona acetiltransferasa de levadura.....	65
El complejo HAT-B (Hat1p/Hat2p).....	69
Objetivos de la tesis.....	73
MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
Materiales.....	77
Cepas de microorganismos.....	77
Plásmidos.....	80
Anticuerpos.....	82
Productos de especial interés.....	83
Medios de cultivo.....	84
Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	84
Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	85
Manipulaciones genéticas.....	86
Deleciones de genes, etiquetado de proteínas y sustitución de promotores..	86
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	87
Transformaciones de levadura.....	87
Técnicas de biología celular.....	88
Sincronización de levadura.....	88
Obtención de diploides y disección de tétradas.....	91
Esperanza de vida.....	92
Inmunofluorescencia indirecta.....	93

Técnicas bioquímicas.....	94
Obtención de extractos con actividad enzimática HAT.....	94
Fraccionamiento de proteínas por cromatografía.....	96
Ensayo de actividad HAT.....	97
Autorradiografías de geles.....	97
Inmunoprecipitación.....	98
Preparación de extractos proteicos totales para análisis por <i>Western blotting</i>	99
Fraccionamiento celular para análisis por <i>Western blotting</i> e inmunoprecipitación.....	99
Aislamiento de histonas de levadura.....	100
Métodos analíticos.....	101
Electroforesis de DNA.....	101
Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	101
Análisis <i>Western blotting</i>	102
<i>Stripping</i> o lavado de membranas.....	104
RESULTADOS.....	105
Complejos histona acetiltransferasa en <i>S. cerevisiae</i>	107
Hif1p es un componente integral del complejo HAT-B de levadura.....	111
Hat2p media la interacción entre las proteínas Hat1 e Hif1.....	116
Localización subcelular del complejo HAT-B.....	120
Caracterización fenotípica de mutantes del complejo B.....	124
Efecto de la delección de HIF1 sobre el silenciamiento telomérico.....	129
Estudio de la acetilación <i>in vivo</i> de la lisina 12 de la histona H4.....	131
Efecto de la delección de HAT1, HAT2 e HIF1 sobre el nivel de H4K12ac.....	134
Niveles de proteína Hat1 y de H4K12ac durante el ciclo celular.....	139
Niveles de H4K12ac en células detenidas en distintos estados del ciclo celular.....	143
Niveles de H4K12ac en células tratadas con agentes que dañan el DNA.....	149
Efecto de la dosis y tiempo de incubación de la hidrox urea sobre el nivel de H4K12ac.....	150
Análisis del contenido de la proteína Hat1 en presencia de hidrox urea.....	152
Efecto de la hidrox urea sobre los niveles de H4K12ac en histonas purificadas.....	155
Acetilación de la lisina 12 de la histona H4 no cromatínica.....	156
Niveles de H4K12ac soluble a lo largo del ciclo celular.....	160
Estudio de la participación de la proteína Hif1 en la actividad HAT del complejo B.....	164
Niveles de H4K12ac soluble cuya degradación está regulada por Rad53p.....	168
Análisis de la interacción de la histona H4 con el complejo HAT-B.....	171
DISCUSIÓN.....	177
Identificación de Hif1 como una nueva proteína del complejo HAT-B de	

<i>S. cerevisiae</i>	179
El complejo HAT-B es mayoritariamente nuclear.....	184
Papel de la proteína Hat2 en el complejo HAT-B.....	188
Especificidad <i>in vivo</i> del complejo HAT-B.....	188
La histona H4 soluble se asocia al complejo HAT-B.....	194
Función del complejo HAT-B.....	197
CONCLUSIONES.....	205
BIBLIOGRAFÍA.....	209



Abreviaturas

3,4-DCI	3,4-dicloroisocoumarina
BSA	Seroalbúmina bovina
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DIC	<i>Differential Interference Contrast</i> (Contraste por interferencia diferencial)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMT	DNA metiltransferasa
E64	<i>trans</i> -epoxysuccinil-L-leucil-amido-(4-guanidino) butano
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> (Clasificación de células por fluorescencia)
FOA	Ácido 5-fluoroorótico
HA	Hemaglutinina
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histona desacetilasa
HK	Histona quinasa
HMT	Histona metiltransferasa
HU	Hidroxiurea
IAA	Iodoacetamida
LB	Medio Luria-Bertani
MMS	Metil metano sulfonato
NLS	<i>Nuclear localization sequence</i> (Secuencia de localización nuclear)
NP40	Nonidet P40
ORF	<i>Open reading frame</i> (Pauta abierta de lectura)
p/v	Peso/volumen
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRMT	Proteína arginina metiltransferasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
TSA	Tricostatina A
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

v/v Volumen/volumen

WCE *Whole cell extract* (Extracto celular total)

TAP *Tandem affinity purification* (Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad en *tandem*)

TEMED N, N, N', N', tetrametiletileno-diamino

INTRODUCCIÓN

La cromatina

El DNA es la molécula biológica que contiene la información genética de los organismos, y en las células eucariotas se aloja en el núcleo. Dadas las dimensiones del DNA, que es una molécula muy larga, es necesario plegarlo previamente para almacenarlo en el espacio limitado del núcleo. Para ello las moléculas de DNA se asocian con diferentes proteínas compactándose en una estructura organizada y jerárquica denominada cromatina [1,2]. Esta es una estructura inherentemente represiva que dificulta los procesos en los que se requiere acceder a la secuencia de DNA. Las proteínas mayoritarias de la cromatina son las histonas, unas proteínas de baja masa molecular, ricas en aminoácidos básicos (Figura 1). Las histonas están muy conservadas en todos los organismos eucariotas [3], lo que sugiere que la estructura fundamental de la cromatina debió aparecer en un antecesor común, posiblemente con el objetivo de resolver el problema del empaquetamiento del DNA dentro del núcleo [4]. La cromatina no es una estructura estática y cerrada en la que histonas y otras proteínas se asocian al DNA con una función únicamente estructural, sino que estas proteínas son sometidas a diversos tipos de modificaciones y alteraciones, lo que se traduce en una relajación de la estructura de la cromatina. Así pues, la cromatina es una estructura dinámica que puede adoptar diferentes estados de compactación regulando así el acceso a la información contenida en el DNA, y permitiendo la ejecución de procesos celulares pre-programados como son el ciclo celular, la diferenciación celular o la adecuación de la respuesta transcripcional para la adaptación a situaciones ambientales cambiantes. Procesos fisiológicos como la replicación, la transcripción o la reparación del DNA, también precisan que se pueda regular el grado de compactación de la cromatina.

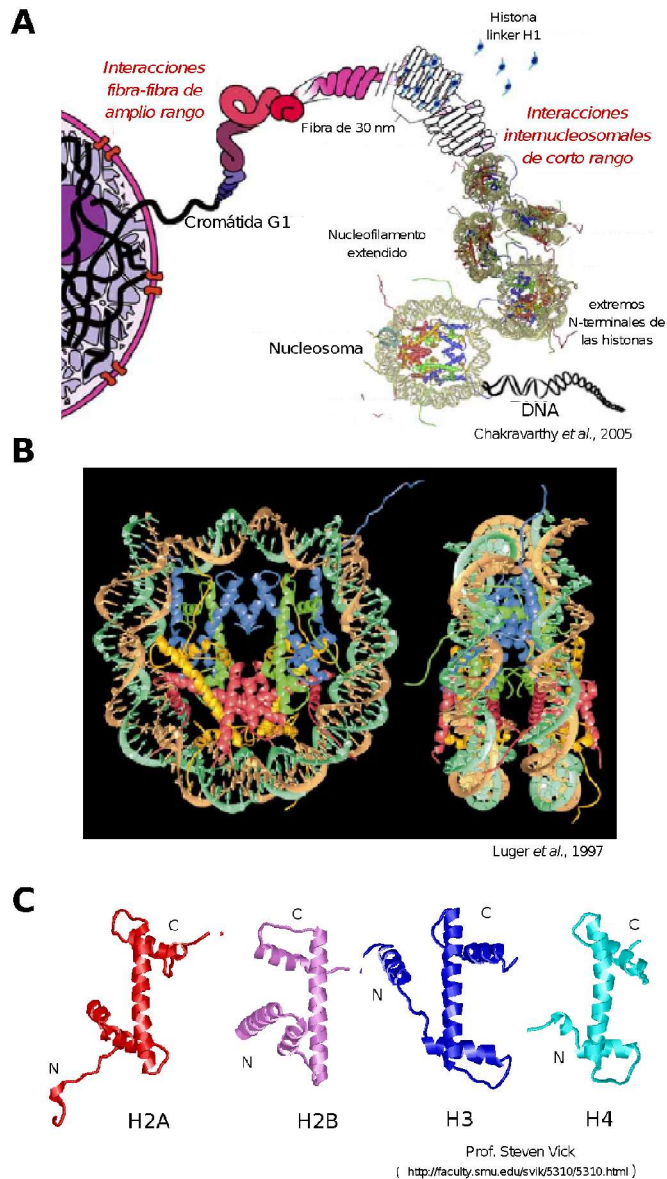


Figura 1. A. Niveles de compactación del DNA eucariótico. El nucleofilamento (en los niveles más bajos de compactación se muestran estructuras atómicas, reemplazados posteriormente con representaciones esquemáticas) se compacta en una fibra de 30 nm de arquitectura poco conocida, la cual a su vez sufre mayor compactación en estructuras de orden superior, que son poco o nada conocidas. **B.** Nucleosoma. 147pb de DNA (marrón y verde turquesa) rodean al octámero de histonas (H3 en azul; H4 en verde; H2A en amarillo y H2B en rojo). **C.** Estructura *histone fold* de las cuatro histonas nucleosomales; H2A, H2B, H3 y H4.

La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma (Figura 1B), que consiste en 147 pb de DNA (aproximadamente 1.75 giros superhelicoidales), ensamblados alrededor de un octámero de histonas, denominadas histonas internas, formado por dos dímeros de histonas (H2A-H2B) y un tetrámero (H3-H4)₂ [5]. Nucleosomas consecutivos quedan unidos entre si por el DNA espaciador, de longitud variable en función de la especie, constituyendo el nucleofilamento. A su vez el nucleofilamento se vuelve a plegar en estructuras de orden superior que van desde la fibra de 30 nm o solenoide durante la interfase, hasta la formación de cromosomas altamente compactados durante la mitosis (Figura 1A). La arquitectura de estas estructuras de orden superior no se conocen con detalle [1,2].

Las histonas internas son proteínas muy conservadas, pequeñas y ricas en lisinas y argininas, lo que les confiere un carácter fuertemente básico. Las masas moleculares de las histonas de *S. cerevisiae* son: H2A 14.28 kDa; H2B 14.24 kDa; H3 15.37 kDa y H4 11.37 kDa. Desde el punto de vista estructural las histonas tienen dos dominios: el dominio globular de la región C-terminal y un dominio no estructurado de la región N-terminal. El dominio globular contiene el motivo *histone fold*, formado por unos 65 aminoácidos que se estructuran en una hélice α corta seguida de un giro/hoja β , una hélice α larga, otro giro/hoja β , y por último otra hélice α corta (Figura 1C). Las tres hélices del dominio *histone fold* de una histona encajan con las tres hélices del dominio *histone fold* de otra histona. Este dominio participa en interacciones histona-histona y también en interacciones histona-DNA en el nucleosoma. Los extremos N-terminales también participan en la interacción con nucleosomas adyacentes [6]. Algunos de los residuos de las histonas son susceptibles de sufrir modificaciones postraduccionales, tales como acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación. Aunque generalmente se ha

aceptado que estas modificaciones afectan principalmente a residuos localizados en los dominios N-terminales, recientemente se han identificado residuos de los dominios C-terminales que también sufren modificaciones postraduccionales [7]. Todas estas modificaciones participan en la regulación de la actividad de la cromatina.

Además de las histonas internas, la cromatina también contiene la histona H1, que se dispone en el exterior de los nucleosomas. Existen diferentes variantes de la histona H1 que constituyen una compleja familia de proteínas y que pueden ser específicas de tejido o de momento del desarrollo [8]. Las variantes de H1 son parcialmente redundantes entre si y pueden regular la actividad de la cromatina estabilizando la fibra de 30 nm y la posición de los nucleosomas, o alterando la accesibilidad de factores reguladores [9]. Además de todos estos participantes, también interviene una amplia variedad de proteínas no histona, poliaminas e iones metálicos divalentes en el establecimiento y regulación de la estructura de la cromatina.

Regulación de la actividad de la cromatina

Como se ha descrito anteriormente, la cromatina esta formada por la asociación de proteínas al DNA, lo que da lugar a una estructura de naturaleza represiva que inhibe procesos como la transcripción, la reparación y la replicación del DNA. Sin embargo la cromatina no es una estructura estática, sino variable y dinámica, que participa en la regulación de todos estos procesos. Existen diferentes tipos de complejos proteicos que modulan la estructura de la cromatina: complejos que modifican histonas químicamente, complejos que remodelan cromatina mediante el empleo de

la energía del ATP, y complejos que modifican el DNA. Además la constitución de nucleosomas con variantes de histonas, diferentes de las histonas canónicas, confiere diferentes propiedades estructurales a la cromatina.

Modificaciones postraduccionales de las histonas

Las primeras modificaciones postraduccionales identificadas sobre las histonas se localizaron en residuos de los extremos N-terminales. Se ha asignado, por ello, una especial atención a estas regiones, relacionándolas con la regulación de la actividad de la cromatina. Sin embargo, recientemente se han identificado diversas modificaciones postraduccionales sobre residuos localizados en la región globular de las histonas [7,10]. Este hallazgo significa que, a diferencia de lo que se pensaba, residuos localizados en las regiones globulares de las histonas también deben jugar un papel importante en la regulación de la actividad de la cromatina. Se conoce una gran variedad de enzimas que modifican residuos de las histonas. Las histona metiltransferasa (HMT) catalizan la metilación de lisinas y la de argininas. La metilación es una modificación que no altera la carga neta de las histonas pero aumenta su basicidad e hidrofobicidad, aumentando la afinidad de las colas de histonas por moléculas aniónicas como el DNA [11]. La metilación de histonas se considera una modificación bastante estable, aunque recientemente se han identificado una lisina desmetilasa (LSD1) y una arginina desiminasa (PADI4/PAD4) [12,13]. Otra modificación que afecta a las histonas es la fosforilación de serinas y treoninas, catalizada por histona quinasas. La fosforilación introduce dos cargas negativas en el residuo modificado, y se ha relacionado tanto con la activación transcripcional como con la condensación mitótica de los cromosomas [14]. La ubiquitinación de lisinas

es catalizada por un sistema de tres enzimas conjugantes de ubiquitina: E1 (enzima activador de ubiquitina), E2 (enzima conjugante de ubiquitina) y E3 (ubiquitina ligasa). La ubiquitinación de la histona H2B parece estar implicada en el establecimiento de una ruta ordenada de modificaciones de histonas y en procesos de transcripción [15,16]. La sumoilación es

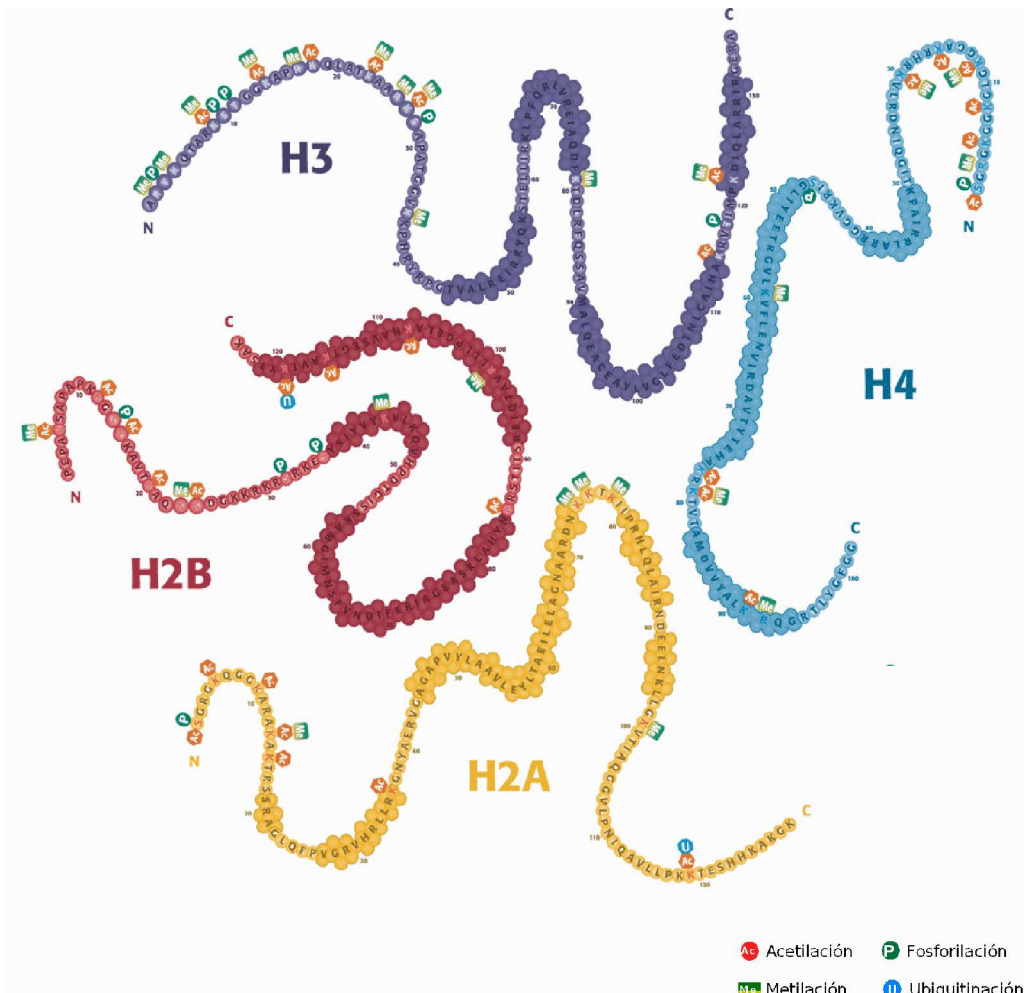


Figura 2. Mapa de modificaciones postraduccionales de las histonas de mamífero H2A, H2B, H3 y H4 (Upstate).

una modificación postraduccional de histonas identificada recientemente, que se ha relacionado con procesos de activación transcripcional [17]. Además, las histonas pueden sufrir otros tipos de modificaciones menos estudiados como la ADP-ribosilación [18], la glicosilación [19], la biotinilación [20] y la carbonilación [21]. Por último, los residuos de lisina de histonas pueden ser acetilados. La acetilación es la modificación postraduccional de histonas más estudiada, ya que es la que se conoce desde hace más tiempo. La acetilación de lisinas neutraliza la carga positiva del aminoácido y desde su descubrimiento se ha pensado que esto podría disminuir la fuerza de su interacción con el DNA, afectando así a la estructura de la cromatina. La acetilación está catalizada por enzimas histona acetiltransferasa (HAT) y puede ser eliminada por histona desacetilasas (HDAC).

En la Figura 2 se muestran los diferentes residuos de histonas de mamífero que son modificados, y la modificación/es que les afectan. Los residuos de histonas modificados y el tipo de modificación que sufren pueden variar dependiendo del organismo.

Metilación

La metilación de histonas fue descrita por primera vez hace ya varias décadas [22], pero hasta hace unos años poco se sabía sobre su significado biológico. Los complejos histona metiltransferasa (HMT) catalizan la transferencia de grupos metilo desde S-adenosil-L-metionina (SAM) a residuos de arginina y lisina de las histonas. Los residuos de arginina pueden ser mono- o di-metilados, de forma simétrica o asimétrica (Figura 3A). Esta modificación es catalizada por proteína arginina metiltransferasas (PRMTs). Por su parte, los residuos de lisina pueden ser mono-, di- o tri-metilados por miembros de la familia de HMTs que contienen dominios SET,

que reciben este nombre por que se identificaron tres factores reguladores de *Drosophila* que contenían este tipo de dominios: *Su(var)3-9*, *Enhancer-of-zeste* y *Trithorax* (Figura 3B) [11,23].

La metilación de histonas se ha relacionado con procesos de regulación

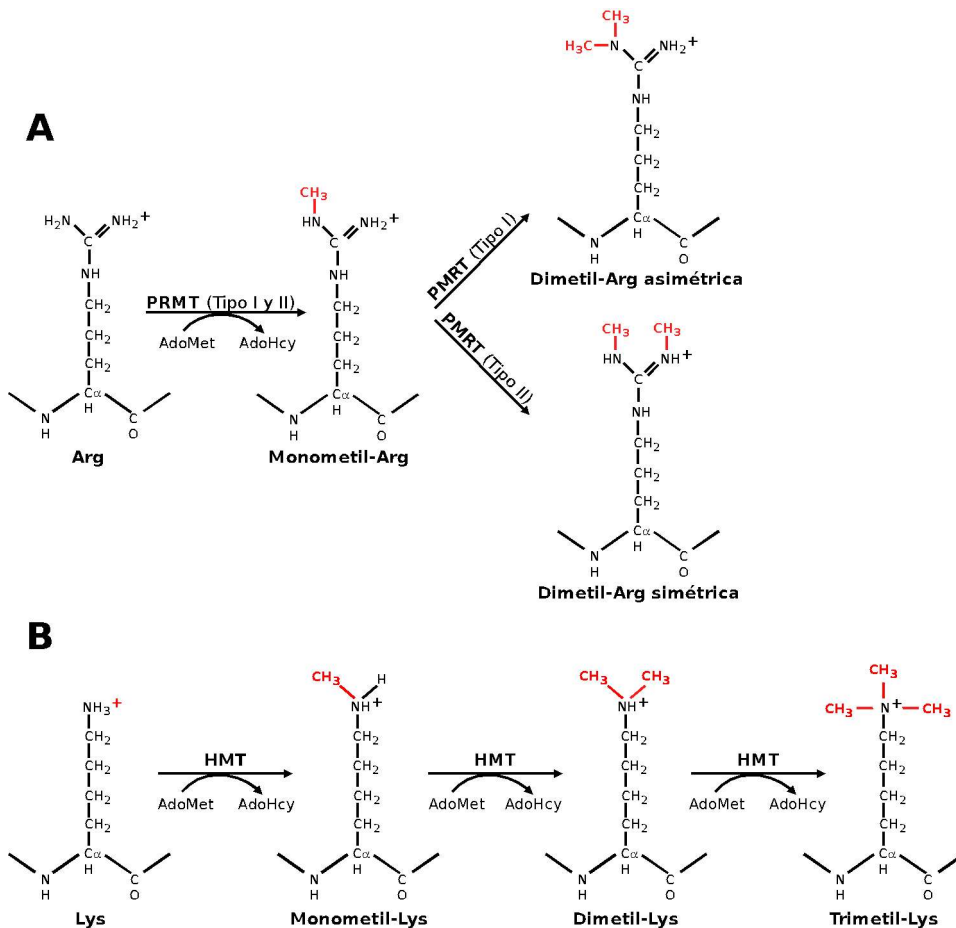


Figura 3. Reacción de metilación de lisinas y argininas. **A.** Estructura molecular de arginina, mono- y di-metilarginina. Las proteína arginina metiltransferasa (PMRTs) de tipo I y II catalizan la dimetilación asimétrica y simétrica respectivamente. **B.** Estructura molecular de lisina, mono-, di- y tri-metil-lisina (10).

transcripcional y de formación de heterocromatina. En general, en eucariotas superiores se ha relacionado la metilación de la lisina 9 de H3 con la formación de heterocromatina [11,24], mientras que en zonas transcripcionalmente activas se encuentra la lisina 4 de H3 metilada [11,25]. Al igual que todas las modificaciones postraduccionales que afectan a las histonas, la función de la metilación no depende solo de los residuos modificados, sino también de la relación establecida con otras modificaciones (ver el apartado *Código de histonas*). Así pues, el significado biológico de una modificación puede variar dependiendo del contexto. Este es el caso de la metilación de la lisina 9 de H3, una marca que sirve como sitio de unión para el reclutamiento de la proteína HP1 (*heterochromatin protein 1*), que a su vez puede oligomerizar formando heterocromatina. La unión de la proteína HP1 a la histona H3 es más estable si esta se encuentra simultáneamente metilada en la lisina 9 y fosforilada en la serina 10 (H3 K9meS10p), pero sin embargo, si la histona H3 contiene además la lisina 14 acetilada (H3 K9meS10pK14ac) ya no puede ser unida por la proteína HP1 [23,26]. También es conocido que el estado de modificación de un residuo puede influir sobre el estado de modificación de otro residuo. Se ha descrito que la metilación de la arginina 3 de H4 facilita la posterior acetilación de las lisinas 8 y 12 de H4 por p300, lo que se ha relacionado con la regulación de la actividad transcripcional [23,27].

La primera HMT específica de lisina descrita fue SUV39H1 humana, homóloga de Su(var)3-9 de *Drosophila* [28]. SUV39H1 es un miembro de la familia de HMTs que contienen dominios SET, y cataliza la metilación de la lisina 9 de H3. Posteriormente se demostró que otras proteínas con dominios SET poseen actividad HMT, siendo las familias más representativas SET1, SET2 y RIZ [29]. En levadura y en células de ratón se ha descrito una HMT específica de lisina, Dot1, que no contiene el dominio SET y que es

capaz de trimetilar K79 del dominio globular de la histona H3. Esta modificación se localiza en regiones de cromatina transcripcionalmente activas y se excluye de regiones silenciadas [30].

En cuanto a la familia de las PRMTs, las más conocidas son PMRT1 y PRMT4/CARM1, ambas implicadas en regulación transcripcional. PMRT1 es un enzima que metila la arginina 3 de la histona H4, mientras que PMRT4/CARM1 metila las argininas 2, 17 y 26 de H3 [23,27,31].

A diferencia de otras modificaciones de histonas, la metilación parece ser un proceso poco dinámico, siendo considerado como una marca epigenética relativamente permanente. Se han propuesto distintos modelos para la eliminación de la marca de metilación, como son la escisión del extremo N-terminal de las histonas metiladas o la sustitución por variantes de histonas [32-34], aunque estos mecanismos no parece que puedan proporcionar la rapidez y flexibilidad necesarias para regular la expresión génica de forma eficaz.

Recientemente se ha identificado la primera histona desmetilasa específica de lisina (LSD1), conservada desde *S. pombe* hasta humanos, que cataliza la conversión de la K4 de H3 mono- o di-metilada, pero no trimetilada, en K no metilada y formaldehído. LSD1 se identificó como un correpresor de la transcripción, por lo que se piensa que desmetila lisinas implicadas en la activación de la transcripción, como es el caso de la lisina 4 de H3 [34]. También se ha descrito un mecanismo que desimina argininas [36], antagonizando la metilación de argininas. La PADI4/PAD4 humana es una peptidilarginina desiminasa que transforma en citrulina residuos de argininas no metiladas o mono-metiladas, pero no di-metiladas, de la histona H3. La desiminación de argininas es un mecanismo que antagoniza la activación transcripcional mediada por la metilación de argininas.

Fosforilación

Las cuatro histonas internas y la histona H1 son susceptibles de ser fosforiladas en residuos de serina y treonina [23,37,38]. La fosforilación de histonas se ha relacionado con múltiples y diversos procesos celulares como la condensación de cromosomas en mitosis y meiosis, la reparación del DNA y procesos de activación o represión transcripcional, apoptosis o muerte celular programada. Algunos ejemplos son la fosforilación de H2A (en la serina 1 y la treonina 119), de H3 (en la treonina 3 y en las serinas 10 y 28) y de H4 (en la serina 1). Se ha descrito que la fosforilación de H1 y H3 (en la serina 10) durante la mitosis y la fase S son marcas de cromatina mitótica condensada, que presentan función redundante con la fosforilación de la serina 1 de las histonas H2A y H4 [39]. Por otro lado la proteína Snf1, una quinasa de histonas, está implicada en la activación transcripcional [40]. En el caso de la reparación del DNA, la quinasa de *checkpoint* ATM (Mec1 en levadura) es reclutada a la zona en la que se ha producido la rotura de del DNA y fosforila la histona H2A en levadura, o la variante H2AX en mamíferos [38].

Al igual que otras modificaciones, la fosforilación parece ser una marca que actúa conjuntamente con otras modificaciones generando patrones que son reconocidos por diferentes complejos implicados en llevar a cabo distintos procesos. Este es el caso de la fosforilación de la H3S10, que induce la acetilación de la lisina H3K14, y estas marcas se han correlacionado con la activación de la transcripción de un grupo de genes regulados por Gcn5p, un enzima con actividad HAT [23]. Sin embargo la fosforilación de la serina 10 de H3 también se ha relacionado con un proceso fisiológico muy diferente, la condensación y segregación de cromosomas durante la mitosis [14,23], aunque en este caso no se conoce cuáles son las otras marcas postraduccionales que participan junto con la

fosforilación de H3S10, en la dirección de este proceso.

Ubiquitinación y sumoilación

Muchas proteínas son diana de ubiquitinación, una modificación que consiste en la conjugación covalente de ubiquitina, una proteína de 76 aminoácidos (9 kDa), a un residuo de lisina [16]. En general todas las proteínas, incluyendo las histonas, pueden ser poli-ubiquitinadas, lo que parece ser una marca de señalización para degradar la proteína en el proteasoma. Por otra parte se ha descrito que la mono-ubiquitinación de lisinas, una modificación que en este caso no está asociada con la degradación de proteínas, puede participar en la regulación de la actividad de las proteínas. Así, por ejemplo, determinados precursores inactivos de factores transcripcionales de la RNA-pol II son procesados en el proteasoma a sus formas activas, de manera dependiente de mono-ubiquitinación, lo que finalmente se traduce en la modulación de la transcripción [16].

Las histonas H2A, H2B, H3, H1 y la variante H2A.Z de muchos organismos eucariotas también pueden ser mono-ubiquitinadas. En *Drosophila* y vertebrados las formas ubiquitinadas de H2A y H2B se localizan en la región 5' no codificante de genes con elevados niveles de expresión, dando lugar a la idea de que la ubiquitinación de histonas es requerida para la activación transcripcional. Poco se sabe de cómo la ubiquitinación de histonas influye positiva o negativamente en la transcripción. Sin embargo se ha descrito que tanto la metilación de la lisina 4 de H3 como la de la lisina 79 son dependientes de la ubiquitinación de H2B, y estas combinaciones de modificaciones pueden afectar al estado de transcripción de determinados genes. La trimetilación de K4 de H3 en las regiones 5' de genes mediada por Set1p parece acompañar a la elongación de la transcripción, mientras que la metilación de K79 de H3 mediada por Dot1p

se localiza en regiones de eucromatina [15].

La sumoilación es un proceso similar a la ubiquitinación, pero la proteína conjugada es SUMO (*s*mall *u*biquitin-*r*elated *m*odifier), una proteína de 11 kDa. La sumoilación de histonas ha sido relacionada con procesos de represión transcripcional mediada por el reclutamiento de histona desacetilasas y de HP1 [41,42]. También se ha sugerido que esta marca participa en la atenuación de la expresión de genes transcripcionalmente activos, que posteriormente serán reprimidos [17].

Acetilación

La acetilación de lisinas es la modificación postraduccional de histonas de la que se han realizado un mayor número de estudios en una gran diversidad de organismos eucariotas, desde la levadura hasta plantas y humanos. Desde siempre, se ha pensado que cuando las lisinas no están acetiladas y por tanto tienen una carga positiva, se favorece la interacción de los extremos N-terminales con el DNA generándose una cromatina más compacta y reprimida. La acetilación de lisinas, al eliminar la carga positiva, debilitaría la interacción de los extremos N-terminales con el DNA provocando la relajación de la estructura de la cromatina. Por tanto, aunque no siempre es cierto, generalmente se ha relacionado la acetilación de histonas con la expresión génica, de manera que las histonas hiperacetiladas se encuentran asociadas con regiones genómicas transcripcionalmente activas, mientras que la desacetilación de histonas da lugar a la represión y al silenciamiento [43-45]. Sin embargo, actualmente se sabe que la acetilación de histonas está relacionada con muchos otros procesos fisiológicos, además de la regulación de la transcripción, como la progresión del ciclo celular, recombinación y reparación del DNA, apoptosis, elongación de la transcripción o el ensamblaje de nucleosomas (revisado en

[45-49]). Por ejemplo, los machos de *D. melanogaster* sólo tienen una copia del cromosoma X mientras que las hembras disponen de dos, de manera que los machos incrementan dos veces la expresión de los genes ligados al cromosoma X para compensar su dosis génica, proceso asociado con la acetilación de la lisina 16 de H4 en el cromosoma X. Por otro lado, ha sido muy discutida la participación de la acetilación en el establecimiento de la heterocromatina, una región que contiene histonas hipoacetiladas. Se ha descrito, en levadura, que la acetilación de H4K16 actúa como una barrera que impide la expansión de estas regiones silenciadas. También se ha descrito que las histonas son modificadas postraduccionalmente justo después de su síntesis, previamente a su ensamblaje en cromatina. En los organismos donde se ha estudiado, la histona H4 sintetizada *de novo* es acetilada en los residuos de lisina 5 y 12. Este patrón de diacetilación está evolutivamente muy conservado en diferentes organismos como *X. leavis*, *D. melanogaster*, humanos y *Tetrahymena* [50-52]. La histona H3 sintetizada *de novo* también se acetila pero el patrón de modificación no parece haberse conservado como en H4 y varía de unos organismos a otros [50,53,54].

La acetilación afecta a determinados residuos de lisina de los extremos N-terminales de las cuatro histonas internas. En concreto, en *S. cerevisiae* se ha encontrado esta modificación *in vivo* en las lisinas 5, 8, 12, 16 de la histona H4; lisinas 4, 9, 18, 23 y 27 de la histona H3; lisinas 12, 15, 20 y 24 de la histona H2B y lisinas 5 y 9 de las histona H2A. Sin embargo, al igual que sucede con otros tipos de modificaciones, en los últimos años se han identificado nuevos residuos de lisina localizados en la región C-terminal de las histonas de mamífero, que son susceptibles de ser acetilados (Figura 2).

Histona acetiltransferasas

La acetilación de histonas es una reacción catalizada por enzimas

histona acetiltransferasa, (HATs), que transfieren un grupo acetilo desde el acetil-coenzima A al grupo ϵ -amino de la cadena lateral de residuos de lisina específicos [46]. Esta modificación puede ser revertida por la acción de histona desacetilasas (HDACs) (Figura 4).

Los enzimas histona acetiltransferasa, y también las histona desacetilasas, *in vivo* forman parte de complejos multiproteicos de elevada masa molecular. Los complejos HAT se han clasificado en dos tipos, A y B, en función de su localización subcelular y de su habilidad de modificar o no histonas ensambladas en nucleosomas. Las HATs tipo A son enzimas nucleares capaces de acetilar histonas ensambladas en cromatina, que normalmente están relacionadas con procesos de regulación de la transcripción. Los complejos HAT tipo B clásicamente se han descrito como complejos de localización principalmente citoplasmática que únicamente

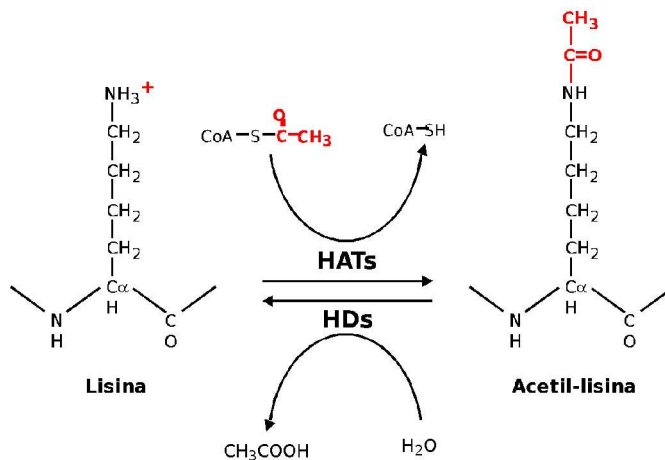


Figura 4. Estructura molecular de la lisina y de la acetil-lisina. La reacción de acetilación de histonas es catalizada por complejos Histona acetiltransferasa (HATs), y revertida por complejos Histona desacetilasa (HDACs) [35].

acetilan histonas libres, presuntamente para su posterior deposición en cromatina (ver más adelante).

Por otro lado, las proteínas con actividad HAT descritas en diferentes organismos que constituyen las subunidades catalíticas de los complejos HAT, se han clasificado en cinco familias diferentes en base a las similitudes estructurales y a los diferentes dominios identificados [45,55]. En la TABLA I se describen estas cinco familias, las proteínas HAT que forman cada

TABLA I. Las proteínas HAT se clasifican estructuralmente en cinco familias.

	Subunidad catalítica	Sustrato
GNATs (Gcn5 relate N-acetyltransferases) Contienen Bromodominios en Ct	yGcn5 (SAGA, ADA, HAT-A2, SLIK y SALSALSA) hPCAF (PCAF) Hat1 (HATB, HAT-A3) yElp3 (Elongator) yHpa2	H3/H2B H3/H4 H4/H2A H3/H4 H3/H4
MYSTs (MOF, Ybf2/Sas3, Sas2 y Tip60) Contienen dedos de zinc	yEsa1 (NuA4 y picNuA4) f MOF (MSL) ySas2 (complejo SAS) ySas3 (NuA3) hMORF hTip60	H4/H2A H4 H4 H3 H4/H3 H4
p300/CBP	p300 CBP	H3, H4, H2A, H2B H3, H4, H2A, H2B
Factores de transcripción	yTaf _{ii} 145 y homólogos (TFIID de RNA-POL II) hTFIIIC (RNA-POL III) yNut1 (<i>Mediator complex</i>)	H3 H3, H4 H3
Cofactores de receptores nucleares	ACTR SRC1	

•Se indican las proteínas conocidas de cada familia y, entre paréntesis, los complejos de los que forman parte. En la última columna se indica los sustratos de estos enzimas. *y*: yeast (levadura); *h*: human (humano); *f*: flies (mosca). Tabla basada en Sterner D. y Berger SL (2000), [47].

grupo, y los complejos de los que se sabe que forman parte.

Las subunidades de los complejos HAT que no poseen actividad enzimática HAT, entre otras posibles funciones, participan en el reconocimiento y especificidad de sustrato. Muchos enzimas inicialmente descritos como co-activadores transcripcionales, tales como Gcn5p, p300/CBP, PCAF o TAFII250 (homólogo humano de Tafi_i145 de levadura), poseen actividad HAT intrínseca [46-48]. Algunos enzimas con actividad HAT pueden asociarse con otros enzimas HAT, incluso se han identificado actividades HAT y HDAC en el mismo complejo. Por ejemplo, p300/CBP interacciona con Gcn5p/PCAF y con ACTR/SRC1, mientras que en células HeLa la histona acetiltransferasa PCAF se asocia con la histona desacetilasa HDAC1 [46,56].

Por último es importante destacar que los complejos HATs no sólo acetilan histonas, sino que pueden actuar sobre otras dianas diferentes, incluyendo proteínas de cromatina no histona (por ejemplo HMGs, *High mobility group*), activadores transcripcionales (p53, E2F1, EKLF, GATA1, c-Myb, etc), factores de transcripción (TFII β , TFIIIF), proteínas estructurales como la tubulina, y poliaminas [47,49,57,58]. Muchas HATs son capaces de auto-acetilarse *in vitro* (p300, Tip60, Hpa2), pero no se sabe la relevancia fisiológica de estas modificaciones [47]. Sólo en el caso de PCAF se ha descrito que su auto-acetilación da lugar al incremento de su actividad [59] [1]. Se ha sugerido el nombre de FAT (*factor acetyltransferase*) para aquellas actividades que acetilan, además de histonas, otras proteínas reguladoras. Estas modificaciones están implicadas en la regulación de la actividad de las proteínas, de las interacciones proteína-proteína y en la estabilidad de las proteínas [60].

Histona Desacetilasas

Las histona desacetilasas (HDACs) son enzimas hidrolíticos capaces de

revertir la acetilación (Figura 4), de manera que los niveles estacionarios de acetilación de las histonas depende del balance de las actividades HAT y HDAC. Al igual que para las HATs, también se ha descrito que las HDACs pueden desacetilar proteínas no histona como p53, E2F, α -tubulina y MyoD [56,61].

La clasificación de los diferentes tipos de HDACs es confusa, pero generalmente se aceptan cuatro clases de HDACs: las tipo Rpd3p o clase I; las tipo Hda1p o clase II; las tipo Sir2p dependientes de NAD⁺ y las tipo HD2 [62].

Rpd3p y Hda1p son desacetilasas de acción global que afectan a muchos promotores y regulan así la transcripción de muchos genes [63]. Hos1p y Hos2p (*HDA one similar*) de levadura pertenecen a la subfamilia de enzimas tipo Rpd3p.

Hos3p es una HDAC que, a pesar de haberse identificado en diferentes organismos, no encaja exactamente ni en el grupo de HDACs tipo Rpd3p ni en el tipo Hda1p. Por este motivo unas veces se ha clasificado como una HDAC de clase II y otras se ha situado entre las dos clases, aunque en realidad no parece correlacionar bien con ninguna de las dos categorías. Es característico que estos enzimas son insensibles a inhibidores como la Tricostatina A (TSA), que afectan a HDACs de clase I y II [64].

Las histona desacetilasas tipo Sir2p (*silent information regulator*) tienen una actividad ADP-ribosiltransferasa independiente de la actividad HDAC, a pesar de que la desacetilación de histonas es dependiente de NAD⁺ [65,66]. Se ha descrito que células de levadura *sir2Δ* presentan una esperanza de vida más corta que células salvajes, aunque esto parece depender de la cepa [67]. La dependencia de NAD⁺ conecta el metabolismo celular, la estructura de la cromatina y el envejecimiento celular [68,69]. Se ha

descrito que en levadura, el envejecimiento provoca una inapropiada expresión génica además de la acumulación de círculos de rDNA extracromosomales (ERCs) que se forman por recombinación homóloga. En células jóvenes la proteína Sir2 mantiene el silenciamiento del rDNA, lo que reprime su recombinación y evita la formación de ERCs. Sir2p también está implicada en el silenciamiento de los telómeros y de los *loci HML* y *HMR*. Guarente (2000) [68] propone que niveles bajos de NAD⁺ en la célula pueden dar lugar a la pérdida de silenciamiento de estas tres regiones, favoreciendo la formación de ERCs y la expresión anormal de genes. Así, células que disponen de altos niveles de glucosa y por tanto de energía, realizan la fermentación de la glucosa, una ruta metabólica que consume poco NAD⁺ si su nivel es relativamente alto. Cuando la glucosa comienza a ser limitante comienza la respiración, proceso en el que se consume más NAD⁺ lo que puede provocar la disminución de los niveles de NAD⁺ en la célula [67-69]. La reducción en los niveles de NAD⁺ puede dar lugar a una disminución de la actividad histona desacetilasa de Sir2p, produciéndose la desrepresión del rDNA y genes transcripcionalmente inactivos. Al igual que los enzimas tipo Hos3p, las HDACs tipo Sir2p son insensibles a TSA y a otros inhibidores de HDACs de clase I y clase II.

Sobre la familia de enzimas tipo HD2, únicamente descrita en plantas, poco se sabe. La HD2 es una histona desacetilasa que se aisló en maíz como una proteína fosforilada y de localización nucleolar [70-72].

En eucariotas superiores se han identificado diversos ortólogos de RPD3 y de HDA1. Los enzimas de la clase I son HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8, mientras que los de la clase II son HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 y HDAC10 (revisado en [73]). HDAC1 y HDAC2 se unen para formar el centro catalítico de tres complejos histona desacetilasa: SIN3, NuRD (*nucleosome remodelling and deacetylating*) y Co-REST. Los complejos SIN3 y NuRD

además contienen las proteínas RbAp48 y RbAp46, proteínas que unen histonas (ver el apartado de *Chaperonas de histonas*).

Las histona desacetilasas participan en la regulación de la transcripción génica, pero también están implicadas en la regulación de otros procesos como el ciclo celular, la proliferación celular y el desarrollo de cáncer, lo que ha dado lugar a una búsqueda y caracterización exhaustiva de inhibidores de HDACs [74].

Al igual que otros complejos implicados en la regulación de muchos procesos celulares vitales, las actividades HDACs se encuentran finamente reguladas por múltiples mecanismos. La actividad desacetilasa de las proteínas HDAC depende, entre otras cosas, de interacciones proteína-proteína específicas, de manera que las subunidades catalíticas requieren otras subunidades o cofactores para ser activas (la mayoría de los enzimas recombinantes son inactivos). Además las HDACs son reguladas por modificaciones postraduccionales, a nivel de expresión y por disponibilidad de cofactores. Por último cabe resaltar la importancia de la regulación a nivel de localización subcelular. Mientras que las HDACs de clase I suelen localizarse en el núcleo ya que contienen una secuencia de localización nuclear (NLS, *Nuclear localization sequence*), las de clase II pueden desplazarse del núcleo al citoplasma en respuesta a determinadas señales celulares [73-75].

Nomenclatura de modificaciones de histonas

Como se ha mencionado anteriormente, se han identificado diversos tipos de modificaciones de histonas, que a su vez pueden afectar a diferentes aminoácidos. Además de las modificaciones más conocidas como la acetilación, la fosforilación, la metilación, la ubiquitinación y la sumoilación, existen otro tipo de modificaciones menos estudiadas como la

adición de nucleótidos (ADP-ribosilación), glicosilaciones y biotinizaciones. Incluso en los tipos de modificaciones más sencillos existe variabilidad: las lisinas pueden ser mono-, di-, o tri-metiladas, además de ser acetiladas o ubiquitinadas, mientras que las argininas pueden llevar uno o dos grupos

TABLA II. Nomenclatura de las modificaciones de histonas.

Grupo modificador	Aminoácido modificado	Nivel de modificación	Abreviación de la modificación^a	Ejemplos^b
Acetil-	Lisina	mono-	ac	H3K9ac
Metil-	Arginina	mono-	me1	H3R17me1
	Arginina	di-, simétrico	me2s	H3R2me2s
	Arginina	di-, asimétrico	me2a	H3R17me2a
	Lisina	mono-	me1	H3K4me1
	Lisina	di-	me2	H3K4me2
	Lisina	tri-	me3	H3K4me3
Fosforil-	Serina o treonina	mono-	ph	H3S10ph
Ubiquitil-	Lisina	mono-	ub1	H2BK123ub1
	Lisina	poli-	ubn	H2BK123ubn ^c
SUMOil-	Lisina	mono-	su	H4K5su ^c
ADP ribosil-	Glutamato	mono-	ar1	H2BE2ar1
	Glutamato	poli-	arn	H2BE2arn ^c

^aEl uso de letras minúsculas para las modificaciones ayuda a distinguirlas de los aminoácidos (identificados por códigos de letra única) y de las histonas, para los cuales se emplean letras mayúsculas.

^bLa nomenclatura empieza por la izquierda con la histona seguida del residuo, seguido de la modificación. En los casos en los que no se conoce el residuo modificado o no es relevante, la modificación puede seguir directamente a la histona (ejemplo, H4ac o H2Bar1). Múltiples modificaciones pueden ser acomodadas simplemente extendiendo la lista (por ejemplo, H3K4me3K9acS10ph...). En ocasiones la presencia de un residuo no modificado puede ser un componente esencial de una información contenida en una combinación de residuos; en este caso el residuo debe ser insertado sin adiciones (por ejemplo H3K9S10ph), para indicar que la lisina 9 no está modificada y que la lisina 10 está fosforilada.

^cEjemplos actualmente hipotéticos [76].

metilo, y además la di-metilación puede ser simétrica o asimétrica. La enorme complejidad de modificaciones y combinaciones de modificaciones que afectan a las histonas hace que cada vez se precise más de un sistema de nomenclatura para designarlas. Recientemente se ha propuesto un sistema de nomenclatura con el que se trata de proporcionar una forma lógica y no ambigua de representar para las diferentes histonas tanto los distintos tipos de modificaciones químicas como el residuo al que afectan [76]. Este sistema de nomenclatura, resumido en la TABLA II, consiste en añadir al nombre de la histona una abreviatura que especifique el residuo y el tipo de modificación. Con este sistema es posible formular combinaciones específicas de modificaciones simplemente añadiendo sus abreviaturas; por ejemplo H3K4me2S10phK14ac significaría histona H3 dimetilada en la lisina 4, fosforilada en la serina 10 y acetilada en la lisina 4.

Leyendo el código de histonas

Se considera que las modificaciones postraduccionales de las histonas podrían afectar a la estructura de la cromatina, favoreciendo su condensación o descondensación. Sin embargo, la creciente variedad de modificaciones de histonas ha dado lugar a la denominada hipótesis del *código de histonas*, la cual no necesariamente ha de estar reñida con la generación de cambios estructurales. El código de histonas [33,77] propone que determinadas combinaciones de modificaciones sobre las histonas generan patrones que son reconocidos por proteínas no-histona. La unión específica de estas proteínas conduce a cambios de actividad de la cromatina de distinta naturaleza. La hipótesis del código de histonas implica dos tipos de actividades bioquímicas: enzimas que escriben el código por adición o eliminación de modificaciones en determinados residuos, y proteínas que interpretan el código mediante la interacción específica con

los patrones de modificaciones de las histonas, para ejercer su función. Los distintos tipos de modificaciones en diferentes residuos de histonas y la interrelación entre los diferentes tipos de modificaciones implican un elevado nivel de complejidad.

Existen algunos ejemplos que apoyan la hipótesis del código de histonas. Así, muchas de las lisinas de histonas pueden ser acetiladas o metiladas, pero como es lógico, no pueden coexistir diferentes marcas sobre el mismo residuo de manera que se excluyen mutuamente. Por tanto cualquier lisina ha de ser desacetilada previamente a su metilación. Estudios en *S. pombe* muestran que se requiere la HDAC CrI3 para que tenga lugar la metilación de la lisina 9 de H3 por la HMT CrI4 [78,79]. Estudios *in vitro* muestran que la metilación de H4 en la arginina 3 facilita la acetilación posterior del extremo N-terminal por p300 [27].

Así pues, las modificaciones de un extremo N-terminal pueden influenciarse entre ellas (efecto *cis*, ver ejemplos anteriores), pero también pueden influenciar las modificaciones de otras histonas del nucleosoma (efecto *trans*). Por ejemplo, la ubiquitinación de la lisina 123 H2B es un prerequisite para que se metile la lisina 4 de la histona H3, lo que da lugar a la activación de la transcripción, o por el contrario, puede inducir la metilación de la lisina 79 de H3 y por tanto la desrepresión de regiones silenciadas [15,16]. Sin embargo no se conocen las señales que determinan cual de las dos lisinas se ha de ubiquitinar, la lisina 79 o la 123. Por otro lado, estudios realizados en células HeLa muestran que la metilación de la lisina 9 de H3 por el complejo SET7 inhibe la actividad de p300 sobre las histonas H3 y H4, mientras que la metilación de la lisina 4 de H3 por el complejo SUV39H1 facilita la posterior acetilación de H3 y H4 por p300 [80].

Se ha propuesto que las diferentes combinaciones de modificaciones podrían dar lugar a determinadas plataformas que son reconocidas por

proteínas no-histona. Estas proteínas poseen dominios o módulos que están implicados en el reconocimiento de las diferentes marcas que afectan a las histonas [81-83]. Hasta el momento se han descrito tres tipos de dominios: el bromodominio, el cromodominio (*chromatin organization modifier*) y el dominio SANT (SWI3, ADA2, N-CoR, y TFIIB B). Los bromodominios unen específicamente acetil-lisinas, mientras que los cromodominios unen metil-lisinas, pero también DNA y RNA. Ambos tipos de dominios han sido encontrados en complejos remodeladores de cromatina y en diversas proteínas con actividad HMTs o HATs, así como en proteínas que forman parte de complejos con estas actividades enzimáticas. Los dominios SANT por su lado parecen tener preferencia por unir extremos de histonas no modificados, y han sido identificados en complejos remodeladores de cromatina y en HMTs. Algunas proteínas pueden tener más de una copia del mismo dominio, lo que parece reforzar la unión a extremos N-terminales de histonas que contienen lisinas específicamente multiacetiladas o multimetiladas [84]. Hasta el momento no se han encontrado combinaciones de diferentes dominios en la misma proteína. La especificidad de reconocimiento y unión de estos dominios por las marcas de histonas parece estar determinada a tres niveles: la variabilidad de secuencia del dominio de unión y de los residuos adyacentes al residuo diana; el número de copias de un dominio y los cambios alostéricos inducidos por la interacción proteína-proteína.

Otros participantes en la regulación de la actividad de la cromatina

Metilación del DNA

La metilación del DNA es una marca epigenética que está implicada en el silenciamiento de genes, en la inactivación del cromosoma X y de los

transposones y en la condensación cromosómica [85,86]. La metilación de citosinas es catalizada por DNA metiltransferasas (DNMTs), de las cuales se han identificado hasta cuatro familias: DNMT1, DNMT2, DNMT3 y la familia cromometilasa [86]. Las metiltransferasas de la familia DNMT1 son responsables de mantener el patrón de metilación. DNMT1 interacciona con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en la horquilla de replicación, metilando el DNA naciente previamente a su empaquetamiento en nucleosomas, lo que garantiza la duplicación de esta marca epigenética durante la división celular. Sin embargo una fracción de dinucleótidos CpG, que pertenecen a secuencias de DNA cuya función es regulada por metilación del DNA, escapa a esta metilación de mantenimiento [87]. La familia DNMT3 son las metiltransferasas *de novo* (DNMT3a y DNMT3b) que metilan DNA independientemente de si el molde está hemi-metilado o no [88], y que están implicadas en el establecimiento de patrones de metilación en DNA recién sintetizado durante el desarrollo. La familia DNMT2 constituye un grupo de putativas DNA citosina metiltransferasas identificadas por homología de secuencia con DNMT1 y DNMT3, pero no se ha demostrado su actividad. Se han identificado homólogos de DNMT2 en todos aquellos organismos que contienen homólogos de las familias DNMT1 y DNMT3. Por último las cromometilasas, que únicamente se han identificado en organismos del reino vegetal, metilan específicamente la secuencia simétrica CpNpG [86].

En algunos organismos eucariotas como *C. elegans* y *S. cerevisiae*, no se ha identificado metilación de citosinas en sus genomas y no muestran secuencias homólogas de proteínas con actividad citosina metiltransferasas [86].

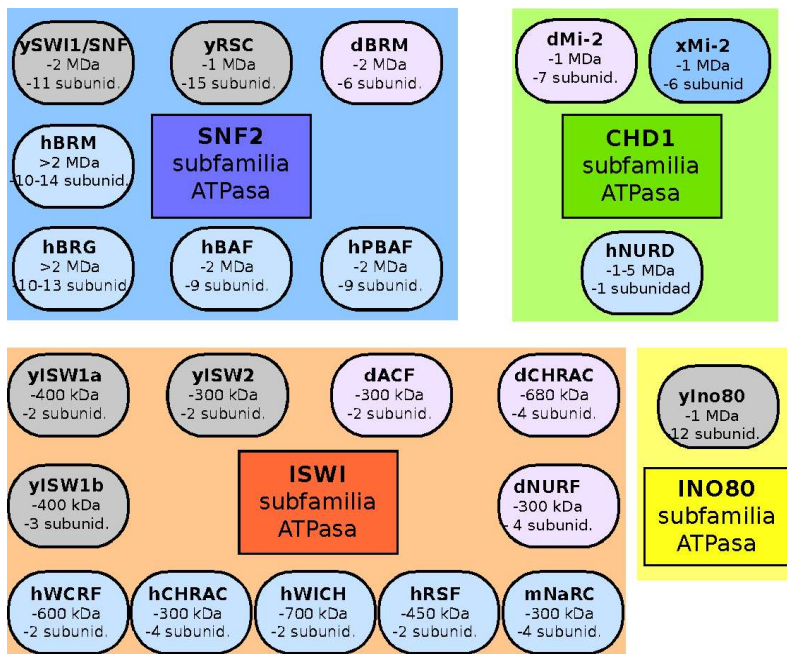
Complejos remodeladores de la cromatina

Se conocen diversas proteínas y complejos multiproteicos que utilizan la energía de hidrólisis del ATP para alterar las interacciones DNA-histonas en los nucleosomas, lo que parece facilitar el acceso de diferentes factores al molde de DNA. Estos complejos se han denominado genéricamente actividades remodeladoras de la cromatina [89]. Estos factores remodeladores participan en procesos como la replicación y la reparación del DNA, la transcripción y la recombinación. Aunque no están claros los mecanismos por los que aumentan la accesibilidad al DNA [90], sí se ha descrito que los complejos remodeladores pueden actuar de diferentes maneras. Así, pueden catalizar la movilización y el reposicionamiento de nucleosomas, la transferencia de un octámero de histonas de un nucleosoma a un molde diferente de DNA o formar estructuras similares a dinucleosomas a partir de mononucleosomas y generar torsión superhelicoidal en el DNA [90].

Los complejos remodeladores de cromatina están constituidos por diferentes subunidades pero todos contienen una subunidad ATPasa que pertenece a la familia de ATPasa SNF2. Esta familia se subdivide en varias subfamilias en función de los motivos proteicos que presentan. Las cuatro subfamilias más importantes (Figura 5) son SNF2, ISWI, CHD1 y INO80. Los miembros de la subfamilia SNF2 se caracterizan por contener bromodominios. A esta subfamilia pertenece la subunidad ATPasas del complejo SWI/SNF de levadura, implicado en la regulación transcripcional de un 5 % de los genes, y del complejo RSC de levadura, que tiene un efecto global sobre la transcripción. Las subunidades ATPasa que pertenecen a la subfamilia ISWI contienen un dominio SANT (SWI3, ADA2, N-CoR, IFIIB), implicado en la interacción con los extremos N-terminales de las histonas [91], mientras que los de la subfamilia CHD1 contienen un cromodominio.

Los complejos remodeladores que contienen ATPasas de la subfamilia CHD1 normalmente también contienen una subunidad con actividad HDAC. Por último, Ino80p es la subunidad ATPasa del complejo INO80 de levadura, un complejo que además posee actividad helicasa, aunque se desconoce si es la propia Ino80 la subunidad del complejo responsable de esta actividad [90].

El resto de subunidades no ATPasas de los complejos remodeladores de cromatina parecen funcionar regulando la actividad de las subunidades ATPasas [92] y el reconocimiento de la cromatina [93].



Lusser y Kadonaga, (2003)

Figura 5. Miembros de las subfamilias SNF2, ISWI, CHD1 e INO80 son componentes de complejos remodeladores de cromatina. Los complejos remodeladores se han simbolizado como óvalos y se indican los tamaños aproximados y el número de subunidades.

Variantes de histonas

Otra manera de modular la conformación de la cromatina consiste en incorporar variantes de histonas en determinadas regiones, sustituyendo a las formas canónicas, mucho más abundantes. Los genes que codifican las histonas mayoritarias suelen ser multicopia y se expresan principalmente durante la fase S del ciclo celular [94]. Aunque las histonas son proteínas que han evolucionado muy lentamente [95], existen variantes no alélicas que contienen diferencias significativas en la secuencia primaria. Los genes que codifican las variantes de histonas suelen ser genes de copia única que se expresan durante todo el ciclo celular. Algunas variantes de histonas pueden alterar las propiedades de los nucleosomas mientras que otras además se localizan específicamente en determinadas regiones del genoma. El reemplazamiento de las histonas canónicas por variantes está relacionado con la especialización celular, la diferenciación de tejidos y la herencia epigenética [96,97].

Se han descrito variantes de las histonas H1, H2A, H2B y H3, pero no de la histona H4 [96]. En la TABLA III se resumen las variantes de histonas descritas y los procesos conocidos en los que están implicadas.

La variante centromérica de H3 (revisado en [98,99]) recibe diferentes nombres según el organismo (corresponde a CENP-A en mamíferos y a Cse4 en *S. cerevisiae*), pero se ha estandarizado su denominación a CenH3 (Centromeric H3). La histona CenH3 se encuentra formando nucleosomas en las regiones de DNA centromérico [100,101]. La variante CenH3 parece constituir, al menos en parte, la marca epigenética que especifica el sitio dónde se ha de formar el cinetócoro, y además está implicada en su ensamblaje [99,102]. La deposición de CenH3 tiene lugar durante la fase G2 y es independiente de la replicación del DNA [103]. Cabe destacar que los factores ensambladores de cromatina CAF-1 y las proteínas Hir, así como

TABLA III. Variantes de histonas

	VARIANTE	ESPECIE	EFEECTO EN LA CROMATINA	FUNCIÓN
H1	H1 ^o	Ratón	Condensación de la cromatina	Represión de la transcripción
	H5	Pollo	Condensación de la cromatina	Represión de la transcripción
	spH1	Erizo de mar	Condensación de la cromatina	Empaquetamiento de la cromatina
	H1t	Ratón	Apertura de la cromatina	Intercambio de histonas, recombinación?
H2A	MacroH2A	Vertebrados	Condensación de la cromatina	Inactivación del cromosoma X
	H2ABbd	Vertebrados	Apertura de la cromatina	Activación de la transcripción
	H2A.X	Ubicua	Condensación de la cromatina	Reparación de DNA/ recombinación/ represión de la transcripción
	H2A.Z	Ubicua	Condensación/ descondensación de la cromatina	Activación/represión de la transcripción, segregación de cromosomas
H2B	spH2B	Erizo de mar	Condensación de la cromatina	Empaquetamiento de la cromatina
H3	CenH3	Ubicua		Formación del cinetócoro
	H3.3	Ubicua	Apertura de la cromatina	Transcripción

Kamakaka y Biggins (2005) [96].

los complejos remodeladores de cromatina tipo RSC, parecen estar implicados en el ensamblaje de CenH3 y en evitar su deslocalización a regiones no centroméricas [104].

Otra variante de la histona H3 en eucariotas superiores es H3.3, una forma que se expresa constitutivamente. La H3.3 se deposita durante todo el ciclo celular en regiones transcripcionalmente activas, reemplazando a la H3 canónica, mediante una ruta de deposición independiente de replicación (RI, *Replication-Independent*) mediada por el complejo HIRA [34,96,97,105]. Esta variante podría funcionar marcando la eucromatina, diferenciándose

así los genes transcripcionalmente activos de los genes transcripcionalmente reprimidos y de las regiones heterocromáticas.

La histona H2A.Z (Htz1 en levadura), se incorpora en regiones silenciadas del genoma inhibiendo la propagación de la heterocromatina, aunque también se ha asociado con la activación de la expresión de un determinado grupo de genes [96,97,106-108].

La variante MacroH2A en vertebrados se localiza principalmente en el cromosoma X inactivo [109], mientras que H2A-Bbd se localiza en el cromosoma X activo de hembras de mamífero [110].

La variante H2A.X se expresa constitutivamente y se deposita a lo largo de todos los cromosomas. Esta variante es fosforilada por las quinasas ATM y ATR en los sitios en que se ha producido una rotura de doble cadena de DNA. Esta fosforilación es esencial para reclutar la maquinaria de reparación de DNA [96,97,111].

Por último, se conocen múltiples variantes de la histona H1. Para muchas de ellas se ha reconocido su implicación en la represión transcripcional durante la diferenciación celular [8,112,113].

En todos los ascomicetos, incluyendo las levaduras de laboratorio, únicamente existe una histona H3 y carecen de variantes para esta histona. Ahmad y Henikoff (2002) [34] han indicado que la H3 de los ascomicetos es equivalente a la H3.3, ya que se ha detectado ensamblaje de nucleosomas durante todo el ciclo celular en *S. cerevisiae*. Algo similar sucede con la histona H2A de *S. cerevisiae*, ya que esta histona realiza las funciones de la histona H2A y H2A.X de otros organismos [114].

Al igual que las histonas canónicas, las variantes de histonas son susceptibles de sufrir modificaciones postraduccionales (revisado en [96]).

Parece ser que las variantes de histonas no pueden coexistir en el mismo nucleosoma junto a la histona homóloga canónica. Así pues, las variantes H2A.Z, MacroH2A y H2A-Bbd forman nucleosomas homotípicos ya que no pueden coexistir con H2A canónica en el mismo nucleosoma. Lo mismo sucede con la variante CenH3. Sin embargo, parece ser que la variante H3.3 puede constituir nucleosomas heterotípicos junto a la histona H3 mayoritaria [96,97,105].

Dinámica de la cromatina y epigenética.

La cromatina, al contrario de lo que se ha pensado durante mucho tiempo, es una estructura flexible y dinámica que es regulada mediante diferentes mecanismos. Existe un amplio grupo de enzimas que modifican residuos de histonas o de DNA, y otros que pueden remodelar nucleosomas variando su posición o incluso promoviendo el intercambio de las histonas canónicas por variantes de histonas. La acción conjunta de todos estos mecanismos, y probablemente otros no identificados, contribuyen a la regulación de la cromatina de acuerdo con las necesidades de la célula. Algunas regiones serán silenciadas (telómeros, loci HML y HMR, rDNA, centrómeros, y genes reprimidos en determinadas condiciones), mientras que otras, aquellas que contengan genes transcripcionalmente activos, deberán presentar una estructura de cromatina más descondensada, más accesible a la maquinaria de transcripción. Aún quedan, sin embargo, muchas preguntas por responder para la comprensión de la regulación de la cromatina: descifrar el código de histonas; identificar el mecanismo de acción de los complejos remodeladores de nucleosomas dependientes de ATP; entender cómo diferentes complejos son dirigidos específicamente a su diana de acción y no a otra región diferente; cómo se transmiten las señales que indican que un gen se ha de expresar o que una región del DNA se ha

de reparar, etc. Otra cuestión es la herencia epigenética, es decir, la transmisión de generación en generación de marcas de cromatina que no se encuentran contenidas en la secuencia de DNA. Teniendo en cuenta que tras la duplicación del DNA las nuevas hebras hijas son ensambladas aleatoriamente con histonas parentales y con histonas recién sintetizadas [105], queda por conocerse cómo estas marcas epigenéticas, que son las modificaciones de las histonas y la estructura particular de la cromatina, son mantenidas, heredadas o transmitidas de generación en generación. También son marcas epigenéticas las variantes de histonas o la metilación del DNA.

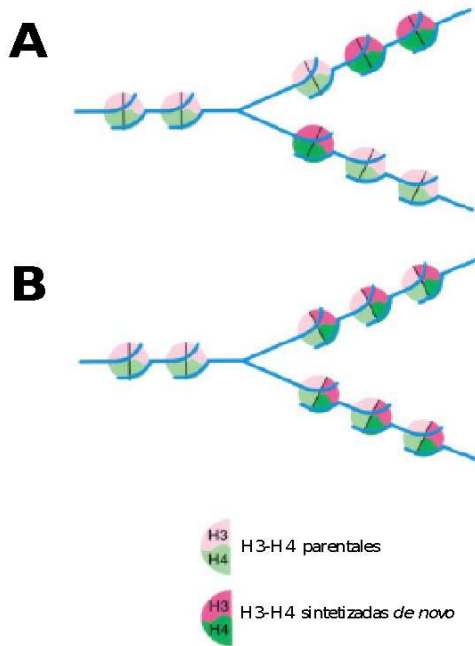
Recientemente se ha identificado que las histonas contienen modificaciones químicas localizadas, además de en el extremo N-terminal, en el dominio globular [7,10]. Cosgrove *et al* (2004) [115] han propuesto un mecanismo que podría resolver algunas de las cuestiones planteadas, referentes a la dinámica de la cromatina. Muchos de los residuos modificables de la región globular se localizan en la superficie exterior del octámero, en la interfaz de interacción DNA-proteína, indicando que estos residuos pueden estar directamente implicados en modular la asociación de histonas con DNA. Así, los enzimas remodeladores de nucleosomas, utilizando la energía de la hidrólisis del ATP, expondrían los residuos que se encuentran ocluidos por la doble hélice de DNA. Una vez expuestos podrían ser modificados por complejos modificadores de histonas, alterándose los contactos histona-DNA. Ahora los nucleosomas tendrían una mayor movilidad y podrían ser desplazados por otros complejos enzimáticos que necesitan acceder al DNA para realizar diferentes funciones (replicación, reparación, recombinación y transcripción). Los nucleosomas podrían regresar a su estado de menor movilidad eliminando las modificaciones reversibles, de nuevo con la ayuda de complejos remodeladores de

nucleosomas dependientes de ATP. Se podrían así clasificar las modificaciones de histonas en dos tipos: clase I, aquellas que afectan principalmente a las colas de las histonas y están implicadas en el reclutamiento de complejos que modifican histonas y/o complejos remodeladores, y clase II, aquellas que alteran las interacciones entre el octámero de histonas y el DNA. En esta clasificación la metilación de DNA pertenecería a las modificaciones de clase I. Este modelo contempla tanto la hipótesis del código de histonas como los cambios estructurales generados por las variaciones en la carga e hidrofobicidad que se producen como consecuencia de las modificaciones postraduccionales. Además explicaría como los enzimas remodeladores de nucleosomas dependientes de ATP pueden mediar tanto la activación como la represión de la transcripción. No hay que olvidar en cualquier caso que se trata sólo de un modelo, será necesario investigar más y obtener nuevos datos para confirmarlo o, por el contrario, refutarlo.

Destino de las histonas

De acuerdo con datos de los que se disponen, el DNA recién replicado se ensambla en cromatina empleando histonas de dos orígenes distintos [105]. En un caso las histonas parentales preexistentes son transferidas, aleatoriamente, a las dos moléculas nacientes de DNA [116]. Se ha postulado que cada nucleosoma parental es desensamblado en un tetrámero $(H3-H4)_2$ y dos dímeros H2A-H2B, y cada tetrámero $(H3-H4)_2$ es segregado aleatoriamente en las dos moléculas hijas de DNA por mecanismos aún desconocidos [116]. En el segundo caso, tetrámeros $(H3-H4)_2$ formados por histonas recién sintetizadas se depositan sobre el DNA, tras lo cual se asocian con dímeros H2A/H2B. Este es un modelo

conservativo (Figura 6A) que implica que las cuatro histonas del tetrámero de un nucleosoma o bien son parentales, o bien son sintetizadas *de novo* [97,117,118]. Sin embargo, recientemente y en base a nuevos datos de asociación de histonas H3 y H4 con complejos ensambladores de cromatina [34,105], se ha propuesto otro modelo de ensamblaje que es semi-conservativo (Figura 6B). En este los tetrámeros parentales $(H3-H4)_2$ son disgregados en dos dímeros H3-H4 que se depositarían en las dos cadenas hijas, y posteriormente se completaría el tetrámero tras la adición de otro dímero de histonas sintetizadas *de novo*. Este modelo implicaría la coexistencia de histonas nuevas y parentales en el mismo nucleosoma, lo que permitiría un mecanismo sencillo para copiar el patrón de modificación de las histonas parentales a las histonas nuevas, aunque realmente no existe ningún dato que lo indique. Los resultados obtenidos por Nakatami y



Tagami *et al.*, 2004.

Figura 6. Modelos de replicación de cromatina. **A**, modelo tetramérico o conservativo. Los tetrámeros $(H3-H4)_2$ parentales se disocian de los nucleosomas y son depositados aleatoriamente en una de las cadenas hijas del DNA. Los tetrámeros $(H3-H4)_2$ sintetizados *de novo* son depositados en la cadena hija de manera dependiente de CAF-1. En este modelo los tetrámeros $(H3-H4)_2$ parentales y sintetizados *de novo* son depositados en nucleosomas diferentes. **B**, modelo dimérico. Los tetrámeros $(H3-H4)_2$ parentales son disociados en dos dímeros H3-H4, que posteriormente serán apareados con dímeros H3-H4 sintetizados *de novo* para formar tetrámeros que serán depositados en las cadenas hijas del DNA. Para simplificar la figura no se han representado los dímeros H2A-H2B.

colaboradores [105] sugieren que H3 canónica y H3.3 pueden coexistir transitoriamente en un mismo nucleosoma. Posteriormente la histona H3 canónica podría ser sustituida por la variante H3.3 mediante una ruta postreplicativa mediada por HIRA. Esto podría constituir un mecanismo de herencia epigenética que permitiría mantener la misma estructura de la cromatina de una generación a otra, con las histonas canónicas y las variantes de histonas localizadas en las mismas regiones.

La síntesis de histonas canónicas o mayoritarias tiene lugar durante la fase S, acoplada a la replicación del DNA [119], y es un proceso altamente regulado. En levadura, la regulación de la síntesis de histonas tiene lugar principalmente a nivel de la transcripción [120], mientras que eucariotas superiores disponen de un mecanismo adicional, que es la regulación de la estabilidad de los mRNA. Existe pues un delicado balance entre la síntesis de histonas y su incorporación en cromatina durante la replicación del DNA, mediada por chaperonas de histonas, las proteínas que se asocian a histonas y participan en su deposición y ensamblaje. Así se mantienen unos niveles mínimos y aproximadamente constantes de histonas libres (Figura 7), ya que un exceso de histonas puede resultar tóxico para la célula [121]. Las histonas, al ser proteínas pequeñas con una elevada carga positiva, podrían unirse inespecíficamente a moléculas con una alta densidad de carga negativa como el DNA, u otros polímeros, generando daños en la célula [122]. Recientemente se ha descrito un mecanismo en levadura que dirige la degradación del exceso de histonas que no han sido empaquetadas en cromatina [121,123] (Figura 7). Las variantes de histonas, al expresarse constitutivamente se incorporan a la cromatina fuera de la fase S, independientemente de la síntesis de DNA. La incorporación a cromatina de estas variantes ocurre a través de otras rutas de ensamblaje diferentes de las rutas que median el ensamblaje de histonas canónicas.



Quivy y Almouzni, 2003.

Figura 7. Destino de las histonas. En este modelo simplificado, las histonas sintetizadas *de novo* se asocian con chaperonas (1) y quedan disponibles para su deposición en DNA (2). Las histonas disponibles pueden interaccionar dinámicamente con Rad53p (3) que puede promover la degradación de histonas (4). Así se mantienen los niveles de histonas no nucleosomales.

En términos generales una chaperona molecular es una proteína que se asocia con una proteína diana evitando su plegamiento incorrecto y la formación de agregados inactivos. Por extensión, las chaperonas de histonas facilitan la interacción de las histonas con otras moléculas sin ser un componente del producto final de la reacción, impidiendo a la vez que interaccionen de forma inapropiada con diversos componentes celulares [124]. Las células disponen de diferentes tipos de chaperonas de histonas, proteínas que se asocian a las histonas y participan en su metabolismo (Figura 8).

La nucleoplasmina y N1/N2 son chaperonas de histonas que fueron inicialmente identificadas en núcleos de oocitos de *Xenopus*, que se asocian a dímeros H2A/H2B y a tetrámeros (H3/H4)₂, respectivamente. Estos complejos liberan histonas progresivamente tras la fertilización, asegurando

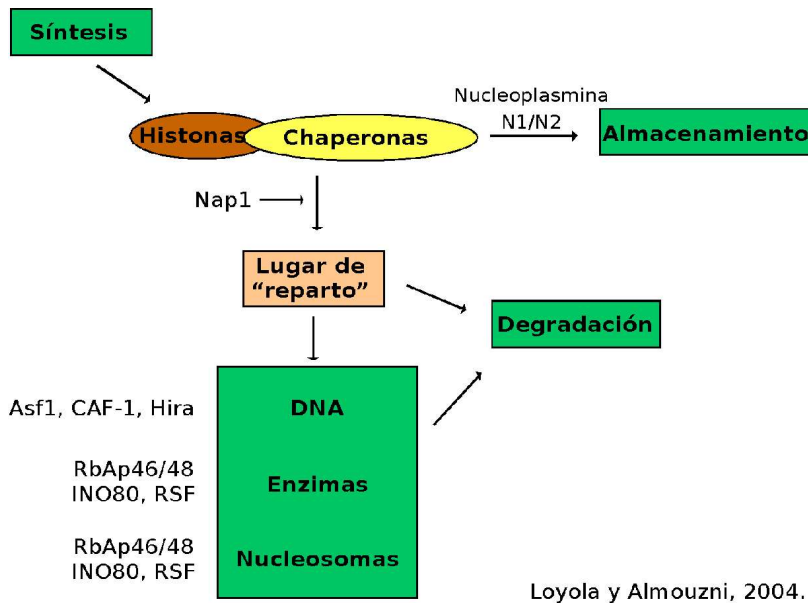


Figura 8. Chaperonas de histonas. La figura muestra una representación del metabolismo de histonas. Una vez sintetizadas interactúan con chaperonas y así son llevadas a su lugar de destino. La Nucleoplasmina y N1/N2 funcionan almacenando histonas, NAP-1 transporta histonas al núcleo, CAF-1 es un factor de ensamblaje de nucleosomas durante la replicación y la reparación, HIRA es un factor de ensamblaje de nucleosomas independiente de la síntesis del DNA, ASF1 es un donador de histonas, y miembros de la familia RbAp46/48 forman parte de complejos multiproteicos con diferentes actividades enzimáticas. Finalmente, para mantener unos niveles apropiados, las histonas son degradadas.

una disponibilidad suficiente de histonas para ensamblar el DNA replicado tras las rápidas divisiones celulares que tienen lugar en el desarrollo temprano [124-127]. No se han identificado miembros de las familias de nucleoplasmina o N1/N2 en levadura, *C. elegans* o en plantas. Este tipo de chaperonas parecen funcionar almacenando histonas [128], haciéndolas disponibles a otras chaperonas para su deposición sobre el DNA, por ejemplo, N1/N2 podría transferir las histonas H3/H4 a la chaperona CAF-1, que a su vez las ensamblaría en DNA. La nucleoplasmina también participa en la descondensación de la cromatina de espermatozoides facilitando, tras la fertilización, la sustitución de protaminas por histonas [129].

La proteína Nap1 (*nuclear assembly protein 1*) une principalmente histonas H2A y H2B, y está conservada desde levadura hasta humanos [130,131]. La función de la proteína Nap1 no se conoce con precisión pero estudios genéticos sugieren un papel en el control del ciclo celular [124,132,133]. En levadura, la delección de *NAP1* produce retraso en la mitosis [134], mientras que en ratones, la delección del homólogo de Nap1 causa letalidad en embriones debido a defectos de neurulación [135]. La proteína Nap1 tiene actividad de ensamblaje de histonas *in vitro*, pero parece que no es suficiente para ensamblar nucleosomas *in vivo* dispuestos periódicamente [136]. Los datos sugieren que el ensamblaje de cromatina es un proceso de múltiples etapas, y Nap1p podría estar implicada en alguna de ellas. En *Drosophila* y en humanos se han descrito proteínas homólogas de Nap1p que se localizan en el núcleo en la fase S y en el citoplasma durante el resto del ciclo celular [136,137], lo que ha llevado a sugerir que Nap1 participa en la importación nuclear de H2A y H2B. También en levadura Nap1p funciona como cofactor en la importación nuclear de H2A y H2B, formando un complejo junto con la carioferina Kap114p y las histonas [132]. Así, Nap1p es una proteína lanzadera nucleocitoplásmica, que aumenta la afinidad y la especificidad de Kap114p por la región de importe nuclear NLS (*nuclear localization sequence*) de H2A/H2B.

Las proteínas RbAp46/48 (*retinoblastoma-associated protein 46/48*) fueron caracterizadas por primera vez en células humanas como proteínas que se unen al supresor de tumores de retinoblastoma [138]. Estas proteínas forman parte de diversos complejos multiproteicos relacionados con la actividad de la cromatina: histona acetiltransferasas (HAT-B, desde levadura hasta humanos), histona desacetilasas (Sin3, desde levadura hasta humanos), remodeladores de nucleosomas dependientes de ATP (NuRD

humana y NURF de *D. melanogaster*), ensambladores de cromatina y complejos implicados en la metilación de histonas (PRC2 de ratón). En estos complejos parece que la interacción con las histonas sustrato de las actividades enzimáticas que residen en ellos, ocurre a través de una subunidad que es miembro de la familia RbAp46/48 (revisado en [124,125,139]).

CAF-1 (*chromatin assembly factor 1*) es un factor que ensambla histonas en DNA recién sintetizado, tanto en procesos de replicación como de reparación del DNA. En levadura CAF-1 es un complejo formado por tres proteínas: Cac1, Cac2 y Cac3 y en humanos por sus respectivos homólogos p150, p60 y p48 [139-141]. La subunidad pequeña Cac3/p48 forma parte de la familia de proteínas RbAp46/48, mencionada anteriormente. El acoplamiento entre la actividad de CAF-1 y la síntesis de DNA es mediada por la interacción de CAF-1 con PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), un factor proteico que mantiene la DNA-polimerasa en el molde de DNA y asegura su procesividad [142-143]. Recientemente se ha descrito que CAF-1 ensambla principalmente la histona H3.1, que es la histona H3 mayoritaria o canónica [105], mediando una ruta dependiente de replicación.

Se ha sugerido que la acetilación de las histonas sintetizadas *de novo* podría ser necesaria para su reconocimiento por los factores ensambladores de nucleosomas. En células humanas una fracción de las moléculas de H4 asociadas con CAF-1 están acetiladas en las lisinas 5, 8 y 12 [144], un patrón que solapa con el de la histona H4 recién sintetizada [50]. Sin embargo, únicamente la delección simultánea de los extremos N-terminales de H3 y H4, o la mutación de las lisinas 5, 8 y 12 junto a la delección del extremo N-terminal de H3, bloquea el ensamblaje de nucleosomas y resulta letal [145,146]. Estos datos dieron lugar a la idea generalizada de que CAF-1 une preferiblemente las histonas H3/H4 acetiladas. Sin embargo

posteriormente se ha encontrado que CAF-1 es capaz de unir y ensamblar eficientemente, *in vitro*, tetrámeros (H3-H4)₂ de histonas que carecen de sus extremos N-terminales, si bien células con estas deleciones no son capaces de sobrevivir [147]. Por tanto, es posible que la acetilación de las histonas H3 y H4 recién sintetizadas faciliten otro aspecto del ensamblaje diferente a la mera unión de histonas por parte de CAF1. Recientemente se ha descrito en levadura que las lisinas localizadas en la región N-terminal de H4 son importantes para su importe al núcleo, y que Cac1p y Kap123p cooperan para asegurar que únicamente las moléculas de H4 debidamente acetiladas sean importadas al núcleo [148].

Además de la función de CAF-1 en el ensamblaje de nucleosomas asociado a la replicación y reparación del DNA, diversos trabajos han puesto de manifiesto que CAF-1 participa en el mantenimiento y formación de la heterocromatina [149-151].

A pesar de que CAF-1 es el único factor de ensamblaje dependiente de síntesis de DNA conocido, los genes *CAC* no son esenciales en diferentes organismos, lo que sugiere que deben existir otras rutas alternativas de ensamblaje de histonas.

Los genes *HIR (histone regulation)* fueron inicialmente identificados en levadura como reguladores negativos de la expresión de histonas [152]. Estos genes codifican para una familia de proteínas muy conservada, que se han encontrado en diferentes especies desde levadura hasta humanos. La deleción de estos genes no es letal, pero produce, al igual que las proteínas *Cac*, defectos de silenciamiento en los telómeros, los loci *HML* y *HMR* y los cinetocoros [153,154].

HIRA, el homólogo en mamíferos, forma parte de complejos que ensamblan nucleosomas durante todo el ciclo celular mediante una ruta

independiente de la replicación del DNA (RI, *Replication-Independent*) [155]. Como ya se ha mencionado HIRA ensambla histonas H4 y H3.3, en zonas transcripcionalmente activas [34,96,97,105].

Por tanto parece ser que mientras que el complejo CAF-1 ensambla H4/H3.1 (histona canónica) en nucleosomas mediante una ruta dependiente de replicación (RD, *Replication-Dependent*) tanto en procesos de reparación del DNA como en la replicación del DNA durante la fase S, HIRA es responsable de ensamblar nucleosomas de H4/H3.3 en regiones transcripcionalmente activas, marcando la eucromatina.

Por otro lado, en levadura, la delección de *HIR* es sintética letal con una mutación del complejo FACT (*facilitates chromatin transcription*), un factor que ayuda a la RNA polimerasa II en la elongación del transcrito actuando como una chaperona que une dímeros H2A/H2B procedentes de octámeros desensamblados de cromatina, y repositándolos tras el paso de la polimerasa [156,157].

El complejo RCAF está formado por la proteína Asf1 (*anti-silencing function*) y las histonas H3 y H4, acetiladas con un patrón de acetilación característico de histonas sintetizadas *de novo* [158,159]. Asf1p podría actuar coordinadamente con CAF-1 en el ensamblaje de nucleosomas, presumiblemente actuando como donador de histonas para CAF-1 [160,161]. La proteína Asf1 de levadura interacciona físicamente con las histonas H3/H4, con la subunidad mediana de CAF-1, Cac1p y con las proteínas Hir [160-163]. La interacción entre Asf1p y las proteínas Hir sugiere que Asf1p también podría actuar donando histonas en el ensamblaje de nucleosomas independiente de la replicación. En un estudio reciente en levadura se ha descrito que Asf1p también puede actuar como aceptor de histonas, promoviendo el desensamblaje de nucleosomas durante la transcripción [164]. Basándose en estos datos algunos autores han

propuesto que Asf1p debe ser un factor de intercambio de histonas que puede aceptar y transferir histonas a factores de ensamblaje de nucleosomas como CAF-1 y HIRA [122,124].

Los complejos remodeladores de nucleosomas también participan en el ensamblaje de cromatina. Por sí solas, las chaperonas de histonas responsables del ensamblaje de la cromatina generan nucleosomas con una separación anormal. La generación de nucleosomas regularmente espaciados requiere la actuación de complejos remodeladores de cromatina. Algunos de estos complejos son ACF (*A*TP-utilizing *c*hromatin assembly and remodeling factor) y CHRAC (*c*hromatin accessibility complex), conservados desde *D. melanogaster* hasta humanos. El complejo ACF parece ser un subcomplejo que constituye el núcleo funcional del complejo CHRAC. Otros complejos descritos son RSF (*r*emodeling and *s*pacing factor) y miembros de la familia CHD1 (*c*hromo-ATPase/helicase-*D*N_A-binding protein 1) de *D. melanogaster*, o INO80 de levadura. En *D. melanogaster* se ha relacionado el complejo CHD1 con el ensamblaje de cromatina activa y ACF con el ensamblaje de cromatina silenciada [122,124,133,165].

La proteína Rad53, una proteína-quinasa de *checkpoint*, también tiene como función participar en la degradación de histonas no ensambladas en cromatina [121]. Los *checkpoints* son mecanismos de vigilancia o de supervivencia de las células que aseguran que procesos críticos del ciclo celular sean iniciados y completados en el orden adecuado. Tras la generación de daños en DNA las respuestas de *checkpoint* detienen el ciclo celular proporcionando tiempo a la célula para reparar las lesiones y mantener su integridad genómica [166]. En la levadura *S. cerevisiae* se han identificado tres *checkpoints* inducibles por daños en DNA que operan en las fases G1, S y G2 del ciclo celular. En ellos la quinasa Rad53p juega un papel

crucial [167,168]. La generación de daños en DNA activa las rutas Rad17/Rad24/Mec3 y Rad9, que convergen en la activación de la cascada de quinasas Mec1/Rad53/Dun1 (Figura 9). La activación de Rad53p provoca el retraso de G1/S como consecuencia de la inhibición de la proteína Swi6, fosforilada por Rad53p. Swi6p es un factor de transcripción implicado en la expresión de las ciclinas *CLN1/CLN2*, que promueven la progresión de la fase G1 [169]. Durante este retraso en G1/S la célula puede reparar las lesiones del DNA.

Sin embargo, la función esencial de Rad53p y Mec1p es promover la síntesis de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) durante la fase S, coincidiendo con la replicación del DNA (Figura 9). La ribonucleótido reductasa (RNR) cataliza la reducción de nucleótidos difosfato (NDPs) en desoxinucleósidos difosfato (dNDPs), el paso limitante de la síntesis de dNTPs. De manera que la actividad de la RNR afecta directamente a los niveles celulares de dNTPs [170]. La actividad de la RNR, y por tanto los niveles de dNTPs, se encuentra finamente regulada de tres modos: regulación alostérica del enzima RNR, inducción transcripcional de los genes *RNR* [171] y degradación del inhibidor de la RNR, Sml1p [170,172,173], siendo en los dos últimos dónde intervienen las quinasas Mec1/Rad53p/Dun1. Células *mec1Δ* o *rad53Δ* son inviables al no poder eliminar a Sml1p y por tanto la RNR no puede sintetizar los niveles de dNTPs requeridos para replicar el DNA. Esta letalidad puede ser rescatada elevando los niveles de dNTPs a través de la disrupción del gen *SML1* o sobreexpresando la RNR. Sin embargo, el hecho de que el doble mutante *rad53Δsml1Δ* presente un fenotipo de crecimiento lento que no presenta el doble mutante *mec1Δsml1Δ*, indica que Rad53p debe tener alguna función adicional en la regulación de la progresión del ciclo celular, independiente de Mec1p.

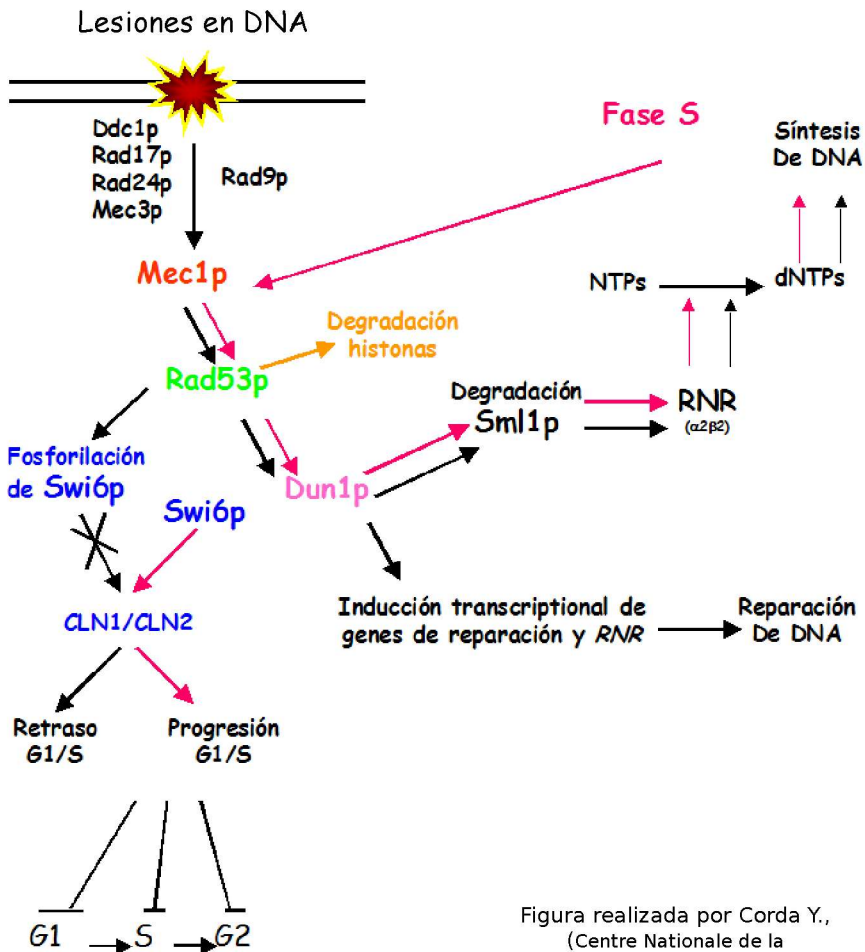


Figura realizada por Corda Y.,
(Centre Nationale de la
Recherche scientifique)

Figura 9. En condiciones normales (flechas rosas), cuando una célula alcanza la fase G1 la proteína Swi6 promueve la síntesis de las ciclinas necesarias para que el ciclo celular progrese. Al llegar a la fase S se activa la ruta de quinasas Mec1/Rad53/Dun1. La quinasa Dun1 fosforila Sml1p, el inhibidor de RNR, dirigiéndolo a su degradación. De esta forma la RNR se activa y sintetiza dNTPs necesarios para la replicación del DNA. Cuando se generan lesiones en DNA (flechas negras), Rad53p fosforila Swi6p inhibiendo la síntesis de ciclinas CLN1/CLN2, necesarias para que progrese la fase G1/S. También se activa la ruta Mec1/Rad53/Dun1, pero esta vez a través de las rutas bifurcadas de Rad9 y Rad17/Rad24/Mec3. De nuevo la quinasa Dun1 fosforila Sml1p regulando su degradación. Al mismo tiempo Dun1 induce la transcripción de los genes RNR y de los genes implicados en reparación de DNA. El modo dual de funcionamiento de Dun1 asegura un rápido incremento de la actividad RNR, necesaria para una eficiente reparación del DNA. Rad53p también regula la degradación de histonas solubles acumuladas (flecha naranja).

Así es, Rad53p pero no Mec1p, está implicada en la degradación de histonas solubles no ensambladas en cromatina. Daños en el DNA o el bloqueo de la replicación genera acumulación de histonas solubles en la célula que son degradadas, para evitar su toxicidad, por una ruta en la que participa Rad53p. Por ello células *rad53Δsm11Δ* presentan una acumulación de histonas solubles, probablemente como consecuencia de la interrupción de la ruta de degradación de histonas solubles.

Complejos histona acetiltransferasa de levadura

En *S. cerevisiae* se han descrito hasta 9 proteínas con actividad HAT: Hat1, Gcn5p, Elp3 y Hpa2, miembros de la familia GNAT; Esa1, Sas2 y Sas3, miembros de la familia MYST; y Taf_i145 y Nut1 que forman parte del factor de transcripción basal TFIID y del complejo *Mediator*, respectivamente [46].

Hat1p fue la primera proteína con actividad HAT identificada en levadura [174]. El gen *HAT1* se aisló analizando actividad HAT de extractos procedentes de mutantes de levadura, sobre un péptido correspondiente a los aminoácidos 1 a 28 de la histona H4. Posteriormente se demostró que Hat1p es la subunidad catalítica de la principal actividad HAT citoplasmática tipo B de levadura [175], un complejo enzimático en el que también se encuentra la proteína Hat2. Los estudios de especificidad realizados con Hat1p en levadura demuestran que, *in vitro*, el enzima acetila principalmente la lisina 12 de la histona H4 libre [174,175]. Basándose en la especificidad de sustrato de este enzima y en su localización subcelular, se han propuesto para esta actividad HAT funciones relacionadas con el ensamblaje de la cromatina tras la replicación del DNA. Así, Hat1p acetilaría la histona H4 libre recién sintetizada previamente a su ensamblaje en

cromatina [174-176].

GCN5 (*general control nonrepressed*), clonado como un coactivador transcripcional [177], fue identificado como histona acetiltransferasa por su similitud con la proteína p55, una actividad HAT nuclear aislada de *Tetrahymena* [177]. Estudios genéticos sobre *GCN5* habían puesto de manifiesto su función en la regulación transcripcional de algunos genes, por tanto, el descubrimiento de la capacidad de acetilar histonas de esta proteína supuso un nexo importante entre la acetilación de histonas y la regulación transcripcional. La lisina 14 de H3 es una de las principales dianas de acetilación de Gcn5p [54], aunque su especificidad varía dependiendo de las proteínas que le acompañen. Hasta el momento se ha identificado que Gcn5p es la subunidad catalítica de al menos tres complejos tipo A diferentes de levadura: ADA (0.8 MDa), SAGA (1.8 MDa) y HAT-A2 (180 kDa) [48]. Los tres complejos contienen, además de Gcn5p, las proteínas Ada2 y Ada3, pero SAGA (*Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferasa*) también contiene proteínas tipo Spt y factores asociados a TBP (*TATA-binding protein*) llamados TAF_{II}s. Se han descrito interacciones genéticas entre el complejo SAGA y el complejo remodelador de cromatina SWI/SNF, lo que sugiere que ambos complejos deben contribuir en la activación transcripcional de determinados genes. Recientemente se ha identificado una proteína nuclear, Sus1, que es capaz de interactuar con el complejo SAGA y con el complejo Sac3-Thp1 implicado en la exportación de RNAs mensajeros. Células *sus1Δ* presentan defectos tanto en la exportación de RNAs mensajeros como en la transcripción de algunos genes [179]. Se ha descrito que la composición y función de SAGA puede ser dinámica, dependiendo de las condiciones en la célula. Cuando se cultivan células en medio rico, el complejo SAGA funciona reprimiendo un grupo de genes de biosíntesis de aminoácidos, función que realiza mediante las proteínas Spt3,

Spt8 y Spt7. Sin embargo, en condiciones de desrepresión actúa una variante del complejo SAGA, el complejo SLIK/SALSA (*SAGA-like/SAGA altered Spt8 absent*) que permite la expresión de este grupo de genes. Este complejo carece de la subunidad Spt8 y contiene la proteína Rtg2 y una versión de Spt7 con el extremo C-terminal truncado. Así pues el complejo puede participar en la modulación positiva o negativa de genes, dependiendo de su composición proteica [47,48]. El complejo ADA, al igual que SAGA, acetila principalmente la histona H3 nucleosomal. Se ha descrito que complejo ADA contiene la subunidad Ahc1 (*ADA HAT complex component 1*), implicada en el mantenimiento de la integridad estructural del complejo. Los complejos SAGA y HAT-A2 no contienen esta subunidad, lo que demuestra que ADA no es un subcomplejo de SAGA, sino que debe tratarse de un complejo distinto. No se conoce la función fisiológica de ADA, pero no se han descrito defectos de transcripción en células mutantes en el complejo. El complejo HAT-A2 está constituido, al menos, por las proteínas Ada2, Ada3 y Gcn5, y este complejo presenta las mismas propiedades de actividad acetiltransferasa sobre histonas y nucleosomas que los otros complejos dependientes de Gcn5p.

Elp3p es una HAT tipo A que parece tener un papel directo en en la elongación de la transcripción. La proteína Elp3 forma parte del complejo *Elongator* que se une al dominio C-terminal hiperfosforilado (CTD) de la RNA polimerasa II, participando en la formación de un holoenzima competente para la elongación. El complejo *Elongator* acetila las histonas H3 y H4 libres o ensambladas en nucleosomas [46-48].

Sobre la proteína Hpa2 poco se sabe. Este enzima acetila *in vitro* las histonas H3 y H4, con una marcada preferencia por la lisina 14 de H3, y también es capaz de autoacetilarse. *In vitro* puede asociarse formando dímeros o tetrámeros, pero se desconoce su función fisiológica, ya que la

delección del gen no ha permitido describir ningún fenotipo [46,47].

La proteína Nut1 es una subunidad del complejo *Mediator*, un complejo multiproteico implicado en la regulación de la transcripción de la RNA polimerasa II, que es capaz de unir nucleosomas. Sólo se ha descrito que la proteína Nut1 tiene actividad HAT *in vitro* [46].

Los genes *SAS2* y *SAS3* (*something about silencing*) se identificaron originalmente en un rastreo diseñado para identificar genes que intensificaran el defecto en el silenciamiento que presentan células *sir1Δ*. Los estudios genéticos mostraron que estos genes muestran efectos opuestos, dependiendo del locus silenciado. Así pues, Sas2p y Sas3p promueven el silenciamiento en el locus *HML* de levadura pero lo antagonizan en el locus *HMR*, mientras que Sas2p también promueve el silenciamiento en los telómeros. La proteína Sas2p se ha identificado como la subunidad catalítica del complejo SAS (450 kDa), un complejo que además contiene las proteínas Sas4 y Sas5 [180]. El complejo SAS acetila la lisina 16 de la histona H4 libre, y hasta hace poco se pensaba que este complejo no era capaz de acetilar nucleosomas. Sin embargo Workman y colaboradores [181] han identificado recientemente que este complejo si acetila H4K16 en sustratos nucleosomales *in vitro*, aunque esta actividad es muy débil. Además el complejo SAS interacciona con las proteínas Asf1 y Cac1 [149], lo cual sugiere que este complejo podría estar implicado en el ensamblaje de nucleosomas. El hecho de que el complejo SAS acetile histonas libres con mayor facilidad que histonas nucleosomales y su posible relación con el ensamblaje de cromatina ha planteado la cuestión de si este complejo se trata en realidad de un complejo tipo B [182]. En concreto la acetilación de la lisina 16 de H4 por el complejo SAS tiene una función antagónica a la histona desacetilasa Sir2p. Por su parte, la proteína Sas3p se ha identificado como la subunidad catalítica del complejo NuA3 (500 kDa), que acetila

exclusivamente la histona H3 nucleosomal. Sas3p media la interacción entre NuA3 y Spt16, un componente del complejo FACT que participa en la elongación de la transcripción.

El gen *ESA1* (*essential SAS2-related acetyltransferase 1*) fue identificado por su homología con Sas2 y Sas3. Células con el gen *ESA1* delecionado son inviables y quedan bloqueadas en la transición G2/M del ciclo celular. La proteína Esa1p es la subunidad catalítica del complejo NuA4 (1.3 MDa), que se ha relacionado con la activación transcripcional. Al igual que sucede con otras proteínas con actividad HAT, la especificidad de sustrato de Esa1p varía en función de si se encuentra libre o formando parte de un complejo. El complejo NuA4 acetila principalmente la histona H4 nucleosomal, y también la histona H2A, mientras que Esa1p acetila las histonas H4, H3 y H2A libres [46,47,183].

Taf_{ii}145 (*TBP associated factor*) es una de las subunidades del factor general de transcripción TFIID, que está implicado en el reconocimiento de la caja TATA en los promotores eucariotas y es requerido para el ensamblaje del complejo de preiniciación de la transcripción por la RNA polimerasa II. Taf_{ii}145 es una histona acetiltransferasa específica de las histonas H3 y H4. Se ha descrito que los nucleosomas inhiben la unión y el acceso de la proteína TBP a la caja TATA, y esta inhibición parece ser mediada por los extremos N-terminales de las histonas. La acetilación de las histonas por Taf_{ii}145 podría entonces facilitar la unión de TBP a la caja TATA y con ello la formación del complejo de preiniciación [47,184].

Mediante análisis bioquímicos, en nuestro departamento, ha sido previamente descrita la presencia de al menos cinco actividades HAT diferentes en *S. cerevisiae* [185,186]. Cuatro de estas actividades corresponden a HATs tipo A, enzimas nucleares capaces de modificar

sustratos nucleosomales, que se han denominado HAT-A1, HAT-A2, HAT-A3 y HAT-A4. El quinto enzima es una actividad HAT tipo B, citoplasmática (ver apartado siguiente). Estos enzimas difieren no solo en su localización subcelular, sino también en su especificidad sobre las histonas. El enzima HAT-A1 acetila las histonas H4 y H2A tanto libres como ensambladas en nucleosomas. HAT-A2 acetila exclusivamente la histona H3 en forma libre y nucleosomal. La subunidad catalítica del complejo HAT-A2 es la proteína Gcn5, y además contiene las proteínas Ada2 y Ada3. Los enzimas HAT-A3 y HAT-B comparten tanto la proteína Hat1 que es la subunidad catalítica, como la proteína Hat2, y ambos acetilan la histona H4 libre, pero no en forma de nucleosomas. Estos dos complejos difieren en su masa molecular (HAT-A3 110 kDa; HAT-B 150 kDa), en su localización subcelular (HAT-A3 es nuclear mientras que HAT-B es citoplasmático) y en su comportamiento cromatográfico. Por último, el complejo HAT-A4 acetila la histona H3 y, en menor medida, la histona H4, tanto libres como ensambladas en nucleosomas. Al igual que para el complejo HAT-A1, no se ha identificado la subunidad catalítica de este complejo.

El complejo HAT-B (Hat1p/Hat2p)

Durante muchos años el único enzima tipo B conocido ha sido el enzima HAT-B, un enzima específico de la histona H4 libre. Sin embargo merece la pena mencionar que recientemente se han identificado, en levadura, otros complejos tipo B. Sklenar y Parthun (2004) [187] han descrito tres HATs tipo B específicas para H3, identificados en fracciones nucleares: HAT-B3.1, HAT-B3.2 y HAT-B3.3. Estos complejos sólo acetilan la histona H3 libre. El complejo HAT-B3.1 (~500 kDa) contiene las proteínas Gcn5 y Ada3, pero a diferencia de otros complejos HAT que contienen Gcn5p, no depende de Ada3p. Por otra parte y como ya ha sido comentado en el apartado anterior,

el complejo SAS debería clasificarse como HAT tipo B dada su baja especificidad para acetilar nucleosomas. Sin embargo, la diana de acetilación del complejo SAS es la lisina 16 de H4, una marca que no se encuentra en la población de histonas sintetizadas *de novo* en ningún organismo dónde se ha estudiado [53,180]. Serán necesarios por tanto más estudios para determinar si el complejo SAS participa en la acetilación de histonas recién sintetizadas o no.

Como ya se ha mencionado las HATs tipo B se caracterizan por acetilar histonas libres, no ensambladas en nucleosomas y por localizarse en el citoplasma. En levadura se describió el enzima HAT-B por primera vez como un enzima citoplasmático con especificidad sobre la histona H4 libre [185,186]. Posteriormente se identificó *HAT1* como el gen que codifica la subunidad catalítica de este enzima [174,175]. Hat1 es una proteína muy conservada en diferentes organismos y ha sido aislado además de en levadura, en *X. leavis*, maíz, humanos, y otros organismos [51,139,188]. Además de la proteína Hat1 (43.87 kDa) que es la subunidad catalítica, se ha identificado otra subunidad del enzima, la proteína Hat2 (45.06 kDa) de levadura o su homólogo RbAp46 (*Retinoblastoma associated protein 46*) de humanos y de *X. leavis*. La proteína RbAp46 pertenece a la familia de proteínas RbAp46/48 de mamíferos, que se caracterizan por su capacidad de interaccionar con histonas. Miembros de esta familia han sido identificados en diferentes complejos relacionados con actividad sobre histonas y/o cromatina, como complejos remodeladores de cromatina, complejos con actividad histona desacetilasa o complejos implicados en el ensamblaje de nucleosomas [139,175]. La masa molecular obtenida para el complejo HAT-B nativo de levadura (150 kDa) sugiere que no debe ser simplemente un heterodímero Hat1/Hat2. En nuestro grupo se ha identificado que las proteínas Hat1/Hat2, además de formar parte del

enzima HAT-B, también forman parte de un complejo HAT nuclear, el complejo HAT-A3 [189]. Este complejo tiene una masa molecular de 110 kDa y al igual que el complejo HAT-B, sólo acetila la histona H4 libre.

En diversos organismos donde ha sido estudiado, la histona H4 recién sintetizada es acetilada en las lisinas 12 y 5 [50]. A este patrón de acetilación, evolutivamente conservado, se le ha asignado una función relacionada con la deposición de histonas y el ensamblaje de la cromatina y coincide, al menos parcialmente, con las posiciones que son modificadas *in vitro* por el complejo HAT-B de diversas especies. *In vitro*, el complejo purificado HAT-B de levadura acetila la lisina 12 de H4 libre, mientras que Hat1p recombinante presenta una especificidad más relajada y es capaz de acetilar las lisinas 5 y 12 de H4 libre, y con menos intensidad la lisina 5 de la histona H2A [174,175]. Los homólogos de Hat1p, tanto en humanos como en maíz, muestran una especificidad similar [139,188,190]. Se ha descrito que Hat2p participa en la especificidad de sustrato del enzima B y además aumenta 10 veces su actividad. También es necesaria la presencia de Hat2p *in vitro* para que el complejo B una la histona H4 de manera estable [139,175]. A pesar de la abundancia de datos sobre la especificidad de sitio de los enzimas HAT-B *in vitro*, no se ha demostrado que *in vivo* sea HAT-B el enzima que acetile las lisinas 5 y 12 de H4.

Durante la fase S las células duplican su DNA y lo ensamblan en cromatina utilizando las histonas parentales e histonas nuevas, sintetizadas de manera coordinada con la replicación del DNA. Las histonas H3 y H4 sintetizadas *de novo* son acetiladas en residuos de lisina específicos del extremo N-terminal [191,192], y posteriormente son incorporadas al DNA junto con las histonas H2A/H2B. Una vez forman parte de la cromatina, las histonas H3/H4 son desacetiladas participando en la maduración de la cromatina [193,194]. Diferentes motivos han llevado a proponer que la

función de HAT-B es acetilar las histonas previamente a su ensamblaje en cromatina. Para empezar, HAT-B únicamente acetila histonas libres pero es incapaz de acetilar nucleosomas y además, ha sido aislada de fracciones citoplasmáticas. Por otro lado, Hat1p/Hat2p y las histonas H3 y H4 acetiladas interaccionan en el citoplasma con la carioferina Kap123, que está implicada en la importación nuclear de H3 y H4 [195]. Por último esta la coincidencia entre el patrón de acetilación de H4 recién sintetizada (lisinas 5 y 12 acetiladas) y la especificidad de HAT-B *in vitro* [51,139,175,190].

A pesar de la frecuente asignación de la acetilación de las lisinas 5 y 12 de H4 recién sintetizada con el ensamblaje de cromatina y también la coincidencia de la especificidad del complejo HAT-B sobre estas posiciones, la sustitución de estas lisinas 5 y 12 de H4 por residuos de arginina o glutamina, por tanto no acetilables, no afectan al ensamblaje ni *in vitro*, ni *in vivo* [145], ni tampoco generan un fenotipo obvio, al igual que la delección de Hat1p o Hat2p. Desde la identificación de los genes codificadores de las proteínas Hat1 y Hat2, componentes del complejo HAT-B, ha resultado llamativo el hecho de que sus delecciones no generen ningún fenotipo aparente. Esto además ha dificultado su caracterización funcional. La sustitución de K5 y K12 de H4 no genera ningún defecto en el ensamblaje, ni siquiera en ausencia del extremo N-terminal de la histona H3 con el que podría ser redundante. Sin embargo la delección simultánea del extremo N-terminal de ambas histonas, o la mutación de las lisinas 5, 8 y 12 junto a la delección del extremo N-terminal de H3, sí bloquea el ensamblaje de nucleosomas *in vivo*, además de ser letal para las células [145,146], indicando que en efecto, los extremos N-terminales de estas histonas sí afectan al correcto ensamblaje de nucleosomas. Sólo algunos estudios más específicos han permitido identificar algunos fenotipos asociados a estos

genes.

Análisis de expresión en mutantes *hat1Δ*, *hat2Δ* y *hat1Δhat2Δ*, empleando *chips* o *microarrays* de DNA que contienen todas las ORFs de levadura, han revelado que el transcriptoma generado en los mutantes simples *hatΔ*, no es muy diferente del transcriptoma de una cepa salvaje. Sin embargo, la comparación del transcriptoma del mutante *hat1Δ* con el del mutante *hat2Δ* muestra mayores diferencias que la comparación con el transcriptoma del salvaje. Ello indica que la respuesta generada por la delección de *HAT1* es contraria a la de la delección de *HAT2*. Estos resultados sugieren que *HAT1* y *HAT2* realizan algunas funciones diferentes, aunque por supuesto, la mayoría si son compartidas, como miembros de un mismo complejo. Cabe resaltar que en el doble mutante se impone una respuesta transcripcional similar a la generada por el mutante *hat1Δ*, pero con un mayor número de genes afectados y cambios más importantes en los niveles de expresión, indicando que la delección de *HAT2* no solo no compensa, sino que además intensifica el fenotipo transcripcional generado en un mutante *hat1Δ* [250].

Recientemente se ha encontrado que *Hat2p*, componente del complejo *HAT-B*, podría estar implicada en el envejecimiento celular. Así se ha encontrado que la delección de *HAT2* alarga la esperanza de vida de las levaduras, entendida como el número de divisiones que una célula realiza antes de morir. Células *hat1Δ* poseen una esperanza de vida similar a la de las células salvajes.

Parthun y colaboradores han descrito que la delección de *HAT1* o *HAT2* en combinación con sustituciones de lisinas 9 y 14 de H3 por argininas, provoca defectos en el silenciamiento telomérico [196]. También la delección de *HAT1* en combinación con sustituciones de las lisinas 9, 18 y 27 de H3 por argininas generan células con una mayor sensibilidad a agentes que

dañan el DNA, indicando que Hat1p esta implicada en la reparación recombinacional de roturas de doble cadena del DNA, presumiblemente mediante la misma ruta que Asf1p ya que células *asf1Δhat1Δ* H3 K9,18,27R presentan una sensibilidad a roturas de doble cadena de DNA, similar a células *hat1Δ* H3 K9,18,27R [197].

Objetivos de la tesis

El enzima HAT-B de levadura está constituido por la subunidad catalítica Hat1p y por la subunidad Hat2p, una proteína que estimula la actividad catalítica de Hat1p. Este enzima, *in vitro*, acetila específicamente las lisinas 12 y 5 de la histona H4 libre, no ensamblada en cromatina, que coincide con el patrón que presenta la histona H4 sintetizada *de novo* descrito para otros organismos en los que ha sido estudiado. Además el complejo HAT-B es habitualmente aislado de fracciones citosólicas. Todo ello hace pensar que podría estar implicado en el ensamblaje de cromatina, aunque no ha sido demostrado hasta el momento que *in vivo* el complejo HAT-B participe en la acetilación de las lisinas 5 y 12 de H4, al igual que no se ha demostrado que la acetilación de estas posiciones sean una marca implicada en el posterior ensamblaje de la histona H4 en cromatina. A pesar de ser el primer enzima con actividad HAT identificado, no es de los que más se ha estudiado y su función aún no ha sido aclarada. El hecho de que la delección de los genes *HAT1* y/o *HAT2* no generen fenotipos evidentes ha dificultado aún más su estudio.

El objetivo de esta tesis es caracterizar el complejo HAT-B de *Saccharomyces cerevisiae*, identificar si contiene alguna subunidad adicional además de Hat1p y Hat2p, y estudiar su actividad y función *in vivo*

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Cepas de microorganismos

En este trabajo se han utilizado las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se muestran en la Tabla IV, donde se detalla el genotipo y la procedencia. Siempre que se trabajó con *Escherichia coli* se empleó la cepa DH5 α .

TABLA IV

CEPA	GENOTIPO	PROCEDENCIA
W303-1a	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, can1-100</i>	R. Rothstein
YSTT49	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, can1-100, hif1Δ::S.pombe his5+</i>	R. Sternglanz
YSTT11	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, can1-100, INO4, hat2Δ::HIS3</i>	R. Sternglanz
RS1263	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, can1-100, hat1Δ::TRP</i>	R. Sternglanz
BQS1156	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112</i>	Dpt. Bioquím. i Biol. Mol. (U. V.)
BQS1187	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, HIF1-Myc9-TRP1</i>	L. Rosaleny
BQS1154	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, HAT1-HA6-TRP1</i>	Ch. Vauhghan
BQS1184	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, HAT1-HA6-TRP1, hif1Δ::natMX4</i>	L. Rosaleny
BQS1172	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, HAT1-HA6-TRP1, hat2Δ::KanMX4</i>	L. Rosaleny
BQS1202	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, HIF1-Myc9-TRP1, hat1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1225	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, HIF1-Myc9-TRP1, hat2Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1304	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, HAT2-HA6-TRP1, hif1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1309	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, HAT2-HA6-TRP1, hat1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1226	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, HIF1-Myc9-TRP1, HAT1-HA6-HIS1</i>	Este trabajo
BQS1306	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, HIF1-Myc9-TRP1, HAT1-HA6-HIS1, hat2Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1426	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, HIF1-Myc9-TRP1, HAT2-HA6-HIS1</i>	Este trabajo
BQS1425	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, HIF1-Myc9-TRP1, HAT2-HA6-HIS1, hat1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo

BQS1367	<i>MAT_a, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, can1-100, hat1Δ::TRP1, hif1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1381	<i>MAT_a, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, can1-100, hat1Δ::TRP1, hif1Δ::KanMX4, hat2Δ::natMX4</i>	Este trabajo
W303-1b	<i>MAT_α, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, can1-100</i>	Este trabajo
BQS1330	<i>MAT_α, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, can1-100, hat1Δ::TRP1</i>	Este trabajo
BQS1332	<i>MAT_{a/α}, ade2-1/ade2-1, ura3-1/ura3-1, his3-11/his3-11, trp1-1/trp1-1, leu2-3, 112/leu2-3, 112, can1-100/can1-100</i>	Este trabajo
BQS1333	<i>MAT_{a/α}, ade2-1/ade2-1, ura3-1/ura3-1, his3-11/his3-11, trp1-1/trp1-1, leu2-3, 112/leu2-3, 112, can1-100/can1-100, hat1Δ::TRP1/hat1Δ::TRP1</i>	Este trabajo
BQS1228	<i>MAT_α, ade2::hisG, his3-200, leu2-0, lys2-0, met15-0, trp1-63, ura3-0, adh4::URA3-TEL (VII-L) hhf2-hht2::MET15, hhf1-hht1::LEU2, pMP3 (TRP1 CEN ARS)-HHF2-HHT2</i>	Este trabajo
BQS1240	<i>MAT_α, ade2::hisG, his3-200, leu2-0, lys2-0, met15-0, trp1-63, ura3-0, adh4::URA3-TEL (VII-L) hhf2-hht2::MET15, hhf1-hht1::LEU2, pMP3 (TRP1 CEN ARS)-HHF2-HHT2, hif1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1232	<i>MAT_α, ade2::hisG, his3-200, leu2-0, lys2-0, met15-0, trp1-63, ura3-0, adh4::URA3-TEL (VII-L) hhf2-hht2::MET15, hhf1-hht1::LEU2, hat1Δ::HIS3, pMP3(TRP1 CEN ARS)-HHF2-HHT2</i>	Este trabajo
BQS1244	<i>MAT_α, ade2::hisG, his3-200, leu2-0, lys2-0, met15-0, trp1-63, ura3-0, adh4::URA3-TEL (VII-L) hhf2-hht2::MET15, hhf1-hht1::LEU2, hat1Δ::HIS3, hif1Δ::KanMX4, pMP3(TRP1 CEN ARS)-HHF2-HHT2</i>	Este trabajo
BQS1230	<i>MAT_α, ade2::hisG, his3-200, leu2-0, lys2-0, met15-0, trp1-63, ura3-0, adh4::URA3-TEL (VII-L) hhf2-hht2::MET15, hhf1-hht1::LEU2, pMP72 (TRP1 CEN ARS)-HHT2 (K9,14R)-HHF2</i>	A. Ruiz-García
BQS1242	<i>MAT_α, ade2::hisG, his3-200, leu2-0, lys2-0, met15-0, trp1-63, ura3-0, adh4::URA3-TEL (VII-L) hhf2-hht2::MET15, hhf1-hht1::LEU2, pMP72 (TRP1 CEN ARS)-HHT2 (K9,14R)-HHF2, hif1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1234	<i>MAT_α, ade2::hisG, his3-200, leu2-0, lys2-0, met15-0, trp1-63, ura3-0, adh4::URA3-TEL (VII-L) hhf2-hht2::MET15, hhf1-hht1::LEU2, hat1Δ::HIS3, pMP72 (TRP1 CEN ARS)-HHT2 (K9,14R)-HHF2</i>	A. Ruiz-García
BQS1246	<i>MAT_α, ade2::hisG, his3-200, leu2-0, lys2-0, met15-0, trp1-63, ura3-0, adh4::URA3-TEL (VII-L) hhf2-hht2::MET15, hhf1-hht1::LEU2, hat1Δ::HIS3, pMP72 (TRP1 CEN ARS)-HHT2 (K9,14R)-HHF2, hif1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
PKY501	<i>MAT_a, ade2-101, arg4-1, his3-201, leu2-3,112, lys2-801, trp1-901, ura3-52, thr-, tyr-, hhf1::HIS3, hhf2::LEU2, pPK626(URA3-HHF2)</i>	M. Grunstein
LDY105	<i>MAT_a, ade2-101, arg4-1, his3-201, leu2-3,112, lys2-801, trp1-901, ura3-52, thr-, tyr-, hhf1::HIS3, hhf2::LEU2, pPK626(URA3 HHF2-K12R)</i>	M. Grunstein
M398	<i>MAT_α, ura3-52, trp1Δ1, his3-200, leu2-1, trk1Δ</i>	J.A. Marsh
M508	<i>MAT_α, ura3-52, trp1Δ1, his3-200, leu2-1, trk1Δ, rpd3Δ::HIS3</i>	J.A. Marsh
BQS1215	<i>MAT_α, ura3-52, trp1Δ1, his3-200, leu2-1, trk1Δ, hat1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1207	<i>MAT_α, ura3-52, trp1Δ1, his3-200, leu2-1, trk1Δ, rpd3Δ::HIS3, hat1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS248	<i>MAT_a, trp1Δ63, ura3-52, his3Δ200</i>	S. Rodríguez-Navarro

BQS1292	<i>MATa, trp1Δ63, ura3-52, his3Δ200, hat1Δ::natMX4</i>	Este trabajo
BQS300	<i>MATα, trp1Δ63, ura3-52, hos1Δ::KanMX4</i>	S. Rodríguez-Navarro
BQS301	<i>MATa, trp1Δ63, ura3-52, hos2Δ::KanMX4</i>	S. Rodríguez-Navarro
BQS302	<i>MATα, leu-, ura3-52, hda1Δ::KanMX4</i>	S. Rodríguez-Navarro
BQS1286	<i>MATα, trp1Δ63, ura3-52, hos1Δ::KanMX4, hat1Δ::natMX4</i>	Este trabajo
BQS1288	<i>MATa, trp1Δ63, ura3-52, hos2Δ::KanMX4, hat1Δ::natMX4</i>	Este trabajo
BQS1290	<i>MATα, leu, ura3-52, hda1Δ::KanMX4, hat1Δ::natMX4</i>	Este trabajo
LPY3498	<i>MATa, his3Δ200, leu2-3,112, trp1Δ1, ura3-52, ESA1</i>	A. Roughton
LPY2990	<i>MATα, his3Δ200, leu2-3,112, trp1Δ1, ura3-52, esa1Δ::HIS3, pLP795 (ESA1 URA3 CEN)</i>	A. Roughton
LPY3291	<i>MATα, his3Δ200, leu2-3,112, trp1Δ1, ura3-52, esa1Δ::HIS3, pLP863 (esa1-Δ414 TRP1 CEN)</i>	A. Roughton
BQS1294	<i>MATα, his3Δ200, leu2-3,112, trp1Δ1, ura3-52, esa1Δ::HIS3, pLP795 (ESA1 URA3 CEN), hat1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1296	<i>MATα, his3Δ200, leu2-3,112, trp1Δ1, ura3-52, esa1Δ::HIS3, pLP863 (esa1-Δ414 TRP1 CEN), hat1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1298	<i>MATa, his3Δ200, leu2-3,112, trp1Δ1, ura3-52, ESA1, hat1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
MCY730	<i>MATa, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1Δ1, his3-Δ200</i>	Dpt. Bioquím. i Biol. Mol. (U. V.)
BQS179	<i>MATa, ura3-52, lys2-801, ade2-101, trp1-Δ1, his3-Δ200, hat1Δ::KanMX3</i>	Dpt. Bioquím. i Biol. Mol. (U. V.)
YAV49	<i>MATa, CAC1-FLAG3::TRP1, sml1Δ::URA3</i>	A. Verreault
BQS1386	<i>MATa, ho, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3, 112, his3-11, ura3-1, CAC1-FLAG3::TRP1, sml1Δ::URA3</i>	Este trabajo
YAG101	<i>CAC1-FLAG3::TRP1, rad53Δ::HIS3, sml1-1, RAD5(URA+)</i>	A. Verreault
BQS1358	<i>MATa, ho, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3, 112, his3-11, ura3-1, CAC1-FLAG3::TRP1, in rad53Δ::HIS3, sml1-1, RAD5(URA+), hat1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1391	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, can1-100, pRAD53::pGAL1-HA3(KanMX4)</i>	Este trabajo
BQS1392	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, can1-100, pRAD53::pGAL1-HA3(KanMX4), hat1Δ::TRP1</i>	Este trabajo
BQS1393	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, can1-100, pRAD53::pGAL1-HA3(KanMX4), hat2Δ::HIS3</i>	Este trabajo
BQS1394	<i>MATa, ade2-1, ura3-1, his3-11, trp1-1, leu2-3, 112, can1-100, pRAD53::pGAL1-HA3(KanMX4), hif1Δ::Sz.pombe his5+</i>	Este trabajo
BQS1399	<i>MATa, ade2-101, arg4-1, his3-201, leu2-3,112, lys2-801, trp1-901, ura3-52, thr-, tyr-, hhf1::HIS3, hhf2::LEU2, pPK626 (URA3-HHF2), HAT1-HA6(TRP1)</i>	S. Ferrando
BQS1401	<i>MATa, ade2-101, arg4-1, his3-201, leu2-3,112, lys2-801, trp1-901, ura3-52, thr-, tyr-, hhf1::HIS3, hhf2::LEU2, pPK626 (URA3-HHF2-K12R), HAT1-HA6(TRP1)</i>	S. Ferrando

BQS1403	<i>MATa, ade2-101, arg4-1, his3-201, leu2-3,112, lys2-801, trp1-901, ura3-52, thr-, tyr-, hhf1::HIS3, hhf2::LEU2, pPK626 (URA3-HHF2), HIF1-HA6(TRP1)</i>	S. Ferrando
BQS1405	<i>MATa, ade2-101, arg4-1, his3-201, leu2-3,112, lys2-801, trp1-901, ura3-52, thr-, tyr-, hhf1::HIS3, hhf2::LEU2, pPK626 (URA3-HHF2-K12R), HIF1-HA6(TRP1)</i>	Este trabajo
BQS1407	<i>MATa, ade2-101, arg4-1, his3-201, leu2-3,112, lys2-801, trp1-901, ura3-52, thr-, tyr-, hhf1::HIS3, hhf2::LEU2, pPK626 (URA3-HHF2), HIF1-HA6(TRP1), hat1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo
BQS1424	<i>MATa, ade2-101, arg4-1, his3-201, leu2-3,112, lys2-801, trp1-901, ura3-52, thr-, tyr-, hhf1::HIS3, hhf2::LEU2, pPK626 (URA3-HHF2-K12R), HIF1-HA6(TRP1), hat1Δ::KanMX4</i>	Este trabajo

Plásmidos

En la Tabla V se detallan los plásmidos que se emplearon como molde de PCR para la obtención de casetes. Con estos casetes se transformaron células de levadura para obtener mutantes de delección, para sustituir promotores o para etiquetar proteínas.

TABLA V

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pFA6a-kanMX4	Plásmido para la obtención de casete de integración con el marcador kanMX4, un gen de resistencia a kanamicina del transposón Tn903 de <i>E. coli</i> , bajo el control de las secuencias de regulación de la transcripción del gen <i>TEF</i> de <i>A. gossypii</i> . Este casete sirve para deleccionar genes por substitución.	Wach <i>et al.</i> (1994) [198].
pAG25 [pFA6a-natMX4]	Plásmido para la obtención de casete de integración con el marcador natMX4, un gen que confiere resistencia a nourseotricina codificado por el gen <i>NAT1</i> de <i>S. noursei</i> . Este casete sirve para deleccionar genes por substitución.	Goldstein y Mccusker, (1999) [199].
pFA6a-TRP1	Plásmido para la obtención de casete de integración con el marcador <i>TRP1</i> de <i>S. cerevisiae</i> . Este casete sirve para deleccionar genes por substitución.	Longtine <i>et al.</i> (1998) [200].
pFA6a-His3MX6	Plásmido para la obtención de casete de integración con el marcador His3MX6 (incluye el gen <i>his5</i> de <i>S. pombe</i>). Este casete sirve para deleccionar genes por substitución.	Longtine <i>et al.</i> (1998) [200].

pFA6a-3HA-kanMX6	Plásmido para la obtención de casete de integración con el marcador kanMX6. Este casete sirve para etiquetar genes con el epítopo 3HA en el extremo Ct.	Longtine <i>et al.</i> (1998) [200].
pFA6a-13Myc-kanMX6	Plásmido para la obtención de casete de integración con el marcador kanMX6. Este casete sirve para etiquetar genes con el epítopo 13Myc en el extremo Ct.	Longtine <i>et al.</i> (1998) [200].
pYM2-3HA-His3MX6	Plásmido para la obtención de casete de integración con el marcador His3MX6 (incluye el gen <i>his5</i> de <i>S. pombe</i>). Este casete sirve para etiquetar genes con el epítopo 3HA en el extremo Ct.	Knop <i>et al.</i> (1999) [201].
pYM3-6HA-kITRP1	Plásmido para la obtención de casete de integración con el marcador <i>TRP1</i> de <i>K. lactis</i> . Este casete sirve para etiquetar genes con el epítopo 6HA en el extremo Ct.	Knop <i>et al.</i> , (1999) [201].
pYM6-9Myc-kITRP1	Plásmido para la obtención de casete de integración con el marcador <i>TRP1</i> de <i>K. lactis</i> . Este casete sirve para etiquetar genes con el epítopo 9Myc en el extremo Ct.	Knop <i>et al.</i> (1999) [201].
pFA6a-kanMX6-pGAL1	Plásmido para la obtención de casete de integración con el marcador kanMX6. Este casete sirve para substituir el promotor de un gen por el promotor <i>pGAL1</i> .	Longtine <i>et al.</i> , (1998) [200].
pFA6a-kanMX6-pGAL1-3HA	Plásmido para la obtención de casete de integración con el marcador kanMX6. Este casete sirve para substituir el promotor natural de un gen por el promotor <i>pGAL1</i> y, simultáneamente, etiquetar el mismo gen con el epítopo 3HA en el extremo Nt.	Longtine <i>et al.</i> (1998) [200].
pFA6a-His3MX6-pGAL1-3HA	Plásmido para la obtención de casete de integración con el marcador His3MX6 (incluye el gen <i>his5</i> de <i>S. pombe</i>). Este casete sirve para substituir el promotor natural de un gen por el promotor <i>pGAL1</i> y, simultáneamente, etiquetar el mismo gen con el epítopo 3HA en el extremo Nt.	Longtine <i>et al.</i> , (1998) [200].

Anticuerpos

En la Tabla VI se indican los anticuerpos empleados y las concentraciones de trabajo. En el caso de los análisis *Western blotting* se indican las concentraciones empleadas para un posterior revelado con el reactivo *ECL Advanced Western blotting*, de AMERSHAM BIOSCIENCES. En el caso de emplear el reactivo *ECL Western blotting*, de AMERSHAM BIOSCIENCES, las concentraciones utilizadas fueron 10 veces más elevadas.

TABLA VI

ANTICUERPO	APLICACIONES	CASA COMERCIAL
Anti-Acetil-Histone H4 (Lys5) IgG policlonal de conejo a la concentración suministrada por la casa comercial.	WB: (1:10000). Secundario a (1:25000).	Abcam
Anti-Acetil-Histone H4 (Lys8) Grado ChIP, IgG policlonal de conejo a la concentración suministrada por la casa comercial.	WB: (1:20000) Secundario a (1:50000).	Upstate biotechnology
Anti-Acetyl-Histone H4 (Lys12) IgG policlonal de conejo a 1 mg/mL	WB: (1:5000). Secundario a (1:25000).	Upstate biotechnology
Anti-Acetil-Histone H4 (Lys16) Grado ChIP, IgG policlonal de conejo a la concentración suministrada por la casa comercial.	WB: (1:30000). Secundario a (1:50000).	Upstate biotechnology
Anti-H4 recombinante IgG policlonal de conejo a la concentración suministrada por la casa comercial.	WB: (1:20000). Secundario a (1:25000).	Abcam
Anti-Acetil-Histone H3 (Lys9) IgG policlonal de conejo a 1mg/mL.	WB: (1:20000). Secundario a (1:50000).	Upstate biotechnology
Anti-Acetil-Histone H3 (Lys14) IgG policlonal de conejo a la concentración suministrada por la casa comercial.	WB: (1:50000). Secundario a (1:100000).	Upstate biotechnology

Anti-Acetil-Histone H3 (Lys23) Grado ChIP, IgG policlonal de conejo a la concentración suministrada por la casa comercial.	WB: (1:25000). Secundario a (1:50000).	Upstate biotechnology
Anti-Acetil-Histone H3 (Lys27) IgG policlonal de conejo a la concentración suministrada por la casa comercial.	WB: (1:100000). Secundario a (1:150000).	Upstate biotechnology
Anti-Ct H3 IgG policlonal de conejo a la concentración suministrada por la casa comercial.	WB: (1:20000). Secundario a (1:50000).	Abcam
Anti-HA Anticuerpo monoclonal de ratón (clon 12CA5) a 0.4 mg/mL	WB: (1:20000). Secundario a (1:40000). IP: 10 µg/mL.	Roche Applied Science
Anti-HA High affinity Anticuerpo monoclonal de rata (clon 3F10) a 0.1 mg/mL	IF: (1:50). Secundario a (1:500). IP: 10 µg/mL.	Roche Applied Science
Anti-c-Myc Anticuerpo monoclonal de ratón (clon 9E10) a 0.4 mg/mL	WB: (1:5000). Secundario a (1:40000). IF: (1:100). Secundario a (1:500). IP: 10 µg/mL.	Roche Applied Science
Anti-HA IgG policlonal de conejo (Y-11) a 0.2 mg/mL	WB: (1:6000). Secundario a (1:40000).	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Rabbit IgG de cordero unido a peroxidasa (HRP) a la concentración suministrada por la casa comercial.	análisis WB (anticuerpo secundario)	Amersham farmacia biotech
Anti-Mouse IgG de mono unido a peroxidasa (HRP) a la concentración suministrada por la casa comercial.	análisis WB (anticuerpo secundario). Ver concentración según el caso.	Amersham farmacia biotech
Anti-Rat IgG de cabra marcado con Alexa Fluor 546 a 2 mg/mL	IP (anticuerpo secundario). Ver concentración según el caso.	Molecular Probes
Anti-Mouse IgG de conejo marcado con Alexa Fluor 546 a 2 mg/mL	IP (anticuerpo secundario). Ver concentración según el caso.	Molecular Probes

Productos de especial interés

Los siguientes productos se adquirieron a las casas comerciales indicadas:

3,4-DCI: CALBIOCHEM y MERCK

4-nitroquinolina-n-óxido: SIGMA

Acetil-CoA [$1-^{14}\text{C}$]: AMERSHAM BIOSCIENCES
Camptotecina: SIGMA
ClonNat (Nourseotricina): WERNER BIOAGENTS
DAPI: SIGMA
E64: SIGMA
Factor alfa: SIGMA y CALBIOCHEM
Fleomicina, de *Streptomyces verticillus*: SIGMA
Geneticina (G418): ROCHE
Hidroxiurea: SIGMA
Iodoacetamida: MERCK
Ioduro de propidio: SIGMA
Metilmetanosulfonato: SIGMA
Nocodazol: SIGMA
PMSF: ROCHE
Ponceau S: SIGMA
Pronasa Tipo XIV, de *Streptomyces griseus*: SIGMA
Quimostatina: CALBIOCHEM y MERCK
Rapamicina: CALBIOCHEM y MERCK
Zimoliasa 20T, de *Arthrobacter Luteus*: SEIKAGAKU CORPORATION

Medios de cultivo

Medios de cultivo para E. coli.

Las bacterias se crecieron en medio Luria-Bertani o LB [1 % (p/v) triptona, 0.5 % (p/v) extracto de levadura, 1 % (p/v) NaCl]. Los medios de cultivo se suplementaron con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina para seleccionar el crecimiento de bacterias que contienen plásmido con el gen marcador β -*lactamasa*.

Medios de cultivo para S. cerevisiae

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento de levaduras fueron: medio rico o YPD [1 % (p/v) extracto de levadura, 2 % (p/v) peptona bacteriológica, 2 % (p/v) glucosa]; medio mínimo sintético o SD [0.67 % (p/v) *Yeast Nitrogen Base* sin aminoácidos, 2 % (p/v) glucosa] suplementado con los aminoácidos apropiados a 40 mg/L, y medio completo o SC [0.67 % (p/v) *Yeast Nitrogen Base* sin aminoácidos, 2 % (p/v) glucosa, 0.067 % (p/v) *Drop Out Mix* completo sintético]. El *Drop Out Mix*, de BIO101, contiene todos los aminoácidos proteicos. Los medios de cultivo sólidos se prepararon de la misma manera, pero añadiendo agar bacteriológico al 2 % (p/v).

Las cepas que tienen el promotor natural de un gen sustituido por un promotor de expresión fuerte regulado por galactosa (*GAL*), se crecieron en medios de cultivo que contenían galactosa en lugar de glucosa a la misma concentración, tanto en medio rico como en medio mínimo.

Las cepas que contienen alguna manipulación en el genoma como la delección de un gen, la sustitución de un promotor o el etiquetado de un gen, con frecuencia contienen asociado un gen marcador de selección que confiere resistencia a kanamicina y derivados (casete *kanMX*) o a nourseotricina (casete *natMX*). Para seleccionar las células que contienen estas resistencias se suplementaron los medios de cultivo con geneticina (G418) a 200 µg/mL o con nourseotricina a 100 µg/mL, respectivamente.

En los estudios de silenciamiento se utilizaron placas de medio SC con FOA (ácido 5-fluoroorótico) 0.1 % (p/v).

La disolución KSM [0.5 % (p/v) acetato potásico] se empleó como medio para la esporulación de células diploides.

Para estudiar la respuesta celular a diferentes agentes que dañan el

DNA, se añadieron éstos al medio de cultivo a distintas concentraciones. El metilmetanosulfonato se añadió a una concentración de 0.04 % (v/v), la fleomicina a 25 µg/mL, la camptotecina a 20 µg/mL, la 4-nitroquinolina n-óxido a 5 µg/mL y el peróxido de hidrógeno a 1 mM. La tricostatina A, un inhibidor de histona desacetilasas, se añadió al medio a una concentración final de 10 µM y además se añadió a 1 µM en las disoluciones empleadas durante el proceso de extracción.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 120°C. Las disoluciones de aminoácidos proteicos y antibióticos se esterilizaron por filtración empleando filtros de un tamaño de poro de 0.2 µm (MINISART, SARTORIUS). Las células de levadura se crecieron a 25°C, 28°C o 37°C según el experimento. Las bacterias fueron crecidas a 37°C.

Manipulaciones genéticas

Deleciones de genes, etiquetado de proteínas y sustitución de promotores

Para realizar estas manipulaciones a nivel genómico se siguió una estrategia de integración dirigida de un casete, construido por nosotros. Estos casetes contienen un gen marcador flanqueado de secuencias de DNA homólogas a las secuencias del gen diana que queremos etiquetar o deletar. Los genes marcadores con los que trabajamos son KanMX, que confiere a la célula resistencia al antibiótico geneticina; NatMX que confiere resistencia a la nourseotricina; o genes que completan la ruta de síntesis de un aminoácido (las auxotrofías empleadas en este trabajo fueron *TRP1* de *S. cerevisiae* o de *K. lactis*, e *his5* de *S. pombe*), permitiendo a la célula crecer en medios de cultivo carentes en ese aminoácido. Los casetes se

amplificaron por PCR utilizando los oligos adecuados y plásmidos como molde. En función del tipo de manipulación que se pretendía realizar, sustitución de promotores, delección o etiquetado de genes, se emplearon diferentes plásmidos como molde. Para la delección de genes se emplearon los plásmidos descritos por Wach *et al.* (1994) [198], por Goldstein *et al.* (1999) [199], y por Longtine *et al.* (1998) [200]. Para la obtención de casetes para el etiquetado de proteínas con los epítomos HA o Myc, se emplearon como molde plásmidos descritos por Longtine *et al.* (1998) [200] y Knop *et al.* (1999) [201]. Por último, la sustitución de promotores se realizó empleando una estrategia similar, utilizando como molde los plásmidos descritos por Longtine *et al.* (1998) [200]. Todos los plásmidos se encuentran detallados en la Tabla V.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se empleó la Taq DNA polimerasa *BioTaq* (BIOLINE). Se preparó una mezcla de reacción conteniendo el tampón provisto por la casa comercial, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 μM de cada oligo, y DNA molde (0.2 ng/μL si se trata de DNA plasmídico o 1.5 ng/μL en el caso del DNA genómico). Finalmente se añadió 1 unidad de Taq DNA polimerasa por cada 25 μL de mezcla de reacción. La preparación se alicuotó en fracciones de 25 o 100 μL y se colocaron en un termociclador (MASTERCYCLER PERSONAL, de EPPENDORF). Las condiciones de reacción utilizadas fueron 5 minutos a 94° C, 30 ciclos de de 1 minuto a 94° C, 2 minutos a 50-55° C y 3 minutos a 72° C, y una extensión final de 5 minutos a 72° C.

Transformaciones de levadura

Las células de levadura fueron transformadas con plásmidos o con productos de PCR, siguiendo el método basado en acetato de litio

optimizado. Se recogieron aproximadamente $2 \cdot 10^8$ células de un cultivo, centrifugando 5 minutos a 500xg. El sedimento de células se resuspendió en 200 μ L de acetato de litio 0.1 M, y se añadieron 50 μ g de DNA de salmón previamente hervido (DNA de salmón a 10 μ g/ μ L, fragmentado por sonicación a un rango de tamaños de 2 a 15 kb), y 100 ng de DNA transformante, plásmido o casete. Tras agitar bien la mezcla se añadieron 1.2 mL de una disolución que contiene PEG 4000, 40 % (p/v) y acetato de litio 0.1 M. La suspensión se incubó durante 30 minutos a 28° C y después se sometió a un choque térmico de 20 minutos a 42° C. Para seleccionar los transformantes las células se sembraron en medio mínimo selectivo, si el gen marcador del plásmido o casete complementa para una auxotrofia propia de la cepa. En el caso de utilizar kanMX4 o NatMX4 como gen marcador las cepas se incubaron a 28° C en YPD fresco durante dos duplicaciones tras el choque térmico, antes de sembrarlas en placas con el antibiótico correspondiente.

Técnicas de biología celular

Sincronización de levadura

Se prepararon cultivos de levadura y se incubaron a 28° C hasta alcanzar una $OD_{600} = 0.35$. Para sincronizar las células en fase G1 se añadió al cultivo factor α a 3 μ g/mL y se incubó a 25° C con agitación orbital. A la hora y media de incubación se añadió más factor α , esta vez a 1.5 μ g/mL y se incubó durante otra hora y media. El cultivo se sonicó con tres pulsos de 10 segundos, descansando 10 segundos después de cada pulso, empleando un sonicador VIBRACELL VCX500 y una sonda modelo CV33, de SONICS AND MATERIALS. Para comprobar el bloqueo de las células en fase G1 se tomó

una alícuota de células y se contaron células sin yema con la ayuda de un microscopio (NIKON JAPAN ALPHAPHOT YS2-H, con aumentos 10X y 40X). En este punto se obtuvieron porcentajes de células sin yema, paradas en G1, de al menos el 98 %. Para liberar las células y permitir que inicien una nueva ronda de replicación, esta vez de forma sincronizada, se recogieron las células centrifugando el cultivo durante 5 minutos a 1000xg. Las células sedimentadas se resuspendieron en medio de cultivo fresco conteniendo 50 µg/mL de pronasa tipo XIV, una proteasa que degrada el factor α . A partir de este momento se tomaron varias muestras a distintos tiempos para realizar diferentes análisis. Por un lado se tomaron volúmenes conteniendo aproximadamente $1 \cdot 10^7$ células para análisis por *Western blotting* de los niveles de histona, histona acetiladas y de Hat1p a lo largo del ciclo. Tras añadir azida sódica hasta una concentración final de 10 mM, las células se recogieron por centrifugación 30 segundos a 5000xg y se lavaron una vez con azida sódica 10 mM. Las células se congelaron a continuación con nitrógeno líquido y se conservaron a -80° C hasta el momento de su procesamiento, como se describe más adelante (ver apartados *Preparación de extractos proteicos totales para análisis por Western blotting* y *Fraccionamiento celular para análisis por Western blotting e inmunoprecipitación*). Por otro lado el grado de sincronización se siguió determinando el índice de gemación por visualización microscópica y conteo de células con yema, y también por análisis FACS. Para el análisis FACS se tomaron 0.25 mL de cultivo a cada tiempo y tras añadir 1 mL de etanol 70 % para fijar las células, se conservaron a 4° C hasta su procesamiento. Las células se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 1000xg, se resuspendieron en 0.25 ml de tampón Tris-HCL 50 mM pH 7.5 conteniendo RNasa A a 1 mg/ml y se incubaron a 37° C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo se sedimentaron de nuevo y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente con 0.5 ml de pepsina disuelta a 5 mg/ml

en HCl 50 mM. Finalmente las células se tiñeron resuspendiéndolas en 0.8 ml de disolución de yoduro de propidio [Tris-HCl 180 mM pH7.5, NaCl 180 mM, MgCl₂ 70 mM, yoduro de propidio 5 mg/l]. El contenido de DNA se analizó en un citómetro de flujo EPICS XL (COULTER INC.).

En experimentos de sincronización, además del factor α , se emplearon otros compuestos que detienen el avance del ciclo celular en distintas fases [202]. El nocodazol, una droga que desestabiliza microtúbulos provocando la parada del ciclo en fase G2/M, se empleó a 15 $\mu\text{g/ml}$. La hidroxiurea detiene el ciclo celular en fase S, al inhibir a la ribonucleótido reductasa y provocar por tanto el agotamiento de desoxirribonucleótidos precursores de la síntesis del DNA. Este compuesto se empleó a concentración 200 mM sobre el cultivo de levadura. La rapamicina inhibe proteínas quinasas de la ruta TOR y provoca, al igual que el factor α , el bloqueo de las células en G1, aunque el grado de sincronización alcanzado no es tan bueno como el obtenido con factor α . La rapamicina se utilizó a una concentración de 0.2 $\mu\text{g/mL}$. Las sincronizaciones de células con estas drogas se realizaron de forma similar a la descrita con factor α , añadiéndolas a las concentraciones indicadas e incubando los cultivos durante aproximadamente 3 horas a 25°C con agitación orbital. Para liberar las células bloqueadas con nocodazol se centrifugaron 5 minutos a 500xg y se lavaron 2 veces con DMSO al 1 % (v/v), y finalmente se resuspendieron en YPD. Las células bloqueadas con rapamicina y con hidroxiurea se liberaron de la misma manera, pero los lavados se realizaron con agua. A partir de este momento se tomaron muestras de células a lo largo del ciclo para seguir el índice de gemación, para análisis FACS y para análisis de proteínas como se ha descrito anteriormente.

El crecimiento de levaduras en medio sin nitrógeno provoca la parada de las células en fase G0. Para estudiar el contenido de histonas acetiladas en

esta fase se recogieron células de un cultivo en fase de crecimiento exponencial por centrifugación durante 5 minutos a 1000xg. Las células se resuspendieron en medio de cultivo SD-N, que carece de una fuente de nitrógeno [0.67 % (p/v) *Yeast Nitrogen Base* sin aminoácidos y sin sulfato amónico, 2 % (p/v) glucosa]. Las células se incubaron en este medio de cultivo durante 10-14 horas a 28°C, hasta quedar bloqueadas en fase G0 (células aisladas y sin yema). Tras realizar un conteo de células sin yema y comprobar por visualización microscópica que las células se encontraban bloqueadas en G0, se centrifugaron 5 minutos a 1000xg y se resuspendieron en un medio de cultivo rico. A partir de este momento se recogieron alícuotas del cultivo cada hora durante un tiempo total de 8 horas, en el que aproximadamente todas las células han completado un ciclo celular. Si bien este tratamiento no sincroniza las células, si permite acumularlas en fase G0 al menos durante su incubación en ausencia de nitrógeno.

Obtención de diploides y disección de tétradas

Se realizaron experimentos de conjugación en placa empleando como control dos cepas salvajes de sexo opuesto, MATa y MAT α . Cada una de estas cepas contiene un plásmido que permite seleccionar por auxotrofia a histidina o a uracilo, de manera que en un medio de cultivo sin histidina ni uracilo solo podrán crecer células diploides que hayan conjugado y por tanto contendrán ambos plásmidos [202]. Se prepararon cultivos de células MATa salvajes (W303-1a) a una concentración de $1 \cdot 10^7$ células/mL y se prepararon varias diluciones 1:10 hasta obtener concentración de 100 células/mL. Se sembraron 10 μ L de cada una de las diluciones por goteo y se incubaron durante una noche a 28° C. Paralelamente se sembraron células MAT α salvajes (W303-1b) en medio de cultivo SD suplementado con los

aminoácidos apropiados y se dejó crecer a saturación durante una noche a 28° C. Las células de este cultivo se recogieron centrifugando 5 minutos a 500xg y se extendieron en césped sobre una placa, con la ayuda de una asa de vidrio. Tras realizar réplicas de la cepa MAT α , sembrada por goteo, y de la cepa MAT α , sembrada en césped sobre una misma placa de medio de cultivo YPD, se incubó a 28° C entre 2 y 10 horas, permitiendo así la conjugación entre las células de sexo opuesto. Transcurrido este tiempo se volvieron a hacer réplicas a placas de medio de cultivo SD sin histidina ni uracilo, para seleccionar el crecimiento de diploides. En paralelo se realizó el mismo experimento pero con dos cepas *hat1* Δ de sexo opuesto; RS1263, MAT α y BQS1330, MAT α , que también contienen un plásmido que permite seleccionar por crecimiento en ausencia de histidina y/o uracilo.

Para inducir la esporulación de células diploides, se inocularon células diploides salvajes (BQS1332) y *hat1* Δ (BQS1333) en medio de esporulación KSM a razón de $1 \cdot 10^7$ células/mL y se incubaron a 28°C durante 4-5 días [202]. Tras la esporulación se digirieron las ascas incubándolas en una disolución de Zimoliasa 20T (20000 U/g, SEIKAGAKU) a 1 mg/ml en agua con 10 mM mercaptoetanol, durante 30 minutos a 37°C. Para la disección se empleó un micromanipulador LABOPHOT-2 de NIKON, acoplado a un microscopio NIKON JAPAN CFWN 15X/14, con un aumento 10X.

Esperanza de vida

La esperanza de vida de células de levadura, definida como el número de divisiones que sufre una célula antes de morir, se determinó como describen Kennedy *et al.* (1995) [203] y Kim *et al.* (1999) [204]. Se sembraron células procedentes de un cultivo en medio líquido en placas de YPD y se aislaron células con la ayuda de un micromanipulador LABOPHOT-2 de NIKON acoplado a un microscopio NIKON JAPAN CFWN 15X/14,

empleando un aumento 10X. Las placas se incubaron a 28°C y tras la primera división se separó y eliminó la célula madre, identificada por su mayor tamaño, y la célula hija que acaba de “nacer” y que es una célula virgen que aun no ha sufrido ninguna división, se reservó. De esta manera se aislaron aproximadamente 60 células vírgenes, colocando hasta 30 células vírgenes por placa. Las células se incubaron a 28° C y periódicamente se examinaron al microscopio. La esperanza de vida se determinó contando el número de células hijas o divisiones de cada una de éstas 60 células vírgenes aisladas, eliminando siempre la célula hija tras cada división y reservando la célula madre. Para detener el crecimiento durante las noches del periodo de tiempo de desarrollo del experimento, las placas se guardaron a 4° C tras su incubación durante 10 minutos sobre hielo. Estos experimentos duraron aproximadamente 2 semanas.

Inmunofluorescencia indirecta

Esta técnica permite visualizar la localización subcelular de una proteína. Es necesario disponer de un anticuerpo que reconozca directamente la proteína diana, o alternativamente una etiqueta que previamente habrá sido fusionada a la proteína que se quiere estudiar. En los experimentos que se describen a continuación se optó por esta segunda posibilidad. Los experimentos de inmunofluorescencia indirecta se realizaron como se describe en Queralt e Igual (2003) [205]. Aproximadamente $1 \cdot 10^8$ células crecidas a 28°C en fase exponencial se fijaron añadiendo formaldehído 37 % (v/v) en proporción 1/10 al medio de cultivo, e incubando 1 hora a 28° C. Después de esta incubación la suspensión celular se sonicó con tres pulsos de 10 segundos, descansando 10 segundos entre cada dos pulsos (sonicador VIBRACELL VCX500 y sonda modelo CV33, de SONICS AND MATHERIALS). Las células se recogieron por

centrifugación y se lavaron un par de veces con 1 mL de solución A [1.2M sorbitol, 50 mM KPO₄, pH 7.0]. Para permitir que el anticuerpo pueda penetrar en el interior de las células, se digirió la pared celular. Para ello las células se resuspendieron en 500 µL de solución A, conteniendo 100 µg/mL de Zimoliasa 20T y 0.1 % (v/v) de 2-mercaptoetanol y se incubaron a 35° C durante 60 minutos. Las células así tratadas se lavaron 3 veces con 1 mL de solución A, y finalmente se resuspendieron en 1 mL de solución A. De esta suspensión se tomaron alícuotas de 100 µL y se recogieron las células centrifugando durante 5 minutos a 500xg. El sedimento de células se incubó durante toda una noche a 4° C, resuspendido en 10 µL de PBS [150 mM NaCl, 50 mM NaPO₄, pH 7.4] que contiene 0.1 % (p/v) BSA y el anticuerpo primario [anti-HA de rata o anti-Myc de ratón, Tabla VI] a concentración de 2 µg/mL. Al día siguiente las células se lavaron sucesivamente con 500 µL de PBS, 500 µL de PBS-NP40 0.1 % (v/v) y con otros 500 µL de PBS. Por último se resuspendieron e incubaron durante 4 horas en 10 µL de PBS-BSA conteniendo el anticuerpo secundario [anti-rata o anti-ratón conjugados con el fluoróforo Alexa546, Tabla VI], a concentración de 4 µg/mL. Las células se lavaron como antes. El DNA de las células se tiñó por incubación durante 5 minutos en 10 µL de PBS conteniendo 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) a 5 µg/mL. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia AXIOSKOP de ZEISS INC, y se fotografiaron con una cámara SPOT de DIAGNOSTIC INSTRUMENT INC.

Técnicas bioquímicas

Obtención de extractos con actividad enzimática HAT

Se prepararon extractos con actividad enzimática HAT según el método

descrito en Ruiz-Garcia *et al.* (1998) [189]. Las células de levadura de un cultivo en fase de crecimiento exponencial se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 500xg, se lavaron con agua destilada y se determinó su peso húmedo. Las células se resuspendieron en tampón de pretratamiento [tampón de digestión, ver composición más abajo, con 75 mM de 2-mercaptoetanol], a razón de 4 mL por gramo de células y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación las células se sedimentaron centrifugando como antes y se resuspendieron a razón de 4 mL/g con tampón de digestión [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1M sorbitol]. Tras añadir 2 mg de Zimoliasa 20T por g de células, la suspensión se incubó durante 40-60 minutos a 35°C. Después de añadir 12 mL/g de células, de tampón de lavado frío [50 mM MES pH 6.0, 5 mM MgCl₂, 1M sorbitol, con los inhibidores de proteasas 1 mM Iodoacetamida, 1 mM PMSF], los protoplastos se recogieron centrifugando 5 minutos a 1000xg, y se lisaron resuspendiéndolos con 4 mL por gramo de células, de tampón hipotónico [75 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.25 mM EDTA, 0.1 % (v/v) Tween-20, 10 mM 2-mercaptoetanol conteniendo los inhibidores de proteasas 50 µM 3,4-DCI, 1 µM E64, 5 µM quimostatina A, 1 mM PMSF]. El lisado se incubó a 4°C con agitación fuerte, durante 30 minutos. Se añadió NaCl sólida hasta alcanzar una concentración final de 0.6M, y se incubó a 4°C con agitación fuerte, durante otros 30 minutos. Tras esta incubación la suspensión se ultracentrifugó durante 2 horas a 100000xg (ULTRACENTRIFUGE L7, de BECKMAN) y el sobrenadante obtenido, que constituye el extracto proteico, se dializó frente a tampón B-80 [15 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.25 mM EDTA, 0.05 % (v/v) Tween-20, 10 % (v/v) glicerol, 5 mM 2-mercaptoetanol, 80 mM NaCl]. Por último el extracto dializado se clarificó centrifugando 15 minutos a 27000xg.

Fraccionamiento de proteínas por cromatografía

Las diferentes actividades HAT presentes en los extractos crudos de levadura se fraccionaron por cromatografía de intercambio iónico sobre Q-Sepharosa FF como se describe en Ruiz-García (1999) [184], con algunas modificaciones. En una columna con 2.5 mL de resina Q-Sepharosa FF equilibrada en tampón B-80, se aplicaron 150 unidades de $OD_{280} \cdot mL$ de extracto proteico, obtenido como se ha descrito anteriormente. Tras lavar la columna con 7 volúmenes de tampón de equilibrado las proteínas retenidas se eluyeron utilizando 20 volúmenes de columna de un gradiente continuo de NaCl en tampón B, desde una concentración inicial de 80 mM hasta una concentración final de 400 mM en NaCl. El eluido se dividió en fracciones de 1.7 mL, empleando un colector de fracciones (modelo 2110, de BIORAD), a las que se determinó su A_{280} y su actividad HAT, como se describe más adelante. La columna se reutilizó varias veces lavando la resina con tampón B-2M en NaCl y posterior equilibrado tras cada uso.

Alternativamente se empleó una columna Q-Resource de 1 mL y un sistema de FPLC (ÄKTA PRIME, AMERSHAM BIOSCIENCES). Se aplicaron 5 unidades de $OD_{280} \cdot mL$ del extracto de proteínas en columnas Q-Resource equilibradas con tampón B-80. La columna se lavó con tampón de equilibrado hasta que la OD_{280} del eluido alcanzó un valor próximo a cero. Las proteínas retenidas se eluyeron empleando 25 mL de gradiente continuo de NaCl, desde 80 a 400 mM. El eluido se fraccionó con un colector de fracciones, en volúmenes de aproximadamente 0.85 mL en las que se determinó la actividad HAT como se describe en el siguiente apartado. Una vez finalizada la cromatografía, la columna se lavó sucesivamente con tampón B-2M en NaCl, con H_2O , y por último con etanol al 20 % (v/v), solución en la que la columna se guardó a 4º C.

Ensayo de actividad HAT

Como histonas sustrato de los enzimas HAT se emplearon histonas internas de eritrocito de pollo obtenidas como se describe en Ruiz-García (1999) [184]. Alícuotas de 17 μL de fracciones de cromatografía o de fracciones obtenidas en experimentos de inmunoprecipitación se mezclaron con 12 μg de histonas internas de eritrocito de pollo y 0.008 μCi de [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-acetilCoA (54 mCi/mMol) en un volumen final de 24 μL , y las mezclas de reacción resultantes se incubaron durante 20 minutos a 30°C. La reacción se detuvo añadiendo 12 μL de solución de muestras SDS 3X [250 mM Tris-HCl pH 6.8, 6.5 % (p/v) SDS, 25 % (v/v) glicerol, 2M 2-mercaptoetanol, 0.02 % (p/v) azul de bromofenol]. Las muestras ensayadas se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron 5 minutos a 16000xg. Se depositaron alícuotas de 7 μL de cada muestra sobre un filtro de fibra de vidrio (Whatman GF/F), dejando 1 cm de separación entre cada una de ellas. Los filtros se dejaron secar al aire y después se sumergieron 5 minutos en solución de fijación y de coloración [0.1 % (p/v) azul comassie, 46 % (v/v) metanol, 8 % (v/v) ácido acético]. Tras lavarlos dos veces con solución decolorante [30 % (v/v) metanol, 5 % (v/v) ácido acético] y una vez con metanol 50 % (v/v), se secaron en una estufa a 90° C. Los filtros se colocaron en un casete y se expusieron a una pantalla (BAS-IP SR2025 FUJI). Tras una exposición de varias horas la radiactividad fijada en los filtros se detectó con un aparato PHOSPHORIMAGER (FUJIFILM FLA-3000), y se cuantificó empleando el programa informático IMAGE GAUGE 4.0.

Autorradiografías de geles

Las histonas ensayadas como se indica en el apartado anterior se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (ver más adelante). Las proteínas resueltas se tiñeron con solución de

Coomassie y los geles se secaron sobre papel Whatman 3 mM en un secador de geles SGD5040 SLAB GEL DRYER (THERMOSAVANT) durante 1 hora y 20 minutos a 80° C. Los geles se colocaron en un casete y se expusieron a una pantalla BAS-IP SR2025 durante un periodo de 72 horas. La radiactividad incorporada en las histonas se detectó y cuantificó como se ha descrito antes, con un aparato PHOSPHORIMAGER (FUJIFILM FLA-3000).

Inmunoprecipitación

En general los experimentos de inmunoprecipitación se realizaron incubando 100 µL de extracto proteico crudo, de fracción subcelular o de fracción cromatográfica, con 1 µg del anticuerpo apropiado (Tabla VI) durante toda una noche a 4°C. Se añadieron 40 µL de una suspensión al 50 % de proteína G-Sepharosa en tampón IP (ver composición más adelante) y se mantuvo en rotación durante 2-4 horas a 4°C. Las perlas de proteína G-Sepharosa se recuperaron centrifugando 2 minutos a 500xg, y se lavaron 5 veces con 500 µL de tampón IP [50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 % (v/v) glicerol, 10 mM 2-mercaptoetanol, 0.1 % (v/v) Tween-20, conteniendo los inhibidores de proteasas 50 µM 3,4-DCI, 1 µM E64, 5 µM quimostatina A y 1 mM PMSF]. Finalmente las perlas de proteína G-Sepharosa se resuspendieron en 60 µL de tampón IP. Esta suspensión se utilizó tanto para determinar su actividad HAT como para analizar las proteínas retenidas por *Western blotting*. En el primer caso se emplearon 17µL de suspensión como fracción a ensayar la actividad HAT, como se ha descrito anteriormente. En el segundo caso, tras eliminar el exceso de tampón IP, las proteínas unidas a las perlas se liberaron al resuspenderlas en el mismo volumen de solución de muestras de electroforesis SDS-PAGE y hervirlas 5 minutos. Las muestras se centrifugaron 5 minutos a 16000xg, y el sobrenadante resultante se sometió a SDS-18 %PAGE para resolver las proteínas.

Preparación de extractos proteicos totales para análisis por Western blotting

Se utilizaron extractos totales de levadura para los análisis por *Western blotting* de proteínas etiquetadas y de histonas. Habitualmente estos extractos se realizaron a partir de aproximadamente 10 mL de cultivo. Para ello se recogieron las células por centrifugación a 500xg 5 minutos y tras un lavado con agua se determinó su peso húmedo. Las células se resuspendieron con agua a razón de 5 μ L/mg de células. Esta suspensión se llevó a una concentración final de 0.2M NaOH añadiendo NaOH 2M y tras incubar en hielo 60 minutos las células se recogieron por centrifugación a 12000xg, 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió con 2 μ L/mg de células, de solución de muestras SDS1X y se hirvió durante 5 minutos. Por último la muestra se centrifugó 5 minutos a 18000xg y una fracción del sobrenadante se sometió a SDS-18 % PAGE.

Fraccionamiento celular para análisis por Western blotting e inmunoprecipitación

Se recogieron células de cultivos en fase exponencial y se prepararon protoplastos siguiendo el procedimiento habitual con algunas modificaciones. Las células se resuspendieron en tampón de pretratamiento a razón de 10 μ L/mg de células, y se incubaron 10 minutos en hielo. La suspensión se centrifugó 5 minutos a 500xg y las células sedimentadas se resuspendieron en 5 μ L/mg de células, de tampón de digestión. La pared celular se digirió con Zimoliasa 20T a una concentración de 2 μ g por mg de células. La suspensión de células se incubó a 35^o C durante 10 minutos y transcurrido este tiempo se añadieron 50 μ L/mg de células, de tampón de lavado frío. Los protoplastos se recogieron centrifugando 5 minutos a 1000xg, y se lisaron resuspendiéndolos en 4 μ L/mg de células de tampón de lisis A⁻ [50 mM Tris-HCl pH 7.6, 75 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 10 mM de 2-

mercaptoetanol, 0.1 % (v/v) NP40, conteniendo los inhibidores de proteasas 50 μ M 3,4-DCI, 1 μ M E64, 1 μ M quimostatina A, 1 mM PMSF]. Esta suspensión se incubó 10 minutos a 4^o C con agitación. En este punto se sacó una alícuota de 10 μ L, que es el extracto total o *WCE* (*whole cell extract*), a la que se le añadió solución de muestras SDS 5X y se hirvió 5 minutos. La suspensión restante se centrifugó a 16000xg durante 5 minutos en una centrífuga refrigerada a 4^oC, fraccionando así el precipitado (fracción P), enriquecido en cromatina, y el sobrenadante o fracción soluble (fracción S). El sedimento se resuspendió en solución de muestras SDS1X a razón de 5 μ L/mg de células, y a la fracción S o se le añadió solución de muestras SDS 5X, o se guardó a -80^o C en el caso de que se necesitara para experimentos posteriores. Las muestras a las que se les añadió solución de muestras se hirvieron durante 5 minutos.

Aislamiento de histonas de levadura

Se prepararon protoplastos de la forma descrita anteriormente, pero empleando una concentración mayor de Zimoliasa 20T (6 μ g/mg de células) e incubando 35-40 minutos a 35^o C. Los protoplastos se lisaron añadiendo 7 mL/g de células de tampón de lisis K [50 mM MES pH 6.0, 75 mM KCl, 0.5 mM CaCl₂, 10 mM de 2-mercaptoetanol, 0.1 % (v/v) NP40, conteniendo los inhibidores de proteasas 50 μ M 3,4-DCI, 1 μ M E64, 5 μ M quimostatina A, 1 mM PMSF]. Para lisar bien los protoplastos se resuspendieron con la ayuda de un pincel o con pipeta y se incubaron 5 minutos en hielo. Tras una centrifugación de 5 minutos a 12000xg se descartó el sobrenadante y el sedimento, enriquecido en núcleos, se resuspendió en tampón HS [10 mM MES pH 6.0, 430 mM NaCl, conteniendo 0.5 % (v/v) NP40 y los mismos inhibidores de proteasas que antes] a razón de 7 mL/g de células. La suspensión se incubó durante 5 minutos en hielo y se centrifugó 5 minutos a

16000xg. Tras un último lavado del sedimento con 7 mL/g de tampón HS, las histonas se extrajeron con 1.2 mL/g de HCl 0.25 M y agitación durante 1 hora o más a 4°C. Transcurrido este tiempo la suspensión se centrifugó 10 minutos a 16000xg y se reservó el sobrenadante. El sedimento se reextrajo añadiendo HCl 0.25 M a razón de 0.5 mL/g de células. Tras una centrifugación en las mismas condiciones que la anterior se reunieron los dos sobrenadantes y se precipitaron las histonas añadiendo 8 volúmenes de acetona e incubando a -20°C durante una noche. El precipitado, que se recuperó centrifugando durante 5 minutos a 12000xg, se lavó en primer lugar con acetona:HCl (100:1, v:v) y después con acetona. Por último, tras secar el precipitado al vacío, se disolvió con 0.5 mL/g de solución de muestras SDS 1X.

Métodos analíticos

Electroforesis de DNA

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa preparados en tampón TBE 0.5x [0.089 M Tris, 0.089 M Ácido bórico, 2.5 mM EDTA], que también se empleó como tampón de electroforesis. La concentración de los geles se varió desde un 0.8 a un 1.5 % (p/v), en función del tamaño de los fragmentos a separar. Para visualizar el DNA se añadió 0.5 mg/L de bromuro de etidio a los geles, y una vez finalizada la electroforesis se iluminaron con luz ultravioleta. Las electroforesis se realizaron a 100 V durante 1 hora aproximadamente.

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

La resolución de proteínas por electroforesis se realizó utilizando geles

de poliacrilamida en presencia de SDS [206]. Los geles de proteínas están formados por un gel concentrador o pre-gel y un gel separador donde se resuelven las proteínas. El gel separador contiene una concentración variable de acrilamida, dependiendo del tamaño de las proteínas que se resolvieron. Para resolver histonas se utilizaron geles al 18 % (p/v); para resolver proteínas de tamaños más grandes, geles al 10 % (p/v). Los geles separadores contienen acrilamida:bisacrilamida (30:0.8), al 18 % o al 10 % (p/v), 0.1 % (p/v) SDS, 0.07 % (v/v) TEMED y 0.38 M Tris-HCl pH8.8. El pre-gel contiene 5 % (p/v) acrilamida:bisacrilamida (30:0.8), 0.1 % (p/v) SDS, 0.2 % (v/v) TEMED y 0.125 M Tris-HCl pH6.8.

Las muestras de proteínas se disolvieron en disolvente de muestras SDS [83 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.2 % (p/v) SDS, 8.3 % (v/v) glicerol, 0.7 M 2-mercaptoetanol, 0.007 % (p/v) azul de bromofenol] y se hirvieron durante 5 minutos. Antes de aplicarlas en la electroforesis se centrifugaron 5 minutos a 16000xg.

El tampón de electroforesis contiene 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicina y 0.1 % (p/v) SDS. Las electroforesis se desarrollaron a 14 mA inicialmente y a voltaje máximo de 100 volts durante 2 horas aproximadamente en el caso de los geles de tamaño pequeño (10x7 cm), y a 25 mA inicialmente y 150 volts máximo durante unas 5 horas en el caso de los geles más grandes (15x15 cm). Una vez finalizada la electroforesis se sacó el gel y, o bien se tiñó con solución de Azul Coomassie, o bien se utilizó para electrotransferencia (ver apartado siguiente). Para la tinción de las proteínas con Azul Coomassie el gel se sumergió en solución colorante [46 % (v/v) metanol, 8 % (v/v) ácido acético, 0.1 % (p/v) Azul Coomassie R250] durante al menos 30 minutos, y después se realizaron varios lavados con solución decolorante [30 % (v/v) metanol, 5 % (v/v) ácido acético] hasta eliminar el exceso de azul de Coomassie no unido a las proteínas. En

algunos casos, como en el de geles obtenidos con muestras radiactivas que requerían generar autorradiografía, los geles se secaron empleando un secador de geles SGD5040 SLAB GEL DRYER (THERMOSAVANT).

Análisis Western blotting

Las proteínas se resolvieron por electroforesis en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (PROTRAN Nitrocellulose transfer membrane 0.2 μm , de SCHLEIDER&SCHÜELL) mediante electrotransferencia con un MINI TRANS-BLOT CELL de BIORAD, siguiendo el procedimiento descrito por Thiriet y Albert (1995) [207]. El tampón de transferencia empleado contiene 25 mM Tris pH 8.3, 192 mM glicina, 0.1 % (p/v) SDS y 20 % (v/v) metanol. La transferencia se realizó con un voltaje de 100 V durante 15 minutos y 60 V durante 30 minutos.

Las proteínas transferidas se colorearon sumergiendo las membranas en una disolución de Ponceau 1 % (p/v) en ácido acético 1 % (v/v) durante 1 minuto. Para eliminar el exceso de colorante se realizaron varios lavados a la membrana en ácido acético 1 % (v/v). Se obtuvo una imagen digitalizada de la membrana coloreada con la ayuda de un *scanner*, y se guardó en formato electrónico. Para eliminar el Ponceau asociado a las proteínas se lavó la membrana con TBS-T [0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.125 M NaCl, 0.02 % (v/v) Tween-20].

La membrana se bloqueó incubándola 1 hora a temperatura ambiente y 1 hora a 4^o C, en TBS-T 1.5 % (p/v) *blocking agent* (reactivo suministrado en el sistema de detección *ECL Advanced Western blotting*, de AMERSHAM BIOSCIENCES). El anticuerpo primario se diluyó en TBS-T y la membrana se incubó en esta disolución durante toda una noche a 4^o C. A la mañana siguiente se realizaron 4 lavados a la membrana con TBS-T, uno de 15 minutos y 3 de 5 minutos. La membrana se incubó con el anticuerpo

secundario diluido en TBS-T, durante dos horas a 4^o C. La detección se realizó utilizando los reactivos *ECL Advanced Western blotting*, de AMERSHAM BIOSCIENCES, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los anticuerpos empleados y las concentraciones utilizadas se detallan en la Tabla VI.

En el caso de utilizar el reactivo *ECL Western blotting* se trató la membrana de igual manera, solo que el bloqueo se realizó con leche descremada en polvo y las concentraciones de anticuerpo empleadas fueron 10 veces mayores.

Stripping o lavado de membranas

Algunas de las membranas obtenidas para *Western blotting* se reutilizaron varias veces tras someterlas a un tratamiento que libera los anticuerpos unidos. En primer lugar se lavó la membrana un par de veces durante 5 minutos, empleando agua destilada. Después se sumergió en tampón de *stripping* [5 % (v/v) ácido acético, 0.5 M NaCl, 4 M urea y 2 % (v/v) 2-mercaptoetanol, que se añade en fresco], y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación. Finalmente se hicieron 5 lavados de 5 minutos cada uno con abundante agua destilada, y un último lavado con TBS-T. A partir de aquí se bloqueó la membrana y se continuó tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

RESULTADOS

Complejos histona acetiltransferasa en *S. cerevisiae*

Trabajos anteriores basados en técnicas cromatográficas, realizados en el Departamento de Bioquímica i Biología Molecular de la Universitat de València, identificaron y caracterizaron hasta cinco complejos histona acetiltransferasa en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que se han denominado HAT-A1, A2, A3, A4 y B [184]. En la Figura 10 se muestra la estrategia empleada para la separación por cromatografía de intercambio iónico de los complejos HAT de levadura y la obtención del perfil de actividad HAT obtenido de una cepa salvaje. En este perfil se pueden reconocer los picos de actividad de estos cinco complejos. El enzima HAT-A1 es nuclear y acetila principalmente las histonas H4 y H2A. El enzima HAT-A2, que acetila la histona H3 tanto libre como formando parte de nucleosomas, también se localiza en el núcleo y su subunidad catalítica es el coactivador transcripcional Gcn5p. HAT-A2 además contiene las proteínas Ada2 y Ada3. Por su parte, los enzimas HAT-A3 y HAT-B poseen como subunidad catalítica la proteína Hat1 y ambos contienen también la proteína Hat2. Estos dos complejos HAT acetilan la histona H4 libre, pero no si está ensamblada en nucleosomas. Finalmente el enzima HAT-A4, del que al igual que HAT-A1 se desconoce su subunidad catalítica, acetila la histona H3 y en menor medida la H4, tanto en su forma libre como formando parte de nucleosomas. En estos perfiles cromatográficos los picos de actividad HAT producidos por los complejos A4 y B se solapan, pero como previamente ha sido demostrado [184,189], estos enzimas son claramente diferentes ya que la actividad del enzima HAT-A4, contrariamente a HAT-B, no es dependiente de los genes *HAT1* o *HAT2*.

Los resultados que se describen a continuación sirvieron de punto de partida para parte de este trabajo. En el laboratorio del Dr. Rolf Sternglanz (State University of New York, Stony Brook) se había realizado un

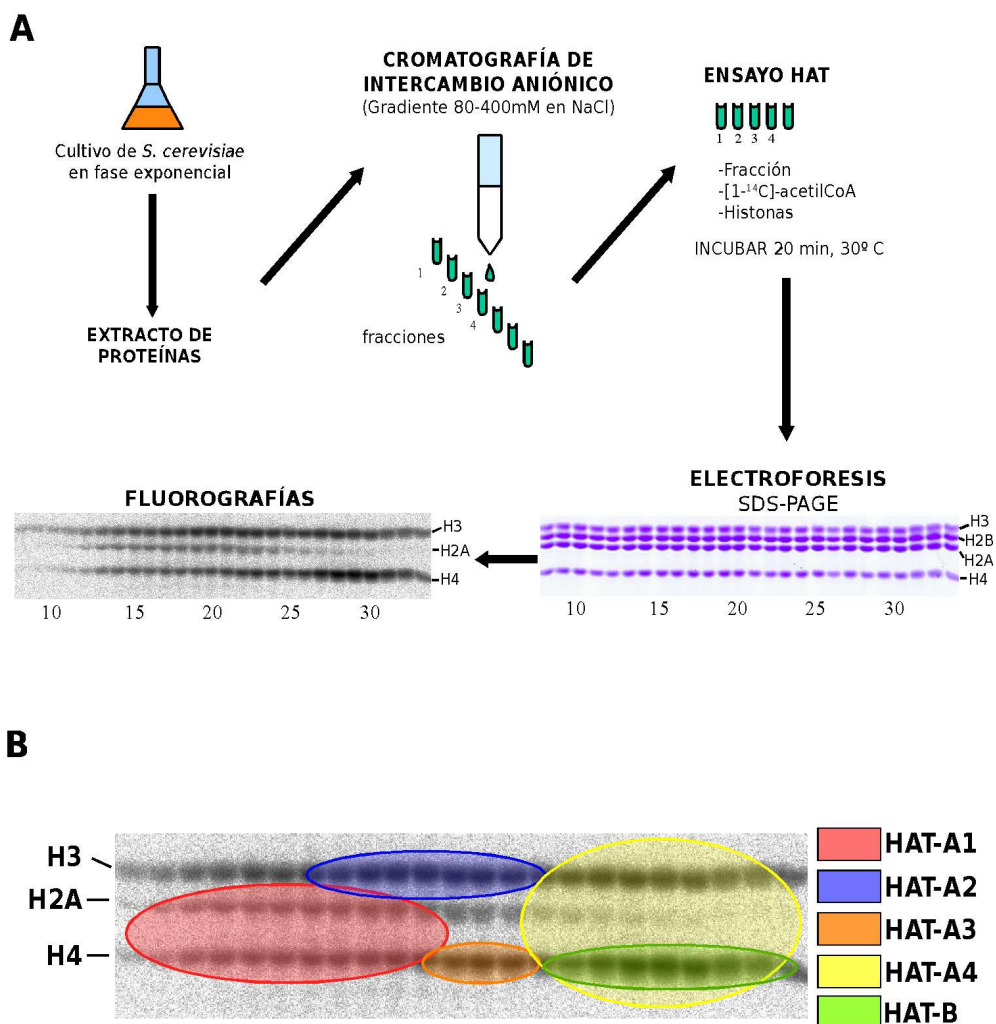


Figura 10. **Procedimiento para análisis de actividad HAT en células de levadura.** **A**, se prepara un extracto de proteínas (descrito en Materiales y métodos) a partir de células en fase de crecimiento exponencial. El extracto se cromatografía en columnas de intercambio iónico (Q-Sepharose FF), y las proteínas retenidas se eluyen con un gradiente lineal en NaCl (80-400 mM). Se determina la actividad HAT de las fracciones eluidas incubando, durante 20 minutos a 30° C, una alícuota de cada fracción con histonas internas de eritrocito de pollo y con [1-¹⁴C]acetil-CoA. Las histonas ensayadas se resuelven por electroforesis en gel de poliacrilamida al 18 % en presencia de SDS, y los gels, tras su tinción con Azul Coomassie, se secan y se exponen a una pantalla (BAS-IP SR 2025) durante 72 horas para obtener la correspondiente fluorografía. En el panel **B** se muestra la fluorografía correspondiente al perfil de actividad HAT de una cepa salvaje de levadura (W303-1a). Las elipses de colores encierran las histonas acetiladas por los diferentes picos de actividad HAT descritos en *S. cerevisiae* [184]: HAT-A1, HAT-A2, HAT-A3, HAT-A4 y HAT-B.

estudio por el sistema de doble híbrido para identificar proteínas que interaccionan con Hat1p. Se empleó como cebo una proteína quimérica expresada desde un plásmido, que contiene la secuencia completa de Hat1p (aminoácidos 1-374) fusionada con LexA. En este rastreo se identificaron varios plásmidos que contenían la secuencia que codifica Hat2p, una proteína previamente descrita que interacciona con Hat1p formando parte de los enzimas HAT-A3 y HAT-B. También se aislaron varios plásmidos que contenían fragmentos de una ORF no caracterizada con anterioridad, YLL022C, a la que se nombró *HIF1* (*Hat1 interacting factor 1*), y que codifica una proteína de 385 aminoácidos (Tabla VII). La interacción por doble híbrido entre Hat1p-Hif1p se verificó cuando se expresó la proteína LexA-Hat1 y distintos fragmentos de la proteína Hif1 codificados en plásmidos presa pGAD (aminoácidos 8-385 y aminoácidos 8-185).

Por otro lado, nuestro grupo había realizado un estudio, también por el sistema de doble híbrido, con el fin de identificar proteínas en levadura que interaccionen con un fragmento de la histona H4 (aminoácidos 1-59). En este rastreo se identificaron varios clones positivos. La secuenciación de los plásmidos purificados reveló que de estos clones algunos correspondían a tres fragmentos del gen *HIF1* (nucleótidos 22-470, 22-552 y 22-555). Se confirmó la interacción entre las proteínas H4-Hif1 por reconstrucción, es decir, transformando la cepa original (pj69-4A) con los plásmidos presa pGAD-Hif1 (aa 8-185) y cebo pGBD-H4 (aa 1-59). Puesto que la histona H4 es la diana principal de Hat1p [51,139,174,175,189], la interacción detectada entre Hif1-H4 sugiere que la interacción entre Hat1-Hif1 descrita previamente por el grupo del Dr. R. Sternglanz, debe ser significativa. Además ambas interacciones son dependientes de Hat2p en ensayos de doble híbrido, ya que ambas desaparecen en una cepa *hat2Δ*, indicando que Hat2p puede funcionar mediando ambas interacciones. Como control

adicional se estudió la interacción entre H4 y Bdf1p (*bromodomain factor 1*) [208], en células *hat2Δ*. La ausencia de *HAT2* no afecta a la interacción entre estas dos proteínas, indicando que la dependencia de las interacciones H4-Hif1p y Hat1p-Hif1p con la proteína Hat2 debe ser específica. Todos estos resultados se resumen en la Tabla VII.

TABLA VII. Resumen de las interacciones halladas mediante estudios de doble híbrido realizados en el laboratorio del Dr. Sternglanz y en nuestro grupo. El crecimiento en medio selectivo y la activación del gen *lacZ* se indica con el símbolo +.

CEPA	CEBO	PRESA	INTERACCIÓN	
L40 <i>MATa trp1 leu2 his3 ade2 LYS2::lexA_{op}- HIS3 URA3::lexA_{op}- lacZ</i>	LexA-Hat1 (aa 1-374) (longitud total)	GAD-Hif1 (aa 8-185)	+	Laboratorio Dr. Sternglanz
		GAD-Hif1 (aa 8-385)	+	
YSTT62 L40, <i>hat2Δ::HIS3</i>	LexA-Hat1 (aa 1-374) (longitud total)	GAD-Hif1 (aa 8-185)	-	
		GAD-Hif1 (aa 8-385)	-	
PJ69-4A <i>MATa trp1-901 ura3-52 his3-200 leu2-3,112 gal4Δ gal80Δ GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS met2::GAL7-lacZ</i>	GBD	GAD	-	Nuestro grupo
		GAD-Hif1 (aa 8-185)	-	
	GBD-H4 (aa 1-59)	GAD	-	
		GAD-Hif1 (aa 8-185)	+	
YTH2 PJ69-4A, <i>hat2Δ::kanMX4</i>	GBD-H4 (aa 1-59)	GAD-Hif1 (aa 8-185)	-	
YTH2 PJ69-4A, <i>hat2Δ::kanMX4</i>	GBD-H4 (aa 1-59)	GAD-Bdf1 (aa 304-571)	+	

Hif1p es un componente integral del complejo HAT-B de levadura

Los datos obtenidos de los experimentos de doble híbrido señalaban que las proteínas Hat1, Hat2 e Hif1 deben estar asociadas *in vivo* para realizar su función, por lo que resultaba interesante analizar si Hif1p forma parte de alguno de los complejo/os HAT identificados en nuestros perfiles, prestando especial atención a los complejos HAT-B y HAT-A3 ya que era conocido que ambos contienen las proteínas Hat1 y Hat2 [139,175,189].

Para estudiar si la proteína Hif1 forma parte de alguno de los complejos HAT resueltos por cromatografía de intercambio iónico, utilizamos una cepa que contiene una versión genómica de *HIF1* etiquetada con el epítipo Myc. Para comprobar que el etiquetado de la proteína Hif1 no modifica el perfil de actividad HAT de la cepa, se preparó un extracto proteico a partir de células de un cultivo en fase exponencial, se fraccionó en una columna Q-Sepharose FF y posteriormente se ensayó la actividad HAT de las fracciones obtenidas. Paralelamente se cromatografió un extracto obtenido de una cepa salvaje no etiquetada empleando idénticas condiciones, que se utilizó como control del perfil de actividad HAT. Los perfiles de elución de actividad HAT obtenidos fueron similares para ambas cepas (Figura 11 A y B) lo que indica que la introducción de la etiqueta Myc en el extremo C-terminal de Hif1 aparentemente no altera ni la actividad enzimática ni las propiedades cromatográficas de los complejos HAT de los que pudiera formar parte en estos perfiles cromatográficos.

Al analizar por *Western blotting* las fracciones de la cromatografía de la cepa que contiene el gen *HIF1* etiquetado con Myc se observa que Hif1p co-eluye con el pico de actividad de HAT-B (Figura 11C, fracciones 28-36) pero no con HAT-A3 (Figura 11B, fracciones 22-27), otro complejo con actividad

sobre H4 y que contiene a las proteínas Hat1 y Hat2 [209]. Se estudió si en estas fracciones la proteína Hif1 está físicamente asociada a alguna actividad HAT, haciendo un análisis por co-inmunoprecipitación. Para ello se incubaron alícuotas de las fracciones con anticuerpo anti-Myc y se ensayó la actividad HAT de las fracciones resultantes de la inmunoprecipitación, la fracción retenida y la no retenida. Como control se ensayó de nuevo la actividad HAT de las fracciones de la cromatografía. En la Figura 11D se observa que Hif1 co-inmunoprecipita una actividad HAT específica para la

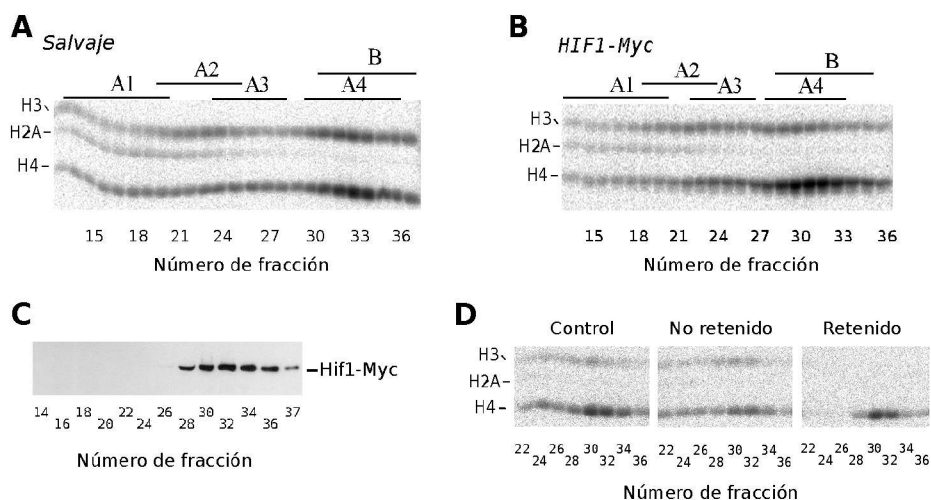


Figura 11. **Hif1p co-purifica con un enzima HAT específico de la histona H4.** Se obtuvieron los perfiles de actividad HAT de una cepa salvaje que expresa la proteína Hif1 no etiquetada (W303-1a), panel **A**, y de una cepa que expresa la proteína Hif1 etiquetada con Myc en el extremo C-terminal (BQS1187), panel **B**. En las fluorografías se señala la posición de las histonas y la posición en el gradiente de elución de los cinco complejos HAT. **C**, análisis de la elución de la proteína Hif1-Myc por *Western blotting*. Alícuotas de las fracciones indicadas de la cromatografía de Hif1p-Myc (elución mostrada en **B**) se resolvieron por electroforesis SDS-10 % PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se incubó con anticuerpo monoclonal anti-Myc (clon 9E10). **D**, las fracciones indicadas de la cromatografía de Hif1p-Myc mostrada en **B**, fueron sometidas a inmunoprecipitación con anticuerpo anti-Myc. Se ensayó la actividad HAT de las fracciones de la cromatografía (que sirven de control), de las proteínas no retenidas y de las proteínas retenidas. Se muestran las fluorografías obtenidas.

histona H4, el sustrato principal de Hat1p.

Aunque existe la posibilidad de que Hif1p pueda participar en algún otro complejo no identificado en estos perfiles cromatográficos, los datos anteriores sugieren que, al menos, debe formar parte del complejo HAT-B. Sin embargo se hace necesario realizar nuevos experimentos para confirmar de forma inequívoca que la proteína Hif1 está asociada a Hat1p formando parte del complejo HAT-B. En una primera aproximación se prepararon extractos totales de una cepa salvaje no etiquetada (que se utilizó como control); de una cepa que contiene la proteína Hif1 etiquetada con Myc; de una cepa que expresa la proteína Hif1-Myc y es además *hat1Δ* y de una cepa que contiene Hif1-Myc y es además *hat2Δ*. Los extractos obtenidos se sometieron a inmunoprecipitación con anti-Myc y de nuevo se ensayó la actividad HAT de la fracción retenida, no retenida y del control, que en este caso fue el extracto proteico previamente a la inmunoprecipitación. Los resultados se muestran en la Figura 12A. En una cepa salvaje Hif1p co-precipita una actividad HAT específica de la histona H4, pero no en una cepa mutante *hat1Δ*, lo que indica que Hat1 debe ser la proteína histona acetiltransferasa co-inmunoprecipitada por Hif1p. Pero además, en una cepa *hat2Δ* la proteína Hif1 tampoco co-precipita ninguna actividad HAT, lo que sugiere que la proteína Hat2 podría actuar como puente en la interacción entre Hat1p e Hif1p en el complejo B nativo, es decir, que la interacción entre Hat1p e Hif1p no debe ser una interacción directa. Este resultado confirma los datos de los experimentos de doble híbrido realizados en el laboratorio del Dr. Sternglanz, mencionados anteriormente.

Por otro lado, para confirmar la presencia de Hif1p en el complejo B se construyó una cepa que contiene una doble etiqueta, Hat1p-HA e Hif1p-Myc. Se preparó un extracto proteico obtenido de células en fase de crecimiento

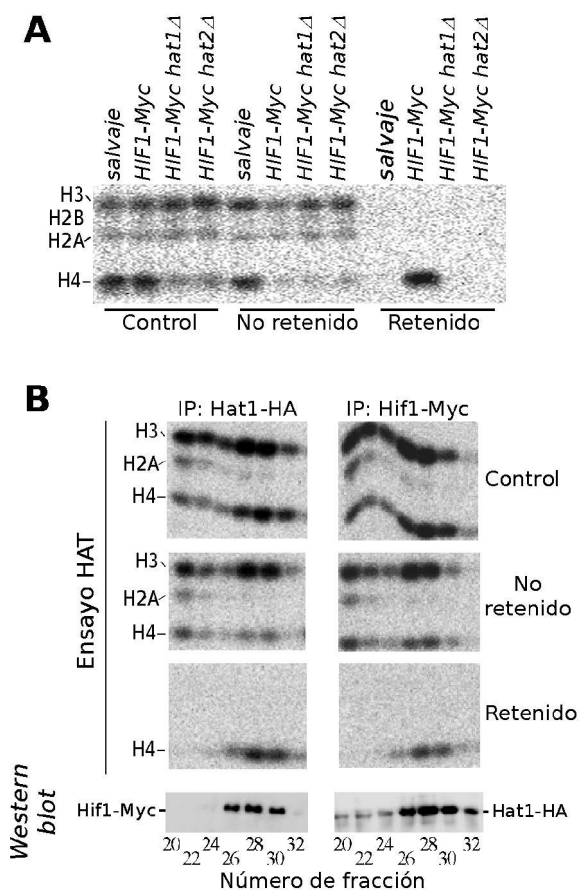


Figura 12. **Hif1p** está asociada físicamente con el complejo HAT-B. **A**, se prepararon extractos proteicos celulares de una cepa salvaje (BQS1187), de un mutante *hat1Δ* (BQS1202) y de un mutante *hat2Δ* (BQS1225), y además todas estas cepas contienen el gen *HIF1* etiquetado con Myc. También se preparó un extracto proteico de una cepa salvaje no etiquetada (W303-1a), que se utilizó como control. Los extractos se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-Myc (clon 9E10) y se ensayó la actividad HAT de las fracciones retenidas, de las no retenidas (sobrenadante) y de una alícuota de los extractos celulares (control), empleando como sustrato histonas internas de pollo y [14 C] acetil-CoA. Las histonas ensayadas se resolvieron en SDS-18 % PAGE y se obtuvo el fluorograma que se muestra. Se indica la posición de las histonas. **B**, se cromatografió como se indica en la Figura 1, un extracto de células BQS1226, que co-expresan Hat1-HA e Hif1-Myc. Las fracciones que contienen el complejo HAT-B parcialmente purificado se sometieron a inmunoprecipitación con anti-HA de rata (clon 3F10, paneles de la izquierda) o con anti-Myc de ratón (clon 9E10, paneles de la derecha). Se muestran las fluorografías obtenidas después de ensayar la actividad HAT de los materiales retenidos, no retenidos y de las fracciones de la cromatografía (control). Las fracciones retenidas también se analizaron por *Western blotting*, empleando anti-Myc (clon 9E10) de ratón o anti-HA (Y-11) de conejo (paneles inferiores).

exponencial de esta cepa y se fraccionó por cromatografía de intercambio aniónico. Las fracciones correspondientes al pico B se utilizaron para experimentos de co-inmunoprecipitación tanto con anti-Myc (para inmunoprecipitar Hif1p-Myc) como con anti-HA (para inmunoprecipitar Hat1p-HA). Posteriormente se analizó la presencia de actividad HAT específica de H4 y la presencia, por *Western blotting*, de la otra proteína acompañante etiquetada (Figura 12B). La proteína Hat1-HA, inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-HA, co-precipita por un lado una actividad HAT específica de H4 y además la proteína Hif1-Myc. Así mismo, en la fracción inmunoprecipitada con anti-Myc también se identificó una actividad HAT específica de H4 y la proteína Hat1-HA. En resumen, el hecho de que las proteínas Hat1 e Hif1 sean capaces de co-precipitarse entre ellas y de co-precipitar una actividad HAT específica de H4, demuestra que Hif1p y Hat1p interactúan establemente. Estos resultados junto a los obtenidos por doble híbrido (Tabla VII) indican que Hif1p y Hat1p forman parte *in vivo* del complejo B nativo de levadura.

Como parte del estudio de la asociación de Hif1p al enzima B, comparamos el perfil cromatográfico de una cepa *hif1Δ* con el perfil de una cepa salvaje (Figura 13). El enzima HAT-B se identificó analizando la actividad HAT de las fracciones obtenidas en la cromatografía. En el perfil cromatográfico de una cepa *hif1Δ* el pico de actividad HAT generado por el complejo B (HAT-B*) presenta aparentemente una posición similar en la elución en el gradiente y aparentemente el mismo nivel de actividad HAT que el pico B (HAT-B) obtenido de una cepa salvaje (Figura 13A). Por el contrario, en ausencia de Hat1p o Hat2p el pico de acetilación sobre H4 correspondiente al complejo HAT-B desaparece por completo (Figura 13B). De manera similar, al fraccionar por cromatografía extractos de células salvajes o *hif1Δ* que expresan Hat1p-HA y detectar la posición del complejo HAT-B

por *Western blotting* con anti-HA, la posición de la proteína Hat1-HA en el gradiente de elución es la misma, independientemente de la presencia o no

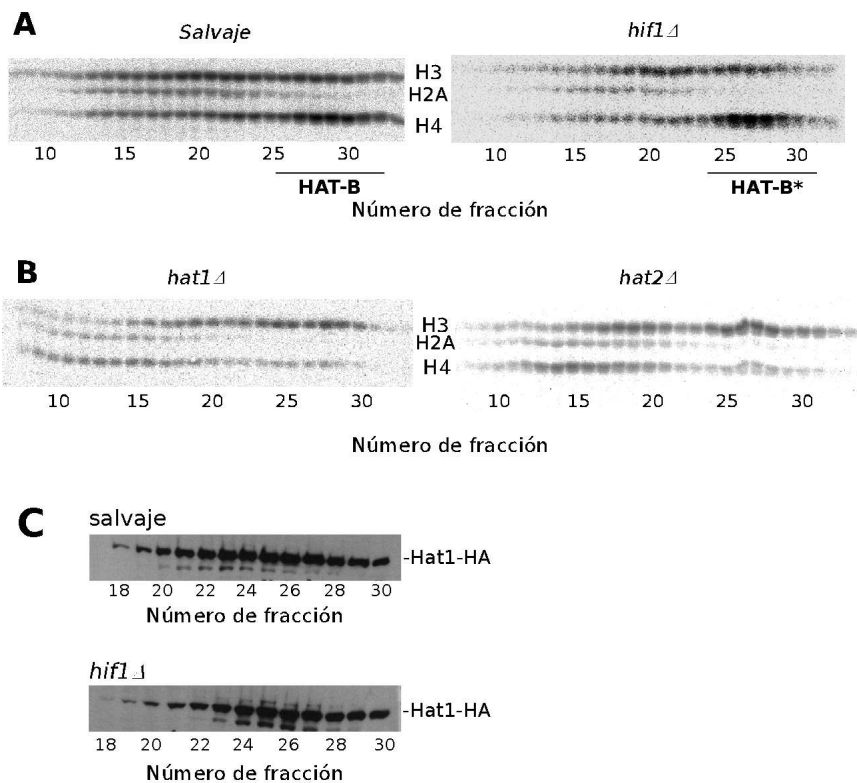


Figura 13. **Perfiles de actividad HAT en mutantes del complejo HAT-B.** Se prepararon extractos de células salvajes (W303-1a), *hif1Δ* (YSTT49), *hat1Δ* (RS1263) o *hat2Δ* (YSTT11) y se cromatografiaron en columnas Q-Sepharose FF como se describe en la Figura 1. Se determinó la actividad HAT de las fracciones incubándolas con histonas internas de pollo y [14 C] acetil-CoA. Las histonas ensayadas se resolvieron por SDS-18 % PAGE y se obtuvieron los fluorogramas, tras 72 horas de exposición en una pantalla (BAS-IP SR 2025). En **A**, se muestran los perfiles de actividad HAT de células salvajes y de células *hif1Δ*. En el perfil de la cepa salvaje se indica la posición de elución del complejo B salvaje (que contiene, al menos, Hat1p, Hat2p e Hif1p), y en el perfil de la cepa *hif1Δ* se indica la posición de elución del complejo B* (al menos Hat1p y Hat2p). En **B**, se muestran los perfiles de actividad HAT correspondientes a células *hat1Δ* y a células *hat2Δ*. **C**, se prepararon extractos totales de células que expresaban *HAT1-HA* (BQS1154) y de células que además de expresar *HAT1-HA*, eran *hif1Δ* (BQS1184), y se cromatografiaron en columnas Q-Sepharose FF. Alícuotas de las fracciones se resolvieron por SDS-18 % PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, en la que se analizó por *Western blotting* la presencia de Hat1p-HA, empleando anti-HA de ratón (clon12CA5, Tabla VI). El panel superior corresponde al *immunoblot* obtenido con las células *HAT1-HA*, y el inferior al obtenido con células *HAT1-HA, hif1Δ*.

de *HIF1* (Figura 13C). La interacción entre Hat1p e Hif1p sugiere un papel en acetilación de este último como parte del complejo B, sin embargo estos resultados demuestran que la ausencia de la subunidad Hif1p no altera el comportamiento cromatográfico del complejo (Figura 13 A y C), y además, el hecho de que en ausencia de Hif1p el complejo B presente *in vitro* niveles similares de actividad sobre la histona H4 (Figura 13A) sugiere que esta proteína no es necesaria para la actividad enzimática HAT del mismo.

Hat2p media la interacción entre las proteínas Hat1 e Hif1

Los resultados de los experimentos de doble híbrido mencionados anteriormente indicaban que Hat2p debe mediar la interacción entre Hif1p y Hat1p, y entre Hif1p y H4. Así mismo, previamente se había descrito que Hat2p de levadura y su homólogo humano, Rbap46, pueden intervenir en la unión de la histona H4 sustrato al enzima B [139,175]. Los experimentos de co-inmunoprecipitación presentados en la Figura 12A también indican que Hat2p media la interacción entre Hif1p y Hat1p, ya que en una cepa *hat2Δ* la proteína Hif1 no co-precipita la actividad HAT específica para H4. Por otro lado se puede apreciar que en el extracto de la cepa *hat1Δ*, como cabía esperar, la actividad específica sobre la histona H4 es muy reducida (Figura 12A, comparar la carrera control de células salvajes con la carrera control de células *HIF1-Myc, hat1Δ*). Sin embargo, la actividad detectada sobre H4 en el extracto de células *hat2Δ*, resulta ser tan débil como la actividad detectada en células *hat1Δ*, a pesar de que el extracto *hat2Δ* sí que debe contener Hat1p (Figura 12A, comparar la carrera control de células salvajes con la carrera control de células *HIF1-Myc, hat2Δ*). Una posible interpretación a este resultado es que Hat2p está implicada en la afinidad y actividad de la subunidad catalítica Hat1p sobre su sustrato, la histona H4

[175], de manera que en ausencia de *HAT2* la proteína Hat1 presente en el extracto tenga una baja actividad enzimática. Existen, sin embargo, otras explicaciones alternativas que podrían invalidar la interpretación de una función mediadora para la proteína Hat2 en el complejo B: 1) La proteína Hat1 podría ser inestable en una cepa *hat2Δ* y por eso se detectan bajos niveles de actividad HAT; 2) Hat1p podría ser inmunoprecipitada por Hif1p, incluso en ausencia de la proteína Hat2, pero debido a su baja actividad no se detecta actividad HAT en la fracción precipitada.

Para explorar la primera posibilidad se analizó por *Western blotting* los niveles de proteína Hat1 etiquetada con HA en una cepa salvaje y en una cepa *hat2Δ*. En la Figura 14A se observa que los niveles de Hat1p-HA son similares en ambas cepas. Para descartar la segunda posibilidad se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación recíprocos empleando extractos obtenidos de una cepa *hat2Δ* que contiene Hat1p-HA e Hif1p-Myc, y se analizaron las fracciones retenidas por *Western blotting*. En la Figura 14B se observa que Hif1p co-precipita a la proteína Hat1 en un extracto obtenido de una cepa salvaje (detectado con anti-HA, carrera 9), pero no en un extracto *hat2Δ* (carrera 10). Recíprocamente Hat1p arrastra a Hif1p en un extracto salvaje (detectado por *Western blotting* con anti-Myc, carrera 17) pero no en un extracto *hat2Δ* (carrera 18). Estos datos permiten concluir que para la unión estable de las proteínas Hif1 y Hat1 es necesaria la presencia de Hat2p actuando como puente.

En la Figura 14B se puede observar que los anticuerpos anti-HA y anti-Myc inmunoprecipitan Hat1p-HA e Hif1p-Myc, respectivamente, de manera muy eficiente como lo indica la casi total ausencia de señal en las fracciones no retenidas de la cepa salvaje (carreras 3 y 15). Pero la proteína acompañante no co-precipitada en estas fracciones no retenidas sigue siendo abundante en ambos casos. De manera que Hif1p-Myc no co-

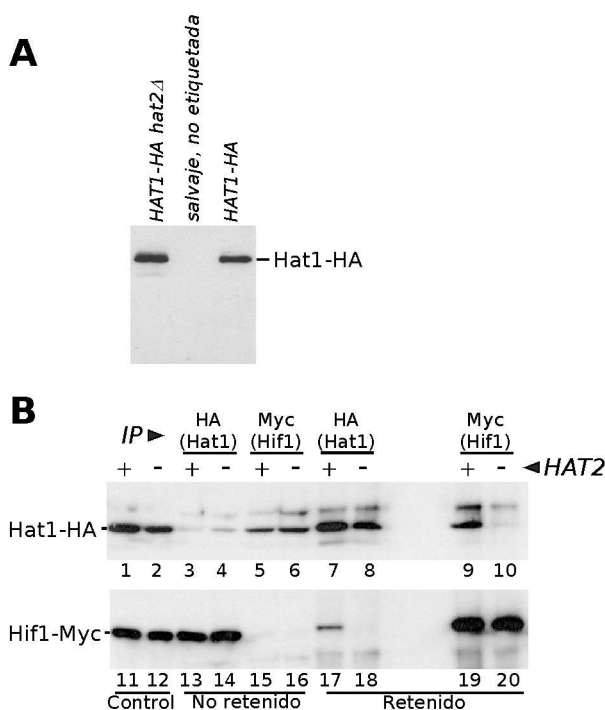


Figura 14. **La asociación entre Hat1p e Hif1p está mediada por Hat2p.** **A**, se examinaron por *Western blotting* los niveles de proteína Hat1 en extractos obtenidos de cepas que expresan la proteína Hat1-HA, una de ellas salvaje (BQS1154) y la otra *hat2Δ* (BQS1172). Como control se empleó el extracto obtenido de una cepa salvaje no etiquetada (W303-1a). Se aplicaron cantidades equivalentes de proteína, estimada previamente a partir de un gel teñido con Azul de Coomassie. El análisis *Western blotting* se realizó empleando anti-HA de ratón (clon 12CA5). **B**, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación recíprocos empleando extractos preparados a partir de células salvajes (BQS1226) o *hat2Δ* (BQS1306), que además contienen una doble etiqueta, *HAT1-HA* e *HIF1-Myc*. Los extractos se inmunoprecipitaron con anti-HA de rata (clon 3F10) o con anti-Myc de ratón (clon 9E10), y con proteína G-Sepharosa. Los materiales retenidos y no retenidos se analizaron por *Western blotting* con anti-HA (Y-11) de conejo o anti-Myc (clon 9E10) de ratón. Como control se analizaron los extractos celulares.

precipita toda la proteína Hat1p-HA (carrera 5), y recíprocamente mucha proteína Hif1-Myc permanece en la fracción no retenida tras la inmunoprecipitación de Hat1p-HA (carrera 13). Aunque no se puede descartar que estos resultados se deban a una co-inmunoprecipitación

ineficiente, cabe la posibilidad de que *in vivo* solo una fracción de Hat1p e Hif1p se encuentren asociadas. El resto entonces estaría libre o formando parte de otros complejos diferentes.

Según todos estos resultados la proteína Hat2 media la interacción entre las proteínas Hif1 y Hat1. Al objeto de un análisis en mayor profundidad de las interacciones entre los componentes del complejo HAT-B, se estudió la posible dependencia de la unión entre las proteínas Hat2 e Hif1 con la presencia de la subunidad catalítica Hat1. Para ello se realizó un experimento de co-inmunoprecipitación similar al anterior pero ahora empleando extractos de cepas que además de contener las proteínas Hat2 e Hif1 etiquetadas (con HA y Myc respectivamente), son *HAT1* o *hat1Δ*. Como se puede observar en la Figura 15 la proteína Hat2-HA co-inmunoprecipita a la proteína Hif1-Myc tanto en una cepa salvaje como en una cepa *hat1Δ*, (carreras 8 y 7 respectivamente). Recíprocamente, Hif1p-Myc co-inmunoprecipita a Hat2p-HA en células *HAT1* y en células *hat1Δ* (carreras 19 y 20). Este resultado confirma que, efectivamente, Hat2p actúa

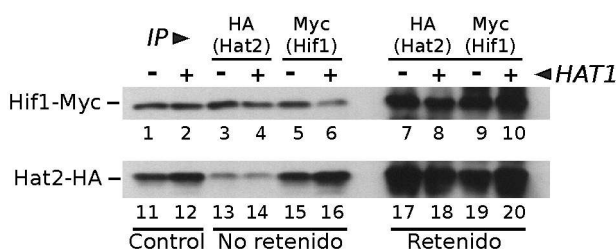


Figura 15. **Hat2p está unido físicamente a Hif1p de forma no dependiente de Hat1p.** Se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación recíprocos similares a los descritos en la Figura 14B, pero empleando extractos de una cepa salvaje que contiene una copia genómica de *HAT2-HA* e *HIF1-Myc* (BQS1426), y de una cepa que además de estos genes etiquetados es *hat1Δ* (BQS1425). De nuevo se incubaron los extractos con anti-HA de rata (clon 3F10) o con anti-Myc de ratón (clon 9E10) y se analizó por *Western blotting* la presencia de Hat2p-HA e Hif1p-Myc en las fracciones retenidas y no retenidas. En el análisis *Western blotting* se emplearon los anticuerpos anti-HA de conejo (Y-11) y anti-Myc de ratón (clon 9E10), y como control se analizaron los extractos celulares.

como puente mediando la interacción entre las proteínas Hat1 e Hif1 y que la ausencia de Hat1p no altera la interacción entre Hat2p e Hif1p. Aunque en este experimento la inmunoprecipitación no es tan eficiente como en el de la figura 14, de nuevo la fracción de proteína acompañante no coprecipitada sigue siendo elevada, sugiriendo que es posible que solo una fracción de Hat2p e Hif1p se encuentren asociadas.

Localización subcelular del complejo HAT-B

El enzima HAT-B acetila *in vitro* la histona H4 libre, pero no si está ensamblada en nucleosomas, y además, *in vivo*, existe acetilación de H4 previamente a su ensamblaje en cromatina. Basándose en estos datos algunos autores han propuesto que el complejo HAT-B podría estar implicado en el ensamblaje de histonas [175,184,191,192]. Mediante técnicas bioquímicas se ha asignado una localización citoplasmática del enzima HAT-B [139,175,189], una localización aceptada generalmente y que además sería coherente con la posible participación de este complejo en el ensamblaje de nucleosomas, aunque en realidad esta función no es incompatible con una localización nuclear. Actualmente, el desarrollo de técnicas de inmunofluorescencia microscópica proporcionan una herramienta más sensible para el estudio de la localización subcelular de proteínas. En este trabajo se ha estudiado la localización subcelular de Hat1p, Hat2p e Hif1p en células de levadura que contienen las versiones etiquetadas de estas tres proteínas, empleando estas técnicas. Como se observa en la Figura 16A, en células en fase exponencial de crecimiento tanto Hat1p-HA como Hat2p-HA generan una señal mayoritariamente nuclear coincidente con la señal generada por el DNA nuclear teñido con

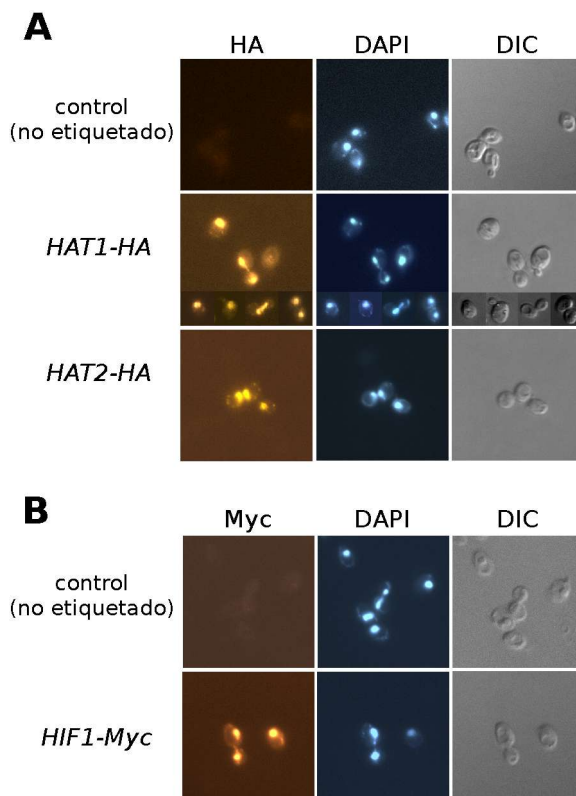


Figura 16. **Las proteínas del enzima B de levadura, Hat1p, Hat2p e Hif1p, se localizan principalmente en el núcleo.** Se fijaron células de levadura en fase de crecimiento exponencial de una cepa salvaje no etiquetada (W303-1a) que se empleó como control, o de células que contienen etiquetada una proteína del enzima HAT-B: **(A)** *HAT1-HA* (BQS1154), *HAT2-HA* (BQS1189) o **(B)** *HIF1-Myc* (BQS1187). Las células se procesaron como se describe en Materiales y Métodos, para visualizar las proteínas etiquetadas por inmunofluorescencia indirecta. En la figura se muestran imágenes de contraste diferencial (*DIC*, *Differential Interference Contrast*), imágenes del DNA teñido con 4,6-diamino-2-fenilindol (*DAPI*), y las imágenes de la señal de fluorescencia indirecta, obtenida con el anticuerpo correspondiente a la etiqueta indicada. Los anticuerpos primarios empleados fueron anti-HA de rata (clon 3F10) y anti-Myc de ratón (clon 9E10), y como anticuerpos secundarios se utilizaron IgG de cabra anti-rata o IgG de conejo anti-ratón, etiquetados con Alexa Fluor 546 (Tabla VI). En los paneles centrales de la parte A se muestra la localización celular de la proteína *HAT1-HA* en células que se encuentran en diferentes momentos del ciclo celular: G1, S, G2 y M, respectivamente.

DAPI. Un resultado similar, revelando también su localización nuclear, se obtuvo con la cepa que contiene la versión etiquetada de Hif1p con el epítipo Myc (Figura 16B). En ambos casos, como control negativo para los anticuerpos se empleó una cepa no etiquetada donde no se observa señal.

Una inspección visual detallada de diferentes células que se encuentran en distintos puntos del ciclo celular, indica que las proteínas del complejo B mantienen una localización mayoritariamente nuclear durante todo el ciclo celular. En los insertos de la Figura 16A se muestra el caso concreto de la proteína Hat1-HA, que presenta una localización principalmente nuclear en células que se encuentran en diferentes fases del ciclo celular, G1, S, G2 y M respectivamente. Estos resultados no descartan la posibilidad de que estas proteínas se encuentren también en el citoplasma, pero contrariamente a lo que se pensaba demuestran que una fracción mayoritaria del complejo HAT-B se encuentra en el núcleo.

La presencia de las tres subunidades del complejo B en el núcleo planteaba la cuestión de si hay una dependencia de localización subcelular entre ellas. Para abordar esta cuestión se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta y se visualizó la localización subcelular de las tres proteínas del enzima B etiquetadas, Hat1-HA, Hat2-HA e Hif1-Myc, en células mutantes en alguna de las otras proteínas acompañantes. Los resultados indican que Hif1p-Myc es nuclear independientemente de la presencia de las otras dos proteínas Hat1 y Hat2 (Figura 17A). Por su parte, la proteína Hat2-HA también reside en el núcleo tanto en células *hat1Δ* como en células *hif1Δ* (Figura 17B). Sin embargo, en la Figura 17C se observa que la localización nuclear de Hat1p-HA parece depender de *HAT2*, pero en cambio, no de *HIF1*. En células *hat2Δ* la señal Hat1p-HA se visualiza por toda la célula. Este resultado revela una posible nueva función para Hat2p no descrita hasta el momento: la proteína Hat2 participa en la

localización nuclear de la subunidad catalítica del complejo HAT-B.

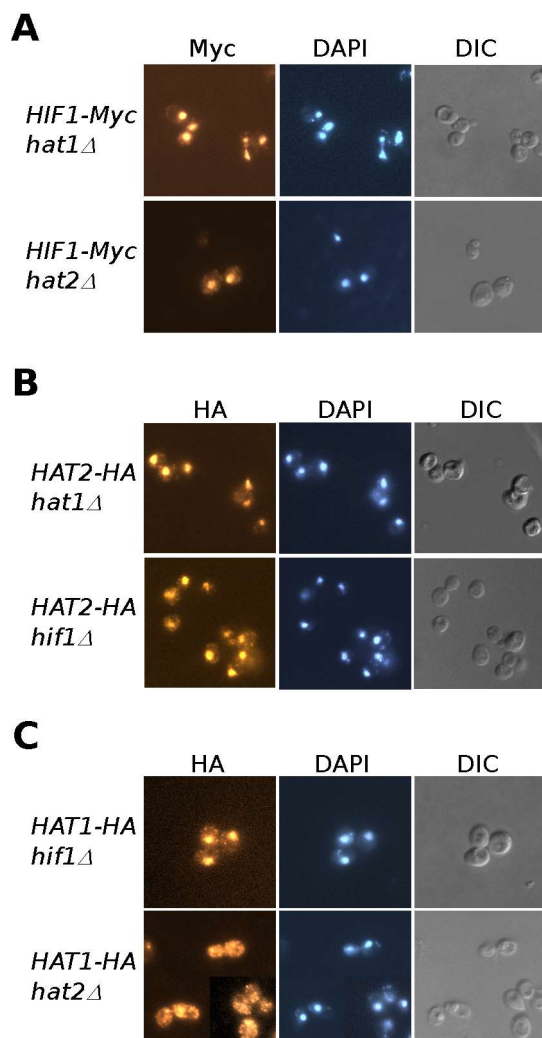


Figura 17. **La localización nuclear de Hat1p es dependiente de HAT2.** Se procesaron células en fase de crecimiento exponencial para ensayarlas por inmunofluorescencia indirecta, como se describe en la Figura 16. En la parte **A** se muestran los resultados obtenidos con células *HIF1-Myc hat1Δ* (BQS1202) y con células *HIF1-Myc hat2Δ* (BQS1225); en **B** se muestran los resultados de células *HAT2-HA hat1Δ* (BQS1309) o células *HAT2-HA hif1Δ* (BQS1304); por último, en **C** se muestran las imágenes obtenidas con células que expresan Hat1p-HA y son *hif1Δ* (BQS1184) o células que expresan Hat1p-HA y son *hat2Δ* (BQS1172). Para estos experimentos se emplearon los anticuerpos que se describen en la Figura 16.

Caracterización fenotípica de mutantes del complejo B

Análisis anteriores han puesto de manifiesto que no existen defectos de crecimiento en mutantes de delección de los genes *HAT1* y *HAT2* [174,175,189]. A pesar de la carencia de este y otros fenotipos en ausencia de estas proteínas componentes de una histona acetiltransferasa de tipo B, la fuerte conservación de las proteínas Hat1 y Hat2 en una amplia variedad de organismos eucariotas, sugiere que el enzima debe participar en algún proceso importante para la célula. La falta de fenotipo podría explicarse por la existencia de otras actividades HAT con función redundante, o por la redundancia estructural entre los extremos N-terminal de las histonas H3 y H4 [145,146].

Es posible que la función del complejo B sea requerida en la célula en una situación o proceso concreto, distinto a los reproducidos habitualmente en el laboratorio. Quizás la intervención del complejo B podría ser necesaria en procesos tales como la conjugación, esporulación o germinación, lo que además constituiría una sencilla explicación de porque no se observan diferencias entre una cepa salvaje y mutantes en *hat1Δ* o en *hat2Δ* cuando se trabaja con cultivos en las condiciones habituales de laboratorio. Así pues se realizaron diferentes aproximaciones experimentales con el fin de identificar fenotipos asociados a la delección del gen *HAT1* en estos tres procesos. En ningún caso, para ninguno de los tres procesos estudiados se encontraron defectos dependientes de *HAT1*. La eficiencia de la conjugación obtenida entre cepas *hat1Δ* resultó similar a la eficiencia de obtenida entre dos cepas salvajes. Por otra parte no se detectaron diferencias significativas entre el porcentaje de esporas generado por células diploides *hat1Δ* y el generado por células diploides salvajes, así como tampoco se observaron defectos morfológicos en las ascas. Por último no se observaron defectos en el proceso de germinación de esporas *hat1Δ*.

Tras la identificación de la proteína Hif1 como componente del complejo B, se construyó el mutante de delección de este gen con el objeto de analizar si presentaba algún defecto de crecimiento. El mutante de delección de *HIF1*, al igual que los mutantes en *HAT1* o *HAT2*, muestra un crecimiento similar al salvaje. Tampoco se detectaron defectos de crecimiento en cepas con delecciones en dos de los genes del complejo, *hat1Δhat2Δ* y *hat1Δhif1Δ*, ni tampoco en el triple mutante *hat1Δhat2Δhif1Δ*. El cultivo de estas cepas en diferentes condiciones y/o en presencia de diferentes drogas no originó defectos diferenciales de crecimiento en ninguno de los casos. Así el crecimiento de estas células no se vio afectado de forma diferencial ni cuando fueron incubadas a 37° C, ni tras la irradiación con luz ultravioleta. Tampoco se detectaron defectos de crecimiento en células *hat1Δ*, con respecto a células salvajes, cuando se cultivaron en presencia de agentes genotóxicos como el metil metanosulfonato (MMS), la hidroxurea (HU), la fleomicina o la camptotecina, o agentes que generan estrés oxidativo como el H₂O₂ o la 4-nitroquinolina n-óxido. Por último células *hat1Δ* tampoco resultaron ser más sensibles que las células salvajes a rapamicina, una droga que inhibe proteína quinasas de la ruta TOR.

Como hemos visto la mayoría de estudios sencillos que se han realizado con células mutantes en alguna de las proteínas del complejo B no han revelado ningún fenotipo, sin embargo sí se han descrito algunos fenotipos a partir de estudios más complejos. En uno de los pocos estudios que han puesto de manifiesto un fenotipo en mutantes de los genes del enzima B, se determinó la senescencia replicativa de células con delecciones en los genes *HAT1* y/o *HAT2* (ver Introducción). La delección de *HAT2*, pero no de *HAT1*, produce un aumento en la esperanza de vida de células de levadura mientras que el doble mutante *hat1Δhat2Δ* presenta un comportamiento similar al mutante *hat2Δ* [250]. Al objeto de analizar si Hif1p participa en el

envejecimiento de la levadura, al igual que las proteínas Hat1 y Hat2 con las que forma parte del complejo B, se determinó la esperanza de vida de células de levadura *hif1Δ* y se comparó con la de células salvajes (Figura 18). No se detectaron diferencias significativas en el número medio de divisiones en las células de ambas cepas, ya que en ambos casos éste oscila alrededor de 18. De modo que la proteína Hif1p, contrariamente a Hat2p, no parece estar implicada en el proceso de senescencia replicativa.

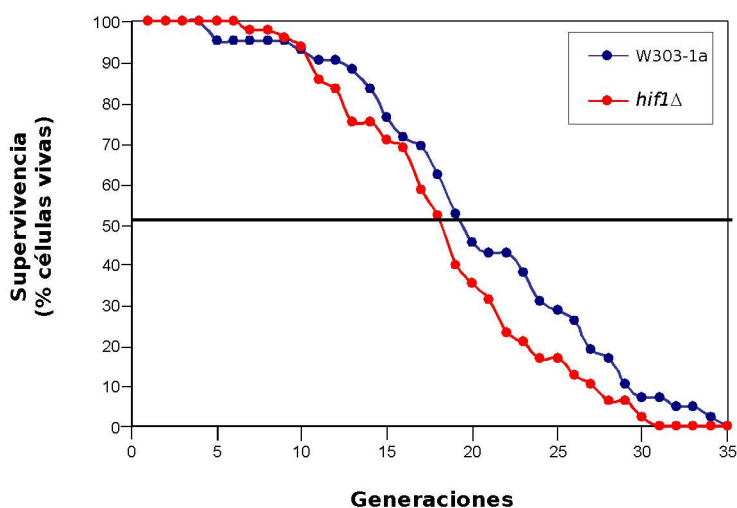


Figura 18. **La delección de *HIF1* no afecta a la esperanza de vida de células de levadura.** Se aislaron 60 células de cada cepa con la ayuda de un micromanipulador (ver Materiales y Métodos), y se controlaron hasta que sufrieron una primera división tras la cual las células madre se desecharon y se conservaron las células hijas, todas ellas vírgenes. Estas células vírgenes se incubaron a 28° C y periódicamente se observaron al microscopio para ir eliminando las nuevas células hijas generadas, hasta determinar el número total de divisiones que sufrió cada una de ellas. En la gráfica se representa el porcentaje de células vivas frente al número de divisiones para células salvajes (W303-1a) y para células *hif1Δ* (BQS1187).

Por último mencionar que recientemente se ha descrito que células de levadura que combinan la delección del gen *HAT1* y/o *HAT2* con sustituciones en las lisinas 9 y 14 de H3 por argininas, que mimetizan lisinas que no

pueden ser acetiladas, presentan defectos en el silenciamiento telomérico [196]. Puesto que Hif1p está asociado a Hat1p *in vivo*, decidimos estudiar si esta proteína también estaba implicada en el silenciamiento telomérico.

Efecto de la delección de HIF1 sobre el silenciamiento telomérico.

Para abordar este estudio se trabajó con una batería de cepas que combinan deleciones en los genes *HAT1* e *HIF1* con sustituciones K9,14R en la histona H3, y que contienen el gen *URA3* integrado en el brazo L del telómero VII. Estas cepas tienen delecionadas las copias cromosómicas de los genes para las histonas H3 y H4 (*HHT1-HHF1* y *HHT2-HHF2*) y contienen plásmidos episomales con copias salvajes de las histonas H4-H3 (*HHF2-HHT2*) o con una copia salvaje de la H4 y mutante de la H3 (*HHF2- [K9,14R] HHT2*). La estimación de los niveles de silenciamiento se realizó midiendo la fracción de células que pueden formar colonias en placas de medio mínimo que contiene ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) al 0.1 % (p/v), en relación al número de colonias que crecen en placas que no contienen 5-FOA. El 5-FOA es un análogo de un compuesto intermediario en la ruta de síntesis del uracilo, a partir del cual las células no pueden obtener uracilo, pero sin embargo producen un compuesto tóxico que las mata. Si las células tienen incompleta la ruta de síntesis del uracilo, lo que en este caso depende del nivel de represión del gen *URA3* localizado en la región telomérica, no podrán sintetizar uracilo, pero tampoco sintetizarán el compuesto tóxico derivado del 5-FOA y podrán vivir en presencia de 5-FOA, siempre y cuando dispongan del uracilo necesario en el medio [210]. La Figura 19 muestra, mediante un diagrama de barras del porcentaje de células que crecen en presencia de 5-FOA, el resultado del estudio realizado con células *hif1Δ* comparándolo con células salvajes y con células *hat1Δ*. Cuando las células expresan la histona H3 salvaje, aunque el doble mutante *hat1Δhif1Δ* parece

tener un pequeño efecto sobre el silenciamiento, los mutantes simples *hat1Δ* e *hif1Δ* no muestran defectos de silenciamiento teloméricos significativos. En general, en las células que expresan H3 K9,14R disminuye el silenciamiento del gen *URA3*. La combinación de las sustituciones K9,14R de H3 con la delección de *HIF1* produce defectos mayores en el silenciamiento telomérico, similares a los del mutante *hat1Δ*. Estos resultados sugieren que la proteína Hif1 participa, al igual que Hat1p, en el silenciamiento telomérico. Además la combinación de las delecciones de los

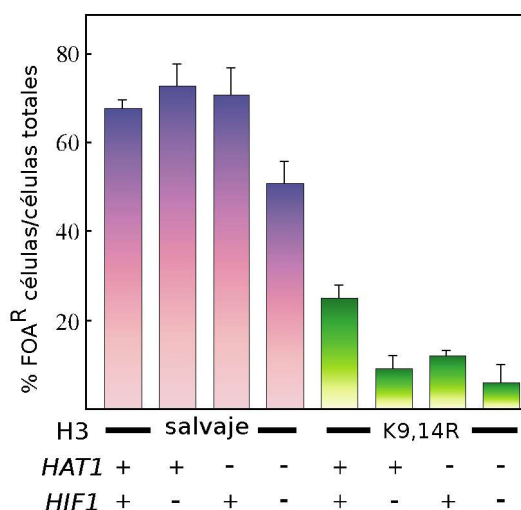


Figura 19. **La delección de *HIF1* o *HAT1*, junto con la sustitución de K9,14R en la histona H3, causa un defecto similar en el silenciamiento telomérico.** Se cultivaron células de levadura en medio YPD a 28° C hasta que alcanzaron una fase de crecimiento exponencial y se sembró un número idéntico de células en placas de medio SC y de SC más 5-FOA (0.1 % p/v), que se incubaron a 28° C durante tres días. El silenciamiento telomérico de cada cepa se cuantificó contando el número de colonias que crecieron en SC más 5-FOA, relativo al número de colonias que crecieron en SC, repitiendo el ensayo tres veces para cada cepa. En el gráfico se ha representado la media y la desviación estándar. Las cepas de levadura que se emplearon son las siguientes: BQS1228 (H3 salvaje); BQS1240 (H3 salvaje *hif1Δ*); BQS1232 (H3 salvaje, *hat1Δ*); BQS1244 (H3 salvaje *hat1Δ hif1Δ*); BQS1230 (*H3K9,14R*); BQS1242 (*H3K9,14R hif1Δ*); BQS1234 (*H3K9,14R hat1Δ*) y BQS1246 (*H3K9,14R hat1Δ hif1Δ*). Todas las cepas contienen el gen *URA3* integrado en el telómero VII-L y expresan el alelo de la histona H3 indicado desde un plásmido centromérico, como única fuente de histona H3.

genes *HAT1* e *HIF1* en células que expresan la histona H3 mutante K9,14R no acentúa significativamente este fenotipo, lo que sugiere que ambas participan en el mismo proceso. Hay que mencionar que el defecto en el silenciamiento telomérico para el mutante *hat1Δ* detectado en este trabajo no es tan pronunciado como el descrito por Kelly *et al.* (2000) [196], lo que podría deberse a variaciones en los componentes del medio, de las condiciones de cultivo u otras variables experimentales [210]. Sin embargo los resultados mostrados aquí son consistentes al mostrar la participación de Hat1p, y ahora también de Hif1p, en silenciamiento telomérico.

En el genoma de levadura se han descrito, a parte de los telómeros, otras dos regiones donde la cromatina se encuentra transcripcionalmente silenciada, el rDNA y los loci HML y HMR. Todas estas regiones tienen una estructura más compacta e inaccesible debido a la interacción con diferentes proteínas que impiden la transcripción génica [211]. Aunque la composición de esta estructura proteica represiva es bastante general para las tres regiones, existen algunas diferencias [211-213]. Como acabamos de ver el enzima B participa en la regulación del silenciamiento telomérico, lo que lleva a la cuestión de si también interviene en el silenciamiento del rDNA y de los loci HML y HMR. Se realizaron experimentos similares a los anteriores, en los que se midió el grado de silenciamiento contando el número de colonias formadas en presencia de 5-FOA, pero esta vez empleando cepas que además de expresar H3 K9,14R o H3 salvaje, contienen el gen marcador *URA3* en la región del rDNA, en el locus HML o en el locus HMR. En ningún caso se observaron defectos significativos de silenciamiento producidos como consecuencia de la delección de *HAT1* en los locus HML y HMR, ni en la región del rDNA. Estos resultados están de acuerdo con datos previamente publicados [196], donde empleando un sistema diferente en el que se cuantifica el RNA expresado, no se encuentra

que la proteína Hat1 participe en el silenciamiento del locus *HMR*.

Estudio de la acetilación *in vivo* de la lisina 12 de la histona H4

Durante el ensamblaje de nucleosomas en todas las especies dónde se ha estudiado, la histona H4 sintetizada *de novo* aparece diacetilada en las lisinas 5 y 12 [50,52, 53, 191, 192]. Se piensa que este patrón de acetilación conservado es generado por el complejo HAT-B. *In vitro*, el enzima HAT-B de una amplia variedad de especies acetila la histona H4 en estas posiciones. En el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la proteína Hat1 recombinante acetila la histona H4 en las posiciones 5 y 12, mientras que el complejo HAT-B purificado muestra una mayor preferencia por la lisina 12 [139,174,175]. Sin embargo, a pesar de la abundancia de información sobre la especificidad *in vitro* de este enzima, no se dispone del mismo tipo de datos *in vivo*. Con la intención de estudiar el requerimiento del complejo B en la acetilación de la lisina 12 de H4 *in vivo*, se analizó por *Western blotting* los niveles de acetilación de la lisina 12 de la histona H4 en una cepa salvaje, y en cepas mutantes en los genes *HAT1*, *HAT2* o *HIF1*. Para realizar estos experimentos se disponía de un anticuerpo comercial que reconoce específicamente la lisina 12 acetilada de la histona H4 (anti-H4K12ac, Upstate. Tabla VI). Previamente se comprobó si la especificidad de este anticuerpo podría ser lo suficientemente alta para poder detectar pequeñas diferencias en el nivel de acetilación sobre esta posición. Para ello, en primer lugar se purificaron histonas de levadura y se prepararon extractos totales (WCE, *Whole Cell Extract*) de una cepa salvaje de levadura y de una cepa que expresa una forma de H4 con la lisina 12 sustituida por

una arginina (H4K12R), mimetizando el estado no acetilado. Ambas cepas expresan H4 desde un plásmido centromérico como única fuente de esta histona H4. Como se muestra en la Figura 20A, el anticuerpo frente a H4K12ac genera una fuerte señal tanto con el WCE como con histonas purificadas de la cepa que expresa la histona H4 salvaje (carreras 2 y 4), pero no se detectó ninguna señal en las muestras obtenidas de la cepa que expresa H4K12R (carreras 3 y 5), ni siquiera tras tiempos largos de exposición, indicando la alta especificidad del anticuerpo por la isoforma H4K12ac. Además estos resultados muestran que el anticuerpo es lo suficientemente sensible como para reconocer la lisina 12 acetilada de la histona H4 tanto en muestras de histonas purificadas como en extractos totales, donde la cantidad total de histona es mucho menor. También se analizó una alícuota de histonas purificadas de eritrocito de pollo (carrera 1), en la que también se detecta isoforma H4K12ac. Sin embargo, ya que no es exactamente equivalente la histona H4 no acetilada en la lisina 12 (H4K12) que histona H4 con la lisina 12 sustituida por una arginina (H4K12R), se realizó un ensayo adicional para determinar la especificidad del anticuerpo anti-H4K12ac. Se ensayó este anticuerpo por *Western blotting* empleando histonas procedentes de diferentes fuentes, eritrocito de pollo y levadura, que habían sido incubadas con Hat1p recombinante de levadura, en presencia o ausencia del otro sustrato, acetil-CoA. Los resultados que se muestran en la Figura 20B, indican que las histonas que habían sido incubadas en presencia de acetil-CoA generan una señal más intensa que histonas incubadas sin acetil-CoA, que aunque en esta imagen no se observa señal, cuando se realizan tiempos largos de exposición también generan una pequeña señal debido al grado natural de acetilación que presenta la histona H4 en la lisina 12 en el momento de ser purificada de células de levadura o eritrocito de pollo. Estos resultados ponen de manifiesto la alta especificidad del anticuerpo frente H4K12ac y su

capacidad de detectar diferencias en los niveles de H4K12ac.

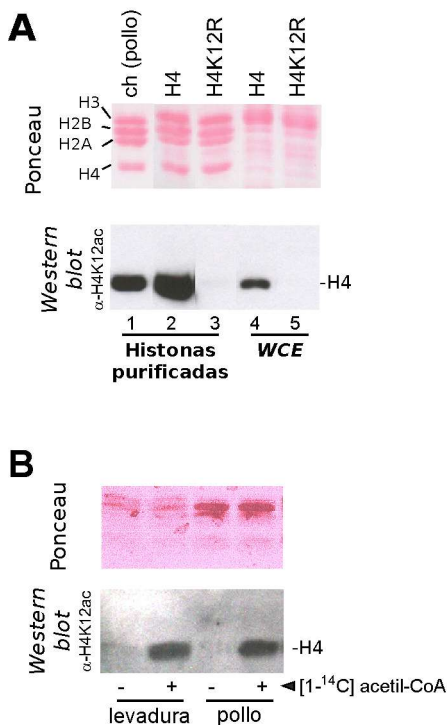


Figura 20. **Análisis de la especificidad del anticuerpo frente a H4K12ac.** Se purificaron histonas y se prepararon extractos celulares de cepas que expresan la histona H4 indicada, salvaje (PKY501) o H4K12R (LDY105), desde un plásmido, como única fuente de histona H4. **A**, las histonas y los extractos celulares se resolvieron por SDS-18% PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se incubó con el anticuerpo de conejo que reconoce la lisina 12 acetilada de la histona H4 (Tabla VI). En el panel superior se muestra la membrana teñida con Ponceau y en el panel inferior se muestra el *immunoblot*. Sólo se muestra la región del gel en la que se encuentran las histonas. **B**, histonas purificadas de células salvajes (W303-1a) y histonas *core* de eritrocito de pollo, se incubaron con Hat1p recombinante, en presencia o en ausencia de [1-¹⁴C] acetil-CoA, durante 20 minutos a 35^o C. Las histonas ensayadas se resolvieron por SDS-18% PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa como se describe en **A**, y se analizaron con el anticuerpo frente a H4K12ac. En la figura se muestra la membrana teñida con Ponceau y el *immunoblot*. En la imagen se indica la posición de la histona H4.

Efecto de la delección de HAT1, HAT2 e HIF1 sobre el nivel de H4K12ac

Tras verificar la especificidad del anticuerpo, éste se empleó para el análisis *Western blotting* de histonas procedentes de células mutantes de delección de proteínas del complejo HAT-B (Figura 21). A partir de cultivos asincrónicos en fase exponencial de una cepa salvaje y de las cepas *hat1Δ*, *hat2Δ* o *hif1Δ*, se aislaron histonas (Figura 21A) y se prepararon extractos totales (Figura 21B) que contienen, por tanto, todas las histonas celulares, tanto las histonas de cromatina como las histonas “libres”. El revelado de la membrana con el anticuerpo específico no indicó diferencias significativas

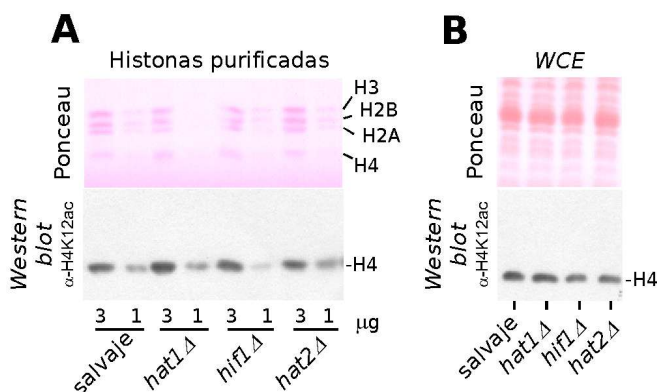


Figura 21. **Niveles de H4K12ac en extractos celulares y en histonas purificadas de células de levadura mutantes en genes del complejo HAT-B.** **A**, histonas de células salvajes (W303-1a), *hat1* Δ (RS1263), *hat2* Δ (YSTT11) o *hif1* Δ (YSTT49) purificadas como se describe en Materiales y Métodos, fueron resueltas por electroforesis SDS-18 % PAGE, transferidas a una membrana de nitrocelulosa, teñidas con Ponceau (panel superior), y analizadas con anticuerpo frente a H4K12ac (panel inferior). **B**, se prepararon extractos celulares de las mismas cepas y se analizaron por *Western blotting* de la misma manera que se ha descrito en A.

en los niveles de acetilación de H4K12 entre las células salvajes y mutantes, ni en histonas purificadas de cromatina ni en las histonas presentes en el WCE.

Resulta sorprendente que no se detecten defectos en los niveles de acetilación de H4K12 en mutantes del enzima B, especialmente si se tiene en cuenta que este enzima posee una elevada actividad específica *in vitro* [139,175,189] y que parece ser abundante en la célula. Sin embargo diferentes alternativas podrían explicar este resultado. Una posibilidad es que sólo una pequeña fracción de toda la isoforma H4K12ac que contiene la célula sea acetilada por Hat1p, y que la mayor parte de la isoforma H4K12ac sea producto de otro/s enzima/s con actividad HAT. Sería posible que esta otra fracción más abundante generada por enzimas diferentes al complejo B enmascarase la fracción minoritaria de H4K12ac producida por este complejo. Otra posibilidad es que, en ausencia de Hat1p, otro enzima puede

suplir su función y acetilar la histona H4, explicando por qué no se detectan defectos de H4K12ac en mutantes del complejo HAT-B. Formalmente también sería posible que la diana sustrato principal del enzima B *in vivo* fuese una proteína no conocida hasta ahora, distinta de aquella que es acetilada específicamente *in vitro*, la histona H4. Hasta este momento, como ya se ha comentado, la especificidad de Hat1p sobre la histona H4 sólo ha sido determinada *in vitro* para todas las especies en las que se ha analizado. En este sentido es interesante mencionar que en mamíferos la desacetilasa HDAC6, identificada inicialmente como un enzima con actividad histona desacetilasa *in vitro*, resultó ser, como posteriormente se comprobó, un enzima que desacetila tanto *in vivo* como *in vitro*, tubulina [57]. Por tanto sería también posible que *in vivo* el sustrato de Hat1p fuese otra proteína. Continuando con el propósito inicial de encontrar si el enzima B acetila H4K12 *in vivo*, se seleccionaron distintas condiciones que podrían aumentar las posibles diferencias en los niveles de acetilación de H4K12 dependientes de Hat1p, entre células salvajes y células *hat1Δ*. Como ya se ha mencionado, en algunas especies se ha descrito que inmediatamente después de la síntesis de la histona H4, ésta es acetilada en las lisinas 5 y 12 [191,192]. Siguiendo a su ensamblaje en cromatina parece ser que las histonas son desacetiladas durante la maduración de la cromatina [193,194]. Es posible que la acetilación sobre la lisina 12 de H4 recién sintetizada dependiente de Hat1p tenga un tiempo de vida muy corto, lo que dificultaría su detección. Es razonable pensar que si se elimina o inhibe la histona desacetilasa responsable de la desacetilación *in vivo* de H4K12, podrían aumentar las diferencias de H4K12ac entre células con o sin *HAT1*. Así pues, se analizaron los niveles de H4K12ac tanto en histonas purificadas como en extractos totales, en una batería de cepas *hat1Δ* que además son mutantes en las histona desacetilasas: *RPD3*, *HDA1*, *HOS1* y *HOS2*. Se sabe que Rpd3p y Hda1p participan en la desacetilación global *in vivo* de la

H4K12ac [215,216]. Para las otras histona desacetilasas (HDACs) no se ha descrito la especificidad de sitio. Paralelamente y con el mismo objetivo, se analizaron los niveles de H4K12ac en histonas y en extractos totales procedentes de células salvajes y *hat1Δ* que habían sido cultivadas en presencia de Tricostatina A, un inhibidor de histona desacetilasas que en levadura parece tener un efecto similar a la delección de diferentes genes de histona desacetilasas [217]. Como se muestra en la Figura 22A, sólo se observó un incremento significativo de los niveles de H4K12ac en células *rpm3Δ*, tanto en histonas purificadas como en las histonas presentes en los extractos celulares, pero no se detectaron diferencias en los niveles de H4K12ac dependientes de *HAT1*. Este resultado sugiere que Rpd3p no debe ser la histona desacetilasa responsable de desacetilar la fracción de H4 que pudiese, en su caso, ser modificada por Hat1p. En extractos celulares de cepas de levadura que presentan combinaciones en delecciones de genes de las otras histona desacetilasas y de *HAT1* (Figura 22B) el análisis *Western blotting* tampoco reveló ninguna diferencia en los niveles de H4K12ac dependientes de Hat1p. Por último, tampoco la incubación de células salvajes y de células mutantes en *hat1Δ*, *hat2Δ* o *hif1Δ* con Tricostatina A sirvió para detectar diferencias en los niveles de acetilación de la histona H4, ni en histonas purificadas ni en extractos celulares (Figura 22C).

Como se ha mencionado, es posible que la fracción de H4 que es acetilada en la lisina 12 por Hat1p sea enmascarada como consecuencia de otras HATs que acetilan esta misma posición. Un posible candidato es la proteína Esa1, una HAT esencial de *S. cerevisiae* que participa en la acetilación global de H4K12 y de otras posiciones. Para comprobar esta posibilidad se delecionó *HAT1* en una cepa con una mutación termosensible de *ESA1^{ts}*, *esa1-Δ414* [183]. Tras incubar las células durante 4 horas a 37^o C

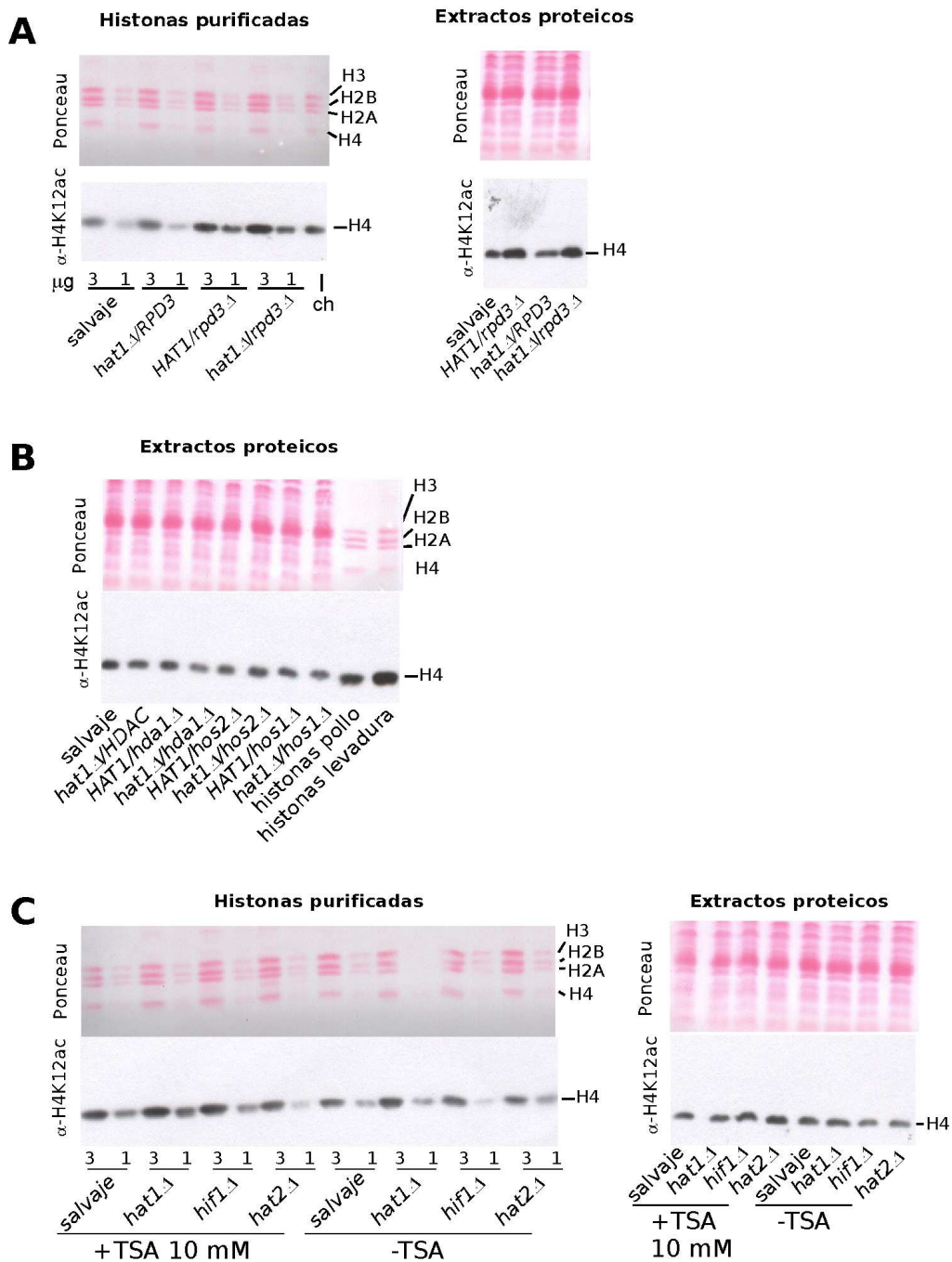


Figura 22. **Análisis de los niveles de H4K12ac en células deficientes en distintas histonas desacetilasas o tratadas con Tricostatina A (TSA).** **A**, se prepararon histonas (parte izquierda) y extractos celulares (parte derecha), que se analizaron por *Western blotting* con anti-H4K12ac, como se describe en la Figura 21. Las cepas que se emplearon fueron: M398 (salvaje), M508 (*rpd3Δ*), BQS1215 (*hat1Δ*) y BQS1207 (*rpd3Δ hat1Δ*). **B**, se analizaron los niveles de H4K12ac en extractos celulares preparados a partir de las siguientes cepas: BQS248 (salvaje); BQS1292 (*hat1Δ*); BQS300 (*hos1Δ*); BQS301 (*hos2Δ*); BQS302 (*hda1Δ*); BQS1286 (*hos1Δ hat1Δ*); BQS1288 (*hos2Δ hat1Δ*) y BQS1290 (*hda1Δ hat1Δ*). Como control se emplearon histonas purificadas de eritrocito de pollo y de levadura. **C**, se sembraron células salvajes (W303-1a) o mutantes en el gen *HAT1* (RS1263), en *HAT2* (YSTT11) o en *HIF1* (YSTT49), en medio de cultivo YPD que contenía 10 μM en Tricostatina A (TSA), y se incubaron toda la noche a 28° C. A partir de estas células se purificaron histonas y se prepararon extractos celulares, que se analizaron con el anticuerpo anti-H4K12ac. Se emplearon células sin tratar con TSA como control. En el caso de histonas purificadas se aplicaron dos cantidades diferentes, 1 o 3 μg.

se prepararon extractos totales y se purificaron histonas, que fueron analizadas por *Western blotting* con el anticuerpo frente a H4K12ac, y se compararon con extractos celulares y con histonas obtenidas de células crecidas a temperatura no restrictiva. Como se observa en la Figura 23 las células *esa1^{ts}* ya muestran niveles reducidos de H4K12ac incluso a temperatura no restrictiva (carreras 3, 4, 13 y 14), pero tras la incubación a 37° C los niveles de H4K12ac en estas cepas aún disminuyen más, tanto en extractos celulares (carreras 7 y 8) como en histonas purificadas (carreras 17 y 18). Sin embargo, no se aprecia una mayor disminución de la señal tras la delección de *HAT1* (carreras 8 y 18). Así pues, la fracción de H4 acetilada por Hat1p no parece ser enmascarada por la histona H4 acetilada por Esa1p. La señal residual que se detecta en células *esa1^{ts}* puede deberse a un bajo nivel de actividad de Esa1p termosensible o también a la presencia de otra/s actividad/es HAT/s que acetilan esa misma posición.

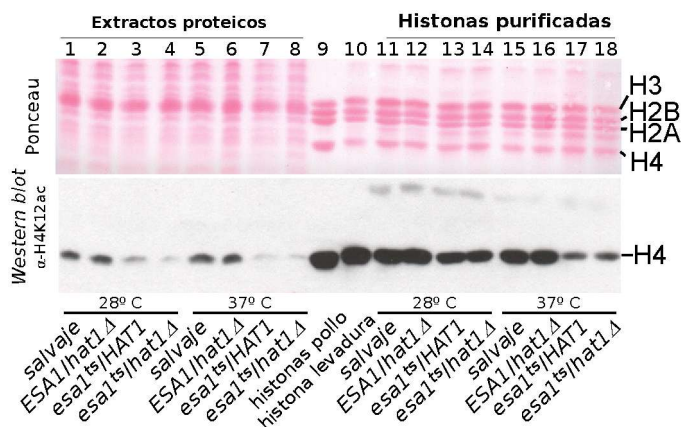


Figura 23. **En células *esa1^{ts}* no se detecta acetilación de la lisina 12 de H4 dependiente de *Hat1p*.** Se sembraron células de levadura en medio de cultivo YPD y se incubaron a 28° C hasta que alcanzaron una $OD_{600}=0.5$, y a partir de ese momento se incubaron a 37° C durante 4 horas. Estas células se emplearon para preparar extractos celulares y para purificar histonas, que se resovieron por SDS-18 % PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron con anticuerpo frente a H4K12ac. Como control se realizó el mismo experimento pero con células que únicamente habían sido incubadas a 28° C. Las cepas empleadas fueron: LPY2990 (*ESA1*); BQS1294 (*ESA1, hat1Δ*); LPY3291 (*esa1-Δ414* termosensible) y BQS1296 (*esa1-Δ414* termosensible, *hat1Δ*). Todas las cepas expresaban el alelo indicado del gen *ESA1* desde un plásmido centromérico. En la figura se indica la posición de las histonas y se muestra la membrana teñida con Ponceau (panel superior) y el *immunoblot* (panel inferior). Las histonas internas de pollo y de levadura se utilizaron como controles.

Niveles de proteína *Hat1* y de H4K12ac durante el ciclo celular.

Durante la replicación se duplican las cadenas de DNA y todos los componentes de la cromatina. Tras el paso de la horquilla de replicación las histonas parentales se reasocian aleatoriamente con una de las dos cadenas hijas de DNA [105,116-118,218-220], pero es necesario la síntesis de nuevas histonas para restaurar la estructura cromatínica en las dos nuevas hebras de DNA. La replicación del DNA y el ensamblaje de la cromatina son dos procesos que han de estar estrechamente coordinados, aunque poco se sabe de la ruta que dirige a las histonas desde su síntesis en el citoplasma hasta su ensamblaje en cromatina en los sitios donde se está replicando el DNA [221-223]. Se ha descrito que durante la replicación se sintetizan altos

niveles de histonas [119,224] e inmediatamente tras su síntesis son acetiladas previamente a su deposición sobre las cadenas de DNA replicadas [191,192]. Como ya se ha mencionado, las histona acetiltransferasas tipo B son enzimas que acetilan únicamente histonas no asociadas a DNA, lo que ha llevado a pensar que están implicados en la acetilación de histonas sintetizadas *de novo* [225]. Hat1p ha sido propuesta como la candidata más probable que se encargaría de esta función, ya que, *in vitro*, solo acetila la histona H4 no ensamblada en cromatina sobre las lisinas 12 y 5, que coinciden con las posiciones que han sido encontradas en H4 previamente a su ensamblaje en cromatina, un patrón evolutivamente muy conservado [50,53]. Los resultados mostrados en el apartado anterior no han revelado, sin embargo, acetilación de H4K12 dependiente de *HAT1*. A pesar de todo se analizó otra posibilidad: si es cierto que Hat1p acetila la histona H4 libre previamente a su ensamblaje en cromatina durante la fase S, momento en el que se sintetizan elevados niveles de histona, es posible que tanto el contenido de proteína Hat1 como los niveles de H4K12ac dependiente de Hat1p sean transitorios. Así, por un lado, si Hat1p participa acetilando la histona H4 sintetizada *de novo*, quizás se observe un pico de proteína Hat1 durante la fase G1 tardía y la fase S temprana coincidiendo con el pico de síntesis de histonas. Para estudiar esta posibilidad se analizó el contenido de proteína Hat1-HA a lo largo del ciclo celular. Se bloqueó en G1 un cultivo de una cepa que expresa *HAT1-HA*, empleando factor α . Se liberó el cultivo, ahora sincronizado, y se tomaron muestras de idéntico volumen a distintos tiempos. Se prepararon extractos totales y se analizaron los niveles de Hat1p-HA por *Western blotting* (Figura 24A). Como control de la sincronización se determinó el índice de gemación microscópicamente (Figura 24B). Los resultados muestran que Hat1 está presente a lo largo de todo el ciclo celular y no parece haber una acumulación de la proteína

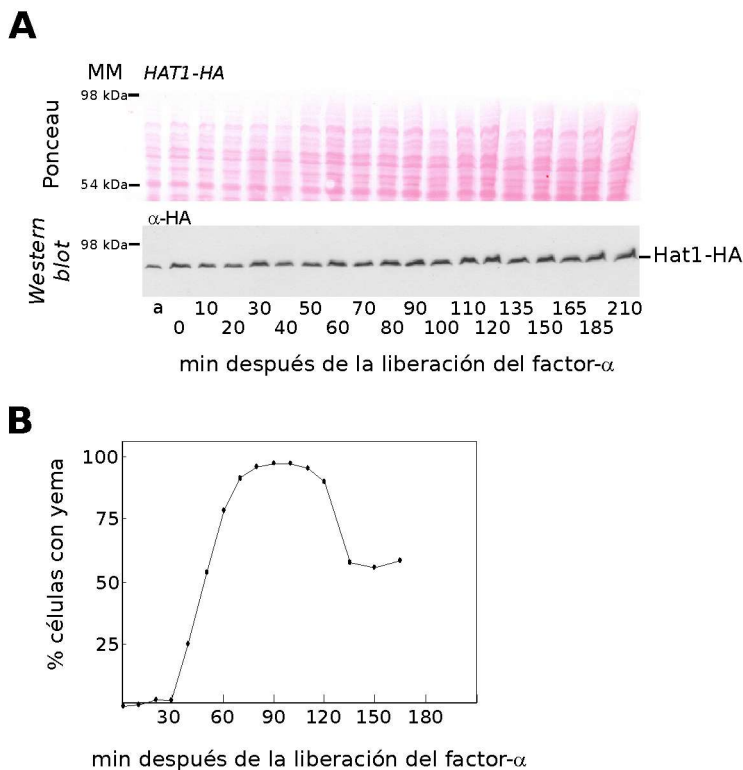


Figura 24. **Los niveles de Hat1p son aproximadamente constantes a lo largo del ciclo celular.** La cepa de levadura BQS1154, conteniendo una versión de Hat1p etiquetada con el epítipo HA, se creció en medio de cultivo YPD. Las células se bloquearon en G1 incubándolas con factor α y tras su liberación se recogieron las células contenidas en volúmenes de cultivo idénticos, tomados a los tiempos que se indican en la figura. Se prepararon extractos celulares y se analizaron los niveles de Hat1p-HA empleando el antisuero de ratón 12CA5 frente al epítipo HA. **A**, membrana teñida con Ponceau (panel superior) y *immunoblot* (panel inferior). La carrera a corresponde a células asincrónicas. **B**, para el seguimiento de la sincronización se determinó el porcentaje de células con yema (índice de gemación) en los mismos tiempos que se indican en el apartado **A**.

en la transición G1/S, definida como el momento en que un cultivo presenta un 50 % de gemación, ni tampoco en ningún otro estadio del ciclo celular. Además este resultado es consistente con los datos de transcripción de

HAT1 obtenidos durante el ciclo celular [226], que indican que los niveles de RNA mensajero de *HAT1* son constantes.

Por otra parte se estudió la posibilidad de que la histona H4 se acetile en la lisina 12 de forma transitoria durante la fase G1/S del ciclo celular, de forma dependiente de Hat1p. Para ello se analizó mediante *Western blotting* el nivel de H4K12ac presente en extractos totales obtenidos de células salvajes y *hat1Δ*. Por un lado el análisis FACS, además de informar sobre el grado de sincronización obtenido, reveló que no existen diferencias significativas entre las dos cepas en cuanto a la progresión a lo largo del ciclo celular (Figura 25A). Por otro lado los experimentos de *Western blotting* no mostraron ningún pico de acetilación significativo de H4K12 a lo largo del ciclo celular, y lo que parece más importante, no se observaron diferencias en los niveles de H4K12ac entre la cepa salvaje y la *hat1Δ* (Figura 25B). Estos resultados no descartan la posibilidad de que Hat1p acetile esta posición en un momento concreto del ciclo, pero si es así, el tiempo de permanencia de esta modificación es tan corto que no se detecta con las técnicas empleadas en este trabajo.

Todos los resultados expuestos hasta ahora sugieren que aparentemente, en condiciones normales, la acetilación *in vivo* de H4K12 detectada no debe ser dependiente de *HAT1*. Ello lleva a pensar que si la histona H4 es la diana de acetilación de Hat1p *in vivo*, como lo es *in vitro*, entonces la fracción de H4 modificada por este enzima debe ser muy pequeña y quizás por ello indetectable con los métodos empleados, o quizás también la acetilación de K12H4 por Hat1p podría participar en algún proceso o estado fisiológico particular no estudiado en este trabajo.

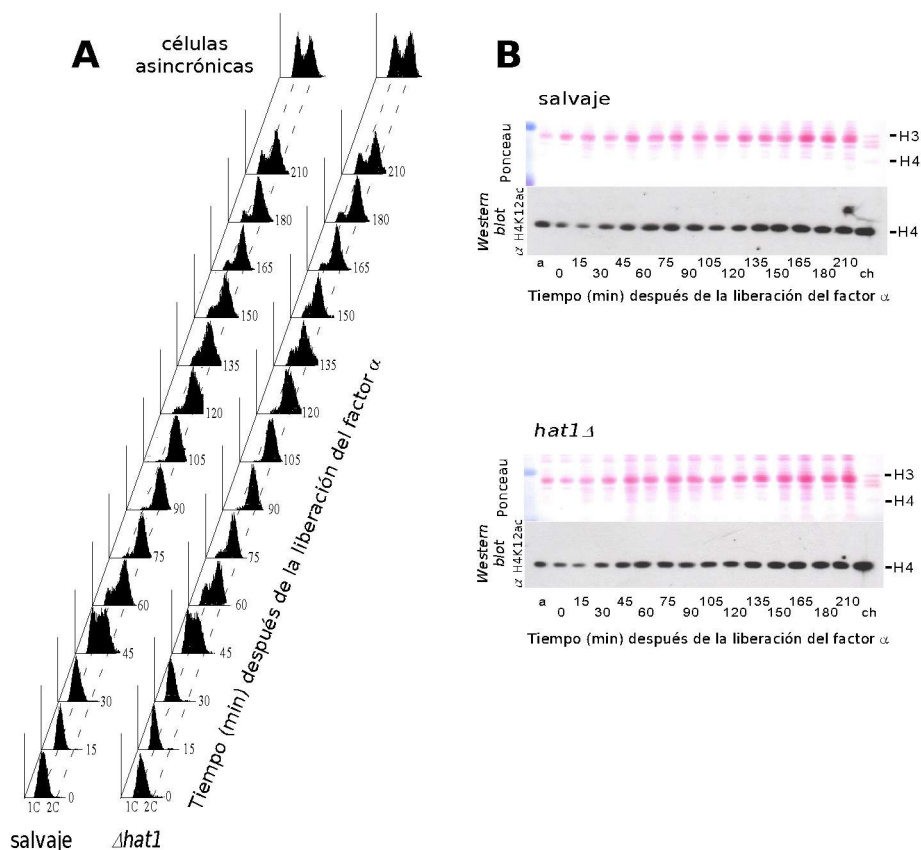


Figura 25. **Los niveles de H4K12ac son aproximadamente constantes a lo largo del ciclo celular, e independientes de HAT1.** Se cultivaron células de una cepa salvaje (MCY730) y de una cepa *hat1* Δ (BQS179) en medio de cultivo YPD. Las células se bloquearon con factor α como se describe en Materiales y Métodos, y tras la liberación del cultivo se tomaron muestras equivalentes a diferentes tiempos para análisis FACS, **(A)** y para preparar extractos celulares, **(B)**. En **B**, los extractos celulares obtenidos se resolvieron por SDS-18 % PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. El *immunoblot* se analizó empleando anticuerpo frente a H4K12ac. En los paneles de arriba se muestran las membranas teñidas con Ponceau y en los de abajo los *immunoblots*. ch, histonas internas de eritrocito de pollo. a, células asincrónicas.

Niveles de H4K12ac en células detenidas en distintos estados del ciclo celular

Para sincronizar un cultivo se bloquean las células en un momento del ciclo

celular empleando alguna droga. Una vez la mayoría de las células se encuentran paradas en este punto se liberan eliminando la droga del medio de cultivo, momento en el cual inician una nueva ronda en el ciclo celular, esta vez de forma sincronizada. Sin embargo, conforme va avanzando el crecimiento tras la eliminación de la droga, cada vez es mayor el porcentaje de células desincronizadas, lo que puede suponer un problema cuando las diferencias que se espera encontrar en aquello que se está analizando son pequeñas. Para intentar solventar este problema una posibilidad es tratar cultivos empleando diferentes drogas o tratamientos que bloqueen en momentos diferentes del ciclo celular. Así pues se seleccionaron distintas drogas y tratamientos para obtener poblaciones de células detenidas en determinados estados del ciclo y se determinaron los niveles de H4K12ac en cada uno de ellos. En primer lugar, la incubación de células en un medio de cultivo deficiente en una fuente de nitrógeno provoca que las células se detengan en el estadio G0 [227]. El tratamiento por ausencia de nitrógeno no es estrictamente un método de sincronización pero permite, durante la parada por ausencia de nitrógeno, obtener todas las células de un cultivo en fase G0 o quiescente, estado metabólico de reposo. Se incubaron células salvajes y *hat1Δ* en medio de cultivo sin nitrógeno durante 14 horas hasta que se detuvieron en fase G0, lo que se determinó microscópicamente contando células individuales sin yema, de tamaño pequeño. Tras pasar las células a medio de cultivo rico YPD se recogieron muestras a distintos tiempos para el análisis del nivel de acetilación de H4K12. En el tratamiento por ausencia de nitrógeno no se observó ninguna diferencia en los niveles de H4K12ac entre la cepa salvaje y la cepa *hat1Δ*, ni cuando las células se encontraban bloqueadas en G0 tras el tratamiento por ausencia de nitrógeno (t=0), ni tampoco posteriormente tras su cultivo en medio rico (Figura 26). Como control de carga interno en este y otros experimentos se utilizó un anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la histona H3

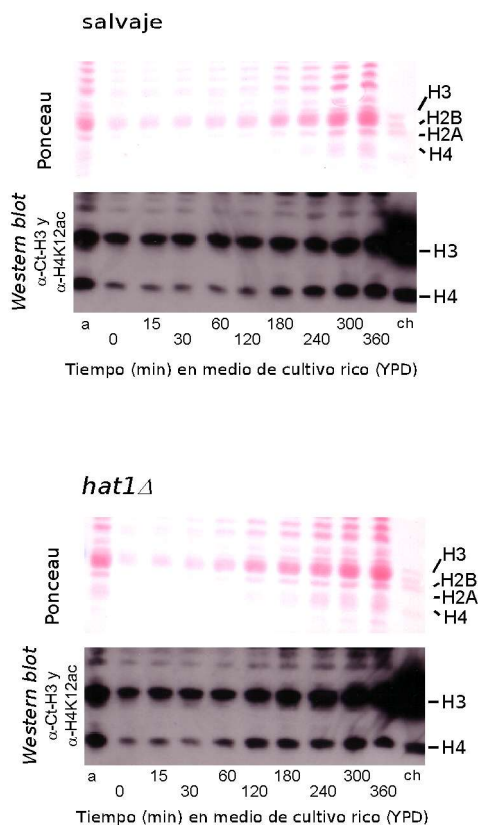


Figura 26. **Niveles de H4K12ac en células salvajes y *hat1Δ* detenidas en fase G0 por deficiencia de nitrógeno, y tras la reactivación del crecimiento por adición de una fuente de nitrógeno.** Se sembraron células salvajes (W303-1a) y *hat1Δ* (RS1263) en medio de cultivo YPD y se incubaron a 28° C hasta que alcanzaron una fase de crecimiento exponencial. Las células se recogieron y se resuspendieron en el mismo volumen de medio de cultivo sin nitrógeno (SD-N₂), y se incubaron a 28° C durante 14 horas. Las células detenidas en fase G0 se resuspendieron en el mismo volumen de medio de cultivo YPD y se incubaron a 28° C. Se tomaron muestras de células periódicamente para preparar extractos celulares. Los extractos se analizaron por *Western blotting* como se indica en la Figura 20, empleando el anticuerpo frente a H4K12ac y el anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de H3 (Tabla VI). En la figura se muestran las membranas de nitrocelulosa teñidas con Ponceau (paneles superiores) y los *immunoblot* (paneles inferiores). Se indica la posición de las histonas. a, corresponde a una muestra de células asincrónicas. ch, histonas internas de eritrocito de pollo.

(anti-Ct H3, Abcam. Tabla VI). En la célula, las histonas H3 y H4 originan tetrámeros (H3·H4)₂ inmediatamente tras su síntesis, de manera que existen en cantidades equimolares [117,228]. Este es un control de carga que permite observar posibles diferencias en la cantidad de histona aplicada.

Otras drogas empleadas para sincronizar células fueron el nocodazol y la rapamicina. El nocodazol es un compuesto químico que interacciona con los microtúbulos induciendo su despolimerización lo que conduce a la parada de las células en la transición G2/M [229]. Por su parte, la rapamicina bloquea las células en fase G1, pero por un mecanismo molecular diferente al del factor α . La rapamicina se une a las proteínas Tor (que reciben su nombre por *Target of Rapamycin*), inhibiendo su función quinasa. Células tratadas con rapamicina presentan un bloqueo en fase G1, un fenotipo similar a células sin función Tor [205,230,231]. El análisis del estado de acetilación de H4K12 en células salvajes y mutantes en *hat1Δ* tratadas con nocodazol y rapamicina no reveló ninguna diferencia ni en las células detenidas en los estados particulares del ciclo celular ni tampoco tras su liberación al eliminar estos agentes del medio de cultivo (Figura 27).

Otra droga frecuentemente empleada para sincronizar células es la hidroxiurea (HU). Este compuesto inhibe a la ribonucleótido reductasa (Rnr), el enzima responsable de la síntesis de desoxirribonucleótidos. Así, la inhibición de la Rnr provoca que las células se detengan en fase S como consecuencia de la disminución de la concentración de dNTPs. El tratamiento con este agente resultaba particularmente interesante puesto que es en la fase S cuando tiene lugar la síntesis de histonas. Igual que en los casos anteriores, se incubaron células salvajes y células *hat1Δ* en presencia de HU 200 mM hasta que la mayor parte de las células quedaron

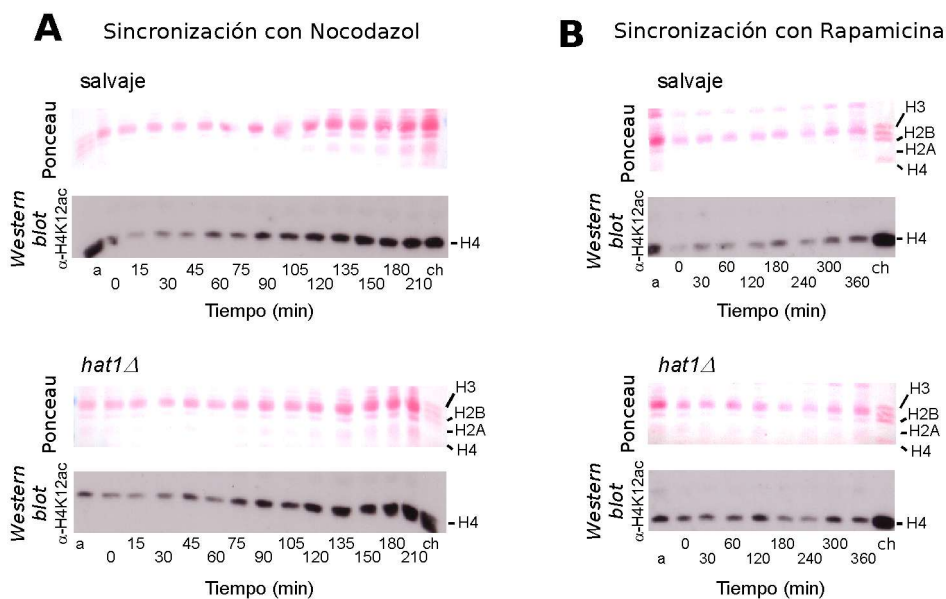


Figura 27. **Niveles de H4K12ac a lo largo del ciclo celular en células salvajes y *hat1Δ*, sincronizadas con nocodazol o rapamicina.** Se prepararon cultivos en fase exponencial de crecimiento de células salvajes (W303-1a) o *hat1Δ* (RS1263) y se sincronizaron añadiendo nocodazol, **A**, o rapamicina, **B**, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Tras la liberación de las células bloqueadas en G2/M o en G1, respectivamente, se tomaron muestras de células a distintos tiempos para preparar extractos celulares que se analizaron por *Western blotting*. En la figura se muestran las tinciones con Ponceau de las membranas (paneles superiores) y los *immunoblot* (paneles inferiores) obtenidos con el anticuerpo frente a H4K12ac. La carrera *a* corresponde a una muestra de células asincrónicas. ch, histonas internas de eritrocito de pollo.

bloqueadas en fase S, lo que se determinó por microscopía contando células con yema grande. Para liberarlas se transfirieron a un medio sin HU, y se fueron tomando muestras de los cultivos, de idéntico volumen, a distintos tiempos. En la Figura 28 se muestra el análisis *Western blotting* realizado en este experimento empleando anti-H4K12ac y como control de carga, anti Ct-H3. Como se demuestra a continuación este experimento resultó revelador y trascendente al poner de manifiesto, por primera vez, la participación de la proteína Hat1 en la acetilación *in vivo* de H4K12. A tiempo cero de la

sincronización, justo antes de eliminar la HU, se observa una clara deficiencia en los niveles de acetilación de H4K12 en la cepa *hat1Δ* comparados con los de la cepa salvaje. Conforme progresa el nuevo ciclo celular los niveles de H4K12ac en la cepa *hat1Δ* se van recuperando hasta alcanzar los niveles de la cepa salvaje. Una vez superada la primera ronda de división ya no se vuelven a detectar niveles reducidos de H4K12ac en células *hat1Δ*, lo que sugiere que la HU debe introducir algún otro efecto durante la fase S que podría provocar la acumulación de la fracción de histona H4 que es acetilada por el enzima Hat1. En cambio, en células que atraviesan una fase S fisiológicamente normal en ausencia de HU, la fracción de H4K12ac acumulada no es lo suficientemente abundante para detectarla con esta estrategia.

Se ha descrito que la HU, además de inhibir al enzima Rnr, es un agente que puede dañar el DNA, quizás como consecuencia de la detención brusca

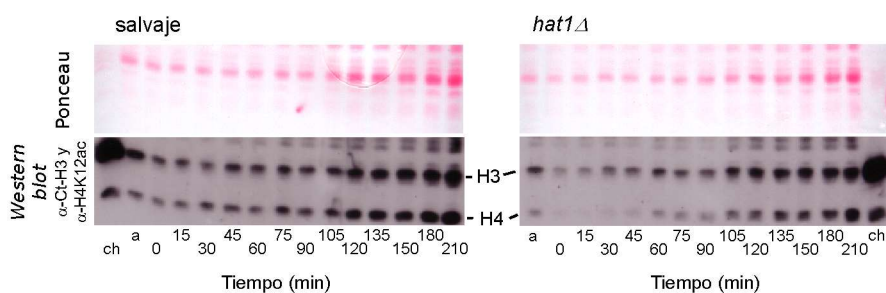


Figura 28. **Niveles de H4K12ac a lo largo del ciclo celular en células salvajes y *hat1Δ* sincronizadas con hidroxurea.** Se sembraron células salvajes (W303-1a) y *hat1Δ* (RS1263) en medio de cultivo YPD y se incubaron a 28° C hasta que alcanzaron una fase de crecimiento exponencial. Los cultivos se bloquearon con hidroxurea y tras la liberación se tomaron muestras de células periódicamente con las que se prepararon extractos celulares. Estos se analizaron por *Western blotting*, empleando anticuerpos frente a H4K12ac y frente al extremo C-terminal de H3 (Tabla VI). Se muestran las membranas teñidas con Ponceau (paneles superiores) y los *immunoblot* (paneles inferiores). Se indica la posición de las histonas y los tiempos en los que se tomaron muestras de células, tras la eliminación de la HU. La carrera a corresponde a células asincrónicas. ch, histonas internas de eritrocito de pollo.

de las horquillas de replicación, quedando el DNA más expuesto a sufrir diferentes tipos de alteraciones. La formación de lesiones en el DNA también contribuye a que las células queden bloqueadas en fase S para dar tiempo a que la maquinaria de reparación del DNA repare los daños antes de proseguir con la replicación. La replicación con daño tendría consecuencias desastrosas ya que la célula moriría o se transferirían moléculas de DNA rotas a las células hijas, así que la célula dispone de un mecanismo de control o *checkpoint* de lesiones. Este sistema controla la integridad de su genoma y al detectar daños en el DNA detiene la progresión del ciclo celular. Podría ocurrir que la fracción de histona H4 acetilada por Hat1p se acumule como consecuencia de las lesiones producidas en el DNA por la HU. En esta misma dirección van los datos publicados por Qing *et al.*, (2002) [197] donde describen que la delección del gen *HAT1*, en combinación con sustituciones de lisinas acetilables de H3 por argininas, provocan defectos en la reparación de roturas de doble cadena en el DNA, generadas por metilmetanosulfonato (MMS) o por enzimas de restricción inducidos endógenamente. Por este motivo resultaba interesante examinar si otros agentes que detienen el ciclo en fase S, algunos de ellos como consecuencia de los daños que provocan en el DNA, producen un defecto en los niveles de H4K12ac dependiente de Hat1p similares a los producidos por la HU.

Niveles de H4K12ac en células tratadas con agentes que dañan el DNA

Los agentes empleados fueron metilmetanosulfonato, 4-nitroquinolina n-óxido, camptotecina, fleomicina y peróxido de hidrógeno. Se incubaron células salvajes y *hat1Δ* en presencia de estas drogas durante un periodo de tiempo. Tras la incubación se tomaron muestras equivalentes de células de ambos cultivos y se prepararon extractos celulares que fueron analizados

por *Western blotting*. El metilmetanosulfonato es un agente que introduce radicales alquílicos en las cadenas de DNA produciendo transiciones GC a AT. La fleomicina es una molécula que se intercala en el DNA generando un complejo activo que degrada el DNA. La camptotecina es un alcaloide natural que se une a la topoisomerasa I. Durante la replicación, el avance de la horquilla de replicación colisiona con el complejo topo I-camtotecina-DNA y se producen roturas de doble cadena en el DNA [232]. El peróxido de hidrógeno es un compuesto de elevado poder oxidante que puede atravesar fácilmente las membranas biológicas. A partir del peróxido de hidrógeno se generan radicales hidroxilo (-OH), muy inestables y reactivos, que se combinan con las diferentes moléculas de las células: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos [233]. La 4-nitroquinolina n-óxido es una amina heterocíclica con propiedades mutagénicas [234], que también genera estrés oxidativo.

Como se observa en la Figura 29 los cinco agentes seleccionados permiten observar diferencias en los niveles de H4K12ac entre una cepa salvaje y una cepa *hat1Δ*, aunque las diferencias que generan estos agentes son menos importantes que las obtenidas con HU. Estos resultados indican que la acumulación de la H4K12ac dependiente de Hat1 debe ser consecuencia de la detención de las células en fase S y no de un efecto lateral de la HU.

De todos los agentes empleados, la HU es el agente con el que mejor y más claramente se observan diferencias en el nivel de H4K12ac entre células salvajes y células *hat1Δ*, por lo que los experimentos subsecuentes se realizaron empleando HU.

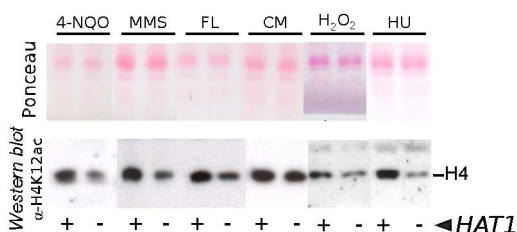


Figura 29. **Agentes que dañan el DNA afectan a la fracción de histona H4 acetilada en la lisina 12 dependiente de Hat1p.** Se prepararon cultivos en fase exponencial de crecimiento de células salvajes (W303-1a) o *hat1Δ* (RS1263), y se incubaron en presencia de distintas drogas. Tras la incubación se prepararon extractos celulares, que fueron analizados por *Western blotting* con el anticuerpo anti-H4K12ac. En la figura se muestra la tinción con Ponceau de las membranas (paneles superiores) y los *immunoblot* (paneles inferiores). Las condiciones empleadas fueron: 4-nitroquinolina n-óxido (4-NQO) a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6 horas; metilmetanosulfonato (MMS) al 0.04 % (v/v), 6 horas; fleomicina (FL) a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 horas; camptotecina (CM) a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6 horas; H_2O_2 a 1 mM, 4 horas; e HU a 200 mM, 4 horas.

Efecto de la dosis y tiempo de incubación de la hidroxiurea sobre el nivel de H4K12ac

Se estudió el efecto del tiempo de incubación en presencia de 200 mM de HU, sobre el nivel de H4K12ac en células salvajes y *hat1Δ*. En la Figura 30A se muestran los resultados obtenidos en este ensayo. Las diferencias en los niveles de H4K12ac se aprecian a partir de las 2 horas de incubación. Tras varias horas se siguen detectando diferencias entre la cepa salvaje y la *hat1Δ*. Merece la pena mencionar que la incubación de un cultivo en presencia de HU produce una acumulación de células en fase S, pero no detiene el ciclo celular por completo, sino que las células continúan dividiéndose aunque a un ritmo mucho más lento.

A continuación se estudió también el efecto de la concentración de HU sobre el nivel de acetilación en la Lys12 de H4 en células salvajes y *hat1Δ*. Para ello se incubaron las células durante periodos de 2 y 4 horas a 28° C, con 10, 50, 200 o 500 mM en HU. Como se observa en la Figura 30B las mayores diferencias en los niveles de H4K12ac se detectan a partir de concentraciones de HU 200 mM o superiores.

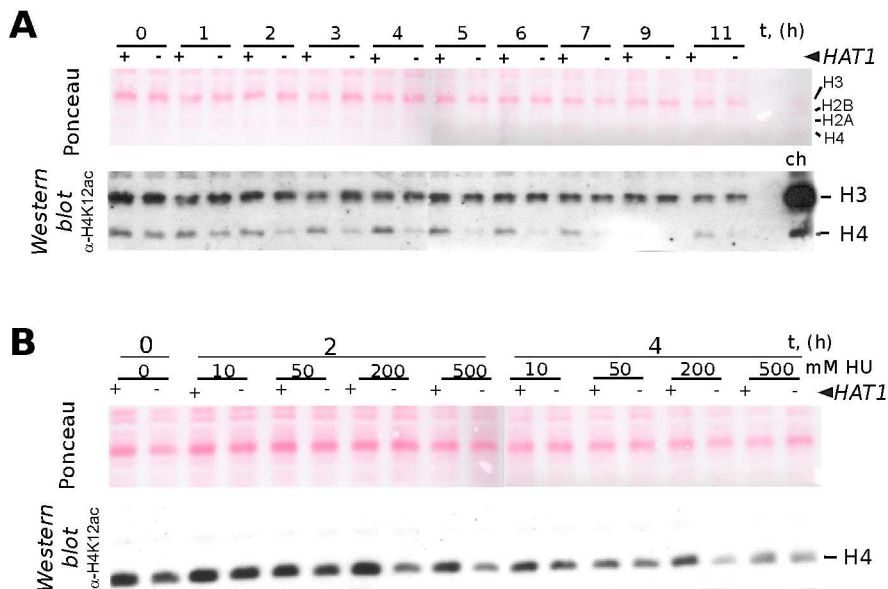


Figura 30. **Efecto del tiempo de incubación y de la dosis de HU sobre la acetilación de la lisina 12 de H4 en células salvajes y *hat1Δ*.** **A**, se prepararon cultivos de una cepa salvaje (W303-1a) y de una cepa *hat1Δ* (RS1263) y cuando alcanzaron una OD_{600} de aproximadamente 0.35 unidades, se añadió HU a una concentración de 200 mM. Los cultivos se incubaron a 28° C con agitación y se tomaron muestras de células a los tiempos indicados. Se prepararon extractos celulares que se resolvieron en SDS-18 % PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se tiñó con Ponceau (panel superior) y se analizaron empleando anticuerpos frente a H4K12ac y frente a Ct-H3 (panel inferior). **B**, se prepararon cultivos de las mismas cepas y cuando alcanzaron una $OD_{600}=0.35$ se dividieron los cultivos iniciales en cinco cultivos de menor volumen. A cada uno de estos cultivos se les añadió una cantidad diferente de HU: 10, 50, 200 y 500 mM, y se tomaron muestras de células tras 0, 2 y 4 horas de incubación. Uno de los cultivos, que se utilizó como control, no se trató con HU. Las muestras de células se procesaron igual que en **A** y se analizaron por *Western blotting* empleando el anticuerpo que reconoce la lisina 12 acetilada de la histona H4. Se indica la posición de las histonas. ch, histonas internas de eritrocito de pollo.

Análisis del contenido de la proteína Hat1 en presencia de hidroxiurea

Las diferencias observadas en los niveles de H4K12ac tras la incubación con HU plantean las siguientes cuestiones. Por un lado, es posible que la

presencia de esta droga produzca la acumulación de la fracción de histona H4 que es acetilada por Hat1p. Por otro lado, es posible que las diferencias observadas en los niveles de H4K12ac tras la incubación con HU sean consecuencia de un aumento en la expresión de la proteína Hat1p, o de su actividad. Así mismo podrían ocurrir ambos efectos de manera simultánea. Para intentar resolver estas cuestiones se analizó, tras la incubación con HU, el contenido de proteína Hat1 de células que expresan *HAT1* etiquetada con el epítipo HA. Después de añadir HU 200 mM a un cultivo en fase de crecimiento exponencial se tomaron muestras equivalentes, calculadas a partir de la medida de la OD₆₀₀ del cultivo, a diferentes tiempos. Los extractos obtenidos de estas células se analizaron por *Western blotting* empleando un anticuerpo que reconoce el epítipo HA. Como se observa en la Figura 31 el nivel de la proteína Hat1 no sólo no aumenta como consecuencia del tratamiento con HU sino que incluso parece disminuir, aunque muy ligeramente, tras la incubación prolongada con esta droga. Estos resultados, por tanto, indican que el mayor nivel de H4K12ac observada por la incubación con HU no es debido a una acumulación de la proteína Hat1.

Para estudiar la posibilidad de que la HU tenga como consecuencia un aumento de la actividad del complejo B se determinó el perfil cromatográfico de actividad HAT de un extracto preparado a partir de células tratadas con HU y se comparó con el perfil obtenido de células no tratadas. Para ello se incubaron células salvajes con 200 mM de HU durante 4 horas. Los extractos proteicos totales con actividad enzimática HAT se fraccionaron por FPLC de intercambio aniónico empleando una columna Q-Resource (1mL). La actividad HAT de las fracciones se determinó incubando una alícuota de cada una de ellas con histonas de eritrocito de pollo y [1

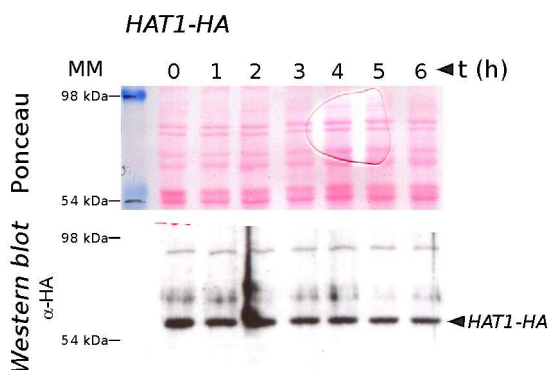


Figura 31. **La HU no incrementa los niveles de proteína Hat1.** Se preparó un cultivo de la cepa BQS1154, que expresa *HAT1-HA*, y se añadió HU a 200 mM. El cultivo se incubó a 28^o C y se tomaron muestras de células a los tiempos indicados, que se utilizaron para preparar extractos celulares. Se analizó el contenido en Hat1p-HA por *Western blotting*, empleando el anticuerpo de ratón frente a HA (12CA5). En la figura se muestra la membrana teñida con Ponceau (panel superior) y el *immunoblot* (panel inferior). MM, patrón de masas moleculares.

⁻¹⁴C] acetil-CoA, y las histonas ensayadas se resolvieron por electroforesis para posteriormente obtener la correspondiente autorradiografía. En la Figura 32 se muestran los perfiles de actividad HAT total y las autorradiografías obtenidas en este experimento, donde se puede observar que tanto el nivel de actividad sobre la histona H4 como la posición de elución del complejo HAT-B son muy similares en ambos perfiles. Estos resultados descartan que la actividad del complejo HAT-B aumente como consecuencia de la incubación con HU.

Según los datos presentados hasta ahora las diferencias que se detectan en los niveles de H4K12ac generadas al incubar las células con HU no parecen ser consecuencia ni de una acumulación de la proteína Hat1 ni de un aumento de su actividad. En cualquier caso los resultados indican que en células tratadas con HU incrementa la fracción de H4K12ac acetilada por Hat1p.

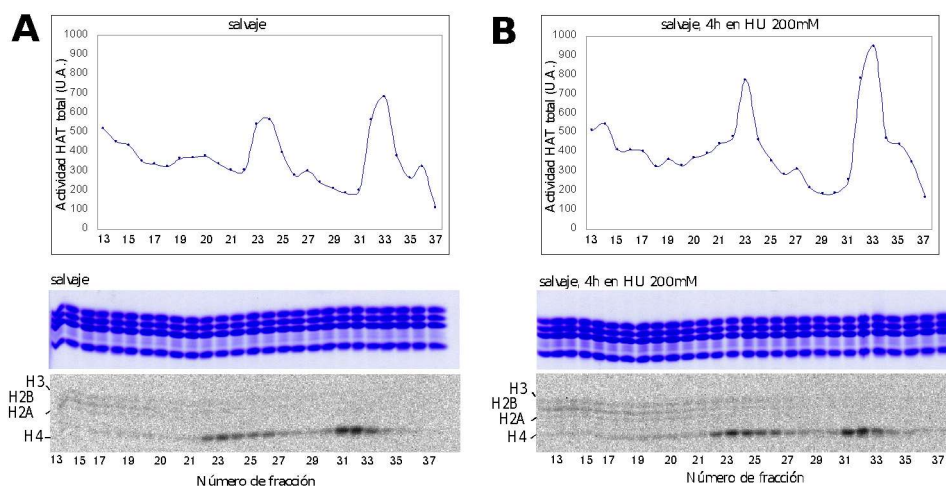


Figura 32. **El tratamiento con HU no afecta a la actividad del complejo HAT-B.** Se prepararon dos cultivos de células salvajes (W303-1a), y uno de ellos (**B**) se trató con HU 200 mM durante 4 horas. Las células de ambos cultivos se utilizaron para preparar extractos con actividad enzimática como se describe en Materiales y Métodos, sólo que tras la lisis de los protoplastos con tampón hipotónico, los lisados se incubaron durante 1 hora a 4^o C con agitación vigorosa, sin añadir NaCl. Los extractos obtenidos se fraccionaron con un aparato de FPLC (ÁKTA PRIME) y una columna Q-Resource (1 mL), empleando un gradiente lineal desde 80 a 400 mM en NaCl. Se ensayó la actividad HAT de las fracciones obtenidas, incubando una alícuota de cada una de ellas con histonas de eritrocito de pollo y [1-¹⁴C] acetil-CoA. Las histonas ensayadas se resolvieron por SDS-18 % PAGE y se obtuvieron las correspondientes autorradiografías en una pantalla (BAS-IP SR 2025). Paneles superiores, perfiles de actividad HAT total (U. A., Unidades Arbitrarias). Paneles centrales, geles teñidos con Coomassie. Paneles inferiores, autorradiografías.

Efecto de la hidroxIUrea sobre los niveles de H4K12ac en histonas purificadas

Al objeto de analizar el contenido de H4K12ac dependiente de Hat1p en células tratadas con HU, como primer paso se determinó el nivel de esta isoforma de H4 en histonas purificadas desde cromatina. Para ello se purificaron histonas de cromatina, como se describe en Materiales y Métodos, de células salvajes y mutantes *hat1Δ* que habían sido tratadas con HU. Como control se purificaron histonas de estas mismas cepas no tratadas

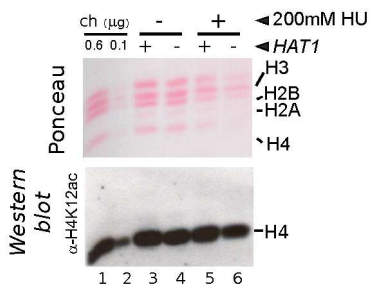


Figura 33. **El tratamiento con HU no afecta al nivel de H4K12ac procedente de cromatina.** Se purificaron histonas de cromatina de células salvajes

con HU. Las histonas aisladas se analizaron mediante Western blotting empleando el anticuerpo frente a H4K12ac (Figura 33). Aparentemente, los niveles de acetilación de H4K12ac en histonas de eritrocitos son similares independientemente de *HAT1* y también de la presencia (carreras 5 y 6) o no (carreras 3 y 4) de HU en el medio de incubación. Estos resultados sugieren que la fracción de H4K12ac dependiente de *HAT1* que se observa al analizar extractos celulares de células incubadas con HU (Figuras 28 y 30) debe tratarse de una fracción de histona no ensamblada en cromatina, que se acumula como consecuencia del tratamiento con HU u otras drogas. Estos resultados también indican que la fracción de histona H4 acetilada por Hat1p, además de no encontrarse formando parte de cromatina, en condiciones normales debe tratarse de una fracción muy pequeña ya que en extractos totales no se detectan diferencias en el nivel de H4K12ac entre células salvajes y mutantes *hat1Δ* (Figura 21B y carreras asincrónicas, a, de células salvajes y *hat1Δ* de la Figura 28). Sólo células incubadas con HU muestran una acumulación detectable de la fracción de histona H4K12ac (Figura 28, comparar carreras t=0, tras 3 horas de incubación en presencia de HU, de células salvajes y *hat1Δ*; comparar también carreras de células *hat1Δ* asincrónicas, a, e incubadas 3 horas con HU (t=0)).

Acetilación de la lisina 12 de la histona H4 no cromatínica

Al incubar células con HU se observan diferencias en los niveles de H4K12ac en extractos totales, extractos que contienen toda la histona presente en la célula, pero sin embargo no se observan diferencias en histonas purificadas de la cromatina. Es posible que la fracción de histona que sirve de sustrato a la proteína Hat1p, al no formar parte de la cromatina, se pierda durante el proceso de aislamiento de cromatina previa a la extracción de histonas. Para estudiar esta posibilidad se desarrolló un procedimiento de fraccionamiento celular en el que el contenido celular se separa en “fracción soluble” que contiene principalmente el citosol y el nucleoplasma y por tanto contendría la posible histona soluble no ensamblada en cromatina, y la “fracción precipitado”, fracción que contiene la cromatina nuclear y otros componentes particulados e insolubles de la célula. En esta fracción se obtienen las histonas de cromatina. En la Figura 34 se muestra el análisis de los niveles de H4K12ac de las fracciones resultantes de este procedimiento, obtenidas a partir de células salvajes y de células *hat1Δ*. Se muestra también, como control, los niveles de H4K12ac en WCE (extracto total). En paralelo se realizó el mismo experimento de fraccionamiento pero con células que habían sido tratadas con HU 200 mM. Como puede observarse, el anticuerpo anti-H4K12ac produce una clara señal en todas las carreras de la fracción precipitado que contiene las histonas de cromatina y también en las carreras del extracto total, que contienen tanto las histonas de cromatina como las histonas no ensambladas. Sin embargo, en las fracciones solubles sólo se detectó señal en las carreras correspondientes a células salvajes, pero no en células *hat1Δ*. Además, la señal detectada en esta fracción fue significativamente más intensa cuando las células habían sido tratadas con HU. Por tanto estos resultados indican que Hat1p debe ser responsable de acetilar *in vivo* la histona H4 no ensamblada en cromatina, contenida en la fracción soluble

[235,236]. Estos resultados son consistentes con trabajos previamente publicados por otros autores, donde se describe que el tratamiento con HU provoca la acumulación de una fracción de histonas “citosólicas” en células HeLa [130]. En realidad las histonas no ensambladas en cromatina no se hallan libres en la célula sino que se encuentran unidas a otras proteínas como por ejemplo chaperonas de histonas en tránsito a su ensamblaje en cromatina [121], así pues nos referiremos a ellas en este trabajo como histonas solubles. Como se había supuesto la fracción de histona soluble de levadura es mucho menor que la fracción de histona ensamblada en cromatina (Figura 34A). La tinción con Ponceau (panel superior) revela que el contenido en proteína de la fracción precipitado es menor que el de la fracción soluble, y sin embargo la señal de H4K12ac es relativamente mayor. Así, se llega a la conclusión de que en extractos totales de células no tratadas con HU la señal generada por la histona soluble debe estar enmascarada por la señal generada por la histona ensamblada. También puede observarse en la Figura 34A que la señal generada por el anticuerpo anti-H4K12ac en la fracción soluble de células salvajes tratadas con HU es mayor que en células salvajes no tratadas. El análisis por *Western blotting* empleando el anticuerpo frente a C-terminal de H3 (Figura 34A) indica que la incubación con HU provoca la acumulación de histona soluble pero no de la histona ensamblada en cromatina, lo que explica los resultados de la Figura 33 discutidos en el apartado anterior. Para confirmar que la histona H4 también se acumula como consecuencia de la incubación con HU, se analizaron estas fracciones con un anticuerpo (anti-ryH4) de conejo que reconoce la histona H4 independientemente de su estado de acetilación (cedido por el Dr. A. Verreault, ahora comercializado por la firma Abcam). Este anticuerpo se desarrolló empleando histona H4 recombinante de levadura como inmunógeno, por lo que reconoce la histona H4 independientemente del estado de modificación. Como puede observarse

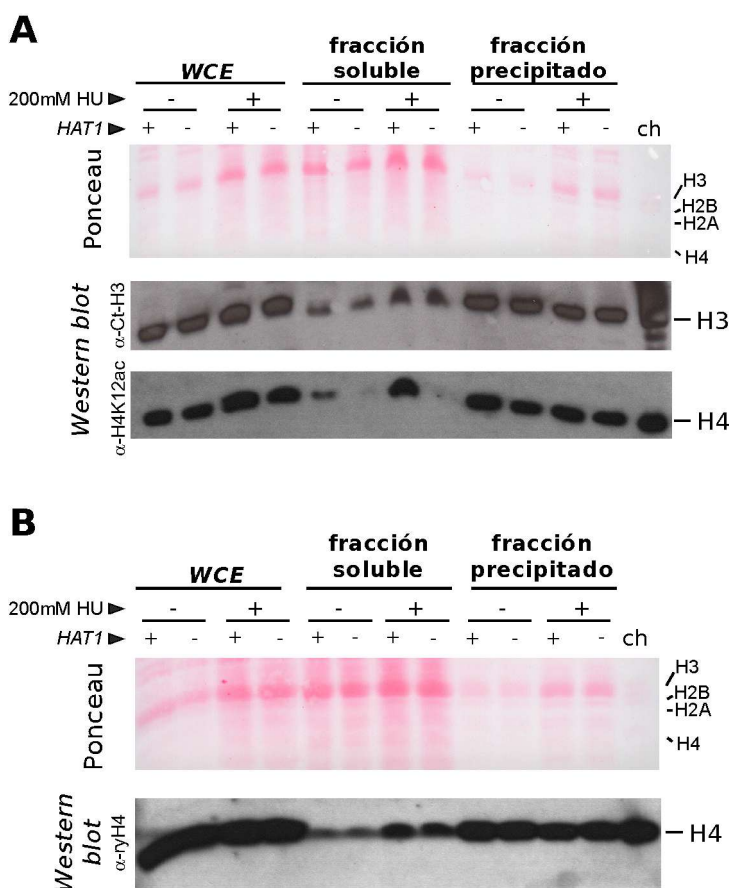


Figura 34. **Hat1p acetila la fracción soluble de histona H4 que además se acumula tras la incubación con HU.** A partir de células salvajes (W303-1a) y células *hat1Δ* (RS1263) tratadas y sin tratar con HU, se prepararon extractos proteicos totales (o WCE), fracción soluble y fracción precipitado, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Las proteínas de las fracciones se resolvieron por SDS-18 % PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para su posterior análisis con el empleo de diferentes anticuerpos. **A**, tinción de la membrana con Ponceau (panel superior), *immunoblot* obtenido con anti-Ct H3 (panel central), e *immunoblot* correspondiente al análisis realizado con anti-H4K12ac. En **B**, se muestra un análisis *Western blotting* de las mismas muestras del apartado **A**, pero con anti-ryH4. Se indica la posición de las histonas. ch, histonas internas de eritrocito de pollo.

en la Figura 34B, también la histona H4, como la H3, se acumula en la fracción soluble tras la incubación de las células con HU. En cambio, los niveles de H3 y H4 totales detectados en la fracción precipitado enriquecida

en histonas de cromatina son similares independientemente de que las células hayan sido tratadas o no con HU. En los WCE tampoco se observan diferencias con estos anticuerpos anti-Ct-H3 y anti-ryH4 debido a que, a pesar de que la histona soluble si que se acumula tras la incubación con HU, la señal generada por la histona de cromatina enmascara la señal de la histona soluble, mucho menos abundante.

Niveles de H4K12ac soluble a lo largo del ciclo celular

Anteriormente se ha mostrado que los niveles totales de H4K12ac no varían a lo largo del ciclo celular (Figura 25), sin embargo ahora se estaba en disposición de analizar la variación de los niveles de fracción H4K12ac dependiente de Hat1p a lo largo del ciclo. La idea perseguida era de nuevo estudiar si se produce una acumulación transitoria de H4K12ac soluble en la fase G1/S. Para este análisis se sincronizaron cultivos de células salvajes y *hat1Δ* con factor α y tras liberarlos se tomaron muestras de células a diferentes tiempos. Se prepararon fracciones solubles de estas células que se resolvieron por SDS-18 % PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para determinar el contenido de H4K12ac. En la Figura 35A se muestra el resultado de este análisis. Los dos *immunoblots* del apartado A corresponden a muestras de fracción soluble o fracción precipitado obtenidas de células sincronizadas salvajes (izquierda) o *hat1Δ* (derecha). En la fracción soluble de células salvajes el contenido por célula de H4K12ac a lo largo de todo el ciclo celular detectado resultó ser aproximadamente constante, descartando la idea de que se acumule de forma prominente la isoforma H4K12ac durante la fase G1/S. Como era previsible, en la fracción de histona soluble aislada de células *hat1Δ* se detecta muy poca señal, o ninguna, de H4K12ac a lo largo de todo el ciclo celular. La pequeña señal de H4K12ac detectada en algunas de las preparaciones de fracción soluble

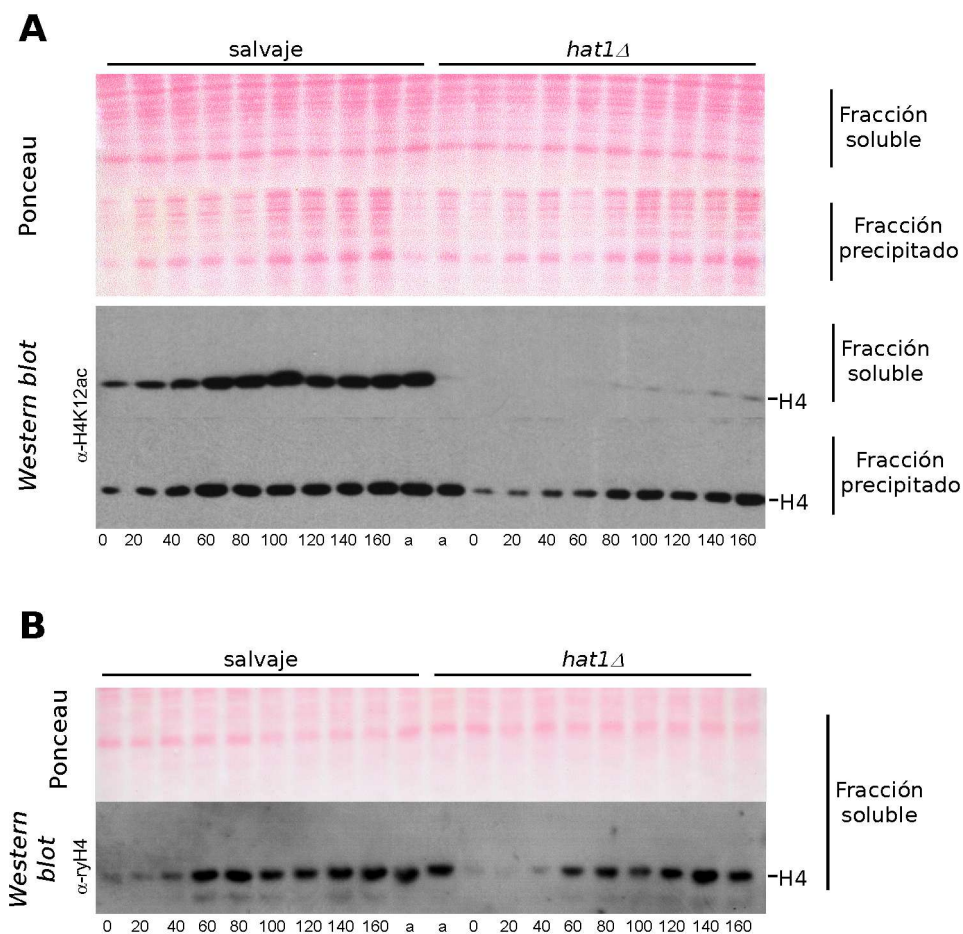


Figura 35. **Los niveles de H4K12ac de la fracción soluble son aproximadamente constantes a lo largo del ciclo celular.** **A**, se cultivaron células de una cepa salvaje (W303-1a) y de una cepa *hat1Δ* (RS1263) en medio de cultivo YPD. Las células se bloquearon con factor α como se describe en Materiales y Métodos, y tras la liberación del cultivo se tomaron muestras de células a diferentes tiempos y se preparó fracción soluble y fracción precipitado. Las fracciones obtenidas se resolvieron en SDS-18 % PAGE y se analizaron por *Western blotting* empleando diferentes anticuerpos. Se muestra la tinción con Ponceau (panel superior) y el *immunoblot* obtenido con anti-H4K12ac correspondiente a las fracciones solubles y a las fracciones precipitado. a, células asincrónicas. **B**, las mismas muestras que en **A** se analizaron por *Western blotting* empleando anticuerpo anti- γ H4. En la imagen se muestra la membrana teñida con Ponceau (panel superior) y el *immunoblot* (panel inferior).

de células *hat1Δ*, se debe posiblemente a contaminación con histonas procedentes de la fracción precipitado. Los niveles de H4K12ac en la fracción precipitado son proporcionalmente similares en células salvajes y *hat1Δ*, confirmando de nuevo que Hat1p sólo acetila la histona soluble, menos abundante que la histona ensamblada en cromatina. Los paneles inferiores corresponden a las mismas muestras de fracciones solubles, pero analizadas con anticuerpo frente a ryH4. Este inmunoblot sirve de control interno de carga, mostrando que la cantidad de histona H4 soluble en las muestras procedentes de células *hat1Δ* es aproximadamente la misma que en células salvajes.

Para confirmar la presencia de histona H4 soluble acetilada por Hat1p a lo largo de las distintas fases del ciclo celular, se emplearon distintos tratamientos para provocar la acumulación de células en distintos estados del ciclo. En la Figura 36 se muestra el análisis *Western blotting* obtenido con células salvajes o mutantes *hat1Δ* bloqueadas en diferentes estados del ciclo celular, empleando diferentes compuestos o tratamientos: ausencia de nitrógeno, factor α , hidroxiaurea y nocodazol. Los niveles de histona H4 soluble son similares en células asincrónicas, en células tratadas con factor α y en células tratadas con nocodazol. En el caso de células en fase G0 (tratamiento por ausencia de nitrógeno) el nivel de H4 es aparentemente menor (Figura 36, panel central, carreras 4 y 5). Esto podría ser explicado como consecuencia de la baja actividad metabólica que presentan las células en este estado, que han sido incubadas durante 14 horas en un medio sin nitrógeno. Sólo en el caso del tratamiento con HU las células presentan un nivel de histona H4 soluble mayor (Figura 36, carreras 8 y 9) que células asincrónicas o tratadas con otros agentes. En todos los casos, siempre se observó la ausencia o un nivel muy reducido de la forma H4K12ac en fracciones solubles de células carentes en *HAT1*. Por tanto, este

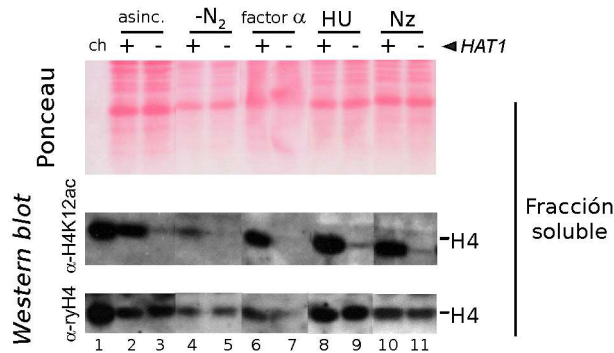


Figura 36. **H4K12ac soluble en células bloqueadas en diferentes puntos del ciclo celular.** Se bloquearon células salvajes (W303-1a) o *hat1Δ* (RS1263) en diferentes puntos del ciclo celular (G0, G1, S y G2/M), incubándolas con diferentes drogas o sometiéndolas a algún determinado tratamiento (ausencia de N₂, factor α, hidroxauriurea y (Nz) nocodazol, respectivamente). Se fraccionó el contenido celular como se describe en Materiales y Métodos, y la fracción soluble se analizó por *Western blotting* con anti-H4K12ac (panel central) y con anti-ryH4 (panel inferior). El panel superior muestra la membrana teñida con Ponceau. Las carreras 2 y 3 corresponden a muestras asincrónicas de células salvajes y *hat1Δ*, respectivamente.

experimento muestra que, en todas las fases del ciclo, la célula contiene histona H4 soluble acetilada por Hat1p en la posición 12, la cual se acumula como consecuencia del tratamiento con HU.

La síntesis de histonas tienen un máximo de expresión en la transición G1/S [119], sin embargo los niveles de histona soluble, y también de H4 soluble acetilada en K12 por Hat1p, son aproximadamente constantes a lo largo del ciclo celular, incluso en la transición G1/S. Coordinada con la síntesis de histonas tiene lugar la activación de la Rnr y la replicación del DNA, por lo que probablemente durante la transición G1/S aumenta la síntesis de DNA y la tasa de incorporación de histonas a cromatina, lo que puede explicar por qué los niveles de histona soluble en condiciones normales de crecimiento son aproximadamente constantes durante todo el ciclo celular. Sólo en el caso de que se bloquee la replicación de las células con HU, u otro compuesto, se acumula la fracción de histona soluble, como

consecuencia de la disminución de la tasa de incorporación de histonas en cromatina.

Estudio de la participación de la proteína Hif1 en la actividad HAT del complejo B

Se ha descrito que tanto la proteína Hat1 como la proteína Hat2 son necesarias para que el complejo B realice su función como histona acetiltransferasa. La proteína Hat1 es la subunidad catalítica del enzima HAT-B y la proteína Hat2 parece ser necesaria para el reconocimiento del sustrato, la histona H4 [139,175,189], y por ello en ausencia de Hat2p disminuye la actividad específica de la proteína Hat1p [175]. En este trabajo se ha identificado una nueva subunidad que forma parte del complejo B, la proteína Hif1, una proteína de 385 aminoácidos y de función desconocida. Los resultados mostrados en la Figura 13A parecen indicar que la proteína Hif1 no participa en la actividad HAT del complejo B *in vitro*, ya que en el perfil cromatográfico de actividad HAT de células *hif1Δ*, el enzima HAT-B* (Hat1p/Hat2p) muestra un nivel de actividad HAT y de especificidad sobre la histona H4 además de su posición en la elución cromatográfica, muy similares al enzima HAT-B (Hat1p/Hat2p/Hif1p). Al objeto de estudiar la participación de los distintos componentes del complejo B sobre la acetilación de la histona H4 soluble, se preparó fracción soluble de células salvajes y mutantes *hat1Δ*, *hat2Δ* o *hif1Δ* que habían sido tratadas o no con HU. En células con el gen *HAT1* delecionado, como ya se ha visto (Figura 34), desaparece la acetilación sobre la lisina 12 en la histona H4 soluble, y lo mismo sucede, como cabía esperar, en células *hat2Δ* (Figura 37A, paneles izquierdos, carreras 2 y 3). Sin embargo, en células *hif1Δ* el nivel de

H4K12ac es similar al detectado en células salvajes (comparar carreras 1 y 4). La incubación de células con HU 200 mM, que produce la acumulación de la fracción de histona H4 soluble que es acetilada por Hat1p, generó los mismos resultados, sólo que ahora se detecta una señal mayor en células salvajes e *hif1* Δ (carreras 5-8). Estos resultados indican que las proteínas Hat1p y Hat2p, pero no Hif1p, participan *in vivo* en la función HAT del complejo B. El análisis *Western blotting* de las mismas muestras, con el anticuerpo anti-ryH4, indicó que la cantidad de histona H4 soluble es similar

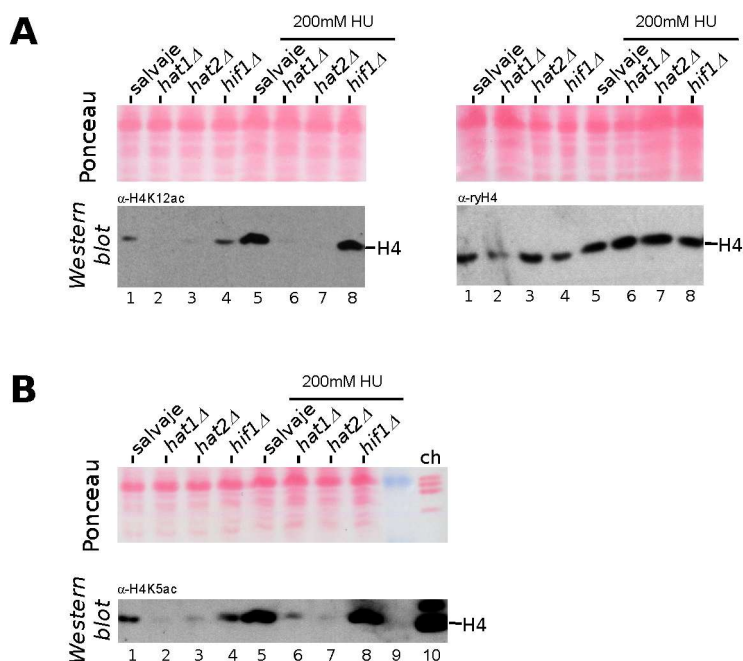


Figura 37. **La proteína Hif1 no es necesaria para la función de acetilación del enzima HAT-B.** Se preparó fracción soluble de células salvajes (W303-1a), *hat1* Δ (RS1263), *hat2* Δ (YSTT11) e *hif1* Δ (YSTT49), tratadas o no con HU 200 mM. Las proteínas de estos extractos se resolvieron en SDS-18 % PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. **A**, a la izquierda se muestra el análisis con anticuerpo frente a H4K12ac; a la derecha el análisis *Western blotting* de las mismas muestras, con anti-ryH4. **B**, las mismas fracciones solubles analizadas en **A**, se analizaron por *Western blotting* empleando anti-H4K5ac. Membranas teñidas con Ponceau (paneles superiores) e *immunoblots* (paneles inferiores).

en células salvajes, *hat1Δ*, *hat2Δ* o *hif1Δ* (Figura 37A, parte derecha, carreras 1-4 y 5-8). En todos los casos, como cabía esperar, la incubación con HU generó un incremento en el nivel de histona H4 soluble.

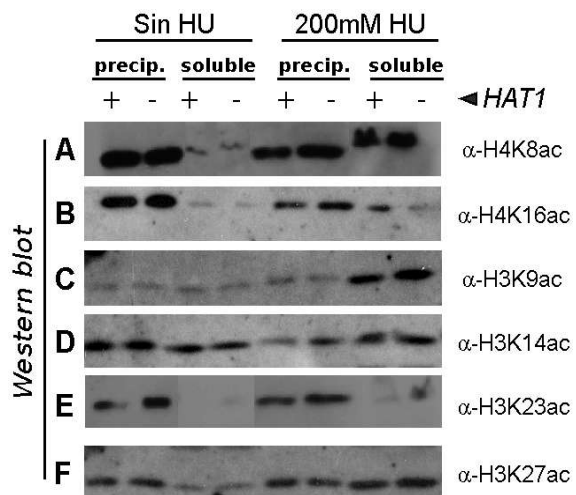
Se ha descrito que *in vitro* el enzima Hat1p recombinante acetila, además de la lisina 12, la lisina 5 de la histona H4, mientras que el enzima HAT-B nativo aislado modifica únicamente la lisina 12 [139,174,175,189]. Sin embargo no está descrito si el enzima HAT-B *in vivo* es capaz de acetilar esta otra posición. Para comprobar la implicación del complejo B en la acetilación de H4K5 soluble *in vivo*, se analizaron las fracciones solubles obtenidas de células salvajes, *hat1Δ*, *hat2Δ* o *hif1Δ* empleando anticuerpo anti-H4K5ac (Figura 37B). En el *immunoblot* se detecta que el anticuerpo anti-H4K5ac genera una intensa señal en la fracción soluble de células salvajes y de mutantes *hif1Δ* (carreras 1 y 4), pero no en células con deleciones en los genes *HAT1* o *HAT2* (carreras 2 y 3). De nuevo la señal generada en células salvajes e *hif1Δ* que habían sido tratadas con HU es más intensa que en células no tratadas, como consecuencia de la acumulación de la fracción de histona H4 soluble.

Como ya se ha mencionado, las lisinas 5 y 12 de H4 son las dos posiciones generalmente aceptadas como diana del complejo HAT-B. Sin embargo, tras realizar los experimentos mostrados anteriormente, surgió la cuestión de cuál es el estado de acetilación de las otras lisinas acetilables de H3 (lisinas 9, 14, 18, 23 y 27) y de H4 (lisinas 8 y 16) en la fracción de histonas soluble, y si el estado de acetilación de estas posiciones era dependiente de Hat1p. Así pues, se prepararon fracciones solubles y fracciones precipitado de células salvajes y mutantes en *hat1Δ*, que a su vez habían sido tratadas o no con HU 200 mM. Las fracciones obtenidas se analizaron por *Western blotting* empleando anticuerpos que reconocen las distintas lisinas acetiladas de las histonas H3 o H4 (Tabla VI). En el caso de

la histona H4, los niveles de acetilación de H4K8 en la fracción soluble son muy bajos y no parecen ser dependientes de Hat1p (Figura 38A), al igual que los niveles de H4K16ac (Figura 38B). En la histona H3 soluble, los niveles de acetilación de las lisinas 9, 14, 23 y 27 tampoco se ven afectados por la delección del gen *HAT1* (Figura 38 C-F). Los niveles de acetilación de algunas posiciones son muy bajos, lo que es razonable si se tiene en cuenta que la fracción soluble debe de contener sobre todo histonas recién sintetizadas, sin embargo es sorprendente que excepto H3K23, todas las demás posiciones analizadas en la fracción de histona soluble presentan un cierto grado de acetilación. En la Figura 38 no se muestran los niveles de H3K18ac en la fracción soluble ya que no se consiguió obtener un análisis *Western blotting* adecuado.

Los resultados de las Figuras 37 y 38 indican que el complejo HAT-B de levadura participa en la acetilación *in vivo* las lisinas 12 y 5 de la histona H4 soluble.

Figura 38. **Niveles de acetilación de diferentes posiciones de las histona H3 y H4 de la fracción soluble.** Se prepararon fracciones de células en fase exponencial de crecimiento salvajes (W303-1a) y *hat1Δ* (RS1263), tratadas o no con HU 200mM. Las proteínas de estos extractos se resolvieron en SDS-18% PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, y se analizaron por *Western blotting* empleando diferentes anticuerpos: **A**, corresponde al análisis *Western blotting* empleando anti-H4K8ac, **B**, con anti-H4K16ac, **C**, con anti-H3K9ac, **D**, con anti-H3K14ac, **E**, con anti-H3K23ac y **F**, con anti-H3K27ac.



Niveles de H4K12ac soluble cuya degradación está regulada por Rad53p

Rad53p y Mec1p son dos proteínas quinasa de *S. cerevisiae* que intervienen de múltiples maneras protegiendo a la célula frente a daños generados en DNA [237,238]. La función esencial de Rad53p y Mec1p es promover la síntesis de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) durante la fase S, coincidiendo con la replicación del DNA, ya que regulan la fosforilación y degradación de Sml1p via la quinasa Dun1p [170,239], un inhibidor estequiométrico de la ribonucleótido reductasa. Sin embargo, la regulación de la síntesis de dNTPs parece ser una función diferente a la protección frente a daños en DNA, ya que se puede rescatar la letalidad de las células, pero no la sensibilidad a daños en DNA, elevando los niveles de dNTPs a través de la disrupción del gen *SML1* o sobreexpresando la Rnr. Por otro lado, el hecho de que el doble mutante *rad53Δsml1Δ* presente un fenotipo de crecimiento lento que no presenta el doble mutante *mec1Δsml1Δ*, indica que Rad53p debe tener alguna función adicional en la regulación de la progresión del ciclo celular, independiente de Mec1p. Esta otra función parece ser la regulación de la degradación del exceso de histonas solubles que se acumulan en la célula [121] por diferentes motivos, como la generación de daños en DNA o el bloqueo de la replicación. Así, células *rad53Δsml1Δ* presentan una acumulación de histonas solubles, probablemente como consecuencia de la interrupción de la ruta de su degradación. Al objeto de analizar el estado de acetilación de H4K12 en el exceso de histonas en células *rad53Δ*, y su dependencia con *HAT1*, se construyó el mutante *hat1Δ* en una cepa *rad53Δsml1Δ*, y se prepararon fracciones solubles que se analizaron por *Western blotting* empleando anticuerpo anti-H4K12ac y anti-ryH4. En la Figura 39A se muestran los *immunoblots* obtenidos. Efectivamente en células mutantes en *rad53Δ* se

detecta un acúmulo de histona H4 soluble respecto a células *RAD53* (Figura 39A, panel inferior, comparar carreras 1-2 con 3-4) y la histona H4 acumulada se encuentra acetilada en la lisina 12 dependientemente de Hat1p (Figura 39A, panel central, carreras 1 y 3).

Esta cepa no es un mutante sencillo *rad53Δ*, sino que también es mutante en el gen *SML1*, ya que el mutante sencillo *rad53Δ* no es viable [170,172,239]. Para confirmar que la fracción de histona que acetila Hat1p es la misma fracción de histona soluble que se acumula como

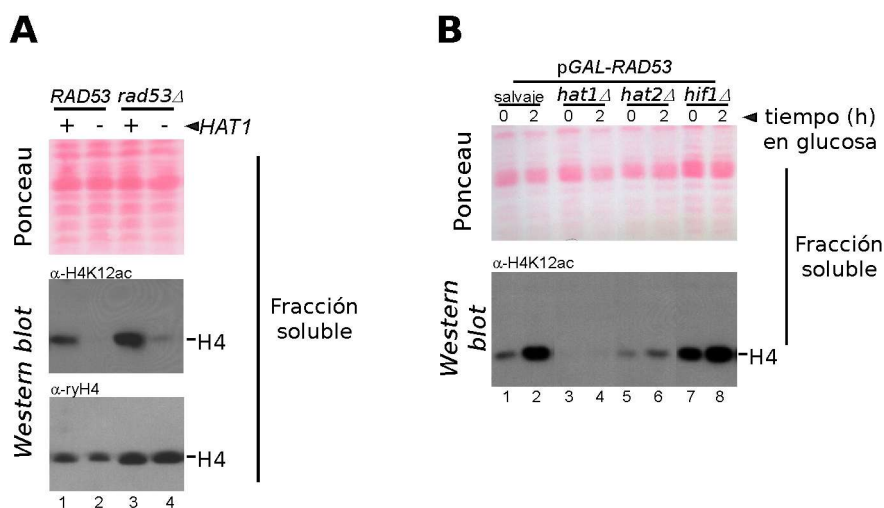


Figura 39. Hat1p acetila la histona H4 soluble acumulada en mutantes *rad53Δ*. **A**, Se prepararon cultivos en fase exponencial de crecimiento de células *sml1-1Δ* (YAV49), *hat1Δ sml1-1Δ* (BQS1386), *rad53Δ sml1-1Δ* (YAG101), *rad53Δ sml1-1Δ hat1Δ* (BQS1358). Se prepararon fracciones solubles con estas células y se analizaron por *Western blotting* con anti-H4K12ac (panel central) y con anti-γH4 (panel inferior). El panel superior corresponde a la membrana teñida con Ponceau. **B**, las cepas: BQS1391 (pGAL-RAD53), BQS1392 (pGAL-RAD53, *hat1Δ*), BQS1393 (pGAL-RAD53, *hat2Δ*) y BQS1394 (pGAL-RAD53, *hif1Δ*) se cultivaron en medio rico conteniendo galactosa como fuente de carbono (YPGAL). Cuando los cultivos alcanzaron una $OD_{600}=0.5$, se recogieron las células y el 50 % se resuspendió en un medio de cultivo rico que contenía glucosa como fuente de carbono (YPD), donde se incubaron durante 2 horas a 28°C. Se prepararon fracciones solubles de las células incubadas en glucosa o en galactosa y se analizaron por *Western blotting* empleando anti-H4K12ac. En la imagen se muestra la membrana teñida con Ponceau (panel superior) y el *immunoblot* (panel inferior).

consecuencia de la delección de *RAD53* y descartar al mismo tiempo que la delección de *SML1* no introduce ningún efecto sobre la acetilación de H4 soluble, se prepararon mutantes condicionales de *RAD53* sustituyendo su promotor natural por el promotor del gen *GAL1*, un promotor reprimible por glucosa. En este mismo experimento se estudió también la implicación de los distintos componentes del complejo HAT-B en la acetilación de H4 soluble acumulada por la deficiencia de *RAD53*, ya que la sustitución se realizó en células salvajes, *hat1Δ*, *hat2Δ* o *hif1Δ*. Las células se sembraron y cultivaron en medio rico con galactosa como fuente de carbono, y tras recogerlas por centrifugación se resuspendieron en un medio que contenía glucosa como fuente de carbono para reprimir la expresión de Rad53p. Se prepararon fracciones solubles a partir de células que habían sido incubadas o no en presencia de glucosa, y se analizaron por *Western blotting* empleando anticuerpo frente a H4K12ac (Figura 39B). Como cabía esperar se detecta claramente histona H4 soluble acetilada en la lisina 12 en células salvajes (carreras 1 y 2) y en células *hif1Δ* (carreras 7 y 8), pero en células mutantes en *HAT1* o en *HAT2* la señal generada es muy reducida, indicando la participación de estas proteínas en la acetilación del exceso de H4 soluble en células deficientes en *RAD53* (posiblemente la señal obtenida en las células *hat2Δ*, carreras 5 y 6, se trata de contaminación de histonas procedentes de cromatina). Así mismo se observa claramente que la represión de la expresión del gen *RAD53* produce un aumento de H4K12ac (comparar carreras 1 y 2, y también carreras 7 y 8), confirmando que la histona H4 de la fracción soluble, cuya degradación está regulada por Rad53p, se encuentra acetilada en la lisina 12 de manera dependiente de Hat1p y Hat2p.

Análisis de la interacción de la histona H4 con el complejo HAT-B

Los experimentos de doble híbrido (Tabla VII) indican que la proteína Hif1 interacciona con la histona H4, por tanto es posible que el complejo HAT-B una la histona H4 sustrato a través de la proteína Hat2. Se realizaron experimentos para estudiar esta idea en mayor profundidad, en los cuales se emplearon distintas cepas con las posibles combinaciones de proteínas etiquetadas y mutantes de delección de los componentes del complejo B. Se preparó fracción soluble de cada cepa para posteriormente inmunoprecipitar las distintas proteínas del complejo y analizar por *Western blotting* la co-inmunoprecipitación de la histona H4 y de su isoforma acetilada en la lisina 12. Como control de los experimentos de inmunoprecipitación se empleó una cepa salvaje sin etiquetar. Así mismo, como control adicional también se analizó en los *Western blotting* la fracción soluble previa a la IP, de todas las cepas. En la Figura 40 se muestra el resultado de estos experimentos. La inmunoprecipitación de cualquiera de las proteínas del complejo B, Hat1, Hat2 o Hif1, conduce a la co-precipitación de la histona H4 (*immunoblot* central, carreras 6, 15 y 27) que además se encuentra acetilada en la posición 12 (*immunoblot* superior, carreras 6, 15 y 27). Por otro lado, como cabía esperar, independientemente de la proteína etiquetada inmunoprecipitada, cuando la cepa es *hat1Δ* o *hat2Δ*, no se detecta H4K12ac en la fracción soluble ni tampoco en el retenido y no retenido (*immunoblot* superior). En estas cepas no se detectó tampoco la histona H4 en los retenidos, indicando que estas dos proteínas son necesarias para la interacción del complejo B con la histona H4. Sin embargo, en ausencia de la proteína Hif1, el subcomplejo Hat1p-Hat2p es capaz de co-inmunoprecipitar la histona H4, que además se encuentra acetilada en la lisina 12 (Figura 40, *immunoblots* superior y central, carreras

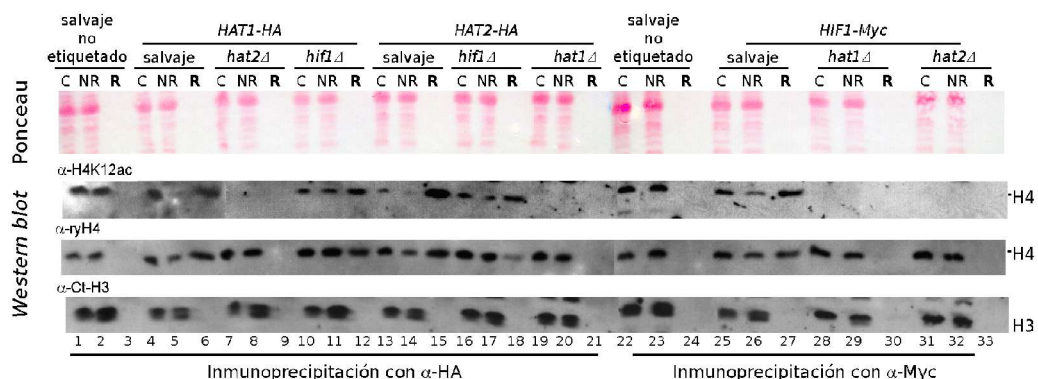


Figura 40. **Análisis de la interacción de histona H4 soluble con el enzima HAT-B.** Se prepararon cultivos de células que contenían diferentes combinaciones de genes del enzima HAT-B deletados y/o etiquetados. A partir de estas células se prepararon fracciones solubles como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, que se *incubaron* con anti-HA de rata (clon 3F10) o con anti-Myc de ratón (clon 9E10), dependiendo de la etiqueta que contiene la proteína del enzima HAT-B que se ha de inmunoprecipitar, y con perlas de proteína G-Sepharosa. Los materiales retenidos (carreras **R**), no retenidos (carreras NR) y fracciones solubles (carreras C) previamente a la inmunoprecipitación, como controles, se analizaron por *Western blotting* para estudiar los niveles de H4K12ac, H4 y H3 co-inmunoprecipitados por el enzima HAT-B, empleando los anticuerpos anti-H4K12ac (*immunoblot* superior), anti-ryH4 (*immunoblot* central) y anti-CtH3 (*immunoblot* inferior), respectivamente (Tabla VI). El panel superior corresponde a la membrana teñida con Ponceau. Las cepas empleadas fueron: W303-1a, que se utilizó como control tanto de la inmunoprecipitación con anti-HA como con anti-Myc; BQS1154 (*HAT1-HA*); BQS1172 (*HAT1-HA, hat2Δ*); BQS1184 (*HAT1-HA, hif1Δ*); BQS1189 (*HAT2-HA*); BQS1304 (*HAT2-HA, hif1Δ*); BQS1309 (*HAT2-HA, hat1Δ*); BQS1187 (*HIF1-Myc*); BQS1202 (*HIF1-Myc, hat1Δ*); BQS1225 (*HIF1-Myc, hat2Δ*).

12 y 18). El hecho de que la histona H4 inmunoprecipitada en extractos obtenidos de células *hif1Δ* esté acetilada en la lisina 12 de nuevo indica que, aunque Hif1p forme parte del complejo HAT-B, no participa en la regulación de la actividad ni en la especificidad y unión de sustrato de la subunidad catalítica Hat1p.

De acuerdo con los resultados de doble híbrido (Tabla VII) mencionados anteriormente, la proteína Hat2 parece actuar como puente en la interacción entre Hif1p y la histona H4, y en la interacción entre Hat1p e Hif1p. Según este modelo sería posible que en una cepa *hat1Δ* la proteína Hat2 interaccione con la histona H4, aunque esta histona no podrá ser

acetilada en la lisina 12, debido a la ausencia de la subunidad catalítica. Por tanto cabría esperar que en un mutante *hat1Δ* la proteína Hat2 co-precipite histona H4. De igual manera, al inmunoprecipitar la proteína Hif1 en un mutante *hat1Δ*, según este modelo también debería co-inmunoprecipitar la histona H4. Sin embargo, los resultados mostrados aquí no parecen apoyar esta idea, ya que no se detecta histona H4, ni por tanto H4K12ac, en las fracciones co-precipitadas por las proteínas Hat2 e Hif1 en cepas *hat1Δ* (*immunoblot* superior, carreras 21 y 30 respectivamente). Además, en ausencia de Hat2p, Hat1p e Hif1p tampoco son capaces de co-inmunoprecipitar H4. Todo ello sugiere que la proteína Hat2 no debe actuar simplemente mediando la interacción entre Hat1p y la histona H4, sino que debe ser necesaria la presencia simultánea de Hat1p y Hat2p para unir la histona H4. Hat2p por sí sola debe ser incapaz de unir la histona H4. Por último, estas mismas muestras se analizaron por *Western blotting* empleando un anticuerpo que reconoce el extremo C-terminal de la histona H3 (Figura 40, *immunoblot* inferior). Ha sido habitual emplear este anticuerpo como un control de carga de histonas, puesto que las histonas H3 y H4 tras su síntesis, siempre van juntas formando tetrámeros y parecen encontrarse en cantidades equimolares. Sin embargo, el revelado de la membrana con este anticuerpo muestra que ninguna de las proteínas del complejo HAT-B co-inmunoprecipita la histona H3, ni siquiera en aquellas células salvajes en las que el complejo HAT-B contiene todos sus elementos conocidos (*immunoblot* inferior, carreras 6, 15 y 27). En la fracción no retenida si se detecta la histona H3, lo que indica que no ha habido un problema de degradación a lo largo del experimento. Este resultado es sorprendente y, dado que siempre se ha considerado que las histonas H3 y H4 forman desde su síntesis un complejo tetramérico [117], sugiere que el complejo HAT-B podría participar en un momento inmediato tras la síntesis de la histona H4, antes de su asociación con H3.

Existe la posibilidad de que el estado de acetilación de la histona H4 afecte a la estabilidad de su unión con el enzima HAT-B, de manera que el enzima HAT-B una la histona H4 débilmente y tras su acetilación la interacción se estabilice. Para explorar esta posibilidad se etiquetaron los genes *HAT1* o *HIF1* con HA6 y Myc, respectivamente, en células salvajes y en células que expresan desde un plásmido y como única fuente de histona H4, una versión que contiene la lisina 12 sustituida por una arginina (H4K12R). Se preparó fracción soluble de estas células para inmunoprecipitar Hat1p-HA o Hif1p-Myc, y se analizó por *Western blotting* la presencia de la histona H4 en los inmunoprecipitados. En todos los casos se analizó el retenido, el no retenido y como control, una alícuota de fracción soluble. En la Figura 41A se muestra el resultado obtenido con anti-H4K12ac. Sólo se detecta señal en células *HAT1* que expresan la histona H4 salvaje (carreras 3 y 9). Como se puede observar en la Figura 41B, la histona H4 es co-inmunoprecipitada por el complejo HAT-B independientemente de que pueda ser acetilada en la lisina 12 (H4 salvaje), o no (H4K12R), tal como lo indica el revelado con el anticuerpo anti-ryH4 (carreras 3, 6, 9 y 12). En células *hat1Δ*, como también se muestra en el experimento anterior (Figura 40), el enzima HAT-B no co-inmunoprecipita la histona H4.

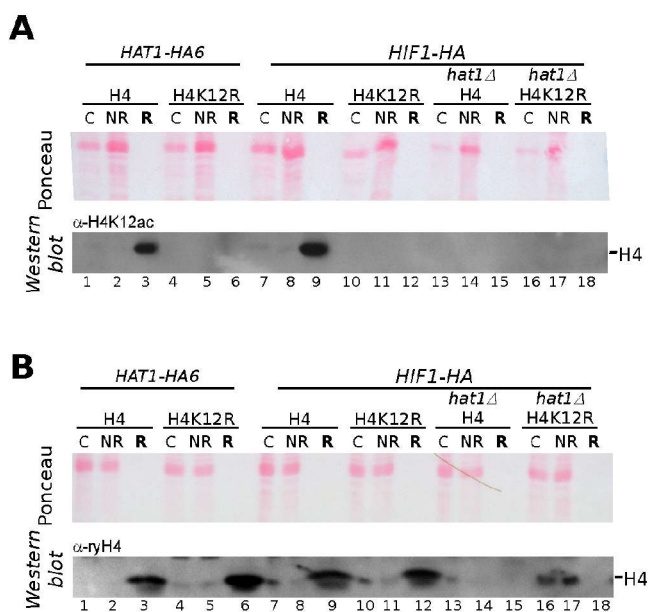


Figura 41. **El estado de acetilación de la lisina 12 de H4 no afecta a la unión de H4 con el enzima HAT-B.** Se prepararon fracciones solubles de las cepas BQS1399 (*HAT1-HA*); BQS1401 (*HAT1-HA, H4K12R*); BQS1403 (*HIF1-HA*); BQS1405 (*HIF1-HA, H4K12R*); BQS1407 (*HIF1-HA, hat1* Δ) y BQS1424 (*HIF1-HA, H4K12R, hat1* Δ). Las fracciones solubles se incubaron con anti-HA de rata (clon 3F10, Tabla VI) y con proteína G-Sepharosa, y los materiales retenidos (carreras **R**) y no retenidos (carreras NR) resultantes se analizaron por *Western blotting* empleando los anticuerpos anti-H4K12R (**A**), y anti-ryH4 (**B**). En todos los casos se analizó, como control (carreras C), una alícuota de la fracción soluble. Los paneles superiores corresponden a la membrana teñida con Ponceau, y los inferiores al *immunoblot*.

DISCUSIÓN

Identificación de Hif1 como una nueva proteína del complejo HAT-B de *S. cerevisiae*.

Empleando el sistema de doble híbrido en trabajos previos al que aquí se presenta, se identificó la proteína Hif1 como una proteína que interacciona con la subunidad catalítica del enzima HAT-B, Hat1p, y con su sustrato, la histona H4 (Tabla VII). Esta interacción se ha confirmado bioquímicamente (Figura 11) y por experimentos de co-inmunoprecipitación (Figuras 12, 14 y 15). La masa molecular determinada cromatográficamente para el complejo HAT-B (150 kDa) [184], es consistente con la posibilidad de que se trate de un heterotrímero formado por las proteínas Hat1 (43.87 kDa), Hat2 (45.06 kDa) e Hif1 (43.43 kDa).

La delección de *HAT1* o *HAT2* da lugar a la pérdida del complejo HAT-B y de la actividad histona acetiltransferasa en los perfiles cromatográficos y en extractos celulares [139,175,189], pero la delección de *HIF1*, en cambio, no conlleva alteración significativa en las propiedades cromatográficas del enzima, ni pérdida o reducción del pico de actividad enzimática ni tampoco de su especificidad (Figuras 13). Estos resultados indican que la subunidad Hif1p no debe ser esencial en el complejo. Efectivamente la ausencia de Hif1p no afecta ni a la actividad histona acetiltransferasa de Hat1p, ni a su especificidad de sustrato (Figura 37). Algo similar ha sido descrito con el complejo SAGA, en el que la eliminación de cualquiera de las subunidades Ada2p, Ada3p, Spt3p o Spt8p apenas altera la integridad estructural y el comportamiento cromatográfico de SAGA. Incluso la pérdida de Gcn5p, su subunidad catalítica, tampoco conlleva la alteración significativa en las propiedades cromatográficas del complejo, aunque obviamente sí desaparece la actividad histona acetiltransferasa. En cambio la delección de los genes de las proteínas Ada1, Spt7 y Spt20, también constituyentes de SAGA, produce la desaparición del complejo, indicando que estas

subunidades juegan un papel fundamental en el mantenimiento de su integridad [240].

A pesar de que Hif1p no participa en la actividad enzimática del complejo B, la delección de *HIF1* produce los mismos defectos en el silenciamiento telomérico que mutantes *hat1Δ* o *hat2Δ*, únicamente observables en combinación con ciertas sustituciones de lisinas del extremo N-terminal de la histona H3, por argininas (Figura 19) [241]. La delección del gen *HAT1* también produce defectos en la reparación de roturas de doble cadena del DNA cuando se combina con mutaciones de sustitución de las lisinas 9, 18 y 27 de H3, por argininas [197]. En un trabajo posterior a este, otros autores han comprobado que también la delección de *HIF1*, en combinación con estas particulares sustituciones de lisinas de H3 por argininas, produce los mismos defectos en reparación del DNA, que la delección de los genes codificadores de los otros componentes del complejo B, *HAT1* o *HAT2* [241]. Estos resultados ponen de manifiesto que la proteína Hif1p participa por tanto de alguna manera, en la función del complejo HAT-B.

Queda por determinar si Hif1 forma parte también de otros complejos macromoleculares, ya que si bien una fracción de Hif1p es co-precipitada por Hat1p, una parte importante se detecta en el sobrenadante, aparentemente no asociada a Hat1p. De forma similar, Hif1p no coprecipita completamente toda la proteína Hat1 presente en los extractos (Figura 14). Algo parecido sucede con Hat2p, que sólo co-precipita una fracción de Hif1p, y viceversa (Figura 15). Si bien estos resultados pueden ser debidos a una ineficiente co-inmunoprecipitación inherente del experimento, también es posible que sean consecuencia de la existencia de diversas poblaciones de Hat1p e Hif1p independientes en los extractos de levadura. Alternativamente también es posible que la asociación de Hif1p a Hat1p-

Hat2p sea débil y/o transitoria, lo que explicaría porque Hif1p no se identificó como un componente del enzima HAT-B en su aislamiento original tras varios pasos cromatográficos [175]. Hif1p podría haberse perdido tras una purificación exhaustiva del complejo.

Hat1 y Hat2 son proteínas muy conservadas para las que existen homólogos en organismos eucariotas distantes, desde la levadura hasta humanos. En cuanto a Hif1p, el análisis de secuencias realizado por Lucas I. y Mars S. (Dpto. de Genética, Universitat de València), con la intención de identificar posibles homólogos de Hif1p en diferentes especies, ha revelado una región de la proteína (entre los aminoácidos 150 y 350 aproximadamente), que presenta cierta similitud con proteínas de animales y bacterias (normalmente <20 % de identidad). Esta similitud es demasiado baja para considerar que son proteínas homólogas a Hif1p. En concreto, en *Xenopus* pueden encontrarse secuencias similares a ese mismo fragmento, pero no con toda la longitud de la proteína Hif1. En general, a causa de la baja complejidad de la secuencia de Hif1p pueden producirse algunos alineamientos aleatorios con secuencias de organismos alejados. Además, los filtros de complejidad reducen el rango de secuencias homólogas a unas pocas especies estrechamente relacionadas (*Saccharomycetales*). Hif1 es una proteína bien conservada en varias levaduras de gemación de la especie *Saccharomyces*, y también en *Candida glabrata* y *K. lactis*, unas levaduras ya bastante más distanciadas. En la Figura 42 se muestra el alineamiento de secuencias y el correspondiente árbol filogenético.

En un trabajo realizado posteriormente, Ai *et al.* (2004) [241] han descrito también la proteína Hif1 como una subunidad del enzima HAT-B, además de las proteínas Hat1 y Hat2, empleando la metodología del TAP sobre células de levadura que expresan la forma etiquetada Hat1p-TAP. En sus análisis de secuencias sobre la base de datos ProDom [242] encuentran

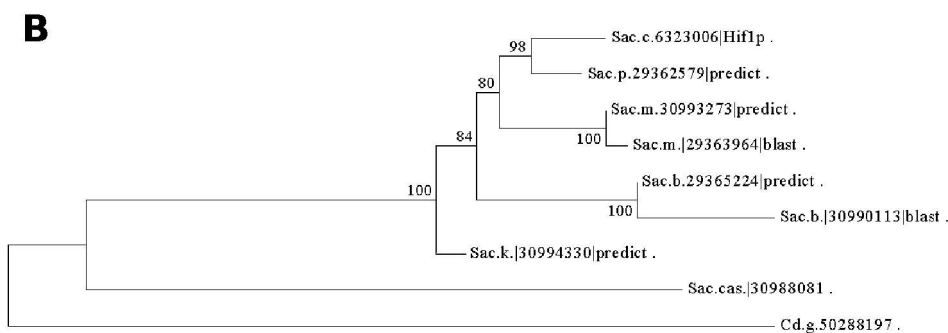


Figura 42. A, Reconstrucción filogenética por el método Neighbor-Joining, con 1000 réplicas de *bootstrap*, realizado con el programa MEGA [251], a partir del alineamiento de las secuencias. **B**, Alineamiento realizado con el programa ClustalX 1.83 [252] y retocado con el GeneDoc 2.6 [253] (*Distributed by the author*). Las secuencias se obtuvieron mediante TBLASTN en la base de datos de genomas eucariotas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El código de especies es el siguiente: Sac.c. : *Saccharomyces cerevisiae*; Sac.p. : *S. paradoxus*; Sac.k. : *S. kudriavzevii*; Sac.m. : *S. mikatae*; Sac.b. : *S. bayanus*; Sac.cas. : *S. castellii* (= *Naumovia castellii*) y Cd.g. : *Candida glabrata*. El número que sigue al nombre de cada secuencia es el identificador de la proteína o secuencia de DNA a partir de la cual se ha obtenido. La terminación *predict* significa que la proteína es una traducción automática con programas de predicción de genes. La terminación *blast* indica que la secuencia de DNA de donde se ha traducido es homóloga a Hif1p, pero que los programas de predicción de genes no identifican la proteína porque probablemente se trata de pseudogenes. De hecho, al menos uno de ellos tiene codones de *stop*. La proteína Sac.k.|30994330|predict esta incompleta. Realizado por Lucas I. y Mars S. (Dpto. Genética, Universitat de València).

que Hif1p presenta similitud con la proteína N1 de *Xenopus leavis*, aunque también muy baja (20 % idéntica, 42 % similar). La proteína N1 se ha descrito como una chaperona que funciona almacenando histonas en oocitos asegurando una disponibilidad de histonas para el ensamblaje de cromatina (ver *Introducción*). Aunque esta similitud es muy débil han averiguado que Hif1p presenta actividad ensambladora de histonas con DNA *in vitro*, en presencia de un factor no identificado presente en extractos citosólicos. Este factor no es ni Hat1p, ni Hat2p, ni tampoco otras proteínas conocidas implicadas en la organización de la cromatina como Asf1 y Cac1. Esta función encaja con el papel generalmente aceptado para el enzima

HAT-B acetilando histonas para su posterior incorporación a cromatina. Así proponen que en levadura, Hat1p-Hat2p acetilarían la histona H4 libre que posteriormente sería ensamblada en cromatina por Hif1p. Esta habilidad de la proteína Hif1p es consistente con que Hif1p no participe en la acetilación de la histona H4 (Figura 13 y 37, discutido más adelante), ya que su papel sería subsecuente a esta acetilación. En cualquier caso hay que ser cautelosos con los datos que indican que Hif1p tiene actividad ensambladora de histonas. Por un lado estos experimentos han sido realizados *in vitro*, lo que plantea la cuestión de si la cromatina ensamblada presenta una estructura regular y apropiada. *In vitro*, casi cualquier molécula rica en cargas negativas (pectinas, RNA, poliglutámico o incluso sal) que se adicione a una mezcla de DNA e histonas puede actuar ensamblando las histonas sobre el DNA sin que ello tenga relevancia fisiológica en el ensamblaje de nucleosomas *in vivo* [133]. Los sistemas de ensamblaje *in vitro* tienen una naturaleza muy permisiva, lo que ha dado lugar a numerosos artefactos [133]. En el mismo trabajo en el que se describe la capacidad ensambladora de cromatina de Hif1p *in vitro*, también se indica que Hif1 recombinante une a las histonas H3 y H4, pero sin embargo *in vivo* esta unión parece ser indirecta, mediada por las proteínas Hat1/Hat2 (coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo, Figura 40, ver más adelante). La proteína Hif1 contiene una región ácida, algo bastante frecuente en chaperonas de histonas, y quizás su capacidad de unión de histonas *in vitro* resida en esta región.

El complejo HAT-B es mayoritariamente nuclear

Uno de los resultados más relevantes de este estudio es que los tres componentes del complejo HAT-B son nucleares (Figura 16). Aunque estos

resultados no descartan la posibilidad de que una pequeña fracción de alguna de estas tres proteínas pueda residir en el citoplasma, claramente indican que la mayor parte se encuentra en el núcleo. En un principio esto puede resultar sorprendente porque el complejo HAT-B se ha aislado frecuentemente en fracciones citoplasmáticas en diferentes especies [50,52,130,139,175,184,190,243], dando lugar a la idea generalizada de que los enzimas tipo B, que además acetilan histonas libres pero no nucleosomas, son citoplasmáticos [46]. Esta visión se ha mantenido a pesar de que ya se había detectado Hat1p en el núcleo en algunos organismos. En células humanas Hat1p se ha detectado en el núcleo durante la fase S del ciclo celular [139], y en oocitos de *Xenopus laevis* se han observado grandes reservas de Hat1p en el núcleo, donde permanece hasta que el oocito madura y comienza la embriogénesis [51]. En levadura, Parthun *et al.* (1996) [175] obtuvieron Hat1p mayoritariamente de fracciones de citoplasma pero también la detectaron, mediante *Western blotting*, en fracciones nucleares. Por otro lado el complejo HAT-A3 de levadura, que contiene las proteínas Hat1 y Hat2 pero no Hif1, como se ha indicado en este trabajo (Figura 11) se obtiene mayoritariamente en fracciones nucleares [189]. Tras los nuevos resultados de localización aquí mostrados cabe preguntarse: si el complejo B tiene una localización nuclear, ¿porqué razón se obtiene de fracciones citoplasmáticas? Cuando se fraccionan extractos bioquímicamente, es conocido que algunos enzimas nucleares pueden escapar fácilmente tras la lisis celular y posteriormente ser detectados en fracciones citoplasmáticas, dando lugar a la asignación de una localización subcelular errónea. Este podría haber sido el caso para el complejo HAT-B, no sólo en levadura sino también en otros organismos. Ahora las técnicas microscópicas están permitiendo abordar el estudio de la localización de las proteínas de la célula de manera diferente, proporcionando resultados no siempre coincidentes con aquellos obtenidos

por fraccionamientos bioquímicos. Estas técnicas, mucho más sensibles, permiten incluso distinguir si una proteína se localiza en el núcleo, en el nucleolo, en el citoplasma, en las mitocondrias, en el retículo endoplásmico, etc. En efecto, en algunos casos la asignación de una localización subcelular citoplasmática para una proteína obtenida por fraccionamiento bioquímico, ha sido posteriormente corregida al determinar su localización más exacta empleando técnicas microscópicas. Así sucedió con la DNA polimerasa α de mamíferos. Durante muchos años se pensó que este enzima era citoplasmático, ya que se obtenía en extractos de citoplasma, pero más tarde se describió mediante técnicas microscópicas e inmunofluorescencia, que el enzima reside en el núcleo donde tiene una función esencial en la replicación del DNA [244].

El enzima B se ha relacionado con la acetilación de la histona H4 sintetizada *de novo*, la cual se fabrica principalmente en fase S, acoplada y coordinada con la síntesis de DNA [225]. Por ello algunos autores se ha llegado a plantear la posibilidad de que exista una regulación espacial y temporal para el enzima B a lo largo del ciclo celular. Durante la fase S el enzima B entraría al núcleo para acetilar la histona H4 recién sintetizada, y una vez el DNA se hubiera replicado y ensamblado con histonas completamente, el enzima B saldría al citoplasma dónde permanecería hasta la siguiente ronda de replicación. El análisis de la localización subcelular de las proteínas del complejo HAT-B en células en diferentes fases del ciclo celular, indicaron para todas ellas una localización mayoritariamente nuclear en todos los estadios del ciclo celular (Figura 16A), no parece por tanto que se de una regulación espacio-temporal de la localización del enzima. Existen sin embargo otras alternativas, como una regulación temporal de la actividad del enzima o una regulación espacio-temporal de la disponibilidad de sustrato. Ai y Parthun, (2004) [241]

también han estudiado la localización subcelular de las proteínas del complejo HAT-B, en células de levadura. En sus estudios emplean anticuerpos dirigidos directamente frente a las proteínas Hat2 o Hif1. No consiguieron determinar la localización subcelular de Hat1p, presumiblemente debido a la incapacidad del anticuerpo empleado en este ensayo. Claramente encontraron que Hat2 e Hif1 son proteínas principalmente nucleares, pero además también detectan pequeños focos de Hat2p en el citoplasma. Basándose en estos resultados y en los resultados previos de fraccionamiento bioquímico en el que se obtuvieron las proteínas Hat1 y Hat2, proponen un modelo según el cual Hat1p/Hat2p interaccionan con la histona H4 en el citoplasma y la importan al núcleo donde interaccionan con Hif1p. Ésta ahora ensambla la histona H4 en cromatina. Este modelo implica una regulación espacial del enzima HAT-B, pero no ha sido experimentalmente analizado, como tampoco se ha analizado su posible regulación temporal.

Al estudiar la interdependencia de la localización subcelular entre las tres proteínas del complejo HAT-B, Hat1, Hat2 e Hif1, se ha averiguado que todas ellas presentan una residencia nuclear independientemente de la presencia de cualquiera de las otras dos, excepto para la proteína Hat1, en células carentes de Hat2p. En células *hat2Δ* la proteína Hat1 pierde su localización nuclear y se distribuye por toda la célula (Figura 17C), es decir, Hat2p determina la localización subcelular de Hat1p pero no de Hif1p. Estos resultados indican que Hat1p/Hat2p deben entrar al núcleo por una vía independiente de Hif1p. Así, estos resultados sugieren que la construcción o ensamblaje del complejo HAT-B debe ocurrir en el interior del núcleo, posteriormente a la entrada de sus componentes, Hif1 por un lado y Hat1/Hat2 por otro.

Papel de la proteína Hat2 en el complejo HAT-B

Una de las funciones que se han descrito para Hat2p es la de incrementar la actividad específica de Hat1p *in vitro* [139,175]. En este trabajo se han descrito tres nuevas funciones para Hat2p. Por un lado la proteína Hat2 actúa como puente mediando la interacción entre Hat1p e Hif1p *in vivo*. La interacción que se detecta *in vivo* entre Hat1p-Hif1p en los experimentos de doble híbrido, desaparece en un *hat2Δ* (Tabla VII). A su vez, los experimentos de co-inmunoprecipitaciones también confirman que Hat2p media la interacción entre Hat1p e Hif1p (Figuras 12, 14 y 15). No se puede, en cualquier caso, descartar que la unión entre Hat2p e Hif1p no esté mediada por otras proteínas. Por otro lado, como ya se ha discutido en el apartado anterior, los resultados de microscopía de inmunofluorescencia aquí presentados (Figura 17), indican que Hat2p esta implicada en la importación o mantenimiento de Hat1p en el núcleo. Por último, Hat2p participa, junto a Hat1p, en la unión *in vivo* de H4, pero Hat1p o Hat2p por sí solas son incapaces de unir la histona H4 (discutido más adelante).

Especificidad *in vivo* del complejo HAT-B

A pesar de la abundancia de datos del enzima HAT-B *in vitro* poco se conoce de su función *in vivo*. En todos los organismos eucariotas dónde se ha estudiado la histona H4 recién sintetizada y depositada en nucleosomas está diacetilada en las lisinas 5 y 12, y este patrón no aleatorio coincide con el patrón generado *in vitro* por los enzimas HAT-B nativos que se han obtenido bioquímicamente [51,139,174,175,189,191,192,245]. Sin embargo se ha demostrado, por mutaciones específicas de los residuos del extremo N-terminal de H4, que las lisinas 5 y 12 no son requeridas para el

ensamblaje de nucleosomas ni *in vitro* ni *in vivo* [145,146]. La delección de *HAT1*, *HAT2* y ahora también de *HIF1*, tampoco presentan fenotipos obvios. Células *hat1Δ* o *hat2Δ* no muestran defectos de crecimiento ni a 28° ni a 37°C, ni son sensibles a diferentes agentes genotóxicos, ni presentan defectos de esporulación, conjugación o germinación. Al identificar la proteína Hif1 como una subunidad del enzima HAT-B se estudió si la delección del gen codificante producía algún fenotipo, pero no tampoco en este caso se identificó ningún defecto de crecimiento ni ninguna sensibilidad a ninguno de los agentes genotóxicos empleados. Recientemente se ha descrito que células mutantes en *hat2Δ* o dobles mutantes *hat1Δhat2Δ* [250], presentan una esperanza de vida mayor que células salvajes, pero la delección de *HIF1* no parece afectar a la esperanza de vida de las células (Figura 18). Si como se supone, el complejo HAT-B participa en la acetilación y ensamblaje de la histona H4 sintetizada *de novo*, es posible que existan otras rutas de ensamblaje de histonas redundantes.

Dado que la lisina 12 de la histona H4 es la principal posición modificada *in vitro* por el enzima HAT-B purificado o por Hat1p recombinante, se realizaron varios experimentos intentando averiguar si la lisina 12 de H4 también es diana *in vivo* de Hat1p. Se analizaron por *Western blotting* los niveles de H4K12ac en WCE, que contienen todas las histonas de la célula, y en histonas de levadura purificadas de cromatina procedentes de células salvajes o mutantes en *hat1Δ*, *hat2Δ* o *hif1Δ*, pero en ningún caso se detectaron diferencias (Figura 21). Tampoco se detectaron diferencias en los niveles de H4K12ac dependientes de *HAT1* al deleccionar genes de diferentes histona desacetilasas, ni en células *esa1^{ts}* (Figura 22 y 23). Además, los niveles de H4K12ac detectados en células salvajes o células *hat1Δ* son aproximadamente constantes a lo largo de todo el ciclo celular

(Figura 25), al igual que la proteína Hat1 que también es aproximadamente constante a lo largo de todo el ciclo celular (Figura 24). En conjunto, todos estos resultados parecían indicar que aparentemente, en condiciones normales, la acetilación *in vivo* de la Lys-12 H4 detectada en histonas purificadas o en *WCE* no es dependiente de *HAT1*.

Sin embargo, al incubar las células en presencia de HU, una droga que bloquea las células en fase S, si que se observaron diferencias en los niveles de acetilación de H4K12 (Figura 28) entre células salvajes y células *hat1Δ*. Ya se había descrito que el tratamiento de células HeLa en presencia de HU producía la acumulación de una fracción “citosólica” de histonas sintetizadas *de novo*, aunque, como se ha discutido anteriormente, es posible que esta proceda tanto del citoplasma como del nucleoplasma [130,236]. La histona H4 de esta fracción se encuentra acetilada en las lisinas 5 y 12, coincidiendo con aquellas posiciones acetiladas por HAT-B humana *in vitro* [130]. El hecho de que el bloqueo de las células en fase S genere una diferencia en los niveles de H4K12 dependiente de Hat1p van en la misma dirección que el papel frecuentemente asignado para el enzima B en la acetilación de histonas sintetizadas *de novo* en fase S, previamente a su deposición en cromatina. La HU es un compuesto que inhibe a la ribonucleótido reductasa (Rnr), el enzima responsable de la síntesis de desoxiribonucleótidos, de manera que cuando la concentración de dNTPs disminuye por debajo de un umbral, se detiene la replicación [246]. También se ha descrito que la HU puede producir daños en el DNA, y aunque no se conoce muy bien cual puede ser su mecanismo de actuación, esta característica resulta interesante por que es conocido que la generación de lesiones en DNA activa los mecanismos de *checkpoint* de la célula contribuyendo también al bloqueo del ciclo en fase S. Además, como se ha mencionado anteriormente, se ha descrito que células con deleciones

en los genes del enzima HAT-B, *HAT1* o *HIF1*, presentan defectos en reparación de roturas del DNA de doble cadena cuando se combinan con sustituciones de algunas lisinas de la histona H3 [197,241].

Además de la HU, el tratamiento con otros compuestos genotóxicos (4-nitroquinolina n-óxido, camptotecina, fleomicina, metilmetanosulfonato y H_2O_2), que detienen el ciclo celular en fase S como consecuencia de las lesiones que generan en el DNA, también generan diferencias en el contenido celular de H4K12ac dependientes de Hat1p (Figura 29), indicando que estas diferencias son consecuencia de los daños producidos en el DNA y/o el bloqueo de la replicación, y no de un efecto específico de la HU.

Tres posibles alternativas pueden explicar porque el tratamiento con HU produce una diferencia en los niveles de H4K12ac dependiente de Hat1p: 1) la HU produce la acumulación de la proteína Hat1p, bien debido a un aumento de su expresión o bien debido a un aumento de su vida media; 2) la actividad específica de Hat1p puede ser incrementada; y 3) se acumula la fracción de histona H4 que es acetilada por Hat1p. Los experimentos realizados han descartado las dos primeras opciones (Figura 31), ya que los niveles de Hat1p se mantienen aproximadamente constantes tras la incubación con HU y su actividad específica tampoco es significativamente diferente, como reveló el análisis cromatográfico de extractos obtenidos de células tratadas o no con HU (Figura 32). Así pues la tercera posibilidad parece ser la correcta. La fracción de H4 que se acetila por Hat1p es una fracción soluble no ensamblada en cromatina que se acumula como consecuencia del tratamiento con HU. Esta fracción de H4 se puede considerar coincidente con aquella fracción descrita en células HeLa, mencionada anteriormente. Cuando se analizan los niveles de H4K12ac en extractos totales de células tratadas con HU, que contienen todas las histonas celulares, se detectan diferencias dependientes de Hat1p (Figura

28), pero cuando se analizan histonas purificadas de cromatina de células tratadas con HU los niveles de H4K12ac son similares en células salvajes o *hat1Δ* (Figura 33 y 34A), lo que sugiere que durante el proceso de aislamiento de histonas de la cromatina se pierde la fracción de H4 acetilada por Hat1p. Efectivamente, tras optimizar un método de fraccionamiento se ha conseguido averiguar que la fracción de histona no ensamblada en cromatina contiene H4 acetilada en las lisinas 12 y 5 de forma dependiente de Hat1p. El empleo de otros anticuerpos específicos de posiciones de acetilación para las histonas H4 y H3, ha revelado que a diferencia de las lisina 5 y 12 de H4 soluble, las otras posiciones de H4, lisinas 8 y 16, y las cinco lisinas acetilables del extremo N-terminal de H3, no son acetiladas *in vivo* de forma dependiente de Hat1p. Esta es la primera vez que se demuestra la acetilación *in vivo* de las lisinas 12 y 5 de H4 por Hat1p.

Se ha analizado también la dependencia de la acetilación de las lisinas 12 y 5 de la histona H4 soluble con los otros dos componentes conocidos del complejo HAT-B (Figura 37). Al igual que ocurre con *HAT1*, la delección de *HAT2* conduce a la pérdida de la acetilación de estas posiciones. Hat2p, por tanto, también participa en su acetilación *in vivo*. El papel de Hat2p *in vivo* concuerda, al menos parcialmente, con el que ya se conocía de resultados *in vitro*, estimulando la actividad enzimática de Hat1p y facilitando o ayudando a la unión de la histona H4 sustrato ([175], ver también más adelante). El papel de Hif1p en el complejo HAT-B en cambio, debe ser diferente, no implicado en la actividad de acetilación de K12 y K5 de H4 soluble. Los niveles de acetilación de estas posiciones, determinadas por experimentos de *Western blotting* en una cepa carente de *HIF1*, fueron similares a los de la cepa silvestre (Figura 37). Tampoco se detectaron defectos en los perfiles cromatográficos de actividad HAT de extractos

obtenidos de células *hif1Δ* (Figura 13). Así, Hif1p no participa en las propiedades catalíticas ni de especificidad del complejo HAT-B y posiblemente, como ya se ha mencionado, su función sea subsecuente a la modificación de las posiciones 12 y 5 de H4 generada por Hat1p en el complejo.

El hecho de no haber detectado diferencias de acetilación en la lisina 12 de H4 procedente de cromatina dependientes de Hat1p (Figuras 33 y 34) lleva a pensar que: 1) o bien, como ya otros autores han sugerido, la desacetilación ocurre inmediatamente después de su incorporación a cromatina, con un tiempo de permanencia tan corto que no fuese detectable con la estrategia de *Western blotting* empleada en este trabajo; o 2) que la desacetilación ocurre previamente o durante el proceso de ensamblaje de la histona a la cromatina. Esta segunda posibilidad conlleva que quizás el papel funcional del complejo HAT-B podría no estar tan directamente implicado en el ensamblaje nucleosomal y estuviese entonces dedicado a otras cuestiones más relacionadas con los diferentes destinos de las histonas solubles no cromatínicas.

Las histonas presentes en la fracción soluble de la célula, que debe contener nucleoplasma y citoplasma, por lo que la denominamos histona soluble, no se encuentran libres en la célula sino que deben estar unidas a diferentes proteínas, llamadas genéricamente chaperonas de histonas [121]. Cuando se tratan células con HU o con diferentes agentes que dañan el DNA (Figura 29), se acumulan las histonas H3 y H4 de esta fracción soluble, y también la histonas H2A y H2B [130,236], y como consecuencia de esta acumulación aumenta la señal de H4K12ac detectada por *Western blotting*. Probablemente estas histonas se acumulan porque al inhibir la ribonucleótido reductasa con HU se bloquea la replicación durante la fase S, de manera que al detenerse la síntesis del DNA no se ensambla la histona

soluble y se acumula. Aunque se ha descrito que durante la fase S tiene lugar un aumento de la expresión de las histonas acoplada a la síntesis de DNA [119], por *Western blotting* no se ha detectado ningún pico de H4 soluble ni de H4K12ac dependiente de Hat1p en esta fase ni tampoco en el resto del ciclo celular (Figura 35). Durante la síntesis del DNA en la fase S, aunque aumenta la tasa de síntesis de histonas, también debe aumentar la tasa de incorporación de histonas en el DNA sintetizado *de novo*, de manera que los niveles de histona soluble en la célula se mantienen aproximadamente constantes durante todo el ciclo de división celular.

La histona H4 soluble se asocia al complejo HAT-B

Mediante ensayos de doble híbrido se había determinado la interacción de la histona H4 con Hif1p. En el trabajo que se presenta se ha ido más lejos y se ha determinado que la misma histona H4, el sustrato principal o único de Hat1p, forma parte del mismo complejo HAT-B. Mediante experimentos de co-inmunoprecipitación empleando extractos procedentes de células que contienen las proteínas del complejo HAT-B etiquetadas, se ha comprobado la presencia de la histona H4 en el complejo HAT-B, que además está acetilada en la lisina 12, en inmunoprecipitados de Hat1p, Hat2p y también Hif1p (Figura 40). Experimentos similares, pero ahora con cepas de levadura que contienen deleciones en los diferentes componentes del complejo, han indicado que la asociación de la histona H4 al complejo es dependiente de Hat1p y Hat2p, pero no de Hif1p. H4 permanece unida a Hat1p/Hat2p en ausencia de *HIF1*. Así pues Hif1p no participa en la unión de H4 como tampoco en su acetilación, lo que ya ha sido discutido. De nuevo este resultado parece señalar hacia una función para Hif1p posterior a la modificación de la histona por la subunidad catalítica Hat1p del complejo.

La interacción de la histona H4 con el complejo HAT-B es independiente

de la lisina 12, principal diana de acetilación de Hat1p. Esta asociación tiene lugar tanto con la histona H4 salvaje (H4K12), como con H4 mutante de sustitución H4K12R, en la que una arginina no acetilable sustituye a la lisina 12 (Figura 41). Así, la unión es independiente del estado de acetilación de la lisina 12. Estos resultados sugieren que la asociación de la histona H4 al complejo no es simplemente reflejo de la unión de un sustrato (H4) a su enzima (HAT-B), sino que va más allá, teniendo un significado funcional que se desconoce por el momento.

Los experimentos de doble híbrido también mostraron que para que la histona H4 interaccione con Hif1p es necesaria la presencia de la proteína Hat2 similarmente a la interacción entre Hat1p e Hif1p. Sin embargo estos resultados no informan de si la proteína Hat1 es necesaria para la unión de la histona H4 o no (ver modelos en Figura 43). Esta cuestión es resuelta por los experimentos de co-inmunoprecipitación que se muestran en la Figura 40. La presencia simultánea de ambas proteínas, Hat1 y Hat2, es requerida para unir la histona H4. Esta idea ya había sido propuesta anteriormente por Parthun *et al.* (1996) [175], quienes comprueban por cromatografía de afinidad empleando una matriz que contiene el extremo N-terminal de H4 unido covalentemente, que el complejo B (Hat1p y Hat2p) queda retenido sólo cuando aplican extractos procedentes de células salvajes, pero no cuando emplean extractos de células *hat1Δ* o *hat2Δ*. Este comportamiento se podría explicar porque al unirse las dos proteínas, Hat1 y Hat2, se formase entre ellas un sitio de unión y reconocimiento para la histona H4, o también por que la unión de ambas produce un cambio conformacional, haciendo accesible el sitio de unión de la histona H4. Así pues, los resultados mostrados en este trabajo apoyan el modelo B de los dos representados en la Figura 43.

Coincidiendo con los resultados aquí descritos, Ai y Parthun (2004) [241]

también han encontrado en extractos de levadura que Hif1p está asociada a la histona H4 de forma dependiente de Hat1p/Hat2p. Esta histona H4 está acetilada, aunque no averiguan en que posiciones. Sin embargo, estos

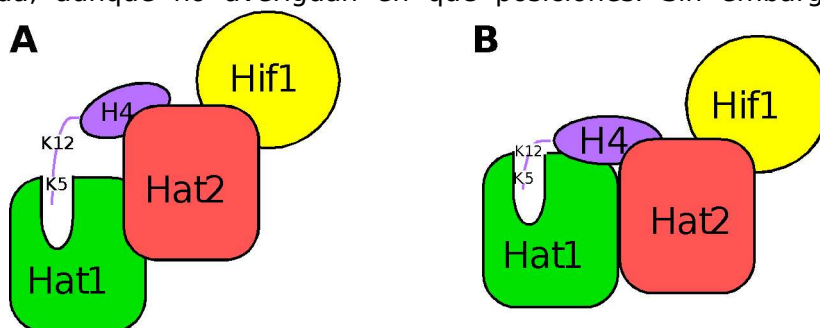


Figura 43. Modelos de interacción de los diferentes componentes del complejo HAT-B. **A**, este modelo indica que Hat2p une la histona H4. **B**, modelo que se deduce de los resultados obtenidos en la Figura 40. Según este modelo son necesarias tanto Hat1p como Hat2p para unir la histona H4 sustrato.

mismos autores demuestran que Hif1p recombinante y por tanto en condiciones *in vitro*, es capaz de unir por sí sola las histonas H3 y H4, como ya se ha discutido, aunque podría ser consecuencia de una asociación inespecífica de una región ácida de la proteína Hif1.

Aunque el estado de acetilación de la lisina 12 de H4 no parece afectar a la unión de la histona H4 con el enzima HAT-B (Figura 41 B), resultaría interesante conocer si esta interacción se ve afectada al sustituir la H4K5 por una arginina o al sustituir simultáneamente ambas lisinas, K5 y K12, por argininas, teniendo en cuenta que ambos residuos son acetilados por Hat1p.

Se dispone de algunos datos sobre la afinidad de Hat1p con el extremo N-terminal de la histona H4, deducidos del análisis de la estructura de Hat1p a 2.3Å [176,247]. Asumiendo que el extremo N-terminal de la histona H4 tiene una conformación extendida que se une en un canal del enzima Hat1p, se ha propuesto que la lisina 12 se localiza junto al grupo carbonilo

del acetil-CoA, mientras que las lisinas 8 y 16 se encuentran localizadas en regiones acídicas. La alineación de la lisina 5 junto al grupo acetilo da lugar a una disposición razonable, pero menos favorable, mientras que si se alinea la lisina 8 da lugar a una conformación poco estable con impedimentos estéricos [176]. Makowski *et al.* (2001) [247] realizaron ensayos HAT empleando Hat1p recombinante de levadura o HAT-B nativo de células HeLa y péptidos del extremo N-terminal de H4 con diferentes posiciones acetiladas. Mientras que el péptido no acetilado es el mejor sustrato para Hat1p y también para HAT-B, el péptido diacetilado en las posiciones 8 y 16 es un sustrato muy malo. Parece así que las cargas positivas en las posiciones 8 y 16 son importantes, confirmando el modelo propuesto por Dutnall *et al.* (1998) [176]. Sin embargo, el péptido monoacetilado en la lisina 5 es un sustrato relativamente bueno para Hat1p que se acetila en la lisina 12, pero el péptido monoacetilado en K12 es un peor sustrato. Conviene en cualquier caso insistir en que estos resultados han sido obtenidos *in vitro* con fragmentos de H4, y en algunos casos sólo con Hat1p recombinante. La acetilación del sustrato no implica necesariamente que la unión sea estable, además *in vivo* es necesaria la presencia de al menos Hat1p/Hat2p para la unión estable de H4 (Figura 40). Como se ha comentado, parece que la unión de H4 al complejo B *in vivo* no es sólo consecuencia del reconocimiento del sustrato por el enzima, sino que parece ser más estable que la mera asociación enzima-sustrato. Resultará interesante en este sentido, conocer que regiones, además del extremo N-terminal de la histona H4, se requieren para la asociación estable de esta histona al complejo HAT-B.

Función del complejo HAT-B

Parece ser que el enzima HAT-B no sólo no es esencial, sino que en su ausencia no hay otro enzima encargado de realizar su misma función (Figura 34). Esto plantea la duda de porqué la célula mantiene este abundante complejo y de porqué se ha conservado evolutivamente, al menos Hat1p y Hat2p. Se ha planteado que no existe un enzima de función redundante con el enzima HAT-B, pero sí podría haber redundancia funcional con su producto, es decir, el estado acetilado de las lisinas 12 y 5 de H4 [196]. En este sentido se conoce la existencia de redundancia funcional entre los extremos N-terminal de las histonas H3 y H4, y entre diversas acetilaciones del extremo N-terminal de H4 y el extremo N-terminal de H3 [196,197]. Sin embargo, la sustitución de las lisinas 12 y 5 por argininas, en combinación con la delección del extremo N-terminal de H3 no genera, en levadura, defectos de crecimiento ni de ensamblaje de cromatina, *in vivo* o *in vitro* [145,146].

Aun así esta marca sobre H4 soluble puede ser importante para su posterior ensamblaje en cromatina, y por tanto puede afectar a la estructura de la cromatina, pero de una forma no detectada hasta ahora. Esto podría explicar por que la delección de los genes del enzima HAT-B, junto con sustituciones de lisinas de H3 por argininas, producen defectos en el silenciamiento telomérico [196] o en la reparación de roturas de doble cadena del DNA [197]. En cualquier caso, células *hat1Δ* o *hat2Δ* son viables y aparentemente sanas, a pesar de que claramente carecen de H4K12acK5ac en la fracción soluble (Figura 37B). Globalmente, todo ello sugiere que si la acetilación de H4K12K5 sirve para señalar la fracción de H4 soluble o facilitando su reconocimiento y unión por chaperonas, o ambas, deben existir otras marcas, generadas por otros complejos, que pudiesen realizar la misma función. Recientemente Ye *et al.* (2005) [248],

han purificado el complejo HAT-B de levadura y han encontrado que la histona H4 asociada está acetilada en la lisina 91. La acetilación de esta lisina no depende de HAT-B. Esta modificación se localiza en el dominio globular, en la interfase entre el tetrámero de H3/H4 y los dímeros H2A/H2B en el nucleosoma, y su sustitución por un residuo no acetilable produce defectos en el ensamblaje y en la estructura de la cromatina que se traducen en un deficiente silenciamiento telomérico. La histona H4 recién sintetizada también se ha encontrado fosforilada en la serina 1 [39,191]. Se desconoce el significado funcional de estas marcas, pero quizás estas marcas generadas por complejos diferentes a HAT-B, pudiesen ser redundantes con la acetilación de las lisinas 12 y 5 dependiente de Hat1p. También es posible que otras modificaciones postraduccionales en la histona H3 pudieran tener una función redundante con la acetilación de H4 en las lisinas 5 y 12. Sin embargo, los resultados mostrados en la Figura 38 indican ciertos niveles de acetilación independientes de Hat1p, en las lisinas 8 y 16 de H4 y 9,14, 23 y 27 de H3, y además en algunos casos los niveles de acetilación son bajos. No parece así existir ningún efecto compensatorio entre distintas acetilaciones en los extremos N-terminales de las histonas H3 y H4 solubles. El tratamiento con HU provoca acumulación de histonas solubles de histonas y por tanto el aumento de la marca de acetilación en todas estas posiciones. Por otro lado, el hecho de que la fracción soluble contenga histonas con diversos residuos modificados sugiere que quizás no sea únicamente histona recién sintetizada la que existe como histona soluble. Una parte de estas histonas solubles son con seguridad moléculas sintetizadas *de novo*, pero otra parte podrían proceder del desensamblaje de la cromatina como consecuencia de procesos como la transcripción, recombinación o reparación del DNA.

Generalmente se ha considerado que el complejo HAT-B juega un papel

en la deposición de la histona H4 durante el ensamblaje de nucleosomas por tres razones: 1) la especificidad del enzima para la acetilación de las lisinas 5 y 12, que coincide con el patrón de acetilación que presentan las histonas recién sintetizadas en diversos organismos; 2) su habilidad para acetilar H4 libre, pero no nucleosomas; y 3) su supuesta localización citoplasmática, que en este trabajo se demuestra que no es del todo correcta. Incluso tras mostrar que Hat1p tiene una localización claramente nuclear, no es razón suficiente para abandonar el concepto de que esta acetilación es importante para la deposición de H4. Tras su síntesis en el citoplasma, H4 es transportada al núcleo principalmente por la carioferina Kap123p [195]. La histona podría ahora ser acetilada por HAT-B en el núcleo previamente a su deposición en nucleosomas. Mosammaparast *et al.* (2002) [195] han purificado Kap123p-PrA de fracciones citosólicas y analizan las proteínas asociadas. Kap123p lleva asociadas las proteínas Hat1, Hat2 y también las histonas H3 y H4 acetiladas. Este resultado, sin embargo, no nos asegura que la histona H4 haya sido acetilada en el citoplasma. Podría suceder, al igual que con el complejo HAT-B, que la fracción citoplasmática contenga Kap123 y las histonas H3 y H4 solubles procedentes del núcleo. En el trabajo aquí realizado, la fracción de H4 acetilada por Hat1p (Figura 34) se obtiene de la lisis de protoplastos en un medio hipotónico. Este extracto posiblemente contiene proteínas solubles tanto del citoplasma como del nucleoplasma, de manera que no se puede asegurar la procedencia de la fracción de H4 acetilada de forma dependiente de Hat1p. Sklenar y Parthun (2004) [187] han identificado tres complejos HAT tipo B de *S. cerevisiae* específicos para H3 (HAT-B3.1, HAT-B3.2 y HAT-B3.3), y los tres se obtienen de fracciones nucleares. A la vista del aumento de datos que indican que los complejos HAT tipo B pueden localizarse en el núcleo, parece que es más correcto clasificar los enzimas HAT en tipo A o tipo B según su capacidad de acetilar o no histonas ensambladas en nucleosomas, y no por su localización

subcelular.

Aunque la función propuesta para el enzima HAT-B es la acetilación de lisinas específicas sobre la H4 recién sintetizada para su posterior ensamblaje en cromatina, también son posibles otros destinos para esta marca de la histona H4 que se encuentra soluble en la célula. Puede ocurrir que el enzima HAT-B no solo participe en el ensamblaje de histonas sintetizadas *de novo* durante la fase S, sino que también podría participar en el ensamblaje de histonas en el DNA en diferentes situaciones en las que tenga lugar un desensamblaje de histonas de la cromatina durante la transcripción o la reparación del DNA. Esta función explicaría porque la célula invierte energía en sintetizar el complejo HAT-B durante todo el ciclo celular, y no sólo durante la fase S (Figura 15A). Se podría pensar que el marcaje de la histona H4 soluble es necesario para que sea reconocida y unida por chaperonas de histonas, ya que la histonas son proteínas muy básicas que si se encontraran libres podrían unirse inespecíficamente a diferentes macromoléculas generando daños internos en la célula, como lo sugiere el hecho de que la acumulación de esta fracción soluble de histona es tóxica para la célula [121]. Se ha descrito que Asf1p está asociada a histonas H3 y H4K12acK5ac formando el complejo RCAF [158], y que CAF-1 contiene asociadas histonas H3 y H4K12acK8acK5ac [141]. Sin embargo, posteriormente se ha encontrado que CAF-1 es capaz de unir *in vitro* histonas H3 y H4 que carecen de su extremo N-terminal [147], aunque no se ha demostrado que esto suceda *in vivo*. Todo ello deja sin explicación porque la delección de Hat1p o Hat2p, y ahora también Hif1p no genera un fenotipo obvio. Glowczewski *et al.* (2004) [148], detectan que Cac1p y Kap123p cooperan en la importación de las moléculas de histona H4 acetiladas apropiadamente, pero de nuevo, en ausencia de los componentes del complejo HAT-B, la histona H4 se incorpora al núcleo y se ensambla en

cromatina de forma aparentemente correcta.

Se ha descrito una ruta dependiente de la proteína quinasa Rad53 que regula los niveles de histona soluble de la célula [121]. Células de levadura *rad53Δsm/1Δ* muestran acumulación de los niveles de histona soluble en la que la histona H4 se encuentra además acetilada en la lisina 12 dependientemente de Hat1p (Figura 39). Es posible que ciertos niveles de histona soluble permanezcan en el nucleoplasma de forma constante, como reserva de histonas para depositar en el DNA en el momento que sea necesario, como al inicio de la replicación, durante la reparación de lesiones del DNA o para reensamblar la cromatina de genes en proceso de transcripción. Si por algún motivo esta fracción de histona soluble se acumula hasta alcanzar niveles superiores a los normales, se activaría la ruta de degradación de histonas dependiente de Rad53p [121,246].

Los experimentos de co-inmunoprecipitación del complejo B indican que la histona H4 soluble forma parte del mismo complejo, pero en ningún caso se ha detectado la presencia de la histona H3 en los inmunoprecipitados del complejo B (Figura 40). Este resultado parece sugerir que el complejo HAT-B debe unir a la histona H4 en un momento muy temprano tras su síntesis, antes de que se ensamble con H3 formando tetrámeros [97,117]. Una búsqueda en bases de datos sobre las interacciones descritas para las proteínas del complejo HAT-B, Hat1p, Hat2p e Hif1p, basadas en técnicas a gran escala [249], revela que estas proteínas interaccionan con la histona H4, pero en ningún caso aparece la histona H3 (http://biodata.mshri.on.ca/yeast_grid/servlet/SearchPage), lo que apoya los datos de la Figura 40 mencionados anteriormente. Sin embargo, Ai y Parthun (2004) [241] han purificado el complejo HAT-B a partir de células que expresan Hat1p-TAP y han identificado, además de las tres proteínas del complejo, la histona H4 y péptidos que corresponden a la histona H3,

aunque en una proporción menor, lo que justifican por un problema de degradación a lo largo del proceso de purificación del enzima B. Los datos obtenidos por Ai y Parthun (2004) [241] son contradictorios con los que se presentan en este trabajo y con los datos obtenidos a gran escala [249], mencionados anteriormente, por lo que será necesario realizar más experimentos que clarifiquen esta cuestión.

Todavía quedan numerosas dudas por resolver en torno al complejo HAT-B: ¿se acetila la histona H4 en el citoplasma o en el núcleo?, ¿cual es la funcionalidad de la acetilación de H4K12K5?, ¿en que procesos interviene Hif1p ensamblando histonas en cromatina?, ¿cuál es la función *in vivo* del enzima HAT-B?, etc.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo se resumen en:

- ✓ La proteína Hif1 es una subunidad del complejo HAT-B de levadura, un enzima previamente descrito por métodos bioquímicos formado por Hat1p como subunidad catalítica, y Hat2p.
- ✓ La delección de los genes del complejo HAT-B no produce defectos de crecimiento de las células incubadas en presencia de diferentes compuestos (metilmetanosulfonato, hidroxiourea, fleomicina, camptotecina, H₂O₂, 4-nitroquinolina n-óxido o rapamicina), o en diferentes condiciones (37°C o irradiación con luz ultravioleta).
- ✓ A diferencia de mutantes *hat2Δ* o *hat1Δhat2Δ*, células *hif1Δ* no presentan una mayor esperanza de vida.
- ✓ Hat2p actúa como puente físico, mediando la interacción entre Hat1p e Hif1p.
- ✓ Las proteínas del complejo HAT-B, Hat1, Hat2 e Hif1, se localizan principalmente en el núcleo de las células de *S. cerevisiae*. La localización nuclear de Hat1p es dependiente de Hat2p, pero no de Hif1p, que se localiza también en el núcleo, de forma independiente a las proteínas Hat1 y Hat2.
- ✓ Hif1p, al igual que Hat1p, participa en el silenciamiento telomérico.
- ✓ El complejo HAT-B acetila *in vivo* una fracción soluble de histona H4 no ensamblada en cromatina, y la acetila en las lisinas 5 y 12.
- ✓ La histona H4 soluble presenta bajos niveles de acetilación en las lisinas 8 y 16 no dependientes de Hat1p. También la histona H3 presenta bajos niveles de acetilación en las posiciones 9, 14, 23 y 27 no dependiente de Hat1p.
- ✓ La fracción de histona H4 soluble acetilada por el complejo HAT-B es

aproximadamente constante durante todo el ciclo celular. Esta fracción únicamente se acumula en células tratadas con HU (un droga que bloquea el ciclo celular en fase S) o con otros agentes que producen daños en el DNA (metilmetanosulfonato, la 4-nitroquinolina n-óxido, la camptotecina, la fleomicina y peróxido de hidrógeno), y en células mutantes *rad53Δ*.

- ✓ La hidroxiaurea produce la acumulación de la fracción de histonas solubles pero no de Hat1p, ni tampoco aumenta la actividad del complejo HAT-B.
- ✓ La proteína Hif1, a diferencia de Hat1p y Hat2p, no participa en la función de acetilación del complejo HAT-B.
- ✓ El complejo HAT-B contiene unida histona H4 acetilada en la lisina 12.
- ✓ Para la unión de la histona H4 es necesaria la presencia simultánea de Hat1p y Hat2p, mientras que Hif1p no es necesaria. El complejo HAT-B únicamente une la histona H4, pero no la H3.
- ✓ El estado de acetilación de la lisina 12 de H4 no afecta a su unión por el complejo HAT-B.

BIBLIOGRAFÍA

1. Widom, J. (1998) Structure, dynamics, and function of chromatin *in vitro*. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 285-327.
2. Hansen, J. C. (2002) Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 361-92.
3. Thatcher, T. H. y Gorovsky, M. A. (1994) Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic. Acids. Res.* **22**, 174-9.
4. Slesarev, A. I., Belova, G. I., Kozyavkin, S. A. y Lake, J. A. (1998) Evidence for an early prokaryotic origin of histones H2A and H4 prior to the emergence of eukaryotes. *Nucleic. Acids. Res.* **26**, 427-30.
5. Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. y Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* **389**, 250-60.
6. Luger, K. y Richmond, T. J. (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 140-6.
7. Zhang, L., Eugeni, E. E., Parthun, M. R. y Freitas, M. A. (2003) Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma* **112**, 77-86.
8. Khochbin, S. (2001) Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* **271**, 01/12/2005.
9. Bustin, M., Catez, F. y Lim, J. (2005) The dynamics of histone H1 function in chromatin. *Mol. Cell.* **17**, 617-20.
10. Freitas, M. A., Sklenar, A. R. y Parthun, M. R. (2004) Application of mass spectrometry to the identification and quantification of histone post-translational modifications. *J. Cell. Biochem.* **92**, 691-700.
11. Rice, J. C. y Allis, C. D. (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **13**, 263-73.
12. Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A. y Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941-53.
13. Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J. y Kouzarides, T. (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**, 545-53.
14. Berger, S. L. (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 142-8.
15. Osley, M. A. (2004) H2B ubiquitylation: the end is in sight. *Biochim. Biophys. Acta.* **1677**, 74-8.
16. Conaway, R. C., Brower, C. S. y Conaway, J. W. (2002) Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**, 1254-8.
17. Nathan, D., Sterner, D. E. y Berger, S. L. (2003) Histone modifications: Now summoing sumoylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13118-20.
18. Adamietz, P. y Rudolph, A. (1984) ADP-ribosylation of nuclear proteins *in vivo*. Identification of histone H2B as a major acceptor for mono- and poly(ADP-ribose) in dimethyl sulfate-treated hepatoma AH 7974 cells. *J. Biol. Chem.* **259**, 6841-6.

19. Liebich, H. M., Gesele, E., Wirth, C., Wöll, J., Jobst, K. y Lakatos, A. (1993) Non-enzymatic glycation of histones. *Biol. Mass. Spectrom.* **22**, 121-3.
20. Hymes, J., Fleischhauer, K. y Wolf, B. (1995) Biotinylation of histones by human serum biotinidase: assessment of biotinyl-transferase activity in sera from normal individuals and children with biotinidase deficiency. *Biochem. Mol. Med.* **56**, 76-83.
21. Wondrak, G. T., Cervantes-Laurean, D., Jacobson, E. L. y Jacobson, M. K. (2000) Histone carbonylation in vivo and in vitro. *Biochem. J.* **351**, 769-77.
22. Murray, K. (1964) The occurrence of epsilon-N-methyl lysine in histones. *Biochemistry.* **127**, 10-5.
23. Zhang, Y. y Reinberg, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes. Dev.* **15**, 2343-60.
24. Nagy, P. L., Griesenbeck, J., Kornberg, R. D. y Cleary, M. L. (2002) A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 90-4.
25. Bernstein, B. E., Humphrey, E. L., Erlich, R. L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J. S., Kouzarides, T. y Schreiber, S. L. (2002) Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8695-700.
26. Mateescu, B., England, P., Halgand, F., Yaniv, M. y Muchardt, C. (2004) Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3. *EMBO Rep.* **5**, 490-6.
27. Wang, H., Huang, Z. Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., Briggs, S. D., Allis, C. D., Wong, J., Tempst, P. y Zhang, Y. (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* **293**, 853-7.
28. Rea, S., Eisenhaber, F., O'carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D. y Jenuwein, T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature.* **406**, 593-9.
29. Kouzarides, T. (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 198-209.
30. Ng, H. H., Ciccone, D. N., Morshead, K. B., Oettinger, M. A. y Struhl, K. (2003) Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1820-5.
31. Schurter, B. T., Koh, S. S., Chen, D., Bunick, G. J., Harp, J. M., Hanson, B. L., Henschen-Edman, A., Mackay, D. R., Stallcup, M. R. y Aswad, D. W. (2001) Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Biochemistry.* **40**, 5747-56.
32. Allis, C. D., Bowen, J. K., Abraham, G. N., Glover, C. V. y Gorovsky, M. A. (1980) Proteolytic processing of histone H3 in chromatin: a physiologically regulated event in *Tetrahymena* micronuclei. *Cell.* **20**, 55-64.
33. Jenuwein, T. y Allis, C. D. (2001) Translating the histone code. *Science.* **293**, 1074-80.
34. Ahmad, K. y Henikoff, S. (2002) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell.* **9**, 1191-200.
35. Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A. y Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* **119**, 941-53.

36. Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J. y Kouzarides, T. (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*. **118**, 545-53.
37. Galasinski, S. C., Louie, D. F., Gloor, K. K., Resing, K. A. y Ahn, N. G (2002) Global regulation of post-translational modifications on core histones. *J. Biol. Chem.* **277**, 2579-88.
38. Peterson, C. L. y Laniel, M. A. (2004) Histones and histone modifications. *Curr. Biol.* **14**, R546-51.
39. Barber, C. M., Turner, F. B., Wang, Y., Hagstrom, K., Taverna, S. D., Mollah, S., Ueberheide, B., Meyer, B. J., Hunt, D. F., Cheung, P. y Allis, C. D. (2004) The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved. *Chromosoma* **112**, 360-71.
40. Lo, W. S., Duggan, L., Emre, N. C., Belotserkovskya, R., Lane, W. S., Shiekhhattar, R. y Berger, S. L. (2001) Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science*. **293**, 1142-6.
41. Shiio, Y. y Eisenman, R. N. (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13225-30.
42. Verger, A. Perdomo, J. y Crossley, M. (2003) Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep.* **4**, 137-42.
43. Turner, B. M. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*. **22**, 836-45.
44. Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. **389**, 349-52.
45. Kurdistani, S. K. y Grunstein, M. (2003) Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 276-84.
46. Roth, S. Y., Denu, J. M. y Allis, C. D. (2001) Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 81-120.
47. Sterner, D. E. y Berger, S. L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 435-59.
48. Carrozza, M. J., Utley, R. T., Workman, J. L. y Côté, J. (2003) The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet.* **19**, 321-9.
49. Marmorstein, R. y Roth, S. Y. (2001) Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 155-61.
50. Sobel, R. E., Cook, R. G., Perry, C. A., Annunziato, A. T. y Allis, C. D. (1995) Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 1237-41.
51. Imhof, A. y Wolffe, A. P. (1999) Purification and properties of the *Xenopus* Hat1 acetyltransferase: association with the 14-3-3 proteins in the oocyte nucleus. *Biochemistry* **38**, 13085-93.
52. Richman, R., Chicoine, L. G., Collini, M. P., Cook, R. G. y Allis, C. D. (1988) Micronuclei and the cytoplasm of growing *Tetrahymena* contain a histone acetylase activity which is highly specific for free histone H4. *J. Cell Biol.* **106**, 1017-26.
53. Annunziato, A. T. y Hansen, J. C. (2000) Role of histone acetylation in the assembly and modulation of chromatin structures. *Gene Expr.* **9**, 37-61.

54. Kuo, M. H., Brownell, J. E., Sobel, R. E., Ranalli, T. A., Cook, R. G., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. y Allis, C. D. (1996) Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* **383**, 269-72.
55. Utley, R. T., Ikeda, K., Grant, P. A., Côté, J., Steger, D. J., Eberharter, A., John, S. y Workman, J. L. (1998) Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* **394**, 498-502.
56. Yamagoe, S., Kanno, T., Kanno, Y., Sasaki, S., Siegel, R. M., Lenardo, M. J., Humphrey, G., Wang, Y., Nakatani, Y., Howard, B. H. y Ozato, K. (2003) Interaction of histone acetylases and deacetylases *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1025-33.
57. Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S. y Matthias, P. (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules *in vivo*. *EMBO J.* **22**, 1168-79.
58. Liu, B., Sutton, A. y Sternglanz, R. (2005) A yeast polyamine acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **280**, 16659-64.
59. Santos-Rosa, H., Valls, E., Kouzarides, T. y Martínez-Balbás, M. (2003) Mechanisms of P/CAF auto-acetylation. *Nucleic. Acids. Res.* **31**, 4285-92.
60. Kouzarides, T. (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* **19**, 1176-9.
61. Hubbert, Ch., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. y Yao, T. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455-8.
62. Lusser, A., Kölle, D. y Loidl, P. (2001) Histone acetylation: lessons from the plant kingdom. *Trends Plant. Sci.* **6**, 59-65.
63. Robyr, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S. K., Wang, A., Suka, N. y Grunstein, M. (2002) Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* **109**, 437-46.
64. Carmen, A. A., Griffin, P. R., Calaycay, J. R., Rundlett, S. E., Suka, Y. y Grunstein, M. (1999) Yeast HOS3 forms a novel trichostatin A-insensitive homodimer with intrinsic histone deacetylase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12356-61.
65. Frye, R. A. (1999) Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 273-9.
66. Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L. y Sternglanz, R. (2000) The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5807-11.
67. Bitterman, K. J., Medvedik, O. y Sinclair, D. A. (2003) Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 376-99.
68. Guarente, L. (2000) Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes. Dev.* **14**, 1021-6.
69. Denu, J. M. (2003) Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD (+)-dependent deacetylases. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 41-8.
70. Lusser, A., Brosch, G., Loidl, A., Haas, H. y Loidl, P. (1997) Identification of maize histone deacetylase HD2 as an acidic nucleolar phosphoprotein. *Science* **277**, 88-91.

71. Wu, K., Tian, L., Malik, K., Brown, D. y Miki, B. (2000) Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **22**, 19-27.
72. Tribus, M. (2005) Functional studies of RpdA and HdaA, two major Histone Deacetylases in *Aspergillus nidulans*. Tesis Doctoral.
73. De Ruijter, A. J. M., Van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. y Van Kuilenburg, A. B. P. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical J.* **370**, 737-49.
74. Sengupta, N. y Seto, E. (2004) Regulation of histone deacetylase activities. *J. Cell. Biochem.* **93**, 57-67.
75. Trojer, P., Brandtner, E. M., Brosch, G., Loidl, P., Galehr, J., Linzmaier, R., Haas, H., Mair, K., Tribus, M. y Graessle, S. (2003) Histone deacetylases in fungi: novel members, new facts. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3971-81.
76. Turner, B. M. (2005) Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 110-2.
77. Strahl, B. D. y Allis, C. D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-5.
78. Zhang, C. L., Mckinsey, T. A. y Olson, E. N. (2002) Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7302-12.
79. Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D. y Grewal, S. I. (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* **292**, 110-3.
80. Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P. y Zhang, Y. (2001) Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol. Cell.* **8**, 1207-17.
81. Marmorstein, R. (2001) Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 422-32.
82. De La Cruz, X., Lois, S., Sánchez-Molina, S. y Martínez-Balbás, M. A. (2005) Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* **27**, 164-75.
83. Boix, M. (2003) Canvis epigenètics de la cromatina associats al programa de mort cel.lular. Tesis doctoral.
84. Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S. y Tjian, R. (2000) Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* **288**, 1422-5.
85. Bender, J. (2004) DNA methylation and epigenetics. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **55**, 41-68.
86. Goll y Bestor (2005) Eukaryotic Cytosine Methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*
87. Okuwaki, M. y Verreault, A. (2004) Maintenance DNA methylation of nucleosome core particles. *J. Biol. Chem.* **279**, 2904-12.
88. Okano, M., Xie, S. y Li, E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* **19**, 219-20.
89. Becker, P. B. y Hörz, W. (2002) ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 247-73.

90. Lusser, A. y Kadonaga, J. T. (2003) Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* **25**, 1192-200.
91. Aasland, R., Stewart, A. F. y Gibson, T. (1996) The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 87-8.
92. Phelan, M. L., Sif, S., Narlikar, G. J. y Kingston, R. E. (1999) Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol. Cell.* **3**, 247-53.
93. Xiao, H., Sandaltzopoulos, R., Wang, H. M., Hamiche, A., Ranallo, R., Lee, K. M., Fu, D. y Wu, C. (2001) Dual functions of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions. *Mol. Cell.* **8**, 531-43.
94. Hereford, L. M., Osley, M. A., Ludwig, T. R. y Mclaughlin, C. S. (1981) Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA. *Cell* **24**, 367-75.
95. Malik, H. S. y Henikoff, S. (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 882-91.
96. Kamakaka, R. T. y Biggins, S. (2005) Histone variants: deviants? *Genes. Dev.* **19**, 295-310.
97. Henikoff, S; Furuyama, T; Ahmad, K. (2004) Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet.* **20**, 320-6.
98. Smith, M M. (2002) Histone variants and nucleosome deposition pathways. *Mol. Cell.* **9**, 1158-60.
99. Krude, T. (2002) Chromatin assembly: the kinetochore connection. *Curr. Biol.* **12**, R256-8.
100. Yoda, K., Ando, S., Morishita, S., Houmura, K., Hashimoto, K., Takeyasu, K. y Okazaki, T. (2000) Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7266-71.
101. Meluh, P. B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D. y Smith, M M. (1998) Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **94**, 607-13.
102. Van Hooser, A. A., Ouspenski, I. I., Gregson, H. C., Starr, D. A., Yen, T. J., Goldberg, M. L., Yokomori, K., Earnshaw, W. C., Sullivan, K. F. y Brinkley, B. R. (2001) Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J. Cell Sci.* **114**, 3529-42.
103. Shelby, R. D., Monier, K. y Sullivan, K. F. (2000) Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. *J. Cell Biol.* **151**, 1113-8.
104. Hsu, J., Huang, J., Meluh, P.B. y Laurent, B. C. (2003) The yeast RSC chromatin-remodeling complex is required for kinetochore function in chromosome segregation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3202-15.
105. Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. y Nakatani, Y. (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**, 51-61.
106. Dhillon, N. y Kamakaka, R. T. (2000) A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. *Mol. Cell.* **6**, 769-80.
107. Meneghini, M. D., Wu, M. y Madhani, H. D. (2003) Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* **112**, 725-36.

108. Van Leeuwen, F. y Gottschling, D. E. (2003) The histone minority report: the variant shall not be silenced. *Cell* **112**, 591-3.
109. Costanzi, C. y Pehrson, J. R. (1998) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**, 599-601.
110. Chadwick, B. P. y Willard, H. F. (2001) A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J. Cell Biol.* **152**, 375-84.
111. Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M. y Bonner, W. M. (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* **10**, 886-95.
112. Buttinelli, M., Panetta, G., Rhodes, D. y Travers, A. (1999) The role of histone H1 in chromatin condensation and transcriptional repression. *Genetica* **106**, 117-24.
113. Buttinelli, M., Panetta, G., Rhodes, D. y Travers, A. (1999) The role of histone H1 in chromatin condensation and transcriptional repression. *Genetica* **106**, 117-24.
114. Downs, J. A., Lowndes, N. F. y Jackson, S. P. (2000) A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* **408**, 1001-4.
115. Cosgrove, M. S., Boeke, J. D. y Wolberger, C. (2004) Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1037-43.
116. Krude, T. (1999) Chromatin assembly during DNA replication in somatic cells. *Eur. J. Biochem.* **263**, 1-5.
117. Yamasu, K. y Senshu, T. (1990) Conservative segregation of tetrameric units of H3 and H4 histones during nucleosome replication. *J. Biochem. (Tokyo)* **107**, 15-20.
118. Yamasu, K. y Senshu, T. (1993) Conservation of the dimeric unit of H2A and H2B histones during the replication cycle. *Exp. Cell Res.* **207**, 226-9.
119. Osley, M. A. (1991) The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 827-61.
120. Lycan, D. E., Osley, M. A. y Hereford, L. M. (1987) Role of transcriptional and posttranscriptional regulation in expression of histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 614-21.
121. Gunjan, A. y Verreault, A. (2003) A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*. *Cell* **115**, 537-49.
122. Polo, S. E. y Almouzni, G. (2005) Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. *Cancer Lett.* **220**, 1-9.
123. Quivy, J. P. y Almouzni, G. (2003) Rad53: a controller ensuring the fine-tuning of histone levels. *Cell* **115**, 508-10.
124. Loyola, A. y Almouzni, G. (2004) Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim. Biophys. Acta.* **1677**, 3-11.
125. Philpott, A., Krude, T. y Laskey, R. A. (2000) Nuclear chaperones. *Semin Cell Dev Biol* **11**
126. Mello, J. A. y Almouzni, G. (2001) The ins and outs of nucleosome assembly. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 136-41.

127. Kleinschmidt, J. A., Seiter, A. y Zentgraf, H. (1990) Nucleosome assembly in vitro: separate histone transfer and synergistic interaction of native histone complexes purified from nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J.* **9**, 1309-18.
128. Akey, C. W. y Luger, K. (2003) Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 1-6.
129. Philpott, A. y Leno, G. H. (1992) Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Cell* **69**, 759-67.
130. Chang, L., Loranger, S. S., Mizzen, C., Ernst, S. G., Allis, C. D. y Annunziato, A. T. (1997) Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry* **36**, 469-80.
131. Mosammamarast, N., Jackson, K. R., Guo, Y., Brame, C. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. y Pemberton, L. F. (2001) Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J. Cell Biol.* **153**, 250-62.
132. Mosammamarast, N., Ewart, C. S. y Pemberton, L. F. (2002) A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *EMBO J.* **21**, 6527-38.
133. Tyler, J. K. (2002) Chromatin assembly. Cooperation between histone chaperones and ATP-dependent nucleosome remodeling machines. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2268-74.
134. Kellogg, D. R. y Murray, A. W. (1995) NAP1 acts with Clb1 to perform mitotic functions and to suppress polar bud growth in budding yeast. *J. Cell Biol.* **130**, 675-85.
135. Rogner, U. C., Spyropoulos, D. D., Le Novère, N., Changeux, J. P. y Avner, P. (2000) Control of neurulation by the nucleosome assembly protein-1-like 2. *Nat. Genet.* **25**, 431-5.
136. Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R. y Kadonaga, J. T. (1996) *Drosophila* NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3112-24.
137. Rodriguez, P., Munroe, D., Prawitt, D., Chu, L. L., Bric, E., Kim, J., Reid, L. H., Davies, C., Nakagama, H., Loeber, R., Winterpacht, A., Petrucci, M. J., Higgins, M. J., Nowak, N., Evans, G., Shows, T., Weissman, B. E., Zabel, B., Housman, D. E. y Pelletier, J. (1997) Functional characterization of human nucleosome assembly protein-2 (NAP1L4) suggests a role as a histone chaperone. *Genomics* **44**, 253-65.
138. Qian, Y. W., Wang, Y. C., Hollingsworth, R. E., Jones, D., Ling, N. y Lee, E. Y. (1993) A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast. *Nature* **364**, 648-52.
139. Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R. y Stillman, B. (1998) Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr. Biol.* **8**, 96-108.
140. Smith, S. y Stillman, B. (1989) Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *Cell* **58**, 15-25.
141. Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Kessler, N. y Stillman, B. (1995) The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell* **81**, 1105-14.
142. Shibahara, K. y Stillman, B. (1999) Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* **96**, 575-85.
143. Moggs, J. G., Grandi, P., Quivy, J. P., Jónsson, Z. O., Hübscher, U., Becker, P. B. y Almouzni,

- G. (2000) A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1206-18.
144. Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R. y Stillman, B. (1996) Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* **87**, 95-104.
145. Ma, X. J., Wu, J., Altheim, B. A., Schultz, M. C. y Grunstein, M. (1998) Deposition-related sites K5/K12 in histone H4 are not required for nucleosome deposition in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6693-8.
146. Ling, X., Harkness, T. A., Schultz, M. C., Fisher-Adams, G. y Grunstein, M. (1996) Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes. Dev.* **10**, 686-99.
147. Shibahara, K., Verreault, A. y Stillman, B. (2000) The N-terminal domains of histones H3 and H4 are not necessary for chromatin assembly factor-1- mediated nucleosome assembly onto replicated DNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 7766-71.
148. Glowczewski, L., Waterborg, J. H. y Berman, J. G. (2004) Yeast chromatin assembly complex 1 protein excludes nonacetylatable forms of histone H4 from chromatin and the nucleus. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10180-92.
149. Meijnsing, S. H. y Ehrenhofer-Murray, A. E. (2001) The silencing complex SAS-I links histone acetylation to the assembly of repressed chromatin by CAF-I and Asf1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes. Dev.* **15**, 3169-82.
150. Kaufman, P. D., Kobayashi, R. y Stillman, B. (1997) Ultraviolet radiation sensitivity and reduction of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking chromatin assembly factor-I. *Genes. Dev.* **11**, 345-57.
151. Enomoto, S. y Berman, J. (1998) Chromatin assembly factor I contributes to the maintenance, but not the re-establishment, of silencing at the yeast silent mating loci. *Genes. Dev.* **12**, 219-32.
152. Recht, J., Dunn, B., Raff, A. y Osley, M. A. (1996) Functional analysis of histones H2A and H2B in transcriptional repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2545-53.
153. Sharp, J. A., Franco, A. A., Osley, M. A. y Kaufman, P. D. (2002) Chromatin assembly factor I and Hir proteins contribute to building functional kinetochores in *S. cerevisiae*. *Genes. Dev.* **16**, 85-100.
154. Kaufman, P. D., Cohen, J. L. y Osley, M. A. (1998) Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chromatin assembly factor I. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4793-806.
155. Ray-Gallet, D., Quivy, J. P., Scamps, C., Martini, E. M. D., Lipinski, M. y Almouzni, G. (2002) HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol. Cell.* **9**, 1091-100.
156. Formosa, T., Ruone, S., Adams, M. D., Olsen, A. E., Eriksson, P., Yu, Y., Rhoades, A. R., Kaufman, P. D. y Stillman, D. J. (2002) Defects in SPT16 or POB3 (yFACT) in *Saccharomyces cerevisiae* cause dependence on the Hir/Hpc pathway: polymerase passage may degrade chromatin structure. *Genetics* **162**, 1557-71.
157. Svejstrup, J. Q. (2003) Transcription. Histones face the FACT. *Science* **301**, 1053-5.

158. Tyler, J. K., Adams, C. R., Chen, S. R., Kobayashi, R., Kamakaka, R. T. y Kadonaga, J. T. (1999) The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature* **402**, 555-60.
159. Le, S., Davis, C., Konopka, J. B. y Sternglanz, R. (1997) Two new S-phase-specific genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1029-42.
160. Tyler, J. K., Collins, K. A., Prasad-Sinha, J., Amiot, E., Bulger, M., Harte, P. J., Kobayashi, R. y Kadonaga, J. T. (2001) Interaction between the Drosophila CAF-1 and ASF1 chromatin assembly factors. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6574-84.
161. Mello, J. A., Silljé, H. H. W., Roche, D. M. J., Kirschner, D. B., Nigg, E. A. y Almouzni, G. (2002) Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO Rep.* **3**, 329-34.
162. Krawitz, D. C., Kama, T. y Kaufman, P. D. (2002) Chromatin assembly factor I mutants defective for PCNA binding require Asf1/Hir proteins for silencing. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 614-25.
163. Sharp, J. A., Fouts, E. T., Krawitz, D. C. y Kaufman, P. D. (2001) Yeast histone deposition protein Asf1p requires Hir proteins and PCNA for heterochromatic silencing. *Curr. Biol.* **11**, 463-73.
164. Adkins, M. W., Howar, S. R. y Tyler, J. K. (2004) Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Mol. Cell.* **14**, 657-66.
165. Lusser, A., Urwin, D. L. y Kadonaga, J. T. (2005) Distinct activities of CHD1 and ACF in ATP-dependent chromatin assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 160-6.
166. Zhou, B. B. y Elledge, S. J. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-9.
167. Paulovich, A. G., Margulies, R. U., Garvik, B. M. y Hartwell, L. H. (1997) RAD9, RAD17, and RAD24 are required for S phase regulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Genetics* **145**, 45-62.
168. Tercero, J. A., Longhese, M. P. y Diffley, J. F. X. (2003) A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol. Cell.* **11**, 1323-36.
169. Sidorova, J. M. y Breeden, L. L. (1997) Rad53-dependent phosphorylation of Swi6 and down-regulation of CLN1 and CLN2 transcription occur in response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes. Dev.* **11**, 3032-45.
170. Zhao, X. y Rothstein, R. (2002) The Dun1 checkpoint kinase phosphorylates and regulates the ribonucleotide reductase inhibitor Sml1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 3746-51.
171. Elledge, S. J., Zhou, Z. y Allen, J. B. (1992) Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 119-23.
172. Zhao, X., Muller, E. G. y Rothstein, R. (1998) A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol. Cell.* **2**, 329-40.
173. Chabes, A., Domkin, V. y Thelander, L. (1999) Yeast Sml1, a protein inhibitor of ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **274**, 36679-83.
174. Kleff, S., Andrulis, E. D., Anderson, C. W. y Sternglanz, R. (1995) Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **270**, 24674-7.

175. Parthun, M. R., Widom, J. y Gottschling, D. E. (1996) The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **87**, 85-94.
176. Dutnall, R. N., Tafrov, S. T., Sternglanz, R. y Ramakrishnan, V. (1998) Structure of the histone acetyltransferase Hat1: a paradigm for the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily. *Cell* **94**, 427-38.
177. Georgakopoulos, T. y Thireos, G. (1992) Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J.* **11**, 4145-52.
178. Brownell, J. E. y Allis, C. D. (1995) An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6364-8.
179. Rodríguez-Navarro, S., Fischer, T., Luo, M., Antúnez, O., Brettschneider, S., Lechner, J., Pérez-Ortín, J. E., Reed, R. y Hurt, E. (2004) Sus1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and the nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* **116**, 75-86.
180. Sutton, A., Shia, W., Band, D., Kaufman, P. D., Osada, S., Workman, J. L. y Sternglanz, R. (2003) Sas4 and Sas5 are required for the histone acetyltransferase activity of Sas2 in the SAS complex. *J. Biol. Chem.* **278**, 16887-92.
181. Shia, W., Osada, S., Florens, L., Swanson, S. K., Washburn, M. P. y Workman, J. L. (2005) Characterization of the yeast trimeric-SAS acetyltransferase complex. *J. Biol. Chem.* **280**, 11987-94.
182. Osada, S., Sutton, A., Muster, N., Brown, C. E., Yates, J. R., Sternglanz, R. y Workman, J. L. (2001) The yeast SAS (something about silencing) protein complex contains a MYST-type putative acetyltransferase and functions with chromatin assembly factor ASF1. *Genes. Dev.* **15**, 3155-68.
183. Clarke, A. S., Lowell, J. E., Jacobson, S. J. y Pillus, L. (1999) Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2505-26.
184. Ruiz-García, A. B. (1999). Caracterización de complejos enzimáticos histona acetiltransferasa en *Saccharomyces cerevisiae* mediante el uso de mutantes en genes implicados en la acetilación de histonas. Tesis doctoral.
185. López-Rodas, G., Tordera, V., Sánchez Del Pino, M. M. y Franco, L. (1989) Yeast contains multiple forms of histone acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **264**, 19028-33.
186. López-Rodas, G., Tordera, V., Sánchez Del Pino, M. M. y Franco, L. (1991) Subcellular localization and nucleosome specificity of yeast histone acetyltransferases. *Biochemistry* **30**, 3728-32.
187. Sklenar, A. R. y Parthun, M. R. (2004) Characterization of yeast histone H3-specific type B histone acetyltransferases identifies an ADA2-independent Gcn5p activity. *BMC Biochem* **5**, 11.
188. Lusser, A., Eberharter, A., Loidl, A., Goralik-Schramel, M., Horngacher, M., Haas, H. y Loidl, P. (1999) Analysis of the histone acetyltransferase B complex of maize embryos. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4427-35.
189. Ruiz-García, A. B., Sendra, R., Galiana, M., Pamblanco, M., Pérez-Ortín, J. E. y Tordera, V. (1998) HAT1 and HAT2 proteins are components of a yeast nuclear histone acetyltransferase enzyme specific for free histone H4. *J. Biol. Chem.* **273**, 12599-605.

190. Kölle, D., Sarg, B., Lindner, H. y Loidl, P. (1998) Substrate and sequential site specificity of cytoplasmic histone acetyltransferases of maize and rat liver. *FEBS lett.* **421**, 109-14.
191. Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L. J. y Allfrey, V. G. (1975) Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* **190**, 117-28.
192. Jackson, V., Shires, A., Tanphaichitr, N. y Chalkley, R. (1976) Modifications to histones immediately after synthesis. *J. Mol. Biol.* **104**, 471-83.
193. Annunziato, A. T. y Seale, R. L. (1983) Histone deacetylation is required for the maturation of newly replicated chromatin. *J. Biol. Chem.* **258**, 12675-84.
194. Jackson, V., Granner, D. K. y Chalkley, R. (1976) Deposition of histone onto the replicating chromosome: newly synthesized histone is not found near the replication fork. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 2266-9.
195. Mosammaparast, N., Guo, Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. y Pemberton, L. F. (2002) Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast. *J. Biol. Chem.* **277**, 862-8.
196. Kelly, T. J., Qin, S., Gottschling, D. E. y Parthun, M. R. (2000) Type B histone acetyltransferase Hat1p participates in telomeric silencing. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7051-8.
197. Qin, S. y Parthun, M. R. (2002) Histone H3 and the histone acetyltransferase Hat1p contribute to DNA double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8353-65.
198. Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. y Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793-808.
199. Goldstein, A. L. y Mccusker, J. H. (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 1541-53.
200. Longtine, M. S., Mckenzie, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. y Pringle, J. R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953-61.
201. Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. y Schiebel, E. (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**, 963-72.
202. Guthrie, C. y Fink, G. R. (2000) Guide to yeast genetics and molecular and cell biology. *Methods enzymol.*
203. Kennedy, B. K., Austriaco, N. R., Zhang, J. y Guarente, L. (1995) Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell* **80**, 485-96.
204. Kim, S., Benguria, A., Lai, C. Y. y Jazwinski, S. M. (1999) Modulation of life-span by histone deacetylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 3125-36.
205. Queralt, E. y Igual, J. C. (2003) Cell cycle activation of the Swi6p transcription factor is linked to nucleocytoplasmic shuttling. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3126-40.
206. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
207. Thiriet, C. y Albert, P. (1995) Rapid and effective western blotting of histones from acid-urea-Triton and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels: two different approaches depending on the subsequent qualitative or quantitative analysis. *Electrophoresis* **16**, 357-61.

208. Pamblanco, M., Poveda, A., Sendra, R., Rodríguez-Navarro, S., Pérez-Ortín, J. E. y Tordera, V. (2001) Bromodomain factor 1 (Bdf1) protein interacts with histones. *FEBS Lett.* **496**, 31-35.
209. Ruiz-García, A. B., Sendra, R., Pamblanco, M. y Tordera, V. (1997) Gcn5p is involved in the acetylation of histone H3 in nucleosomes. *FEBS Lett.* **403**, 186-90.
210. Van Leeuwen, F. y Gottschling, D. E. (2002) Assays for gene silencing in yeast. *Methods Enzymol.* **350**, 165-86.
211. Gottschling, D. E. y Aparicio, O. M., Billington, B. L.M. y Zakian, V. A. (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**, 751-62.
212. Grunstein, M. (1998) Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell* **93**, 325-8.
213. Rine, J. y Herskowitz, I. (1987) Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **116**, 01/09/2022.
214. Jackson, V., Granner, D. K. y Chalkley, R. (1975) Deposition of histones onto replicating chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 4440-4.
215. Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B. M. y Grunstein, M. (1996) HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14503-8.
216. Vogelaer, M., Wu, J., Suka, N. y Grunstein, M. (2000) Global histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature* **408**, 495-8.
217. Bernstein, B. E., Tong, J. K. y Schreiber, S. L. (2000) Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13708-13.
218. Gruss, C., Wu, J., Koller, T. y Sogo, J. M. (1993) Disruption of the nucleosomes at the replication fork. *EMBO J.* **12**, 4533-45.
219. Cusick, M. E., Depamphilis, M. L. y Wassarman, P. M. (1984) Dispersive segregation of nucleosomes during replication of simian virus 40 chromosomes. *J. Mol. Biol.* **178**, 249-71.
220. Sogo, J. M., Stahl, H., Koller, T. y Knippers, R. (1986) Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures. *J. Mol. Biol.* **189**, 189-204.
221. Verreault, A. (2000) De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* **14**, 1430-8.
222. Krude, T. y Keller, C. (2001) Chromatin assembly during S phase: contributions from histone deposition, DNA replication and the cell division cycle. *Cellular And Molecular Life Science* **58**, 665-72.
223. Krude, T. (1995) Chromatin. Nucleosome assembly during DNA replication. *Curr. Biol.* **5**, 1232-4.
224. Wu, R. S. y Bonner, W. M. (1981) Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* **27**, 321-30.
225. Brownell, J. E. y Allis, C. D. (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 176-84.
226. Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P.

- O., Botstein, D. y Futcher, B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 3273-97.
227. Herman, P. K. (2002) Stationary phase in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 602-7.
228. Perry, C. A., Allis, C. D. y Annunziato, A. T. (1993) Parental nucleosomes segregated to newly replicated chromatin are underacetylated relative to those assembled de novo. *Biochemistry* **32**, 13615-23.
229. Samson, F., Donoso, J. A., Heller-Bettinger, I., Watson, D. y Himes, R. H. (1979) Nocodazole action on tubulin assembly, axonal ultrastructure and fast axoplasmic transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **208**, 411-7.
230. Crespo, J. L. y Hall, M. N. (2002) Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 579-91.
231. Schmelzle, T. y Hall, M. N. (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**, 253-62.
232. Cardenal, F., Domine, M., Massutí, B., Carrato, A., Felip, E., Garrido, P., Juan, O., Artal, A., Barneto, I., López-Vivanco, G., Balcells, M. y Rosell, R. (2003) Three-week schedule of irinotecan and cisplatin in advanced non-small cell lung cancer: a multicentre phase II study. *Lung Cancer* **39**, 201-7.
233. Young, I. S. y Woodside, J. V. (2001) Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* **54**, 176-86.
234. Sinha, R. y Rothman, N. (1999) Role of well-done, grilled red meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. *Cancer Lett.* **143**, 189-94.
235. Louters, L. y Chalkley, R. (1985) Exchange of histones H1, H2A, and H2B *in vivo*. *Biochemistry* **24**, 3080-5.
236. Bonner, W. M., Wu, R. S., Panusz, H. T. y Muneses, C. (1988) Kinetics of accumulation and depletion of soluble newly synthesized histone in the reciprocal regulation of histone and DNA synthesis. *Biochemistry* **27**, 6542-50.
237. Santocanale, C. y Diffley, J. F. (1998) A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* **395**, 615-8.
238. Tercero, J. A. y Diffley, J. F. (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* **412**, 553-7.
239. Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L. y Rothstein, R. (2001) The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO J.* **20**, 3544-53.
240. Sterner, D. E., Grant, P. A., Roberts, S. M., Duggan, L. J., Belotserkovskaya, R., Pacella, L. A., Winston, F., Workman, J. L. y Berger, S. L. (1999) Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 86-98.
241. Ai, X. y Parthun, M. R. (2004) The nuclear Hat1p/Hat2p complex: a molecular link between type B histone acetyltransferases and chromatin assembly. *Mol. Cell.* **14**, 195-205.
242. Servant, F., Bru, C., Carrère, S., Courcelle, E., Gouzy, J., Peyruc, D. y Kahn, D. (2002) ProDom: automated clustering of homologous domains. *Brief. Bioinform.* **3**, 246-51.

-
243. López-Rodas, G., Georgieva, E. I., Sendra, R. y Loidl, P. (1991) Histone acetylation in *Zea mays*.I. Activities of histone acetyltransferases and histone deacetylases. *J. Biol. Chem.* **266**, 18745-50.
244. Lehman, I. R. y Kaguni, L. S. (1989) DNA polymerase alpha. *J. Biol. Chem.* **264**, 4265-8.
245. Sobel, R. E., Cook, R. G. y Allis, C. D. (1994) Non-random acetylation of histone H4 by a cytoplasmic histone acetyltransferase as determined by novel methodology. *J. Biol. Chem.* **269**, 18576-82.
246. Koç, A., Wheeler, L. J., Mathews, C. K. y Merrill, G. F. (2004) Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J. Biol. Chem.* **279**, 223-30.
247. Makowski, A. M., Dutnall, R. N. y Annunziato, A. T. (2001) Effects of acetylation of histone H4 at lysines 8 and 16 on activity of the Hat1 histone acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **276**, 43499-502.
248. Ye, J., Ai, X., Eugeni, E. E., Zhang, L., Carpenter, L. R., Jelinek, M. A., Freitas, M. A. y Parthun, M. R. (2005) Histone H4 lysine 91 acetylation a core domain modification associated with chromatin assembly. *Mol. Cell.* **18**, 123-30.
249. Gavin, A., Böschke, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A., Cruciat, C., Remor, M., Höfert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M., Copley, R. R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. y Superti-Furga, G. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-7.
250. Rosaleny L. E., Antúnez O., Ruiz-García A. B., Pérez-Ortín J. E. y Tordera V. (2005). Yeast HAT1 and HAT2 deletions have different life-span and transcriptome phenotypes. *FEBS Lett.* **579** (19), 4063-8.
251. Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. y Nei, M. (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics.* **12**, 1244-5.
252. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.
253. Nicholas, K. B. y Nicholas H. B. Jr. (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.