



Regulació de l'heterocromatina constitutiva en condicions normals i d'estrès: Paper de SirT1 i d'HP1

Helena Raurell Vila

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

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

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

Regulació de l'heterocromatina constitutiva en condicions normals i d'estrès:

Paper de SirT1 i d'HP1

Tesi Doctoral

Helena Raurell Vila

Universitat de Barcelona
Programa de Doctorat de Biomedicina

Regulació de l'heterocromatina constitutiva en condicions normals i d'estrès:

Paper de SirT1 i d'HP1

Memòria presentada per l'Helena Raurell Vila per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Aquest treball ha estat realitzat sota la supervisió del Dr. Alejandro Vaquero en el grup de Biologia de la Cromatina, dins del Programa d'Epigenètica i Biologia del Càncer (PEBC) de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL)



Dr. Alejandro Vaquero

Director



Dr. Oriol Bachs

Tutor



Helena Raurell

Doctoranda

Hospitalet de Llobregat (Barcelona), 2014

*Als meus pares i
a la meva germana,*

i al meu tiet

*La recerca és una ajuda al món,
entre moltes d'altres,
per fer la vida una mica més justa.*

AGRAÏMENTS

Primer de tot, agrair a l'Àlex per confiar amb mi i donar-me aquesta oportunitat per dedicar-me en el que volia ja des de petita, investigar. També per transmetre la passió per la ciència i dedicació. A la Laia, per la gran paciència que ha tingut amb mi ajudant-me sempre en tot des del primer dia, per tirar endavant i a resoldre, amb tota l'energia i de la millor manera, tota la feina del laboratori, experiments, seminaris...i les diferents situacions que et presenta la vida. T'estic molt agraïda, ha sigut un plaer compartir el dia a dia de la feina al laboratori. També a la Irene per ser al meu costat, o més ben dit, darrera, esquena per esquena treballant en el laboratori tots aquests anys compartint les nostres preocupacions de començar una tesi, desenvolupar-la i intentar-la acabar. Crec que durant tot aquest temps ha anat apareixent una gran amistat degut a la similitud de la manera de ser de les dues, gràcies per tot. A la Paloma, la veïna de davant, durant més de 5 anys. Amb tu he compartit principalment les últimes hores de la majoria de tots aquests dies al laboratori, passant dies bons i dies dolents, hem anat tirant arribant a l'últim tram d'aquesta etapa. A l'Anna, per compartir també tota aquesta etapa des del primer dia que vaig arribar. M'has ajudat i aconsellat per començar una tesi i a tirar endavant al laboratori i a la vida, gràcies pel teu suport. A en Màx que tot i estar més desconnectat, sempre m'ha cuidat amb els seus petits detalls. Núria, tot i no començar juntes és com si haguessim fet tota la tesi juntes, gràcies per la confiança i els moments compartits. Nico, hem coincidit a la meua part final però ha sigut un plaer, gràcies per aportar bon rotllo i serenitat. George, també hem coincidit poc al laboratori però també hem compartit algunes avaries de renfe. I a la Carme per voler compartir el nostre projecte i ajudar-nos amb qualsevol experiment que se'ns passés pel cap amb una gran il·lusió. Gràcies per fer sentir bé a la gent.

També agrair al grup "fanta limón" pel suport, per compartir les nostres històries i problemes a la feina, però també altres moments de diversió tan importants per tirar endavant i fer que la vida valgui la pena. Moltes gràcies: Ester, Lúdia, Amy, Núria, Vicky i especialment a en Pol perquè

m'ha ajudat als moments més complicats de la tesi amb el lema "Tu pots". Moltes gràcies pel teu suport incondicional i per totes les hores dedicades a ajudar-me a tirar la tesi endavant.

Un altre suport molt gran ha sigut el de la Lídia, gran amiga, companya de pis, i compinxer de tesi durant tota aquesta etapa. Has estat en tot moment al meu costat, en qualsevol de les situacions que ens ha portat la vida i a través de les xerrades d'hores i hores els problemes es minimitzaven i les coses bones eren millors, moltes gràcies. I a en Borja, compartint l'última etapa d'aquest procés com a company de pis i amic, també ha sigut un gran recolzament en tot.

Un altre gran pilar, en aquesta etapa especialment, però que ho són des de quasi tota la vida són les meves amigues de Calella. Neus, moltes moltes gràcies per escoltar-me, animar-me, entendre'm i aconsellar-me en tot moment però més en moments de baixon els quals s'agraeix moltíssim i per estar sempre al meu costat en moments complicats de la vida. I també a l'Arnau, per escoltar-me i compartir sensacions, dubtes, estrès degut al fet d'estar els dos fent una tesi. Natàlia, també has compartit amb mi tots aquests anys de la tesi, sobretot aquest últim període en el qual hem estat preparant, una el començament i l'altre el final, d'una etapa molt important de les nostres vides, gràcies. Sònia, gràcies també per escoltar totes les meves paranoies però també les alegries i donar-me suport durant tots aquests anys. I a totes tres pels bons moments: sortides, sopars i algun ball! Sé que per molt temps que passi estareu allà.

També vull donar les gràcies a alguns noiets que han format part d'aquesta etapa de la meua vida i espero que en segueixin formant part: Polls, Vailet i Jubany. Hem compartit molts moments de diversió i festa però quan us he necessitat per algun mal moment m'heu escoltat i m'heu fet costat. Gràcies.

Els agraïments especials d'aquesta tesi són pels meus pares, al meu pare per escoltar-me sempre, aconsellar-me, entendre'm i ajudar-me totes les hores que fessin falta per fer la feina ben feta i a tirar endavant, a la meua mare per ajudar-me en tot i més, per tal de que jo em pogués dedicar única i

exclusivament a fer la meva feina sense haver-me de preocupar per res més, i als dos per suportar-me sobretot a la pitjor etapa de la tesi, moltes moltes gràcies; i per la meva germana per estar sempre allà per tot, fins i tot escoltant-me quan li explicava l'article. Sempre he comptat amb tu i m'has ajudat en qualsevol cosa, moltes gràcies per la teva predisposició. Sense vosaltres no ho hagués pogut aconseguir i no seria qui sóc. També a l'Eric per escoltar els assajos dels seminaris però sobretot en aquesta última etapa per aguantar, cada cap de setmana que venieu a casa, sentir parlar de la tesi; i a tota la meva família: tiets, oncles, cosins, cosinetes: Marina, per interessar-vos per la meva feina i de com em va tot, i estar al meu costat sabent que puc comptar amb vosaltres. Moltes gràcies, sou la millor família, US ESTIMO MOLT!

ÍNDEX

ABREVIACIONS	I
INTRODUCCIÓ	1
LA CROMATINA	3
Composició de la cromatina	3
Modificacions postraduccionals	4
Maquinària de remodelació de la cromatina	5
Enzims relacionats amb la cromatina	7
HATs i HDACs.....	7
HATs.....	7
HDACs.....	8
HDACs de classe I, II i IV	9
HDACs de classe III: les sirtuïnes	9
Localització de les sirtuïnes	11
Substrats de les sirtuïnes	13
Funcions de les sirtuïnes.....	13
HMTs, HDMTs.....	14
HMTs	14
HDMs.....	17
Relació entre les HDACs i les HMTs.....	18
ESTRUCTURA DE LA CROMATINA	18
Organització de la cromatina	18
Comparació entre l'heterocromatina i l'eucromatina	20
Comparació entre l'heterocromatina facultativa i l'heterocromatina constitutiva	21
Heterocromatina facultativa.....	22
Heterocromatina constitutiva.....	22
FACTORS CLAU A L'ESTRUCTURA DE L'HETEROCROMATINA: SUV39H1	25
Origen i estructura de Suv39h1	25

Regulació de Suv39h1	26
Funcions de Suv39h1	26
UNA DE LES PRINCIPALS PROTEÏNES IMPLICADES EN L'ESTRUCTURA DE L'HETEROCROMATINA: HP1.....	29
Estructura d'HP1 i isoformes	29
Modificacions postraduccional a les isoformes d'HP1	32
Substrats d'HP1 α , HP1 β i HP1 γ	33
Localització de les isoformes d'HP1	35
Funcions i implicacions d'HP1	37
FORMACIÓ D'HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA: SUV39H1 I HP1..	39
Localització “de novo” d'HP1 a l'HC per la seva formació	41
HC a la replicació de l'ADN	42
MANTENIMENT DE L'ESTABILITAT GENÒMICA SOTA CONDICIONS D'ESTRÈS: PAPER DE SIRT1.....	43
Descripció i estructura de SirT1	44
Regulació de SirT1	44
Funcions en les que està involucrada SirT1 i les altres sirtuïnes	45
Funció de SirT1 en la formació d'HF.....	46
Funció de SirT1 a l'HC	47
Altres funcions de SirT1	48
Funcions de la resta de sirtuïnes	51
Resposta de la cromatina sota estrès: actuació de SirT1	51
 OBJECTIUS.....	 55
 RESULTATS.....	 59
 PRIMERA PART	 61
SirT1 controla els nivells de proteïna Suv39h1.....	61

La sobreexpressió de SirT1 altera l'estabilitat de Suv39h1	65
El control per part de SirT1 dels nivells de Suv39h1 implica dominis específics de cadascuna d'aquestes proteïnes	67
SirT1 regula l'intercanvi de Suv39h1 en HC	70
L'estrès oxidatiu i l'estrès metabòlic indueixen un augment dependent de SirT1 en els nivells de Suv39h1	75
SirT1 inhibeix la poliubiquitinació de la lisina 87 en el domini cromosòmic de Suv39h1 per part de MDM2.....	77
El mutant K87 de Suv39h1 mostra una alteració dràstica a la seva taxa de renovació a l'HC que permet la protecció del genoma en condicions d'estrès	85
SEGONA PART	90
Relació de retroalimentació entre les isoformes d'HP1 i Suv39h1 a nivell de proteïna	90
Les isoformes d'HP1 controlen l'estabilitat de Suv39h1 a través de la regulació de la poliubiquitinació d'aquest. El domini Nt de Suv39h1 i la regió hinge d'HP1 són part de la regulació	95
Estudi del paper de les isoformes d'HP1 a nivell de foci d'HC	100
Relació entre Suv39h1 i les isoformes d'HP1 a nivell de foci d'HC <i>in vivo</i>	103
Diferents papers de les isoformes d'HP1 al foci d'HPC.....	107
DISCUSSIÓ.....	115
IMPORTÀNCIA DE L'ESTABILITAT I LA DINÀMICA DE SUV39H1 PER LA PRESERVACIÓ DE LA INTEGRITAT GENÒMICA SOTA CONDICIONS NORMALS I D'ESTRÈS.....	117
Mecanisme proposat per mantenir l'estabilitat genòmica a través de la regulació de Suv39h1 per part de SirT1 sota condicions d'estrès ...	119
Relació entre Suv39h1 i l'E3 ubiquitin lligasa MDM2 sota condicions d'estrès.....	120
La cromatina com a entitat altament dinàmica	120

Importància de l'estabilització dels nivells de Suv39h1 en l'estabilitat genòmica	123
Implicació de les isoformes d'HP1 en l'estabilitat genòmica a través de la regulació de Suv39h1	124
Relació de la regulació entre Suv39h1 i les isoformes d'HP1	125
Extensió del mecanisme d'estabilització de Suv39h1 per part de SirT1 a l'HF	127
PAPER DE LES ISOFORMES D'HP1 EN L'ESTRUCTURA DEL FOCI D'HPC	128
Model proposat per entendre l'estructura del foci d'HPC a través de les isoformes d'HP1	128
Control de l'estructura de l'HC a través de les seqüències repetitives	129
Control de l'estructura d'HC a través de les modificacions postraduccionals	130
Paper diferencial de les isoformes en la compactació de la cromatina	131
PROPOSTA DEL MODEL ENGLOBANT ELS DIFERENTS MECANISMES IMPLICATS EN EL MANTENIMENT DE L'ESTABILITAT GENÒMICA I EN L'ESTRUCTURA DE L'HC	133
IMPLICACIÓ DE SIRT1 EN L'ESTABILITAT GENÒMICA EN L'ENVELLIMENT	134
CONCLUSIONS	137
MATERIALS I MÈTODES	141
Línies cel·lulars	143
Plàsmids utilitzats	143
Procediments de transfecció	144
Extracció de proteïnes, Western Blot i quantificació	144
Anticossos utilitzats	145

Assaig d'immunoprecipitació (IP)	146
Experiments d'immunofluorescència (IF)	146
Assaig d'ubiquitinització <i>in vitro</i>	146
Experiments amb restricció calòrica	147
Tractaments:	147
Inhibició del proteosoma	147
ARNi	147
Tractament amb H ₂ O ₂	147
Tractament amb BrdU	148
Experiments de “pulse-chase”	148
Assaig de metilació	148
Experiments de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)	148
Experiments de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)	149
Digestió per la nucleasa micrococcal (MNasa) anàlisi amb Southern Blot	150
Producció retroviral i transfecció cel·lular	151
FISH	151
Quantificació dels nivells de proteïna γH2AX i la presència de micro- nuclis	151
Purificació de l'ARN i RT-qPCR	152
Anàlisi estadístic	153
BIBLIOGRAFIA	154

ABREVIACIONS

ADPRT= ADP-ribosiltransferasa

ADN= Àcid Desoxiribonucleic

AL= *Ad Libitum*

ARN= Àcid Ribonucleic

ARNi= ARN d'interferència

Cbx= "Chromobox homolog"

CD= Domini chromo o "Chromo Domain"

Clr4= "Cryptic loci regulator 4"

CSD= "Chromo Shadow Domain"

CTCF= "CCCTC-binding Factor"

Cul= Culina

ΔCD= Delecció del domini chromo

ΔSET= Delecció del domini SET

DAC= Deacilasa

DAPI= "4',6-diamidino-2-phenylindole"

Dnmt3a/Dnmt3b= Metiltransferasa d'ADN 3a i 3b

DBS= Dany a doble cadena

EZH2= "Enhancer of Zeste Homolog 2"

FBS= Sèrum boví fetal

FISH= Hibridació "In Situ" Fluorescent

FL= longitud completa o "Full Length"

FRAP= "Fluorescence Recovery After Photobleaching"

FRET= "Fluorescence Resonance Energy Transfer"

GFP= "Green Fluorescent Protein"

G4BD=Domini d'unió Gal4

HATs= Acetiltransferases d'Histones

HC= Heterocromatina Constitutiva

HDACs= Desacetilases d'Histones

HDMTs= Demetilases d'Histones

HF= Heterocromatina Facultativa

HMTs= Metiltransferases d'Histones

HPC= Heterocromatina Pericentromèrica
HP1= "Heterochromatin Protein 1"
HR= regió frontissa o "Hinge Region"
IF= Immunofluorescència
KO= "Knock Out"
MDM2= E3 ubiquitin lligasa MDM2
MEFs= Fibroblasts embrionaris de ratolí
MNasa= Nucleasa Micrococcal
NDAC= Desacetilació depenent de NAD⁺
PTM= Modificacions postraduccionals
Rb= Retinoblastoma
ROS= espècies reactives d'oxigen
SAM= S-adenosilmetionina
Sir2= "Silent information regulador 2"
SirT1= Sirtuina 1
Suv39h1= "Suppressor of Variegation 3-9 homolog 1"
TSA= "Trichostatin A"
WB= Western Blot
WT= soca salvatge o "Wild Type"

Introducció

La cromatina

Composició de la cromatina

En el nucli de les cèl·lules eucariotes l'ADN s'estructura juntament amb les histones per formar la cromatina. Les histones H3 i H4 s'agrupen en un tetràmer i les H2A i H2B en dos dímers, donant lloc a un octàmer d'histones el qual s'hi embolcallen 147pb d'ADN formant el nucleosoma, la unitat bàsica i estructural de la cromatina^{1,2} (Figura I1). Els diferents nucleosomes els uneix la histona H1, que enllaça els llocs d'entrada i sortida de l'ADN entre dos nucleosomes^{3,2}.

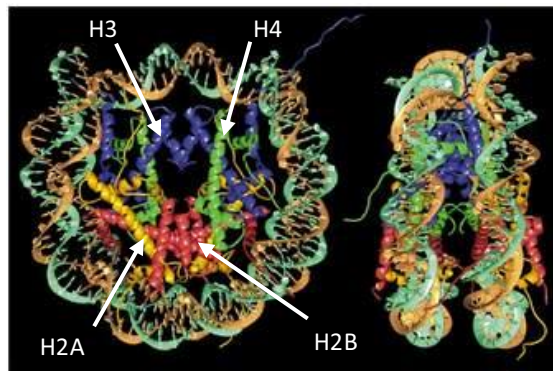


Figura I1. Estructura del nucleosoma. Es mostren dos angles diferents de l'estructura del nucleosoma on s'hi observen els tetràmers d'histones formats per H3 (blau) i H4 (verd) i els dímers formats per H2A (groc) i H2B (vermell) envoltats per la doble hèlix d'ADN (turquesa i taronja)³.

El nucleosoma conté una regió formada pels dominis globulars estructurats de les vuit histones, o cor, d'on sobresurten les anomenades cues d'histones, o regions amino i carboxi terminal, les quals són més accessibles i desestructurades que el cor. Els residus d'aquestes cues d'histones, principalment H3 i H4, són susceptibles a un gran nombre de modificacions postraduccionals covalents^{2,4}.

Modificacions postraduccionals

Les modificacions postraduccionals són un dels principals mecanismes epigenètics hereditaris i reversibles juntament amb la metil·lació de l'ADN i l'expressió d'ARN no codificant.

Les modificacions epigenètiques són canvis que es poden transmetre als descendents⁵ per tal de mantenir els perfils de transcripció específics de llinatge tot i no haver-hi un canvi a la seqüència d'ADN⁶. La interrupció d'aquests processos epigenètics pot conduir a l'alteració de la funció del gen, a la transformació cel·lular maligna i, consegüentment, a l'aparició de nombroses patologies com malalties neurodegeneratives, càncer, etc⁷.

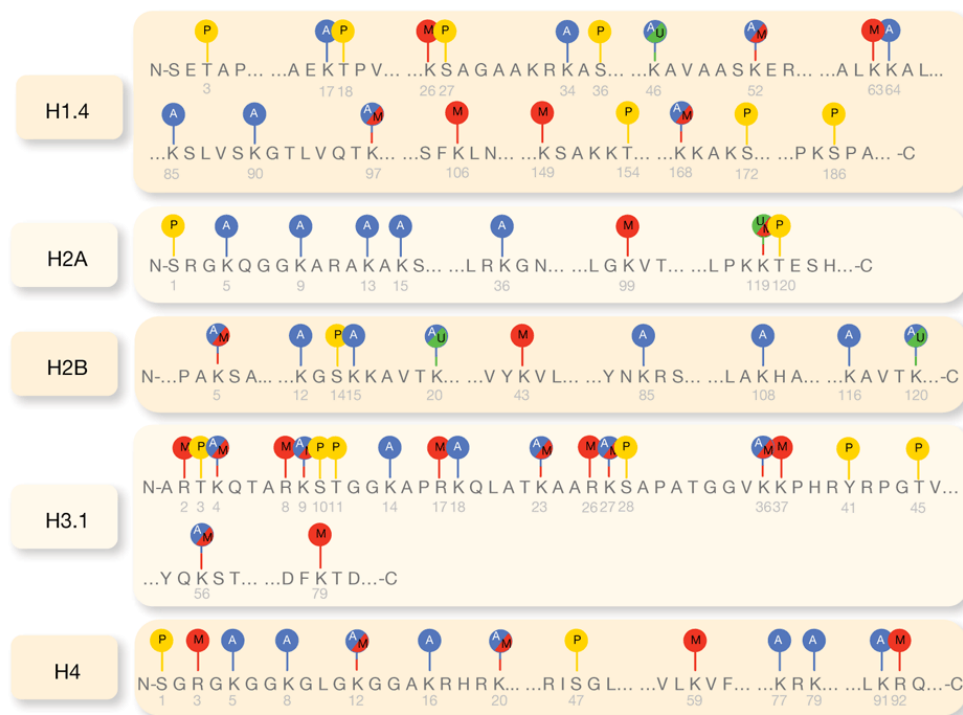


Figura I2. Principals modificacions postraduccionals a les histones. Representació de les modificacions postraduccionals més representatives com l'acetilació (blau), metil·lació (vermell), fosforilació (groc) i ubiquitinització (verd) en les histones H1 (H1.4), H2A, H2B, H3 (H3.1) i H4. El número en gris situat a sota dels aminoàcids representa la posició a la seqüència⁸.

Les modificacions postraduccionals més estudiades són l'acetilació, la metilació i la fosforilació, però moltes d'altres han estat identificades i caracteritzades incloent: ubiquitinització, sumoilació, ADP-ribosilació, biotinilació, isomerització de prolines, glicosilació i crotonilació, entre d'altres^{9,10} (Figura I2).

Aquestes modificacions, depenent de la seva naturalesa i del residu que modifiquen (els més comuns són lisina i arginina) estan associades amb silenciament o activació gènica i, per tant, al control de l'expressió gènica⁶. Aquestes poden contribuir en la regulació de la transcripció de la cromatina influint directament en l'estructura de la cromatina, com per exemple: l'acetilació de residus de lisina pot reduir la càrrega positiva de les histones, afeblint així la seva interacció amb l'ADN carregat negativament, augmentant la fluïdesa nucleosomal⁶, fent una cromatina més accessible a proteïnes d'unió a l'ADN com poden ser els factors de transcripció¹⁰.

Per altra part, es postula la funció de les modificacions postraduccionals com una plataforma de senyal per reclutar proteïnes a la cromatina, i aquests efectors són els que en última instància determinen el resultat funcional de certes modificacions. Hi ha múltiples famílies de dominis conservats que reconeixen histones modificades com, per exemple, les proteïnes amb un domini anomenat "chromo" o "bromo", com poden ser les proteïnes estructurals, remodeladors de la cromatina, modificadors de la cromatina o adaptadors per reclutar factors implicats en activitats del metabolisme de l'ADN⁶.

És important destacar que la integritat del genoma també es manté a través d'una sèrie de modificacions de les histones mitòtiques que coordinen l'estructura cromosòmica d'ordre superior i la segregació cromosòmica precisa¹¹.

Maquinària de remodelació de la cromatina

Les modificacions postraduccionals d'histones contribueixen al canvi de l'estructura de la cromatina juntament amb la cooperació amb factors externs com la maquinària de remodelació de la cromatina la qual media

alteracions nucleosomals com la incorporació de variants d'histones (H2AZ, H2AX, H2A, macro-H2A, H3.3, CenH3/CENP-A) o la modulació de l'empaquetament i posicionament nucleosomal^{12,13,14}.

Els complexos remodeladors de cromatina hidrolitzen ATP per controlar tota aquesta dinàmica¹⁵. La seva capacitat per a reubicar nucleosomes juga un paper important a la regulació de l'expressió gènica, així com a la mediació d'accés a l'ADN durant la replicació i la reparació, a la regulació activa de la localització de nucleosomes en el context del desenvolupament i a l'estat metabòlic de la cèl·lula^{16,17}. Aquests complexos poden llegir les senyals de la cromatina com la seqüència d'ADN, l'estructura o la metilació, reconèixer les modificacions d'histones (reconegudes a través dels dominis de proteïnes, presents tant en diverses subunitats reguladores com en l'ATPasa del complex de remodelació de la cromatina, com als bromodomains per a les cues de les histones acetilades o dominis chromo i dits PHD que interactuen amb lisines metilades), detectar la presència de variants de les histones i poden interactuar amb les proteïnes associades a la cromatina com ara factors de transcripció per identificar nucleosomes específics en el nucli¹⁴ (Figura I3).

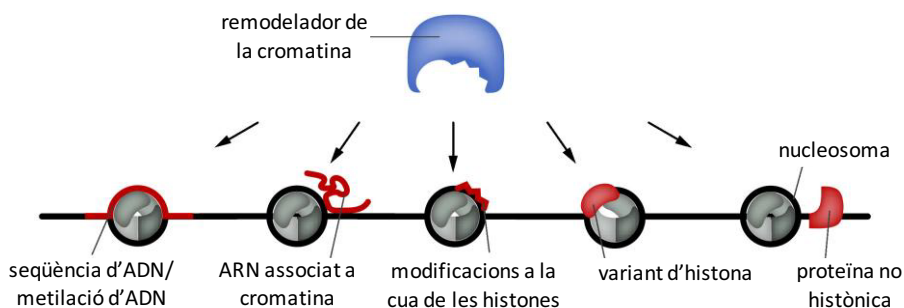


Figura I3 . Dianes per remodeladors de la cromatina. ADN, ARN, PTM a les cues de les histones, variants d'histones o altres proteïnes associades a la cromatina representen senyals de la cromatina que poden dirigir remodeladors de la cromatina¹⁴.

Finalment, els remodeladors de la cromatina poden modular directament o indirectament els patrons epigenètics a través de la seva associació amb els modificadors d'histones. Per exemple, recentment s'ha

descriu que el remodelador de la cromatina, SMARCAD1, promou la metilació d'histones H3K9 en associació amb les desacetilases HDAC1/2 i la metiltransferasa G9a/GLP^{14,18}. Altres proteïnes de remodelació de la cromatina s'uneixen a HP1 (proteïna implicada en l'estructura de l'heterocromatina) el que suggereix que, a més, tenen un paper en el manteniment de l'heterocromatina¹⁹.

Enzims relacionats amb la cromatina

Les modificacions postraduccionals són el producte del balanç entre els enzims que posen la modificació i els que la treuen. Per exemple, entre acetilases (HATs) i desacetilases (HDACs), o entre metiltransferases (HMTs) i demetilases (HDMTs), entre d'altres. Són els principals enzims catalitzadors de les modificacions postraduccionals, els quals també es poden associar amb remodeladors de la cromatina i, per tant, estarien implicats en l'organització de l'estructura de l'heterocromatina i consegüentment en la regulació de l'expressió gènica.

HATs i HDACs

Les HATs i les HDACs estan implicades amb l'acetilació. La dinàmica d'aquesta modificació postraduccionals està determinada pel balanç entre aquests dos grans grups d'enzims. Les HATs són responsables d'afegir aquesta marca i les HDACs són les encarregades de la seva eliminació^{20,21}.

HATs

Les HATs estan implicades en activació de l'expressió gènica, reduïnt l'afinitat de l'ADN per la cromatina i fent-la més accessible als complexos d'inici de la transcripció¹³. Les HATs es classifiquen en quatre famílies segons

critèris d'homologia: GNAT (formada per GCN5, PCAF, HAT1, ELP3, ESCO1, ESCO2 i CDY)²², MYST (la qual la constitueixen les HATs Tip60, HBO1, MOF, MOZ i MORF)²³, p300 (CBP juntament amb p300)²⁴ i SCR (composada per SRC1, ACTR, p160 i Clock)^{12,13,25,26}. Les HATs generalment actuen en complexos com, per exemple, NuA4/TIP60²⁷, HBO1²⁸, MOZ-MORF²⁹, MOF³⁰ i STAGA/ATAC²², que promouen la transcripció. Només p300 i CBP semblen capaces de funcionar soles.

HDACs

Les HDACs exerceixen una funció repressiva en la transcripció gènica compactant la cromatina, ja que la inhibició d'aquestes causa una reorganització dinàmica de la cromatina, com canvis en els patrons d'HP1 durant la interfase i canvis en les seves modificacions epigenètiques, augmentant l'H3K9Ac i H3K4me2^{31,32}. Les HDACs catalitzen l'eliminació dels grups acetil. Són un grup d'enzims més divers que les HATs. Han estat identificades divuit HDACs en eucariotes que tenen en comú un domini catalític amb activitat desacetilasa ben conservat. Estan classificades en quatre classes diferents (classes I- IV)³³.

Algunes HDACs formen part de complexos multiproteics que contenen una àmplia varietat d'altres proteïnes, incloent proteïnes "scaffold", subunitats reguladores i altres enzims, com ara aquells amb activitats de remodelació de la cromatina dependents d'ATP; reclutant factors inhibitoris per regular elements d'ADN dins de les regions promotores dels gens. Curiosament, almenys en el cas de les HDAC1-3, el complex assegura la seva activitat enzimàtica³⁴. Aquestes formen part de la classe més estudiada de les HDACs en complexos, la classe I, que està present en diversos complexos d'HDACs com, per exemple, Sin3, NuRD, CoREST i NCoR/SMRT, NuRD, implicats en diferents funcions com ara la repressió de la transcripció³⁵. Degut a que les HDACs actuen tant en histones com en substrats no histònics fa que regulin a diferents nivells com en la unió de l'ADN, en l'estabilitat de proteïnes i en l'activitat enzimàtica²¹.

HDACs de classe I, II i IV

Les classes I, II i IV es caracteritzen per requerir Zn^{+2} per catalitzar la reacció i conduir a l'alliberament del grup acetil en el medi aquós. Aquests enzims són sensibles a l'inhibidor d'HDACs TSA (trichostatin A) i estan altament relacionats des d'un punt de vista estructural i mecanístic²¹.

HDAC1, HDAC2, HDAC3, i HDAC8 són membres de la classe I d'HDACs similars a la desacetilasa Rpd3p (reduced potassium deficiency 3) de *Saccharomyces cerevisiae*. Aquestes són normalment localitzades en el nucli i formen grans complexes multiproteics. Estan involucrades en diverses funcions com el desenvolupament, la regulació del cicle cel·lular i el silenciament gènic. HDAC1 i HDAC2 tenen un 82% de similitud en les seves seqüències i tenen moltes funcions redundants, mentres que HDAC3 és més similar a la seqüència d' HDAC8³⁴.

Els membres de la classe II (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 i HDAC10) són homòlegs a la desacetilasa Hda1p de llevat. Aquesta classe pot ser subdividida en classe IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7 i HDAC9) i classe IIb (HDAC6 i HDAC10). Les HDACs de classe II estan implicades principalment en el desenvolupament i la diferenciació i les seves funcions són específiques de teixit³⁶. Curiosament, les HDACs de classe IIa són generalment segrestades al citoplasma fins que s'activen, moment en què són posteriorment transportades al nucli, on actuen. Respecte a la localització de la classe IIb, HDAC6 és citoplasmàtica i HDAC10 es troba al nucli i al citoplasma^{37,38}. No està clar que les histones siguin substrats d'aquesta classe d'HDACs.

Finalment, HDAC11 forma part de la classe IV³⁹ (Taula I1).

HDACs de classe III: les sirtuïnes

La Classe III d'HDACs o sirtuïnes, homòlegs del Sir2p (silent information regulador 2), està molt conservada en l'evolució^{5,40,41} trobant-se ja en procariotes amb una funció metabòlica. Tenen un antecedent comú amb la família de proteïnes PARPs. Les sirtuïnes són un grup de proteïnes amb

característiques úniques crucials per l'aptitud de les cèl·lules, l'adaptació als estímuls ambientals i la integritat genòmica⁵. Caldria destacar que no són sensibles a TSA.

El número de sirtuïnes varia segons l'organisme, generalment correlaciona amb la complexitat⁵. En mamífers s'han descrit set membres (SirT1-7) SirT1, SirT2 i SirT3 són classificats com a enzims de la subclasse I, els quals mostren una alta homologia amb Sir2p i tenen una activitat desacetilasa més robusta. SirT4 i SirT5 són assignats com a subclasses II i III, respectivament, i SirT6 i SirT7 són classificats com a subclasse IV⁴² (Figura I4).

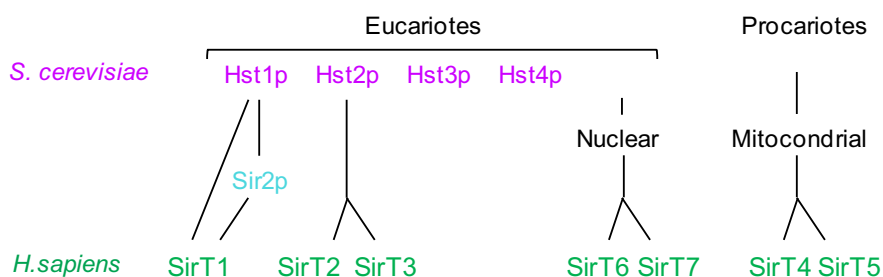


Figura I4. La família Sir2. Representació de la conservació de la família Sir2 des del llevat fins als humans. En llevat, els diferents membres de la família semblen ser els ortòlegs d'algunes de les sirtuïnes humanes. SirT1 sembla ser un ortòleg d'Hst1p i Sir2p; i SirT2 i SirT3 d'Hst2p.

La característica comuna entre aquesta classe d'enzims és que depenen del cofactor NAD^+ per dur a terme la desacetilació (en lloc de Zn^{+2} , com a les altres classes d'HDACs) el qual es consumeix durant aquesta reacció catalítica, conduïnt a la transferència del grup acetil a una molècula d'ADP-ribosa resultant la proteïna desacetilada (Figura I5)^{40,43}.

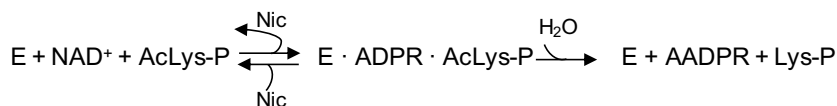


Figura I5. Reacció de desacetilació de les sirtuïnes. Consisteix en una reacció de dues etapes que consumeix NAD^+ i allibera nicotinamida (Nic), O-acetyl-ADP-ribosa (AADPR) i el substrat desacetilat (P). Adaptació de⁴⁴.

El mecanisme catalític de la família Sir2p no només porta a terme desacetilació dependent de NAD^+ (NDAC), també pot comportar una activitat monoADP-ribosiltransferasa (ADPRT), que semblaria estar present en gairebé totes les sirtuïnes, encara que en moltes, no s'ha identificat. Encara que les sirtuïnes són originalment ribosiltransferases, el fet que realitzen desacetilació de proteïnes en arqueobacteris i bacteris suggereix que probablement adquireixen aquesta funció relativament d'hora en l'evolució⁵.

En mamífers, SirT1, SirT2 i SirT3, són desacetilases dependents de NAD^+ que catalitzen la desacetilació d'histones i proteïnes no històniques. De la SirT4 a la SirT6 semblen exercir ambdues activitats d'HDACs dependent de NAD^+ i ADPRT, tot i que en SirT4 predominaria la segona⁴¹. Caldria destacar que la sirtuïna mitocondrial SirT5 sembla tenir una activitat deacilasa (DAC) més general, amb el que a més de grups acetil, també poden eliminar grups malonil, succinil, etc. Sembla que aquesta activitat té una funció metabòlica. També la trobem en SirT6^{42,45} (Taula I1).

Localització de les sirtuïnes

SirT1, SirT6 i SirT7 estan presents al nucli, tot i que SirT7 majoritàriament es troba al nucleol; SirT2 és predominantment localitzada al citoplasma excepte durant la transició G2/M que llavors es localitza al nucli abans de la desaparició de la membrana nuclear; SirT3 és la desacetilasa majoritària al mitocondri però també es localitza al nucli en condicions d'absència d'estrès i SirT4 i SirT5 són exclusivament mitocondrials⁴⁵.

Aquestes localitzacions poden ser dictades per la identitat cel·lular, l'etapa del desenvolupament, els estímuls ambientals o la progressió del cicle cel·lular⁵ (Taula I1).

Enzim	Act. catalítica	Complexes	Substrats	Localització	Funció
I	HDAC1	CoREST/NuRD/ Sin3	p53/Stat3/H3K56Ac/H4K16Ac	nucli	reparació ADN/apoptosis
	HDAC2	CoREST/NuRD/ Sin3	Bcl-6/Stat3/H3K56Ac/H4K16Ac	nucli	reparació ADN/diferenciació
	HDAC3	N-CoR/SMRT	MEF2/GATA1/Stat3/ p65/NFkB/H4K4Ac/H4K12Ac	nucli/citoplasma	reparació ADN/control cicle cel·lular
	HDAC8	-	H4	nucli	control cicle cel·lular
IIa	HDAC4	-	GATA1/Runx2/MEF2/HP1	nucli/citoplasma	diferenciació/apoptosis
	HDAC5	-	Smad7/GATA1/Runx3/MEF2/HP1	nucli/citoplasma	diferenciació
	HDAC7	-	Runx2/MEF2	nucli/citoplasma	diferenciació
	HDAC9	-	MEF2	nucli/citoplasma	diferenciació/metabolisme
	HDAC6	-	tubulina/HSP90	citoplasma	regulació metabolisme/ motilitat cel·lular/adhesió/funció xaperona
HDAC10	-	HSP70	nucli/citoplasma	autofàgia	
III	Sirt1	eNOSC/LSD1/ homotrimer	histònics: H4K16/H3K9/H1K26 enzims: Suv39h1/p300 factors: p53/P TEN	nucli	organització genoma resposta estrès metabolisme
	Sirt2	tetràmers	H4K16/tubulina	citoplasma/nucli	control cicle cel·lular
	Sirt3	-	H3K9	mitocondri/nucli	resposta estrès
	Sirt4	ADPRT/NDAC	malonyl-CoA-decarboxylase	mitocondri	metabolisme mitocondrial
	Sirt5	DAC	carbamoyl phosphate synthase 1	mitocondri	metabolisme mitocondrial
	Sirt6	ADPRT/NDAC	H3K9/H3K56	nucli	integritat telòmer/reparació ADN
	Sirt7	ADPRT/NDAC	ARNPol I/H3K18	nucleol	transcripció ARN Pol I en rADN/ control proliferació
IV	HDAC11	-	IL-10	nucli	control cicle cel·lular/tolerància immune

Taula 11. Classificació d'HDACs. Classes d'HDACs on s'hi representa també la modificació produïda a la cromatina, els substrats i la localització de cadascuna d'elles^{33,36,38,46}.

Substrats de les sirtuïnes

El fet de que les sirtuïnes catalitzin dues activitats enzimàtiques diferents juntament amb l'alta quantitat de substrats d'aquestes explica la seva diversitat funcional. Els diferents substrats descrits abarquen des d'histones, factors relacionats amb la cromatina com enzims que modifiquen la cromatina i proteïnes estructurals fins a factors de transcripció. Per exemple SirT1, SirT2, SirT3 i SirT6 tenen com a substrats H4K16Ac i/o H3K9Ac, i altres substrats no histònics com diversos factors nuclears per part de SirT1, tubulina per SirT2 i dianes mitocondrials per SirT3. En mamífers les sirtuïnes adopten un increment de complexitat adquirint noves funcions a través de la focalització d'una àmplia gamma de substrats i també a través d'una alta diversitat de patrons de localització cel·lular^{5,40} (Taula 11).

Funcions de les sirtuïnes

La funció bàsica de les sirtuïnes és promoure la comunicació entre les cèl·lules i el seu entorn, connectant els canvis o fluctuacions de l'ambient amb la dinàmica funcional del genoma. Promovent d'aquesta manera una adaptació eficient a aquests estímuls ambientals⁴⁵.

El fet que les sirtuïnes requereixin NAD⁺ és fonamental per entendre moltes de les seves funcions, ja que suggereix que poden actuar com a sensors de l'estat metabòlic de la cèl·lula però també a nivell sistèmic. Per tant, les sirtuïnes són capaces de transmetre canvis en el metabolisme de la cromatina a través de la desacetilació d'histones i altres proteïnes. Les funcions de les sirtuïnes més rellevants inclouen la senyalització sota estrès, el control de la supervivència cel·lular, el manteniment de l'estabilitat genòmica i la regulació del metabolisme^{40,5}.

Les sirtuïnes també tenen implicacions funcionals en diferents patologies, a part de en la regulació del càncer, estan relacionades amb malalties neurològiques (per exemple, l'Alzheimer i el Parkinson), patologies relacionades amb les hormones i patologies cardiovasculars⁵.

HMTs, HDMTs

Les HMTs i les HDMTs estan implicades en la metilació que consta de la transferència d'un grup metil de la SAM a l' ϵ -amina a la cadena lateral d'un residu de lisina⁴⁷. Aquesta modificació està regulada dinàmicament per les HMTs les quals incorporen el grup metil i les HDMTs que catalitzen la seva eliminació.

HMTs

Respecte el grup de les HMTs, actualment n'hi ha més de 60. Són fonamentals en la regulació de la senyalització de la cromatina, silenciament gènic per l'establiment d'heterocromatina pericèntrica, segregació cromosòmica, regulació de la longitud dels telòmers i desenvolupament, entre d'altres⁴⁸. Per tant, defectes funcionals d'aquests enzims poden conduir al càncer, defectes de creixement de^{49,50}, trastorns neurològics⁵¹ i altres patologies humanes⁴⁷.

La metilació d'histones es produeix tant a la cromatina transcripcionalment activa com a la inactiva, segons el residu que es metili, el seu grau de metilació (mono-, di-, o trimetilació) i la seva posició dins del gen i en el genoma. La metilació d'H3K4 i H3K36 s'associa generalment amb els gens transcripcionalment actius i es localitzen principalment als promotors (H3K4) i en el cos del gen (H3K36), mentre que la metilació d'H3K9 i H3K27 són generalment característiques de la cromatina condensada o heterocromatina⁵².

La majoria de les HMTs descrites contenen el domini catalític SET encarregat de metilar un residu de lisina o arginina⁴⁷. Algunes de les principals HMTs identificades en mamífers són (Taula I2):

Enzim	Substrats histònic	Funció heterocromatina	Funció
Suv39h1	H3K9me3	repressió	formació i organització cromatina/ estabilitat telòmers/progressió cicle cel·lular/desenvolupament
SETDB1	H3K9me3	repressió	desenvolupament/diferenciació
G9a	H3K9me1-me2/ H3K27/H1	activació-repressió	desenvolupament
GLP	H3K9me1-me2	activació-repressió	desenvolupament
EZH2	H3K27me2-me3/H1	repressió	desenvolupament/diferenciació
PR-Set7	H4K20me1	repressió	cicle cel·lular/reparació ADN
Suv420h1.1 Suv420h1.2 Suv420h2	H4K20me2 H4H20me2 /H1 H4K20me3	repressió	compactació cromatina/replicació ADN/reparació/cohesió cromàtides

Taula I2. Classificació d'HMTs. Observem les diferents HMTs descrites com també l'acció que produeixen aquestes a l'heterocromatina, substrats i localització d'aquestes⁵³.

Suv39h1 va ser la primera metiltransferasa específica de lisines descrita que conté un domini SET i és la principal activitat HMT H3K9me2/3 a mamífers. En ratolins hi ha dos loci molt relacionats, un a la posició "centromere-proximal" al cromosoma X que codifica per Suv39h1 el qual en teixits adults és ubiqüament expressat, i l'altre al cromosoma 2 codificant per Suv39h2 amb una localització restringida a testicles on sembla estar involucrat en la regulació heterocromàtica durant la meiosi⁵⁴. Suv39h1 per portar a terme la seva activitat necessita una monometilació prèvia a H3K9⁵⁵ que és induïda per dues metiltransferases d'histones citoplasmàtiques Prdm3 i Prdm16. Aquestes induïxen H3K9me1 en el "pool" citoplasmàtic d'H3 perquè Suv39h1 estableixi la trimetilació. Les histones premetilades probablement s'incorporen en dominis de la cromatina repressiva⁵⁶. Suv39h1 i la majoria d'H3K9me3, estan dirigits preferentment a l'heterocromatina constitutiva⁵. Suv39h1 és una proteïna clau en l'organització del genoma i el seu paper està directament relacionat amb la integritat i organització de la cromatina. A partir del descobriment de Suv39h1 la investigació sobre la metilació d'histones ha progressat ràpidament.

SetDB1, G9a i GLP són altres metiltransferases implicades en la metilació d'H3K9 (Taula I2). SETDB1 catalitza el pas d'H3K9me2 a H3K9me3, reacció la qual es veu reforçada per una ATPasa, regulant

l'expressió de gens diana⁵⁷. Participa en la compactació d'heterocromatina durant la diferenciació cel·lular, el desenvolupament, la mort cel·lular i la carcinogènesis. G9a i GLP (G9a-Like Protein) són els enzims principals per la mono i dimetilació d'H3K9. Existeixen predominantment com un complex heteromèric i aquest té un paper important en el desenvolupament. G9a també participa en la modificació H3K9me3 *in vivo* i en la metilació de la histona H1^{58,59,60}.

Estudis fets en cèl·lules deficientes per G9a i per Suv39h1/h2 varen demostrar que Suv39h1/h2 són HMTs crucials per H3K9me3 en HPC, i que G9a és una important HMT d'H3K9me1 i H3K9me2 en eucromatina. Les marques H3K9me2 i H3K9me3 s'enriqueixen en el lloc d'inici de la transcripció de gens silenciats, H3K9me2 s'ha associat més a heterocromatina facultativa (HF) i H3K9me3 a heterocromatina constitutiva (HC), mentre que H3K9me1 es troba en promotors transcripcionalment actius⁶¹. Destaquem que la marca d'eucromatina H3K4me3 inhibeix la metilació d'H3K9 per SETDB1, G9A i Suv39h1⁶².

S'ha proposat que aquestes quatre HMTs descrites, G9A, GLP, SETDB1 i Suv39h1 formen un complex enzimàtic implicat en la metilació d'H3K9 en eucromatina i heterocromatina, en la regulació de l'expressió gènica i en la formació d'heterocromatina pericèntrica, però aquest fet no està del tot clar⁴⁸.

La metiltransferasa Ezh2 és l'encarregada de di- i trimetilar H3K27. Aquest enzim és un factor del grup del Polycomb fonamental en el desenvolupament i la diferenciació, la qual forma part del complex PRC2 (polycomb repressiva Complex 2) juntament amb Suz12, Eed, i RbAp46/48 i n'és la subunitat catalítica que estableix les modificacions. Tots els membres del cor de PRC2 són necessaris per Ezh2 per exercir la seva activitat⁵². Aquesta està implicada en la formació d'HF silenciada. La marca H3K27me1 s'enriqueix als promotors transcripcionalment actius mentre que la marca H3K27me3 s'associa amb promotors silenciats⁶¹. Cal destacar que G9a també pot metilar H3K27^{52,63}.

Algunes dades suggeririen que hi hauria una cooperació funcional entre PRC2 i G9a/GLP per assegurar un silenciament epigenètic de gens en

certes regions de la cromatina. Això demostra un “cross-talk” entre aquests dos importants mecanismes de silenciament epigenètic⁵².

Respecte les metiltransferases d'H4K20, PR-Set7 monometila H4K20 i és essencial per a la correcta divisió cel·lular i l'estabilitat genòmica⁶⁴. Aquesta monometilació s'estableix en G₂/M i és molt important en la compactació del cromosoma metafàsic, en la sortida mitòtica durant la mitosi, en la reparació de l'ADN i en la replicació de l'ADN⁶⁵.

Una altra metiltransferasa d'H4K20 és la Suv420. En vertebrats existeixen dues metiltransferases Suv420, Suv420h1 i Suv420h2, i només un equivalent a *Drosophila*. Suv420 és un component clau en la formació de l'heterocromatina i per tant, en el silenciament gènic. La unió estable de Suv420h2 és crucial per el correcte establiment d'una estructura d'heterocromatina compacta i cohesió de cromàtides germanes⁵⁶.

Durant M/G₁, algunes H4K20me1 són metilades a H4K20me2 (necessari per a la reparació de l'ADN) o H4K20me3 (necessari per a la formació de l'estructura d'heterocromatina) per les HMTs Suv420h1 i Suv420h2, respectivament⁶⁵.

H4K20me3, igual que H3K9me3, també està enriquida a heterocromatina pericèntrica i en telòmers. De fet, per la inducció d'H4K20me3 es requereix H3K9me3 catalitzat per Suv39h1/h2, encara que H4K20 no és un substrat intrínseca per aquests enzims⁶⁶.

HDMs

La primera demetilasa identificada va ser la LSD1 (linina demetilasa 1). Aquesta pot demetilar H3K4me1/2 i H3K9me1/2 en funció de les proteïnes associades⁶⁷. Posteriorment, es va identificar una gran família de desmetilasas que contenen un domini JmjC (domini c-terminal Jumonji)⁶⁸ el qual utilitza Fe²⁺ o α-cetoglutarat, depenent de la demetilació, com a cofactors per eliminar els grups metil⁶⁹. Aquesta família pot demetilar lisines trimetilades⁶⁸. Dins d'aquesta família s'han identificat desmetilases d'histones que eliminen específicament marques metil en H3K4, H3K9, H3K36 i H3K27⁶⁹. UTX (ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, cromosoma

X) i JMJD3 són demetilases que contenen el domini JmjC, ambdues catalitzen la reducció de di- i trimetilació d'H3K27 *in vivo*^{70,71}.

Relació entre les HDACs i les HMTs

La relació funcional entre desacetilases i metiltransferases d'histones sembla ser més estreta que la que es creia fins ara. De fet, experiments realitzats en *S. pombe* suggereixen que aquesta relació es conserva des del llevat als éssers humans⁵. Per exemple, la relació entre SirT1 i Suv39h1 és molt important en la formació de l'heterocromatina on SirT1 fa augmentar els nivells d'H3K9me3 a través d'un seguit d'accions sobre Suv39h1⁷². En el manteniment de l'heterocromatina sota condicions d'estrès SirT1 modula l'intercanvi de Suv39h1 en heterocromatina constitutiva (HC) mitjançant el control dels nivells de Suv39h1. També s'estableix aquesta relació entre SirT2 i PR-Set7 on SirT2 promou l'activitat PR-Set7 a través d'una combinació de mecanismes, incloent la desacetilació d'H4K16Ac i la unió a PR-Set7, que sembla que augmenta l'activitat específica de l'enzim. A més SirT2 altera els nivells de la PR-Set7 a la cromatina⁶⁵. Un altre exemple seria entre p300 i Suv420. La metilació d'H4K20 impedeix l'acetilació de H4K16 per l'acetiltransferasa P300 *in vitro*. Curiosament, també es va observar el contrari, la marca H4K16ac evita la metilació d'H4K20⁷³.

Estructura de la cromatina

Organització de la cromatina

Els enzims i les seves modificacions esmentades anteriorment, entre d'altres, modulen l'organització de la cromatina en una jerarquia d'ordres successius de compactació. Van des de la fibra d'11nm fins al cromosoma, la forma de la cromatina més compactada. La fibra d'11nm representa l'ADN

embolicat al voltant dels nucleosomes (Fig. I6E). Aquesta s'ordena per formar un ordre superior de compactació de fibra helicoïdal de 30nm de diàmetre (Figura I6D). Es pot formar a través del reclutament de la histona H1^{74,75} durant la interfase, i/o a través de factors associats a la cromatina com HP1 o Polycomb (PC). S'han proposat dos models per descriure la fibra de 30nm: solenoide i hèlix en zig-zag⁷⁵. Però tot i que s'ha estudiat extensament *in vitro*, les evidències per a l'existència de la fibra de 30nm *in vivo* són limitades. Alternativament, a l'organització de la cromatina en una fibra de 30nm, ha estat proposat el model "polymer melt" on els nucleosomes no contigus linealment en la cadena d'ADN, interactuen dins d'una regió de la cromatina. Aquesta s'organitza en una sèrie de petits glòbuls per formar un estat més compacte⁷⁶ (Figura I6D), arribant fins a la formació del cromosoma durant la divisió nuclear (mitosis i meiosis).

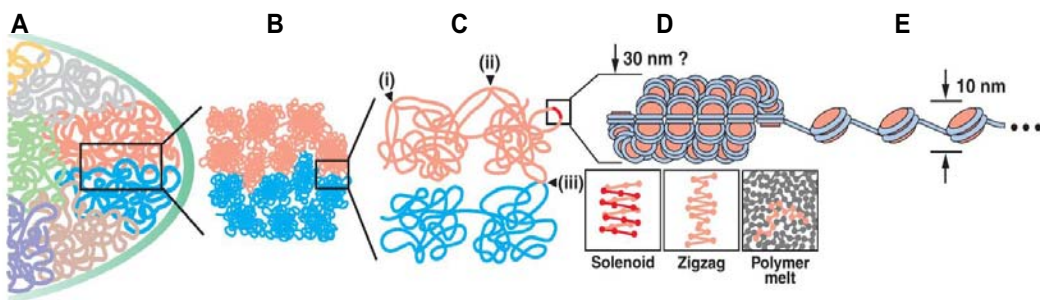


Figura I6. Organització de la cromatina en el nucli de mamífer. **A** Els cromosomes estan organitzats en els territoris cromosòmics. **B** Els territoris cromosòmics estan compostos de glòbuls fractal. **C** Les fibres de la cromatina interactuen (i) dins d'un glòbul fractal (freqüent), (ii) entre glòbuls fractals d'un mateix territori cromosoma, o entre el cromosoma territoris adjacents. **D** La cromatina pot formar una fibra de 30nm (model ziga-zaga o model solenoide) o alternativament organitzar-se com a "polymer melt". **E** La cromatina es resol com una fibra de 11 nm que consisteix en nucleosomes⁷⁶.

Comparació entre l'heterocromatina i l'eucromatina

A part de dividir la cromatina segons el seu grau de compactació, la podem classificar segons la seva funcionalitat en eucromatina i heterocromatina.

L'eucromatina és la forma menys compactada de les dues⁵. Es caracteritza per una alta densitat de gens i per ser transcripcionalment activa¹⁰. En general, regions actives de cromatina es correlacionen amb l'acetilació de lisines de les cues d'histones com pot ser l'acetilació a la lisina 16 de la histona 4 i certes combinacions de la metilació en lisines i arginines com per exemple: H3K4me2/3, H3K36me3, H3K79me2/3 i H4K3me2⁵ (Figura 17). Aquestes modificacions poden afavorir l'accés de factors de transcripció a les regions promotores i permetre una transcripció eficient mitjançant l'ARN polimerasa II⁷⁷.

Per altre banda, l'heterocromatina, és la forma de cromatina més compactada. Es caracteritza per baixa activitat transcripcional, baixa abundància de gens i enriquiment en seqüències repetitives d'ADN. Aquesta està generalment hipoacetilada, per exemple, degut a la desacetilació per part la desacetilasa SirT1, i metilada en diferents lisines com ara H3K9me2 i H3K9me3, H4K20me1 i H4K20me3, i H3K27me3. En particular, H3K9me2 i H3K9me3, catalitzades per la metiltransferasa Suv39h1, és una característica de l'organització global de la cromatina. En particular, H3K9me3 és reconeguda per les proteïnes estructurals específiques, com ara l'HP1, que es requereix per l'estructura i difusió de l'heterocromatina^{5,78}.

La transició entre aquests dos nivells d'organització de la cromatina és vital pel control de la transcripció, replicació i moltes altres funcions cel·lulars associades amb l'ADN⁵.

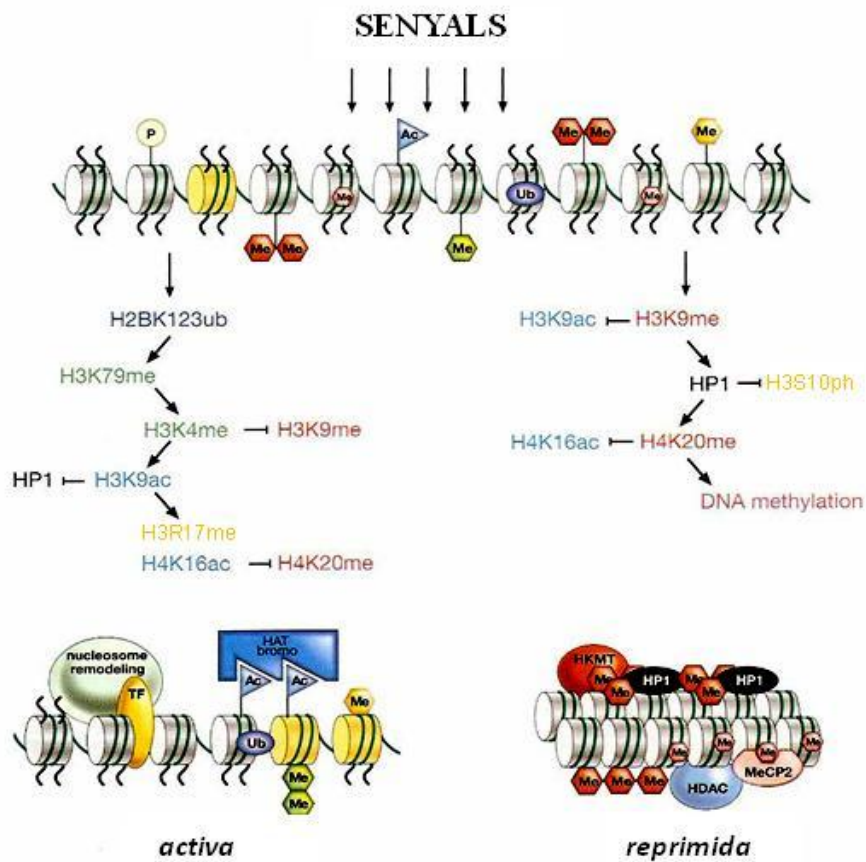


Figura 17. Modificacions de la cromatina. Transició d'una plantilla de cromatina inicial a euromatina activa (esquerra) o a l'establiment d'heterocromatina reprimida (dreta), implicant coordinadament una sèrie de modificacions. En el cas de l'activació transcripcional, aquesta va acompanyada per l'acció de complexos remodeladors del nucleosoma i la substitució d'histones per variants d'histones (en groc)²⁰⁴.

Comparació entre l'heterocromatina facultativa i l'heterocromatina constitutiva

L'heterocromatina es divideix en dues formes principals d'acord amb la seva diferent dinàmica funcional i estructural: l'heterocromatina constitutiva (HC) altament compactada, conté pocs gens i es troba principalment en estructures cromosomals com telòmers i centròmers; i l'heterocromatina

facultativa (HF), és més abundant en termes de contingut de gens i constitueix regions que es poden formar com heterocromatina, però que poden revertir a eucromatina un cop requerit^{5,10}.

Heterocromatina facultativa

L'HF és transcripcionalment silenciada però pot passar a eucromatina, per tant es descompacta i permet la transcripció dins dels següents contextos específics: temporal (per exemple, estats de desenvolupament o etapes específiques del cicle cel·lular)^{5,10}, espacial (com poden ser canvis de localització nuclear del centre a la perifèria o viceversa, a causa de senyals o factors exògens), o parental/hereditari (per exemple, expressió gènica monoal·lèlica)⁴.

L'HF pot ocupar un cromosoma sencer (per exemple, el cromosoma X inactiu (Xi) de femelles de mamífer), abarcar grans distàncies genòmiques (per exemple, grups de gens homeòtics), o limitar-se a les regions reguladores de gens definits (per exemple, promotors)^{4,5,10}.

Marques d'histones com H3K9me2/3 i H4K20me3, que es troben en l'HC, s'associen sovint amb els dominis d'HF, per exemple, es van trobar en els subdominis del cromosoma X inactiu en les cèl·lules somàtiques femenines^{79,80}. No obstant això, la formació d'HF també està controlada per mecanismes independents dels que controlen l'heterocromatina constitutiva. De fet, la formació d'heterocromatina facultativa s'associa sovint amb l'H3K27me3, una marca que està absent en l'heterocromatina constitutiva⁸¹. H3K27me3, contribueix als mecanismes d'inactivació del cromosoma X^{82,21}.

Heterocromatina constitutiva

En mamífers, l'HC es troba en estructures cromosòmiques funcionals com ara centròmers i telòmers. Als centròmers, al voltant de la regió centromèrica la qual està implicada directament en la formació del cinetocor, es defineix com a regió pericèntrica la qual està implicada en l'adequada

separació de cromàtides germanes¹⁹. La regió pericèntrica o pericentromèrica (HPC) és la més abundant dels diferents dominis d'HC en el genoma. En nuclis en interfase aquesta regió pot formar agrupacions denominades chromocenters.

Aquestes dues regions, centromèrica i pericentromèrica, contenen majoritàriament seqüències repetitives d'ADN (Figura I8).

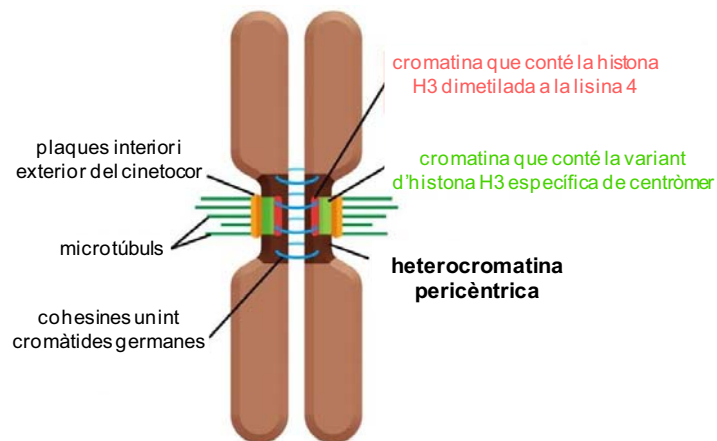


Figura I8. Estructura i funció de la cromatina que forma els centròmers. Es mostra el centròmer, l'heterocromatina pericèntrica, les cohesines, els microtúbuls i els braços dels cromosomes.

En ratolins, la regió centromèrica, està formada per seqüències repetitives anomenades minor satèl·lits, cada una de les quals conté unes 120pb i són regions d'unues 600kb. Aquesta regió també està caracteritzada per la incorporació de la variant d'histona H3 centromèrica en els seus nucleosomes i per la presència de proteïnes centromèriques específiques requerides per la formació del cinetocor^{19,83}.

La regió pericèntrica en ratolins està formada per repeticions anomenades major satèl·lits, la transcripció dels quals està regulada diferencialment, cada un consta d'unues 234pb i són regions d'unues 6Mb. Aquestes regions estan enriquides amb les isoformes d'HP1; amb un component d'ARN que sembla tenir una paper crucial en la formació i manteniment de la regió pericèntrica; i en marques epigenètiques repressives

com hipoacetilació d'histones, metilació d'histones, com la metilació d'H3K9 per part de Suv39h1, i metilació de l'ADN (als dinucleòtids CpG)^{19,83} (Figura 19).

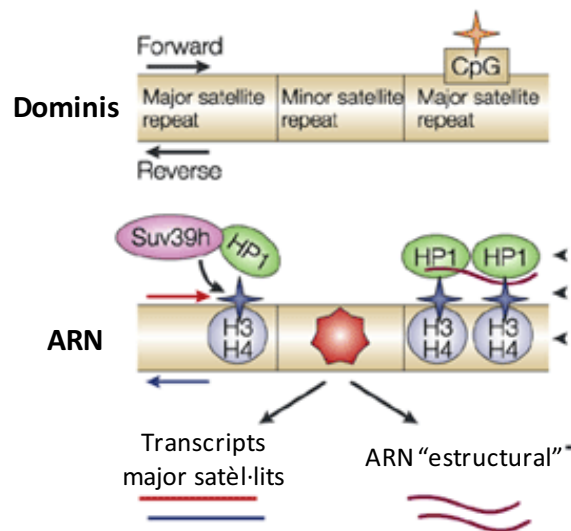


Figura 19. Organització de l'heterocromatina pericèntrica en cèl·lules de ratolí. Regions pericèntriques fortament metilades en H3 (es mostra per un estel blau) per Suv39h, en les illes CpG de l'ADN (es mostra amb una estrella taronja). El domini intern és la regió centromèrica (estel de vuit puntes de color vermell). Observem també els transcrits d'ARN homòlegs a les dues cadenes dels major satèl·lits, així com un component d'ARN (ARN "estructural") que està implicat en el manteniment de l'organització de l'heterocromatina¹⁹.

En la regulació de la metilació de l'ADN dels satèl·lits, hi està implicat Suv39h1, a través de dirigir la trimetilació a H3K9 i la metilació de l'ADN dependent de Dnmt3b. En canvi, la metilació de l'ADN en repeticions centromèriques es produeix independentment de la funció de Suv39h. Tots dos sistemes de metilació són propensos a ser importants en el reforç de l'estabilitat de subdominis heterocromàtics i, per tant, en la protecció de la integritat del genoma⁸⁴.

En ratolins, l'heterocromatina pericèntrica es caracteritza per alts nivells de metilació de l'ADN i trimetilació d'H3K9.

Diverses modificacions de les histones s'han relacionat amb la formació de dominis d'HC, incluint trimetilació d'H3K9 (H3K9me3) i la trimetilació a la lisina 20 de la histone H4 (H4K20me3). Més recentment, una tercera modificació d'histones, H3K79me3, s'ha relacionat amb la formació d'HC en cèl·lules mare embrionàries de ratolí ²¹.

Factors clau a l'estructura de l'heterocromatina: Suv39h1

Origen i estructura de Suv39h1

Suv39h1/h2 va ser aïllada en mamífers, a partir de la informació de la seqüència del domini SET^{85,86}, el qual va ser originalment identificat com una seqüència conservada d'aminoàcids en les proteïnes de *Drosophila* Su(Var)3-9, E(z), i Trithorax⁸⁷. Està situat a C-terminal i és on hi recau l'activitat catalítica de l'enzim^{85,86}.

A part del domini SET, Suv39h1 conté a la regió N-terminal el domini chromo el qual també el trobem conservat a la proteïna homòloga de *Schizosaccharomyces pombe*, Clr4p⁸⁶. Aquest domini juga un paper en la focalització de Suv39h1 i en el reconeixement de la lisina metilada d'H3K9 i, a més a més, té la capacitat d'unir-se a l'ADN i a l'ARN. També és essencial per a l'activitat catalítica de Suv39h1 ja que la mutació i la supressió del domini chromo de Suv39h1 posen en perill la seva activitat enzimàtica tot i la presència d'un domini SET catalíticament intacta⁸⁸. Aquests dos dominis són presents en proteïnes cromosomals implicades en el control epigenètic de l'expressió gènica.

La detecció de Suv39h1 en diferents línies cel·lulars de mamífer ens descriu una distribució enriquida d'aquest enzim en els foci d'HC durant la interfase⁸⁶, on interacciona amb HP1 (la proteïna estructural més abundant de l'HC), però Suv39h1 pot ser reclutada en aquestes regions en part independentment d'HP1⁸⁹. Tant Suv39h1 com HP1 tenen una alta dinàmica de renovació. Durant la mitosi hi ha una acumulació de Suv39h1 transitòria

en les regions centromèriques⁹⁰. També es troba en les regions d'HF on està implicada en la seva formació⁵.

Regulació de Suv39h1

Suv39h1 pot estar regulat per enzims, factors de transcripció i modificacions postraduccionals, entre d'altres.

Per exemple, la relació entre la demetilasa d'H3K9 JMJD2b i p53 pot regular Suv39h1. L'activació de p53 indueix l'expressió de la d'JMJD2b que disminueix, indirectament, l'expressió de Suv39h1. L'esgotament JMJD2b o expressió sostinguda de Suv39h1 retarda la reparació de l'ADN en l'HC⁹¹.

Un altre exemple és el de DBC1 (suprimit en el càncer de mama 1) que pot ser un important regulador de la formació d'heterocromatina i de l'estabilitat genòmica mitjançant la interrupció del complex Suv39h1-SirT1 i la inactivació dels dos enzims⁹².

Treballs previs del grup van demostrar que SirT1 regula l'activitat de Suv39h1 per diverses vies: promou la metilació d'H3K9me3 per Suv39h1 reclutant aquest directament a regions reguladores a través de la unió entre domini N-terminal de SirT1 i el domini chromo de Suv39h1; a part, SirT1 desacetila H3K9Ac per permetre la metilació per part de Suv39h1; la unió de SirT1 a Suv39h1, també incrementaria la seva activitat metiltransferasa probablement a través d'un canvi conformacional i, finalment, SirT1 desacetila la K266 de Suv39h1, un residu localitzat al domini catalític SET, fent l'enzim més actiu. Aquesta modificació és la primera descrita en una metiltransferasa que modula la seva activitat catalítica. Encara que el paper de la K266 en la formació d'heterocromatina, i les seves implicacions per a les funcions Suv39h1 encara no estan del tot descrites⁹.

Funcions de Suv39h1

Suv39h1 està implicat en diverses funcions, entre d'altres, en la formació de l'heterocromatina i l'organització del genoma, al silenciament

gènic, en l'estabilitat dels telòmers, en la progressió del cicle cel·lular, en la segregació cromosòmica, al desenvolupament i en la tumorigènesis.

La relació de Suv39h1 amb HP1 sembla ser crucial en la formació d'heterocromatina (Figura I10). Suv39h1 és important pel reclutament d'HP1 a l'heterocromatina gràcies a la trimetilació d'H3K9 per part d'aquest, ja que la pèrdua de la metiltransferasa causa una deslocalització d'HP1⁹³. La interacció entre aquestes dues proteïnes i el reclutament d'HP1, juntament amb altres proteïnes, indueix l'empaquetament de la cromatina o la formació d'heterocromatina i el silenciament de gens⁸⁸.

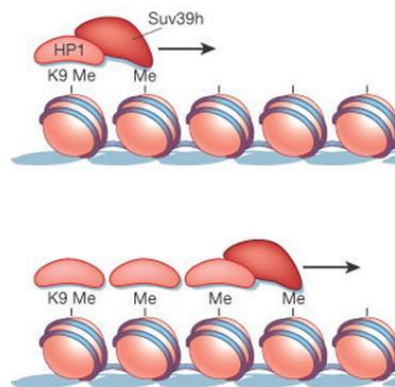


Figura I10. Propagació de l'heterocromatina. Els nucleosomes metilats a H3K9 es vinculen a HP1. HP1 ahora recluta Suv39h, que metila específicament H3K9, permetent que la metilació i l'HP1 s'extenguin als nucleosomes successius propagant-se i donant lloc a la formació d'heterocromatina³.

Suv39h1 està també implicat en el silenciament gènic de novo^{94,95}.

Suv39h1 també podria tenir una funció estructural en l'HPC, a part de la seva activitat catalítica. S'ha descrit una població substancial d'aquest enzim immòbil en aquesta regió i li assignen aquest paper estructural, sent el domini SET el que media aquesta unió estable⁸⁹.

També s'observa una relació de Suv39h1 i de la metilació d'H3K9 amb el manteniment de l'estabilitat genòmica ja que l'absència d'aquest enzim causa una mala segregació dels cromosomes^{72,55,93}.

També trobem Suv39h1 relacionat amb el manteniment dels telòmers ja que la pèrdua de Suv39h1/h2 durant el desenvolupament provoca redistribució dels seus nivells en els telòmers⁵. A més a més, l'absència

d'aquest enzim també s'ha relacionat amb l'increment de longitud dels telòmers en cèl·lules murines. Contràriament, en cèl·lules humanes disminueix la longitud dels telòmers, el que suggereix que la biologia dels telòmers és diferent entre les espècies de mamífers⁹⁶. Suv39h i làmines de tipus A probablement juguen un paper clau en el manteniment dels telòmers i l'arquitectura nuclear d'aquests⁹⁷.

Suv39h1 està implicat en cicle cel·lular ja que s'ha vist en ratolins que la pertorbació d'aquest produeix defectes en la progressió d'aquest procés. Suv39h1 es recluta preferentment a l'HPC durant l'entrada en mitosi, generant un gradient de marques de metilació, sent el pic d'H3K9me3 a la metafase i disminueix a mesura que les cromàtides germanes se separen⁹³.

La pèrdua de Suv39h1/h2 durant el desenvolupament provoca la pèrdua total d'H3K9me3 a HPC provocant una pèrdua d'heterocromatina ja que es perden les proteïnes d'HP1 i es relocalitza H4K16Ac al foci d'heterocromatina⁵. Els doble KO per Suv39h1/2 tenen la viabilitat reduïda durant el desenvolupament embrionari i creixement reduït i infertilitat en adults⁹². Curiosament, la pèrdua d'un dels dos no afecta els nivells de H3K9me3, reafirmant la importància de mantenir els nivells de la modificació a través del programa de desenvolupament⁵. Aquests són viables però predisposen al desenvolupament de tumors com limfomes⁹².

Suv39h1 també està implicat en tumorigènesis. Se l'ha relacionat amb la formació d'un complex amb pRb i juga un paper en la inhibició d'E2F1 metilant els promotors d'aquest enzim. Per tant, Suv39h1 té una implicació en vies de supressors de tumors⁹² i, conseqüentment, en tumorigènesis.

La senescència dependent de Suv39h1 protegeix els ratolins de limfomes invasius en cèl·lules T conduïts per Ras, per tant, reafirma la seva funció com a supressor de tumors. Contràriament, H3K9me mediada per Suv39h1 s'ha relacionat amb el silenciament de gens supressors de tumors com ara p15INK4B i E-cadherina en la AML (leucèmia mieloide aguda), entrant en controvèrsia amb les dades anteriors. Per tant, és possible que la funció per defecte de Suv39h1 sigui mantenir l'estabilitat del genoma limitant l'activació aguda d'oncogens mentre que la seva desregulació podria causar la formació de tumors^{98,99}.

Una de les principals proteïnes implicades en l'estructura de l'heterocromatina: HP1

Estructura d'HP1 i isoformes

Suv39h1 crea un lloc d'unió per l'HP1 (Heterochromatin protein 1), la proteïna estructural per excel·lència de l'heterocromatina i una de les més importants en seva formació.

HP1 va ser identificada per primera vegada en *Drosophila* com a Su(var)2-5 i com un supressor dominant de la PEV (position effect variegation). La família d'HP1 és evolutivament conservada, ha estat descrita des del llevat de fissió (Swi6p) fins a mamífers (HP1 α , HP1 β i HP1 γ), amb un paper en la regulació estructural de l'heterocromatina^{31,100}.

En mamífers cada una de les tres isoformes està codificada pel seu propi gen. HP1 α està codificada pel gen Cbx5 (“*Chromobox homolog 5*”), HP1 β pel gen Cbx1 i HP1 γ per Cbx3.

Aquestes tres isoformes tenen un alt grau de similitud en la seqüència d'aminoàcids, aproximadament un 65% (Figura I11)¹⁰⁰, i en l'organització estructural.

Aquestes tres isoformes són proteïnes petites, d'uns 25kD. Estan compostes per dos dominis estructurals, el “chromodomain” o domini chromo (CD) a la part N-terminal i el “chromoshadow domain” (CSD) a la regió C-terminal i units per una regió més variable anomenada “hinge” (HR) (Figura I11).

```

HP1α MGKKTERT-ADSSSEDEEEYVVEKVLDRRMVKGQVEYLLKWKGFSEEHNTWEPEKNLDC 59
HP1β MGKKQNKKKVVEEVLEEEEEEYVVEKVLDRRVVKGVEYLLKWKGFSDENTWEPEENLDC 60
HP1γ MGKKQNGK-SKKVEEAPEEFVVEKVLDRRVVNGKVEYFLKWKGFTDADNTWEPEENLDC 59
      ****                                ** ***** * ***** ***** ***** **

HP1α PELISEFMKKYKMKEGENNPREKSEGNKRKS-SFSNS-ADDIKSKKKREQSNDIARGF 117
HP1β PDLIAEFLQSQKTAHETDK-----SEGGKRKADSDSEDKGEESPKKKKES-EKPRGF 113
HP1γ PELIEDFLNSQKAGKEKD-----GTKRKSLSDSES--DDSKSKKRDAA-DKPRGF 107
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HP1α ERGLEPEKIIGATDSCGDLMLMKWKTDEADLVLAKEANVKCPQIVIAFYEEERLTWHAY 177
HP1β ARGLEPERIIGATDSSGELMFLMKWKSDEADLVPAKEANVKCPQVVISFYEEERLTWHSY 173
HP1γ ARGLDPERIIGATDSSGELMFLMKWKSDEADLVLAKEANMKCPQIVIAFYEEERLTWHS 167
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

HP1α PEDAENKEKESAKS 191
HP1β PSEDDDKKDDKN-- 185
HP1γ P-EDEAQ----- 173
      *

```

Figura I11. Seqüències d'aminoàcids de les isoformes d'HP1 de ratolí. Aliniament de les seqüències d'aminoàcids d'HP1α, HP1β i HP1γ murines. Els asteriscs indiquen els aminoàcids conservats entre les tres isoformes. Es diferencien els tres dominis d'HP1: CD (vermell), regió hinge (verd) i CSD (blau)¹⁹.

El domini chromo (*chromatin organization modifier domain*) és responsable de la unió d'HP1 a la lisina 9 di- i trimetilada de la histona H3. La funció de silenciament gènic d'HP1 depèn, entre d'altres, d'aquesta interacció. Aquest domini és més un motiu d'interacció amb proteïnes que no pas un motiu d'unió a l'ADN¹⁰⁰.

El CD té un paper estructural altament conservat en l'evolució. Totes les proteïnes que el contenen poden alterar l'estructura de la cromatina afavorint la formació d'heterocromatina, com també és el cas de Suv39h1^{32,100}. El domini chromo també el trobem a les proteïnes de la família polycomb¹⁰¹.

A part de dirigir-se a heterocromatina a través de la unió a H3K9me3, el CD d'HP1 també té com a diana el "histone fold domain" de la histona H3. Aquesta unió és d'alta afinitat i es pensa que representa la fracció immòbil d'HP1¹⁰². El domini chromo d'HP1 és necessari perquè HP1 s'incorpori a heterocromatina, ja que el mutant ΔCD és incapaç de localitzar-se en regions d'heterocromatina i queda difús en cèl·lules de ratolí¹⁰³. Però el reconeixement específic de la metilació a H3K9 no és només pel CD, sinó que la HR i el CSD també contribueixen en la unió selectiva de HP1 als nucleosomes metilats a la histona H3 a lisina 9¹⁰⁴.

Les modificacions postraduccionals també contribueixen a dirigir les isoformes d'HP1 cap a l'HC. En mamífers, HP1α és fosforilada als residus de serina del domini N-terminal i aquesta fosforilació juga un paper crític modulant l'activitat d'aquesta isoforma d'HP1 per una unió eficient a la cua de la histona H3 metilada. Curiosament, aquestes fosforilacions persisteixen durant el cycle cel·lular i formen una unitat estructural essencial d'HP1α per assegurar la seva unió a cromatina¹⁰⁵.

El CSD està implicat en l'homo- i heterodimerització i com a resultat, en la interacció amb altres proteïnes (Figura I12). L'estructura del dímer crea una interfase formada per residus conservats i únics en aquest domini que poden acomodar proteïnes que contenen la seqüència consens PXVXL^{100,102}. Aquest domini és específic de la família d'HP1¹⁰¹.

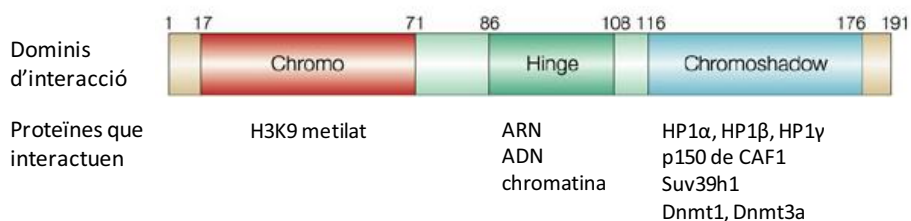


Figura I12. Dominis d'HP1 de ratoli i interacció amb diferents factors. Aquest esquema representa els tres dominis d'HP1: CD, CSD i la regió "hinge", i alguns dels components amb els que interacciona cadascun dels quals són importants per a l'estabilitat dels dominis d'heterocromatina¹⁹.

Suv39h1 interacciona amb HP1 gràcies a la dimerització del domini CSD tot i que Suv39h1 no conté la seqüència consens. HP1 interacciona amb el CD de Suv39h1⁸⁶. Aquesta interacció es veu abolida per mutacions en residus específics de cada isoforma d'HP1 en el CSD. Les proteïnes d'HP1 també es dirigeixen a la cromatina gràcies a aquesta interacció i també a través de la interacció amb H2A.Z i H1¹⁰⁶.

El CSD i el CD comparteixen una alta identitat de la seqüència d'aminoàcids tot i tenir diferents funcions. L'alt grau de similitud suggereix que els gens que codifiquen HP1 podrien originar-se a partir de la duplicació d'una d'aquestes seqüències dels dominis¹⁰⁰.

La regió “hinge” és la menys conservada d’HP1. Conté una seqüència de localització nuclear. La regió hinge és la responsable de la unió a ARN i ADN. Ha estat demostrat que modificacions en aquesta regió afecten a la localització, interaccions i funció. La regió “hinge” podria ser una regió de control central en la regulació de les proteïnes d’HP1¹⁰⁰. Una de les modificacions en aquesta regió que afectarien la localització d’HP1 α és la sumoilació. Aquesta modificació postraduccional podria promoure la unió d’HP1 a l’ARN *in vivo*¹⁰⁷. La desumoilació causada per SENP7, localitzada als dominis pericèntrics enriquits d’HP1, podria afavorir el manteniment HP1 α en aquests dominis¹⁰⁸.

Tot i així, s’han descrit modificacions postraduccionalment específiques de cada isoforma i la interacció d’aquestes amb diferents proteïnes; això explicaria la diferent localització i diferent funció de les isoformes a nivell general. En absència de cadascuna de les isoformes d’HP1 s’observen fenotips diferents en ratolins cosa que reafirma la diferent funcionalitat d’aquestes proteïnes.

Modificacions postraduccionalment a les isoformes d’HP1

Les isoformes d’HP1 són regulades per modificacions postraduccionalment com la fosforilació, acetilació, ubiquïtinització, sumoilació i formilació¹⁰⁹. Per exemple, en mamífers, la fosforilació d’HP1 α , HP1 β i HP1 γ , és una de les PTM més estudiades d’aquests enzims, sent un dels mecanismes a través del qual es regula la seva funció.

La fosforilació a la regió N-terminal d’HP1 α té un paper important en la seva localització a cromatina. La fosforilació de la serina 83 d’HP1 γ per la PKA (proteïna kinasa A), afecta l’activitat de silenciament d’aquesta i serveix com a marcador per l’elongació transcripcional¹⁰⁵ definint una subpoblació d’aquesta isoforma exclusiva per eucromatina. HP1 γ fosforilada interacciona amb Ku70, una proteïna implicada en la reparació del trencament de doble cadena de l’ADN, mentre que la isoforma α interacciona amb Ku70 en estat desfosforilat^{110,111}.

En el cas d'HP1 β , sota condicions de dany, està fosforilada per la CK2 (caseïna quinasa 2) al residu tirosina 51 localitzat al domini chromo. HP1 α i HP1 γ també són reclutades en llocs de dany a l'ADN però sense aquesta modificació específica de residu⁷⁸. Altres estudis demostren que S89 a la regió hinge i S175, la qual és única per HP1 β entre les tres isoformes d'HP1, són els principals llocs de modificació. HP1 β fosforilada a S89 i S175 conserva la seva activitat fonamental d'unió a les histones i cromatina¹¹².

Canvis en la fosforilació de HP1 α i HP1 β poden ser conduïts per l'activació de c-Raf, a part de conduir a la inducció estable de H3K9me3, resultant així en una heterocromatinització alterada del genoma¹⁰⁹.

Substrats d'HP1 α , HP1 β i HP1 γ

Les isoformes d'HP1 són capaces d'interaccionar amb una gran varietat de proteïnes implicades en diversos processos biològics. Aquestes interaccions poden ser específiques de cada isoforma o generals, per totes tres isoformes (Taula I3). Per tant, podem parlar d'exemples tan diversos com:

Les metiltransferases d'ADN Dnmt1 i Dnmt3a, implicades en la metilació de CpG¹⁹, i Suv39h1, amb la qual s'uneixen, reforcen un estat repressiu de la cromatina gràcies a la interacció amb les tres isoformes d'HP1.

En canvi, HP1 α forma un complex amb el factor remodelador de la cromatina BRG1, que no es forma ni amb HP1 β ni amb HP1 γ . La regió que confereix aquesta unió al CSD d'HP1 α és crítica per a l'activitat de silenciament d'aquesta isoforma¹¹³.

PROTEÏNA	ISOFORMA D'HP1	DOMINI
Reguladors transcripcionals o proteïnes modificadores de la cromatina		
Histone H1	HP1	ND
Histone H3	HP1, HP1 ^{Mm} α , HP1 ^{Mm} β , HP1 ^{Mm} γ	CD
Methyl K9 Histone H3	Swi6, HP1, HP1 α , HP1 β , HP1 γ	CD
Histone H4	HP1, HP1 ^{Mm} α	CSD
SUV39H1	HP1, HP1 α , HP1 β , HP1 γ	CSD
Polycomb	HP1 ^{Hs} α , HP1 ^{Hs} γ	CSD
Dnmt3a	HP1 ^{Mm} α	ND
Dnmt3b	HP1 α , HP1 β	ND
Kap-1/Tif1 β	HP1 α , HP1 β , HP1 γ	CSD
Rb	HP1 ^{Hs} γ	ND
MITR	HP1 ^{Mm} α	Linker
BRG1	HP1 ^{Mm} α	CSD
ATRx	HP1 ^{Mm} α , HP1 ^{Mm} β	CSD
TAF _{II} 130	HP1 ^{Hs} α , HP1 ^{Hs} γ	CSD
PIM1	HP1 ^{Hs} γ	CSD
Proteïnes de replicació i reparació del DNA		
CAF-1p150	HP1 α , HP1 β	CSD
Ku70	HP1 ^{Hs} α , phosphoS83-HP1 ^{Hs} γ	CSD, Linker
ORC1-6	HP1	CD, CSD
Altres proteïnes associades al cromosoma		
Psc3	Swi6	CD
INCENP	HP1 ^{Hs} α , HP1 ^{Hs} γ	Linker
Hsk1/CDC7	Swi6	ND
Ki-67	HP1 ^{Mm} α , HP1 ^{Mm} β , HP1 ^{Mm} γ	CSD
SP100	HP1 ^{Hs} α , HP1 ^{Hs} β , HP1 ^{Hs} γ	CSD
Proteïnes d'estructura nuclear		
Nuclear envelope	HP1 ^{Mm} α , HP1 ^{Mm} β , HP1 ^{Mm} γ	CD
Lamin B receptor	HP1 ^{Hs} α , HP1 ^{Hs} β , HP1 ^{Hs} γ	CSD
Lamin B	HP1 ^{Mm} β	CD
LAP2 β	HP1 ^{Mm} β	CD

Taula I3. Exemples de proteïnes que interaccionen amb les isoformes d'HP1. HP1, es refereix a HP1 de *Drosophila*; HP1 α , HP1 β and HP1 γ s refereix a ratolí i humà a no ser que s'especifiqui (Mm, ratolí; Hs, humà); ND, no determinat. Adaptat de¹⁰⁰.

També ha estat descrita la interacció d'HP1 α amb el supressor de tumors Rb el qual està implicat en la repressió transcripcional. Funcionalment Rb interactua amb factors clau en la biologia de l'heterocromatina com Suv39h1, Dnmt1 i components del complex de remodelació de la cromatina SWI/SNF, a part de l' HP1 α . La pèrdua de Rb fa disminuir la mobilitat d'HP1 α i que desaparegui la trimetilació d'H4K20 en els dominis d'heterocromatina. Per tant, fa que HP1 α estigui més associada a heterocromatina en absència d'aquesta¹¹⁴. La interacció amb Rb també s'ha descrit amb HP1 γ ¹¹⁵.

Localització de les isoformes d'HP1

Tot i la similitud entre les isoformes d'HP1, aquestes mostren un patró heterogeni de localització intracel·lular d'acord amb la presència d'una àmplia varietat de molècules amb les que interactuen¹⁰¹.

En la interfase, HP1 α es localitza a heterocromatina, HP1 β part a heterocromatina i part a eucromatina i HP1 γ majoritàriament a eucromatina (Figura I13).

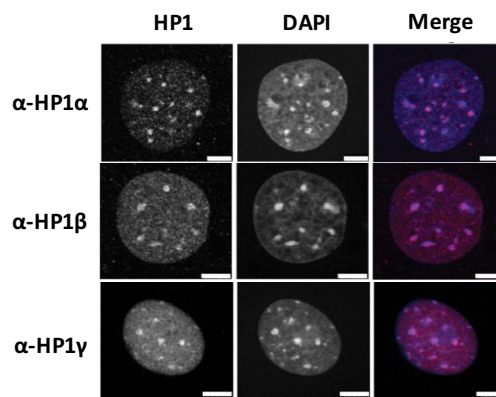


Figura I13. Localització de les isoformes en el nucli de cèl·lules MEFs. IF que mostra la localització de les proteïnes d'HP1 endògenes (primera columna). Tinció amb DAPI (segona columna). MERGE (tercera columna). Adaptació figura suplemental¹¹⁶.

Aquesta localització pot variar també segons la fase del cicle cel·lular o l'etapa del desenvolupament en que es trobi la cèl·lula.

Durant la mitosi, una fracció d'HP1 α , però no HP1 β ni HP1 γ , està retinguda a la regió pericentromèrica dels cromosomes, on es porten a terme funcions importants per a la cohesió del centròmer i la formació del cinetocor i podria ser necessari per identificar i definir aquesta àrea especialitzada de l'heterocromatina en tot el cicle cel·lular¹¹⁷. Durant aquesta fase, però, la majoria de proteïnes d'HP1 són alliberades de la cromatina gràcies a la fosforilació transitòria de la serina 10 de la histona H3, per part de la kinasa mitòtica Aurora B. Aquesta modificació és suficient per expulsar les proteïnes HP1 dels seus llocs d'unió i permetre l'accés dels factors necessaris per a la mediació de condensació de la cromatina i l'adequada segregació de cromosomes durant la mitosi¹¹⁸.

Recentment s'ha descrit que durant la divisió cel·lular mitòtica, en la fase G₂/M, HP1 γ colocalitza i és fosforilada en la serina 83 (Ser83) per l'Aurora A, sent aquesta fosforilació necessària per a la correcta execució de la divisió cel·lular¹¹⁹.

Respecte el desenvolupament, la majoria de cèl·lules indiferenciades tenen un fenotip d'HP1 α i γ difús, en canvi HP1 β es manté localitzada a les regions d'heterocromatina¹⁰³.

La localització de les isoformes d'HP1 als foci d'heterocromatina també pot variar segons la presència o absència d'altres proteïnes importants en aquestes regions. Per exemple, la pèrdua de Suv39h1/h2 deslocalitza completament les isoformes d'HP1 en les regions d'heterocromatina¹¹⁶.

Particularment interessant és el cas d'HP1 γ , ja que necessita la presència de les isoformes α i β d'HP1 per localitzar-se als foci d'HC en MEFs. Al doble KO per aquestes dues isoformes, HP1 γ es troba difusa pel nucli. Contràriament, la localització de H3K9me3 i Suv39h1 es manté tant en presència com en absència d'HP1 α i HP1 β indicant que els territoris d'heterocromatina no estan afectats per l'absència d'aquestes dues isoformes¹⁰³.

Funcions i implicacions d'HP1

La contínua llista en expansió de proteïnes que interactuen amb HP1 indiquen que podria estar involucrat en la regulació de més processos biològics que els estrictament relacionats amb la formació d'heterocromatina. Entre aquests: replicació de l'ADN, reparació del dany a l'ADN i activació de la transcripció en regions eucromàtiques^{105,109}.

HP1 assegura l'estabilitat dels dominis d'heterocromatina a través de la seva unió transitòria a la cromatina i el seu intercanvi dinàmic³². A més a més, s'ha descrit que la pèrdua d'aquesta causa defectes de segregació cromosòmica i, concretament en absència de la isoforma β , letalitat¹²⁰.

Estudis recents en cèl·lules de mamífer relacionen HP1 amb el reclutament de cohesines a l'heterocromatina pericèntrica a través de la interacció amb Suv420¹²¹.

HP1 també ha estat implicat en el manteniment i estabilitat del telòmer ja que s'ha demostrat la localització d'HP1 γ als telòmers a la fase S on aquest és requerit per establir i mantenir la cohesió. A més, el lloc d'unió d'HP1 a TIN2 (media la funció telomèrica en humans) és necessari per a la cohesió dels telòmers germans i pot impactar en el manteniment de la longitud dels telòmers per la telomerasa¹²².

Tant l'HP1c de *Drosophila* com l'HP1 γ en mamífers, s'han trobat en dominis de la cromatina activa on interaccionen i colocalitzen amb l'ARN polimerasa II (RNAPol II), relacionant-se amb la regulació de la transcripció^{123,124}, com ja s'ha esmentat anteriorment.

El reclutament per part d'HP1 de factors de replicació d'ADN ha demostrat ser important per a la replicació de l'heterocromatina pericèntrica en ratolí. HP1 s'associa amb proteïnes implicades en la replicació de l'ADN com el factor d'ensamblatge de cromatina CAF1¹⁰⁹, així com amb diversos membres del complex de l'origen de replicació. Com que l'heterocromatina pericèntrica és replica relativament tard, l'associació d'HP1 amb aquestes proteïnes pot ser crucial per assegurar una adequada finalització de la replicació de l'ADN en les últimes etapes de la fase S en cèl·lules eucariotes¹²⁵.

Les isoformes d'HP1 estan implicades en la reparació del dany a l'ADN a través de la seva reclutació als llocs afectats, per exemple, per estrès. Majoritàriament implica la seva interacció directa amb CAF1¹⁰⁹. Degut al dany, les isoformes d'HP1 desencadenen la seva dissociació transitòria de la cromatina per facilitar la resposta al dany a l'ADN¹²⁶. Les isoformes estan implicades en vies de reparació del dany a la doble cadena de l'ADN, incluint la recombinació homòloga (HR) i l'anellament de cadena simple (SSA). Estudis recents descriuen que HP1 α i HP1 β estimulen HR i SSA, en canvi HP1 γ té un paper inhibitori¹²⁷.

HP1 també està relacionada amb tumorigènesis. Alguns estudis descriuen que nivells reduïts estan associats amb la progressió del càncer de mama i el de medulloblastoma, entre d'altres^{78,128}. Contràriament, altres autors relacionen l'expressió de les isoformes d'HP1 amb càncer com per exemple en el de pròstata on HP1 β i HP1 γ es troben incrementades¹²⁹.

Estudis en ratolins KO per cada una de les isoformes han donat lloc a diferents fenotips demostrant que les proteïnes d'HP1 no són funcionalment redundants a nivell global de la cèl·lula¹⁰².

Als estudis per entendre la funció d'HP1 α no s'ha vist cap alteració en els ratolins amb la mutació nul·la de Cbx5. Per tant, no sembla tenir cap funció imprescindible per la viabilitat cel·lular que no puguin compensar les altres isoformes. Són indiferenciables dels WT, indicant que la seva funció és redundant¹³⁰.

Respecte HP1 β té un paper molt important en el desenvolupament ja que la mutació nul·la de Cbx1^{-/-} provoca letalitat perinatal¹³¹. La pèrdua d'aquesta isoforma condueix a un defectuós desenvolupament neuromuscular i de l'escorça cerebral. El defecte en aquest últim és probable que sigui el resultat d'un alt increment en l'instabilitat genòmica¹⁰². Per tant, el fenotip nul de Cbx1 en ratolins és més greu que el de Suv39h1/h2 doble mutant¹³¹.

En cèl·lules Cbx3hypo (nivells molt reduïts d'HP1 γ), es produeixen defectes en l'espermatogènesis. Per tant, HP1 γ s'ha descrit ser requerida per una adequada renovació i supervivència de les cèl·lules germinals¹³⁰.

No obstant, diferències entre les tres isoformes d'HP1 a nivell de foci d'HPC encara no han estat descrites.

Formació d'heterocromatina constitutiva: Suv39h1 i HP1

En mamífers, la formació d'heterocromatina i silenciament gènic es podria dur a terme a través del reconeixement per part de factors de transcripció de seqüències específiques d'ADN com elements d'ADN repetitius, concretament grups de seqüències satèl·lit i elements de transposició, que es troben en els centròmers i telòmers¹³². Els factors de transcripció reprimarien la producció d'ARN dels major satèl·lits mitjançant l'associació amb l'ADN dins de l'heterocromatina pericèntrica¹³³. Aquests mecanismes basats en l'ADN poden cooperar amb els mecanismes basats en l'ARN, el qual és un component estructural important en HPC, per acoblar eficientment a l'heterocromatina. A més a més, els transcrits generats a partir dels major satèl·lits també podrien estar implicats a la formació i silenciament de l'heterocromatina.

Aquests factors ajudarien a reclutar enzims modificants d'histones com HMT i metilarien els nucleosomes necessaris pel reclutament d'HP1 (Figura I14).

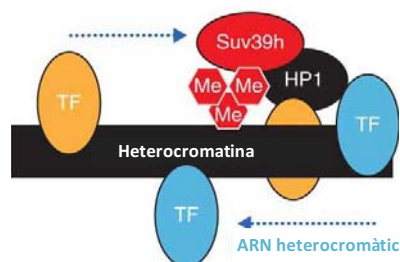


Figura I14. Model de formació d'heterocromatina. Es proposa un model a partir de la unió de factors de transcripció (TF) a les seqüències repetitives d'ADN de l'HC i el posterior reclutament d'HMT i HP1¹³³.

Un cop reclutat l'HP1, aquest successivament reclutaria Suv39h que metil·laria específicament H3K9 formant llocs d'unió per molècules d'HP1 i així s'aniria propagant en els successius nucleosomes donant lloc a la formació d'HC³.

Recentment s'han descrit factors que intervenen en el reclutament de Suv39h a través de la interacció amb les seqüències repetitives dels major satèl·lits. Aquests factors són els factors de transcripció Pax3 i Pax9. Ambdues proteïnes són necessàries per reprimir els transcripts no codificants de les repeticions de major satèl·lits.

Les proteïnes d'HP1 no només promouen la propagació de l'heterocromatina, sinó també el reclutament de complexos de proteïnes amb diverses activitats enzimàtiques essencials per a la formació d'aquesta. La presència de nombrosos efectors que estan involucrats en diferents processos cromosòmics en el domini d'heterocromatina contribueix a l'actuació de l'heterocromatina com una plataforma dinàmica. Per exemple, l'heterocromatina podria servir per reclutar factors implicats en diversos processos com ara el "cell-type switching", la cohesió de cromàtides germanes i el silenciament de la transcripció gènica, entre d'altres^{134,132}. Un exemple d'interacció amb les isoformes d'HP1 és el dels enzims Suv420h (Suv420h1.1, Suv420h1.2 i Suv420h2), aquesta interacció suggereix un mecanisme seqüencial d'establir trimetilació d'H3K9 i H4K20 a heterocromatina pericèntrica⁶⁶. A més a més, trobem també que Suv4-20h2, a part de Suv39h1, és crucial pel reclutament del complex de cohesines a heterocromatina pericèntrica per la cohesió de cromàtides germanes i la correcta segregació cromosòmica. El que demostra que la via d'heterocromatina és important per a l'establiment adequat dels nivells de cohesina pericèntrica (Figura I15)⁵⁶.

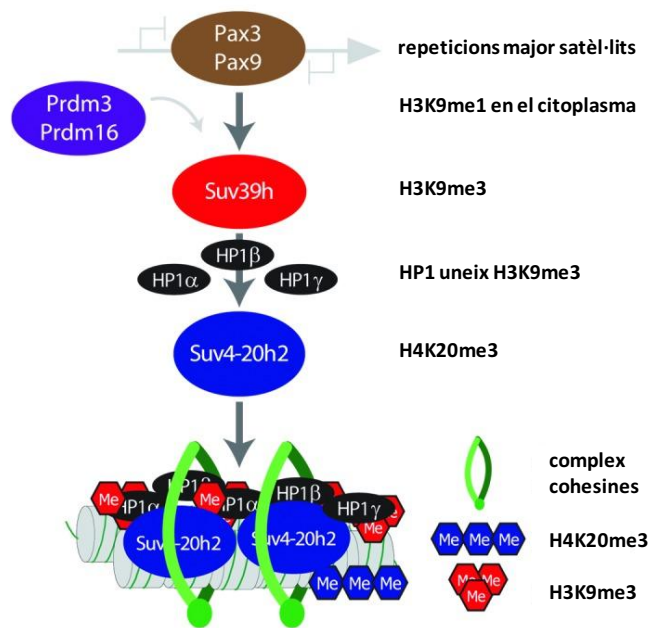


Figura I15. Via per la formació d'heterocromatina. Esquema de l'actuació seqüencial dels diferents enzims i factors necessaris per la formació d'heterocromatina i el reclutament de cohesines⁵⁶.

Localització “de novo” d'HP1 a l'HC per la seva formació

S'ha descrit la localització “de novo” d'HP1α a heterocromatina pericèntrica gràcies a la sumoilació d'aquesta isoforma. HP1 sumoilat reconeix i s'uneix als transcrits de major satèl·lits, establint-se en aquesta regió a través del reconeixement de la metilació d'H3K9 per part de Suv39h. L'acumulació d'HP1 implica un bucle en el qual l'HP1α nou s'uneix directament a la cromatina per multimeritzar amb altres molècules d'HP1α o per associar-se amb altres proteïnes i amb H3K9me3, propagant així la formació d'heterocromatina pericèntrica (Figura I16)¹⁰⁷.

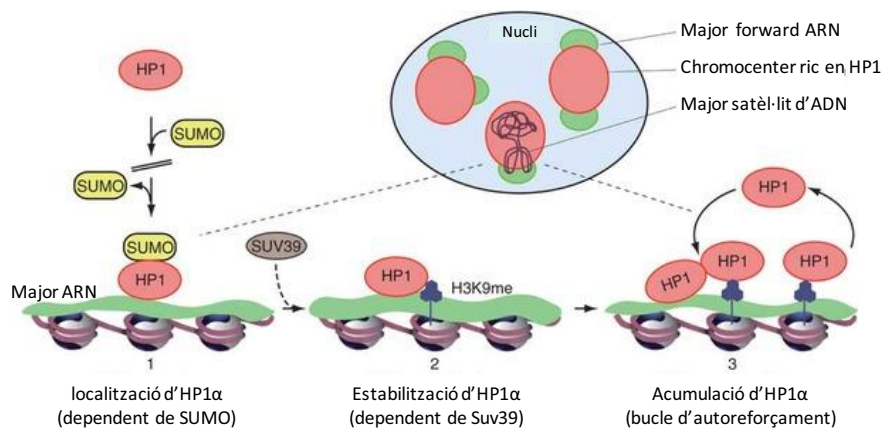


Figura I16. Model de la localització “de novo” d'HP1α a l'heterocromatina pericèntrica. Representació esquemàtica del nucli amb dominis pericèntrics enriquits amb HP1 (rosat) i els major RNA (verd). I ampliació d'aquest on s'il·lustren les proteïnes i modificacions implicades en aquest procés de nova localització d'HP1 en aquestes regions d'heterocromatina pericèntrica i progressió de la formació d'aquesta¹⁰⁷.

HC a la replicació de l'ADN

Els dominis d'heterocromatina repliquen durant la fase S i l'ADN recentment sintetitzat ha de conservar els trets epigenètics de l'heterocromatina. Per això les regions pericentromèriques poden descondensar per permetre l'entrada de la maquinària de replicació de l'ADN, no obstant, una vegada que la heterocromatina ha estat replicat, ha de ser re-silenciada novament. La concentració total d'HP1 es manté en les regions d'heterocromatina pericèntriques i s'associa amb proteïnes implicades en la replicació de l'ADN com CAF1, un complex de 3 subunitats (p150, p60, p48) que media la deposició d'histones H3 i H4 sobre l'ADN recentment replicat en ambdues regions eucromàtiques i heterocromàtiques¹⁰⁹. La metiltransferasa d'H3K9 SETDB1 s'associa al complex HP1-CAF1 per metilar la histona H3 sintetitzada de nou per tal de poder ser un nou substrat per Suv39h1/h2 en regions pericèntriques.

CAF1 i SETDB1 suggereix un mecanisme molt coordinat per assegurar la propagació de H3K9me3 en heterocromatina pericèntrica durant

la replicació de l'ADN¹³⁵. La interacció d'HP1-CAF1 també es requereix per la progressió de la fase S en cèl·lules de ratolí. HP1 α murí i humà també pot interactuar amb les múltiples subunitats d'ORC i aquest pot participar en l'establiment de silenciament heterochromàtic¹⁰⁹.

No obstant, no es sap la implicació específica de cada isoforma en l'organització i regulació del foci d'heterocromatina constitutiva.

Manteniment de l'estabilitat genòmica sota condicions d'estrès: Paper de SirT1

Tots els organismes han d'adaptar-se als canvis ambientals, en particular els que afectem al metabolisme o a l'homeostasi energètica. Aquestes condicions indueixen una resposta protectora coordinada, cosa que implica l'ús dels recursos disponibles de manera més eficient i assegura l'estabilitat genòmica¹³⁶. Aquests processos abarquen dues dianes principals: els mitocondris i la cromatina, que estan estretament vinculats amb el control de l'envelliment i la vida mitja⁴⁶. Les dades obtingudes durant l'última dècada han suggerit que els membres de la família de les sirtuïnes són importants en la detecció i la coordinació de les respostes dirigides a la cromatina i als mitocondris¹³⁷.

Les sirtuïnes controlen la integritat genòmica de la cèl·lula per fer front a aquests efectes perjudicials a través de diferents mecanismes cel·lulars com s'ha comentat anteriorment. La majoria de vies impliquen un paper directe en funcions relacionades amb cromatina. Per tant, és molt important la regulació de l'estructura de la cromatina en el manteniment de l'estabilitat genòmica¹³⁸.

S'ha descrit a través d'estudis en ratolins KO per les diferents sirtuïnes, que les SirT1-4 i 6, SirT3 i SirT4 a través del metabolisme, són les que estan implicades en el manteniment de l'estabilitat genòmica, ja que els resultats mostren clarament l'augment dels nivells de la inestabilitat genòmica, com indiquen els alts nivells de dany a l'ADN, la reparació defectuosa de l'ADN i les aberracions cromosòmiques⁴⁵.

Descripció i estructura de SirT1

SirT1 és la més estudiada de les sirtuïnes, mostra la més àmplia gamma de funcions, així com la més àmplia varietat de substrats entre les sirtuïnes⁵.

La desacetilasa SirT1 humana conté un cor catalític conservat en les sirtuïnes i ambdues extensions N- i C- terminals serveixen com a plataformes per interaccionar amb proteïnes reguladores i substrats, la qual cosa fa que pugui estar implicada en moltes funcions. També conté dues senyals de localització nuclear i dues d'exportació nuclear⁴³. Per tant, tot i ser una proteïna nuclear, la localització de SirT1 pot variar segons el tipus cel·lular, etapa de desenvolupament i condicions d'estrès.

SirT1 s'expressa en tots els òrgans però és més prevalent en els teixits més energèticament dependents com per exemple en múscul o teixit adipós⁵.

Regulació de SirT1

SirT1 pot estar regulada a través del control de la seva expressió gènica per factors de transcripció com, per exemple, E2F1 el qual s'uneix directament al promotor de SirT1 incrementant la seva expressió gènica. Successivament, la funció de desacetilació de SirT1 inhibeix l'activitat transcripcional d'E2F1^{40,139}. Un altre cas és el supressor de tumors p53 que en resposta a estrès i sota condicions de dejú s'uneix amb el factor de transcripció FOXO3a estimulando l'expressió de SirT1, contràriament, sota condicions normals la reprimeix. També c-Myc incrementa l'expressió gènica de SirT1, i successivament SirT1 media la desacetilació de c-Myc permetent la degradació proteica d'aquest⁴⁰.

L'activitat de SirT1 també pot ser regulada per modificacions posttraduccionals com la fosforilació per part de la cyclinB/Cdk1, d'una manera dependent de cicle cel·lular, reduint l'activitat de la desacetilasa¹⁴⁰; SirT1 també pot ser fosforilada per la quinasa associada a l'estrès JNK2 (c-Jun N-terminal kinase 2), una fosforilació associada amb la regulació de la

seva estabilitat proteica¹⁴¹; i per la CK2 (casein kinase 2) que juntament amb SirT1 són reguladors clau de funcions biològiques similars incluint remodelació de la cromatina, progressió del cicle cel·lular, i supervivència o apoptosi¹⁴². Múltiples llocs conservats de fosforilació s'han identificat dins de SirT1 els qual són dianes potencials per una varietat de kinases com ATM, CK1 (casein kinase 1), DNA-PK (DNA-depenent proteïna kinase), entre d'altres¹⁴³.

D'altra banda, a més de la fosforilació, sembla que la S-nitrosilació de SirT1 afecta l'activitat catalítica de l'enzim¹⁴⁴.

També la sumoilació de SirT1 regula la seva activitat enzimàtica activant-la. L'exposició de cèl·lules a diferents tipus de condicions d'estrès com irradiació UV o peròxid d'hidrogen resulta en una desumoilació de SirT1 mediada per la SENP1 (desumoylase sentrin-specific protease 1) i la inactivació de la seva funció desacetilasa⁴⁰.

SirT1 també pot estar regulada per altres factors com pot ser la ratio $NAD^+/NADH$. Els nivells de NAD^+ augmenten en teixits de mamífer en resposta a estressos relacionats amb energia o nutrient com l'exercici, el dejuni, o la restricció calòrica i fa que l'activitat de SirT1 es vegi reforçada¹⁴⁴.

Funcions en les que està involucrada SirT1 i les altres sirtuïnes

Les sirtuïnes, a part del seu paper principal en el manteniment i formació de l'heterocromatina, estan implicades en una àmplia quantitat de funcions biològiques com en la supervivència cel·lular, reparació de l'ADN, regulació metabòlica, diferenciació cel·lular i desenvolupament, estabilitat genòmica, estabilitat dels telòmers i organització de la cromatina sota estrès. Les sirtuïnes modulen totes aquestes vies cel·lulars a través de la regulació de la funció de substrats histònics i no histònics com factors de transcripció, enzims metabòlics i maquinària de la cromatina, entre d'altres^{5,41,145}. Molts d'aquests papers en els que estan implicades les sirtuïnes, són executats a

través de l'expressió gènica, i per tant, a través de la regulació de la cromatina⁵.

Funció de SirT1 en la formació d'HF

Una de les principals funcions de SirT1 es el seu paper en el silenciament gènic i formació d'heterocromatina. SirT1 es va relacionar amb heterocromatina al veure que tenia una forta activitat desacetilasa *in vitro*, especialment per H4K16Ac i H3K9Ac. Estudis d'ARNi van revelar que la pèrdua de SirT1 es correlacionava amb un augment global de H4K16Ac i H3K9Ac, juntament amb una pèrdua de marques d'heterocromatina tals com H3K9me3 i H4K20me1¹⁴⁶.

SirT1 està implicada en la formació d'HF a través d'interaccions amb una varietat de proteïnes associades a la cromatina, com factors de transcripció i coreguladors.

Sota el reclutament a cromatina, SirT1^{5,145} coordina la formació d'HF desacetilant H4K16Ac i H3K9Ac, també com el reclutament i desacetilació d'H1K26Ac i correlaciona amb una pèrdua de la marca activa H3K79me2. Seguidament SirT1 recluta i desacetila Suv39h1 promovent la metilació d'H3K9me3. H3K9me3 és reconegut per la proteïna estructural d'heterocromatina HP1 a través del seu domini chromo, establint les bases de l'estructura de l'heterocromatina^{44,146} (Figura I17).

SirT1, promou l'establiment de marques d'heterocromatina, com s'ha comentat, d'H3K9me3, però també de l'H4K20me1, les propaga en tota la regió de codificació del gen^{5,31}.

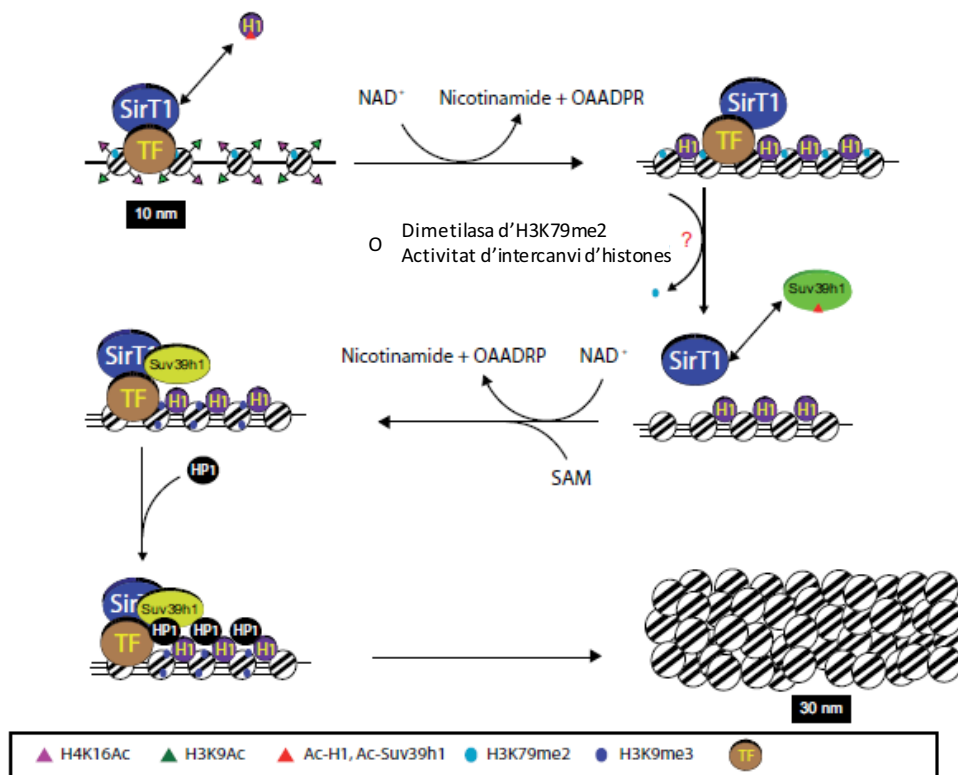


Figura I17. Model la formació d'heterocromatina facultativa mitjançant SirT1. Esquema del procés de propagació de l'HF iniciada pel reclutament de SirT1 per factors de transcripció, seguit de la desacetilació d'histones per part de SirT1 i el reclutament d'H1 (part superior) i de Suv39h1 (part intermitja) el qual atreu HP1 a través de la modificació produïda (H3K9me3) desencadenant-se la propagació de l'heterocromatina⁵.

Funció de SirT1 a l'HC

La rellevància de la relació entre SirT1 i Suv39h1 va més enllà de l'HF, també afecta l'HC, que dona suport a un paper general de SirT1 en la organització global de les dues formes d'heterocromatina dels mamífers.

En treballs previs del grup, fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) derivats de ratolins SirT1^{-/-} mostren una pèrdua completa dels nivells d'H3K9me3 i d'HP1α al foci d'HC en aproximadament el 50% de les cèl·lules (Figura I18A,B), demostrant una implicació directa en aquest fenotip. Però el fet de que en condicions normals SirT1 mai s'ha trobat en els foci d'HC en

estudis d'immunofluorescència (Figura I18C), fa que no estigui clar com SirT1 promou la metilació d'H3K9 en aquestes regions⁵ suggerint que aquesta relació és més complexa i va més enllà d'una simple interacció.

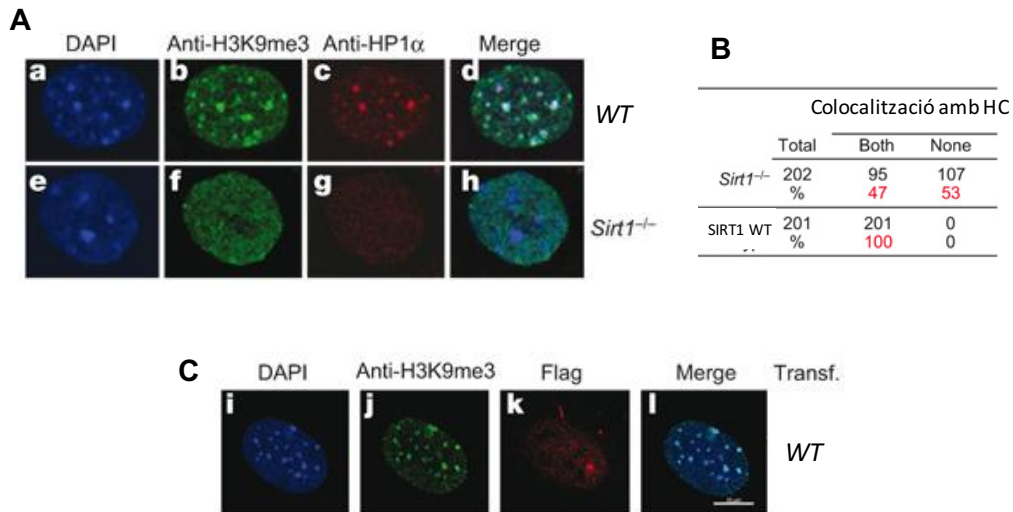


Figura I18. Relació entre SirT1 i Suv39h1 *in vivo*. **A** IF de MEFs WT i *Sirt1*^{-/-} on es detecta la distribució de DAPI (a, e), H3K9me3 (b, f) i HP1 (c, g). Una imatge fusionada d'ells es mostra (d, h). **B** La quantificació de cèl·lules a (A). **C** MEFs WT van ser transfectades amb SirT1, i es van analitzar per immunofluorescència per a la distribució de H3K9me3 (j), etiqueta Flag (k), i la tinció amb DAPI (i). Una imatge fusionada de DAPI i H3K9me3 es mostra (l). Les imatges que es mostren són representatives de l'experiment. Es va verificar la col·localització d'HP1 i H3K9me3 sobre DAPI. Les cèl·lules que mostren col·localització es van expressar com una freqüència del nombre total de cèl·lules⁷².

Altres funcions de SirT1

SirT1 té un paper important en el manteniment de l'estabilitat genòmica ja que en cèl·lules *Sirt1*^{-/-} s'observa una condensació cromosomal reduïda en la metafase, la qual interfereix amb la progressió mitòtica, conduint a ruptures cromosòmiques, desigual segregació cromosòmica i aneuploïdies⁴⁵.

El paper de SirT1 en el manteniment dels telòmers en els mamífers a creat una certa controvèrsia. D'una banda, hi ha evidències que suggereixen que SirT1 inhibeix l'activitat de la telomerasa a través d'un paper traduccional en l'estabilitat de la subunitat catalítica TERT, mentre que per l'altra banda, els resultats de cèl·lules SirT1^{-/-} revelen que l'esgotament de SirT1 resulta en l'augment de la inestabilitat del genoma i en aberracions telomèriques que contribueixen a la disminució de creixement cel·lular⁴¹.

SirT1 és important en la viabilitat ja que la pèrdua d'aquest resulta en la mort prenatal o perinatal en la meitat dels individus, i la meitat restant pateixen defectes en la gametogènesi i esterilitat, i altres tipus de problemes⁵.

SirT1 contribueix en la progressió del cycle cel·lular, senescència o apoptosi a través de la interacció, a diferents nivells, amb p53, que va ser el primer substrat identificat per SirT1 en mamífers. Durant el cycle cel·lular els nivells de SirT1 correlacionen positivament en la divisió cel·lular i disminueixen a la sortida. Uns altres substrats de SirT1 són FOXO3 i FOXO4. Aquests són desacetilats sota estrès induïnt la parada del cycle cel·lular en lloc de l'apoptosi⁴⁰. SirT1 també controla el cycle cel·lular a través de la regulació de Rb i d'E2F1 desacetilant-los i consegüentment inhibint l'activitat proapoptòtica d'E2F1, i promovent la fosforilació de Rb inhibint la seva activitat per entrar a la fase S, induïnt així la proliferació cel·lular. A més, Rb forma un complex amb Suv39h1 i HDAC1, 2 i 3, suggerint una important relació entre Suv39h1 i SirT1. SirT1 també uneix i desacetila pRb participant en la via de pRb en resposta a estrès oxidatiu⁴⁵.

SirT1 també intervé en la reparació de diferents tipus de dany a l'ADN, incluint l'estrès oxidatiu. SirT1 és reclutat en llocs on es produeix el dany i modula l'expressió de gens implicats en la reparació de l'ADN⁴⁰. Per exemple, en mamífers, SirT1 promou la supervivència per la reparació de l'ADN per desacetilació del Ku70, que està implicat en la via NHEJ^{41,147}. A més a més, en DBS (dany en doble cadena), SirT1 recluta factors que participen en la procés de reparació del dany de l'ADN. SirT1 també participa en la reparació per escissió de nucleòtids (NER), la principal via de reparació que s'indueix pel dany causat pels raigs ultraviolats (UV)⁴⁵.

SirT1 també participa en la regulació metabòlica desacetilant directament enzims metabòlics nuclears com la isoforma ACS nuclear o

regulant la cromatina mitjançant la promoció de silenciament o activació específica de teixit d'un conjunt diferent de gens relacionats amb el metabolisme. Íntimament relacionat amb el sistema endocrí, SirT1 participa al programa d'expressió d'una àmplia varietat de receptors nuclears d'hormones i altres reguladors del metabolisme com PGC-1 α , (relacionat amb el metabolisme glucosídic) o PPAR- γ (del metabolisme lipídic)⁴¹.

SirT1 està implicat en desenvolupament a través d'EZH2. Ambdós formen part del complex PRC4 durant el desenvolupament en els mamífers⁴¹. A més, en ratolins KO de SirT1 s'ha demostrat que SirT1 és important pel desenvolupament, observant-se la hiperacetilació de p53 i indicant que SirT1 és crucial per a l'apoptosi mediada per p53. Ratolins mutants per SirT1 i per p53 desenvolupen tumors en múltiples teixits, fet que destaca el possible paper de SirT1 en la regulació de p53¹⁴⁴.

A més, SirT1 també està implicada en funcions específiques en les principals malalties neurodegeneratives. Té un paper neuroprotector en la malaltia d'Alzheimer, bloqueja l'acumulació de les proteïnes β -amiloide i tau en el cervell. En el Parkinson SirT1 evita l'agregació de "misfolded α -synuclein", mitjançant l'activació de les xaperones. Finalment en la malaltia de Huntington l'activitat desacetilasa de SirT1 redueix l'acumulació de la proteïna mutant tòxica de Huntington^{148,149}. L'absència de SirT1 dóna lloc a un deteriorament de la memòria, la funció cognitiva, i l'aprenentatge espacial, i l'expressió de gens importants per plasticitat sinàptica i el metabolisme es redueix¹⁴⁴.

Caldria destacar que SirT1 també està relacionada amb la malaltia cardiovascular, amb la lesió miocàrdica i amb l'arteroesclerosi^{148,150}.

SirT1 té un paper dual en tumorigènesis. Molts càncers humans exhibeixen nivells reduïts de SirT1 en comparació amb els controls normals i els ratolins mutants de SirT1 presenten una major incidència de càncer. Per tant, SirT1 pot actuar com un supressor de tumor a través del seu paper en la resposta al dany de l'ADN i la integritat del genoma^{144,151}. Però també hi ha estudis que indiquen que SirT1 també podria tenir un paper contrari i actuar com a oncogen⁴⁵.

Funcions de la resta de sirtuïnes

Respecte les altres sirtuïnes, per exemple SirT2, igual que SirT1, ajuda a mantenir l'estabilitat genòmica i actua com a supressor de tumors^{65,152}. Durant el cicle cel·lular, SirT2 desacetila H4K16Ac, important per entrar a la fase S i per la deposició de la monometilació d'H4K20, una marca del control del cicle cel·lular i estabilitat genòmica⁶⁵. En el cas de SirT6, la seva absència, en ratolins, mostra un fenotip d'envelliment, pateixen inestabilitat genòmica i tenen defectes metabòlics seriosos¹⁵³. També desacetila H3K9Ac i promou repressió gènica. SirT6 està implicat en el manteniment i funció dels telòmers. És una de les sirtuïnes més actives, juntament amb SirT1, en el control de reparació de l'ADN. SirT7 està associat amb gens d'rARN actius, implicat en la transcripció de l'ARN Pol I i ajuda a l'expressió de l'rARN per reprendre-la després de la mitosi¹⁵⁴. L'absència de SirT7 també promou un fenotip d'envelliment¹⁵⁵ com SirT6, i està associada amb un increment de sensibilitat a estrès oxidatiu, la qual cosa també suggereix una relació amb la protecció genòmica.

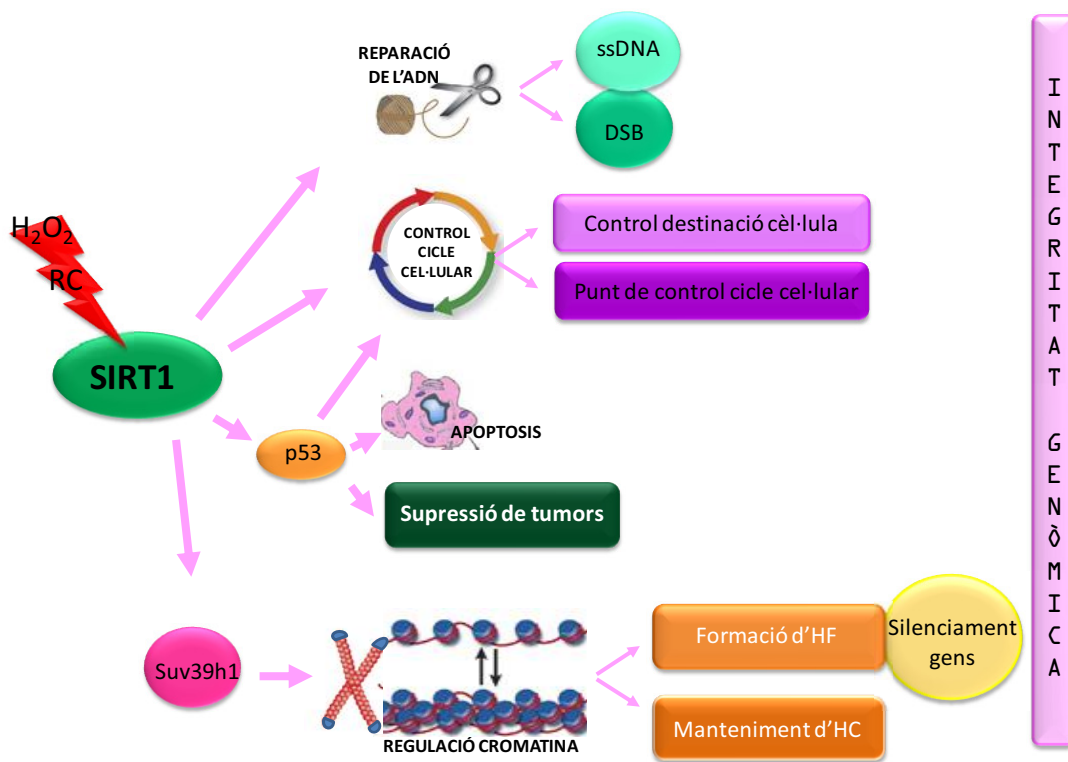
En el cas de les sirtuïnes mitocondrials: SirT3, promou longevitat, la seva absència en fibroblasts embrionaris de ratolí exhibeix una fisiologia mitocondrial anormal, inestabilitat genòmica i increment dels nivells de superòxid¹⁵⁶. També podria regular la cromatina, igual que SirT1, a través de la desacetilació d'H4K16Ac i H3K9Ac i a promotors de gens relacionats amb la resposta a estrès. Diferents estudis indiquen que actua com a supressor de tumors⁴⁵. També com SirT1, incrementa sota restricció calòrica¹⁵⁷. SirT4, influeix en la resposta del metabolisme cel·lular al mitocondri per dany a l'ADN i a la tumorigènesis com a supressor de tumors¹⁵⁸. SirT5 és important en el metabolisme mitocondrial¹⁵⁷.

Resposta de la cromatina sota estrès: actuació de SirT1

En un organisme, els diversos factors que contribueixen a la desestabilització del genoma i que comprometen durament la seva integritat inclouen diferents formes d'estrès, com ara l'estrès oxidatiu (que pot ser

causat per ROS), l'estrès genotòxic (incluint radiació ionitzant) i estrès metabòlic (com per exemple la restricció calòrica)⁴⁶.

El tema de les sirtuïnes i l'estrès ha estat molt estudiat ja que aquestes ajuden a coordinar la resposta davant d'estrès gràcies a la detecció de canvis en la proporció de $NAD^+/NADH$ que es deriva del fet de la seva activitat enzimàtica requereix NAD^+ ^{5,159}. L'adaptació davant l'estrès per controlar l'estabilitat genòmica, per part de SirT1, és portada a terme a través de diversos mecanismes (Figura I19), dels quals ens centrem en la regulació de l'estructura de l'HF i l'HC⁴⁵.



I N T E G R I T A T G E N Ò M I C A

Figura I19. SirT1 i mecanismes d'estabilitat genòmica sota estrès. Les sirtuïnes participen en múltiples mecanismes per mantenir l'estabilitat genòmica sota condicions d'estrès a través de la reparació de l'ADN, del control del cicle cel·lular, de la regulació de factors de transcripció i de la regulació de la cromatina a través de la formació de l'HF o de la reorganització de l'HC. Adaptació⁴⁵.

L'estrès (per exemple, restricció calòrica) pot requerir silenciament, el qual podria estar associat amb formació d'heterocromatina i l'herència

epigenètica. Totes les principals formes d'estrès que impliquen sirtuïnes podrien actuar a través d'aquest mecanisme, formant HF⁴⁵.

SirT1, a través de la formació d'HF, ajuda a regular l'expressió en resposta a l'estrès de diversos factors de transcripció, entre ells NF-κB, p53, HIF-1α, FOXO, E2F1 i HSF1^{160,161,162}. SirT1 promou silenciament epigenètic de les dianes regulades per aquests factors mitjançant la coordinació de diversos esdeveniments en col·laboració amb altres enzims responsables de les modificacions d'histones característiques d'heterocromatina i una consegüent propagació d'aquestes. SirT1 promou la propagació d'H3K9me3 a través d'una relació funcional amb Suv39h1 formant així l'HF⁷². Un clar exemple de formació d'HF induïda per SirT1, és la inhibició de l'expressió dels gens ribosomals sota estrès oxidatiu. Sota aquestes condicions SirT1, Suv39h1, i nucleometilina indueixen la formació d'HF en rADN, silenciant l'expressió de gens ribosomals i disminuint la producció cel·lular de proteïnes per tal de mantenir l'estabilitat genòmica^{163,164,165}.

Finalment podríem dir que durant la resposta a l'estrès, SirT1 té un paper molt important a l'HC i en l'establiment i manteniment de regions pericentromèriques i telomèriques⁴⁵. SirT1 està implicat en el manteniment de la integritat genòmica de l'HC sota condicions d'estrès a través d'un mecanisme que regula Suv39h1. Mecanisme el qual abarca la primera part d'aquest projecte.

Objectius

El nostre objectiu principal de la tesi és entendre els mecanismes de protecció de l'heterocromatina constitutiva sota condicions d'estrès.

Això s'ha traduït en dos subobjectius específics:

1.- Entendre la contribució de la cromatina per SirT1 en condicions d'estrès.

Considerant la importància de l'HC en l'organització global de la cromatina i en l'estabilitat genòmica i la implicació de SirT1 per fer front a condicions adverses, ens vam dirigir a entendre la relació funcional entre SirT1 i l'estructura de l'HC. A partir de la important relació descrita entre SirT1 i Suv39h1 en la formació de l'HF, es va observar que la relació entre aquestes dues proteïnes també és crucial per la formació d'HC⁷². Per tant ens centrem en entendre com respon la cromatina enfront a condicions d'estrès, a través de la relació entre SirT1 i Suv39h1 per tal de mantenir una adequada estructura en l'HC i preservar així la protecció genòmica.

2.- Demostrar si aquesta relació està conservada entre les isoformes d'HP1 i Suv39h1, ja que semblen regular Suv39h1 de la mateixa manera que SirT1 en l'HC.

Tenint en compte el coneixement de l'HC, que és mínim, els nostres estudis s'han centrat en entendre la seva estructura, a través de la caracterització del paper de les isoformes d'HP1, en condicions normals i d'estrès.

Resultats

Primera part

Sabem que SirT1 està implicat en la formació d'HF a través d'una relació funcional amb Suv39h1. Però SirT1 també regula l'HC depenent de Suv39h1 a través d'un mecanisme desconegut⁷².

Considerant la importància de l'HC en l'organització i estabilitat de la cromatina global, i les seves implicacions funcionals en l'envelliment i la durada de la vida¹⁶⁶, definir si i com SirT1 ajuda a mantenir l'estructura HC podria ser per a determinar les conseqüències durant la resposta a l'estrès en l'estabilitat del genoma.

Per aquest motiu, en aquesta primera part de la tesi, ens vam centrar en entendre la connexió entre SirT1 i l'estructura de l'HC a través de l'estudi de la relació entre SirT1 i Suv39h1, ja que com s'ha comentat anteriorment, aquesta relació és crucial per la formació d'HC.

SirT1 controla els nivells de proteïna Suv39h1

Primer de tot, vam caracteritzar una possible modulació dels nivells de Suv39h1 per part de SirT1, independentment de la regulació d'H3K9me3 ja estudiada en estudis previs del grup. Els resultats obtinguts van mostrar que un augment en els nivells de SirT1 en cèl·lules HeLa correlacionava consistentment amb nivells més alts ja sigui de Suv39h1 endogen o sobreexpressat a nivell de proteïna (Figura R1). Confirmant una regulació per part de SirT1 dels nivells de Suv39h1.

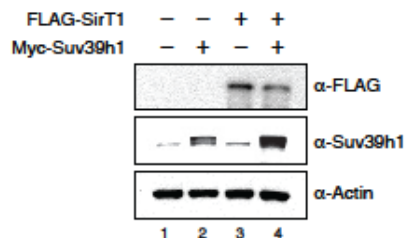


Figura R1. L'increment dels nivells de SirT1 es correlaciona amb nivells més alts de Suv39h1. Western blot de cèl·lules 293 transfectades amb els factors indicats. Els nivells de SirT1 (FLAG), Suv39h1 i actina van ser monitoritzats.

Per definir si aquest efecte era exclusiu a nivell de proteïna o si també es produïa a nivell d'ARN vam analitzar els nivells d'ARN de Suv39h1 de diferents mostres sobreexpressades amb Suv39h1+/- SirT1 o en MEFs SirT1^{-/-} els quals no van canviar com a conseqüència de la presència o absència de SirT1 (Figures R2A i R2B). Per tant, SirT1 exerceix el seu efecte a nivell de proteïna i no d'ARN, ja que no varem observar la regulació dels nivells de Suv39h1 per part de SirT1 que s'observen a nivell de proteïna.

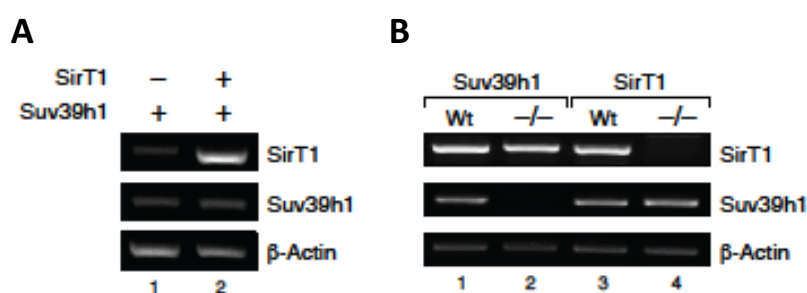


Figura R2. Els nivells d'ARN de Suv39h1 no estan afectats per SirT1. **A** Nivells d'ARN de SirT1, Suv39h1 i actina a cèl·lules 293 (A) per RT-PCR. **B** Nivells d'ARN com a (A), però utilitzant MEFs WT, SirT1^{-/-} o Suv39h1/2^{-/-}.

Un cop observat l'efecte de SirT1 sobre Suv39h1, vam determinar si aquesta afectació era específica i independent de la seva activitat catalítica sobreexpressant SirT1 actiu (FS1) i un mutant d'aquest catalíticament inactiu (FS1M). Ambdós van produir nivells més alts de Suv39h1, en canvi amb una altra sirtuïna, per exemple SirT2, no es va observar cap efecte (Figura R3A), per tant, sembla una regulació específica de SirT1 independent de la seva activitat. Per descartar que aquest efecte fos un artefacte de l'etiqueta FLAG de SirT1, la vam substituir pel domini d'unió Gal4 i aquest va provocar el mateix efecte en els nivells de Suv39h1 (Figura R3A). També vam eliminar la possibilitat de qualsevol artefacte de la transfecció, mitjançant la generació d'una línia cel·lular estable que expressa Myc-Suv39h1 de forma constitutiva, i FLAG-SirT1 de forma induïble. En aquest cas, la inducció de SirT1 va donar el mateix increment en els nivells de Suv39h1 (Figura R3B). Addicionalment, es va observar un efecte dosi-dependent de SirT1 en Suv39h1, que va donar suport a la participació directa de SirT1 (Figura R3C).

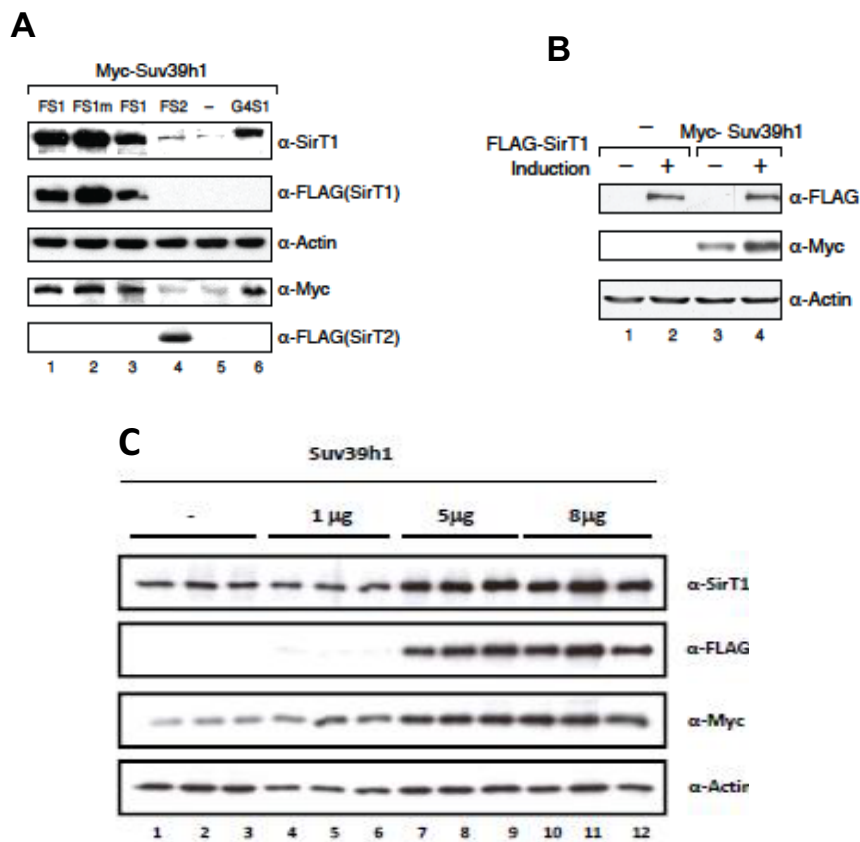


Figura R3. Regulació dels nivells de Suv39h1 per part de SirT1. **A** Western blot (com en [R1]) utilitzant Myc-Suv39h1 co-transfectades amb FLAG-SirT1, FLAG-SirT1m, FLAG-SirT2 o SirT1 fusionat al domini d'unió G4 (Gal4BD). **B** Western blot de cèl·lules 293TRES amb FLAG-SirT1 induïble per tetraciclina, abans i després de la inducció, sol o amb l'expressió constitutiva de Myc-Suv39h1. **C** Efecte de quantitats creixents de SirT1 en els nivells de Suv39h1. WB d'extractes de cèl·lules 293F prèviament transfectades amb Myc-Suv39h1 en absència o presència d'una quantitat cada vegada més gran de vector FLAG-SirT1.

També es va considerar que en lloc d'afectar els nivells globals de Suv39h1, SirT1 simplement podria alterar la proporció de subpoblacions de Suv39h1. Això canviaria la recuperació global de Suv39h1 en el nostre protocol de purificació¹⁶⁷. Per excloure aquesta possibilitat, es van generar extractes cel·lulars totals a partir de cèl·lules 293 humanes transfectades amb Myc-Suv39h1 +/- Flag-SirT1 utilitzant diferents mètodes d'extracció, el mètode de Dignam i el mètode RIPA més estricte. Els resultats van ser

idèntics als dels assajos anteriors (Figura R4) indicant que SirT1 fa el seu efecte a la població global de Suv39h1.

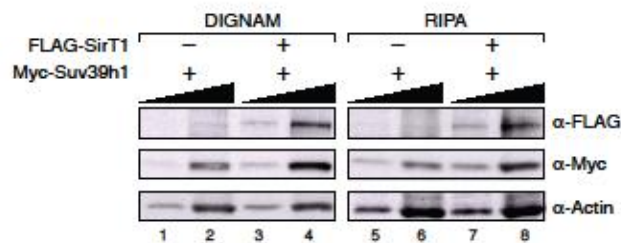


Figura R4. Regulació dels nivells de Suv39h1 per part de SirT1 independentment del mètode d'extracció Dignam o RIPA. Western blot com a (R1), però utilitzant dos mètodes d'extracció diferents.

Si SirT1 és crucial per a la regulació dels nivells de Suv39h1, llavors la pèrdua de SirT1 hauria d'alterar els nivells endògens de Suv39h1. En l'estudi amb MEFs SirT1^{-/-} vam observar nivells anormalment baixos de Suv39h1 (Figura R5A). Consistentment, la pèrdua de SirT1 per RNAi, que causa una disminució global en H3K9me3 i un augment en H3K9ac¹⁴⁶, també va induir una caiguda en Suv39h1 (Figura R5B).

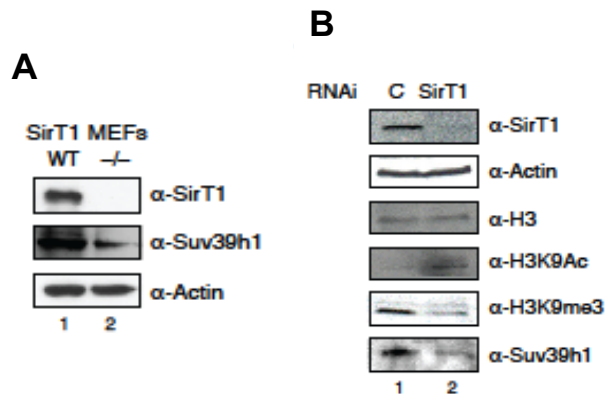


Figura R5. L'absència de SirT1 correlaciona amb els nivells més baixos de Suv39h1. **A** Els nivells de proteïna de SirT1 endogen, Suv39h1 i actina en extractes de MEFs WT o SirT1^{-/-}. **B** Nivells de SirT1, actina, H3, H3K9Ac, H3K9me3 i Suv39h1 endògens en cèl·lules 293 control i SirT1 KO per ARNi.

En conjunt, aquests resultats demostren que SirT1 controla els nivells globals de Suv39h1 *in vivo*.

La sobreexpressió de SirT1 altera l'estabilitat de Suv39h1

Vam hipotetitzar que l'augment dels nivells de proteïna Suv39h1 induïts per SirT1 podrien alterar l'estabilitat de Suv39h1. Per comprobar aquesta hipòtesi varem realitzar un experiment de "pulse-chase" (Figura R6A). Vam emprar un sol pols de 40 minuts de [³⁵S]-Met per marcar radioactivament totes les proteïnes sintetitzades en aquell moment, i després vam monitoritzar la decadència de Suv39h1 marcat amb [³⁵S] en les cèl·lules fins 11h després del pols. Sorprenentment, Suv39h1 va exhibir una vida mitjana molt curta, d'aproximadament 1h 20min (Figures R6B i R6C).

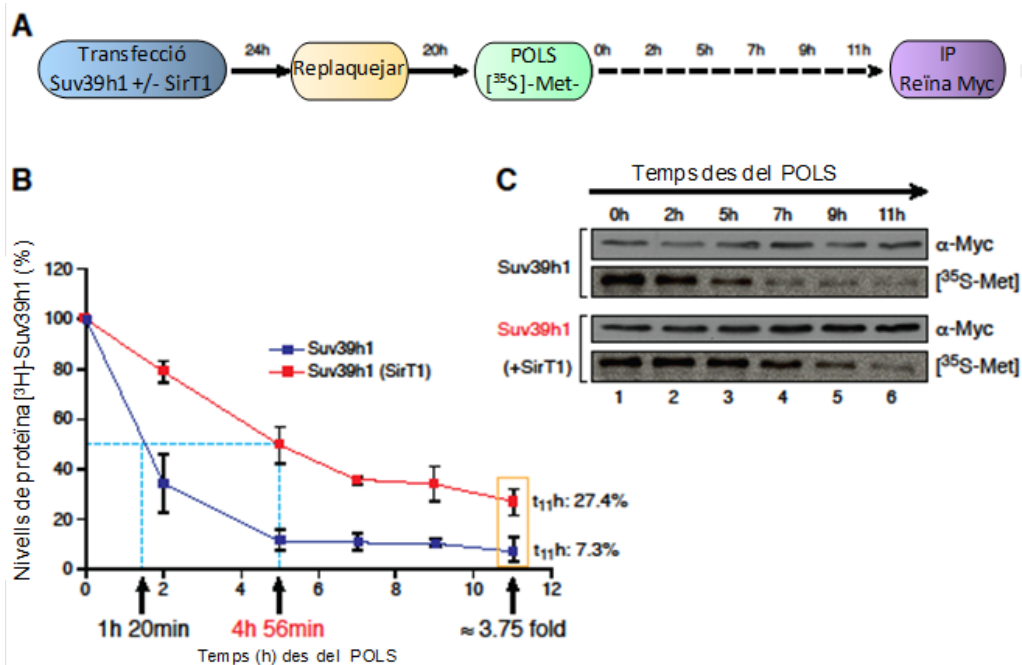


Figura R6. SirT1 regula l'estabilitat de Suv39h1. **A** Procediment de l'experiment mostrat en (B). **B** Corba de [³⁵S]-Myc-Suv39h1 en presència o absència de FLAG-SirT1. La trama es basa en la quantificació de múltiples experiments, un dels quals es mostra en (C). Els nivells de [³⁵S] en elucions de Myc-Suv39h1 es van normalitzar amb la quantitat total de Myc-Suv39h1. Les línies discontinües blaves indiquen la vida mitja ($t^{1/2}$) de Myc-Suv39h1 en aquestes condicions, calculat com el temps en què el senyal inicial de [³⁵S]-Myc-Suv39h1 (establert com a 100%) es redueix a 50%. Les fletxes negres indiquen $t^{1/2}$ de Myc-Suv39h1; $t^{1/2}$ de Myc-Suv39h1 + FLAG-SirT1, i la proporció de senyal de [³⁵S]-Myc-Suv39h1 a les 11h després del pols. **C** Un experiment representatiu dels múltiples (n=4) utilitzat per generar el gràfic en (B).

D'altra banda, la sobreexpressió de SirT1 va desplaçar radicalment el pendent de la taxa de degradació de [³⁵S]-Suv39h1, gairebé quadruplicant la vida mitjana de Suv39h1 a 4h 56min (Figura R6B). A causa de l'estabilitat perllongada de Suv39h1, les cèl·lules amb sobreexpressió de SirT1 van retenir el 27,4% de la població inicial de Suv39h1 marcat a [³⁵S] després d'11h, en comparació amb el 7.3% en les cèl·lules control.

Per aclarir el mecanisme pel qual SirT1 estén la vida mitjana de Suv39h1, vam realitzar un altre experiment. En lloc de seguir la degradació de Suv39h1 marcat, vam seguir el descens dels nivells totals de Myc-Suv39h1 (Figura R7A). Com era d'esperar, els nivells de Suv39h1 van ser més alts en les cèl·lules transfectades amb SirT1 que en les cèl·lules control, aconseguint un màxim a les 48h després de la transfecció (Figura R7B).

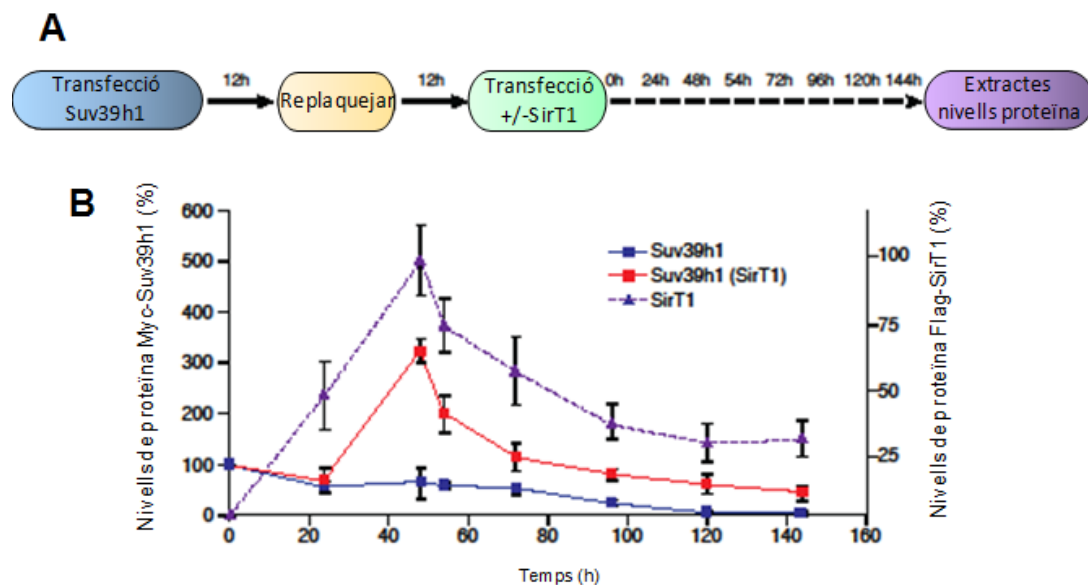


Figura R7. Protecció de la degradació de Suv39h1 per part de SirT1. **A** Esquema de l'experiment que es mostra en (B). **B** Experiment similar al de (R6), però sense un pols radioactiu. Els nivells de proteïna Myc-Suv39h1 (escala de l'esquerra) es van quantificar en relació al seu nivell en el moment de la transfecció de SirT1 (marcat com a 100%). Els nivells de SirT1 (escala dreta) es representen de forma diferent: el nivell màxim assolit se li va assignar un valor de 100%.

Sorprenentment, Suv39h1 va aconseguir el seu punt màxim en el mateix temps que ho va fer SirT1 i el patró de degradació per Suv39h1 va reflectir el mateix que el de SirT1, el que va suggerir que SirT1 estabilitzaria Suv39h1 protegint-lo.

El control per part de SirT1 dels nivells de Suv39h1 implica dominis específics de cadascuna d'aquestes proteïnes

Semblaria doncs que SirT1 mantindria l'estabilitat de Suv39h1 protegint-lo de la seva degradació però encara és desconegut a través de quin mecanisme. Per entendre-ho, primer de tot, vam caracteritzar les regions de SirT1 i Suv39h1 implicades en aquesta regulació. Per poder assignar aquestes regions es van generar diversos mutants de deleció de cada proteïna, i després les vam provar en comparació amb el corresponent WT. En el cas de SirT1, en un treball anterior⁷², es va demostrar que el domini de SirT1 que interactua amb Suv39h1 és la regió N-terminal. Per saber si aquest mateix domini és el que està implicat en la regulació de Suv39h1, vam utilitzar dues construccions fusionades a G4BD: una que conté SirT1, i l'altre que conté un mutant SirT1 que no té la regió N-terminal (Δ NSirT1; Figura R8A). Com era d'esperar, la pèrdua del domini N-terminal de SirT1 va suprimir completament l'efecte de SirT1 en els nivells de Suv39h1 (Figura R8B).

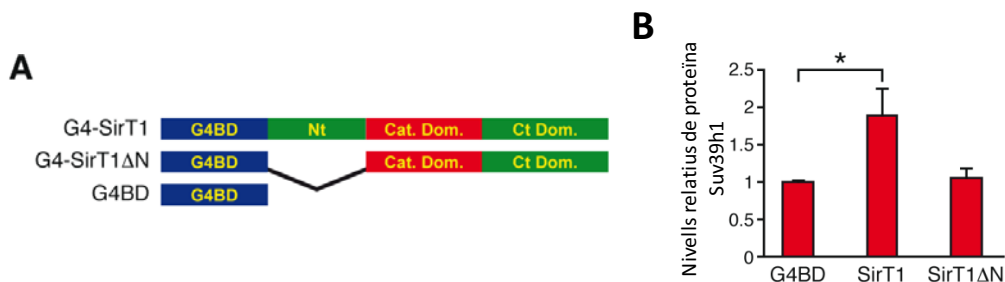


Figura R8. La regulació dels nivells de Suv39h1 per part de SirT1 requereix el domini N-terminal. **A** Les construccions usades en (B). **B** Cèl·lules 293 transfectades amb els vectors indicats. Els nivells de Myc-Suv39h1 es representen gràficament en relació als nivells de Suv39h1 + G4BD, i se'ls assigna un valor d'1 (*: $p < 0,05$).

Per part de Suv39h1, també s'havien mapejat, en treballs previs del grup, el/s domini/s de Suv39h1 que interaccioven amb SirT1⁷². Aquests comprenen els primers 88 residus, dins dels quals hi ha un domini chromo (44-88) (figura R9A). SirT1 interactua amb aquesta regió de Suv39h1, ja que la pèrdua dels 88 residus inhibeix la unió⁷². Per identificar els residus que participen en aquesta regulació vam provar dos mutants de delecció de Suv39h1, un que no té el domini catalític SET, i l'altre el domini chromo, per a la regulació per SirT1 (Figures R9A). Mentre que el mutant ΔSET encara estava regulat per SirT1, Δchromo no (Figures R9B i R9C).

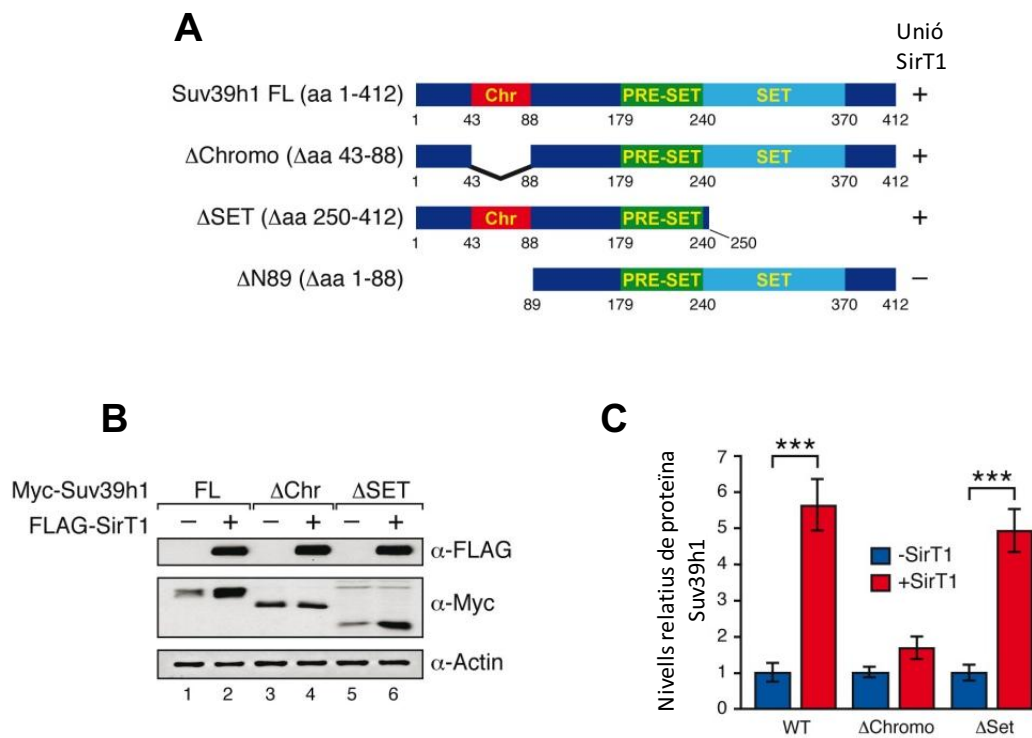


Figura R9. La regulació dels nivells de Suv39h1 per SirT1 requereix el chromodomain de Suv39h1. **A** Esquema de les diferents construccions de Suv39h1 etiquetats amb Myc utilitzats en (B). La capacitat d'aquestes construccions per unir-se a SirT1⁷² es resumeix a la part dreta de l'esquema. **B** Western blot de cèl·lules 293 transfectades amb les construccions descrites en (A): FL (Suv39h1), ΔChr (ΔChromo) o ΔSET +/- FLAG-SirT1. **C** Quantificació de diversos experiments (n=5) com en (B) (***: p<0,002).

Aquests resultats van suggerir que la diana de SirT1 és el domini chromo de Suv39h1, revelant d'aquesta manera un possible paper acabat de descobrir i inesperat pel domini chromo¹⁶⁸. No obstant això, SirT1 no va regular els nivells d'una altra proteïna que conté el domini chromo com pot ser HP1 (Figura R10), per tant aquesta dada va suggerir que l'efecte de SirT1 és específic per Suv39h1 i no una característica general de tots els chromodomains.

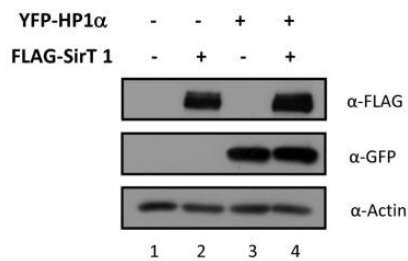


Figura R10. SirT1 no regula HP1 que també conté un domini crom. Western blot d'extractes de cèl·lules 293 prèviament transfectades amb el que s'indica: YFP-HP1 α i FLAG-SirT1.

Per confirmar aquest efecte específic de SirT1, vam decidir fusionar o el domini chromo (chromo) o tota la regió N-terminal (Nt) de Suv39h1 a la proteïna GFP (Figura R11A) per confirmar que aquest afecte recau estrictament en els aminoàcids que comprèn el domini chromo de Suv39h1. Després varem provar cadascuna d'aquestes construccions, per l'estudi de la regulació per part de SirT1. Els nivells de GFP van ser completament insensibles a SirT1. En canvi, els nivells de chromo-GFP i Nt-GFP encara estaven regulats per SirT1 (Figures R11B i R11C) gairebé al mateix nivell que els de Suv39h1 (Figura R9C).

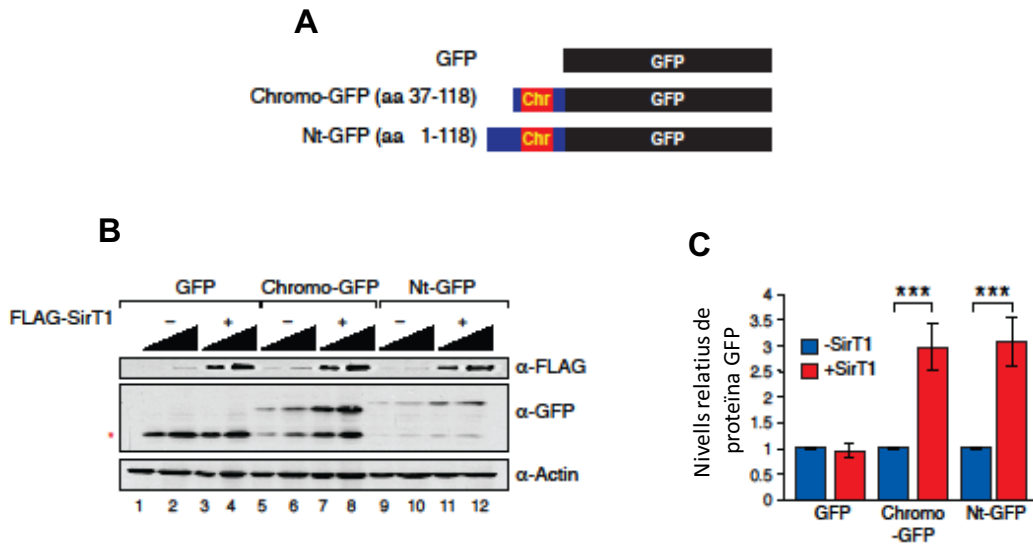


Figura R11. La regulació dels nivells de Suv39h1 per SirT1 requereix el chromodomain de Suv39h1. A Proteïnes de fusió GFP utilitzades en (B) i (C). **B** Western blot de cèl·lules 293 transfectades amb GFP, Chromo-GFP o Nt-GFP, +/- FLAG-SirT1. L'asterisc vermell marca la mida de GFP. Al utilitzar les proteïnes de fusió de GFP (Chromo- i Nt-), una proporció de la proteïna GFP es troba com un resultat de la degradació esporàdica. **C** La quantificació de múltiples experiments (n=5) realitzat com a (B). (***:p<0,002).

En conjunt, aquests resultats van demostrar que SirT1 estabilitza els nivells globals de Suv39h1 *in vivo* a través del domini chromo d'aquest.

SirT1 regula l'intercanvi de Suv39h1 en HC

Vam hipotetitzar que l'augment dels nivells de Suv39h1 per part de SirT1 podria afectar a la dinàmica d'aquest i contribuir així en el manteniment de l'estructura de l'HC sota condicions d'estrès. Aquest estudi es va dur a terme mitjançant un assaig de FRAP (recuperació de la fluorescència després del "fotobleaching") en col·laboració amb el laboratori de la Dra. Lourdes Serrano. Aquesta tècnica consisteix en fotodestruir un dels foci i mitjançant la recuperació de la intensitat del GFP en aquesta regió ens permet quantificar el temps mitja d'intercanvi de Suv39h1-EGFP, la fracció mòbil d'aquest i la

fracció immòbil (intensitat recuperada respecte la inicial) (Figura R12B). Utilitzem la proteïna de fusió Suv39h1-EGFP¹⁶⁹, en estructures d'HPC *in vivo* (Figura R12A fletxes vermelles).

D'acord amb els resultats publicats per EYFP-Suv39h1⁸⁹, el nostre anàlisi del FRAP va indicar que aproximadament un 63% de les molècules de Suv39h1 en els "foci" d'HPC es va intercanviar molt ràpidament, amb un temps mitjà de recuperació ($t^{1/2}$) de 27,41 segons. La sobreexpressió de SirT1 no va alterar els nivells de Suv39h1-EGFP en els "foci", però va afectar dràsticament l'intercanvi de Suv39h1 en aquests. Vam observar un doble efecte: d'una banda, SirT1 va augmentar la fracció de molècules de Suv39h1 mòbils del 63,01% al 72,41%, i en segon lloc, va reduir el temps mitjà d'intercanvi d'aquestes molècules per aproximadament un 35%, de 27,41 a 18,25 segons.

Curiosament, aquest efecte no va ser impulsat per l'activitat enzimàtica de SirT1 ja que el mutant puntual catalíticament inactiu H363Y de SirT1 (SirT1m) es va comportar de manera similar com el WT. No obstant això, sí que sembla específica per SirT1: de fet, la sobreexpressió de SirT2 no va afectar notablement a l'intercanvi de Suv39h1 (Figures R12C i R12D).

Aquestes observacions suggereixen una relació directa entre els nivells de SirT1 i l'intercanvi de Suv39h1 a l'HC.

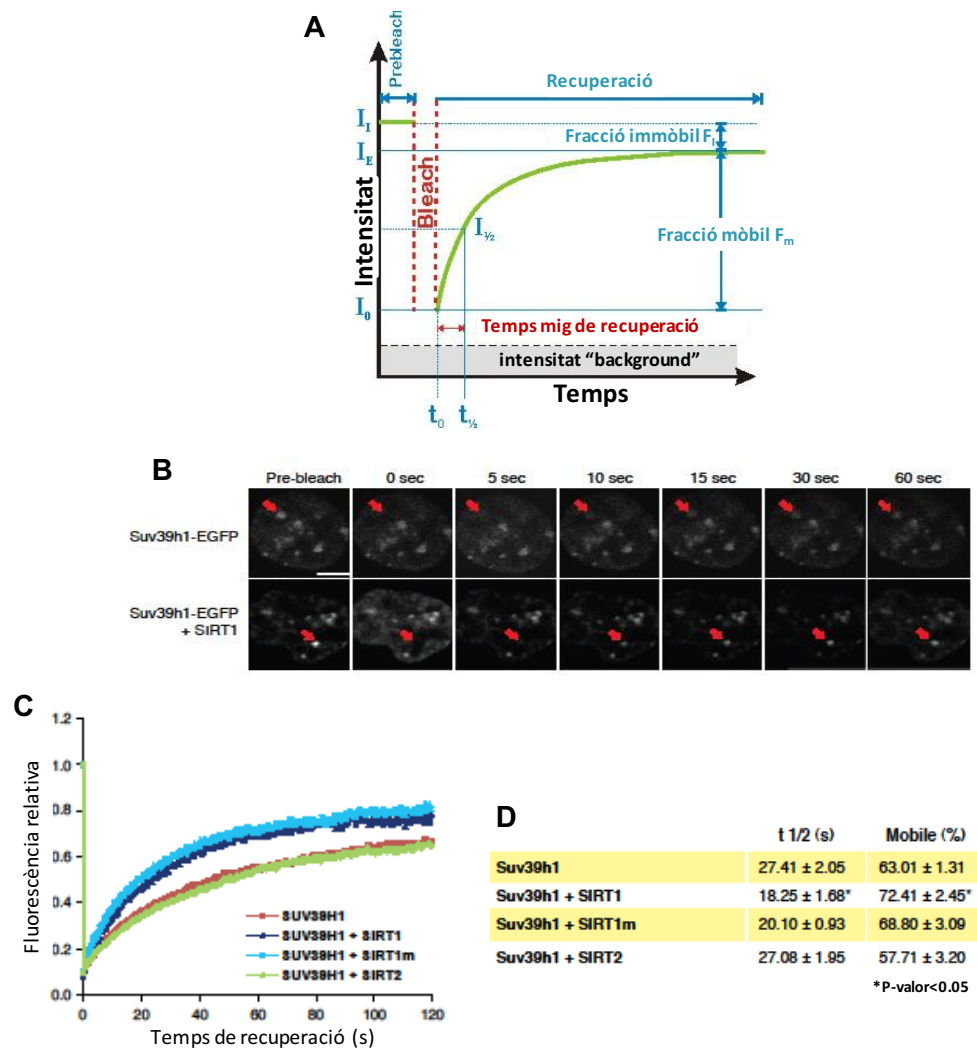


Figura R12. La sobreexpressió de SirT1 altera la renovació Suv39h1 a l'HPC. Assaig de FRAP als "foci" d'HPC de cèl·lules NIH3T3. **A** Esquema de l'experiment de FRAP en el qual observem la intensitat de la molècula estudiada respecte el temps durant l'assaig. Obtenim una corba de recuperació de la intensitat després del bleach que ens permet calcular el temps mitjà de recuperació, la fracció mòbil i immòbil de la proteïna estudiada. **B** Els senyals de fluorescència d'experiments representatius de FRAP en cèl·lules transfectades amb Suv39h1-EGFP +/- SirT1 abans i després de "photobleaching", com s'indica. Les fletxes vermelles indiquen foci d'HPC seleccionats per "photobleaching". **C** Intensitat de fluorescència relativa dels experiments de FRAP de Suv39h1-EGFP +/- SirT1, SirT1m i SirT2 sobreexpressats. **D** Quantificació i anàlisi estadístic dels experiments de FRAP en (B), com la fracció de la població mòbil (mòbil [%]) i temps mitjà de recuperació de fluorescència ($t^{1/2}$).

Seguidament vam comprovar si aquesta modulació per part de SirT1 de la renovació de Suv39h1 en HC és a través d'un augment en un grup de Suv39h1 disponible. Si aquest fos el cas, l'augment dels nivells de Suv39h1 per altres mitjans també hauria d'alterar l'intercanvi de Suv39h1 en l'HC. Per portar-ho a terme, vam realitzar experiments de FRAP. Vam comparar l'intercanvi de Suv39h1 en l'HC quan es van transfectar 0,5 µg (com a la Figura R12) o 2 µg de vector d'expressió. Com era d'esperar, més vector va conduir a nivells més alts de Suv39h1 (Figura R13A), que correlacionaven amb una major fracció mòbil de Suv39h1 del 63,01% al 74,77% (Figura R13B) i un intercanvi més ràpid de Suv39h1 a l'HC ($t^{1/2}$ es va reduir en aproximadament un 45%, de 27,41 a 14,99 segons).

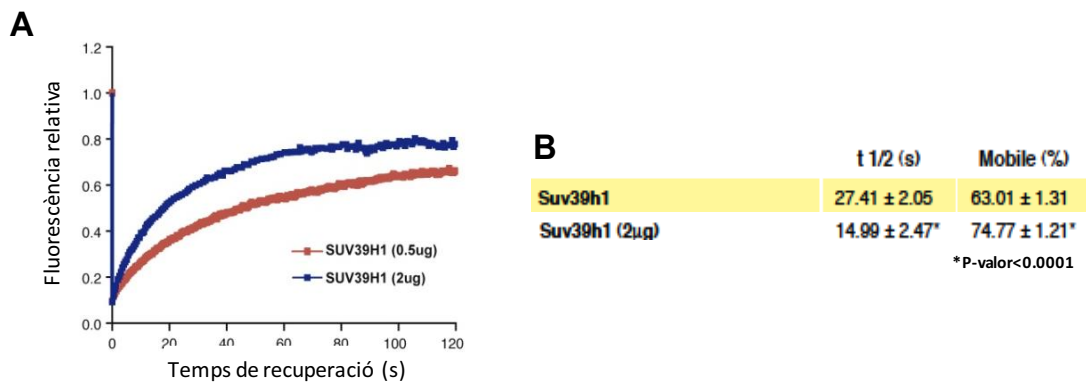


Figura R13. L'augment de Suv39h1 correlaciona amb un augment de la taxa de renovació d'aquest a HPC. **A** Anàlisi de FRAP (com a la Figura R12) en HPC de cèl·lules NIH3T3 transfectades amb 0,5 µg o 2 µg de plàsmid d'expressió Suv39h1-EGFP. **B** Quantificació i anàlisi estadístic dels experiments de FRAP en (A), com la fracció de la població mòbil (mòbil [%]) i temps mitjà de recuperació de fluorescència ($t^{1/2}$).

En conjunt, aquests resultats demostren que SirT1 controla els nivells globals de Suv39h1 *in vivo*, modulant d'aquesta manera l'intercanvi de Suv39h1 en HC.

Si els nostres estudis són reals l'augment de SirT1 per causes endògenes, com l'estrès, hauria de produir un augment en els nivells de Suv39h1 i un augment en l'intercanvi d'aquest. Per portar-ho a terme vam analitzar la dinàmica de Suv39h1 mitjançant l'ús de condicions conegudes que incrementen SirT1 endogen, com ara les condicions oxidatives¹⁷⁰ (Figura R14A). D'acord amb els resultats en R12B, el tractament de les cèl·lules amb

2mM de H₂O₂ augmenten significativament l'intercanvi de Suv39h1 en HC, disminuint el t^{1/2} de Suv39h1 en HC en un 25%, de 20,61 a 14,99 segons (Figures R14A i R14B). Altres evidències de la participació de SirT1 en la dinàmica d'HPC es van obtenir d'estudis similars en MEFs SirT1^{-/-}. Tot i que la dinàmica de l'intercanvi de Suv39h1 a l'HPC (t^{1/2}) no es va alterar, la fracció mòbil de Suv39h1 va augmentar en MEFs SirT1^{-/-} al voltant del 63% al 76%, el que suggereix que la estructura de l'HPC era d'alguna manera diferent. Sorprenentment, les condicions d'estrès oxidatiu en MEFs SirT1^{-/-} indueixen una disminució de t^{1/2} de més del 50%, del 27,97 al 14,53s, així com un 18% de disminució de la fracció mòbil de 76.03 % a 62.38 % (Figures R14A i R14B).

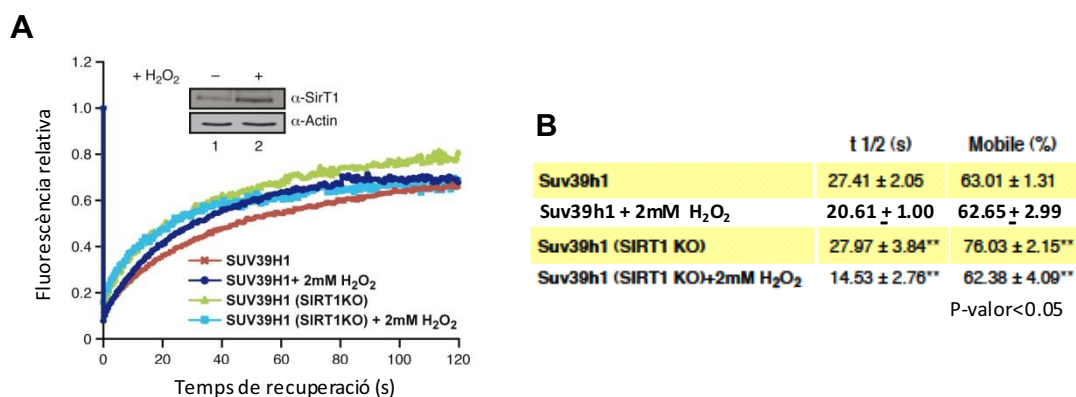


Figura R14. SirT1 està implicat en l'alteració de la renovació de Suv39h1 a HPC sota condicions d'estrès. A Assaig de FRAP (com en [R12B]) de Suv39h1-EGFP expressat en MEFs WT i SirT1^{-/-} no tractades o tractades amb 2mM d'H₂O₂ durant 1h. Requadre: western blot de SirT1 i actina en les cèl·lules WT. **B** Quantificació i anàlisi estadístic dels experiments de FRAP com en (R12C).

Aquests resultats donen considerablement suport a un paper directe per SirT1 en el control de la dinàmica i l'organització de l'HPC a través de Suv39h1.

En general, aquestes troballes suggereixen que SirT1 indueix una estructura d'HPC més dinàmica, accelerant la renovació de Suv39h1, que es reflecteix en una major mobilitat i un intercanvi més ràpid de Suv39h1.

L'estrès oxidatiu i l'estrès metabòlic indueixen un augment dependent de SirT1 en els nivells de Suv39h1

S'ha demostrat que SirT1 està augmentat en certs tipus d'estrès (per exemple, metabòlic o oxidatiu) *in vivo*^{170,171}. Com s'il·lustra a la Figura R14A, esperàvem que aquestes condicions també produïssin un increment de Suv39h1 endogen. La restricció calòrica (CR) és una de les condicions més conegudes que augmenta SirT1. Es tracta d'una reducció del 30 al 50% en el consum del que un animal pot menjar lliurement (ad libitum (AL)), el que porta a un estrès metabòlic en l'animal¹³⁶.

Per determinar si l'increment de SirT1 endogen també indueix Suv39h1, vam incubar MEFs WT a un medi que contenia sèrum (10%) obtingut a partir de rates que havien estat alimentades ja sigui AL o sota CR; les últimes condicions s'han mostrat reproduint-les en cultius cel·lulars¹⁷¹. Com era d'esperar, es va observar un significatiu augment de SirT1 a les MEFs incubades amb sèrum de CR en comparació amb AL (Figura R15). D'acord amb els nostres resultats anteriors, la CR en MEFs també va induir nivells significativament més alts de Suv39h1 (Figures R15A i R15B). A més, es va veure que aquest efecte va ser dependent de SirT1 ja que en un experiment similar utilitzant MEFs SirT1^{-/-}, no vam observar cap increment de Suv39h1 (Figures R15A i R15B). Aquests resultats es van reproduir sota estrès oxidatiu mitjançant la incubació de les MEFs WT i SirT1^{-/-} per separat amb 2mM de H₂O₂ (Figures R15C i R15D).

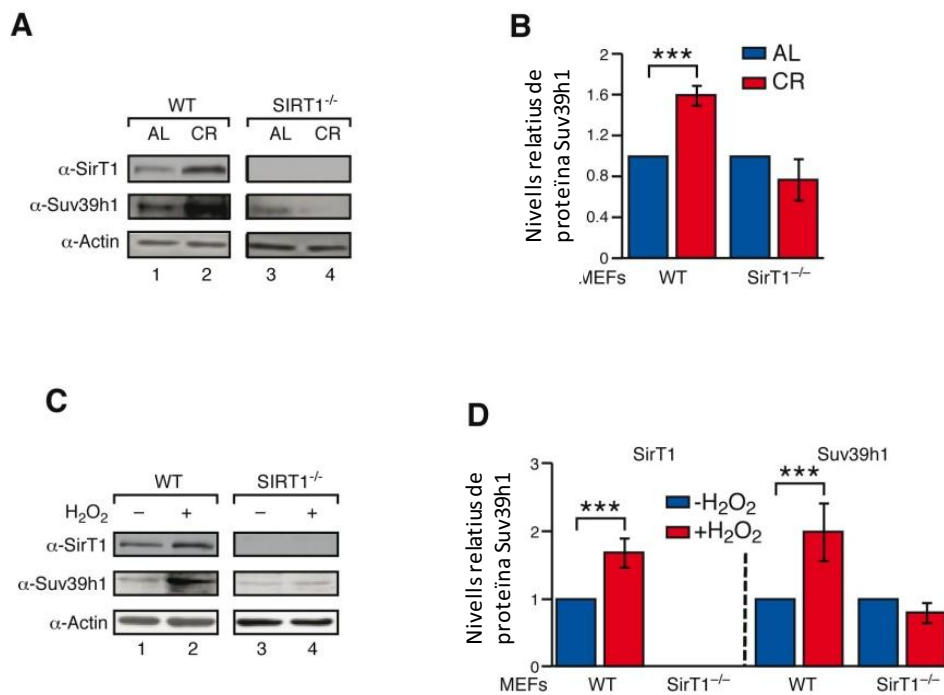


Figura R15. Suv39h1 està augmentat durant l'estrès a través d'un mecanisme dependent de SirT1. **A** MEFs WT i SirT1^{-/-} incubades amb sèrum de rates alimentades AL o sota CR durant 24h es van analitzar per quantificar SirT1 endogen, Suv39h1 i actina. **B** Quantificació dels nivells de Suv39h1 normalitzats per l'actina a partir de múltiples experiments (n=3) com en (A), els nivells de RC es presenten en relació amb els corresponents nivells d'AL. **C** Experiment similar al d'(A), però en lloc d'utilitzar sèrums AL i CR, incubant les MEFs en presència o absència de 2mM de H₂O₂ durant 1h. **D** La quantificació de múltiples experiments (n=3) com en (C) i representats com a (B). (***: p < 0,002).

Un aspecte interessant en els nostres estudis va ser comparar el nostre model de regulació en el context d'un model animal. Es van analitzar els nivells de SirT1 i Suv39h1 en els fetges de les rates que havien estat alimentades AL o sota CR. Com era d'esperar, els fetges de rates sotmeses a CR contenien nivells significativament més alts tant de SirT1 com de Suv39h1 que als fetges de rates AL, així com H3K9me3 (Figures R16A i R16B).

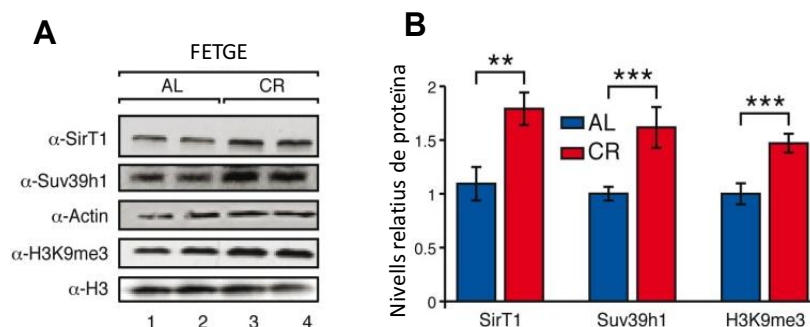


Figura R16. Augment de SirT1, Suv39h1 i H3K9me3 sota estrès metabòlic. **A** Els nivells de proteïna de SirT1, Suv39h1, actina, histona H3 i H3K9me3 de fetges de les rates alimentades amb AL o sota RC. **B** Quantificació de SirT1 i Suv39h1 (normalitzat pels nivells d'actina), i per H3K9me3 (normalitzat pels nivells de la histona H3), a partir de múltiples experiments realitzats com el d'(A). (***: $p < 0,002$).

En conjunt, els resultats anteriorment esmentats indiquen que el control dels nivells de proteïna de Suv39h1 és part de la resposta a l'estrès mediada per SirT1 i revelen una relació més estreta del que es pensava entre la resposta a l'estrès i la maquinària de la cromatina del nucli.

SirT1 inhibeix la poliubiquitinització de la lisina 87 en el domini chromo de Suv39h1 per part de MDM2

El mecanisme més evident a través del qual SirT1 podria controlar els nivells de Suv39h1 seria mitjançant el bloqueig de la degradació de Suv39h1, per tant, vam tractar d'identificar la via de degradació relacionada. La degradació específica de les proteïnes es produeix amb més freqüència a través de la via del proteosoma, en la que la proteïna diana es marca mitjançant poliubiquitinització abans de ser degradada. Per provar si Suv39h1 pateix una degradació proteasòmica, vam estudiar els efectes de la lactacistina, inhibidor del proteosoma, sobre els nivells de Suv39h1. La incubació amb lactacistina va induir nivells més alts de Suv39h1 i va abolir completament la capacitat de SirT1 d'incrementar Suv39h1 (Figures R17A i

R17B), la qual cosa demostra que SirT1 controla els nivells de Suv39h1 a través d'aquesta via.

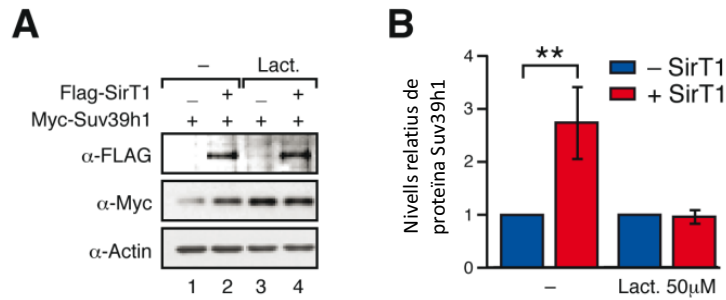


Figura R17. SirT1 inhibeix la degradació de Suv39h1 dependent de proteasoma. A Western blot de cèl·lules 293 transfectades amb Suv39h1 +/- SirT1, sense tractar o tractades amb lactacistina 50nM. **B** Quantificació de Myc-Suv39h1 en aquestes condicions (**: $p < 0,02$).

El següent pas va ser comprovar que Suv39h1 es poliubiquitinitza. Això es va fer mitjançant experiments de pull-down amb resina anti-Myc d'extractes derivats de les cèl·lules co-transfectades amb Suv39h1 i ubiquitina marcada amb HA (Figura R18). D'acord amb les dades abans esmentades, Suv39h1 va ser significativament molt menys ubiquitinitzat en presència de SirT1 que en absència de la mateixa (Figura R18).

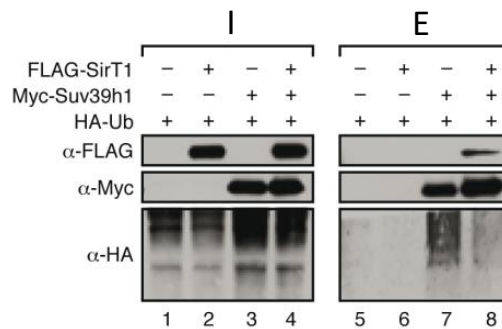


Figura R18. SirT1 inhibeix la poliubiquitinació de Suv39h1. Nivells de poliubiquitinació de Suv39h1 dels extractes de cèl·lules 293 transfectades en les combinacions indicades van ser immunoprecipitades amb anticossos de l'etiqueta Myc (Suv39h1) i analitzats per FLAG (SirT1), Myc (Suv39h1) i HA (ubiquitinació). Es mostren "inputs" (I) i elucions (E).

A continuació vam tractar d'identificar l'E3 lligasa d'ubiquitina responsable de la poliubiquitinització de Suv39h1. Vam analitzar diversos membres de la maquinària de ubiquitinació que s'han vinculat a Suv39h1 o als seus ortòlegs^{172,173,174,175}: Cul3, Cul4, Rad6 (Ube2A i 2B), MDM2, UbcH13 i APC. Tots aquests són enzims E2, de conjugació a ubiquitina, excepte MDM2, la qual és una E3 lligasa d'ubiquitina. Entre tots els factors provats, només MDM2 induïx nivells significativament més alts d'ubiquitinació a Suv39h1 (Figura R19).

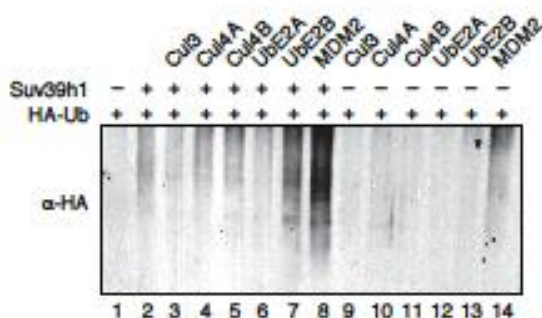


Figura R19. MDM2 incrementa la ubiquitinització de Suv39h1. Nivells de poliubiquitinització de Suv39h1 d'extractes de cèl·lules 293 transfectades amb les combinacions indicades van ser immunoprecipitades amb anticossos de l'etiqueta Myc (Suv39h1) i analitzats per HA (ubiquitinització). Es mostren les elucions.

Per demostrar un control directe dels nivells de proteïna de Suv39h1 per part de MDM2, en primer lloc vam treballar amb un mutant puntual catalíticament inactiu de MDM2 (H457S)¹⁷² i vam observar que aquest no ubiquitinitzava Suv39h1 (Figura R20A). En segon lloc, vam comprovar que MDM2 és directament responsable de la poliubiquitinització de Suv39h1 ja que en la reacció *in vitro* amb MDM2 recombinant i Suv39h1 vam observar ubiquitinització de Suv39h1 (Figura R20B). Atès que l'E2 ubiquitin lligasa Ube2B també va induir una mica l'ubiquitinació de Suv39h1 (Figura R19), vam provar si en aquest cas, Ube2B era l'E2 parella de MDM2. S'havia demostrat que Ube2A/B interaccionava amb p53 i MDM2, i en modulava l'estabilitat¹⁷⁶. Els nostres resultats van confirmar que Ube2B podria promoure la ubiquitinització de Suv39h1 *in vitro* juntament amb MDM2 (Figura R20B).

La participació d'Ube2B en la degradació de Suv39h1 està d'acord amb l'antagonisme funcional entre Rhp6p i heterocromatina en *S. pombe*¹⁷⁵.

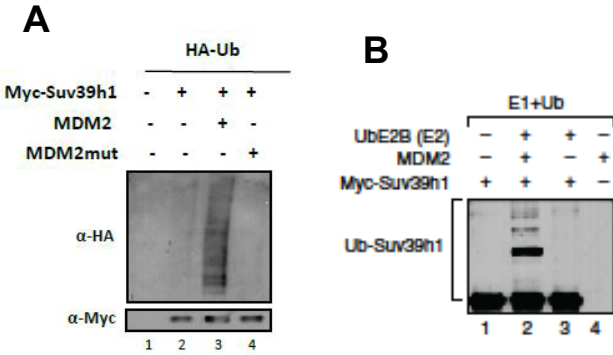


Figura R20. Suv39h1 és ubiquinitzat per MDM2. **A** Poliubiquitització de Suv39h1 en presència de MDM2 WT o un mutant catalític d'MDM2 (H457S). Es mostra l'elució d'immunoprecipitació de Myc. **B** Ubiquitització de Suv39h1 *in vitro* per MDM2 recombinant, juntament amb UbE2B (E2), E1 i Ub amb les combinacions indicades.

Finalment, comprovant la relació entre Suv39h1 i MDM2 *in vivo* en MEFs p53^{-/-}/MDM2^{-/-}, observem que l'absència de MDM2 en aquestes cèl·lules produeix nivells significativament més alts de Suv39h1 i H3K9me3 que en MEFs p53^{-/-} (Figura R21) (el fons d'p53^{-/-} es requereix ja que l'esgotament MDM2 en ratolins WT causa letalitat embrionària primerenca).

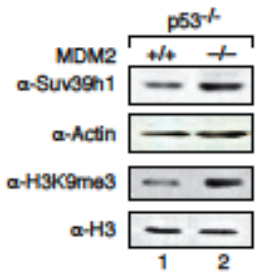


Figura R21. MDM2 està implicat en la disminució dels nivells de Suv39h1. Nivells de proteïna de Suv39h1 i H3K9me3 en MEFs p53^{-/-} o p53^{-/-}/MDM2^{-/-}.

Aquestes evidències suggereixen que SirT1 afecta Suv39h1 a través de la inhibició de la ubiquitinació catalitzada per MDM2.

Aquesta hipòtesi va ser recolzada per dues troballes. En primer lloc, la sobreexpressió de SirT1 va inhibir la ubiquitització de Suv39h1 per

MDM2 (Figura R22A) i va revertir significativament la supressió dels nivells de Suv39h1 per MDM2 (Figura R22B).

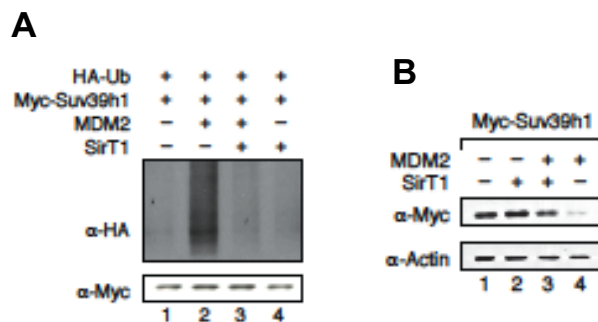


Figura R22. SirT1 protegeix Suv39h1 de la seva degradació per part de MDM2. A Nivells de poliubiquitinació de Suv39h1. Els extractes de cèl·lules 293 transfectades en les combinacions indicades van ser immunoprecipitades amb anticossos de l'etiqueta Myc (Suv39h1) i analitzats per FLAG (SirT1), Myc (Suv39h1) i HA (ubiquitinació). Es mostren elucions d'experiments, utilitzant els factors indicats. **B** Nivells de Suv39h1 en cèl·lules H1299 (no expressen p53) co-transfectades amb MDM2 +/- SirT1.

RESULTATS

Els efectes antagònics de SirT1 i MDM2 suggereixen que competeixen per la unió a Suv39h1. Conseqüentment, el mutant d'unió Δ NSirT1, no va inhibir la ubiquitinació de Suv39h1 per MDM2 (Figura R23A). Els experiments d'immunoprecipitació van revelar que encara que SirT1 i MDM2 ambdues immunoprecipiten Suv39h1, aparentment no interactuen.

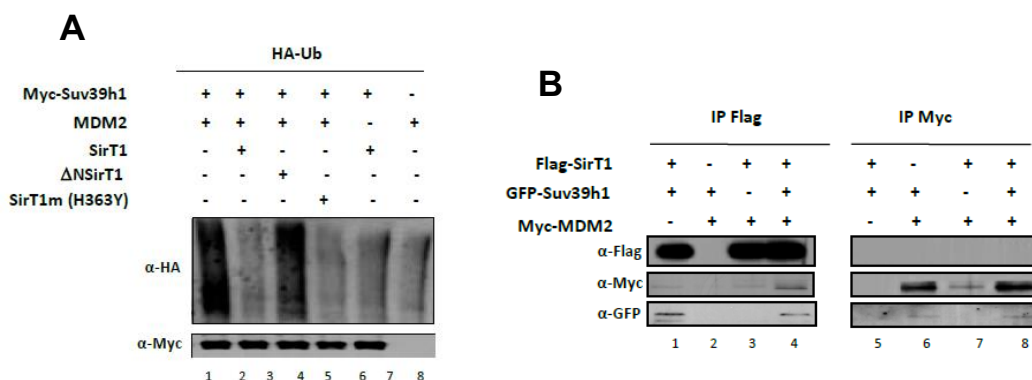


Figura R23. Suv39h1 es ubiquitinitzat per MDM2. A Poliubiquitinació de Suv39h1. Elucions de l'immunoprecipitació de Myc de cèl·lules 293 transfectades en presència o absència d'MDM2 i/o SirT1, SirT1 delectada en els residus 1-268 (Δ NSirT1) i el mutant puntual catalític de SirT1 H363Y (SirT1m), analitzada amb l'anticòs contra l'etiqueta HA. **B** Elucions d'experiments d'immunoprecipitació utilitzant anticossos o FLAG o l'etiqueta Myc amb les diferents combinacions de FLAG-SirT1, GFP-Suv39h1 i Myc-MDM2.

No obstant això, SirT1 pot immunoprecipitar una quantitat molt limitada de MDM2 en presència de Suv39h1, el que suggereix que la unió de SirT1 a Suv39h1 no elimina completament la unió física de MDM2 a Suv39h1 (Figura R23B).

A continuació vam tenir com a objectiu identificar el residu o residus que participen en la inhibició. Ja que vam veure que la regulació per part de SirT1 sobre Suv39h1 era a través del domini chromo d'aquest, vam hipotetitzar que aquest domini de Suv39h1 podria contenir el residu(s) que es modifica. Per tant, es van comparar els nivells d'ubiquitinització de Suv39h1 amb els del mutant Δ chromo. Sorprenentment, el mutant mostra menys del 20% de la ubiquitinització trobada al WT (Figures R24A i R24B).

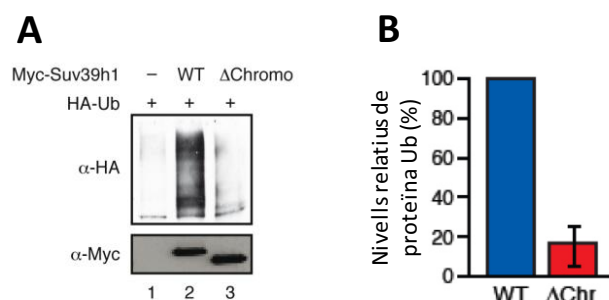


Figura R24. Implicació del domini chromo de Suv39h1 en la poliubiquitinització d'aquest. **A** Nivells d'ubiquitinització de Myc-Suv39h1 WT i Δ Chromo d'extractes de cèl·lules 293 transfectades en les combinacions indicades, immunoprecipitats amb anticossos de l'etiqueta Myc (Suv39h1) i analitzats per Myc (Suv39h1) i HA (ubiquitinació). S'observen les elucions. **B** Quantificació dels nivells d'ubiquitinització de l'experiment observat en (A).

Sabem que les proteïnes estan majoritàriament ubiquitinitzades en els residus de lisina. En el domini chromo de Suv39h1 es van identificar cinc residus de lisina (Figura R25A, subratllat): K52, K53, K63, K81 i K87. Per identificar la lisina(s) que participen en el bloqueig de la ubiquitinització de Suv39h1 per part de SirT1, vam generar mutacions puntuals intercanviant les

lisines per alanines en Suv39h1, tres de simples (K63, K81, K87) i una de doble (K52/K53).

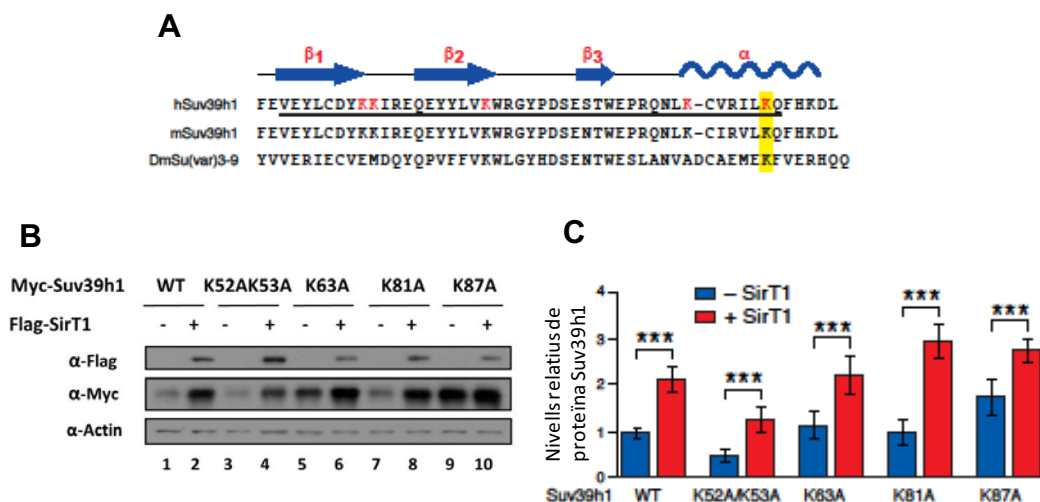


Figura R25. Implicació en la degradació de Suv39h1 de la lisina 87 localitzada en el domini chromo. **A** Estructura primària i secundària del domini chromo de Suv39h1 (humà, murí i de *Drosophila*). Es ressaltava el segment que falta en el mutant Δ Chromo (subratllat). Les cinc lisines candidates es mostren en vermell; K87 es ressaltava en groc. **B** WB d'extractes de cèl·lules 293 prèviament transfectades amb Myc-Suv39h1 WT, K52A/53A, K63A, K81A i K87A en presència o absència de FLAG-SirT1, com s'indica. **C** Suv39h1 WT i mutants K52A/K53A, K63A, K81A i K87A es van transfectar +/- FLAG-SirT1. Els resultats de diversos experiments (n=5) es van representar en relació amb el WT. (***:p<0,002).

Tots aquests mutants es localitzen als foci d'HC, tal com ho fa el WT. A continuació, vam provar els nivells basals dels quatre mutants resultants de Suv39h1 (K52A/K53A, K63A, K81A i K87A) i vam estudiar si SirT1 augmenta els nivells de cadascun d'ells. Només K87A es va expressar en nivells considerablement més alts que el WT en absència de SirT1, i va ser incrementat per aquesta en un grau molt menor respecte el WT (Figures R25C i R25B).

La mutació K87A en el chromo-GFP també va induir nivells més alts d'expressió de la proteïna i molt menys increment per part de SirT1 (Figura R26).

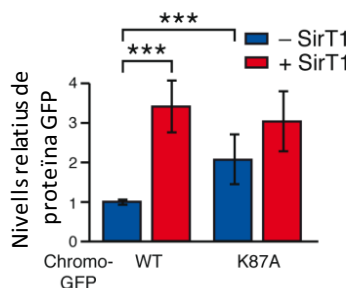


Figura R26. La mutació a la lisina 87 dins el domini chromo està implicada en la degradació de Suv39h1. Efectes de la sobreexpressió de SirT1 en el chromo-GFP WT o K87A. La quantificació de múltiples experiments (n=5) es mostra relacionada amb el WT. (***) $p < 0,002$.

Aquests resultats no estan relacionats amb cap alteració en la capacitat de Suv39h1 d'unir-se a SirT1, el qual s'uneix tant a Suv39h1 WT com al mutant de K87A de manera similar (Figura R27).

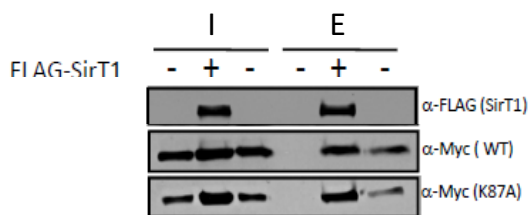


Figura R27. La mutació de K87 de Suv39h1 no fa variar la seva unió amb SirT1. Experiments d'immunoprecipitació utilitzant l'anticòs Myc. Extracte total de cèl·lules 293 prèviament transfectades amb Myc-Suv39h1 i Myc-Suv39h1K87A en presència o absència de FLAG-SirT1. Es mostren els inputs (I) de les diferents IP i elucions (E). La presència de SirT (FLAG), Myc-Suv39h1 i Myc-Suv39h1K87A (Myc) van ser visualitzats utilitzant els anticossos pertinents.

Tanmateix, l'efecte no està relacionat amb la mutació a alanina de per si, ja que un mutant K87R es va comportar exactament com K87A en tots els experiments (dades no mostrades).

D'acord amb aquestes troballes, el mutant K87A va presentar només un 30% de la ubiquitinació trobada per al WT (Figura R28). I en presència d'MDM2 només observem un augment en la ubiquitinització de Suv39h1 en el

WT i no en el mutant. Aquest resultat demostra clarament que la poliubiquitinització de Suv39h1 es produeix principalment a K87 a través d'MDM2 (Figura R28B).

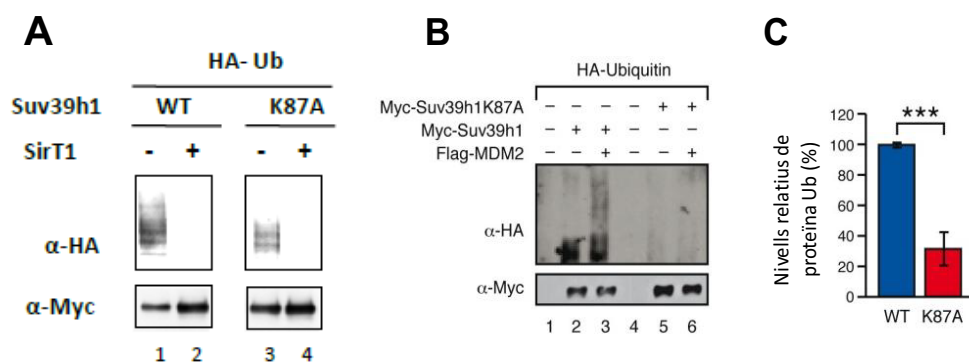


Figura R28. SirT1 protegeix la degradació de Suv39h1 per la inhibició de poliubiquitinització de la lisina 87 de Suv39h1. **A** Nivells de poliubiquitinització d'elucions d'extractes transfectats amb Suv39h1 WT o K87A en presència o absència de FLAG-SirT1, immunoprecipitats per Myc i detectats per HA(Ub) i Myc (Suv39h1 i Suv39h1K87). **B** Nivells de poliubiquitinització de Myc-Suv39h1 WT o K87A (senyal de α -HA) +/- MDM2 fet com en (A). **C** Quantificació del senyal de α -HA de poliubiquitinització de Myc-Suv39h1 WT o K87A com en (B) dividit per la quantitat total de proteïna Suv39h1 obtinguda a partir del senyal de α -Myc. Nivells de poliubiquitinació de K87A es representen amb relació al WT. (***:p<0.002).

Basant-nos en els resultats ja esmentats, vam arribar a la conclusió que SirT1 regula els nivells de Suv39h1 mitjançant el control de poliubiquitinització de K87 per part de MDM2.

El mutant K87 de Suv39h1 mostra una alteració dràstica a la seva taxa de renovació a l'HC que permet la protecció del genoma en condicions d'estrès

Per confirmar si aquest mecanisme està directament implicat en la regulació de l'intercanvi de Suv39h1 per SirT1 en HC, vam dur a terme experiments de FRAP per quantificar l'intercanvi de Suv39h1 K87A en HC en

RESULTATS

presència o absència de SirT1, i després comparar els resultats amb Suv39h1 WT (Figures R29A i R29B).

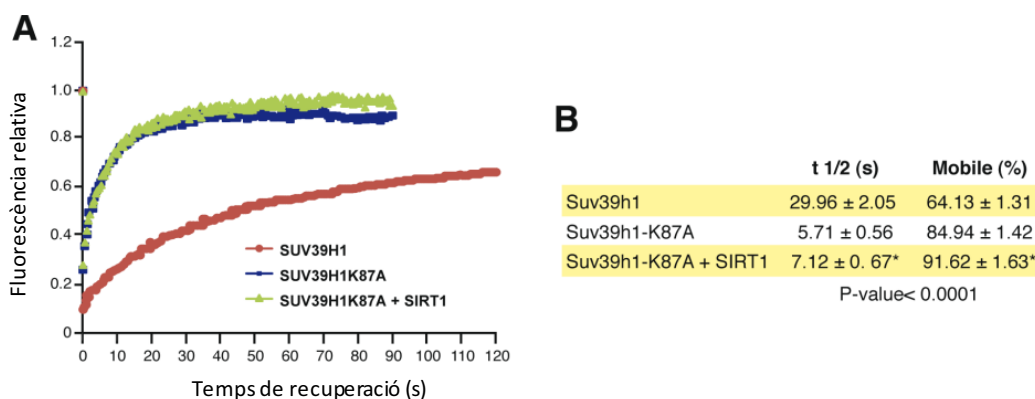
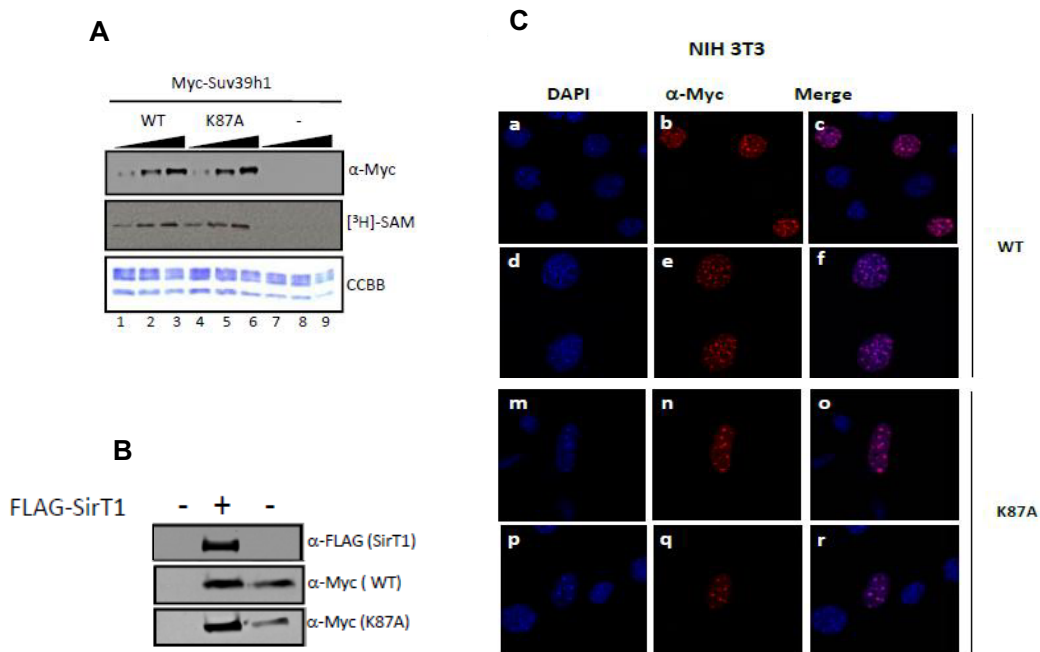


Figura R29. La mutació de K87 augmenta l'intercanvi de Suv39h1. **A** L'anàlisi de FRAP de Suv39h1-EGFP WT davant K87A +/- SirT1. **B** Quantificació i anàlisi estadística dels experiments de FRAP descrits en (A). El mutant K87A condueix a un augment significatiu en la fracció mòbil (%) i una disminució significativa en $t^{1/2}$.

Sorprenentment, el mutant va presentar radicalment un intercanvi diferent respecte el WT: el seu temps mitjà de recuperació va ser de més d'un 80% més curt (5,71 vs 29,96 segons, respectivament), i la seva fracció mòbil va ser molt més alta (84,94% vs 64,13%, respectivament). D'altra banda, SirT1 no va tenir un clar impacte en la taxa de renovació del mutant K87A. Aquests resultats donen suport fermament a una relació directa entre el control dels nivells de Suv39h1 i l'intercanvi de Suv39h1 en HC, com havíem observat prèviament (Figura R13).

A excepció dels assaigs de FRAP, Suv39h1 WT i K87A es van comportar de forma idèntica: en primer lloc, tenen idèntica activitat específica histona metiltransferasa (HMT) *in vitro* (Figura R30A), en segon lloc, tots dos s'uneixen a SirT1 i en la mateixa mesura com ja em vist abans (Figura R30B) i, finalment, ambdós localitzen a HC en la mateixa proporció, segons el que es va mesurar per immunofluorescència (Figura R30C)

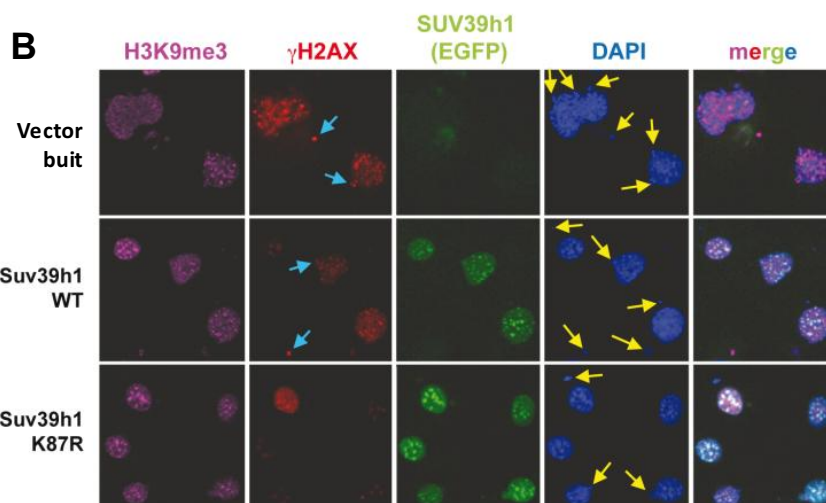
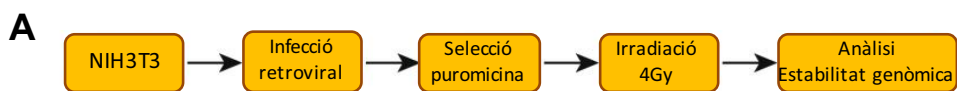


RESULTATS

Figura R30. Suv39h1 i Suv39h1K87A es comporten quasi igual. A Assaig d'HMT per Suv39h1 WT i K87A utilitzant [³H]-SAM com un donador de metil en la reacció. *A dalt*, WB d'una IP amb anticòs Myc d'extracte total de cèl·lules 293 transfectades amb Myc-Suv39h1 WT (1-3) i Myc-Suv39h1K87A (4-6). *Al mig*, autoradiografia d[³H] a la histona H3. *A baix*, tinció CCBB de la membrana exposada per l'autoradiografia del panel del mig. **B** Experiments d'immunoprecipitació utilitzant l'anticòs Myc. Extracte total de cèl·lules 293 prèviament transfectades amb Myc-Suv39h1 i Myc-Suv39h1K87A en presència o absència de FLAG-SirT1. Es mostren les elucions de les diferents IP. La presència de SirT1 (FLAG), Myc-Suv39h1 i Myc-Suv39h1K87A (Myc) van ser visualitzats utilitzant els anticòs pertinents. **C** Distribució cel·lular de Myc-Suv39h1 WT i K87A en cèl·lules NIH3T3 transfectades, per immunofluorescència (segona columna). Tinció de DAPI de les cèl·lules com a control d'ADN en els foci d'HC (primera columna). Una imatge de "merge" és mostrada (tercera columna).

Si l'augment de la renovació de Suv39h1 en HC és un mecanisme de resposta a condicions d'estrès, llavors un major intercanvi en HPC probablement estaria associat a un augment de l'estabilitat genòmica. Per provar aquesta hipòtesi, es va dissenyar un experiment que aprofita les propietats de la mutació K87 (Figura R31A), en el qual es van infectar cèl·lules NIH3T3 amb uns retrovirus que contenen ja sigui Suv39h1-EGFP WT, Suv39h1-EGFP K87R o vector buit. Després de la selecció, les cèl·lules

van ser irradiades, i posteriorment es van estudiar els seus respectius nivells d'estabilitat genòmica.



C

# Cells \geq 500	% Cells μ -nuclei	% Cells γ -H2AX
+ Suv39h1-K87R	48	40
+ Suv39h1-WT	67	54
+ Empty Vector	81	77

Figura R31. La mutació de K87 de Suv39h1 en PCH s'associa a la protecció del genoma. A Experiment que es mostra en (B) i (C). **B** L'anàlisi d'immunofluorescència per H3K9me3, γ H2AX, Suv39h1-EGFP i DAPI (per a la detecció de micronucleis, s'indica amb fletxes grogues). Alguns micronucleis van ser fortament tenyits amb γ H2AX (fletxes blaves). **C** L'estabilitat genòmica es va quantificar comptant les cèl·lules positives per γ H2AX al foci i la presència de micronucleis.

A través d'IF vam estudiar dos marcadors de la inestabilitat genòmica: la freqüència de micronucleis i la formació del foci de γ H2AX, que reflecteixen directament el dany a l'ADN. Hem observat una gran tendència en la protecció genòmica per a tots dos marcadors entre els tres tipus de cèl·lules. Els micronucleis es van trobar al 81% de les cèl·lules control, al 67% de les cèl·lules Suv39h1-EGFP WT, i només al 48% de les cèl·lules Suv39h1-EGFP K87R (Figures R31B i R31C). De la mateixa manera, la presència de

RESULTATS

foci γ H2AX es van trobar en el 77% de les cèl·lules control, al 54% de les cèl·lules Suv39h1-EGFP WT, i només al 40% de les cèl·lules Suv39h1-EGFP K87R (Figures R31B i R31C).

Curiosament, els cromosomes metafàsics de les cèl·lules WT Suv39h1-EGFP van mostrar significativament més aberracions cromosòmiques, com translocacions Robertsonianes (fusions cèntriques) i cromosomes acèntrics que les de les cèl·lules Suv39h1 K87R (Figura R32).

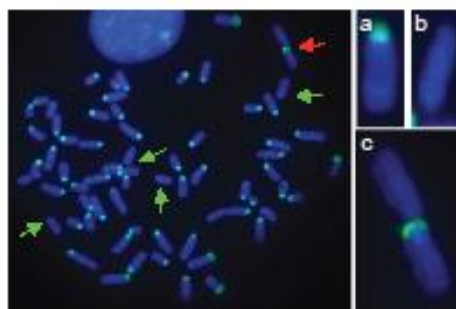


Figura R32. La mutació K87 a Suv39h1 disminueix les aberracions cromosòmiques respecte Suv39h1 i s'associa, per tant, a la protecció del genoma. FISH d'HPC (quadre principal i a). Propagació en metafase de l'expressió de Suv39h1 en cèl·lules NIH3T3. Cal destacar la presència de fragments de cromosomes acèntrics (fletxes verdes i b) i translocacions Robertsonianes (fletxa vermella i c).

Atès que moltes d'aquestes aberracions estan relacionades amb defectes centromèrics, els nostres resultats donen suport a la implicació de l'HPC en aquests processos.

Ja que Suv39h1 i el seu mutant K87 es van comportar de manera similar en HPC, qualsevol diferència entre elles s'ha d'atribuir a la diferència en la seva taxa de canvi. Per tant, els nostres resultats suggereixen fortament que l'augment d'intercanvi de Suv39h1 als foci és un mecanisme de protecció del genoma exercida a nivell de l'HPC en resposta a senyals d'estrès.

Segona part

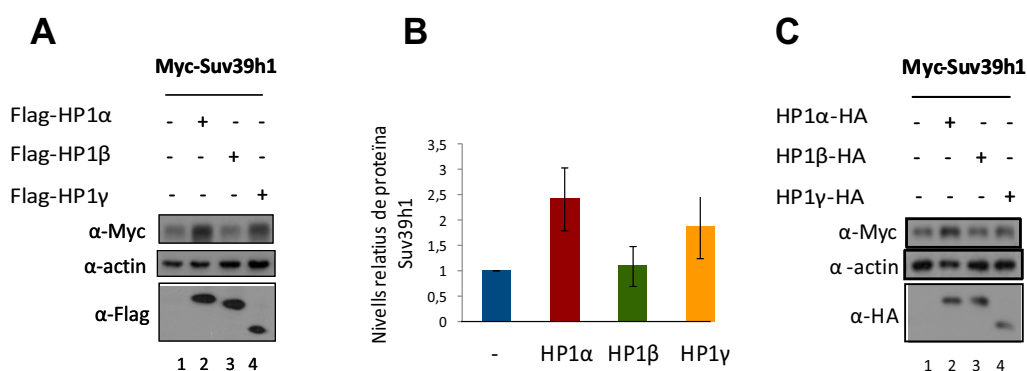
Una altra proteïna molt important en l'HC, en el manteniment i formació d'aquesta, és la proteïna estructural HP1, que com ja s'ha explicat són tres isoformes anomenades HP1 α , HP1 β i HP1 γ . Curiosament comparada amb SirT1, HP1 també s'uneix a la regió N-terminal de Suv39h1, però contràriament, té una forta localització a HC.

Aquesta observació ens va portar a desenvolupar la segona part del projecte centrada en entendre si el mecanisme observat entre SirT1 i Suv39h1 estava conservat dins del cor estructural de l'HC a través de la relació entre Suv39h1 i les isoformes d'HP1. Conseqüentment, aquest estudi ens va dirigir cap a la caracterització del paper de cadascuna de les isoformes d'HP1 en el manteniment de l'estructura de l'HC. Les qual s'han considerat, excepte en aspectes molt concrets, força similars.

Relació de retroalimentació entre les isoformes d'HP1 i Suv39h1 a nivell de proteïna

Primer de tot, ens vam centrar en un possible efecte per part de les isoformes d'HP1 sobre Suv39h1 per determinar si aquestes tenien un paper similar a SirT1 sobre l'estabilitat de Suv39h1. Per portar-ho a terme vam transfectar HP1 α , HP1 β i HP1 γ , així com Suv39h1 en cèl·lules embrionàries de ronyó humanes 293F. Sorprenentment, vam observar un paper diferencial entre aquestes tres isoformes a la regulació dels nivells de Suv39h1: la sobreexpressió tan d'HP1 α com d'HP1 γ va incrementar els nivells de Suv39h1, en canvi, HP1 β no va produir cap efecte (Figures R33A i R33B). Per tant, semblaria que les isoformes d'HP1 tot i el seu alt grau de similitud entre les seves seqüències d'aminoàcids, tenen un paper diferencial respecte el control dels nivells de la metiltransferasa Suv39h1.

Per descartar que aquestes observacions fossin un artefacte de l'etiqueta FLAG d'HP1, vam substituir-la per HA, i els resultats van demostrar que les isoformes d'HP1 amb aquesta nova etiqueta van provocar el mateix efecte en els nivells de Suv39h1 (Figura R33C).



RESULTATS

Figura R33. Les isoformes d'HP1 regulen els nivells de Suv39h1 de manera diferencial entre α, β i γ. **A** Western blot de cèl·lules 293 transfectades amb els factors indicats. Els nivells de les isoformes d'HP1 (FLAG), Suv39h1 i actina van ser monitoritzats. **B** Quantificació de diversos experiments (n=5) com el d'(A). **C** Western blot com en (A) utilitzant Myc-Suv39h1 co-transfectades amb les isoformes d'HP1-HA.

Aquest resultat ens permet sostenir que la regulació de Suv39h1 per part d'HP1 és depenent d'isoforma.

Posteriorment es va analitzar si com en el cas de SirT1, aquesta regulació era només a nivell de proteïna o si també s'observava a nivell d'ARN. Vam extreure ARN de les diferents MEFs d'HP1^{-/-} i WT per analitzar els nivells de Suv39h1 en cadascuna de les línies. Els resultats van indicar que les isoformes d'HP1 exerceixen el seu efecte a nivell de proteïna, ja que els nivells d'ARN de Suv39h1 segueixen un perfil totalment diferent, quasi contrari, al de proteïna (Figura R34).

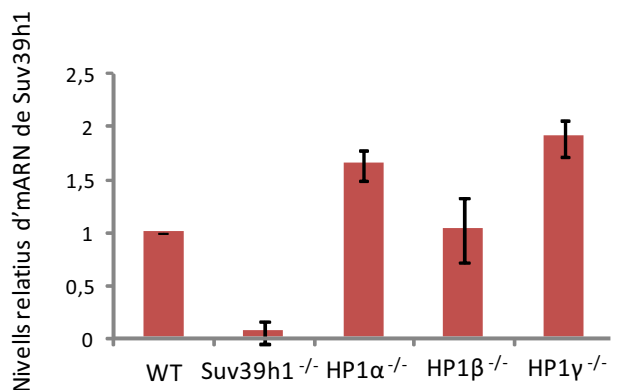


Figura R34. Implicació de les isoformes d'HP1 als nivells d'ARN de Suv39h1. Representació dels nivells d'ARN de Suv39h1 extret de cèl·lules MEFs WT i KO per les diferents isoformes d'HP1. Estan representats els resultats de diversos experiments (n=5).

Curiosament vam observar una possible regulació per part de Suv39h1 dels nivells de les isoformes d'HP1, de manera que indicaria l'existència d'un mecanisme de retroalimentació entre aquestes proteïnes. Per estudiar aquesta altra part de la regulació entre aquestes proteïnes, vam sobreexpressar quantitats creixents de Suv39h1 juntament amb les isoformes d'HP1. Vam observar que els nivells de HP1α incrementaven a mesura que anàvem augmentant la concentració de Suv39h1, contràriament, sota les mateixes condicions de Suv39h1, HP1β disminuïa, i també els nivells d'HP1γ però en menor mesura (Figures R35A i R35B). Per tant, és una regulació dependent de l'isoforma, i de la dosi de Suv39h1. Varem descartar la possibilitat de que fos qualsevol artefacte de la transfecció mitjançant la generació d'una línia cel·lular estable induïble per Myc-Suv39h1. La inducció de Suv39h1 va provocar el mateix efecte, observat anteriorment, en els nivells endògens de les isoformes d'HP1 (Figura R35C).

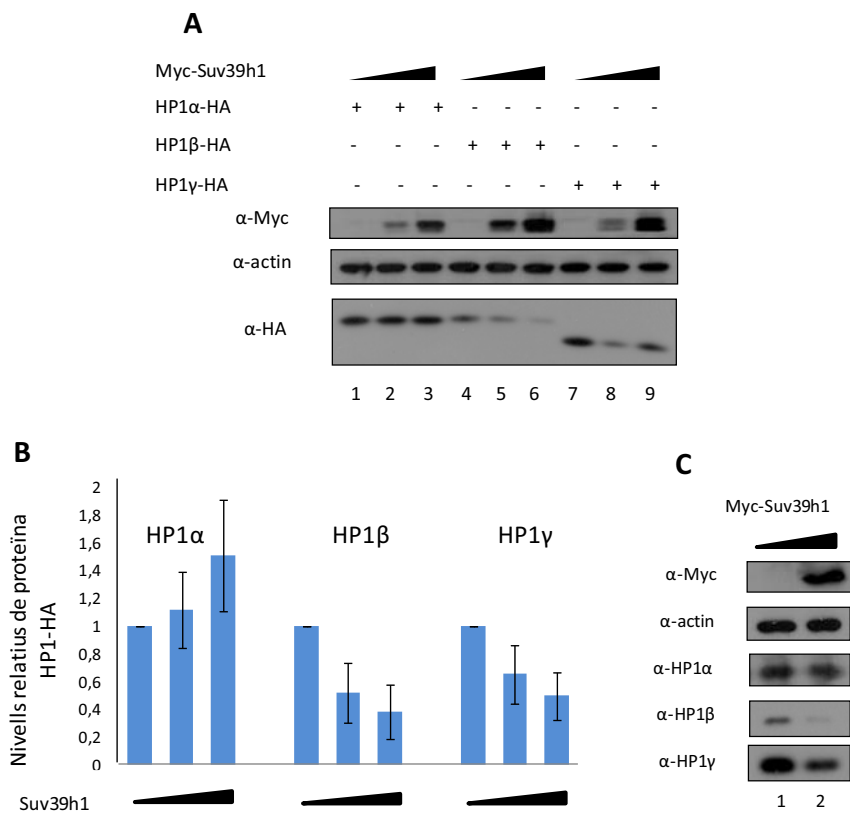


Figura R35. Suv39h1 regula els nivells de les isoformes d'HP1 d'una manera diferencial entre α , β i γ . **A** Western blot de cèl·lules 293 cotransfectades amb les isoformes d'HP1 $-/+$ tres quantitats creixents de Myc-Suv39h1. **B** Quantificació de diversos experiments ($n=5$) com el de (A). **C** Western blot de cèl·lules 293TRESX amb Myc-Suv39h1 induït per tetraciclina abans i després de la inducció de Myc-Suv39h1, i detecció dels nivells endògens de les isoformes d'HP1.

Aquests resultats semblen indicar que hi ha una relació funcional entre aquestes proteïnes més complexa que la que ens pensàvem.

Si la regulació entre aquestes dues proteïnes és crucial, un aspecte interessant seria veure l'efecte als nivells de Suv39h1 en absència de les diferents isoformes d'HP1 esperant alguna alteració dels nivells de Suv39h1 en les MEF's KO per les diferents isoformes. Vam observar que la pèrdua d'HP1 α i HP1 γ correlacionava amb uns nivells de Suv39h1 endogen lleugerament inferiors respecte al WT, coherent amb el paper d'estabilització

dels nivells de Suv39h1 per part d'aquestes isoformes observat al sobreexpressar-les. Per tant, amb la seva absència no veiem aquest efecte d'estabilització. Contràriament, en absència d'HP1 β els nivells de Suv39h1 es van veure significativament augmentats. Podria ser degut a que el paper d'HP1 β fos desestabilitzar Suv39h1 i al no ser-hi veiem aquest augment, o que aquest increment dels nivells de Suv39h1 fos degut a l'efecte d'HP1 α i HP1 γ endògens (Figura R36).

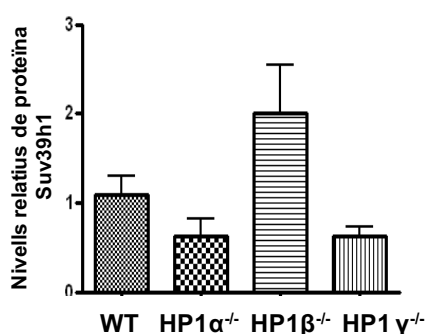


Figura R36. Els nivells de Suv39h1 varien dependent de l'isoforma d'HP1.
Quantificació dels nivells de proteïna de Suv39h1 endògens en extractes de MEFs WT o KO per les diferents isoformes d'HP1.

Aquests resultats ens portarien a extreure que hi ha clarament una regulació entre aquestes proteïnes dependent d'isoforma i exclusivament a nivell de proteïna. També semblaria que la relació entre les isoformes HP1 α i HP1 γ , i Suv39h1 és força similar en contrast amb el que veiem entre HP1 β i Suv39h1. HP1 α i HP1 γ podrien estabilitzar els nivells de Suv39h1 a nivell global de la cèl·lula. En canvi, HP1 β podria tenir un paper contrari o actuar com a reservori, el que significaria que en absència de les altres isoformes HP1 β seria l'encarregada, en aquest cas, de mantenir l'estabilitat dels nivells de Suv39h1.

Les isoformes d'HP1 controlen l'estabilitat de Suv39h1 a través de la regulació de la poliubiquitinització d'aquest. El domini Nt de Suv39h1 i la regió hinge d'HP1 són part de la regulació

Per poder assignar les regions de les isoformes d'HP1 i de Suv39h1 implicades en aquesta regulació vam mapejar els diferents dominis d'ambdues proteïnes. Respecte Suv39h1, es va treballar amb els mutants de delecció d'aquest utilitzats i descrits en l'estudi de SirT1: una construcció de Suv39h1 sense el domini chromo (Δ chromo), una altra en absència del domini SET (Δ SET) i una deleccionant tota la regió N-terminal (Δ N89) (Figura R37A). Mentre que els mutants Δ SET i Δ chromo encara estaven regulats per les isoformes d'HP1 de la mateixa manera que regulen el WT, amb el constructe Δ N89, clarament, no vam observar aquesta regulació (Figures R37B i R37C).

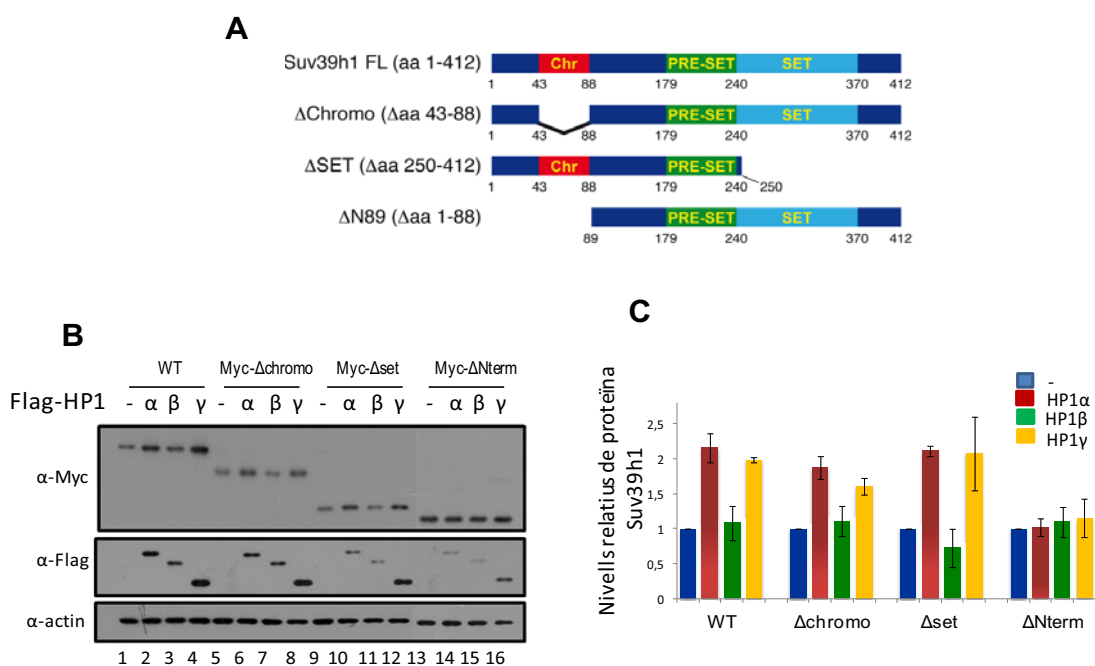


Figura R37. La regulació dels nivells de Suv39h1 per les isoformes d'HP1 a través de la regió N-terminal de Suv39h1. A Esquema de les diferents construccions de Suv39h1 etiquetades amb Myc utilitzades en (B). **B** Western blot de les cèl·lules transfectades amb les construccions descrites en (A): FL (Suv39h1), Δ Chromo, Δ SET o Δ N89 (Δ N-term) +/- FLAG-HP1 α , β i γ . **C** Quantificació de diversos experiments (n= 5) com en (B).

Això suggereix que la diana de les isoformes d'HP1 per dur a terme aquesta regulació és el domini N-terminal de Suv39h1. Com en el cas de la regulació per part de SirT1, la regulació de les isoformes d'HP1 sobre Suv39h1 dotaria a aquesta regió de Suv39h1 d'un altre nou paper.

Respecte l'estudi del domini/s d'HP1 implicat/s en aquesta regulació ens vam centrar en la regió hinge ja que, tot i l'alta identitat entre les isoformes d'HP1, aquesta regió és la més variable entre les tres (Figura R38A). Per tant, vam pensar que podria ser causant de l'efecte diferencial produït sobre Suv39h1. Per portar a terme aquest estudi vam intercanviar la regió hinge entre les dues isoformes que tenen un efecte contrari més clar sobre la regulació entre Suv39h1 i HP1, sent les dues que es troben més relacionades amb heterocromatina, HP1 α i HP1 β . Vam observar que l'efecte d'aquestes isoformes sobre Suv39h1 reverteix parcialment al intercanviar aquesta regió comparat amb els seus corresponents WT.

La sobreexpressió d'HP1 α amb el domini hinge d'HP1 β no va augmentar tant els nivells de Suv39h1 com ho fa HP1 α . I HP1 β amb el domini hinge d'HP1 α vam veure que incrementava els nivells de Suv39h1 però sense arribar als nivells provocats per la sobreexpressió d'HP1 α (Figures R38B i R38C).

Per tant podríem dir que la regió hinge d'HP1 seria part implicada en aquest mecanisme de regulació diferencial per part de les isoformes d'HP1 sobre Suv39h1.

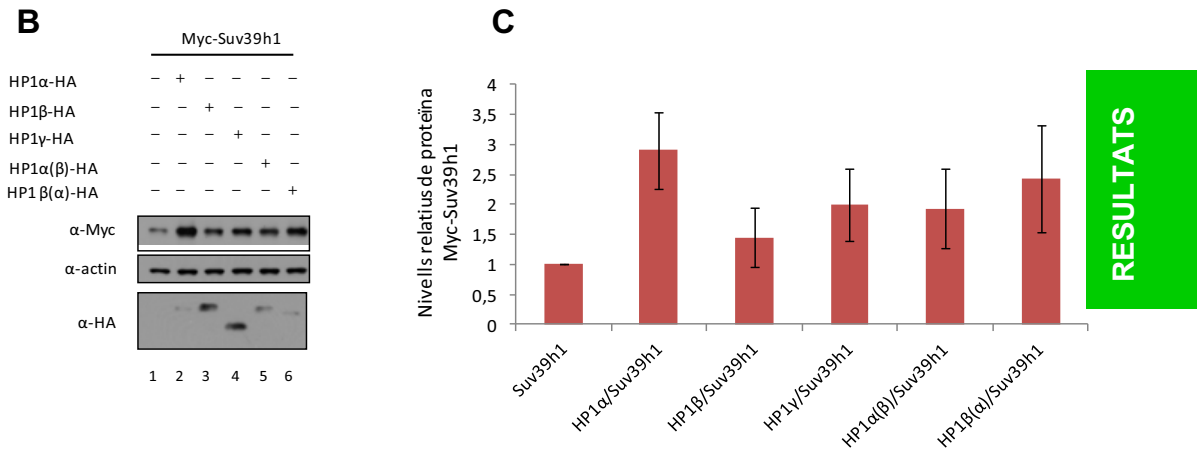


Figura R38. La regió hinge d'HP1 està implicada en la regulació dels nivells de Suv39h1. A Aliniament de les seqüències d'aminoàcids de les tres isoformes d'HP1. **B** Western blot de cèl·lules 293 transfectades amb Myc-Suv39h1-/+ HP1α, β, γ i els constructes d'HP1 amb la regió hinge intercanviada entre aquestes dues isoformes: HP1α(β) i HP1β(α). **C** Quantificació de diversos experiments (n=5) com en (B).

Un altre aspecte important per aquest estudi va ser la confirmació de la interacció entre les isoformes d'HP1 i Suv39h1, crucial per la formació d'HC. Vam treballar amb les diferents construccions de Suv39h1 utilitzades anteriorment (Figura R37A) per tal de confirmar també el domini de Suv39h1 implicat en la interacció. Els estudis de la relació entre aquestes dues proteïnes va començar amb la descripció de la co-immunoprecipitació de SUV39H1 amb M31 (HP1β homòleg de ratolí)⁸⁶, on s'assumia que totes tres isoformes interaccionaven de forma equivalent amb Suv39h1. I arribant fins a descriure específicament la interacció entre els 39 primers aminoàcids de la regió N-terminal de Suv39h1 i la superfície creada per dos CSD fruit de la dimerització de les isoformes d'HP1¹⁷⁷. Tal com esperàvem, les isoformes d'HP1 van interaccionar amb totes les construccions de Suv39h1 excepte

amb la que té l'N-terminal delectat. Sorprenentment, vam observar que la capacitat d'unió amb Suv39h1 era dependent de cada isoforma, sent molt més dèbil amb HP1β que amb les altres dues isoformes (Figura R39).

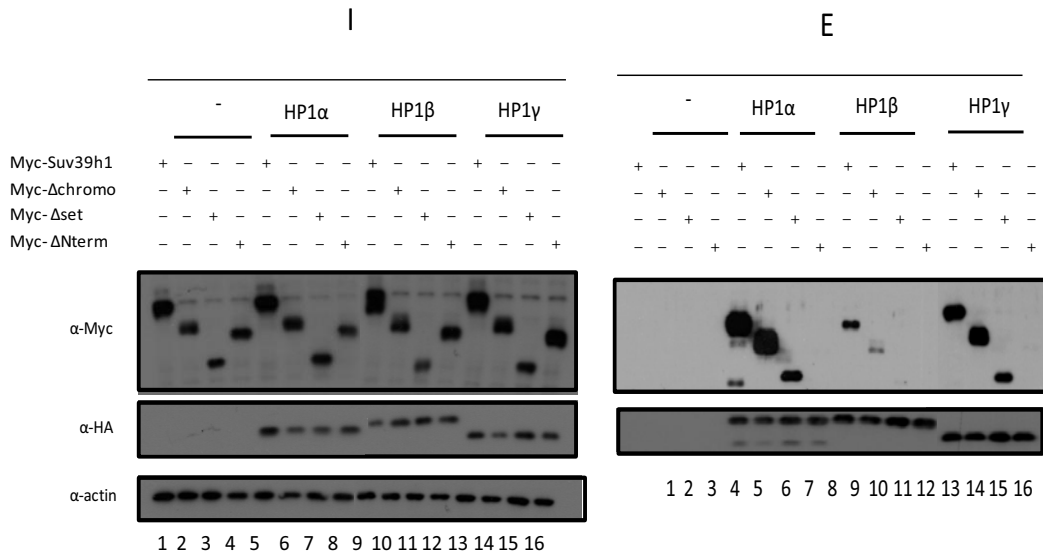


Figura R39. La interacció entre les isoformes d'HP1 i Suv39h1 és dependent d'isoforma i requereix la regió N-terminal de Suv39h1. Eluïts de la immunoprecipitació de les construccions descrites en la figura R37A i les isoformes d'HP1, amb l'anticòs de l'etiqueta Myc i analitzats per HA (isoformes d'HP1) i Myc (Suv39h1).

Aquesta dada recolzava la similitud entre HP1α i HP1γ en relació a Suv39h1 i la diferència amb HP1β que havíem observat amb l'estudi de la regulació dels nivells de Suv39h1.

Per confirmar aquesta diferent capacitat d'unió amb Suv39h1, centrant-nos amb les isoformes HP1α i HP1β les quals semblen ser totalment diferents respecte aquest aspecte, vam realitzar una immunoprecipitació de competència entre aquestes dues isoformes i Suv39h1 amb reina Myc. Vam observar que incrementant HP1α la interacció d'HP1β amb la metiltransferasa disminueix (Figura R40), per tant, podríem deduir que Suv39h1 interacciona més dèbilment amb HP1β que amb HP1α i que HP1α i HP1β competirien per la metiltransferasa. Aquest resultat ens torna a conduir a la hipòtesi del paper HP1β com a reservori, la qual en absència d'HP1α, podria substituir-la.

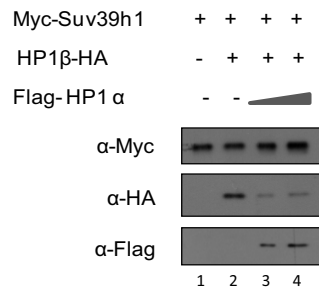


Figura R40. HP1α competeix més fortament que HP1β per la unió a Suv39h1. Es mostren elucions d'immunoprecipitació amb l'anticòs de l'etiqueta Myc després de contransfectar cèl·lules 293F amb Myc-Suv39h1 +/- HP1β-HA i quantitats creixents d'HP1α.

Un cop confirmada la interacció i regulació per part de les isoformes d'HP1 respecte Suv39h1, vam proposar un possible mecanisme a través del qual HP1 podria controlar els nivells de Suv39h1. El mecanisme més probable, igual que SirT1, seria a través del bloqueig de la degradació de la metiltransferasa, incrementant la seva vida mitja mitjançant la inhibició de la ubiquitinització. Per estudiar aquest mecanisme vam realitzar experiments d'IP amb resina anti-Myc d'extractes derivats de les cèl·lules 293 co-transfectades amb Suv39h1, ubiquitina marcada amb HA i les isoformes d'HP1, demostrant que Suv39h1 es poliubiquitinitza i que el grau d'aquesta modificació és depenent de la isoforma d'HP1. Vam observar que HP1α i HP1γ disminueixen els nivells d'ubiquitinització de Suv39h1 tal i com vam observar amb SirT1. Contràriament, HP1β no produeix aquesta disminució sinó que augmenta la ubiquitinització respecte el control (Figura R41).

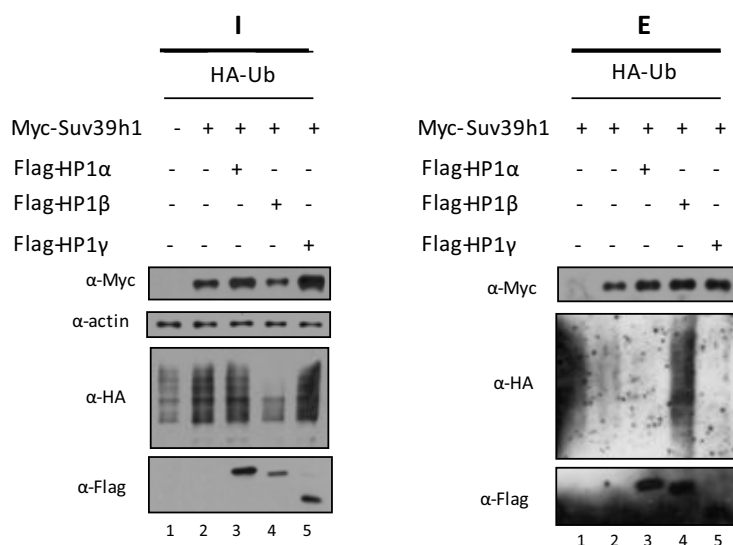


Figura R41. Les isoformes d'HP1 regulen els nivells de Suv39h1 a través de la inhibició de la degradació d'aquest. Nivells de poliubiquitinització de Suv39h1. Els extractes de cèl·lules 293 transfectades en les combinacions indicades van ser immunoprecipitades amb anticossos de l'etiqueta de Myc (Suv39h1) i analitzats per FLAG (isoformes d'HP1), Myc (Suv39h1) i HA (ubiquitinació). Es mostren les elucions.

HP1 α i HP1 γ estableixen els nivells de Suv39h1 a través de la inhibició de la poliubiquitinització de Suv39h1. HP1 β , en canvi, no estableixaria aquesta metiltransferasa ja que no la protegeix de la ubiquitinització i conseqüent degradació sinó que contràriament la promou.

Estudi del paper de les isoformes d'HP1 a nivell de foci d'HC

Un cop demostrada una diferent regulació per part de les isoformes d'HP1 sobre Suv39h1 a nivell global, ens vam focalitzar en el foci d'HC, en si aquesta diferent actuació de les isoformes d'HP1 també s'observa en aquestes regions per tal de mantenir la seva estructura.

A les regions d'HC hi predominen les seqüències repetitives, específicament els major satèl·lits (a les zones pericèntriques) i minor satèl·lits (a les zones centromèriques) (Figura R42A). Per començar a

entendre un possible paper diferencial de les diferents isoformes d'HP1 en aquestes regions, vam analitzar l'expressió d'aquestes seqüències en les diferents MEFs WT i KO d'HP1 α , HP1 β i HP1 γ . El control de l'expressió d'aquestes seqüències per part de les isoformes ens van aportar la primera idea de la diferent actuació d'aquestes en els foci. Dels resultats obtinguts va destacar la gran derepressió de l'expressió dels major satèl·lits en absència d'HP1 γ respecte el WT, per tant, aquesta isoforma semblaria necessària per reprimir l'expressió d'aquestes seqüències repetitives de les regions pericèntriques (Figura R42B). Respecte l'anàlisi dels nivells dels minor satèl·lits en les diferents línies cel·lulars, vam observar una lleugera derepressió d'aquests en les MEFs HP1 α ^{-/-} (Figura R42C), per tant, podriem relacionar aquesta isoforma amb el control de l'expressió de les seqüències repetitives que es troben en la regió centromèrica.

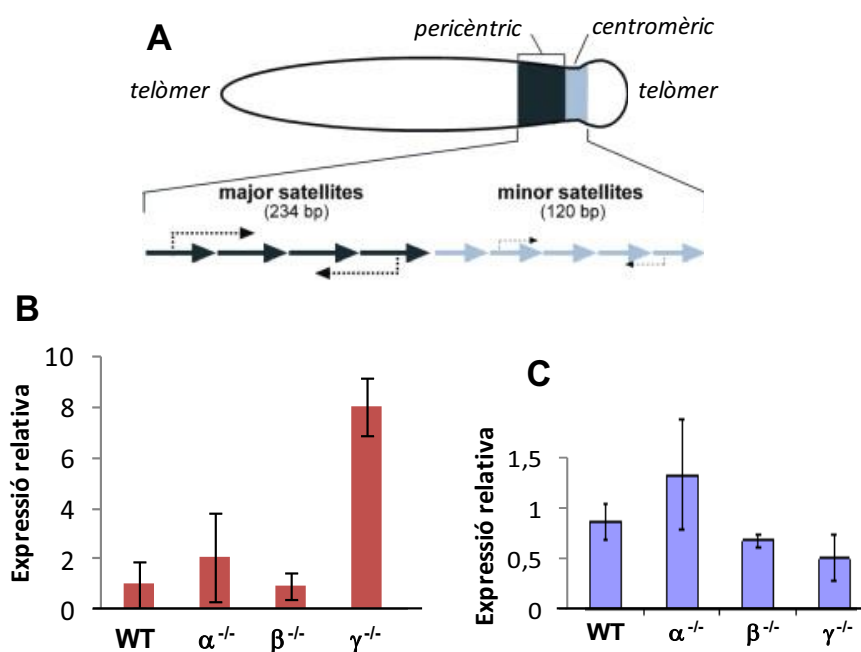


Figura R42. Distribució de les isoformes al foci d'HC. **A** Gràfic representatiu de la localització de major i minor satèl·lits al cromosoma. De⁸⁴. **B** Quantificació de la RT-PCR (n=5 experiments) pels major i **C** minor satèl·lits.

Amb els nostres resultats obtinguts hipotetitzariem que HP1 α i HP1 γ controlen a diferents regions del foci d'heterocromatina.

En relació amb la isoforma HP1 γ i els major satèl·lits, hi ha un factor de transcripció descrit anomenat PAX3 que interacciona amb HP1 γ , i com aquesta isoforma, també està relacionat amb el control dels major satèl·lits en les zones d'HPC (Figura R43A). Es troba localitzat en aquestes regions en un 30% de les cèl·lules WT (Figura R43B)¹³³. Per tal d'estudiar la relació entre HP1 γ , PAX3 i la regió d'HPC, vam analitzar, per IF, la localització de PAX3 en els foci d'HPC a les diferents MEFs WT i KO per les isoformes d'HP1 transfectant-les amb aquest factor de transcripció. En absència d'HP1 α es va localitzar un alt % de PAX3 als foci, inclús més alt que a les cèl·lules WT. En canvi a les MEFs d'HP1 β el % es va reduir significativament.

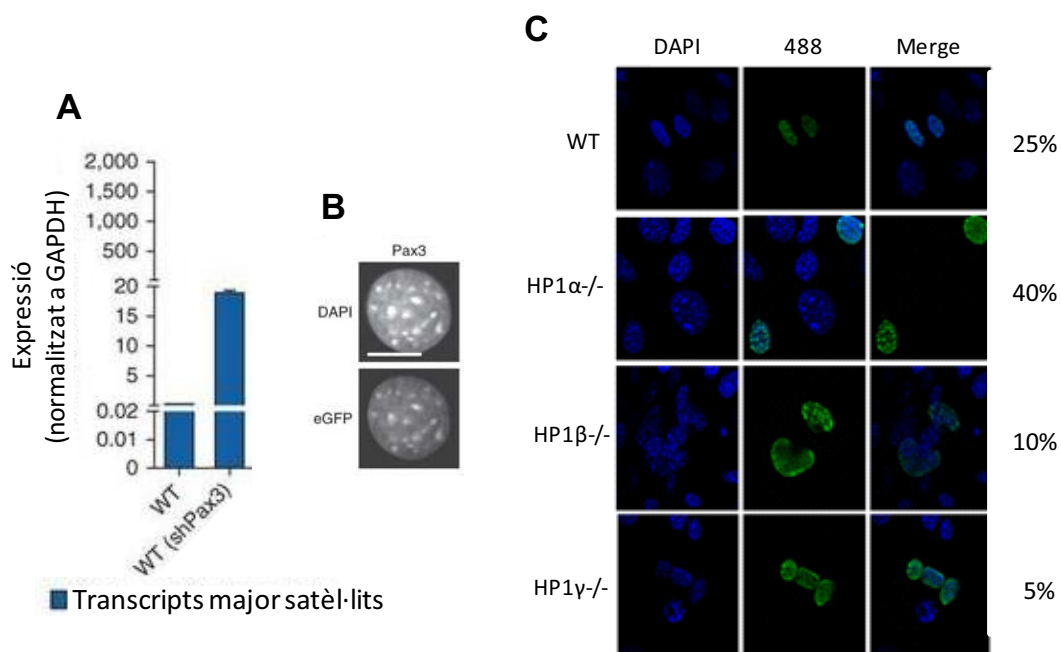


Figura R43. Relació entre HP1 γ , el factor de transcripció PAX3 i la regió d'HPC. A Expressió dels major satèl·lits en cèl·lules WT i WT(shPAX3). **B** Immunofluorescència de la localització de PAX3-GFP en els foci d'HPC. (A) i (B) agafades de¹³³. **C** IF de la distribució del DAPI i PAX3 i quantificació de la localització de PAX3 als foci en les diferents MEFs WT i KO d'HP1.

Curiosament, però, en les cèl·lules on quasi no es va observar localització de PAX3 en els foci va ser a les MEFs KO per HP1 γ (Figura R43C). Per tant, aquest resultat també relacionaria HP1 γ amb el control de la regió d'HPC.

Relació entre Suv39h1 i les isoformes d'HP1 a nivell de foci d'HC *in vivo*

Seguint amb l'estudi a nivell de foci d'HPC, per determinar la hipotètica relació funcional diferencial entre les isoformes d'HP1 i Suv39h1, vam analitzar la implicació d'HP1 α , HP1 β i HP1 γ en el manteniment de l'estructura de l'HC a través de la regulació, de la dinàmica de Suv39h1. Es va portar a terme mitjançant un assaig de FRAP, en el que utilitzem la proteïna de fusió Suv39h1-EGFP¹⁶⁹ la qual es localitza al nucli associant-se principalment al foci d'HPC marcat per un fort enriquiment en H3K9me3 i en HP1 (Figura R44).

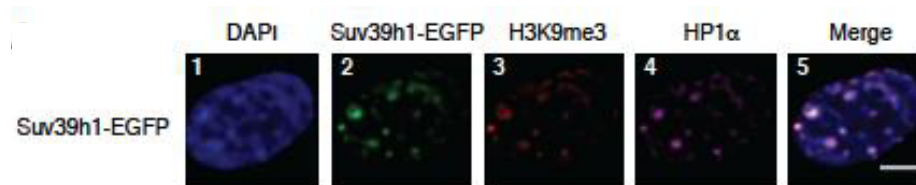


Figura R44. Localització de les principals proteïnes de l'HPC i la modificació conseqüent d'aquestes. Distribució subnuclear de la tinció de DAPI, Suv39h1-EGFP, H3K9me3 i HP1 α en cèl·lules NIH3T3 transfectades amb Suv39h1-EGFP.

En un primer experiment de l'estudi de la dinàmica, vam sobreexpressar, junt amb Suv39h1-EGFP, les isoformes d'HP1. Aquestes van afectar dràsticament l'intercanvi de Suv39h1 en els foci. HP1 α i HP1 γ van reduir el temps mitjà d'intercanvi ($t^{1/2}$) de les molècules de Suv39h1 des de 19 a 10,05 i 15,2 segons respectivament (Figures R45A i R45B), el que significava que tant la sobreexpressió d'aquestes dues isoformes van fer

augmentar l'intercanvi de Suv39h1. Contràriament, amb HP1 β no es va veure canvi en aquest aspecte respecte el WT.

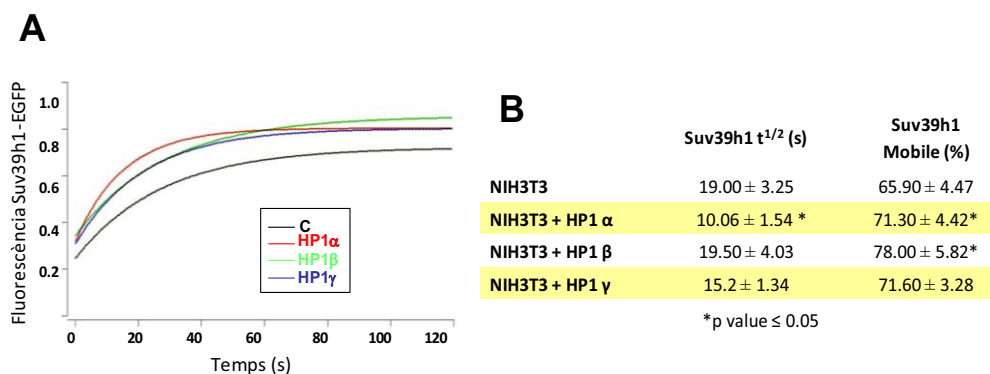


Figura R45. Efecte de la sobreexpressió de les isoformes d'HP1 sobre la dinàmica de Suv39h1 mitjançant FRAP, *in vivo*, en el "foci" d'HPC. A Assaig de FRAP al "foci" d'HPC de cèl·lules NIH3T3. Intensitat de fluorescència relativa dels experiments FRAP sobreexpressant Suv39h1-EGFP +/- les isoformes d'HP1. **B** Quantificació i anàlisi estadístic dels experiments de FRAP en (A), com la fracció de la població mòbil (mòbil [%]), i el temps mitjà de recuperació de fluorescència ($t^{1/2}$).

Continuant amb l'estudi de la dinàmica de Suv39h1 vam estudiar com l'absència de les isoformes d'HP1 podria afectar a aquesta, utilitzant les diferents MEFs WT i KO per aquestes isoformes. Vam observar que l'absència d'HP1 α i HP1 γ disminueix l'intercanvi de Suv39h1 i la fracció mòbil respecte les cèl·lules WT, el 50-51% de les molècules de Suv39h1 en els foci d'HPC tenen una velocitat d'intercanvi més lent que el control, amb un $t^{1/2}$ de 30,27 i 29,28 segons respectivament en contra dels 18,28 segons del control, representant una disminució del 40%.

Contràriament, amb l'absència d'HP1 β , s'observa un intercanvi de Suv39h1 lleugerament més ràpid que a les cèl·lules WT (Figures R46A i R46B).

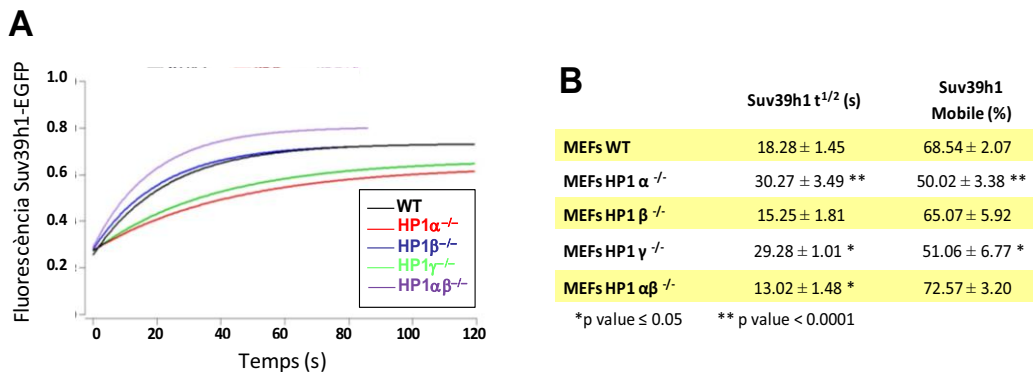


Figura R46. Efecte de l'absència de les isoformes d'HP1 sobre la dinàmica de Suv39h1 mitjançant FRAP, *in vivo*, en el foci d'HPC. A Assaig de FRAP (com en la figura R46A) de Suv39h1-EGFP expressat en MEFs WT i KO per HP1 α , β o γ . **B** Quantificació i anàlisi estadístic dels experiments de FRAP en (A), com en (Figura R46B).

RESULTATS

Aquests resultats de l'estudi de la dinàmica de Suv39h1 podríem hipotetitzar que la sobreexpressió d'HP1 α i HP1 γ induiria una estructura d'HPC menys compacta, més dinàmica, accelerant així la renovació de Suv39h1. Aquest fet concordaria amb la possible compactació de l'estructura de la cromatina produïda per la pèrdua d'aquestes isoformes. De forma oposada, la sobreexpressió de la isoforma HP1 β no altera la dinàmica de renovació i la pèrdua produeix una cromatina lleugerament més oberta. Així doncs, en general no s'observa un efecte significatiu a la dinàmica de Suv39h1 degut a aquesta isoforma.

En general, aquestes troballes suggereixen un paper directe per part d'HP1 α i HP1 γ en el control de la dinàmica i organització de l'HPC través Suv39h1.

Seguidament, continuant amb l'estudi *in vivo*, vam analitzar la interacció entre aquestes proteïnes mitjançant experiments de FRET. Es basa en la transferència d'energia entre fluoròfors com GFP i RFP, emprant la proteïna de fusió GFP-Suv39h1 com a donador i HP1-RFP com a acceptor. Es crema el donador i es van obtenir mesures a diferents temps. El FRET només passa quan aquestes dues proteïnes fluorescents són molt properes (a

RESULTATS

una distància inferior a 10nm) el que significa que han d'estar en interacció directe (Figura R47A). A part de confirmar la interacció entre les isoformes d'HP1 i Suv39h1, ja descrita per FRET entre la isoforma HP1β i Suv39h1⁸⁹, vam comprovar si aquesta interacció era depenent d'isoforma en el foci d'HPC. Vam observar que HP1α s'uneix significativament molt més amb Suv39h1 que no pas HP1β. En el cas d'HP1γ els resultats van mostrar una unió intermitja amb Suv39h1 respecte HP1α i HP1β (Figures R47B i R47C).

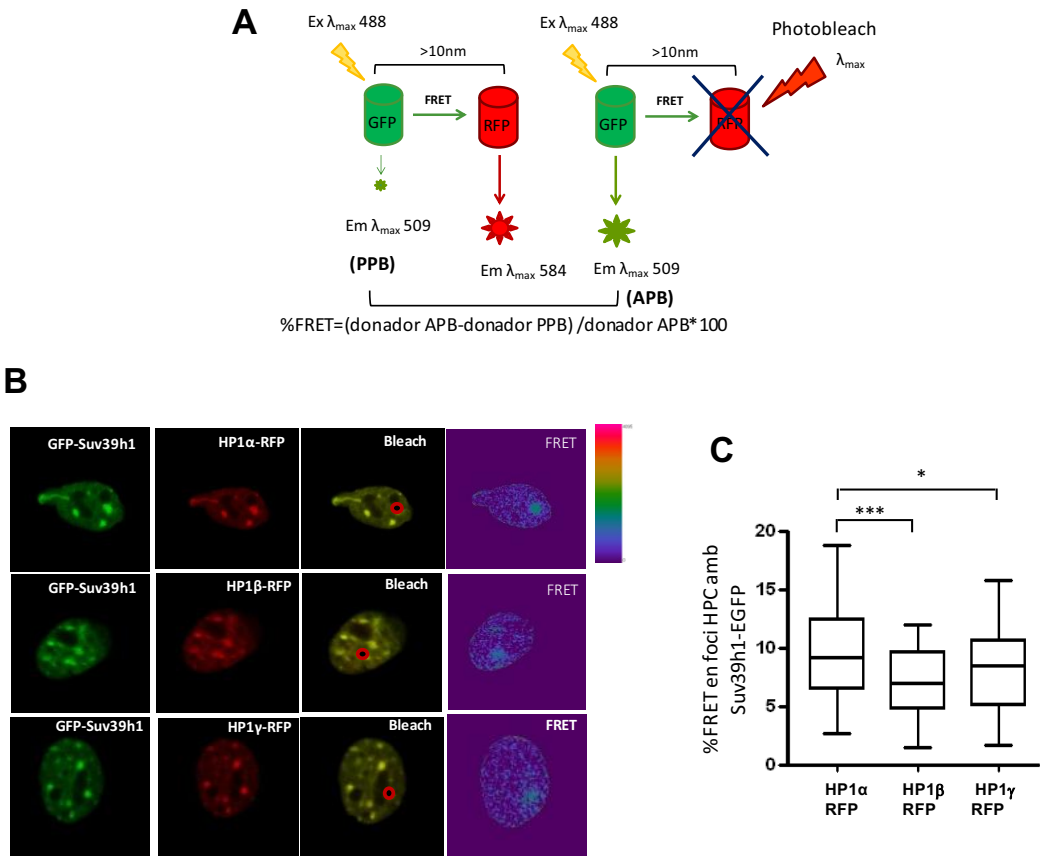


Figura R47. Interacció *in vivo* entre Suv39h1 i les isoformes d'HP1 en el foci d'HPC.
A Esquema del mecanisme de funcionament del FRET. PPB= abans i APB= després del "photobleach". **B** Senyals de fluorescència d'experiments representatius de FRET en cèl·lules NIH3T3 transfectades amb Suv39h1-EGFP + HP1α, HP1β o HP1γ-RFP abans i després del "photobleaching", com s'indica. El cercle vermell representa la zona analitzada. L'escala de colors indica el % de FRET entre les dues proteïnes, de més (vermell) a menys (lila). **C** Quantificació del FRET de l'experiment vist en (B). (*: p<0,05 i ***: p<0,0005). N=50.

Per tant, la diferent capacitat d'unió caracteritzada a nivell global de la cèl·lula entre les isoformes d'HP1 i Suv39h1 és conserva de forma similar en el foci d'HPC *in vivo*.

En aquest estudi reafirmem la similitud entre HP1 α i HP1 γ respecte la seva actuació en l'estructura de la cromatina i la diferència amb HP1 β , observada fins ara, en els diferents aspectes estudiats com en la regulació, en el control de la dinàmica de Suv39h1 i en la interacció entre aquestes proteïnes.

Diferents papers de les isoformes d'HP1 al foci d'HPC

Un dels factors implicats en la dinàmica de l'HC per tal de mantenir l'estructura d'aquesta són les modificacions postraduccionals. Aquestes juntament amb les seqüències repetitives i les isoformes d'HP1 són els components majoritaris del "foci" d'HPC. Per aquests motius vam estudiar la relació de les isoformes d'HP1 amb les principals modificacions postraduccionals característiques de la cromatina: H3K9me3, H4K20me3 i H3K27me3, relacionades amb heterocromatina, i H3K4me3 relacionada amb eucromatina, a les MEFs WT i KO per les diferents isoformes d'HP1. Vam portar a terme aquesta caracterització a través de la detecció endògena de les diferents marques per IF, en col·laboració amb el laboratori de la Dra. Lourdes Serrano. Vam veure que la pèrdua de les diferents isoformes no produeix cap canvi en H3K9me3 (Figura R48A). Sorprenentment, respecte les marques històniques H4K20me3 i H3K27me3, l'absència d'HP1 α va mostrar un increment d'aquestes, fet que no vam observar quan faltava HP1 β o HP1 γ (Figura R48B i R48C). Segons aquests resultats HP1 α controlaria els nivells d'H4K20me3 i d'H3K27me3. Com esperavem, no vam detectar cap efecte en els nivells de la marca control d'H3K4me3 (Figura R48D).

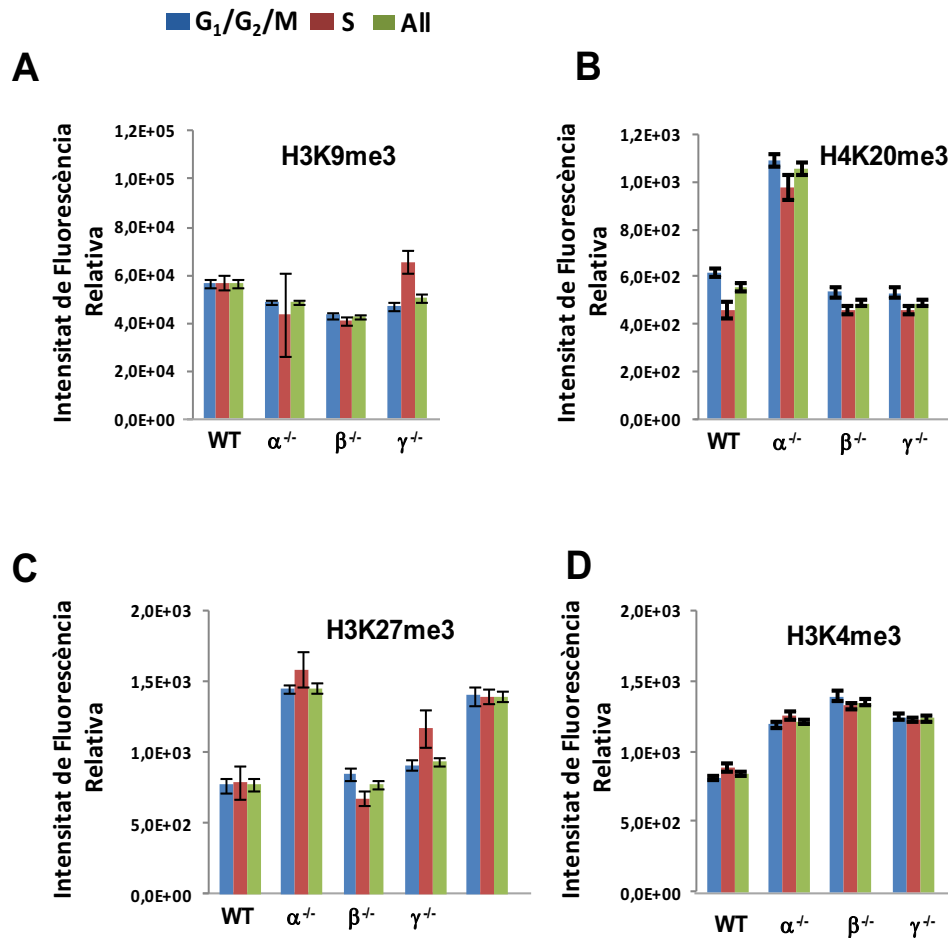


Figura R48. Relació entre l'absència de les isoformes d'HP1 i importants modificacions posttraduccionals. **A** Quantificació de les modificacions posttraduccionals: H3K9me3, **B** H4K20me3, **C** H3K27me3 i **D** H3K4me3 a través d'IF de les MEFs WT i KO per les les tres isoformes d'HP1, en diferents etapes del cicle cel·lular tal com s'indica.

Per demostrar que l'efecte d'HP1 α era directe respecte aquestes dues modificacions, H4K20me3 i H3K27me3, vam realitzar el mateix estudi però utilitzant les línies de MEFs HP1 $\alpha^{-/-}$ noKO i reKO. Aquestes línies són obtingudes a partir de la línia de MEFs HP1 $\alpha^{-/-}$ KO a la qual s'introdueix l'activitat cre recombinasa, s'elimina el gen neo i l'exó que conté ATG es

tornen a alinear amb el promotor i el gen s'expressa de nou obtenint la línia de MEFs noKO. Finalment, s'introdueix Flpe recombinasa eliminant l'exó i el gen és reprimix novament, donant lloc a les MEFs reKO (Figura R49A). Respecte la marca d'H4K20me3, al tornar-se a expressar HP1α vam observar una reducció dels seus nivells respecte l'augment vist en les MEFs KO d'HP1α, i al tornar a inhibir la seva expressió no detectem cap recuperació dels nivells d'H4K20me3. Contràriament, els nivells d'expressió d'H3K27me3 si que es recuperen en les MEFs reKO, després de la disminució d'aquests causada per l'expressió HP1α (Figura R49B).

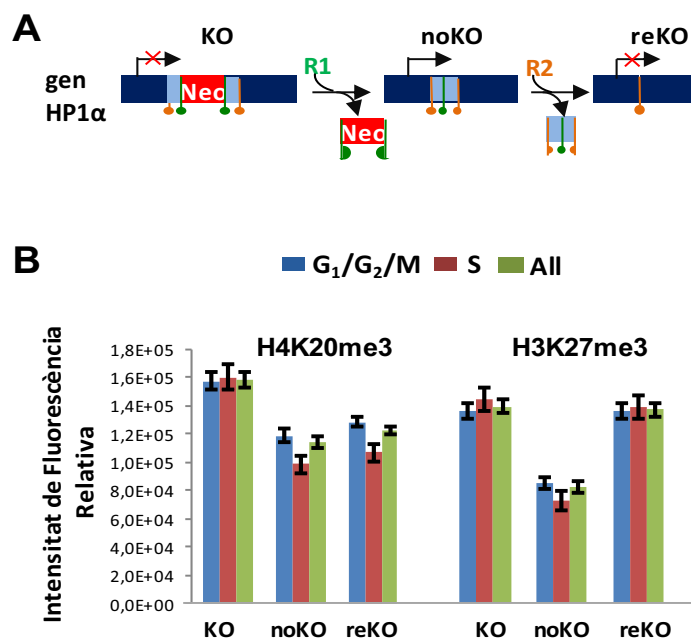


Figura R49. La presència o absència d'HP1α modifica els nivells de les marques d'heterocromatina H4K20me3 i H3K27me3. A Estratègia per la recuperació de l'expressió d'HP1α (noKO), a partir de l'HP1α KO original (KO), i posterior inhibició d'aquesta (reKO). R1: Cre recombinasa, R2: Flpe recombinasa. **B** Quantificació de les modificacions postraduccional H4K20me3 i H3K27me3a partir d'experiments d'IF de les diferents MEFs descrites en (A).

Extreurem que HP1α té un efecte directe en el control d'aquestes modificacions, explicant la falta de recuperació dels nivells d'H4K20me3

observats en absència d'HP1 α (reKO), com a un efecte que es podria produir més a llarg termini.

Degut a que aquesta modificació regulada per HP1 α és catalitzada per un important component estructural de l'HC com és Suv420h2, el qual media la compactació a través de la interacció amb HP1¹²¹, varem decidir estudiar aquesta interacció, entre Suv420h2 i les isoforms d'HP1, *in vivo*, mitjançant la tècnica del FRET. Vam observar que Suv420h2 interaccionava significativament més amb HP1 β que no pas amb les altres dues isoforms d'HP1, α i γ (Figura R50). Per tant, hi hauria una relació més estreta entre Suv420h2 i la isoforma HP1 β .

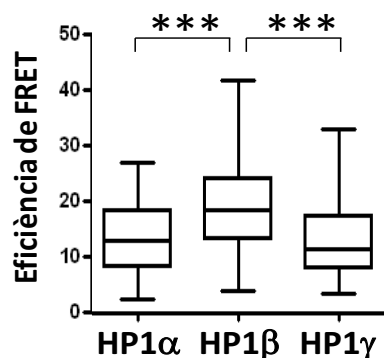


Figura R50. Interacció entre les isoforms d'HP1 i la metiltransferasa Suv420.

Quantificació del FRET entre Suv420h2 i les isoforms d'HP1. (***: $p < 0,0005$). N=45.

Seguidament, i tenint en compte aquestes diferències de les isoforms d'HP1 amb factors relacionats amb el nivell de compactació de la cromatina vam estudiar l'efecte de cadascuna d'elles sobre l'estructura d'HPC. Vam estudiar aquest aspecte mitjançant la digestió, amb MNasa (nucleasa micrococcal), de l'ADN de cadascuna de les línies de MEFs, de la qual en vam obtenir la informació sobre la compactació total de la cromatina. A continuació, la incubació d'aquestes mostres, transferides per southern, amb una sonda de major satèl·lits marcada amb [³²P], ens va permetre detectar el grau de compactació a nivell d'HPC (Veure materials i mètodes). Respecte la compactació a nivell global, en absència d'HP1 α vam observar una cromatina menys digerida, respecte el control, contràriament, en les

MEFs HP1 β ^{-/-} vam diferenciar una cromatina lleugerament més digerida. I en el cas de les MEFs HP1 γ ^{-/-} no vam apreciar cap canvi en comparació a les MEFs WT. Semblaria que en absència HP1 α es compacta més la cromatina i que respecte la pèrdua d'HP1 β s'indueix una estructura de la cromatina més relaxada.

I més específicament, a nivell d'HPC, mitjançant la detecció a través de la sonda de major satèl·lits, vam veure que en absència d'HP1 α i també d'HP1 γ , però en menor mesura, es produiria una estructura més compactada, ja que la sonda s'uneix a les zones menys digerides d'ADN, respecte en les cèl·lules WT que no pas en les MEFs HP1 β ^{-/-}, on la vam detectar en zones més digerides (Figura R51).

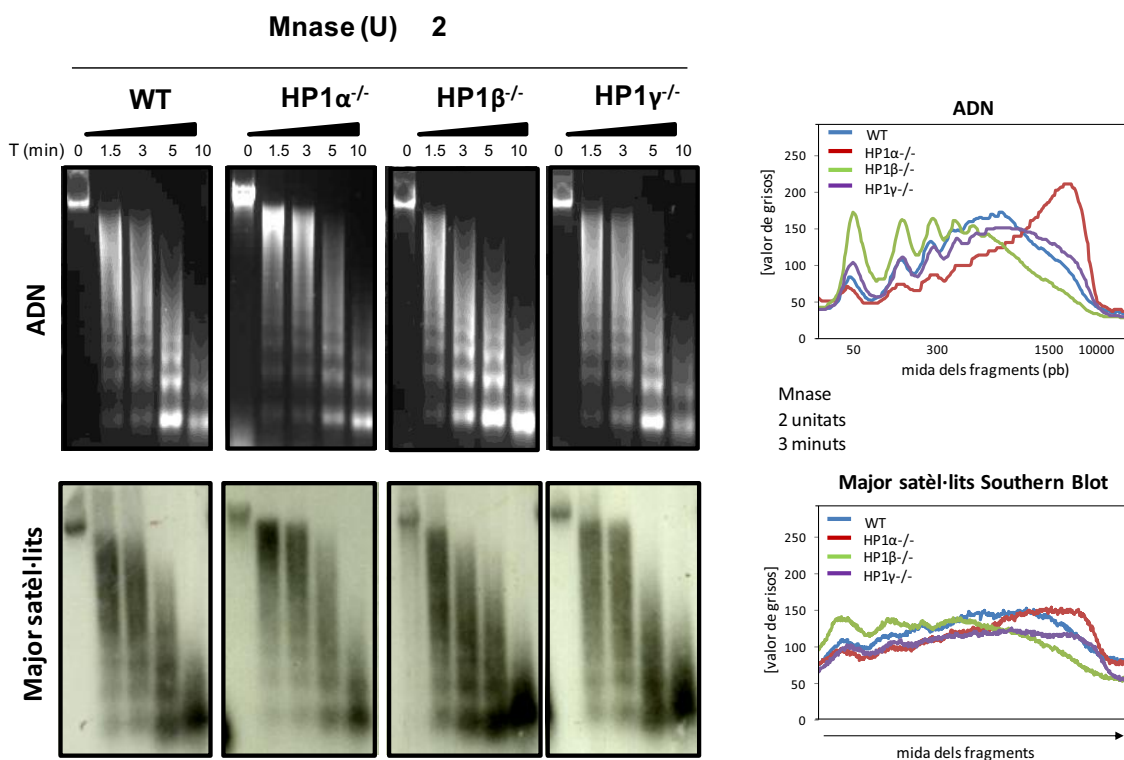


Figura R51. Compactació en les MEFs WT i KO per les diferents isformes d'HP1. A

A la part superior, digestió de l'ADN amb 2unitats d'MNasa als diferents temps i mostres indicades. I a la part inferior, incubació de les mostres amb una sonda de major satèl·lit marcada amb [³²F], després de la transferència per southern. **B** Representació de la quantificació del punt tres de diversos experiments com el mostrat en (A) mitjançant la mesura d'intensitat dins una escala de grisos n=5.

Aquests resultats suggeririen un paper d'HP1 α en el control de la compactació ja que en absència d'aquesta augmenta. Respecte la pèrdua d'HP1 β , es relacionaria amb una cromatina menys compactada i la d'HP1 γ causaria una estructura més semblant al KO per HP1 α , però amb un efecte menor.

Finalment, un aspecte interessant en els nostres estudis va ser caracteritzar la relació entre les isoformes d'HP1 i Suv39h1 sota condicions d'estrès, com aquestes proteïnes restructuren la cromatina per tal de mantenir una adequada estabilitat genòmica. Per estudiar aquest aspecte vam analitzar com les isoformes d'HP1 regulaven la dinàmica de Suv39h1 a nivell de foci d'HC per un assaig de FRAP i utilitzant l'agent oxidant H₂O₂. Vam observar que l'intercanvi de Suv39h1 en MEFs WT i KO d'HP1 α i HP1 γ està augmentat. Això explicaria, com vam demostrar en treballs previs, que sota condicions d'estrès s'incrementa l'intercanvi per assegurar la protecció del genoma. I seguint el patró com en d'altres experiments on veiem una actuació oposada d'HP1 β respecte les altres isoformes, amb l'absència de HP1 β no vam veure un increment a l'intercanvi de Suv39h1 sota condicions d'estrès (Figures R52A i R52B). Això sembla indicar que HP1 β és necessària per l'adaptació de Suv39h1 en aquestes condicions.

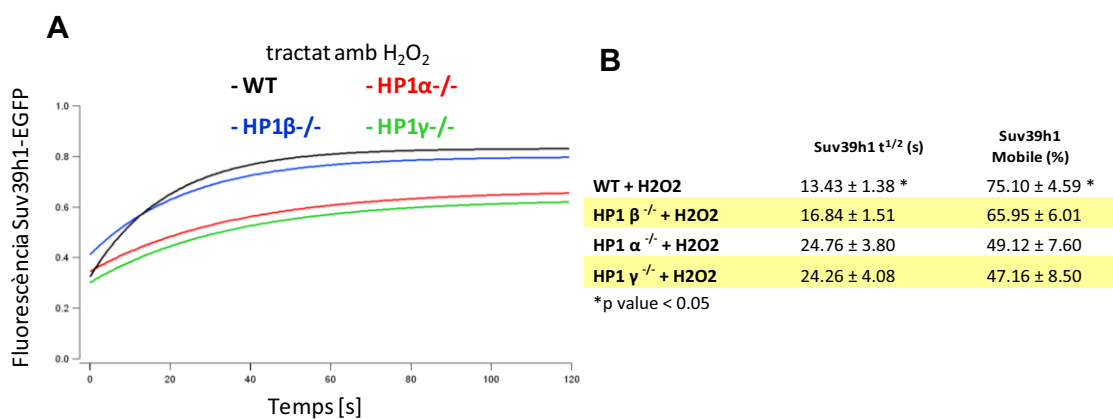


Figura R52. Distribució de les isoformes d'HP1 al foci d'HPC i implicació d'aquestes en la dinàmica sota condicions d'estrès. A FRAP de Suv39h1-GFP en les diferents línies de MEFs sota la incubació amb 2mM d'H₂O₂. **B** Quantificació i anàlisi estadístic dels experiments de FRAP en (A), com la fracció de la població mòbil (Mobile (%)), i temps mitjà de recuperació de fluorescència (t^{1/2}).

Vam realitzar un segon experiment per tal d'entendre la relació entre les isoformes d'HP1 i Suv39h1 sota estrès. Es va portar a terme en MEFs WT i KO per Suv39h1 tractades en condicions normals i sota condicions d'estrès (5mM H₂O₂). Es van analitzar els nivells endògens de les isoformes d'HP1 i vam observar que sota condicions d'estrès, en les MEFs WT, van augmentar totes tres. Però en les MEFs KO per Suv39h1 sota aquestes condicions, només HP1β va incrementar els seus nivells (Figura R53).

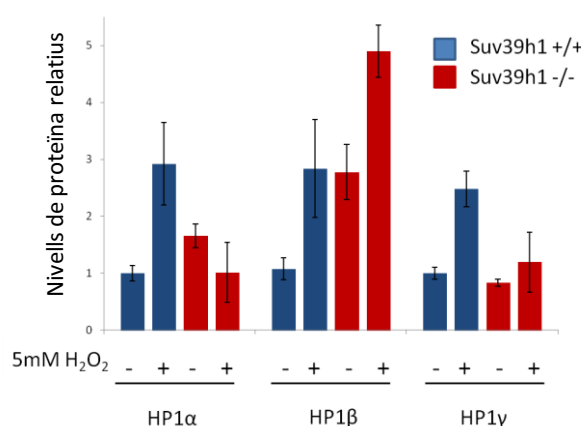


Figura R53. Els nivells d'HP1α i d'HP1γ són regulats sota condicions d'estrès a través d'un mecanisme dependent de Suv39h1. Quantificació de diversos experiments (n=5) de WT de MEFs Suv39h1^{+/+} (WT) i Suv39h1^{-/-} (KO) tractades en absència o presència d'H₂O₂ tal com s'indica. Es detecten els nivells endògens de les diferents isoformes.

Per tant, HP1α i HP1γ incrementen els seus nivells sota estrès a través d'un mecanisme que implica Suv39h1, en canvi, HP1β, en aquest aspecte, podria actuar independentment d'aquest.

Aquests resultats mostren que la regulació entre les isoformes d'HP1 i Suv39h1 pot ser molt important per l'adaptació de l'HC en condicions d'estrès i per tant, al manteniment de l'estabilitat del genoma.

RESULTATS

Discussió

En aquest treball, proposem un mecanisme per entendre la relació entre SirT1 i el manteniment de l'estructura de l'HC a través de la regulació de Suv39h1, i en particular, per la protecció de l'estabilitat genòmica en resposta a l'estrès. El nostre treball també suggereix la implicació de les isoformes d'HP1 en la regulació de Suv39h1 i en el manteniment de la integritat genòmica, així com també el seu paper en l'estructura d'HC. Recolzant d'aquesta manera el paper crucial de l'HC en l'organització i estabilitat de la cromatina i la seva implicació funcional en l'envelliment i la durada de la vida.

Importància de l'estabilitat i la dinàmica de Suv39h1 per la preservació de la integritat genòmica sota condicions normals i d'estrès

Demostrem, doncs, dos mecanismes de regulació dels nivells de proteïna de Suv39h1 implicats en el manteniment de l'estabilitat genòmica, un a través de SirT1 sota condicions d'estrès i l'altre amb la contribució de les isoformes d'HP1, el qual funcionaria sota condicions normals pel manteniment de l'estructura del foci d'HPC i tot i que sembla que també podria actuar sota condicions d'estrès.

L'estabilització de Suv39h1, tant per part d'HP1 com de SirT1, és a través de la unió a la regió N-terminal de Suv39h1, entrant en competència per aquesta regió (Figura D1).

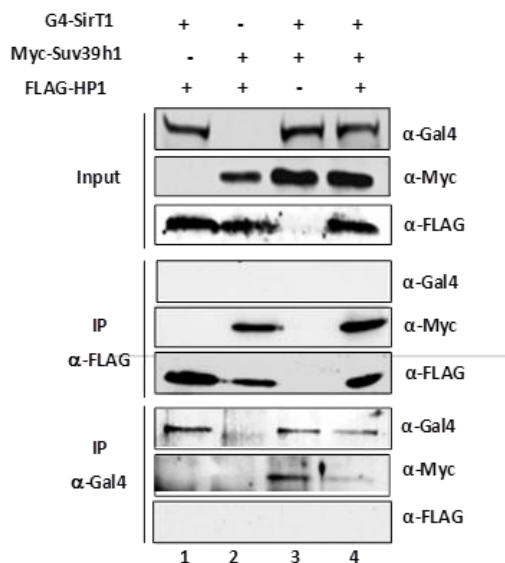


Figura D1. SirT1 and HP1α competeixen pel mateix lloc d'unió a Suv39h1. IP entre Suv39h1, HP1 i SirT1 a partir d'extractes amb les combinacions de proteïnes transfectades indicades. Per una part, immunoprecipitant Suv39h1 amb Flag-HP1 i per l'altre amb Gal4-SirT1. Observem els imputs les elucions d'ambdues immunoprecipitacions detectats amb anticossos per l'etiqueta Myc (Suv39h1), Flag (HP1) i Gal4 (SirT1).

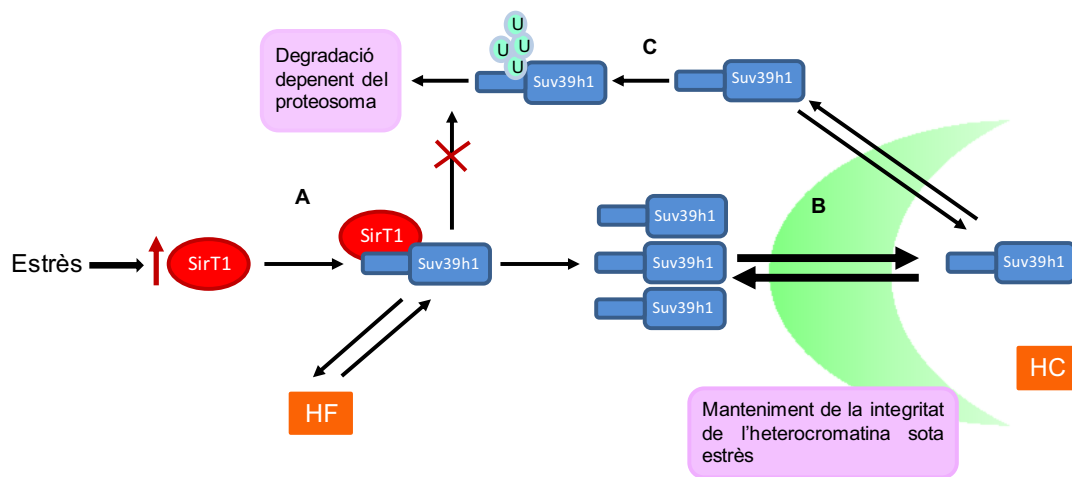
Per tant, especulem que sota condicions d'estrès, o es podria activar un dels dos mecanismes, ja que ambdós tenen la mateixa finalitat quedant l'altre com un mecanisme de reservori podent-se activar sota altres condicions específiques o sota alguna afectació de l'expressió de les proteïnes implicades en el mecanisme en funcionament. O que s'activin els dos alhora actuant sobre la fracció de Suv39h1 disponible en diferents regions ja que degut a la competència no podrien interaccionar amb el mateix. Els nostres estudis indiquen que aquesta regulació de Suv39h1 per part d'HP1 seria directament sobre la metiltransferasa disponible dins del foci d'HPC, ja que HP1 si que s'hi localitza, a diferència de SirT1. Suggerim que la regulació per part de SirT1 es porta a terme fora del foci ja que aquest no s'ha localitzat massivament en les regions d'HPC com s'observa en experiments de fluorescència⁷². En aquest sentit l'única evidència de que SirT1 es troba en aquestes regions va ser per la detecció mitjançant estudis

de ChiP. Però els nivells detectats van ser molt baixos i a més a més aquests resultats plantegen dubtes ja que aquesta tècnica és molt sensible però imprecisa¹⁷⁸.

Per tant, aquesta hipotètica regulació simultània des de diferents regions podria sumar els efectes dels dos mecanismes, produïnt un major augment de la dinàmica de renovació de Suv39h1, per fer front a un estrès sever per tal de mantenir la integritat de la cèl·lula.

Mecanisme proposat per mantenir l'estabilitat genòmica a través de la regulació de Suv39h1 per part de SirT1 sota condicions d'estrès

En el mecanisme que proposem entre SirT1 i Suv39h1 per entendre la relació funcional entre aquestes dues proteïnes a l'HC, SirT1 preserva l'estructura de l'HC a través de l'estabilització de Suv39h1 sota condicions d'estrès inhibint la poliubiquitinització mediada per MDM2 a la lisina 87 del domini chromo de Suv39h1.



DISCUSSIÓ

Figura D2. Model proposat. Model de com SirT1 modula Suv39h1 en l'estructura de HPC en resposta a l'estrès. **A** Sota condicions d'estrès SirT1 estabilitza Suv39h1 inhibint la seva degradació gràcies a la unió amb aquest. **B** L'increment dels nivells de Suv39h1 fa augmentar l'intercanvi d'aquest i manté així la integritat genòmica. **C** Una fracció de Suv39h1 es degrada a través de la via del proteosoma.

L'increment de Suv39h1 disponible s'associa amb una renovació més ràpida de l'HPC i un increment de la protecció de la integritat genòmica en aquestes condicions (Figura D2).

Relació entre Suv39h1 i l'E3 ubiquitin lligasa MDM2 sota condicions d'estrès

La interacció de SirT1 amb Suv39h1 inhibeix la poliubiquitinització d'aquesta mediada per l'E3 ubiquitin lligasa MDM2 (Figures R22A i R23A). S'ha descrit que MDM2 està implicat en la degradació del supressor de tumors p53, en condicions de no estrès, mantenint-la a un nivell baix. Quan les cèl·lules estan exposades a estrès, la proteïna p53 s'acumula i s'activa, sent essencial pel manteniment de l'estabilitat genòmica i la protecció contra la tumorigènesis^{179,180,181}. La formació d'un complex p53-Suv39h-MDM2 té un paper important en la resposta a estrès¹⁷². En aquest sentit, l'augment dels nivells de p53 podria portar associat un augment de Suv39h1. Una possible especulació és que això permeti la regulació coordinada dels dos factors (MDM2 i Suv39h1) sota estrès.

La cromatina com a entitat altament dinàmica

Com a conseqüència d'aquesta protecció de Suv39h1 per SirT1 s'augmenta la fracció disponible de Suv39h1 que es tradueix en un augment en el seu intercanvi afavorint una cromatina més dinàmica. Fet que hem confirmat per experiments de FRAP augmentant la concentració de Suv39h1 i observant l'esperat increment de la dinàmica d'aquest (Figura R13) vist per l'efecte de SirT1 sota condicions d'estrès.

Els nostres estudis donen suport a la visió actual de l'heterocromatina, no com una entitat estàtica i inaccessible de conformació d'ordre superior, si no com una estructura altament plàstica gràcies a diversos factors com la remodelació dels nucleosomes, les modificacions posttraduccional i la regulació per una varietat de proteïnes d'unió i

complexes, fent que tingui el potencial per adaptar-se ràpidament a diversos estímuls i estrès^{55,182,183,184} que influeixen en els patrons d'expressió de gens o la progressió del cicle cel·lular^{183,184}. Per exemple, sota dany a l'ADN l'heterocromatina pateix una remodelació nucleosomal global per aconseguir una conformació descondensada de cromatina accessible a proteïnes essencials de reparació de l'ADN^{182,185}, entre d'altres canvis, per fer front a aquest dany. Nosaltres proposem un augment de la dinàmica de recanvi de la cromatina a través de l'increment de l'intercanvi de Suv39h1, una de les proteïnes clau en l'organització i estabilitat del genoma. S'ha demostrat que diverses proteïnes estructurals d'unió a la cromatina estan en constant renovació, com és el cas d'HP1 i de Suv39h1, i que la dinàmica d'aquestes és essencial per regular els processos relacionats amb l'estabilitat genòmica^{186,187}. HP1 i Suv39h1 estan en constant intercanvi: un 95% de les molècules d'HP1 i al voltant d'un 70% de les molècules de Suv39h1 mostren ser altament mòbils *in vivo* per anàlisi de FRAP^{183,184}.

Altres autors proposen que una alta renovació de Suv39h1 està associada a una cromatina menys compacta i a transcripció degut a que l'intercanvi a eucromatina és molt més ràpid⁸⁹. Tot i que els nostres experiments d'IF per HP1, Suv39h1 i H3K9me3 (Figura R44) indiquen que en aquestes condicions no s'observa un canvi en l'estructura del foci. L'increment de SirT1 afecta a l'intercanvi de Suv39h1 però no altera ni el número de molècules de Suv39h1 unides a l'HC ni la compactació d'aquesta regió. Això és recolzat pels nostres anàlisis del mutant K87A el qual mostra un intercanvi incrementat en HPC (Figura R29) sense associar-se a cap canvi remarcable en els marcadors d'HC citats (Figura R30) excepte per un decreixement limitat dels nivells d'H3K9me3 (data no mostrada). També ho demostrem amb la regulació dels major satèl·lits, les seqüències repetitives que ocupen aquestes regions, als quals no veiem canvis en el control d'aquestes comparant el Suv39h1 WT amb el mutant Suv39h1K87A (Figura D3)

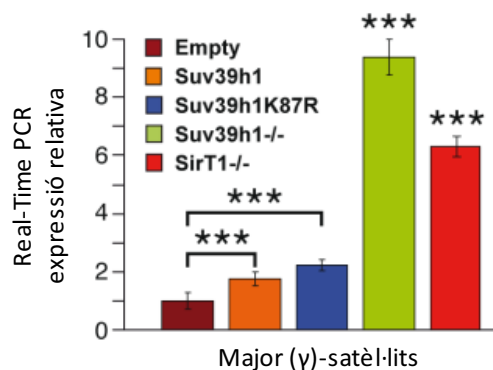


Figura D3. Suv39h1 i el mutant Suv39h1K87 regulen igual l'expressió dels major satèl·lits. Quantificació de la RT-PCR dels nivells d'expressió dels γ o major satèl·lits en les línies cel·lulars NIH3T3 amb el vector buit, Suv39h1 o Suv39h1K87R i MEFs Suv39h1-/- i SirT1-/- mostrades a la figura. (***) $p < 0.002$.

Per tant podem extreure que el grau de renovació de Suv39h1 en HPC i l'estructura de la cromatina no van necessàriament units.

Les proteïnes associades a la cromatina tot i ser altament dinàmiques tenen una fracció immòbil variable depenent de la proteïna i les condicions en les que es troba exposada. Està descrit en Suv39h1 una fracció immòbil d'un 25%⁸⁹. Els nostres estudis mostren que en absència d'ambdues isoformes, HP1 α i HP1 β , on conseqüentment està descrit que tampoc s'hi localitzaria HP1 γ ¹⁰³, seguim detectant, en el foci d'HC, aquesta proporció de fracció immòbil de Suv39h1 la qual podria estar interaccionant amb ARN, amb altres proteïnes, etc. Per tant, hi ha una part de Suv39h1 independent d'HP1.

Certs estudis descriuen que la fracció immòbil de Suv39h1 podria ser indicativa de conformacions de la cromatina que no són propenses a processos que regulen activitat transcripcional, però que juguen un paper en l'organització estructural del nucli de la cèl·lula⁸⁹. Els nostres estudis demostren que un increment en el recanvi i la fracció mòbil de Suv39h1 també juguen un paper en la protecció de l'estructura d'HPC. Observem que el mutant Suv39h1K87 té una taxa de renovació més alta que el control Suv39h1 (Figura R29) i una major estabilitat que observem a partir de la disminució en els indicadors de dany, γ H2AX i micronuclis, i en aberracions cromosomals (Figures R31 i R32).

Basat en les nostres troballes, hipotetitzem un model on un intercanvi més ràpid de Suv39h1 en HPC i una major fracció mòbil d'aquest, conformen una estructura de l'HC més dinàmica, que podria reflectir que en condicions d'estrès s'acceleri el recanvi dels elements de l'estructura per un costat i per l'altre es faciliti l'accés de la maquinària de reparació al foci d'HC. D'aquesta manera faria que es reduís el temps de localització del dany al foci mantinguent l'HC amb aquesta alta renovació.

Importància de l'estabilització dels nivells de Suv39h1 en l'estabilitat genòmica

Tot i que alguns autors han suggerit que la sobreexpressió de Suv39h1 indueix una proliferació i diferenciació alterada en ratolins¹⁸⁸, sabem que la seva absència també està associada amb inestabilitat genòmica⁵⁵. Els nostres estudis semblen suggerir un gran valor a l'estabilització de Suv39h1, ja que creiem que és crucial per l'increment de la dinàmica i posterior manteniment de l'estructura de la cromatina i integritat genòmica sota condicions d'estrès. Estudis recents donen suport al valor d'aquesta estabilització per fer front a malalties prevenint la inestabilitat genòmica. La làmina A, un important component de la làmina i matriu nuclear, interacciona amb Suv39h1 protegint-lo de la degradació proteasomal. Aquesta estabilització de Suv39h1 sembla està implicada en la protecció del síndrome de progèria Hutchinson-Gilford causat predominantment per una mutació al gen de la làmina A¹⁸⁴.

Per tant, les troballes aportades relacionen l'augment dels nivells de Suv39h1 amb estabilitat genòmica.

Així doncs que aquest mecanisme via activació de SirT1, estableix la regulació precisa de l'estructura d'HC sota situacions comprometedores (estrès oxidatiu) i assegura la protecció genòmica sota aquestes condicions.

Implicació de les isoformes d'HP1 en l'estabilitat genòmica a través de la regulació de Suv39h1

Sorprenentment, tot i l'alta similitud entre les tres isoformes d'HP1, aportem una regulació diferencial d'aquestes sobre Suv39h1. Dues de les isoformes d'HP1 existents en mamífers, HP1 α i HP1 γ , augmenten els nivells de Suv39h1 a través de la seva unió i regulació a la regió N-terminal d'aquest (Figura R37), com hem vist amb SirT1, inhibint la degradació per ubiquitinització i conseqüentment augmentant l'intercanvi de Suv39h1 (Figura D4).

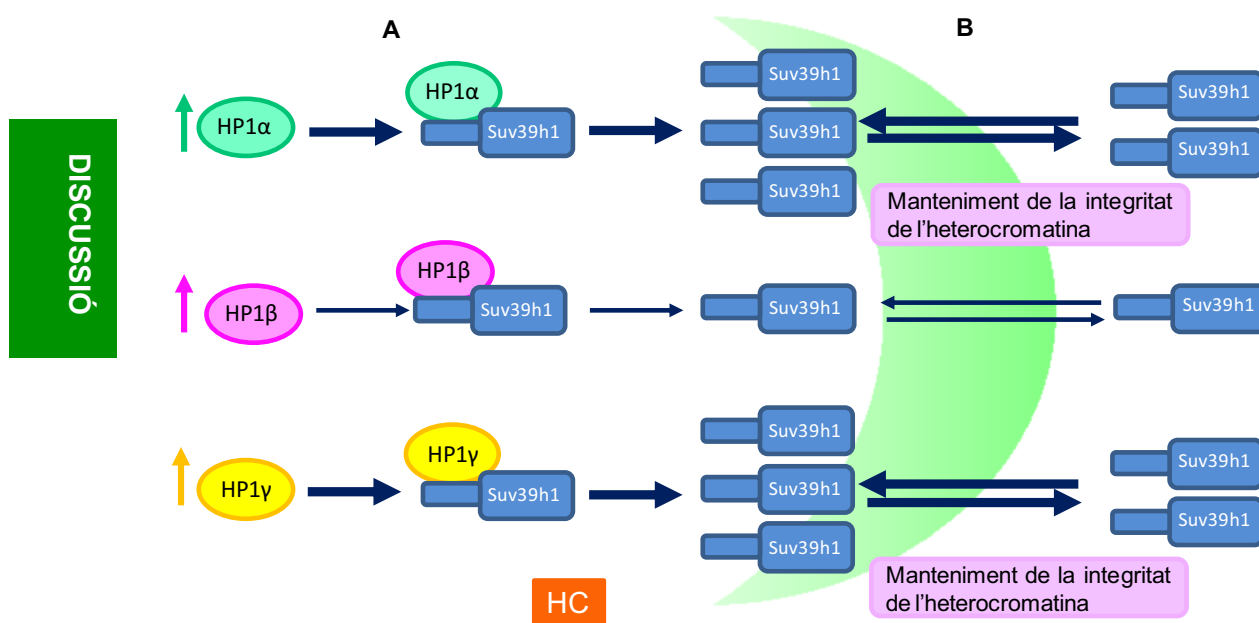


Figura D4. Regulació dels nivells de Suv39h1 per part de les isoformes d'HP1 i conseqüent augment de la dinàmica per mantenir la protecció del genoma. A L'augment d'HP1 α i HP1 γ incrementen els nivells de Suv39h1. **B** Aquest augment dels nivells de Suv39h1 provoca una dinàmica d'intercanvi d'aquest més ràpida per tal de mantenir una adequada estabilitat genòmica.

Contràriament, HP1 β sembla que no estabilitza Suv39h1 (Figura R33). Una primera hipòtesi per explicar aquesta observació seria que degut a

la dèbil interacció entre aquestes dues proteïnes, aquesta isoforma quedaria desplaçada, segons els nostres resultats, per exemple, en presència d'HP1 α (Figures R39 i R40). Per tant, la inhibició de la degradació per part d'HP1 β es veuria reduïda en aquestes condicions. Una segona hipòtesi seria l'actuació d'HP1 β com a reservori ja que sabem que existeix una certa redundància entre les isoformes. Aquesta hipòtesi està recolzada pel paper funcional d'HP1 α , ja que està descrit que en ratolins KO per aquesta isoforma no s'observa cap canvi respecte els WT¹³⁰, suggerint que la seva funció podria estar recolzada per les altres isoformes.

Una altre hipòtesi seria que l'activació d'HP1 β fos necessària en altres contextes o condicions, per exemple sota condicions d'estrès. Tot i que està descrit que les tres isoformes estan involucrades en la reparació del dany a l'ADN, HP1 β pateix una modificació (fosforilació a la Thr51) específica i diferencial respecte les altres isoformes, per tal de facilitar la resposta al dany a l'ADN¹⁸⁹ i podríem especular que aquesta modificació estigués implicada en aquest efecte.

Una altra observació que recolza la relació diferencial entre HP1 β i estrès, respecte les altres dues isoformes, és que l'augment observat dels nivells d'aquesta isoforma en aquestes condicions sembla ser independent de Suv39h1 (Figura R53). Per tant semblaria que HP1 β pot actuar sota estrès dependent o independentment de Suv39h1.

Respecte aquesta mateixa hipòtesi, observem que en els experiments de dinàmica sota estrès, la isoforma d'HP1 β és necessària per augmentar l'intercanvi de Suv39h1 per tal de mantenir la integritat genòmica (Figura R52).

Relació de la regulació entre Suv39h1 i les isoformes d'HP1

En aquesta regulació de Suv39h1 per part de les isoformes d'HP1 observem un mecanisme de retroalimentació del control d'aquestes: les isoformes d'HP1 regulen els nivells de Suv39h1 i a l'inrevés (Figures R33 i R35).

En el cas de la regulació entre HP1 α i Suv39h1 es produeix una retroalimentació positiva. Això no és un resultat trivial, ja que, hi ha certes evidències contradictòries respecte el paper d'HP1 α a la protecció genòmica. Per un costat, hi ha treballs que relacionen l'expressió de la isoforma HP1 α amb el creixement tumoral¹⁹⁰. Altres evidències relacionen l'absència d'aquesta isoforma amb l'aparició de càncers com pot ser el càncer de mama¹⁹¹. Els nostres resultats demostren que l'augment dels nivells de Suv39h1 a través de SirT1, les isoformes d'HP1 α i d'HP1 γ està relacionat amb l'estabilitat genòmica. Per tant, l'augment d'ambdues proteïnes i la relació entre elles, semblen ser importants pel manteniment de l'estructura de l'HC per tal d'incrementar la protecció del genoma. És possible que el paper detectat com a inductor de tumors d'HP1 α sigui indirecte.

Com a resultat de la retroalimentació entre la isoforma HP1 β i Suv39h1, la sobreexpressió d'aquesta isoforma no canvia els nivells de Suv39h1. Això ens porta a pensar que en condicions normals el paper d'HP1 β no està relacionat amb Suv39h1. Però sota condicions d'estrès, on els nivells de Suv39h1 augmenten, aquest produeix una disminució de la isoforma HP1 β . No obstant això, el que està descrit és que la presència d'aquesta isoforma és vital per tal de mantenir l'estabilitat genòmica¹⁰². Per tant, això probablement suggereix o bé que aquest mecanisme induït per Suv39h1 no funciona en totes les circumstàncies o no funciona en condicions d'estrès. Sugeriríem però, que els nivells d'HP1 β es conservarien gràcies a l'augment d'aquesta isoforma independentment de Suv39h1 sota aquestes condicions.

Finalment, respecte HP1 γ especulem que aquesta isoforma s'autoregula a través de Suv39h1 mantenint uns nivells constants necessaris per regular adequadament les funcions de les quals forma part com per exemple la gametogènesis¹³⁰. I aquesta autoregulació també podria ser important per regular un possible augment d'HP1 γ ja que està descrit que la sobreexpressió d'aquesta està implicada en processos tumorogènics¹⁹².

Extensió del mecanisme d'estabilització de Suv39h1 per part de SirT1 a l'HF

Tot i que ens hem centrat en el paper de SirT1 i les isoformes d'HP1 en HPC, hem observat els mecanismes d'estabilització de Suv39h1 per part d'aquestes proteïnes, a nivell global de la cèl·lula, com es demostra en la regulació positiva de SirT1 que indueix alts nivells globals de Suv39h1 i H3K9me3 *in vivo* (Figura R16A). Per tant, també podrien ser crucials per preservar l'estructura de l'HF. Com s'ha esmentat anteriorment, l'increment en l'intercanvi de Suv39h1 aparentment no afectaria l'estructura del foci d'HPC. Per tant, l'augment en H3K9me3 s'ha de relacionar amb altres funcions relacionades amb Suv39h1. Atesa l'estreta relació entre SirT1 i Suv39h1 en HF, especulem que la coordinació de SirT1 a la formació d'HF també implica increment dels nivells de proteïna Suv39h1. Els nivells de Suv39h1 són limitats en condicions fisiològiques normals⁸⁶, un fet que és consistent amb les nostres troballes sobre la curta vida mitja de Suv39h1. Per tant, la inducció d'HF per SirT1 comença probablement amb l'estabilització de molècules de Suv39h1 per augmentar el nombre dels enzims crítics, induïnt així un augment en el nombre de complexos actius i arribant a un nivell en què podrien ser establertes estructures compactades. Per exemple, l'increment de SirT1 durant la deficiència de glucosa indueix la formació del complex eNoSC format per SirT1, Suv39h1 i nucleometilina en còpies d'ADN ribosomal¹⁹³.

En general, els nostres resultats demostren que la regulació dels nivells de Suv39h1 és un esdeveniment clau en la modulació de l'estructura de l'heterocromatina i representa un pas important en les situacions de resposta a l'estrès. Aquests resultats proporcionen una explicació molecular per la capacitat de l'heterocromatina per adaptar-se a la fisiologia cel·lular i la seva notable capacitat de preservar la integritat genòmica.

Paper de les isoformes d'HP1 en l'estructura del foci d'HPC

Model proposat per entendre l'estructura del foci d'HPC a través de les isoformes d'HP1

Tenint en compte els resultats obtinguts fins ara, importants pel manteniment de l'estructura de l'HC per tal de conservar una adequada estabilitat genòmica, proposem un model per entendre l'estructura d'aquesta centrant-nos en el paper de les isoformes d'HP1. Situàriem predominantment HP1 α , però també HP1 γ , formant homo i heterodímers, a diferents regions del foci d'HC limitant l'expansió de la marca H4K20me3. En aquesta regió, Suv39h1 s'uniria a HP1 α i a HP1 γ les quals l'estabilitzarien. I en el centre d'aquestes regions hi localitzariem HP1 β que tindria més afinitat amb Suv420h2 formant homodímers o heterodímers amb HP1 γ . En absència d'HP1 α , la modificació H4K20me3 s'expandiria provocant una compactació de la cromatina (Figura D5).

DISCUSSIÓ

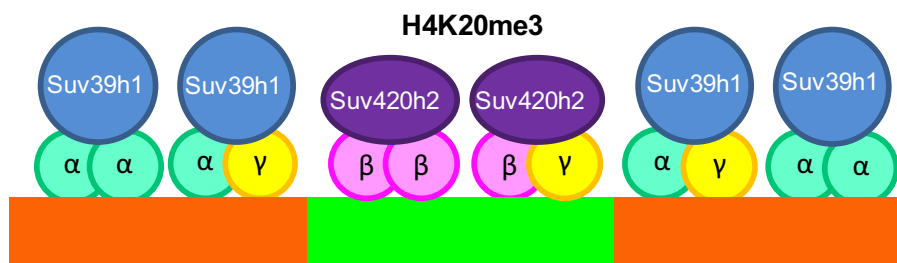


Figura D5. Model proposat. Diferent implicació de les isoformes d'HP1 en l'estructura de l'HC, amb el control de la marca d'H4K20me3 i amb l'actuació també de Suv39h1 i Suv420h2.

Control de l'estructura de l'HC a través de les seqüències repetitives

Observem la importància de les diferents isoformes d'HP1 en el control de l'estructura de l'HC a través de la regulació de l'expressió de les seqüències repetitives presents en les regions cèntriques (minor satèl·lits) i pericèntriques (major satèl·lits). En la interfase, els major satèl·lits es detecten colocalitzant amb el DAPI als foci d'HPC i s'associen amb les proteïnes d'HP1, mentre els minor els situen a la perifèria dels foci formant entitats individuals i associant-se amb proteïnes centromèriques¹⁹⁴.

Suggerim que HP1 γ sembla tenir un paper predominant en el control de les zones pericèntriques recolzat per la relació amb el factor de transcripció PAX3 el qual també està relacionat amb aquest control. En aquestes regions, en menor mesura hi participaria també HP1 α , tot i que aquesta la podríem relacionar més amb el control les regions cèntriques (minor satèl·lits) (Figures R42, R43 i D6).

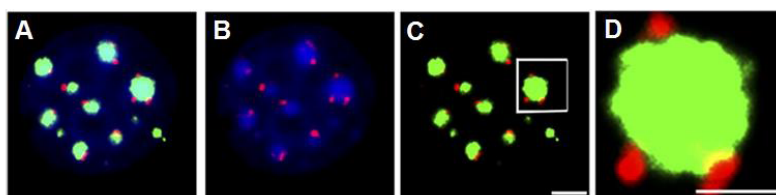


Figura D6. Major i minor satèl·lits d'ADN defineixen dominis en els nuclis de ratolins en interfase. Localització dels majors i minor satèl·lits en la interfase per anàlisi de FISH. **A** Imatge del MERGE. **B** Imatge del DAPI i dels minors satèl·lits. **C** Imatge dels satèl·lits minors i majors. **D** Primer pla del foci¹⁹⁴.

Suv39h1 i SirT1, igual que HP1 α i HP1 γ , són importants pel control de l'estructura de les regions pericèntriques ja que en absència d'aquestes observem una alta desregulació de l'expressió dels les seqüències repetitives presents en aquestes regions¹⁹⁵.

Control de l'estructura d'HC a través de les modificacions postraduccional

En el manteniment de l'estructura de l'HC per part de Suv39h1, SirT1 i les isoformes d'HP1, també hi estan implicades les modificacions postraduccional. Respecte l'estudi de la relació entre aquestes proteïnes i les PTM, estudis previs del grup van demostrar que en absència de SirT1 hi ha una clara deslocalització d'H3K9me3 i una desestructuració del foci d'HPC, per tant, una disminució d'aquesta marca en aquesta regió (Figura 118A). En MEFs KO per les 3 isoformes, contràriament, s'ha descrit que no s'afecta la localització d'aquesta modificació i que no varien els nivells al total de la cèl·lula¹¹⁶. Els nostres estudis confirmen que a nivell de foci l'absència de les isoformes d'HP1 no fan variar els nivells d'aquesta marca. Sugerim que podria ser degut a que la reclutació de Suv39h1, i per tant H3K9me3, a aquestes regions pot ser independent d'HP1.

Respecte la marca H4K20me3, està descrit que la quantitat i la localització heterocromàtica d'aquesta no presenta canvis en absència d'HP1 β ¹⁰². Els nostres estudis demostren que tant H3K27me3 com H4K20me3 depenen d'HP1 α . Encara que totes dues estan directament relacionades amb aquesta isoforma, ja que la restricció d'HP1 α retorna els nivells de les dues marques, en el cas d'H4K20me3 sembla ser més complexe (Figures R48 i R49). Estudis d'ARN (data no mostrada), juntament amb les dades del ReKO, semblen indicar que la restricció als límits d'H4K20me3 passa més a llarg plaç.

Amb aquests resultats hipotetitzem que HP1 α seria el gran element estructural d'HC en contrast amb HP1 β i HP1 γ , controlant l'expansió de la marca d'heterocromatització H4K20me3 en els límits del foci d'HPC. En aquestes zones hi trobem altres proteïnes que actuen com a barreres de la propagació de l'heterocromatina com és el cas de la proteïna estructural CTCF (factor d'unió a CCCTC)¹⁹⁶. S'ha identificat una unió significativa de CTCF als límits dels dominis de la cromatina repressiva marcats per H3K27me3¹⁹⁷, en la transició entre cromatina activa i inactiva (Figura D7)¹⁹⁸. Estudis recents descriuen una possible relació entre HP1 α i CTCF a través de la proteïna d'unió a ARN vigilin. Així la reducció mediada per CTCF de la

unió de vigilin a les repeticions pericèntriques bloqueja la càrrega d'HP1α en el "locus" d'aquestes repeticions. Per tant, hi hauria aquesta possible relació tot i que sembla que no seria una unió directa¹⁹⁹.

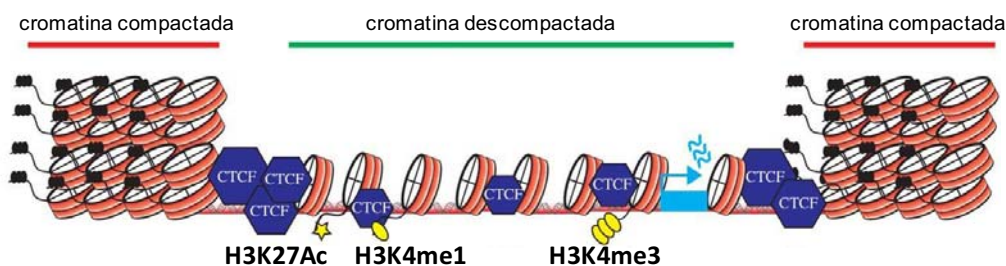


Figura D7. Paper del factor de transcripció CTCF implicat en el control dels límits de la cromatina repressiva. Llocs d'unió per CTCF en els límits que separen dominis actius i inactius¹⁹⁸.

Fins ara, respecte la distribució de les isoformes d'HP1 en el foci d'HPC, només s'havia descrit que HP1α i HP1β en aquestes regions no correlacionen completament i tampoc coincideixen exactament en tots els casos amb els llocs d'H3K9me3¹⁹⁵. Els nostres resultats suggeririen la localització d'HP1α com a controlador dels límits del foci d'HPC.

Paper diferencial de les isoformes en la compactació de la cromatina

HP1 és la proteïna per excel·lència implicada en la compactació de l'estructura de la cromatina, per tant, l'absència de les isoformes d'HP1 causa canvis en aquesta.

Sembla que l'absència d'HP1α està relacionada amb compactació tal com demostren els nostres resultats d'MNasa, dinàmica i la relació amb les modificacions d'heterocromatina (Figures R51, R46 i R48). Hipotetitzem que aquest augment de compactació en absència d'HP1α podria ser o per l'expansió de les marques d'heterocromatina com H4K20me3 o H3K27me3,

suggerint un paper d'HP1 α en el control de l'estructura de l'HPC, o com a conseqüència de la compactació produïda per l'HP1 β endogen.

HP1 β sembla estar més relacionada amb compactació segons els nostres resultats, fet que estaria recolzat pel treball d'uns autors descriuen que la localització d'HP1 β als foci serien "blocs" sempre compactats i de forma ovoide¹⁰³. Associem, per tant, l'absència d'HP1 β amb una cromatina lleugerament més descompactada, el mateix que observem als experiments de dinàmica.

Una altre dada que recolzaria la relació d'HP1 β amb compactació, seria la unió d'aquesta isoforma amb Suv420h2. Tot i que dades aportades pel laboratori de l'Schotta mitjançant experiments d'IF demostren una relació entre les isoformes d'HP1 i Suv420h2 similar per cadascuna de les isoformes¹²¹, els nostres estudis demostren una major unió de Suv420h2 amb HP1 β (Figura R50), respecte amb les altres dues isoformes, observada mitjançant experiments de FRET (tècnica altament sensible) *in vivo*.

Sabem que la interacció de Suv420h2 amb HP1 comporta un mecanisme seqüencial de l'establiment d'H3K9me3 i H4K20me3 a HPC⁶⁶, per tant, un mecanisme d'heterocromatització i compactació. Extrapolant aquest concepte ens portaria a especular un paper específic d'HP1 β a la càrrega i expansió tant de Suv420h2 com de la marca H4K20me3. No obstant això, la pèrdua d'HP1 β no comporta una pèrdua d'H4K20me3 (Figura R48B). Juntament amb el fet de que la pèrdua d'HP1 α a la llarga sembla aportar una hipermetilació d'H4K20me3, semblaria indicar que HP1 γ podria ser redundant amb HP1 β en aquests casos.

Respecte HP1 γ , la seva absència si que sembla que afecti a la compactació global incrementant-la lleugerament respecte al control, però a nivell de foci d'HC no s'observen canvis significatius. Per tant, suggeriríem que HP1 γ està relacionada amb les altres dues isoformes per intervenir en la compactació en aquestes regions formant heterodímers amb HP1 α i HP1 β . Fet que està recolzat pels estudis del doble KO d'HP1 α/β ^{-/-} on no s'observa localització de la isoforma HP1 γ al foci d'HPC¹⁰³.

Proposta del model englobant els diferents mecanismes implicats en el manteniment de l'estabilitat genòmica i en l'estructura de l'HC

El conjunt de totes les troballes proposaria un model en el qual hi hauria una regulació sobre Suv39h1 tant a fora del foci d'HPC, per part de SirT1 sota condicions d'estrès, com des de dins del foci per part d'HP1 α i HP1 γ , establint-lo. HP1 α també controlaria els límits d'aquestes estructures d'heterocromatina. HP1 β , respecte les altres dues isoformes, sembla que tindria més relació amb H4K20me3 i la dinàmica de Suv420h2 i tindria una relació funcional amb Suv39h1 aquesta en condicions d'estrès (Figura D8).

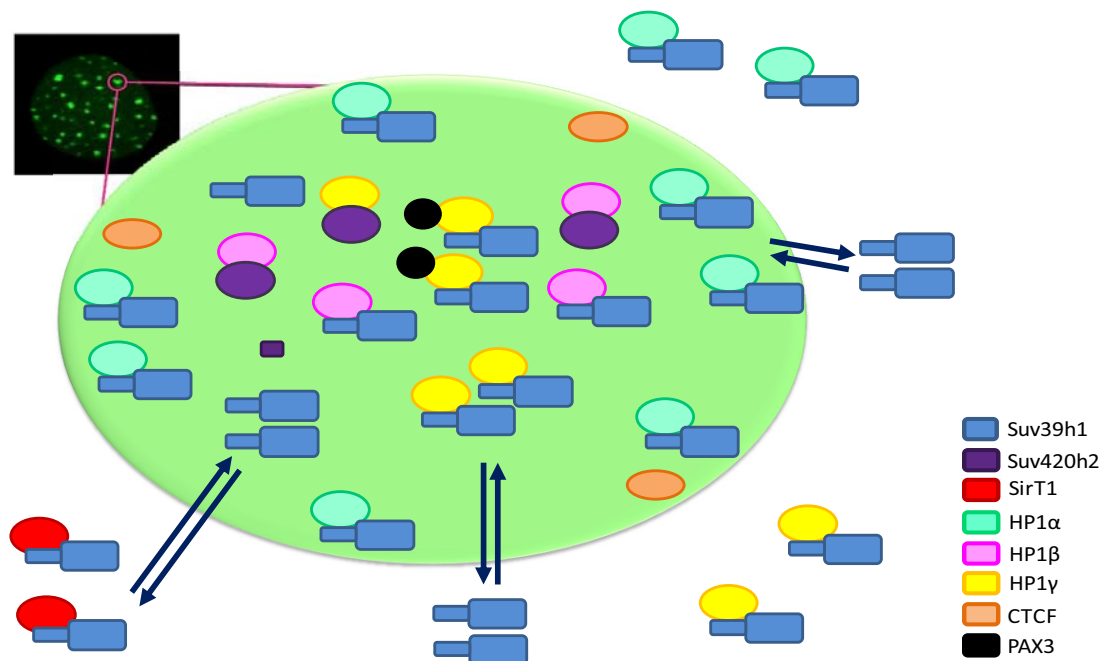


Figura D8. Model global proposat. Representació d'un foci d'HPC on hi veiem representats els diferents mecanismes i relacions proposades entre SirT1 i les isoformes d'HP1 a través de l'estabilització de Suv39h1 per tal de mantenir l'estabilitat genòmica tant dins com fora d'aquest. També s'indica el paper d'HP1 α , HP1 β i HP1 γ en l'estructura de l'HPC.

Implicació de SirT1 en l'estabilitat genòmica en l'envelliment

Els nostres resultats demostren que les proteïnes estudiades són crucials per mantenir una adequada estabilitat genòmica sota estrès.

El dany oxidatiu a la cèl·lula causat pel seu propi metabolisme al llarg de la vida d'un organisme (per exemple acumulació de ROS) causa inestabilitat genòmica (danys estructurals com mutacions a parells de bases, delecions, insercions i amplificacions de seqüència, trencaments de l'ADN, dany a gens supressors de tumors com p53, i increment de l'expressió de pro-oncogens), la qual està relacionada amb l'aparició d'un seguit de malalties relacionades amb l'envelliment com malalties metabòliques (diabetes tipus 2), neurodegeneratives (Alzheimer) i càncer⁴⁵.

La relació entre ROS i cromatina està recolzada per una gran quantitat d'evidències⁴⁶. SirT1 intervé en la reestructuració de la cromatina per tal de mantenir la integritat del genoma sota aquestes condicions, sabent que SirT1 s'activa en la majoria de condicions d'estrès que impliquen un desequilibri energètic (estrès oxidatiu (augment dels nivells de ROS), restricció calòrica, hipòxia) o un dany en el genoma (estrès genotòxic)⁴⁵ (Figura D9).

Respecte la relació entre SirT1 i CR s'observa que els nivells de proteïna SirT1 són elevats en ratolins mantinguts en un règim de CR. La CR també activa l'expressió de SirT2, SirT3, i SirT6, però reprimeix SirT4^{171,200,201}. Els nivells de SirT1 són més fortament influenciats per l'absència de sèrum que per l'absència de glucosa; l'augment de SirT1 sobre la privació de nutrients es deu principalment a un augment de la seva estabilitat de la proteïna⁴⁶.

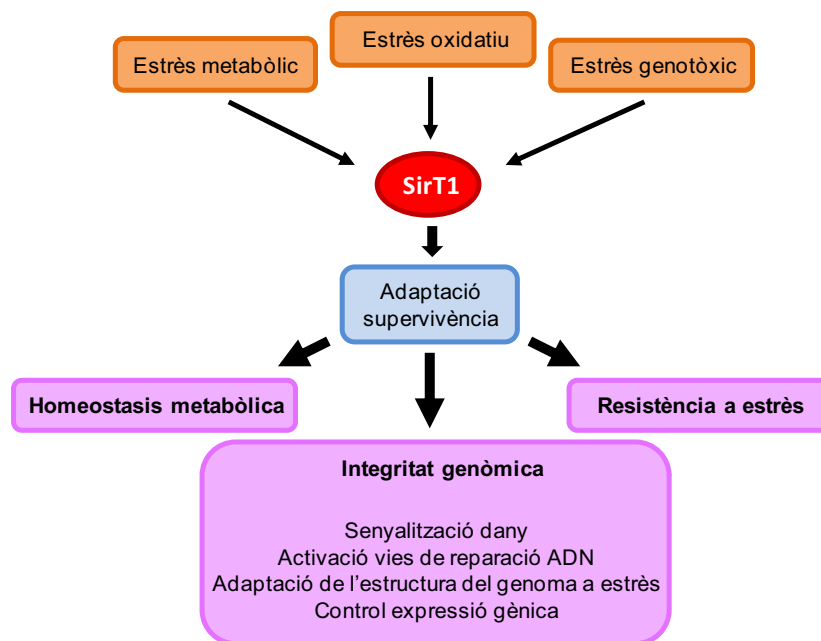


Figura D9. Resposta per part de SirT1 sota diferents tipus d'estrès. SirT1 intervé en diferents processos per tal de mantenir la integritat genòmica sota condicions d'estrès.

L'acumulació de dany produït per ROS i també per estrès genotòxic tant a l'ADN nuclear com mitocondrial és reduït mitjançant la CR, augmentant així la resistència cel·lular a l'estrès oxidatiu. La CR retrassa la taxa d'envelliment i estén l'esperança de vida màxima d'una àmplia gamma d'organismes, incloent el llevat, nemàtodes, *Drosophila* i mamífers. D'altra banda, la CR ha estat relacionada amb el retard en l'aparició de molts trastorns relacionats amb l'edat, com ja hem esmentat^{46,202}.

SirT1 és la que s'ha relacionat amb el retràs dels canvis fisiopatològics associats amb l'edat i la prevenció d'aquestes malalties de l'envelliment. Aquest enzim pot regular diverses funcions de supervivència desacetilant no només les histones, sinó també de molts factors de transcripció crucials, per exemple, els que controlen l'autofàgia i la producció de ROS.

Actualment hi ha controvèrsia en els estudis sobre el paper de SirT1 sobre la prolongació de la vida; molts dels efectes beneficiosos es poden relacionar amb la capacitat de SirT1 per millorar la qualitat de vida. Però és

probable que en els mamífers, les observacions relacionades amb l'edat estiguin relacionades també amb SirT6, a més de SirT1⁴⁵.

Hi hauria un equilibri òptim entre el nivell de producció de ROS i l'activitat de SirT1, que confereix els beneficis més favorable en la durada de la salut; en conseqüència, el manteniment d'aquest equilibri fins i tot pot ampliar la vida mitja d'un organisme.

Conclusions

SirT1 controla els nivells de Suv39h1 en el context d'estrès.

El mecanisme implicat és la poliubiquitinització de Suv39h1 que hem mapejat a la K87 del domini chromo.

Hem identificat la ubiquitina lligasa E3 implicada, la MDM2, un factor molt important en el control de la resposta a estrès relacionat amb p53.

Els nostres estudis suggereixen que l'augment dels nivells de Suv39h1 promou un augment de l'intercanvi d'aquest a l'HPC.

L'increment de la taxa de renovació de Suv39h1, observat al mutant K87 d'aquest, promou la integritat genòmica en condicions d'estrès genotòxic.

Aquest mecanisme pot ser també molt important per l'HF en el contexte del programa d'expressió en resposta a estrès regulat per SirT1.

Les isoformes d'HP1 α i HP1 γ també controlen l'estabilitat de Suv39h1 a nivell de foci d'HPC, el mecanisme a través del qual no està clar. HP1 β sembla tenir un paper com a reservori respecte la regulació de Suv39h1 en condicions normals.

HP1 α i HP1 γ també incrementen la renovació de Suv39h1. Específicament, HP1 β seria necessari en aquest augment sota l'efecte de l'estrès per garantir la integritat del genoma.

Les isoformes d'HP1 i Suv39h1 regulen els seus nivells a través d'una relació de retroalimentació. Excepte HP1 β , que podria conservar els seus nivells independentment de Suv39h1.

HP1 α seria el gran element estructural d'HC tinguent un paper com a controlador dels límits del foci d'HPC mantinguent l'expansió d'H4K20me3.

HP1 β sembla que tindria més relació amb H4K20me3 i amb la dinàmica de Suv420h2.

Sugeriríem que la funció d'HP1 γ aniria relacionada amb el paper de la isoforma amb la que dimeritzi, ja que per si mateixa està més relacionada amb la transcripció.

Materials i mètodes

Línies cel·lulars

293F (HEK 293F) Cèl·lules embrionàries de ronyó humà, les quals proliferen i es transfecten molt fàcilment.

HeLa Cèl·lules epitelials humanes procedents d'un carcinoma cervical. Aquestes, a part de créixer i transfectar-se fàcilment, són adequades per fer-hi tractaments.

H1299 Línia cel·lular de carcinoma de pulmó humà procedent dels ganglis limfàtics.

NIH-3T3 Línia cel·lular de fibroblasts embrionaris de ratolí amb morfologia mesenquimal.

Platinum-E Cèl·lules d'empaquetament retrovirals

MEFs Fibroblasts embrionaris de ratolí:

Les MEFs SirT1 WT i KO van ser proporcionades pel Dr. Fred Alt i pel Dr. Raul Mostoslavsky (Harvard University, Cambridge, MA).

Les WT i KO per Suv39h1 procedents del laboratori del Dr. Jenuwein

Les MEFs p53^{-/-} i p53^{-/-}/MDM2^{-/-} proporcionades pel grup del Dr. J. Mark.

I les MEFs WT i KO HP1α, HP1β i HP1γ, com també les noKO, ReKO d'HP1α^{-/-}, totes elles van ser proporcionades pel laboratori del Dr. Singh Prim.

293TREX Línia cel·lular amb expressió regulada per tetraciclina

La majoria de línies cel·lulars són crescudes i mantingudes en DMEM (Gibco) suplementat amb el 10% de suero boví fetal a 37°C en 5% CO₂. Excepte les cèl·lules Platinum en les quals afegim 1µg/ml de puromicina i 10µg/ml de blasticidina i les 293TREX amb 5µg/ml de blasticidina.

Plàsmids utilitzats

Les construccions de SirT1, SirT2 i Suv39h1 van ser prèviament descrites^{72,146}. Nterm-GFP i Chromo-GFP van ser clonats a pcDNA3.1/CT-GFP (Invitrogen). Mentres que les isoformes d'HP1-GFP van ser proporcionades pel Dr. Peter Hemmerich (Leibniz-Institut für Altersforschung) i clonades al vector pcDNA4To (Invitrogen) HA, Flag i RFP. També vam clonar

la region hinge de la construcció HP1 α -HA a l'HP1 β -HA i a l'inrevés. Mutacions puntuals de Suv39h1 van ser generades a través de mutagènesi dirigida. La construcció HA-ubiquitin va ser proporcionada per la Dra. Helen Piwnicka-Worms (WUSM, St. Louis, USA). La construcció Nt44-GFP va ser clonada en pcDNA3.1/CT-GFP (Invitrogen) utilitzant una estratègia de clonació estàndard basat en la PCR. La construcció YFP-HP1 va ser un regal del Dr. Hiraoka (Iwaoka, Japan). Els següents plàsmids es van obtenir a partir Addgene: pDEST17-UbE2B (15781), Ubch5c WT pET28a (12643), pCMV-myc3-HDM2 (20935), pGEX-4T MDM2 WT (16237), pDEST17-UbE2A (15780), pcDNA3-myc-CUL3 (19893), pcDNA3-HA2-CUL4A (19907) i pcDNA3-myc3-CUL4B (19922).

Procediments de transfecció

Tots els plàsmids s'han transfectat utilitzant el polímer polietilenimina (PEI). Aquest s'incuba 5 minuts amb l'ADN específic a temperatura ambient i s'afegeix a les cèl·lules les quals són lisades al cap de 48 hores.

Extracció de proteïnes, Western Blot i quantificació

L'extracte cel·lular total va ser preparat amb cèl·lules, majoritàriament, seguint el protocol Dignam ¹⁶⁷ amb el qual obtenim per separat l'extracte citoplasmàtic del nuclear. En algun cas obtenim directament l'extracte cel·lular total utilitzant el buffer RIPA, el qual és més estringent.

El Western Blot es va realitzar utilitzant els anticossos indicats i l'anàlisi densitomètric d'aquest es va fer amb el programa Quantity One de Biorad.

Anticossos utilitzats

Contra etiquetes	
α -Myc	Cell Signaling
α -Flag	Sigma
α -HA	Sigma
α -GFP	Upstate
α -Gal4	Upstate
Contra proteïnes endògenes	
α -Suv39h1	Millipore
α -SirT1	Millipore
α -SirT1 (G410)	De ¹⁴⁶
α -Sir2	Upstate
α -HP1 α	Euromedex
α -HP1 β	Euromedex
α -HP1 γ	Euromedex
α -actina	Sigma
α -H3	Cell Signalling
Contra modificacions	
α -H3K9me3	Upstate
α -H4K20me3	Millipore
α -H3K27me3	Diagenode
α -H3K4me3	Active motive
Secundaris	
α -mouse conjugat a HRP	DAKO
α -rabbit conjugat a HRP	DAKO
α -mouse Alexa Flour 488, 594	Molecular Probes
α -rabbit Alexa Flour 488, 594, 647	Molecular Probes

Assaig d'immunoprecipitació (IP)

Les IPs van ser realitzades utilitzant Flag-agarosa (Sigma), HA-agarosa (Sigma), agarosa crosslinkada amb l'anticòs Myc (Cell Signalling), i agarosa crosslinkada amb l'anticòs Gal4 (Millipore) com va ser prèviament descrit al¹⁸⁷. Les proteïnes unides van ser eluïdes amb 0,2 M de glicina amb pH 2,3 i amb 0,2 mg/ml de pèptid Flag quan va ser indicat. Els resultants d'IP van ser visualitzats mitjançant un western blot.

Experiments d'immunofluorescència (IF)

Per experiments d'IF, les cèl·lules van ser transfectades, i després de 24h, es van replaquejar en cobreobjectes i seguidament es van incubar durant 24 hores més. Les cèl·lules van ser fixades amb paraformaldehid al 4% durant 10min a temperatura ambient i es van permeabilitzar durant 10 minuts amb 0,1% d'azida sòdica PBS, 0,5% de Triton-X, 0,5-1% de BSA. Els anticossos primaris i secundaris es van diluir en 0,1% d'azida sòdica PBS, 0,2% de Triton-X, 0,5-1% de BSA. Com anticossos secundaris anti-rabbit Alexa Flour 647 (porpra) i anti-mouse Alexa Flour 594 (vermell), de Molecular Probes, van ser utilitzats. Les cèl·lules es contratenyir amb DAPI (Sigma) i els portaobjectes es van muntar en Mowiol. Es van obtenir imatges de les cèl·lules marcades utilitzant un làser de rastreig microscopi Zeiss LSM510 Meta confocal.

Els experiments d'IF en cèl·lules MEFs disminuïm a 2% de paraformaldehid durant el mateix temps, 10 minuts i augmentem el temps de permeabilització a 15 minuts.

Assaig d'ubiquitinització *in vitro*

L'assaig d'ubiquitinació *in vitro* es va realitzar com s'ha descrit prèviament²⁰³ amb algunes modificacions. Per a una reacció estàndard, 25ng de GST-Suv39h1 produït en bacteris o proteïna purificada myc-Suv39h1 de cèl·lules 293F es van barrejar amb UBE1 (UB101 LifeSensors) (0.2µM), ja sigui purificat E2 seu-Ubch5c (200ng) o His-UBE2B (200ng), E3 (GST-Mdm2)

(500ng), i 2µg d'ubiquitina (Sigma U6253) en 20µl de tampó de reacció (40mM de Tris, 5mM de MgCl₂, 2mM d'ATP, 2mM de DTT, pH 7.6). La reacció es va aturar després de 60min a 37°C mitjançant l'addició de tampó de mostra SDS, i posteriorment es resol en gels SDS-PAGE al 10% per l'anàlisi del Western Blot.

Experiments amb restricció calòrica

La quantitat de menjar que s'ofereix a les rates R s'actualitza setmanalment d'acord amb la ingesta de les rates C. Les rates es van allotjar individualment en gàbies per evitar la coprofàgia i amb temperatura controlada (22°C) amb un cicle de llum-fosc de 12h i l'accés lliure a l'aigua. Els animals es van sacrificar per decapitació en l'inici del cicle de llum. Es va recollir el sèrum i es va emmagatzemar a -70°C. Les cèl·lules SirT1 WT i KO van ser tractats amb el sèrum de rates ja sigui C o R durant 24h. Les cèl·lules tractades es van recollir a continuació per a l'anàlisi de transferència de Western. El teixit hepàtic de les rates C i R va ser extirpat, es va pesar, es van congelar en N₂ líquid, i després es va emmagatzemar a -70°C. Extractes cel·lulars totals de teixit hepàtic es van obtenir amb tampó de Laemmli i es van analitzar posteriorment per Western Blot.

Tractaments:

Inhibició del proteosoma

Els experiments d'inhibició del proteosoma es van realitzar mitjançant el tractament de cèl·lules HeLa amb 50 µM de lactacistina durant 24 h.

ARNi

L'ARNi de SirT1 va ser preparat com està prèviament descrit¹⁴⁶.

Tractament amb H₂O₂

Incubar les cèl·lules 1h a 37 °C amb 2mM d'H₂O₂ just abans de recollir-les.

Tractament amb BrdU

Per a la incorporació de BrdU per tal de diferenciar les cèl·lules en fase S, les cèl·lules es van incubar amb BrdU a una concentració final de 10µM en el medi de cultiu cel·lular durant 10 minuts.

Experiments de “pulse-chase”

Les cèl·lules HeLa van ser transfectades amb les construccions apropiades i després de 24 h de la transfecció van ser replaquejades. El pols de ³⁵S durant 40 minuts va ser realitzat després de 20h i les cèl·lules van ser recollides a diferents punts. La proteïna Myc-Suv39h1 va ser immunoprecipitada utilitzant l'anticòs Myc i el Suv39h1 total o el marcat va ser analitzat per Western Blot o per autoradiografia respectivament.

Assaig de metilació

Les mostres es van incubar a 30°C durant 60min en un buffer de reacció que conté 50 mM de Tris-HCl (pH 8,7), MgCl₂ 5 mM, DTT 4 mM, i 1 µM ³H marcada amb SAM (GE). Tres micrograms de “core histones” es van utilitzar com a substrat. La reacció es va aturar per addició de tampó Laemmli i després es va fraccionar en 12,5% de SDS-PAGE. Les histones separades es van transferir després a una membrana Immobilon-P (Millipore) i es van visualitzar per tinció amb CBB. La membrana es va polvoritzar amb EN³HANCE (PerkinElmer), i es va exposar a una pel·lícula Kodak Biomax MS durant la nit a -80°C.

Experiments de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Les cèl·lules es van mantenir a 37°C utilitzant una càmera d'incubació amb corrent d'aire controlada (Carl Zeiss, THORNWOOD, NY) i insertant calefacció. El “bleaching” es va realitzar en una àrea circular de 1,0µm de diàmetre utilitzant el làser 488nm a una intensitat del 100% (durada del “bleaching”: 25,6 µs). La recuperació de dades de fluorescència van ser

adquirides amb un làser d'argó que opera a 50% de la potència del làser i el filtre AOTF al 2%. La mida de la imatge és de 512x512 píxels amb un factor de zoom de 5, donant una mida d'escala xi de 0056µm/píxel. El pinhole confocal es va fixar en 1,18 unitats d'Airy (AU). L'escanejat es va realitzar de forma bidireccional amb una velocitat màxima d'escaneig (temps d'adquisició: 253ms). Intervals es van fixar en 247ms i les imatges es van recollir cada 500ms per cada 120 segons. L'ús de la regió d'interès (ROI) en funció del programari Zeiss LSM510, es van mesurar les tres regions d'interès: FRAP ROI (l'àrea de lleixiu intencional), BASE ROI (fons sense cèl·lules, off-set) i REFERÈNCIA ROI (disminució de la fluorescència d'adquisició en tot el nucli a causa del "photobleaching"). Una doble normalització¹⁸⁷ va ser després aplicada a tots els experiments FRAP. Després de la normalització, les intensitats de fluorescència relatives dins de la zona "bleachada" es van representar gràficament com una funció de temps, produint les corbes de recuperació del FRAP. El valor de la vida mitjana (definit com el temps necessari per arribar a la meitat del màxim de recuperació) es va calcular a partir de les corbes de recuperació que han estat adaptades en una equació exponencial estàndard.

Experiments de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

L'experiment de FRET es va portar a terme cotransfectant una proteïna amb GFP i l'altre amb RFP. Al cap de 48 h de la transfecció es mesura al microscopi confocal, Leica SP5.

"FRET acceptor photobleaching" és el mètode més directe i fàcil per estudiar FRET. Es tracta de cremar l'acceptor, l'RFP, amb una intensitat de làser 561 del 100%, sense cremar el donador, el GFP. Si hi ha FRET a la zona cremada, el donador tindrà una intensitat més alta de la que tenia a l'inici ja que no hi ha transferència d'energia perquè l'acceptor s'ha cremat. L'adquisició d'imatges es porta a terme amb les següents condicions: làser d'argó al 20%, pinhole obert (AU=2), imatges en 12 bits, format 512*512, velocitat: 700Hz, mode bidireccional, zoom=3, mostres al límit de la saturació

però sense arribar a estar saturades, “line average” de mínim 2 per disminuir el “background”.

S'adquireixen tres imatges: Imatge pre-bleach: imatge del donador (làser 488 al 9%, detector pel donador) i imatge de l'acceptor (làser 561 al 11%, detector per l'acceptor). Imatge bleach: ROI a la zona que interessa. Làser 561 al 100% i 7 passades de làser. I per últim la imatge post-bleach: imatge donador i imatge acceptor amb les mateixes condicions que la imatge pre-bleach.

La quantificació de la intensitat de fluorescència del donador amb la fórmula (utilitzant el Fiji):

$$\text{Eficiència de FRET} = (\text{donador post- donador pre}) / \text{donador post} * 100$$

Digestió per la nucleasa micrococcal (MNasa) anàlisi amb Southern Blot

A partir de $2 \cdot 10^6$ cèl·lules de cadascuna de les diferents línies de MEFs WT i KO de les isoformes d'HP1, es van fer dos rentants amb PBS, es van resuspendre en 1ml de buffer RSB (Tris 10mM pH 7.5, NaCl 10mM, MgCl_2 3mM) i un cop resuspeses es va afegir Nonidet P40 10% per trencar la membrana citoplasmàtica i incubant-les seguidament en gel durant 10 min. Les cèl·lules es van centrifugar a 1500 rpm durant 5 minuts, i el sediment nuclear es va resuspendre en 300 μ l de tampó nuclear (20mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 7.5, 70mM NaCl, 3mM de CaCl_2 i inhibidors de proteases). Es van dividir les mostres en quantitats de 70 μ l per ser digerides a diferents condicions, treballant amb una concentració de 2U/70 μ l d'MNasa amb diferents temps d'incubació (0, 1.5, 3, 5, 10min). La reacció es va aturar amb 10mM d'EDTA. Els productes de la digestió es van separar en gels d'agarosa al 1.5% en presència de Syber Safe i van ser escanejats al G-Box. Els gels, contenint les mostres d'ADN, es van transferir a la membrana Hybond-N per Southern. Un cop transferides, la membrana es va incubar amb la sonda del major satèl·lit, 5' GTGAAATATGGCGAGGAAAAC 3', marcada radioactivament amb [γ ³²P] (Perkin Elmer) gràcies a la reacció amb la T4 quinasa. La senyal va ser detectada exposant-la en films autoradiogràfics d'alta sensibilitat. I finalment els experiments van ser quantificats amb el

programa Fiji mitjançant la mesura de la intensitat de grisos a cada punt de la digestió representat en una gràfica respecte la mida dels fragments.

Producció retroviral i transfecció cel·lular

Per a la producció de retrovirus, la línia cel·lular d'empaquetament Platinum-E va ser transfectada amb pMSCV, pMSCV-Suv39h1-EGFP o pMSCV-Suv39h1K87R-EGFP utilitzant PEI (Polysciences, Inc). Els sobrenedants retrovirals resultants es van utilitzar per a infectar cèl·lules NIH3T3 i W8 i la població infectada es va seleccionar per 2µg/ml de puromicina.

FISH

Es van sembrar $2,5 \cdot 10^6$ cèl·lules en una placa de 100mm que conté medi de creixement per fibroblasts dos dies abans de la realització de les extensions de cromosomes. 24 hores després de la sembra, les cèl·lules es van irradiar (5Gy/5min) utilitzant un filtre d'alumini a 100 kVp (Faxitron Cabinet X-ray System, Faxitron X-ray Corp, Wheeling, IL) i es van tornar a l'incubador durant 24 hores addicionals. Es van obtenir les extensions de cromosomes després del tractament amb colcemida (0.02ug/ml) durant 3 hores. L'ADN centromèric es va tenyir utilitzant "Concentrated Mouse Pan-Centromeric Probes", seguint el protocol de fabricació i els cromosomes es van contratenyir amb DAPI. Les imatges es van obtenir utilitzant un microscopi d'epifluorescència Zeiss 200M (objectiu 65X).

Quantificació dels nivells de proteïna γH2AX i la presència de micro-nuclis

Per a la quantificació dels nivells de proteïna γH2AX i la presència de micro-nuclis, les cèl·lules es van sembrar en cobreobjectes recoberts amb poli-D-lisina, col·locats en plaques de 6 pouets amb 10^5 cèl·lules per pouet, i es van deixar incubar tota la nit. Irradiació amb raigs X (5Gy/5min), el

marcatge d'immunofluorescència i l'adquisició es van dur a terme com es descriu anteriorment, 24 hores després de la irradiació.

Purificació de l'ARN i RT-qPCR

L'ARN total va ser aïllat de les cèl·lules en cultiu amb el "NucleoSpinII kit" (Macherey-Nagel) d'acord amb les instruccions del fabricant. La transcripció reversa de l'ARN total (2µg) es va portar a terme utilitzant el "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche) d'acord amb el protocol del fabricant. L'anàlisi de la PCR quantitativa en temps real es va realitzar en una reacció en 10µl utilitzant el ciclador 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) i SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Els oligos per als major o γ-satèl·lits, minor satèl·lits, tubulina, GAPDH, RPL38 i EEF2 de ratolí i van ser dissenyats per amplificar amplicons 100-300pb. L'expressió relativa del gen es va determinar pel mètode de $\Delta\Delta C_T$.

Per l'amplificació amb la PCR, els primers específics utilitzats van ser:

Mostres		
Majorsatèl·lits	forward	5' CATATTCCAGGTCCTTCAGTGTGC 3'
	reverse	5' GACGACTTGAAAAATGACGAAATC 3'
Minorsatèl·lits	forward	5' CATGGAAAATGATAAAAACC 3'
	reverse	5' CATCTAATATGTTCTACAGTGTGG 3'
Controls		
Tubulina	forward	5' GCCAGAGTGGTGACAGGAAATA 3'
	reverse	5' TCACCACGTCCAGGACAGAGT 3'
GAPDH	forward	5' GGAGCCAAACGGGTCATCATCCC 3'
	reverse	5' GAGGGGCCATCCACAGTCTTCT 3'
RPL38	forward	5' AGGATGCCAAGTCTGTCAAGA 3'
	reverse	5' TCCTTGTCTGTGATAACCAGGG 3'
EEF2	forward	5' TGTCAGTCATCGCCATGTG 3'
	reverse	5' CATCCTTGCGAGTGTCAAGTGA 3'

Les RT-PCR per amplificar els major satèl·lits amb els seus respectius controls, es van portar a terme a una temperatura d'annealing de 60°C, en canvi, per amplificar els minor satèl·lits a 55°C.

Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadística es va realitzar utilitzant un test d'anàlisi de la variància (ANOVA).

Bibliografia

1. Wu, J. & Grunstein, M. 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci* **25**, 619–623 (2000).
2. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705 (2007).
3. Felsenfeld, G. & Groudine, M. Controlling the double helix. *Nature* **421**, 448–53 (2003).
4. Trojer, P. & Reinberg, D. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* **28**, 1–13 (2007).
5. Vaquero, A. The conserved role of sirtuins in chromatin regulation. *Int J Dev Biol* **53**, 303–322 (2009).
6. Yun, M., Wu, J., Workman, J. L. & Li, B. Readers of histone modifications. *Cell Res.* **21**, 564–78 (2011).
7. Kanwal, R. & Gupta, S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin. Genet.* **81**, 303–11 (2012).
8. Portela, A. & Esteller, M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* **28**, 1057–68 (2010).
9. Vaquero, A., Loyola, A. & Reinberg, D. The constantly changing face of chromatin. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **2003**, RE4 (2003).
10. Rodriguez, A. & Bjerling, P. The links between chromatin spatial organization and biological function. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1634–9 (2013).
11. Zhou, Y. *et al.* Reversible acetylation of the chromatin remodelling complex NoRC is required for non-coding RNA-dependent silencing. *Nat Cell Biol* **11**, 1010–1016 (2009).
12. Dion, V. & Gasser, S. M. Chromatin movement in the maintenance of genome stability. *Cell* **152**, 1355–64 (2013).
13. Shi, L. & Oberdoerffer, P. Chromatin dynamics in DNA double-strand break repair. *Biochim Biophys Acta* **1819**, 811–819 (2012).
14. Erdel, F., Krug, J., Längst, G. & Rippe, K. Targeting chromatin remodelers: signals and search mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1809**, 497–508 (2011).
15. Clapier, C. R. & Cairns, B. R. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 273–304 (2009).

16. Bai, L. & Morozov, A. V. Gene regulation by nucleosome positioning. *Trends Genet.* **26**, 476–83 (2010).
17. Erdel, F. & Rippe, K. Binding kinetics of human ISWI chromatin-remodelers to DNA repair sites elucidate their target location mechanism. *Nucleus* **2**, 105–12
18. Rowbotham, S. P. *et al.* Maintenance of silent chromatin through replication requires SWI/SNF-like chromatin remodeler SMARCAD1. *Mol. Cell* **42**, 285–96 (2011).
19. Maison, C. & Almouzni, G. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 296–304 (2004).
20. Xu, Y. & Price, B. D. Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle* **10**, 261–267 (2011).
21. Chantalat, S. *et al.* Histone H3 trimethylation at lysine 36 is associated with constitutive and facultative heterochromatin. *Genome Res.* **21**, 1426–37 (2011).
22. Nagy, Z. & Tora, L. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* **26**, 5341–57 (2007).
23. Sapountzi, V. & Cote, J. MYST-family histone acetyltransferases: beyond chromatin. *Cell Mol Life Sci* **68**, 1147–1156 (2011).
24. Bedford, D. C., Kasper, L. H., Fukuyama, T. & Brindle, P. K. Target gene context influences the transcriptional requirement for the KAT3 family of CBP and p300 histone acetyltransferases. *Epigenetics* **5**, 9–15 (2010).
25. Li, S. & Shang, Y. Regulation of SRC family coactivators by post-translational modifications. *Cell. Signal.* **19**, 1101–12 (2007).
26. Simon, M. *et al.* Histone fold modifications control nucleosome unwrapping and disassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 12711–6 (2011).
27. Doyon, Y., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S. & Côté, J. Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1884–96 (2004).
28. Avvakumov, N. *et al.* Conserved molecular interactions within the HBO1 acetyltransferase complexes regulate cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 689–703 (2012).

29. Ali, M. *et al.* Tandem PHD fingers of MORF/MOZ acetyltransferases display selectivity for acetylated histone H3 and are required for the association with chromatin. *J. Mol. Biol.* **424**, 328–38 (2012).
30. Huang, J. *et al.* Structural insight into the regulation of MOF in the male-specific lethal complex and the non-specific lethal complex. *Cell Res.* **22**, 1078–81 (2012).
31. Jacobs, S. A. *et al.* Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *Embo j* **20**, 5232–5241 (2001).
32. Bartova, E. *et al.* Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J Cell Sci* **118**, 5035–5046 (2005).
33. Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T. & Oehme, I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* **277**, 8–21 (2009).
34. De Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. & van Kuilenburg, A. B. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737–749 (2003).
35. Hayakawa, T. & Nakayama, J. Physiological roles of class I HDAC complex and histone demethylase. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 129383 (2011).
36. Clocchiatti, A., Florean, C. & Brancolini, C. Class IIa HDACs: from important roles in differentiation to possible implications in tumorigenesis. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 1833–46 (2011).
37. Haberland, M., Montgomery, R. L. & Olson, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 32–42 (2009).
38. Oehme, I. *et al.* Histone deacetylase 10 promotes autophagy-mediated cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E2592–601 (2013).
39. Villagra, A. *et al.* The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat. Immunol.* **10**, 92–100 (2009).
40. Rajendran, R., Garva, R., Krstic-Demonacos, M. & Demonacos, C. Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 368276 (2011).
41. Martinez-Redondo, P. & Vaquero, A. The diversity of histone versus nonhistone sirtuin substrates. *Genes Cancer* **4**, 148–163 (2013).

42. Webster, B. R., Lu, Z., Sack, M. N. & Scott, I. The role of sirtuins in modulating redox stressors. *Free Radic Biol Med* **52**, 281–290 (2012).
43. Canto, C. & Auwerx, J. Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)? *Pharmacol Rev* **64**, 166–187 (2012).
44. Vaquero, A., Sternglanz, R. & Reinberg, D. NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene* **26**, 5505–5520 (2007).
45. Bosch-Presegue, L. & Vaquero, A. Sirtuins in stress response: guardians of the genome. *Oncogene* (2013). doi:10.1038/onc.2013.344
46. Vaquero, A. & Reinberg, D. Calorie restriction and the exercise of chromatin. *Genes Dev* **23**, 1849–1869 (2009).
47. Binda, O. On your histone mark, SET, methylate! *Epigenetics* **8**, 457–63 (2013).
48. Fritsch, L. *et al.* A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 participate in a multimeric complex. *Mol Cell* **37**, 46–56 (2010).
49. Albert, M. & Helin, K. Histone methyltransferases in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 209–20 (2010).
50. Morishita, M. & di Luccio, E. Cancers and the NSD family of histone lysine methyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* **1816**, 158–63 (2011).
51. Ryu, H. *et al.* ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19176–81 (2006).
52. Mozzetta, C. *et al.* The histone H3 lysine 9 methyltransferases G9a and GLP regulate polycomb repressive complex 2-mediated gene silencing. *Mol. Cell* **53**, 277–89 (2014).
53. Jørgensen, S., Schotta, G. & Sørensen, C. S. Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Res.* **41**, 2797–806 (2013).
54. O'Carroll, D. *et al.* Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol Cell Biol* **20**, 9423–9433 (2000).

55. Peters, A. H. *et al.* Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**, 323–337 (2001).
56. Dambacher, S., Hahn, M. & Schotta, G. The compact view on heterochromatin. *Cell Cycle* **12**, 2925–2926 (2013).
57. Noh, H. J., Kim, K. A. & Kim, K. C. p53 Down-regulates SETDB1 gene expression during paclitaxel induced-cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **446**, 43–48 (2014).
58. Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T. & Shinkai, Y. Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J Biol Chem* **276**, 25309–25317 (2001).
59. Trojer, P. *et al.* Dynamic Histone H1 Isotype 4 Methylation and Demethylation by Histone Lysine Methyltransferase G9a/KMT1C and the Jumonji Domain-containing JMJD2/KDM4 Proteins. *J Biol Chem* **284**, 8395–8405 (2009).
60. Shinkai, Y. & Tachibana, M. H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. *Genes Dev* **25**, 781–788 (2011).
61. Barski, A. *et al.* High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823–37 (2007).
62. Binda, O. *et al.* Trimethylation of histone H3 lysine 4 impairs methylation of histone H3 lysine 9: regulation of lysine methyltransferases by physical interaction with their substrates. *Epigenetics* **5**, 767–775 (2010).
63. Patnaik, D. *et al.* Substrate specificity and kinetic mechanism of mammalian G9a histone H3 methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **279**, 53248–58 (2004).
64. Congdon, L. M., Sims, J. K., Tuzon, C. T. & Rice, J. C. The PR-Set7 binding domain of Riz1 is required for the H4K20me1-H3K9me1 trans-tail “histone code” and Riz1 tumor suppressor function. *Nucleic Acids Res.* **42**, 3580–9 (2014).
65. Serrano, L. *et al.* The tumor suppressor SirT2 regulates cell cycle progression and genome stability by modulating the mitotic deposition of H4K20 methylation. *Genes Dev* **27**, 639–653 (2013).

66. Schotta, G. *et al.* A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**, 1251–1262 (2004).
67. Shi, Y. *et al.* Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941–953 (2004).
68. Tsukada, Y. *et al.* Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**, 811–816 (2006).
69. Klose, R. J., Kallin, E. M. & Zhang, Y. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 715–27 (2006).
70. Hong, S. *et al.* Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18439–18444 (2007).
71. Van der Meulen, J., Speleman, F. & Van Vlierberghe, P. The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. *Epigenetics* **9**, 658–668 (2014).
72. Vaquero, A. *et al.* SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* **450**, 440–444 (2007).
73. Nishioka, K. *et al.* PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol. Cell* **9**, 1201–13 (2002).
74. Hansen, J. C. Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 361–92 (2002).
75. Khorasanizadeh, S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* **116**, 259–72 (2004).
76. Hübner, M. R., Eckersley-Maslin, M. A. & Spector, D. L. Chromatin organization and transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**, 89–95 (2013).
77. Eissenberg, J. C. & Shilatifard, A. Leaving a mark: the many footprints of the elongating RNA polymerase II. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 184–190 (2006).
78. Cann, K. L. & Dellaire, G. Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochem Cell Biol* **89**, 45–60 (2011).

79. Peters, A. H. *et al.* Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet* **30**, 77–80 (2002).
80. Chadwick, B. P. & Willard, H. F. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17450–5 (2004).
81. Peters, A. H. *et al.* Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* **12**, 1577–1589 (2003).
82. Plath, K. *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* **300**, 131–5 (2003).
83. Eymery, A., Callanan, M. & Vourc'h, C. The secret message of heterochromatin: new insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription. *Int J Dev Biol* **53**, 259–268 (2009).
84. Lehnertz, B. *et al.* Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* **13**, 1192–1200 (2003).
85. Rea, S. *et al.* Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593–599 (2000).
86. Aagaard, L. *et al.* Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *Embo j* **18**, 1923–1938 (1999).
87. Daniel, J. A., Pray-Grant, M. G. & Grant, P. A. Effector proteins for methylated histones: an expanding family. *Cell Cycle* **4**, 919–926 (2005).
88. Wang, T. *et al.* Crystal structure of the human SUV39H1 chromodomain and its recognition of histone H3K9me2/3. *PLoS One* **7**, e52977 (2012).
89. Krouwels, I. M. *et al.* A glue for heterochromatin maintenance: stable SUV39H1 binding to heterochromatin is reinforced by the SET domain. *J Cell Biol* **170**, 537–549 (2005).
90. Melcher, M. *et al.* Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol Cell Biol* **20**, 3728–3741 (2000).

91. Zheng, H., Chen, L., Pledger, W. J., Fang, J. & Chen, J. p53 promotes repair of heterochromatin DNA by regulating JMJD2b and SUV39H1 expression. *Oncogene* **33**, 734–744 (2014).
92. Li, Z. *et al.* Inhibition of SUV39H1 methyltransferase activity by DBC1. *J Biol Chem* **284**, 10361–10366 (2009).
93. Chu, L. *et al.* SUV39H1 orchestrates temporal dynamics of centromeric methylation essential for faithful chromosome segregation in mitosis. *J Mol Cell Biol* **4**, 331–340 (2012).
94. Spensberger, D. & Delwel, R. A novel interaction between the proto-oncogene Evi1 and histone methyltransferases, SUV39H1 and G9a. *FEBS Lett* **582**, 2761–2767 (2008).
95. Ait-Si-Ali, S. *et al.* A Suv39h-dependent mechanism for silencing S-phase genes in differentiating but not in cycling cells. *Embo j* **23**, 605–615 (2004).
96. Dang-Nguyen, T. Q. *et al.* Downregulation of histone methyltransferase genes SUV39H1 and SUV39H2 increases telomere length in embryonic stem-like cells and embryonic fibroblasts in pigs. *J Reprod Dev* **59**, 27–32 (2013).
97. Uhlirva, R. *et al.* SUV39h- and A-type lamin-dependent telomere nuclear rearrangement. *J Cell Biochem* **109**, 915–926 (2010).
98. He, Y., Korboukh, I., Jin, J. & Huang, J. Targeting protein lysine methylation and demethylation in cancers. *Acta Biochim Biophys Sin* **44**, 70–79 (2012).
99. Zhao, T., Ma, X. D. & Huang, Y. Q. [Experimental study of SUV39H1 gene specific siRNA in human leukemia cell line]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* **34**, 49–54 (2013).
100. Lomber, G., Wallrath, L. & Urrutia, R. The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol* **7**, 228 (2006).
101. Hayakawa, T., Haraguchi, T., Masumoto, H. & Hiraoka, Y. Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase. *J Cell Sci* **116**, 3327–3338 (2003).
102. Aucott, R. *et al.* HP1-beta is required for development of the cerebral neocortex and neuromuscular junctions. *J Cell Biol* **183**, 597–606 (2008).

103. Dialynas, G. K. *et al.* Plasticity of HP1 proteins in mammalian cells. *J Cell Sci* **120**, 3415–3424 (2007).
104. Mishima, Y. *et al.* Hinge and chromoshadow of HP1alpha participate in recognition of K9 methylated histone H3 in nucleosomes. *J Mol Biol* **425**, 54–70 (2013).
105. Hiragami-Hamada, K. *et al.* N-terminal phosphorylation of HP1{alpha} promotes its chromatin binding. *Mol Cell Biol* **31**, 1186–1200 (2011).
106. Munari, F. *et al.* Methylation of lysine 9 in histone H3 directs alternative modes of highly dynamic interaction of heterochromatin protein hHP1beta with the nucleosome. *J Biol Chem* **287**, 33756–33765 (2012).
107. Maison, C. *et al.* SUMOylation promotes de novo targeting of HP1alpha to pericentric heterochromatin. *Nat Genet* **43**, 220–227 (2011).
108. Maison, C. *et al.* The SUMO protease SENP7 is a critical component to ensure HP1 enrichment at pericentric heterochromatin. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 458–460 (2012).
109. Kwon, S. H. & Workman, J. L. The changing faces of HP1: From heterochromatin formation and gene silencing to euchromatic gene expression: HP1 acts as a positive regulator of transcription. *Bioessays* **33**, 280–289 (2011).
110. Lomberk, G., Bensi, D., Fernandez-Zapico, M. E. & Urrutia, R. Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nat Cell Biol* **8**, 407–415 (2006).
111. Kwon, S. H. & Workman, J. L. HP1c casts light on dark matter. *Cell Cycle* **10**, 625–630 (2011).
112. Munari, F., Gajda, M. J., Hiragami-Hamada, K., Fischle, W. & Zweckstetter, M. Characterization of the effects of phosphorylation by CK2 on the structure and binding properties of human HP1beta. *FEBS Lett* **588**, 1094–1099 (2014).
113. Nielsen, A. L. *et al.* Selective interaction between the chromatin-remodeling factor BRG1 and the heterochromatin-associated protein HP1alpha. *Embo j* **21**, 5797–5806 (2002).
114. Siddiqui, H., Fox, S. R., Gunawardena, R. W. & Knudsen, E. S. Loss of RB compromises specific heterochromatin modifications and modulates HP1alpha dynamics. *J Cell Physiol* **211**, 131–137 (2007).

115. Trojer, P. *et al.* L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell* **129**, 915–28 (2007).
116. Mosch, K., Franz, H., Soeroes, S., Singh, P. B. & Fischle, W. HP1 recruits activity-dependent neuroprotective protein to H3K9me3 marked pericentromeric heterochromatin for silencing of major satellite repeats. *PLoS One* **6**, e15894 (2011).
117. Schmiedeberg, L., Weisshart, K., Diekmann, S., Meyer Zu Hoerste, G. & Hemmerich, P. High- and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin of mammalian cells. *Mol Biol Cell* **15**, 2819–2833 (2004).
118. Fischle, W. *et al.* Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**, 1116–1122 (2005).
119. Grzenda, A. *et al.* Functional impact of Aurora A-mediated phosphorylation of HP1gamma at serine 83 during cell cycle progression. *Epigenetics Chromatin* **6**, 21 (2013).
120. Dialynas, G. K., Vitalini, M. W. & Wallrath, L. L. Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression. *Mutat Res* **647**, 13–20 (2008).
121. Hahn, M. *et al.* Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin. *Genes Dev* **27**, 859–872 (2013).
122. Canudas, S. *et al.* A role for heterochromatin protein 1gamma at human telomeres. *Genes Dev* **25**, 1807–1819 (2011).
123. Font-Burgada, J., Rossell, D., Auer, H. & Azorin, F. Drosophila HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression. *Genes Dev* **22**, 3007–3023 (2008).
124. Vakoc, C. R., Mandat, S. A., Olenchock, B. A. & Blobel, G. A. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol. Cell* **19**, 381–91 (2005).
125. Vermaak, D. & Malik, H. S. Multiple roles for heterochromatin protein 1 genes in Drosophila. *Annu Rev Genet* **43**, 467–492 (2009).
126. Baldeyron, C., Soria, G., Roche, D., Cook, A. J. & Almouzni, G. HP1alpha recruitment to DNA damage by p150CAF-1 promotes homologous recombination repair. *J Cell Biol* **193**, 81–95 (2011).

127. Soria, G. & Almouzni, G. Differential contribution of HP1 proteins to DNA end resection and homology-directed repair. *Cell Cycle* **12**, 422–429 (2013).
128. Moss, T. J. & Wallrath, L. L. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. *Mutat Res* **618**, 163–174 (2007).
129. Itsumi, M. *et al.* Human heterochromatin protein 1 isoforms regulate androgen receptor signaling in prostate cancer. *J Mol Endocrinol* **50**, 401–409 (2013).
130. Brown, J. P. *et al.* HP1gamma function is required for male germ cell survival and spermatogenesis. *Epigenetics Chromatin* **3**, 9 (2010).
131. Singh, P. B. HP1 proteins--what is the essential interaction? *Genetika* **46**, 1424–1429 (2010).
132. Grewal, S. I. & Jia, S. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* **8**, 35–46 (2007).
133. Bulut-Karslioglu, A. *et al.* A transcription factor-based mechanism for mouse heterochromatin formation. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 1023–1030 (2012).
134. Cam, H. P., Chen, E. S. & Grewal, S. I. S. Transcriptional scaffolds for heterochromatin assembly. *Cell* **136**, 610–4 (2009).
135. Loyola, A. *et al.* The HP1alpha-CAF1-SetDB1-containing complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. *EMBO Rep* **10**, 769–775 (2009).
136. Guarente, L. & Picard, F. Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell* **120**, 473–482 (2005).
137. Saunders, L. R. & Verdin, E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene* **26**, 5489–5504 (2007).
138. Papamichos-Chronakis, M. & Peterson, C. L. Chromatin and the genome integrity network. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 62–75 (2013).
139. Wang, C. *et al.* Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **8**, 1025–1031 (2006).
140. Sasaki, T. *et al.* Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoS One* **3**, e4020 (2008).

141. Ford, J., Ahmed, S., Allison, S., Jiang, M. & Milner, J. JNK2-dependent regulation of SIRT1 protein stability. *Cell Cycle* **7**, 3091–3097 (2008).
142. Zschoernig, B. & Mahlknecht, U. Carboxy-terminal phosphorylation of SIRT1 by protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun* **381**, 372–377 (2009).
143. Lau, A. W., Liu, P., Inuzuka, H. & Gao, D. SIRT1 phosphorylation by AMP-activated protein kinase regulates p53 acetylation. *Am. J. Cancer Res.* **4**, 245–55 (2014).
144. Radak, Z. *et al.* Redox-regulating sirtuins in aging, caloric restriction, and exercise. *Free Radic Biol Med* **58**, 87–97 (2013).
145. Zhang, T. & Kraus, W. L. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 1666–1675 (2010).
146. Vaquero, A. *et al.* Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell* **16**, 93–105 (2004).
147. Jeong, J. *et al.* SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70. *Exp Mol Med* **39**, 8–13 (2007).
148. Chong, Z. Z., Shang, Y. C., Wang, S. & Maiese, K. SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress. *Expert Opin Ther Targets* **16**, 167–178 (2012).
149. Jiang, M. *et al.* Neuroprotective role of Sirt1 in mammalian models of Huntington's disease through activation of multiple Sirt1 targets. *Nat Med* **18**, 153–158 (2012).
150. Sundaresan, N. R., Pillai, V. B. & Gupta, M. P. Emerging roles of SIRT1 deacetylase in regulating cardiomyocyte survival and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **51**, 614–618 (2011).
151. Wang, R. H. *et al.* Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell* **14**, 312–323 (2008).
152. Kim, H. S. *et al.* SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. *Cancer Cell* **20**, 487–499 (2011).
153. Mostoslavsky, R. *et al.* Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* **124**, 315–329 (2006).

154. Ford, E. *et al.* Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* **20**, 1075–1080 (2006).
155. Paredes, S., Villanova, L. & Chua, K. F. Molecular pathways: emerging roles of mammalian Sirtuin SIRT7 in cancer. *Clin. Cancer Res.* **20**, 1741–6 (2014).
156. Kim, H. S. *et al.* SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell* **17**, 41–52 (2010).
157. Osborne, B., Cooney, G. J. & Turner, N. Are sirtuin deacylase enzymes important modulators of mitochondrial energy metabolism? *Biochim Biophys Acta* **1840**, 1295–1302 (2014).
158. Jeong, S. M., Lee, A., Lee, J. & Haigis, M. C. SIRT4 protein suppresses tumor formation in genetic models of Myc-induced B cell lymphoma. *J Biol Chem* **289**, 4135–4144 (2014).
159. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. & Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795–800 (2000).
160. Luo, J. *et al.* Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **107**, 137–148 (2001).
161. Fulco, M. *et al.* Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell* **12**, 51–62 (2003).
162. Takata, T. & Ishikawa, F. Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 250–257 (2003).
163. Moss, T., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T. & Stefanovsky, V. A housekeeper with power of attorney: the rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 29–49 (2007).
164. Bosch-Presegue, L. & Vaquero, A. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer* **2**, 648–662 (2011).
165. Grummt, I. & Pikaard, C. S. Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 641–9 (2003).
166. Heydari, A. R., Unnikrishnan, A., Lucente, L. V. & Richardson, A. Caloric restriction and genomic stability. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7485–96 (2007).

167. Dignam, J. D., Martin, P. L., Shastry, B. S. & Roeder, R. G. Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol.* **101**, 582–98 (1983).
168. Jones, D. O., Cowell, I. G. & Singh, P. B. Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *Bioessays* **22**, 124–137 (2000).
169. White, J. & Stelzer, E. Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol.* **9**, 61–5 (1999).
170. Kwon, H. S. & Ott, M. The ups and downs of SIRT1. *Trends Biochem Sci* **33**, 517–525 (2008).
171. Cohen, H. Y. *et al.* Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science (80-.)*. **305**, 390–392 (2004).
172. Chen, L. *et al.* MDM2 recruitment of lysine methyltransferases regulates p53 transcriptional output. *Embo j* **29**, 2538–2552 (2010).
173. Horn, P. J., Bastie, J.-N. & Peterson, C. L. A Rik1-associated, cullin-dependent E3 ubiquitin ligase is essential for heterochromatin formation. *Genes Dev.* **19**, 1705–14 (2005).
174. Jia, S., Kobayashi, R. & Grewal, S. I. Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Clr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin. *Nat Cell Biol* **7**, 1007–1013 (2005).
175. Zofall, M. & Grewal, S. I. S. HULC, a histone H2B ubiquitinating complex, modulates heterochromatin independent of histone methylation in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **282**, 14065–72 (2007).
176. Lyakhovich, A. & Shekhar, M. P. V. Supramolecular complex formation between Rad6 and proteins of the p53 pathway during DNA damage-induced response. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2463–75 (2003).
177. Yamamoto, K. & Sonoda, M. Self-interaction of heterochromatin protein 1 is required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 287–292 (2003).
178. Oberdoerffer, P. *et al.* SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* **135**, 907–918 (2008).
179. Harris, S. L. & Levine, A. J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**, 2899–908 (2005).

180. Vousden, K. H. & Lane, D. P. p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 275–83 (2007).
181. Pant, V. & Lozano, G. Dissecting the p53-Mdm2 feedback loop in vivo: Uncoupling the role in p53 stability and activity. *Oncotarget* **5**, 1149–56 (2014).
182. Festenstein, R. *et al.* Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells. *Science* **299**, 719–21 (2003).
183. Cheutin, T. *et al.* Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* (80-.). **299**, 721–725 (2003).
184. Liu, B. *et al.* Depleting the methyltransferase Suv39h1 improves DNA repair and extends lifespan in a progeria mouse model. *Nat Commun* **4**, 1868 (2013).
185. Ziv, Y. *et al.* Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat. Cell Biol.* **8**, 870–6 (2006).
186. Harrer, M., Lührs, H., Bustin, M., Scheer, U. & Hock, R. Dynamic interaction of HMGA1a proteins with chromatin. *J. Cell Sci.* **117**, 3459–71 (2004).
187. Phair, R. D. *et al.* Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6393–402 (2004).
188. Czvitkovich, S. *et al.* Over-expression of the SUV39H1 histone methyltransferase induces altered proliferation and differentiation in transgenic mice. *Mech Dev* **107**, 141–153 (2001).
189. Ayoub, N., Jeyasekharan, A. D., Bernal, J. A. & Venkitaraman, A. R. HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* **453**, 682–686 (2008).
190. De Koning, L. *et al.* Heterochromatin protein 1alpha: a hallmark of cell proliferation relevant to clinical oncology. *EMBO Mol Med* **1**, 178–191 (2009).
191. Lieberthal, J. G., Kaminsky, M., Parkhurst, C. N. & Tanese, N. The role of YY1 in reduced HP1alpha gene expression in invasive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* **11**, R42 (2009).
192. Slezak, J., Truong, M., Huang, W. & Jarrard, D. HP1γ expression is elevated in prostate cancer and is superior to Gleason score as a

predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy. *BMC Cancer* **13**, 148 (2013).

193. Murayama, A. *et al.* Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell* **133**, 627–639 (2008).
194. Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C. & Almouzni, G. Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J Cell Biol* **166**, 493–505 (2004).
195. Martens, J. H. A. *et al.* The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J.* **24**, 800–12 (2005).
196. Ong, C.-T. & Corces, V. G. CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 234–46 (2014).
197. Cuddapah, S. *et al.* Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res.* **19**, 24–32 (2009).
198. Holwerda, S. J. B. & de Laat, W. CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120369 (2013).
199. Shen, W.-Y. *et al.* CTCF-mediated reduction of vigilin binding affects the binding of HP1 α to the satellite 2 locus. *FEBS Lett.* **588**, 1549–55 (2014).
200. Wang, F., Nguyen, M., Qin, F. X. & Tong, Q. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell* **6**, 505–514 (2007).
201. Kanfi, Y. *et al.* Regulation of SIRT6 protein levels by nutrient availability. *FEBS Lett* **582**, 543–548 (2008).
202. Hursting, S. D., Lavigne, J. A., Berrigan, D., Perkins, S. N. & Barrett, J. C. Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. *Annu. Rev. Med.* **54**, 131–52 (2003).
203. Honda, R., Tanaka, H. & Yasuda, H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* **420**, 25–7 (1997).
204. Allis, C. D., Jenuwein, T & Reinberg, D. Epigenetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (2007).