

Caracterització funcional d'HP1c, la isoforma eucromàtica de les proteïnes HP1 de *Drosophila*

Joan Font Burgada

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.tesisenxarxa.net) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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.tesisenred.net) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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.tesisenxarxa.net) service 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.

Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

TESI DOCTORAL

Caracterització funcional d'HP1c, la isoforma eucromàtica
de les proteïnes HP1 de *Drosophila*

Joan Font Burgada
Barcelona, Setembre 2009
Divisió de Ciències Experimentals i Matemàtiques

Programa de Doctorat del Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Bienni 2002-04

**Caracterització funcional d'HP1c, la isoforma
eucromàtica de les proteïnes HP1 de *Drosophila***

Memòria presentada per
Joan Font Burgada
Per optar al grau de
Doctor

Tesi doctoral realitzada sota la direcció del Dr. Ferran Azorín
Marín al Departament de Biologia Molecular i Cel·lular de
l'Institut de Biologia Molecular de Barcelona (CSIC) i a l'Institut
de Recerca Biomèdica, al Parc Científic de Barcelona

El Director

El Tutor

L'interessat

Dr.Ferran Azorín

Dra.Gemma Marfany

Joan Font

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. La cromatina eucariota	3
1.1.1. La unitat estructural de la cromatina: el nucleosoma	3
1.1.2. Estructura del nucleosoma	4
1.1.2.3. Estructures d'ordre superior de la cromatina	6
1.2. Regulació de l'estructura de la cromatina	7
1.2.1. Variants d'histona	8
1.2.1.2. Variants d'H2A	9
1.2.1.3. Variants de la histona H3	9
1.2.1.4. Variants de les histones H2B i H4	10
1.2.2. Remodelació de l'estructura de la cromatina	10
1.2.3. Modificacions covalents de les histones	12
1.2.3.1. Acetilació	12
1.2.3.2. Fosforilació	15
1.2.3.3. Ubiquitinació i sumoilació	16
1.2.3.4. Metilació	17
1.2.3.5. Desmetilació	20
1.3. La hipòtesi del codi de les histones	25
1.3.1. Acetilació i Bromodomini	27
1.3.2. Fosforilació i dominis 14-3-3 i BRCT	28

1.3.3. Metilació de lisines i dominis de la superfamília Royal i dominis PHD	30
1.3.3.1. Superfamília ROYAL	31
1.3.3.2. Dominis PHD	32
1.4. Les proteïnes HP1	35
1.4.1. Característiques estructurals	36
1.4.1.1. El cromodomini	36
1.4.1.2. Cromodomini-shadow	38
1.4.1.3. Regió Hinge	40
1.4.2. Localització i funció	40
1.4.2.1. Repressió de gens a l'eucromatina	41
1.4.2.2. Influència sobre l'expressió dels gens heterocromàtics	41
1.4.2.3. Regulació de l'expressió gènica a l'eucromatina	41
1.4.2.4. HP1s i el dany a l'ADN	42
1.4.2.5. HP1 i funció telomèrica	42
1.4.3. Modes d'unió a la cromatina	43
1.5. Les proteïnes HP1 de <i>Drosophila melanogaster</i>	46
2. OBJECTIUS	49
3. RESULTATS	53
3.1. CAPÍTOL 1	55
3.1.1. PUBLICACIÓ	57

3.1.2. RESULTATS I INFORMACIÓ SUPLEMENTARIS	79
3.1.3. MATERIALS I MÈTODES SUPLEMENTARIS	97
3.1.4. MÈTODES ESTADÍSTICS SUPLEMENTARIS	105
3.1.5. Annex al Capítol 1. L'HP1b i la seva ambivalència en localització i funció.	117
3.2. CAPÍTOL 2. Anàlisi fenotípic d'HP1c/WOC/ROW.	123
3.2.1. MATERIALS i MÈTODES.	131
3.2.2. RESULTATS	137
4. DISCUSSIÓ	143
4.1. La unió d'HP1c a la cromatina	145
4.1.1. La relació entre HP1c i la metilació d'H3K9	145
4.1.2. WOC/ROW i la localització eucromàtica d'HP1c.	148
4.2. Sobre la funció del complex HP1c/WOC/ROW	153
4.2.1. Reclutament ectòpic	153
4.2.2. Suggeriments funcionals a partir dels cromosomes politènics.	154
4.2.3. HP1c/WOC/ROW i l'expressió gènica	158
4.2.4. WOC/ROW/HP1c i la funció telomèrica.	162
4.2.5. WOC i la via de Notch.	163
4.3. L'HP1b	164
4.4. Reptes que emergeixen	166
5. CONCLUSIONS	171

1. INTRODUCCIÓ

1.1. La cromatina eucariota

A finals del segle XIX, Albrecht Kossel va descobrir una família de proteïnes nuclears molt abundants que va anomenar histones. Aquestes es caracteritzen per tenir una mida petita (11-15 KDa) i ser molt riques en aminoàcids arginina i lisina que al voltant de pH neutre tenen càrrega positiva. Els principals representants d'aquesta família són les histones H1, H2A, H2B, H3 i H4. Amb la suma d'abundants investigacions al llarg del segle XX, aquestes proteïnes van esdevenir una peça clau per la solució al problema de l'empaquetament dels genomes, dificultat que afronten tots els éssers vius. Per facilitar una visualització del problema de l'empaquetament en una escala mètrica que resulti més natural, podem engrandir imaginàriament un nucli eucariota fins a un diàmetre de 10 cm. La llargària de l'ADN que s'hi hauria d'encabir seria com un fil molt prim d'uns 0.02 mm (un cabell humà), que tindria una longitud d'uns 20 Km. D'aquesta manera es fàcil notar que ha d'existir un mecanisme d'empaquetament que permeti alhora el correcte funcionament de totes les activitats que utilitzen el genoma com a substrat.

1.1.1. La unitat estructural de la cromatina: el nucleosoma

Al llarg de molts anys d'investigacions al voltant de les histones, es van acumular moltes dades bioquímiques que mostraven la relació íntima entre aquestes i l'ADN. Això va fer que s'encunyés la paraula **cromatina** que es defineix com el conjunt de l'ADN, les histones i altres proteïnes que co-purifiquen amb l'ADN.

Finalment al 1974, Roger Kornberg va proposar un model definitiu de l'estructura de la cromatina :

- 1- La cromatina consisteix en una unitat estructural repetitiva formada per uns 150 pb d'ADN i dues de cada una de les quatre histones (H2A, H2B, H3 i H4), formant un octàmer proteic. Pierre Chambon va confirmar aquest model i va anomenar a aquesta partícula **nucleosoma** (Fig.i1a).
- 2- Una fibra de cromatina consisteix en varis nucleosomes separats per un ADN nu d'unió entre ells, formant una cadena flexible que correspon a l'estructura "*beads on a string*" de 10 nm de diàmetre.

1.1.2. Estructura del nucleosoma

Fa aproximadament una dècada que es té un coneixement al detall de l'estructura del nucleosoma, gràcies a la publicació de l'estructura cristal·logràfica a una resolució gairebé atòmica (2,8 Å) (Luger et al, 1997). Totes les histones que formen el cor del nucleosoma presenten una estructura globular similar, que consisteix en tres hèlixs alfa i dos *loops* que les uneixen en forma: $\alpha 1$ -L1- $\alpha 2$ -L2- $\alpha 3$. Aquest tipus de plegament és anomenat *histone fold* i es pot trobar amb certa similitud en altres proteïnes que no pertanyen a la família de les histones.

L'acoblament de l'octàmer d'histones es fonamenta en una sèrie d'interaccions proteïna-proteïna entre les diferents histones (Fig.i1b). La interacció més fonamental és la que permet la formació de dos tipus d'heterodímers d'histones, un format per les histones H3 i H4 (H3-H4) i l'altre format per les histones H2A i H2B (H2A-H2B) (Fig.i1b). La base bioquímica de l'estructuració d'aquests dímers és la interacció de les hèlix $\alpha 2$ de les dues histones implicades. Aquestes hèlixs adopten una configuració en forma de creu antiparal·lela (fig1). El següent pas en la construcció de l'octàmer, és la formació d'un tetràmer d'histones H3 i H4 a partir de dos dímers H3-H4. Aquest tetràmer es sustenta en la formació d'una estructura anomenada *4 helix bundle*, que consisteix en l'associació de 4 hèlix α , entre les dues histones H3. Les hèlix α implicades són les dues hèlix $\alpha 3$, i la part més carboxiterminal de les dues hèlix $\alpha 2$. Per últim, s'acoblen els dos dímers H2A-H2B al tetràmer mitjançant la formació de sengles *4 helix bundle*. En aquest cas les hèlixs implicades són les mateixes que en la construcció del tetràmer, però les histones implicades són les histones H4 del tetràmer i les histones H2B dels dímers.

Al voltant de l'octàmer és on 146 pb d'ADN en forma de superhèlix donen una volta i tres quarts en sentit levogir. Els contactes que s'estableixen entre l'ADN i l'octàmer es produeixen cada 10 pb on el solc menor queda col·locat en la cara interior. Aquests contactes es basen en diferents tipus d'enllaços (ponts d'hidrogen, electrostàtics, salins) entre residus de les histones i l'esquelet de fosfats de la doble hèlix. La natura d'aquest mode d'interaccionar és el que explica la unió no específica de seqüència que tenen els nucleosomes i d'aquesta manera es puguin constituir al llarg de tot el genoma. Cal esmentar però que no totes les seqüències es corbaran amb la mateixa facilitat per tal d'establir els contactes amb l'octàmer i escometre el gir necessari. Aquest fet influirà en el posicionament final dels nucleosomes establint-se allà on sigui més fàcil i resulti més estable la seva formació.

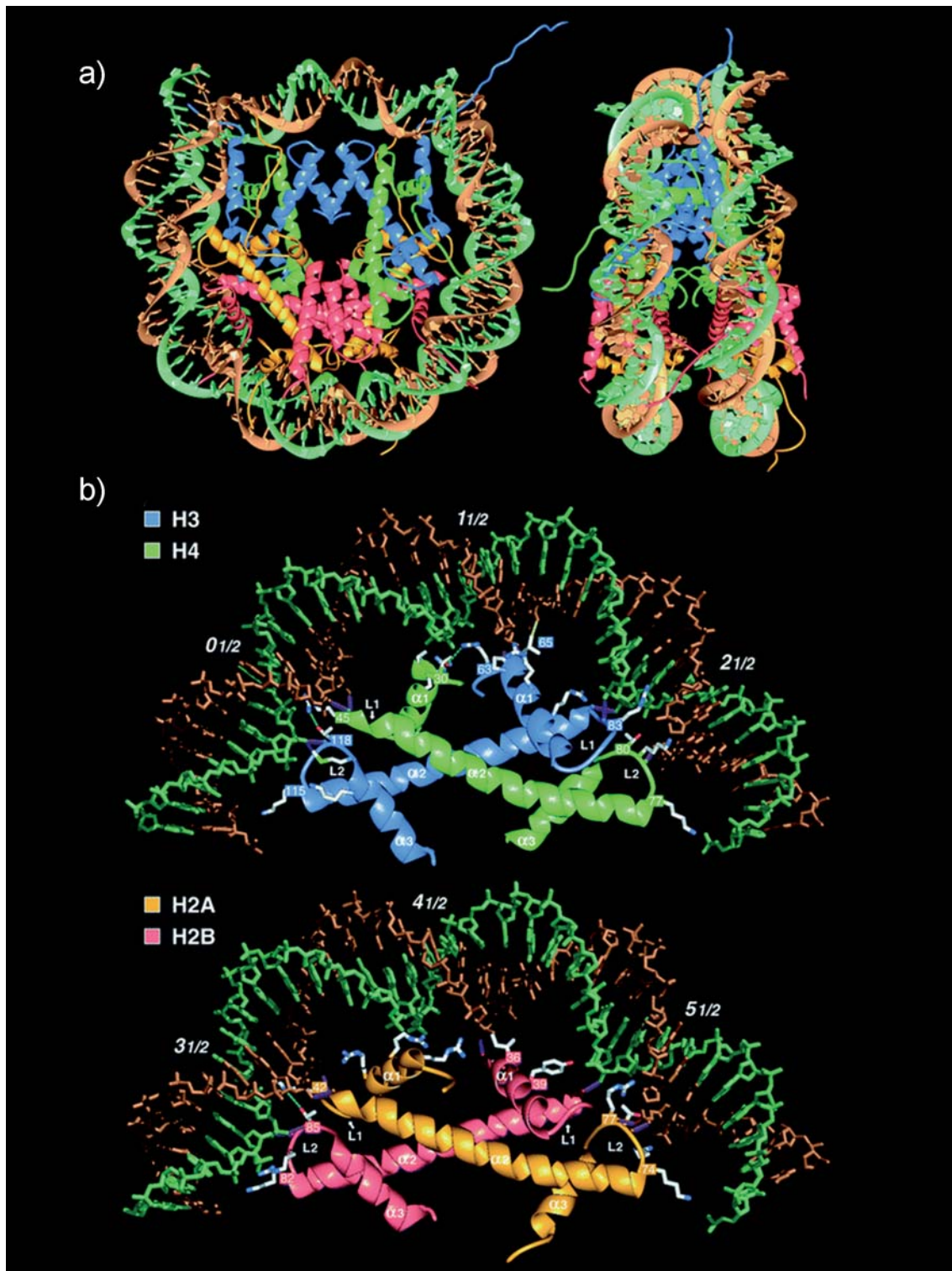


Figura i1. L'estructura del nucleosoma

a) Visió general de l'estructura cristal·logràfica del nucleosoma. S'aprecia com la doble hèlix embolcalla l'octàmer d'histones.

b) Detall de l'aparellament dels *histone folds* d'H3-H4 (part superior) i d'H2A-H2B (part inferior). Es pot observar l'estructura $\alpha 1$ -L1- $\alpha 2$ -L2- $\alpha 3$ de cada una de les histones. Es mostra com les parelles de *loops* L1/L2 estableixen les principals interaccions. Les cadenes laterals dels residus que produeixen ponts d'hidrogen o interaccions hidrofòbiques amb l'ADN i les arginines inserides en el solc petit són ressaltades. Extret de (Luger et al, 1997).

Introducció

En l'estructura cristal·lina no es poden observar les zones més amino-terminals de les histones (un 25% de la longitud de les histones), ja que no estan estructurades i són molt flexibles. Aquestes regions que anomenarem cues o extrems N-ter de les histones sobresurten del nucleosoma sent la part més exposada i on es produeixen la majoria de les modificacions postraduccionals.

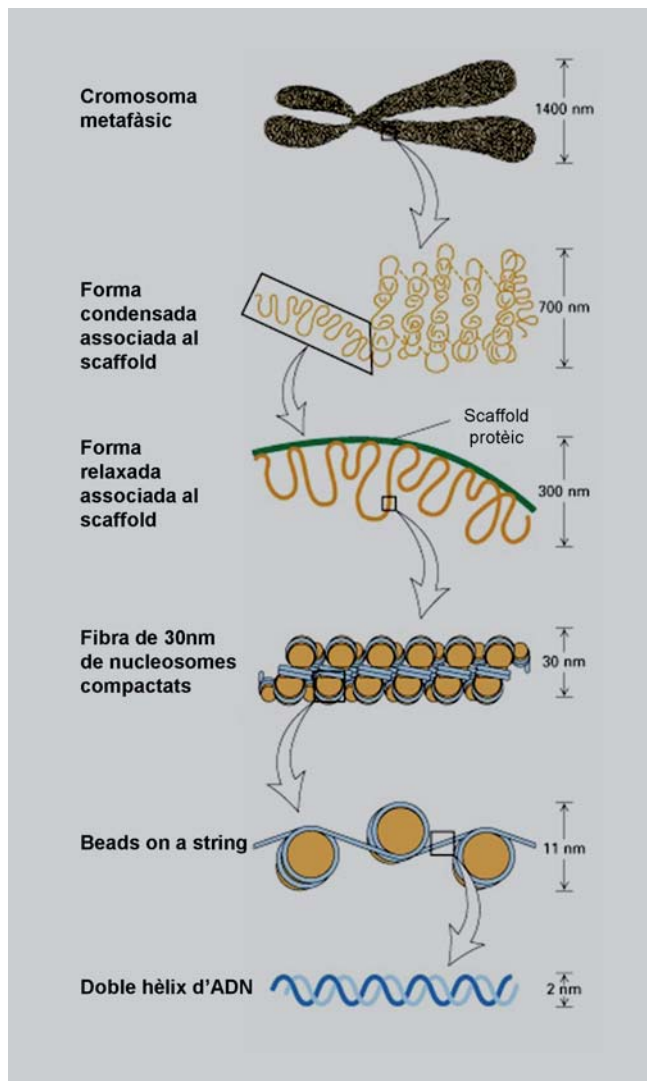


Figura i2. Compactació de la cromatina

Il·lustració esquemàtica dels diferents ordres d'empaquetament de la cromatina, fins a assolir el nivell màxim de compactació en els cromosomes metafàsics.

1.1.3. Estructures d'ordre superior de la cromatina

L'organització del genoma en nucleosomes implica un factor de compactació lineal de unes 5 vegades. Això resulta del tot insuficient per explicar la compactació que s'assoleix en els cromosomes metafàsics que és d'un 200.000 vegades. El model de compactació actual es

basa en que la fibra de cromatina més bàsica la de *beads on string* de 10 nm es compacta en una estructura d'ordre superior de 30 nm en un factor de 50 vegades. Hi ha diferents models que intenten reproduir l'estructura d'aquesta fibra, però encara no hi ha suficients dades experimentals que en sustentin cap. El que sí que s'ha demostrat és la necessitat de la histona H1 per realitzar la transició de la fibra de 10 nm a la de 30 nm (Bednar et al, 1998). La estequiometria de la histona H1 és d'una per nucleosoma i algunes dades experimentals suggereixen que s'associa amb els fragments d'ADN que entren i surten del nucleosoma (Bednar et al, 1998; Nightingale et al, 1996; Pruss et al, 1996). A partir d'aquesta fibra, els successius nivells de compactació són molt poc coneguts. La visió clàssica assumeix que la fibra de 30 nm forma uns rínxols ancorats a un *scaffold* proteic, assolint un diàmetre de 300nm, sent aquesta el substrat per la condensació dels cromosomes metafàsics (Fig.i2).

1.2. Regulació de l'estructura de la cromatina

A nivell general la cromatina es pot dividir en dues estructures anomenades eucromatina i heterocromatina. L'eucromatina és una estructura relaxada que ofereix accessibilitat a les maquinàries que operen sobre l'ADN. Per contra l'heterocromatina és una estructura més compactada que ofereix una accessibilitat més limitada. L'heterocromatina es pot subdividir entre facultativa, aquella que és reversible i constitutiva la que és invariable al llarg del temps.

Els nucleosomes presenten com a mínim tres propietats dinàmiques que poden modificar les propietats estructurals de la cromatina transitant entre diferents estats funcionals:

- 1- Variabilitat en la composició de l'octàmer per la incorporació de diferents variants d'histona.
- 2- Remodelació de la posició dels nucleosomes al llarg de la cromatina.
- 3- Modificacions covalents de les histones.

Aquests tres processos dinàmics actuen en concert per tal d'establir o alterar regionalment les propietats de la cromatina correlacionat-se directament en diferents funcions genòmiques. La importància i l'ordre dels processos varia molt depenent de l'element genòmic examinat.

Introducció

1.2.1. Variants d'histona

Com s'ha vist, el nucleosoma està compost per un octàmer d'histones anomenades canòniques (H2A, H2B, H3, H4), però alternativament es pot substituir alguna de les histones canòniques per una variant d'histona que confereix propietats funcionals diferents (Fig.i3). Les variants estan codificades en gens de còpia única en contraposició a les canòniques on hi han múltiples còpies del mateix gen al genoma. També hi ha diferències en el moment de l'expressió. Així mentre que les canòniques s'expressen només a la fase S del cicle cel·lular (expressió dependent de replicació), les variants es poden expressar en diferents fases del cicle (expressió independent de replicació) (Grove & Zweidler, 1984).

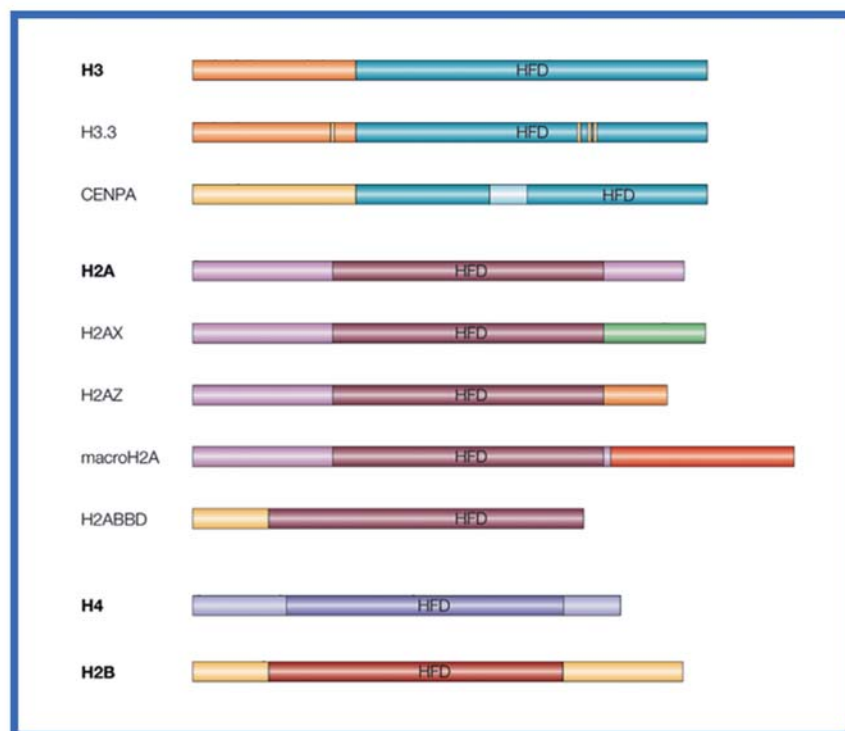


Figura i3. Les histones canòniques i les seves variants

Les 4 histones canòniques (en negreta) i les seves variants. Totes presenten el *Histone Fold Domain* (HFD). En la histona H3.3, hi ha quatre residus que difereixen respecte de la histona H3, els quals estan remarcats en color groc. Tres d'aquests estan en el HFD i el restant és la Ser31 que s'ha especulat que es podria fosforilar. En la variant centromèrica de la histona H3 (CENPA), la regió del HFD necessària per la seva localització específica està marcada en diferent color. Les variants de la histona H2A difereixen significativament en la regió carboxi-terminal. La histona H2ABBD és la més petita de les variants de la histona H2A, contenint un extrem amino-terminal diferent i el extrem carboxi-terminal truncat. Modificat de (Sarma & Reinberg, 2005).

Segons el grau de dissemblança a nivell d'estructura primària podem dividir les variants d'histona entre homomòrfiques o heteromòrfiques (Ausio et al, 2001; West & Bonner, 1980). Les variants homomòrfiques són aquelles que presenten molt poques variacions: H2A.1, H2A.2, H3.1, H3.2, H3.3. Per altra banda les variants heteromòrfiques són aquelles que presenten fragments importants dissímils: H2A.X, H2A.Z, macroH2A, H2A.Bbd i CENP-A.

1.2.1.1. Variants d'H2A

La histona H2A és la histona que presenta més variants (Fig.i3). Algunes d'aquestes s'han conservat al llarg de l'evolució i d'altres només són presents en vertebrats o en mamífers. Les diferències principalment es localitzen en la part carboxi-terminal tant a nivell de seqüència com a nivell de mida (Ausio et al, 2001).

La histona H2A.Z s'ha demostrat essencial per la viabilitat cel·lular (Clarkson et al, 1999), tot i que encara no s'ha pogut escatir quina és la seva funció ja que hi ha dades contradictòries al respecte (Dryhurst et al, 2004). Pel que fa a la histona H2A.X s'ha establert amb bastant d'exactitud la seva participació en el procés de reparació de l'ADN (Li et al, 2005), tot i que se l'ha relacionat també en processos com l'apoptosis (Rogakou et al, 2000), recombinació (Chen et al, 2000) i replicació (Ward & Chen, 2001). La macroH2A es troba localitzada al cromosoma X inactiu de les femelles dels mamífers (Costanzi & Pehrson, 1998). És una histona d'aparició bastant recent en l'evolució (Li et al, 2005). No només es troba en el cromosoma X inactiu sinó que també se la relaciona amb la formació de l'heterocromatina pericentromèrica i l'heterocromatina facultativa (Abbott et al, 2005; Turner et al, 2001). Finalment la histona H2A^{bbd} (*Bar body deficient*), com el seu nom indica està exclosa del cromosoma X inactiu. És una histona que només es troba a vertebrats (Henikoff et al, 2004) i presenta només un 48% d'identitat amb la histona H2A (Chadwick & Willard, 2001). S'ha vist que la presència d'aquesta histona fa l'estructura del nucleosoma menys estable (Bao et al, 2004; Gautier et al, 2004). Aquest fet i la seva localització a llocs transcripcionalment actius, han situat aquesta histona com a facilitadora de l'accessibilitat de complexos transcripcionals (Angelov et al, 2004).

1.2.1.2. Variants de la histona H3

Les dues variants principals són: La histona H3.3 i la histona CENP-A. La histona H3.3 presenta molt poques diferències amb la histona H3, només en 4 aminoàcids (Fig.i3). Tot i així té un patró de localització diferenciat ja que es troba enriquida en regions actives transcripcionalment, substituint la histona H3 canònica (Mito et al, 2005). Una altra diferència important és que s'expressa al llarg de tot el cicle cel·lular i la seva deposició no és dependent

Introducció

de la maquinària d'assemblatge pròpia de la replicació sinó que depèn d'un complex d'assemblatge independent anomenat HIRA (Tagami et al, 2004).

La variant CENP-A juga un paper crucial en la viabilitat cel·lular ja que és l'identificador de la cromatina centromèrica al substituir la histona H3 canònica específicament al centròmer (Palmer et al, 1987). Des d'un punt de vista estructural aquesta variant presenta una divergència considerable en el *histone fold*, que en el cas de la variant humana és d'un 62% d'identitat respecte del de la histona H3 canònica humana (Sullivan et al, 1994). Per altra banda presenta un extrem amino-terminal molt divergent que també és molt diferent entre espècies tant a nivell de seqüència com de longitud (Tyler-Smith & Floridia, 2000).

1.2.1.3. Variants de les histones H2B i H4

Comparat amb les histones H3 i H2A, les altres dues histones canòniques presenten molt poca variació aminoacídica. Això ha estat explicat històricament pel fet que aquestes dues histones tenen un paper destacat en l'establiment de les interaccions necessàries per l'estabilitat del nucleosoma (Pusarla & Bhargava, 2005). La histona H4 en particular és una de les proteïnes que es coneixen que es troben més conservades.

1.2.2. Remodelació de l'estructura de la cromatina

Els octàmers d'histones poden ésser recol·locats en una posició alternativa al llarg de l'ADN. També poden ésser expulsats per tal de fer accessible una seqüència determinada. Aquestes accions però, han de vèncer els més de 100 contactes entre l'octàmer i l'ADN (Luger et al, 1997), i són dutes a terme mitjançant la hidròlisi d'ATP per maquinàries proteïques que s'anomenen remodeladors de cromatina (Becker & Horz, 2002).

Tots els eucariotes contenen com a mínim 5 famílies de remodeladors de la cromatina: SWI/SNF, ISWI, NURD/MI-2/CHD, INO80/SWR1 (Fig.i4). Aquestes famílies són complexos multipteics que es defineixen per la subunitat catalítica ATPasa.

S'ha observat que aquests complexos són capaços de mobilitzar i reposicionar nucleosomes, intercanviar variants d'histona, ejectar histones i canviar l'estructura d'alt ordre de la cromatina. Queda molt encara per determinar quines són les propietats exactes de cadascun dels complexos, ja que les activitats que presenten depenen molt del context i de les característiques experimentals emprades. L'activitat més estudiada i compartida per tots els

complexos remodeladors és el moviment traslacional de nucleosomes. Han estat proposats dos mecanismes per explicar com les maquinàries remodeladores actuen, un l'anomenat *twisting* que es basa en la rotació de l'ADN, i l'altre anomenat *looping*, que consisteix en la formació d'un *loop* que fa que l'ADN associat acabi corrent-se al voltant del nucleosoma (Langst & Becker, 2004; Lusser & Kadonaga, 2003; Narlikar et al, 2002).

Funcionalment, aquestes activitats remodeladores són usades en multitud de processos diferents, com per exemple en la transcripció, replicació, reparació de l'ADN, la recombinació, cohesió de les cromàtides, en la transposició de transposons, entre altres. Sembla doncs que aquests complexos són requerits en qualsevol procés que necessiti com a substrat la cromatina, resultant essencials per la viabilitat cel·lular.

Subfamília SWI/SNF

<i>S.cerevisiae</i>	<i>D.melanogaster</i>	<i>H.sapiens</i>
SWI/SNF	RSC	BAP PBAP BAF PBAF
Swi2/Snf2	Sth1*	Brahma* Brahma* Brg1 or hBrm* BRG1*
Swi1/Adr6		OSA BAF250 Polybromo BAP170 Polybromo/BAF 180
	Rsc 1,2&4	
Swi3	Rsc9	
Snf5	Rsc8	Moir
Swp82/Yfl049w	Sfh1	Snr1
Swp3/Snf2	Rsc7/ Npl6p	hSNF5/INI1 hSNF5/INI1
Arp7/Swp61	Rsc6	BAF60a BAF60aorb
Arp9/Swp59	Arp7/Rsc11	BAP55 BAP55 BAF53 BAF53
	Actin	Actin
Snf6		
Swp29/Tfg3/Taf14/Ark		
Rtt102	Rtt102	
Snf11	Rsc 5,10,13-15	

Subfamília INO80

<i>S.cerevisiae</i>	<i>H.sapiens</i>
yINO80	ySWR1
Ino80*	hIno80*
Arp8	Arp8
Arp5	Arp5
Arp4	BAF53a/Arp4
Rvb1	Rvb1
Rvb2	Tip49a
Ies2	hles2/PAPA-1
Ies6	hles6/C18orf37
Act1	Amida
Taf14	FLJ90652
Nhp10	Aor1/Swc5
Ies1	Vps71/Swc6
Ies3	Vps72/Swc2
Ies4	Yaf9
Ies5	Bdf1
	Swc1/Swc3
	Swc4/God1

Subfamília ISWI

<i>S.cerevisiae</i>	<i>D.melanogaster</i>	<i>H.sapiens</i>	<i>M.musculus</i>
ISW1a	ISW1b	ISW2	ACF
ISW1a	ISW1b	ISW1*	ISW1*
loc3	loc2	loc1	Acf1
		Acf1	Acf1
	Dpb4	Chr16	
	Dis1	Chr14	
		Nurf301	
		Nurf55	
		Nurf38	
		Wstf	
		hChr17	
		hChr15	
		p325	
		Mta1 & 2	
		HDAC1 & 2	
		RbAp46	
		RbAp48	
		MBD2 & 3	
		Rad21	
		SA1 & 2	
		Smc1 & 3	
			p50
			p80
			mWstf
			mSNF2h*
			Tip5/Baz2a
			mSNF2h*
			mWstf

Subfamília CHD

<i>S.cerevisiae</i>	<i>D.melanogaster</i>	<i>M.musculus</i>	<i>H.sapiens</i>
CHD1	Mi2	CHD1	NuRD
Chd1*	Chd4*	Chd1*	ATR
	Rpd3	Chd4/Chd3*	Chd3/Chd4*
		HDAC1 & 2	HDAC1 & 2
		RbAp48	RbAp48
		Icaros 1,2 & 7	RbAp46
		Aiolos	MBD3
			MTA2

Figura i4. Els complexos remodeladors de cromatina

Composició dels diferents complexos remodeladors de cada subfamília. La subunitat catalítica de cada complex està marcada amb un asterisc. Les subunitats que estan compartides per diferents complexos en la mateixa espècie estan subratllades. Les subunitats que presenten homologia en diferents organismes estan ombrejades en gris. Extret de (Gangaraju & Bartholomew, 2007).

1.2.3. Modificacions covalents de les histones

L'última propietat dinàmica dels nucleosomes emergeix de la gran varietat de modificacions postraduccionals de les histones. Les modificacions que estan més estudiades són: l'acetilació, la fosforilació, la ubiquitinació, la sumoilació i la metilació (Fig.i5). Aquestes modificacions es localitzen principalment en els extrems amino-terminal de les histones H3 i H4. Els diferents tipus de modificació han estat associats a algun procés funcional relacionat amb l'ADN, com: transcripció, reparació, replicació, assemblatge, entre d'altres.

Tipus de modificacions postraduccionals de les histones		
	Correlació amb Transcripció	Residus modificats
Grup 1		
Acetilació	Activació	H3(K9,K14,K18,K56) H4(K5,K8,K12,K16) H2A H2B(K6,K7,K16,K17)
Fosforilació	Activació	H3(S10,S28)
Metilació	Activació	H3(K4,K36,K79)
	Repressió	H3(K9,K27) H4(K20)
Grup 2		
Ubiquitinació	Activació	H2B(K123)
	Repressió	H2A(K119)
Sumoilació	Repressió	H4(K5,K8,K12,K16) H2A(K126) H2B(K6,K7,K16,K17)

Figura i5. Modificacions postraduccionals de les histones.

Les diferents modificacions de les histones estan agrupades en dos grups: El Grup1 representa les modificacions que consisteixen en un grup químic petit, mentre que les del Grup2 inclouen les modificacions químiques grans. Extret de (Allis et al, 2007).

1.2.3.1. Acetilació

La reacció d'acetilació consisteix en la transferència d'un grup acetil provinent del cofactor Acetil-CoA al grup ϵ -amino d'una lisina. Aquesta reacció és catalitzada per enzims que són

anomenats HATs (*Histone Acetyl Transferases*). Aquesta acetilació de les lisines de les histones és una reacció reversible que catalitzen uns altres enzims anomenats HDACs (*Histone Deacetylases*) (Fig.i6). Les lisines més comunament acetilades corresponen a la K9, K14, K18 i K23 de la histona H3, i a la K5, K8, K12 i K16 de la histona H4 (Grunstein, 1997; Thorne et al, 1990).

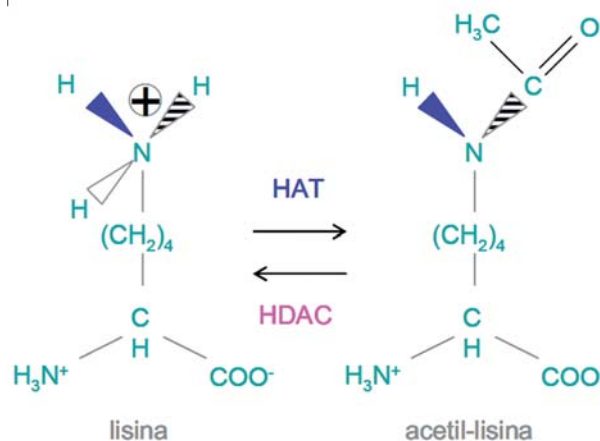


Figura i6. Acetilació i Desacetilació

Reacció d'acetilació i desacetilació de les lisines. A l'esquerra hi ha una lisina carregada positivament. A l'esquerra una lisina acetilada. El grup acetil ha estat incorporat per una acetiltransferasa (HAT), mentre que la reacció inversa d'extracció del grup acetil es duta a terme per una desacetilasa (HDAC). Extret de (Rice & Allis, 2001).

Els enzims amb activitat HAT es poden dividir en 5 famílies: GCN5/PCAF, MYST, CBP/p300, TAF250 i SRC (Fig.i7). Aquests enzims solen tenir certa preferència de substrat però no tanta com altres enzims catalitzadors d'altres modificacions com és el cas de la metilació.

La família GCN5/PCAF és la més ben caracteritzada. Els membres pertanyents a aquest grup es caracteritzen estructuralment per contenir un domini catalític molt conservat (domini HAT), un domini ADA2 i un Bromodomini a la regió carboxi-terminal. Els HATs d'aquesta família acetilen preferentment les lisines de la histona H3 (Vetting et al, 2005).

La família MYST rep els seus noms dels seus membres fundadors: MOZ, Ybf2/Sas3, Sar2 i Tip60. La característica estructural principal d'aquesta família és la presència d'un Zn-finger abans del domini catalític. A més alguns membres tenen un domini Chromo. La preferència de substrat d'aquesta família són les lisines de la histona H4 (Utiley & Cote, 2003).

La família CBP/p300 es caracteritza per tenir, a part del domini catalític, un bromodomini, un domini d'unió a CREB i tres dominis Zn-finger. És mitjançant aquests últims que estableix múltiples interaccions proteïna-proteïna formant diferents complexos multiproteics (Chan & La Thangue, 2001; Janknecht, 2002; Kalkhoven, 2004).

Famílies d'Acetiltransferases d'histones		
HAT	Organisme	Funció
GCN5/PCAF		
Gcn5 PCAF	de llevat a humà humà	coactivador coactivador
MYST		
As2/Sas3	llevat	silenciament
Esa1	llevat	progressió cicle cel·lular
MOF	mosca	compensació de dosis
Tip60	humà	Interacció TAT HIV
MOZ	humà	Leucèmia
HBO1	humà	Interacció amb OR
CBP/p300		
	cuc a humà	coactivador
TAFII250		
	llevat a humà	factor associat a TBP
SRC		
Src-1 ACTR/AIB1/pCIP/TRAM- 1/RAC3 SRC-3 TIF-2 GRIP1	ratolí i humà	coactivador dels receptors d'esteroides

Figura i7. Famílies HAT

Les diferents famílies d'enzims HAT. Es senyala cada enzim humà i la seva conservació en diferents organismes. També es fa esment de quines funcions tenen o en quins processos estan involucrats. Modificat de (Marmorstein, 2001).

Les últimes dues famílies no estan tan ben caracteritzades però s'han diferenciat per criteris estructurals. S'ha vist que els coactivadors de receptors nuclears ACTR, SRC-1 i TIF2 així com la subunitat de TFIID TAF250 que defineix l'altra família presenten activitat HAT intrínseca (Mizzen et al, 1996; Xu, 2005).

Pel que fa a la desacetilació, s'han identificat 18 gens humans que codifiquen per diferents HDACs. Aquests s'han classificats en tres classes I, II i III (Fig.i8). Les dues primeres classes presenten un mecanisme comú en la reacció depenent de Zinc, però els HDACs de la classe tres es diferencien perquè són homòlegs de sir2 de *Saccharomyces cerevisiae* i requereixen el cofactor NAD per a la reacció (Mottet & Castronovo, 2008).

S'ha establert com a generalitat àmpliament acceptada que l'acetilació de les histones està implicada en activació transcripcional i de forma contrària la desacetilació està implicada en repressió transcripcional. Fa més de 40 anys ja es va observar que l'ADN que està sent transcrit activament està en una cromatina rica en histones acetilades. S'han proposat dos mecanismes principals pels quals l'acetilació promou l'activació transcripcional. El primer és l'alteració directa de l'estructura de la cromatina per l'efecte de la neutralització de càrrega, alleugerint d'aquesta manera els contactes histona-ADN. El segon és que funciona com a marca que és reconeguda per maquinàries moleculars que remodelen la cromatina (Choi & Howe, 2009).

Famílies de Desacetilases d'histones		
Classe	Homologia a llevat	Humans
Classe I	RPD3	HDAC1 HDAC2 HDAC3 HDAC8 HDAC11
Classe II	HDA-1	HDAC4 HDAC5 HDAC6 HDAC7 HDAC9 HDAC10
Classe III	Sir2	SIRT1 SIRT2 SIRT3 SIRT4 SIRT5 SIRT6 SIRT7

Figura i8. Classes de HDACs

Agrupació dels diferents membres de la família de les Desacetilases humanes en diferents classes segons la homologia que tenen amb les desacetilases de llevat, RPD3 classe I, HDA-1 classe II i Sir2 classe III. Adaptat de (Mottet & Castronovo, 2008).

1.2.3.2. Fosforilació

Les quatre histones canòniques i la histona H1 són susceptibles de ser fosforilades en els residus serina i treonina (Galasinski et al, 2002). De tots els residus que es fosforilen el més ben estudiat és el de la Ser10 de la histona H3 (H3S10) (Nowak & Corces, 2004). Aquesta fosforilació s'ha relacionat des del principi amb la mitosis. En els primers estudis es va observar que la fosforilació d'H3S10 començava a la profase i que anava decaient fins a la telofase,

Introducció

associant-la al procés de condensació cromosòmica (Gurley et al, 1978). Més endavant es va determinar que aquesta fosforilació és necessària per a l'inici de la condensació cromosòmica en la mitosis i la meiosi com també durant la segregació, però que és prescindible pel manteniment de l'estat condensat (Wei et al, 1999). S'ha vist que hi ha altres residus que es fosforilen durant el procés de mitosis i que són marcadors de cromatina condensada com la serina 28 i la treonina 11 de la histona H3 i les serines 1 de les histones H2A i H4 (Barber et al, 2004; Goto et al, 1999; Preuss et al, 2003).

Els membres de la família de quinases AIR2-Ipl1 i principalment Aurora B són els encarregats de fosforilar H2S10 durant la mitosis (Giet & Glover, 2001). Per altra banda les fosfatases de tipus 1 (PP1) són les encarregades de catalitzar la reacció contrària (Murnion et al, 2001).

Durant la dècada dels 90 es va proposar una nova funció per la fosforilació de H3S10. Es va veure que l'estimulació de fibroblasts amb factors de creixement, èsters de forbol, inhibidors de síntesis proteica i inhibidors de fosfatases produïa una fosforilació de H3S10 en els promotors de gens de resposta ràpida com c-jun i c-fos (Mahadevan et al, 1991). En aquest cas els enzims amb activitat quinasa que fosforilen aquest residu són MSK1 i 2 (Soloaga et al, 2003). Tot i que s'ha suggerit un paper més general de la fosforilació de H3S10 en la regulació de la transcripció induïda, hi ha certa polèmica encara.

1.2.3.3. Ubiquitinació i sumoilació

La ubiquitinació consisteix en la transferència de la ubiquitina, que és una proteïna de 76 aa que pesa 9 Kda, a les lisines de les histones. La reacció d'ubiquitinació és duta a terme per tres proteïnes que de forma orquestrada transfereixen la ubiquitina: el primer enzim E1, és l'anomenat activador de la ubiquitina, l'enzim E2 és el que conjuga la ubiquitina i l'enzim E3 és la ubiquitina lligasa. Els enzims encarregats de la reacció contrària són les UBPs (ubiquitina proteases). En general totes les proteïnes poden ser poli-ubiquitinades, senyal que és reconeguda pel proteosoma per tal de degradar la proteïna que ha estat marcada d'aquesta manera. Per altra banda la mono-ubiquitinació no és una marca de degradació sinó que és una marca reguladora (Conaway et al, 2002). Les histones H2A i H2B es troben mono-ubiquitinades, i tenen un efecte oposat. La mono-ubiquitinació de l'H2B K123 té un paper activador de la transcripció. Aquesta és transferida per Bre1/Rad6 i provoca que es metili l'H3K4 (Kao et al, 2004; Wood et al, 2003). Per altra banda la mono-ubiquitinació de l'H2AK119 té un paper repressor a nivell transcripcional. La reacció és catalitzada pel membre de la família polycomb Bmi1/Ring1A (Wang et al, 2004a). La desubiquitinació de l'H2BK123 està

involucrada en dos processos de silenciament, per una banda en activació gènica indirectament i per l'altra en el manteniment del silenciament de l'heterocromatina. Aquesta diferència funcional s'aconsegueix mitjançant l'acció de dues desubiquitinases diferents, la Ubp8 i la Ubp10. La Ubp8 és una subunitat del complex SAGA, que acetila histones (conté la HAT Gcn5), i actua just després de la ubiquitinació transferida per Rad6 (Daniel et al, 2004; Henry et al, 2003). Aquesta seqüència d'ubiquitinació-desubiquitinació és necessària per establir els nivells adequats de metilació d'H3K4 i d'H3K36. Per tant a l'afectar aquest cicle la transcripció decau (Henry et al, 2003). La Ubp10 funciona en les regions heterocromàtiques silenciades, per tal de mantenir baixos els nivells de metilació d'H3K4 i els d'acetilació d'H3/H4 i d'aquesta manera prevenir la transcripció (Emre et al, 2005; Gardner et al, 2005).

La sumoilació consisteix en la transferència del modificador relacionat amb ubiquitina (SUMO, *small ubiquitin related modifier*), que pesa 11 Kda a les lisines de les histones. SUMO presenta un 18% d'identitat i comparteix estructura tridimensional amb la ubiquitina, però són dissímils en la càrrega superficial. Aquesta modificació ha estat poc estudiada fins al moment i hi ha pocs treballs que hagin determinat clarament la seva funció, tot i que sembla que està associada a repressió transcripcional (Shiio & Eisenman, 2003).

1.2.3.4. Metilació

La metilació és la modificació més complex de les que tenen lloc a les histones. Aquesta complexitat prové del fet que es poden metilar tant els residus lisina com els arginina, i que fins al moment s'han descrit 24 llocs metilables en les quatre histones canòniques. A més a més els residus lisina poden acceptar un grup metil (mono-metil), dos grups (di-metil) o tres grups (tri-metil). En canvi els residus arginina poden acceptar un grup (mono-metil) o dos grups, però en aquest cas aquests grups poden ser simètrics o bé asimètrics (Fig.i9)

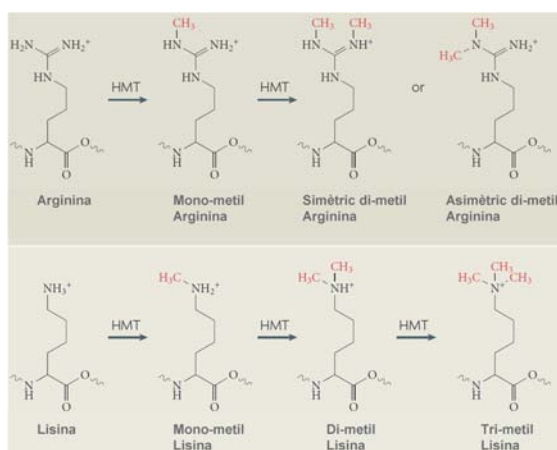


Figura i9. Possibles estats metilats de les lisines i les arginines a les histones

Les arginines poden ser metilades per formar mono-metil Arginina, simètric di-metil Arginina o asimètric di-metil Arginina. Les lisines per altra banda poden ser metilades per formar mono-metil, di-metil o tri-metil Lisina. En vermell s'aprecien els grups metil. HMT és *Histone Methyltransferase*. Adaptat de (Klose & Zhang, 2007).

Introducció

Els enzims que catalitzen aquestes reaccions són les HMTs (*Histone Methyl Transferases*). Aquests els podem dividir en dos grups segons metilen arginines, PRMTs o metilen lisines, SET i DOT (Fig.i10) (Cheng et al, 2005).

Metiltransferases d'histones				
Especificitat	S.cerevisiae	S.pombe	D.melanogaster	Mamífers
H3K4	Set1	Set1	Trithorax Ash1	Set1/Mll/All-1 Set7/9
H3K9	absent	Clr4	Su(var)3-9 Ash1 dG9a SETDB1 E(z)	SUV39H1/2 G9a GLP SETDB1 RIZ
H3K27	absent	absent	E(Z) dG9a	EZH1/2 G9a
H3K36	Set2	Set2	dSet2	Set2 NSD1 Smyd2
H3K79	Dot1		Grappa	Dot1L
H4K20	Absent	Set9	Su(var)4-20 Pr-set7 Ash1	Pr-set7 Su(var)420H1/2 NSD1

Figura i10. Metiltransferases de lisines d'histones

Resum de les diferents metiltransferases de lisina, agrupades segons la lisina que metilen i la seva conservació en diferents espècies. ALL-1, *acute lymphoblastic leukemia 1*; Ash1, *Absent small homeotic discs 1*; Dot-1, *disrupter of telomeric silencing*; Dot1-L, *Dot-1 like*; E(z), *enhancer of zeste*; Ezh1/2, *E(z) homolog 1/2*; Mll, *mixed lineage leukemia*; NSD1, *nuclear receptor binding SET domain protein 1*; PR-Set7, *PR-SET domain containing protein 7*; RIZ, *retinoblastoma protein interacting zinc finger*; SETDB1, *SET domain bifurcated 1*; Set1/2/9, *SET domain containing 1, 2 o 9*; Smyd2, *SET and MYND 2*; Su(var)3-9, *supressor of position effect variegation 3-9*; Suv3-9, *Su(var)3-9 homolog*; Trx, *trithorax*. Extret de (Sims et al, 2003).

PRMTs: Els enzims PRMTs poden ser de tipus I si metilen de forma asimètrica i de tipus II si metilen de forma simètrica (Cheng et al, 2005). Hi ha 9 enzims descrits dels quals estan més ben estudiats PRMT1 que metila principalment el residu H4R3 (Wang et al, 2001), i PRMT4/CARM1 que metila les arginines 2,17 i 26 de la histona H3. La funció de CARM1 està relacionada amb l'activació transcripcional, ja que actua com a coactivador de diferents programes genètics (Bauer et al, 2002; Ma et al, 2001). PRMT1 funciona com a coactivador del

receptor HNF4 que regula diferents gens de vies metabòliques diverses (Barrero & Malik, 2006).

SET: Tots els membre d'aquesta família presenten un domini SET, que allotja l'activitat catalítica. El nom de SET prové de les inicials dels tres membre fundadors Su(var)3-9, Enhancer of Zeste i Trithorax (Jones & Gelbart, 1993; Stassen et al, 1995; Tschiersch et al, 1994). Aquesta família es pot dividir a la vegada en sis subfamílies: Suv39, SET1, SET2, RIZ, SMYD, EZ i Suv4-20 (Dillon et al, 2005). Dos membres de la família SET han estat àmpliament estudiats. Un és Su(var)3-9, que està relacionat amb la formació de l'heterocromatina creant un lloc d'unió per la Proteïna d'Heterocromatina 1 (HP1), quan metila la lisina 9 de la histona H3 (Lachner et al, 2001; Rea et al, 2000). L'altre membre és la HMT E(z), o Enhancer of Zeste, que està implicat en el silenciament dels gens homeòtics, metilant la lisina 27 de la histona H3 creant un lloc d'unió per la proteïna Polycomb (Czermin et al, 2002; Min et al, 2003).

DOT: Dot-1 és l'única HMT identificada fins al moment, que metila lisines i que no conté un domini SET. Dot-1 metila específicament la lisina 79 de la histona H3 (Feng et al, 2002; Ng et al, 2002; van Leeuwen et al, 2002).

Famílies de Desmetilases d'histones					
Família	Enzim	<i>S.cerevisiae</i>	<i>D.melanogaster</i>	Humà	Substrat
PADI	PADI4	Absent	Absent	Present	H3R2, H3R8, H3R17, H3R26 and H4R3
LSD	LSD1	Absent	Present	Present	H3K4me2 and H3K4me1
	LSD2	Absent	Absent	Present	ND
JMJC	JHDM1	Present	Present	Present	H3K36me2 and H3K36me1
	JHDM2	Absent	Present	Present	H3K9me2 and H3K9me1
	JHDM3/JMJD2	Present	Present	Present	H3K9me3, H3K9me2, K36me3 and K36me2
	JARID	Present	Present	Present	H3K4me3 and H3K4me2
	PHF8/PHF2	Absent	Absent	Present	ND
	UTX/JMJD3	Absent	Present	Present	H3K27me2 and H3K27me3
	JmjC only	Absent	Present	Present	ND

Figura i11. Desmetilases d'histones

Famílies de desmetilases d'histones. S'observen els diferents membres humans i la seva conservació en diferents organismes. A l'última columna es descriuen els residus metilats que utilitzen com a substrat. JHDM, *JmjC-containing histone demethylase*; JMJC, *Jumonji-C*; ND, no determinat; PADI, *peptidylarginine deiminase*. Adaptat de (Klose & Zhang, 2007).

Introducció

1.2.3.5. Desmetilació

En els primers anys d'aquest mil·lenni es debatia sobre l'existència d'enzims que fossin capaços de catalitzar la desmetilació de les histones, ja que només es tenien evidències circumstancials que indicaven la seva existència. En els últims anys s'ha fet un gran esforç en la identificació d'aquests enzims (Fig.i11), que inclouen una deiminasa que antagonitza la metilació de les arginines i amin-oxidases i hidroxilases que treuen directament els grups metils de les lisines metilades de les histones.

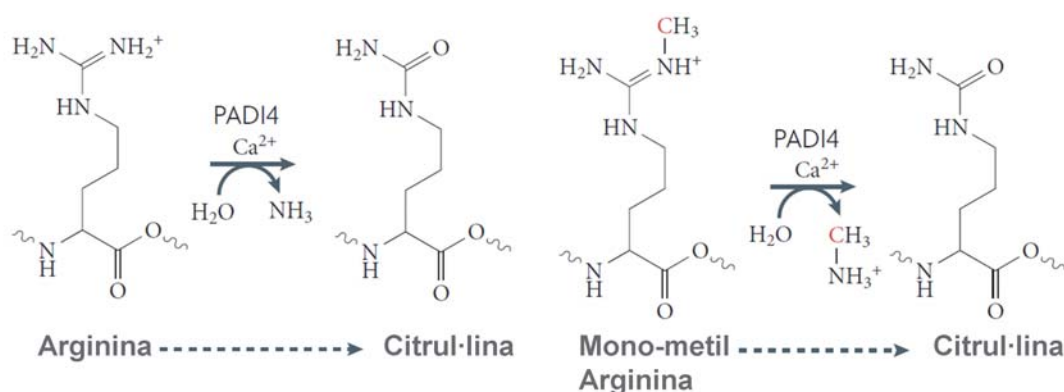


Figura i12. PADI4 com a metilarginina deiminasa

La PADI4 és una peptidilarginina deiminasa depenent de Ca^{2+} que pot funcionar reduint els nivells de metilació de les arginines de les histones. Es mostren les reaccions de deiminació de l'arginina i la demetiliminació de la mono-metilarginina. El carboni del grup metil està en vermell i el producte de la reacció és la citrul·lina. Adaptat de (Klose & Zhang, 2007).

Arginines: Els residus arginina de les histones poden ser covalentment modificats per enzims deiminases per tal de produir residus citrul·lina (Nakashima et al, 2002). Aquesta observació va portar a formular la hipòtesi que un residu arginina metilat podia ser convertit en citrul·lina mitjançant una reacció de demetiliminació (Cuthbert et al, 2004; Wang et al, 2004b). Els humans i els ratolins contenen quatre peptidilarginina deiminases (PADI). La PADI4 humana és l'única que localitza al nucli (Nakashima et al, 2002) i s'ha vist que és capaç de convertir arginines metilades d'una histona a citrul·lina (Cuthbert et al, 2004; Wang et al, 2004b) (Fig.i12). Aquest enzim no presenta molta especificitat de residu i pot actuar sobre qualsevol de les arginines metilades descrites tant a la histona H3 com a l'H4. El fet que PADI4 converteixi una arginina metilada en una citrul·lina i no en una arginina no metilada, fa que no sigui considerada una desmetilasa *sensu stricto*. S'ha vist que la PADI4 està implicada en la regulació dels gens que responen a hormones i que utilitzen els coactivadors CARM1 i PRMT1.

Sembla ser que les arginines que s'han metilat durant l'activació es converteixen a citrul·lina per tal de recuperar l'estat basal anterior (Cuthbert et al, 2004; Wang et al, 2004b).

Lisines:

LSD1: Des de feia molt temps es sabia que hi havia una activitat enzimàtica a la cèl·lula que *in vitro* podia desmetilar les lisines en una reacció amino oxidasa que utilitzava FAD com a cofactor i produïa formaldehid com a producte de la desmetilació de la lisina (Kim et al, 1964). Va ser Shi i els seus col·legues que van proposar que la proteïna BHC110 era aquesta desmetilasa, i la van anomenar LSD1 (Shi et al, 2004). Aquesta proteïna presenta un domini Amino Oxidasa catalític que té una gran especificitat pel residu H3K4 di-metil i mono-metil (Fig.i13). El fet que el mecanisme catalític sigui depenent d'un nitrogen protonat per iniciar la desmetilació, provoca que LSD1 no pugui desmetilar l'estat tri-metil. LSD1 és una subunitat de diferents complexos desacetiladors d'histones. El més ben estudiat és el complex CoREST. Les dues subunitats principals d'aquest complex a part de LSD1 són el propi CoREST i HDAC1. La subunitat CoREST és essencial perquè LSD1 pugui desmetilar *in vivo* (Lee et al, 2005; Shi et al, 2005). S'ha vist que les dues activitats s'influencien mútuament de forma positiva, és a dir LSD1 desmetila amb molta menys eficàcia si les histones estan acetilades i HDAC1 desacetila amb menys eficàcia si la histona està metilada a H3K4 (Lee et al, 2006). El complex CoREST és fonamental en la repressió dels gens neuronals en teixits no neuronals (Ballas et al, 2001). LSD1 però també pot fer d'activador quan s'associa al receptor d'andrògens. En aquest cas sembla que el receptor canvia l'especificitat de LSD1 de la K4 a la K9, desmetilant així aquesta marca associada a repressió permetent l'activació dels gens de resposta als andrògens (Metzger et al, 2005).

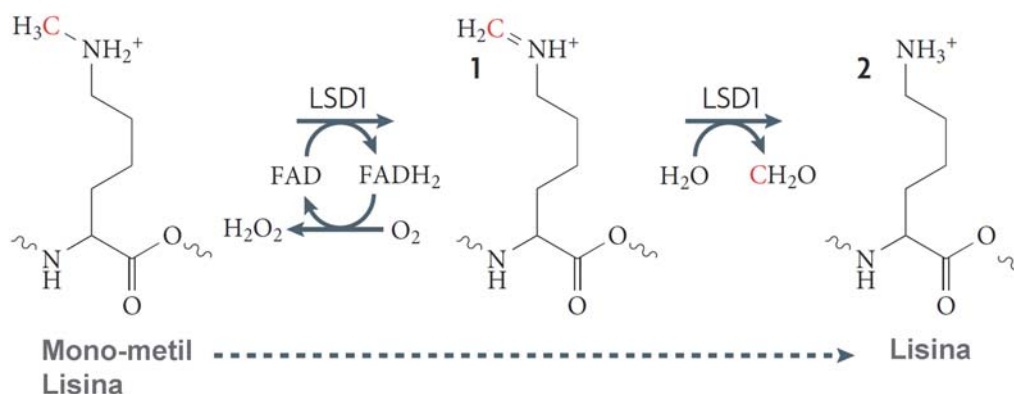


Figura i13. LSD1 com a desmetilasa de H3K4.

Es detallen els mecanismes de reacció de desmetilació d'una mono-metillisina per part de LSD1. La reacció és una amino-oxidació que usa FAD com a cofactor. La pèrdua del grup metil s'aconsegueix mitjançant un intermediari imino (1), el qual és hidrolitzat per formar formaldehid (2). En vermell es destaca el carboni del grup metil. Adaptat de (Klose & Zhang, 2007).

Introducció

Proteïnes JmjC: A humans només hi ha dos homòlegs de LSD1. A més a més aquests enzims no poden catalitzar la desmetilació dels estats tri-metilats de les lisines. Si considerem doncs el gran nombre de residus lisina metilats que hi ha a les histones i l'alta prevalença de l'estat tri-metilat in vivo, fa suposar que han d'haver-hi altres enzims que s'encarreguin d'acomplir aquestes tasques. La primera pista va venir de la identificació d'una proteïna de bacteri, AlkB, que catalitza una reacció d'oxidació depenent de ferro i d' α -cetoglutarat amb la qual desmetila l'ADN, produint també formaldehid (Falnes et al, 2002; Trewick et al, 2002). El domini catalític d'AlkB presenta moltes similituds amb el domini JmjC d'eucariotes. Així les proteïnes que tenen un domini JmjC van passar a ser candidates i proposades a ser hidroxilases desmetiladores (Trewick et al, 2005). A més, moltes de les proteïnes de mamífers que contenen un domini JmjC ja havien estat anteriorment caracteritzades com a reguladors de la transcripció i de l'estructura de la cromatina. Finalment es va demostrar l'activitat desmetiladora de l'anomenada JHDM1A (Tsukada et al, 2006) (Fig.i14). L'especificitat d'aquest enzim és el residu H3K36 en forma di i mono-metil. En els últims dos anys s'han anat caracteritzant desmetilases pertanyents a aquesta família que poden desmetilar els residus: K4, K9, K27 i K36 (Agger et al, 2007; Cloos et al, 2006; Fodor et al, 2006; Klose et al, 2006; Klose et al, 2007; Lan et al, 2007; Lee et al, 2007b; Liang et al, 2007; Whetstine et al, 2006; Yamane et al, 2006). Fins al moment no s'ha descrit cap demetilasa per la K79 ni per la K20, però és de suposar que entre el gran nombre de membres no caracteritzats apareixeran noves desmetilases amb afinitat per aquests substrats.

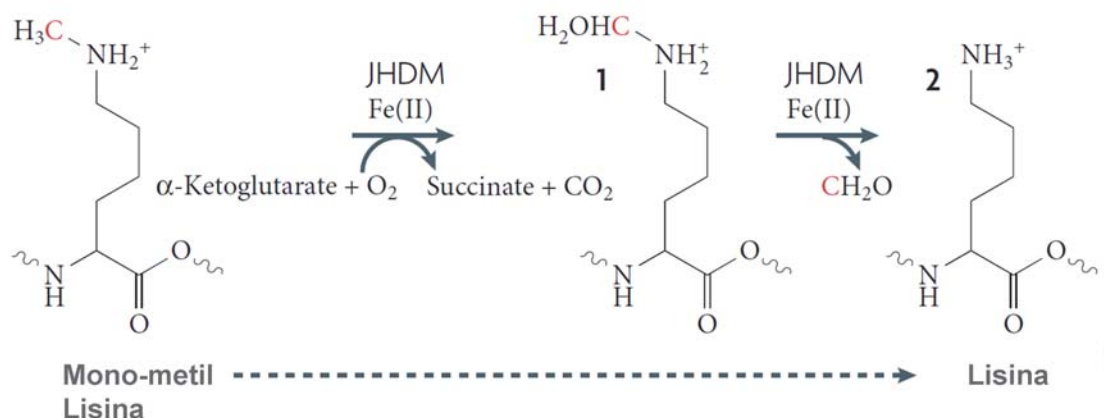


Figura i14. Les proteïnes amb domini JmjC com a desmetilases d'histones

Es detallen els mecanismes de reacció de desmetilació d'una mono-metillisina per part d'una proteïna de la família JmjC. Aquest domini usa $Fe(II)$ i α -cetoglutarat com a cofactors en una desmetilació oxidativa que produeix una hidroximetil-lisina, succinat i CO_2 com productes de la reacció (1). Seguidament el grup hidroximetil és perdut espontàniament en forma de formaldehid (CH_2O) per alliberar el grup metil. En vermell es destaca el carboni del grup metil. Adaptat de (Klose & Zhang, 2007).

De tots els residus lisina que es poden metilar, sis han estat àmpliament estudiats, cinc en la histona H3 (K4, K9, K27, K36 i K79), i un a la histona H4 (K20). La metilació dels residus H3K4, H3K36 i H3K79 estan en general implicats en activació transcripcional, mentre que la resta estan implicats en repressió. A més la metilació d'H3K79 i H4K20 ha estat relacionada amb reparació de l'ADN. S'han identificat proteïnes que s'uneixen específicament a cada una d'aquestes lisines quan estan metilades. Són proteïnes que contenen almenys un domini dels que es coneixen que interaccionen amb lisines metilades: domini Chromo, domini PHD i domini Tudor (Allis et al, 2007).

Metilació d'H3K4: La metilació d'H3K4 està localitzada a l'eucromatina i específicament en gens que estan actius o tenen la potencialitat d'estar-ho. Estudis de Chip-on-chip han demostrat una forta correlació entre aquesta metilació i l'activitat transcripcional. Concretament la tri-metilació de l'H3K4 s'observa en la regió 5' dels gens que estan actius (Barski et al, 2007; Bernstein et al, 2005; Heintzman et al, 2007). Les HMTs encarregades d'aquesta metilació són la SET1 de llevat i els seus homòlegs a altres espècies. Hi ha diferents mecanismes pels quals SET1 és reclutada als promotors transcripcionalment actius. El primer és la fosforilació de la serina 5 del CTD (Carboxi Terminal Domain) de la RNAPol II (Ng et al, 2003). També hi ha el complex PAF que regula diferents passos en el metabolisme de l'ARN naixent que és capaç de portar SET1 a zones d'elongació primerenca (Mulder et al, 2007). També s'ha vist que hi ha una relació molt estreta entre aquesta metilació i la mono-ubiquitinació de H2BK123 (Lee et al, 2007a). No està molt clar quin és el paper exacte que juga aquesta metilació en el procés de transcripció, però hi ha diferents complexos proteics que tenen diferents dominis que són capaços d'unir específicament la tri-metilació de l'H3K4. Per exemple CHD1 conté cromodominis que uneixen aquesta metilació i el complex NURF conté un domini PHD que també interacciona específicament amb aquesta modificació (Flanagan et al, 2005; Wysocka et al, 2006). En els gens homeòtics s'ha vist que els enzims que catalitzen aquesta metilació són essencials per mantenir l'estat actiu en els segments de l'organisme on han de romandre activats.

Metilació d'H3K36: S'ha proposat que la metilació d'aquest residu és necessària perquè l'elongació de la transcripció per la regió codificant dels gens sigui eficient. Consistent amb això, aquesta modificació està altament enriquida en les regions codificants dels gens actius en contrast amb la localització 5' de la metilació de H3K4 (Barski et al, 2007; Bernstein et al, 2005; Heintzman et al, 2007). La proteïna de llevat SET2 i els seus homòlegs són les HMTs que catalitzen la reacció (Strahl et al, 2002). SET2 s'uneix preferencialment a la RNAPolIII que es troba fosforilada en la serina 2 i que és la forma elongant, i que és diferent de la forma que

Introducció

abandona el promotor fosforilada en la serina 5 (Li et al, 2003a). S'ha vist que hi ha una relació entre la ubiquitinació de H2BK123 i l'elongació, havent-hi un cicle d'ubiquitinació-desubiquitinació durant aquest procés (Wyce et al, 2007). Aquesta modificació també té un paper crucial en evitar inicis de transcripció a partir de llocs interns dels gens. La subunitat EAF3 del complex RPD3S conté un cromodomini que interacciona específicament amb H3K36 metilada, que com hem vist està present durant l'elongació. D'aquesta manera la desacetilasa RPD3 és localitzada a les zones codificants un cop la polimerasa elongant ha passat i pot desacetilar les histones per tal que promotors críptics interns no es puguin activar (Carrozza et al, 2005).

Metilació d'H3K79: La lisina 79 de la histona H3 es troba en el domini *histone fold* i no en la cua com la resta de lisines metilables que es coneixen. Una altra característica és que la HMT que catalitza aquesta reacció és DOT1 que no conté el domini SET. No es coneix molt bé quina és la funció d'aquesta modificació, però s'ha vist que està enriquida en regions codificants de gens actius, encara que el seu rol no està ben definit. S'ha trobat una proteïna que és capaç d'unir específicament aquest residu metilat, 53BP1, i que té un paper en reparació de l'ADN (Huyen et al, 2004).

Metilació d'H3K9: Aquesta ha estat la modificació més estudiada fins al moment. Una de les HMT que catalitza aquesta metilació va ser la primera HMT que es va descriure, SUV39H1 (Rea et al, 2000). L'homòleg de *Drosophila* ha estat àmpliament estudiat en el procés de formació de l'heterocromatina pericentromèrica i per tant ha estat implicat en el procés de silenciament i en la supressió del fenomen de PEV (*Position Effect Variegation*). La PEV és una propietat que adquireix un gen eucromàtic al ésser recol·locat artificialment a prop d'una regió heterocromàtica, de manera que la seva expressió és en forma variegada. Aquest tipus d'expressió significa que en algunes cèl·lules el gen adquirirà el silenciament heterocromàtic, i aquest serà heretable durant les següents mitosis formant un clon de cèl·lules on el gen s'ha silenciat. El model actual de la formació de l'heterocromatina es basa en la cooperació de dues proteïnes: la ja esmentada SUV39 i HP1. La proteïna HP1 conté dos dominis: un cromodomini que uneix específicament la modificació i un cromodomini-shadow que permet la dimerització de la proteïna. Així SUV39 crearia un lloc d'unió per HP1 i aquesta mitjançant la seva capacitat de dimerització i la seva interacció amb SUV39 permet que aquesta metili un nucleosoma adjacent i així es produeixi una disseminació d'aquesta metilació (Maison & Almouzni, 2004). Aquesta modificació també s'ha descrit en el silenciament de certs gens a l'eucromatina. Per exemple la proteïna Rb recluta SUV39 i HP1 als promotors regulats per E2F com el de la ciclina E per tal de silenciar-los (Nielsen et al, 2001b). En aquest cas però, no hi ha una disseminació a

la regió sinó que HP1 es manté en un o dos nucleosomes només. S'han descrit altres HMTs que metilen H3K9 a l'eucromatina com G9a, SETDB1 i RIZ, que estan implicades en el silenciament d'altres gens (Sims et al, 2003).

Metilació d'H3K27: Aquesta és una altra modificació repressora i la podem trobar en tres llocs principalment: a llocs eucromàtics on hi ha PREs (*polycomb response elements*) (Ringrose & Paro, 2007), a l'heterocromatina pericentromèrica (Saurin et al, 1998) i al cromosoma X inactiu a mamífers (Plath et al, 2003). Els enzims que catalitzen la reacció de metilació són E(Z) i els seus homòlegs. S'ha trobat aquesta HMT en diferents complexos però la manera com és dirigida a una regió concreta encara no es coneix amb detall. La proteïna Polycomb uneix específicament aquesta metilació. Aquest mecanisme de repressió és usat durant el desenvolupament per silenciar gens importants com ara el gens homeòtics (Czermin et al, 2002; Min et al, 2003).

Metilació d'H4K20: Es coneix més aviat poc sobre aquesta modificació. El que sembla clar és que està implicada en silenciament ja que està present a l'heterocromatina pericentromèrica (Ebert et al, 2006), i un dels enzims que catalitzen la reacció, SUV4-20, és un supressor de la PEV (Schotta et al, 2004). Hi ha alguna evidència funcional de que aquesta modificació està implicada en reparació de l'ADN, ja que s'ha descrit que la proteïna CrB2 (*Crumbs homolog 2*) s'uneix a aquesta metilació específicament (Sanders et al, 2004). CrB2 és un element del *checkpoint* de dany a l'ADN (Du et al, 2006).

1.3. La hipòtesi del codi de les histones

Durant molt de temps havia prevalgut el model que dibuixava les modificacions de les histones com un element que regulava les interaccions entre ADN-histones i histona-histona, alterant l'estructura de la cromatina. Amb el progressiu descobriment de la gran diversitat de modificacions que es produeixen a les histones i la seva aparent especificitat funcional van fer que a principis dels 90 es gestés (Tordera et al, 1993; Turner, 1993) i després al 2000 (Strahl & Allis, 2000), es desenvolupés la hipòtesi del codi de les histones, la qual afirma que les modificacions de les histones formen combinacions amb un significat que és posteriorment descodificat per produir un esdeveniment biològic específic. La formulació literal de la hipòtesi del codi de les histones és: *"Multiple histone modifications, acting in a combinatorial or*

Introducció

sequential fashion in one or multiple histone tails, specify downstream functions” (Strahl & Allis, 2000).

Mòdul d'unió		Modificació postraduccionals
Bromodomini		Diferents Lisines acetilades
R O Y A L	Cromodomini	H3K9me2/3, H3K27me2/3
	Doble Cromodomini	H3K4me1/2/3
	Chromo barrel	H3K36me2/3
	Tudor	(Rme2s)
	Doble/Tàndem Tudor	H3K4me3, H4K20me3 H4K20me1/2, (Kme2)
	MBT	H4K20me1/2, H1K26me1/2 H3K4me1, H3K9me1/2
PHD finger		H3K4me3, H3K4me0 H3K9me3, H3K36me3
WD40 repeat		H3R2/K4me2, (R, Sph, Tph)
14-3-3		H3S10ph, H3S28ph, (Sph, Tph)
BRCT		H2AX-S139ph, (Sph, Tph)

Figura i15. Llegint el codi de les histones.

Es mostren agrupats en famílies estructurals els diferents dominis que es coneix que funcionen com a mòduls d'unió a cromatina. En cada cas s'especifica la modificació postraduccionals a la qual s'ha descrit que s'uneix. Entre parèntesis hi ha modificacions que corresponen a proteïnes no històniques on existeix informació estructural d'algun domini que s'hi uneix. Adaptat de (Taverna et al, 2007).

Aquesta hipòtesi es basa en vàries observacions:

- 1- Hi ha un gran nombre diferent de modificacions el qual podria donar lloc a un gran nombre de combinacions diferents i per tant a una gran variació de significats. A més en una mateixa histona coexisteixen diferents modificacions
- 2- Els enzims que catalitzen les reaccions són molt específics de residu, suggerint per tant que hi hagi una direccionalitat específica en el procés.
- 3- S'ha vist que hi ha diversos grups de modificacions que estan interrelacionades tant positivament com negativament.

- 4- Algunes d'aquestes modificacions estan relacionades en mantenir una estructura de la cromatina que és heretable al llarg de les divisions cel·lulars, suggerint que les modificacions transmeten la informació.
- 5- S'han descrit un gran nombre de proteïnes que contenen diferents dominis que uneixen específicament les diferents modificacions (Fig.i15), i que constituïrien els descodificadors de la informació codificada en les histones.

Aquest últim punt ha estat essencial per sostenir aquesta hipòtesi ja que s'ha pogut correlacionar en alguns casos, la unió d'aquests descodificadors amb efectes funcionals clars.

1.3.1. Acetilació i Bromodomini

Els bromodominis són uns mòduls d'unió a lisines acetilades. Aquests dominis es troben presents principalment en les mateixes HATs i en subunitats de complexos remodeladors de la cromatina (Zeng & Zhou, 2002). L'estructura prototípica d'aquest bromodomini és el de la proteïna PCAF, i consisteix en quatre hèlixs alfa formant un *4-helix bundle* amb una butxaca hidrofòbica en un dels extrems, formada per dos dels loops entre les hèlixs (Fig.16a). És aquesta butxaca la que interacciona amb la lisina acetilada (Fig.i16a-c). Aquesta zona de la butxaca també realitza diversos contactes amb els aminoàcids circumdants a la lisina acetilada establint així especificitat de seqüència. El bromodomini de PCAF té afinitat pel residu H4K16 acetilat (Fig.i16b) (Dhalluin et al, 1999; Owen et al, 2000). TAF250 (Fig.i16d) és un altre exemple però en aquest cas presenta un doble bromodomini que té afinitat per la histona H4 di-acetilada en els residus K5 i K12 (Jacobson et al, 2000). Un altre bromodomini en tàndem és el de la subunitat Rsc4p (Fig.i16e) del complex remodelador RSC. Aquest tàndem però s'estructura com a una única unitat, en canvi els de TAF250 s'estructuren de forma independent (Jacobson et al, 2000). S'ha vist que en el cas de Rsc4p, un bromodomini uneix a H3K14 acetilat i que l'altre bromodomini serveix com a unitat reguladora unint la K25 de la pròpia Rsc4p en cas que estigui en estat acetilat inhibint la capacitat de l'altre bromodomini d'interaccionar amb l'H3K14 acetilada (VanDemark et al, 2007).

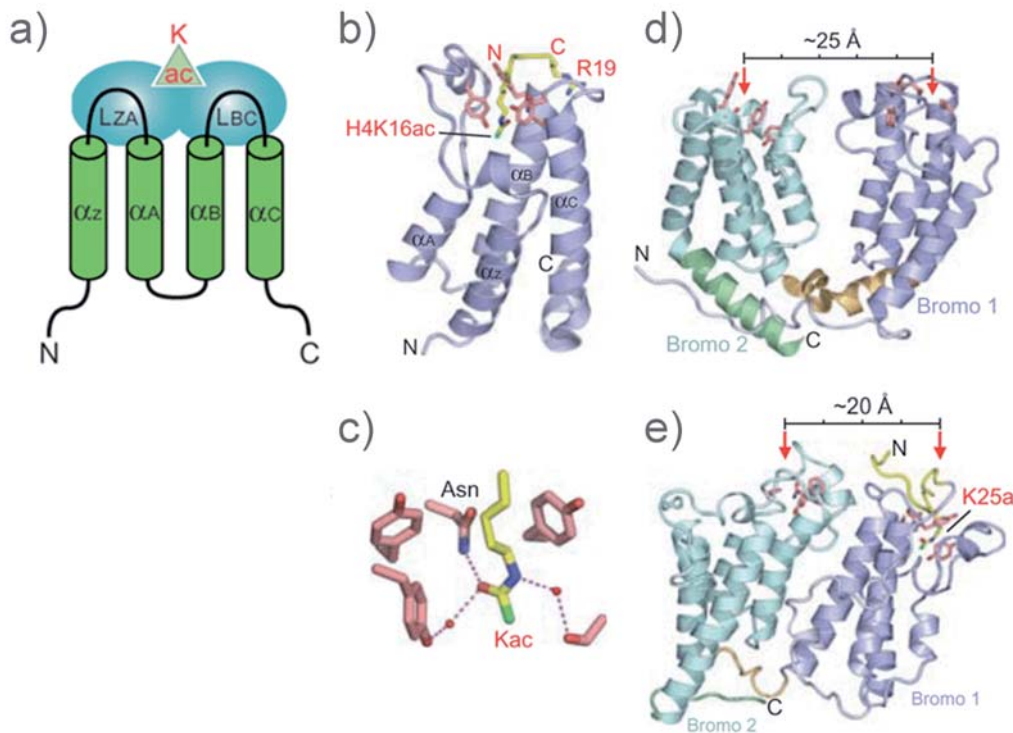


Figura i16. Reconeixement de lisines acetilades pel Bromodomini.

a) Topologia del plegament del bromodomini. Els cilindres de color verd representen les α -hèlix ($\alpha Z, \alpha A, \alpha B, \alpha C$); els ovals de color blau representen els *loops* (LZA, LBC) que participen en la formació de la butxaca de reconeixement de l'acetil-lisina i que contenen també elements de reconeixement de la seqüència del pèptid modificat. b) Estructura del bromodomini de Gcn5p unit a un pèptid que inclou l'acetilació de H4K16 (PDB 1E6I). S'observa com la cadena lateral de la lisina acetilada es troba inserida a dins de la butxaca de reconeixement. c) Detall de la butxaca d'interacció del bromodomini de Gcn5p. Les esferes vermelles representen molècules d'aigua i les línies discontinues ponts d'hidrogen. d i e) Exemples de bromodomins en tàndem. El de TAF1 (d); (PDB 1EQF) i els de Rsc4p (e); (PDB 2R10). Les fletxes vermelles corresponen a les butxaques de reconeixement. Els pèptids d'histona que inclouen la lisina acetilada estan marcats amb groc. Els extrems amino i carboxil dels dominis d'unió estan en color negre i els corresponents als pèptids d'histona estan en vermell. Extret de (Taverna et al, 2007).

1.3.2. Fosforilació i dominis 14-3-3 i BRCT

L'addició d'un grup fosfat implica afegir un grup relativament gran i negatiu que expandeix considerablement les capacitats interactives del residu modificat. El reconeixement de la fosforilació per part dels efectors de vies de senyalització ha estat àmpliament estudiat en el camp de la transducció de senyal. S'han descrit diferents mòduls d'unió a fosforilació per a proteïnes no històniques, però pel que fa a les histones fins al moment només s'han descrit dos exemples.

Proteïnes 14-3-3: Les proteïnes de mamífer anomenades 14-3-3, constitueixen una família de proteïnes que són ubiques i molt ben conservades que tenen la capacitat d'unir residus de

fosfoserines (Muslin et al, 1996; Yaffe et al, 1997) (Fig.i17). Se les ha implicat en diferents processos com transducció de senyal, condensació cromosòmica i mort cel·lular per apoptosi (Dougherty & Morrison, 2004). En el context de la histona H3 hi ha les Serines 10 i 28 que són fosforilables. La seqüència en la qual estan inserides és la mateixa: A-R-K-S. S'ha pogut determinar *in vitro* l'afinitat de la isoforma 14-3-3 ζ per aquestes dues serines fosforilades: per la S10 Kd=78 μ M i per S28 Kd=23 μ M. Per mitjà d'experiments de ChIP (*Chromatin immunoprecipitation*), s'ha pogut determinar que 14-3-3 ζ és reclutada als promotors de c-jun i c-fos de forma induïble durant l'activació d'aquests, i de forma concomitant a la fosforilació de la histona H3 (Macdonald et al, 2005).

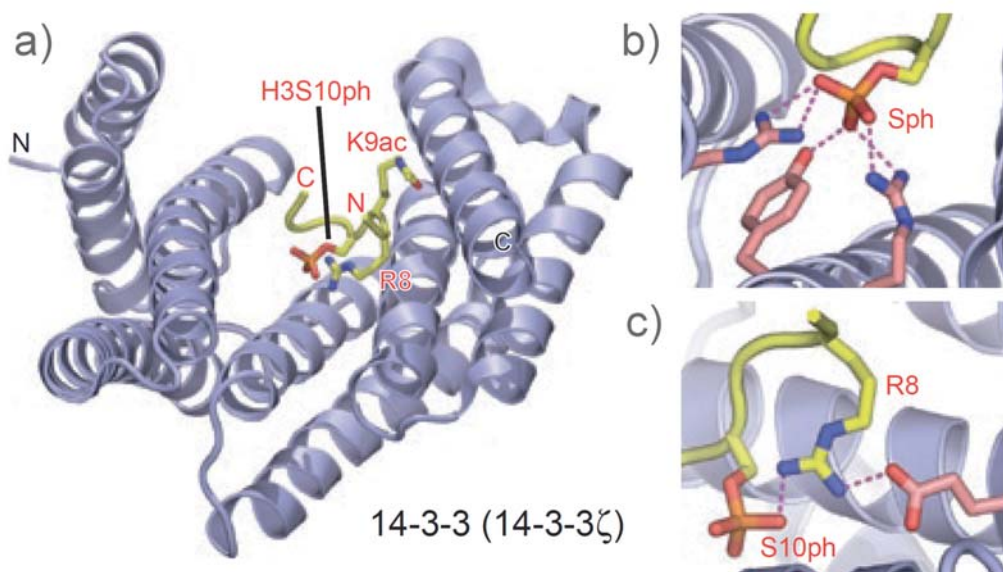


Figura i17. Reconeixement de fosfoserines per les proteïnes 14-3-3.

a) Visió general del complex 14-3-3 ζ amb un pèptid que inclou l'H3S10 fosforilada (PDB 2C1J). El pèptid queda enterrat a dins de l'estructura en forma de V de 14-3-3 ζ . b) Detalls moleculars del reconeixement de la fosfoserina. El grup fosfat és ancorat mitjançant múltiples ponts d'hidrogen i xarxes de parells d'ions. c) El reconeixement del grup amino guanidini de l'H3R8 contribueix a l'especificitat d'unió a la fosforilació de l'H3S10 per part de 14-3-3 ζ . Extret de (Taverna et al, 2007).

Dominis BRCT en tàndem: La proteïna MDC1 (*Mediator of DNA damage Checkpoint Protein 1*) conté dos dominis BRCT en tàndem. Aquesta proteïna colocalitza amb la variant d'histona H2Ax i la proteïna 53BP1 en els focus especialitzats generats per dany a l'ADN. La localització de MDC1 a aquests focus és depenent de la variant H2Ax però només quan està fosforilada a la S139 que passa a anomenar-se γ H2Ax (Rogakou et al, 1998; Stucki et al, 2005). La quinasa que catalitza aquesta fosforilació és ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) en presència de trencaments de doble cadena a l'ADN (Burma et al, 2001). S'ha comprovat *in vitro* que els

Introducció

dominis BRCT de MDC1 uneixen el pèptid K-K-A-T-Q-A-Sp-Q-E-Y corresponent a la histona γ H2Ax amb una afinitat substancial ($K_d=2.2\mu\text{M}$) (Fig.i18). S'ha demostrat in vivo que mutacions en el residu S de γ H2Ax que la fan no fosforilable o en residus clau en els dominis BRCT de MDC1, fan que MDC1 no sigui reclutada als focus de dany i que les proteïnes de reparació de dany a l'ADN com 53BP1 i NBS1 tampoc siguin reclutades (Stucki et al, 2005).

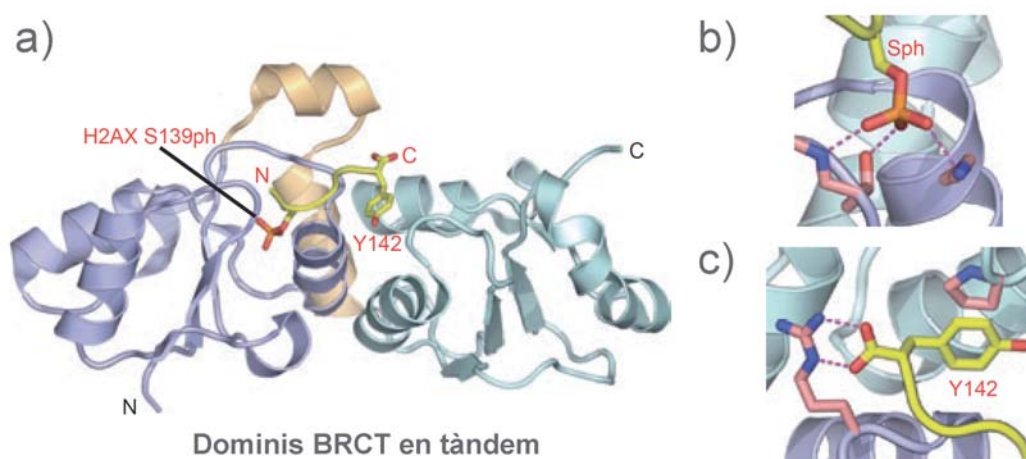


Figura i18. Reconeixement de fosfoferines pels dominis BRCT en tàndem.

a) Visió general del complexa que formen els dominis BRCT de MDC1 amb un pèptid fosforilat de H2AXS139 (PDB2AZM). El lloc d'unió es localitza en la interfície dels dos dominis b) Detalls moleculars del reconeixement de la fosfoferina. El lloc de reconeixement es troba ubicat en el primer domini BRCT. La interacció està estabilitzada per varis ponts d'hidrogen involucrant diferents cadenes laterals de varis residus del domini així com també la cadena principal. c) En aquest cas l'especificitat es deguda a l'interacció de la Y142 en la interfície dels dos dominis. El grup carboxilat lliure és lligat per la cadena lateral d'una arginina del primer domini BRCT, i a més la cadena lateral de la tirosina és immobilitzada per l'anell d'una prolina del segon domini BRCT. Extret de (Taverna et al, 2007).

1.3.3. Metilació de lisines i dominis de la superfamília Royal i dominis PHD

En contrast amb les altres modificacions, la metilació de les lisines es pot trobar en tres estats diferents, mono-, di- i tri-metil. Aquests estats són el resultat del balanç entre les diferents activitats enzimàtiques que operen en el nucli, tant les metiltransferases com les desmetilases d'histones (Shi & Whetstine, 2007). Totes les formes metilades de la lisina són catòniques a pH fisiològic i a mesura que s'incrementen els grups metils la hidrofobicitat i el radi catiònic del grup metilamoni també incrementen, reduint-se doncs la capacitat de donar ponts d'hidrogen. Així doncs el domini que hagi d'acomodar aquest grup ha de contenir unes característiques hidrofòbiques similars a més de ser capaç d'acomodar la persistent càrrega positiva. Com que

els diferents estats de metilació difereixen considerablement en les característiques físico-químiques, aquest fet podria permetre el discerniment d'aquests estats per part de diferents efectors.

1.3.3.1. Superfamília ROYAL

Els membres d'aquesta superfamília (cromodomini, tudor, *malignant brain tumor*- MBT, PWWP i *plant Agetet*), van ésser agrupats per anàlisi de seqüències al presentar homologia entre ells (Maurer-Stroh et al, 2003). Sembla ser que aquesta família s'ha generat de manera divergent al llarg de l'evolució. La presència d'aquests dominis en una proteïna sol conferir alguna propietat funcional associada a la cromatina (Maurer-Stroh et al, 2003). Estudis estructurals posteriors han confirmat aquesta agrupació estructural. El plegament sol estar format per 3-4 fulles β antiparal·leles formant un β -barrel incomplet amb unes hèlix α menys conservades falcant l'estructura(Fig.i19a).

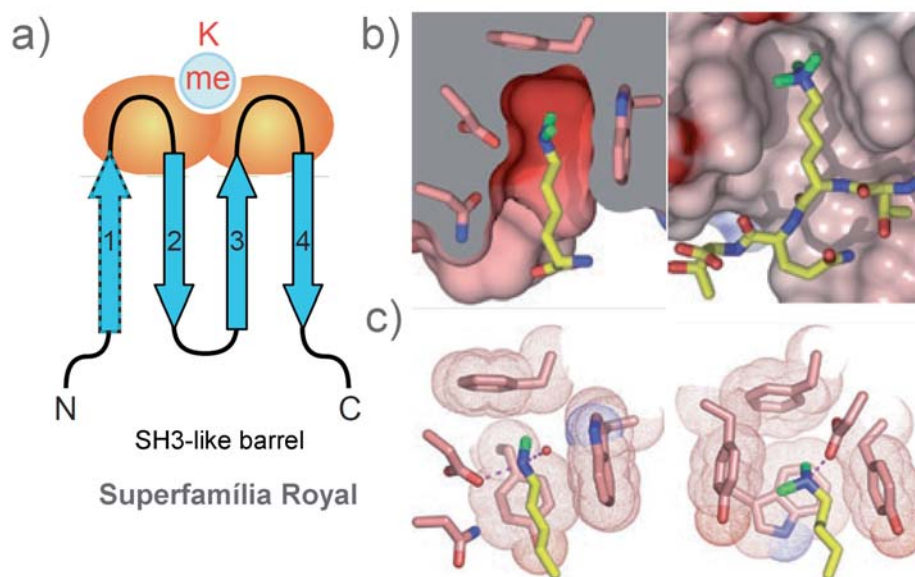


Figura i19. Reconeixement de metil-lisines pels dominis de la superfamília Royal.

a) Topologia general del plegament dels dominis de la superfamília Royal. Les fletxes de color blau representen fulles β que formen un β -barrel incomplet remissent del plegament dels dominis SH3. Els ovals de color taronja representen els loops involucrats en la formació de la butxaca de reconeixement. b) Diagrames que il·lustren la diferència entre el sistema d'unió per inserció en cavitat (esquerra) i el sistema de superfície/solc (dreta). c) Detall de l'estructura de la butxaca d'interacció del segon domini MBT de L3MBTL1 unit a mono-metil-lisina (esquerra) i el d'un domini Tudor de 53BP1 unit a di-metil-lisina (dreta). S'observa com el grup metilamoni presenta una càrrega positiva difusa i que d'aquesta manera es forma la interacció catió- π amb el sistema π que formen els diferents anells aromàtics de la caixa. També s'aprecia com s'aconsegueix la discriminació d'estats baixos de metilació mitjançant la interacció entre el grup metilamoni i un residu aspàrtic que s'introdueix a dins de la gàbia hidrofòbica.

Introducció

El mecanisme comú d'interacció entre tots els dominis de la superfamília amb les lisines metilades, és el posicionament del grup metilamoni dins d'una gàbia formada per entre dos a quatre aminoàcids aromàtics, i a vegades suplementada per una o més cadenes laterals acídiques (Fig.i19a i c). Així aquesta gàbia genera un sistema π d'electrons que a la vegada generen un camp electrostàtic que estableix una interacció amb el metilamoni catiònic. Aquest tipus d'interacció és conegut com a sistema π -catiònic (Ma & Dougherty, 1997). A la vegada aquesta gàbia proporciona l'ambient hidrofòbic necessari (Hughes et al, 2007; Ruthenburg et al, 2007). Les estructures conegudes de dominis que uneixen metil·lisines es poden dividir en dos grups segons el mode d'unió. El primer grup consisteix en un sistema de superfície/solc, que utilitzen els dominis que uneixen estats alts de metilació (di- i tri-metil) (Flanagan et al, 2005; Huang et al, 2006; Jacobs & Khorasanizadeh, 2002). En aquest sistema les butxaques d'unió són més amples i accessibles fent que aquests dominis tinguin una astringència apreciable entre diferents estats però menor que el segon sistema que és el de la inserció en cavitat (Fig.i19b). Aquest altre sistema és usat per dominis que reconeixen estats baixos de metilació com els dominis Tudor en tàndem de 53BP1 i el segon domini MBT de L3MBTL1 (Li et al, 2007). En aquest cas el grup metilamoni és inserit i enterrat dins d'una fenedura profunda de l'estructura. L'especificitat per aquest estats baixos de metilació és aconseguida per un pont d'hidrogen i la interacció electrostàtica entre el protó del metilamoni i un grup carboxilat d'una arginina que està cobrint la gàbia hidrofòbica (Fig.i19c). A més aquesta gàbia en aquest dominis de cavitat és més petita, restringint la capacitat d'encabir una trimetil·lisina.

1.3.3.2. Dominis PHD

Els dominis PHD que es componen de segments Cys₄-His-Cys₃, que coordinen dos àtoms de zinc, són mòduls que es troben en moltes proteïnes associades a la cromatina. S'ha determinat per alguns casos, que aquests dominis PHD són dominis d'interacció de lisines metilades. La topologia del domini PHD és totalment diferent a la dels dominis de la superfamília Royal (Fig.i20a). El primer PHD que es va descriure com a interactor de lisines metilades fou el segon domini PHD de la proteïna BPTF, que és una subunitat del complex remodelador de la cromatina NURF. S'ha determinat que aquest domini presenta afinitat pels estats di i tri-metilats de l'H3K4 (Fig.i20b), amb unes afinitats de K_d=2,4 μ M i de K_d=5 μ M respectivament. El mecanisme emprat pels dominis PHD per tal d'interaccionar amb les lisines metilades és fonamentalment el mateix que l'usat pels dominis de la superfamília Royal, ja que existeix una gàbia amb aminoàcids aromàtics que generen interaccions de tipus π -catiònic amb el grup tri-

metilamoni. També es poden observar les mateixes estratègies d'inserció en cavitat o de superfície/solc.

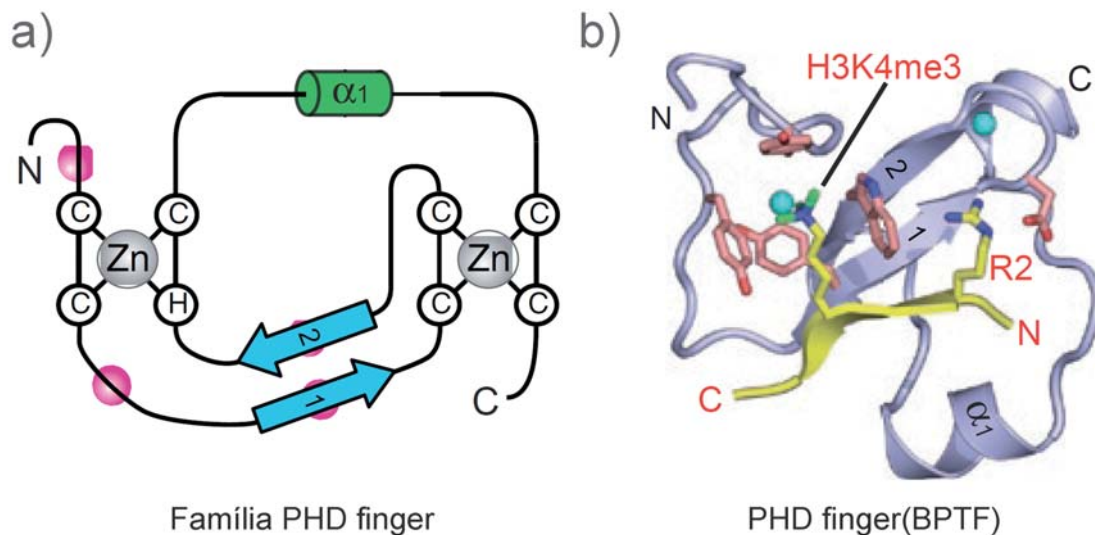


Figura i20. Reconeixement de metil-lisines pels dominis PHD.

a) Topologia general del plegament dels dominis de la família PHD. Les fletxes blaves corresponen a dues fulles β petites que connecten els dos motius *zinc-finger*; els cercles de color blanc corresponen a les cisteïnes i histidines que coordinen els àtoms de zinc; el cilindre verd correspon a una hèlix α petita a l'extrem carboxi-terminal; els cercles rosats són els residus aromàtics que formen la butxaca hidrofòbica de reconeixement. b) Reconeixement específic de la tri-metilació de l'H3K4 per part del segon domini PHD de la proteïna BPTF (PDB2F6J). El pèptid de l'H3 es col·loca entre l'hèlix α 1 i la fulla β 1 formant una fulla β antiparal·lela. Es ressalten els residus aromàtics que estructuren la butxaca de reconeixement hidrofòbica. L'especificitat per la K4 s'aconsegueix en part pel reconeixement de l'R2 i l'ancoratge de l'extrem amino terminal. Extret de (Taverna et al, 2007).

Un punt crucial és l'especificitat de seqüència en la unió, ja que aquests dominis, tant els de la superfamília Royal com els PHD, a part de discriminar entre diferents estats de metilació també discriminen entre diferents lisines metilades (Fig.i21). El mecanisme més usat és el de la inducció de la conformació de fulla β als aminoàcids adjacents a la lisina metilada. D'aquesta manera es forma un aparellament de forma antiparal·lela entre el pèptid amb les fulles β del domini d'unió, proporcionant afinitat i especificitat mitjançant la compatibilitat estèrica i múltiples ponts d'hidrogen i interaccions electrostàtiques intermoleculars (Li et al, 2006).

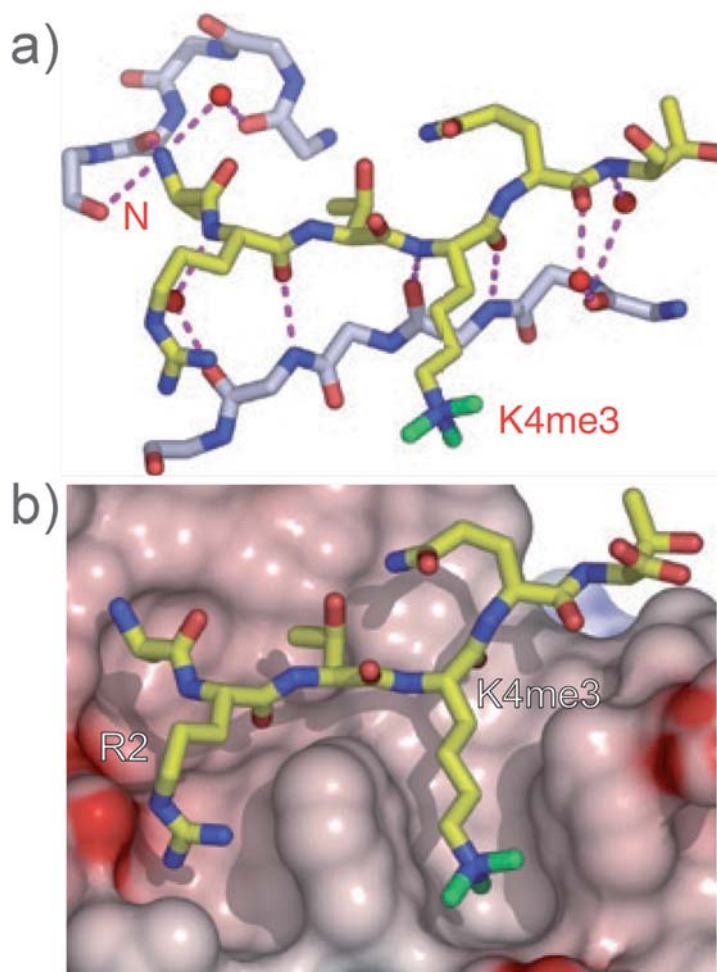


Figura i21. Mecanismes d'especificitat de seqüència

a) Inducció de làmina β per alineament intermolecular en el reconeixement de l'H3K4 tri-metilada per part del PHD de BPTF. Els pèptids metilats en estat lliure es troben desestructurats, però al formar complex s'estructuren en una fulla β induïts pel domini que s'hi uneix. D'aquesta manera els residus circumdants al residu modificat interaccionen específicament al llarg del domini. b) Detecció del residu modificat en relació a l'extrem lliure del pèptid. Aquest mecanisme és essencial en el reconeixement específic de l'H3K4 metilada per part del PHD de BPTF. En aquest cas l'extrem amino-terminal carregat positivament és ancorat en la seva pròpia butxaca de reconeixement, bloquejant la unió de pèptids amb un extrem més llarg. Extret de (Taverna et al, 2007).

1.4. Les proteïnes HP1

La proteïna HP1 va ser descoberta a *Drosophila melanogaster*, quan es van generar uns anticossos monoclonals contra una fracció de proteïnes nuclears no històniques de *Drosophila*. La immunolocalització a cromosomes politènics amb aquests anticossos va donar una tinció concentrada a l'heterocromatina centromèrica (James & Elgin, 1986). Més tard es va determinar que mutacions en el gen Su(var)2-5 que codifica per HP1a de *Drosophila* actuaven com a supressors dominants de la PEV (Eissenberg et al, 1990). En general els membres d'aquesta família de proteïnes estan implicats en l'establiment i el manteniment d'estructures compactades de la cromatina.

S'han identificat membres d'aquesta família en gairebé tots els organismes eucariotes, des de *Schizosaccharomyces pombe* fins als mamífers i les plantes (Hiragami & Festenstein, 2005). En el llevat *Saccharomyces cerevisiae* no s'ha trobat cap proteïna HP1, però se sap que en aquest organisme la PEV està modificada per les proteïnes SIRs (*Silent Information Regulatory*) (Moazed, 2001). El nombre de proteïnes HP1 que contenen diferents organismes varia entre 1 com a *Neurospora crassa*, fins a 5 com a *Drosophila melanogaster* (HP1a, HP1b, HP1c, HP1d i HP1e).

Les proteïnes HP1 estan codificades per una classe de gens anomenats cromobox (CBX). En el cas dels mamífers hi ha tres proteïnes HP1 diferents cadascuna codificada pel seu propi gen: l'HP1 α pel gen CBX5, l'HP1 β per CBX1 i l'HP1 γ per CBX3. Els corresponents gens murins es troben localitzats en les regions sintèniques del genoma del ratolí suggerint que aquestes proteïnes han estat sota una forta pressió evolutiva indicant que la seva funció ha estat curosament seleccionada (Norwood et al, 2004). A més en els genomes dels vertebrats s'han identificat varis pseudogens de HP1s. Per exemple, en humans hi ha almenys 1 pseudogen corresponent a CBX5, 5 pseudogens de CBX1 i 11 de CBX3 (Jones et al, 2001). Això suggereix que al llarg de l'evolució s'han duplicat múltiples vegades seqüències corresponents a HP1. La seva longevitat evolutiva denota que la seva funció és molt important i ha estat fortament conservada. Això queda palès en experiments de creuaments de dominis inter-espècies, per exemple, el cromodomini de l'HP1 β humana pot substituir funcionalment el cromodomini de l'HP1 de *S.pombe* (Wang et al, 2000). També l'expressió de l'HP1 α humana rescata completament la letalitat dels mutants homozigòtics de l'HP1a de *Drosophila melanogaster* (Norwood et al, 2004).

1.4.1. Característiques estructurals

La seqüència i l'estructura de les proteïnes HP1 pot ésser dividida en tres regions. La primera és el Cromodomini, un mòdul estructural ubicat a l'extrem amino-terminal, responsable de la interacció amb l'H3K9 di- i tri-metilada (Bannister et al, 2001; Lachner et al, 2001). La segona regió és el cromodomini-shadow que s'ubica a l'extrem carboxi-terminal, responsable de l'homodimerització i heterodimerització i de la interacció amb altres proteïnes. Per últim aquests dos dominis estan separats per una regió d'unió que s'anomena Hinge, la qual conté la senyal de localització nuclear.

1.4.1.1. El cromodomini

Aquest domini es plega en una conformació globular d'aproximadament 30 Å de diàmetre i consisteix en tres fulles β antiparal·leles empaquetades contra una hèlix α corresponent a l'extrem carboxi-terminal (Ball et al, 1997) (Fig.i23a). Aquest domini pertany a la superfamília Royal i per tant el mode que usa per interaccionar amb l'H3K9 metilada és el que ja s'ha explicat anteriorment. En aquest cas la gàbia hidrofòbica està formada per tres residus aromàtics (en general dues Tirosines i un Triptòfan) (Fig.i23b). Així s'ha vist que mutacions en aquests residus (Tyr24, Trp45 i Tyr48 per l'HP1a de *Drosophila*) provoquen la pèrdua d'afinitat del cromodomini pel pèptid metilat a més de presentar defectes funcionals *in vivo* (Jacobs & Khorasanizadeh, 2002). En aquest cas la discriminació entre l'H3K9 i l'H3K27 és molt important, ja que els residus més propers són idèntics: ARKS. Per l'H3K27 metilada, és el cromodomini de la proteïna Polycomb qui s'uneix específicament (Cao et al, 2002). S'han estudiat amb deteniment les causes de la discriminació d'aquests dominis per la seva lisina i s'ha arribat a la conclusió que els dos dominis generen uns solcs suficientment llargs per tal de discriminar a través dels residus diferents i més allunyats (Fischle et al, 2003). En el cas del cromodomini de l'HP1a hi ha quatre residus (Glu²³, Val²⁶, Asn⁶⁰, Asp⁶²) que interaccionen específicament amb els residus circumdants a l'H3K9 i obliguen al pèptid a formar una fulla β (Fischle et al, 2003).

La interacció que s'estableix entre el cromodomini de l'HP1 i el pèptid metilat a la K9 de la histona H3, depèn de certs residus clau tant en el domini com en el pèptid. S'ha mesurat l'afinitat del cromodomini pel pèptid metilat en una sèrie de mutants puntuals (Fig.i22). Pel que fa als residus aromàtics del cromodomini (Tyr24, Trp45 i Tyr48) que formen la caixa hidrofòbica, quan es muten individualment a Alanina, la interacció es perd completament. Per altra banda quan es muta un residu polar com el Glu23 la pèrdua d'afinitat és molt més lleu. La

inducció de fulla β en el pèptid per part del cromodomini sembla crucial per l'afinitat i per la especificitat. Així mutacions en els residus al voltant de la K9 (Thr6, Ala7, Arg8 i Ser10) esdevenen en una pèrdua significativa d'afinitat. També es destacable que la lisina tri-metilada no pot ser substituïda per un residu amb una cadena lateral hidrofòbica com un Tryptòfan o una Leucina (Jacobs & Khorasanizadeh, 2002) (Fig.i22).

Cromo Domini	K_D (μ M)	Pèptid H3	K_D (μ M)
Wild type	4 ± 1.0	K9M	>500
Mutants		K9W	>500
E23A	6.9 ± 0.9	K9L	>500
Y24A	>75	AcK9	>500
W45L	>500	R8A	>85
W45A	>500	A7M	>110
Y48A	>290	T6A	27 ± 4
E52A	6.5 ± 0.9	T6A/R8A	>500
		S10A	11.6 ± 3.5

Figura i22. Anàlisi mutacional del domini chromo i la histona H3.

Columna de l'esquerra: relació de les afinitats del cromodomini i de les diferents variants mutades d'aquest pel pèptid de la histona H3 metilat a la K9. Columna de la dreta: relació de les afinitats del cromodomini amb diferents variants mutades del pèptid de l'H3. K_D = constant de dissociació. Extret de (Jacobs & Khorasanizadeh, 2002).

La fosforilació de l'H3S10 redueix l'afinitat del cromodomini per la metilació de H3K9 que està just abans d'aquesta serina. S'ha vist que la fosforilació d'aquest residu per la quinasa Aurora B durant la mitosis, provoca que es deslocalitzi HP1 de la cromatina (Fischle et al, 2005; Hirota et al, 2005).

El cromodomini d'HP1 a més d'unir-se a l'H3K9 metilada, s'ha vist que també és capaç d'unir-se a altres lisines metilades en una altra histona (H1) i d'una proteïna no histònica (G9a). S'ha determinat que el cromodomini de les HP1 $\alpha/\beta/\gamma$ de mamífer interaccionen específicament amb la isoforma 1.4 de la histona H1 quan està metilada a la K26 (Daujat et al, 2005; Kuzmichev et al, 2004). Els aminoàcids que envolten aquesta K26(KKARKSA) són molt similars als de la K9 de la histona H3 (QTARKST). S'ha pogut determinar que el complex *Polycomb Repressive Complex2*(PRC2) i concretament la seva subunitat catalítica EZH2 és el responsable de la metilació de la isoforma 1.4 de la histona H1. Recentment s'ha observat que la metiltransferasa d'histones G9a de mamífers s'autometila, generant un lloc d'unió per HP1. La seqüència HRARKT és molt similar a la de l'H3. Curiosament, la interacció d'HP1 amb aquesta lisina metilada és modulable per fosforilació a la Thr adjacent, tal com succeeix amb les histones H3 i H1 en les Ser. (Sampath et al, 2007).

Introducció

Hi ha diferents treballs que determinen que les proteïnes HP1 poden establir interaccions proteïna-proteïna mitjançant el cromodomini. Per exemple l'HP1 β de ratolí interacciona amb l'embolcall nuclear interaccionant pel cromodomini amb la proteïna de membrana nuclear LAP2 β (Polioudaki et al, 2001). També el cromodomini de l'HP1 α murina pot interaccionar amb el domini histone fold de la histona H3 (Nielsen et al, 2001a). Un altre exemple és el cromodomini de l'HP1 α de *Drosophila melanogaster* que interacciona amb alguna de les subunitats del complex ORC (*Origin recognition complex*) (Badugu et al, 2005; Pak et al, 1997).

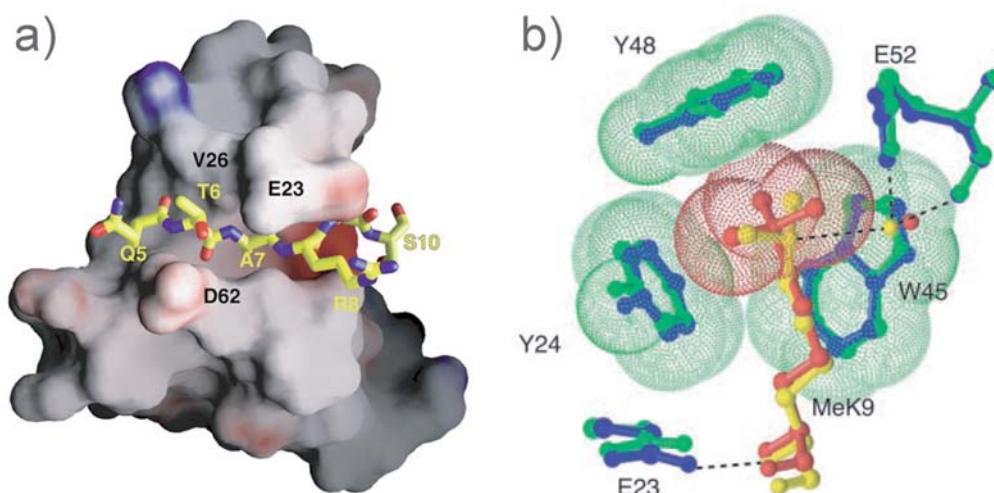


Figura i23. Reconeixement de l'H3K9 metilada pel cromodomini de l'HP1.

a) Estructura cristal·logràfica general del cromodomini de l'HP1 α de *Drosophila* unit a un pèptid corresponent a la histona H3 amb la K9 metilada. Extret de (Fischle et al, 2003) b) Representació detallada de la butxaca hidrofòbica del cromodomini de l'HP1 α amb la K9 de l'H3 metilada. La lisina en groc correspon a la di-metilació de la K9 i en vermell a la tri-metilació. El cromodomini en blau correspon a l'estructura amb el pèptid di-metilat i en verd el cromodomini amb el pèptid tri-metilat. Es formen contactes de van der Waals diferents en el cas del pèptid tri-metilat. Extret de (Jacobs & Khorasanizadeh, 2002).

1.4.1.2. Cromodomini-shadow

Així com hi ha diferents proteïnes que contenen un o més cromodomins, el cromodomini-shadow és únic per les proteïnes HP1. Aquest domini té una conformació globular i unes dimensions molt similars a les del cromodomini. També està estructurat per tres fulles β antiparal·leles, però a diferència del cromodomini que té una hèlix α , el cromodomini-shadow en té dues (Cowieson et al, 2000). Una altra diferència important, és que el cromodomini es manté monomèric en solució, contràriament el cromodomini-shadow es troba en forma

dimèrica en les mateixes condicions (Brasher et al, 2000). La interfície del dímer està formada per les dues hèlix $\alpha 2$ formant un angle de 35° . En aquesta interfície es troben una sèrie de residus conservats únics pel cromodomini-shadow, que generen un solc no polar, on es poden acomodar regions d'altres proteïnes que interaccionen amb HP1. Per tal de determinar quina seqüència consens és la que es pot encabir en aquest solc específicament, es va realitzar un assaig de *phage display* per trobar dins d'una llibreria de pèptids aquells que tinguessin suficient afinitat pel cromodomini-shadow (Smothers & Henikoff, 2000). Aquest crivellatge resultà amb la identificació del pentapèptid PxVxL (Fig.i24c), que està present en diferents proteïnes de les que ja es coneixia la seva interacció amb HP1(Fig.i24b), així com també en el propi cromodomini-shadow. En l'estructura cristal·logràfica del cromodomini-shadow amb el pèptid de la proteïna CAF-1, s'observa com aquest pèptid s'estructura en forma de fulla β , induït per una fulla β paral·lela d'un monòmer i una altra fulla β antiparal·lela de l'altre monòmer (Fig.i24a). Aquesta disposició és molt semblant a la forma com interacciona el cromodomini amb el pèptid de la histona H3 metilat. La diferència és que un interacciona de forma monomèrica, mentre que l'altre ho fa de forma dimèrica. La forma força inespecífica amb la qual el cromodomini-shadow estableix interaccions, permet que les proteïnes HP1

puguin interaccionar amb un gran nombre de proteïnes diferents (Thiru et al, 2004).

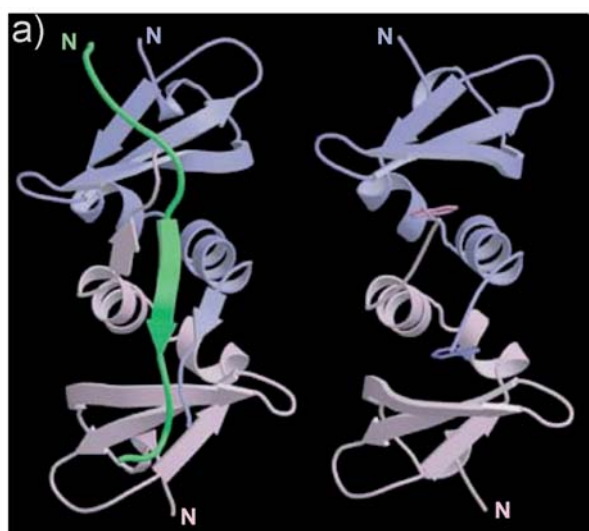


Figura i24. Interacció del cromodomini-shadow amb el pentapèptid PxVxL.

a) Estructura del cromodomini-shadow de l'HP1 β complexat amb el pèptid de CAF-1(esquerra), comparada amb la del mateix domini sense complexar amb el pèptid de CAF-1(dreta). En verd és la regió de CAF-1 que interacciona. En l'estructura del domini sol es ressalten les cadenes laterals dels Trp170 els quals estableixen les cues carboxi-terminals sortints. b) Alineament de seqüències de les proteïnes que interaccionen amb HP1 a través del cromodomini-shadow i que contenen el consens PxVxL. Ombrejats en blau els residus de CAF-1 que participen en la interacció. En vermell els residus conservats. Extret de (Thiru et al, 2004). c) Alineament de les seqüències obtingudes en el *phage display*.

	-6	-2	0	+2	+5
mCAF	SKAGDLLFIEKV	PVV	VLEDILATKPSIASL		
hCAF β	SEAGGILFKGKV	PMV	VLDILAVRPPQIKS		
mTIF1 β	GEGEVSGLLRKVP	RV	SLERLDLDTSDSQP		
hTIF1 β	GEGEVSGLMRKVP	RV	SLERLDLDTADSQP		
mTIF1 α	SKPAGADSTHKVP	VM	LEPIRIKQENSGPP		
hTIF1 α	SKPAGADSTHKVP	VM	LEPIRIKQENSGPP		
TAF ₁₁ 30	IGVEDDLNKGAKP	VV	LQKLSLDDVQKLIK		
IDN3	LIRPPQVTLTQT	PMV	ALRQPHNRIMLTTPQ		

c) Pèptids del phage display	YFWVIMR
	YWPVIL
	YPYVILR
	LNPRVIL
	HTLRVML
	RVVHPM

Introducció

1.4.1.3. Regió Hinge

Els dos dominis globulars de HP1 estan separats per la regió hinge, que és la regió més variable en seqüència i en longitud entre les diferents HP1s. S'ha proposat que l'estructura d'aquesta regió no és globular sinó flexible i exposada, i per tant la raó fonamental per la qual no s'ha pogut determinar la seva estructura tridimensional (Singh & Georgatos, 2002). Aquesta regió és propensa a ésser modificada postraduccionalment, especialment per fosforilacions (Badugu et al, 2005; Koike et al, 2000; Lomberg et al, 2006; Zhao et al, 2001). A més aquestes modificacions afecten aspectes funcionals d'HP1 com la localització, interaccions o la funció. Així es pot proposar aquesta regió com una plataforma reguladora de la funcionalitat de les proteïnes HP1.

1.4.2. Localització i funció

Les diferents proteïnes HP1 presenten diferents patrons de distribució subnuclear: en general les HP1 α /a i HP1 β /b es localitzen a l'heterocromatina pericentromèrica mentre que HP1 γ /c, es troba més enriquida a l'eucromatina.

La funció més estudiada d'HP1 és la que realitza com a constituent de l'heterocromatina. Aquesta funció depèn de la metilació de l'H3K9 que és reconeguda a través del cromodomini. Aquesta modificació depèn de la metiltransferasa d'histones Su(var)3-9. El fet que HP1 i Su(var)3-9 interaccionin físicament, ha portat a formular el model de l'expansió de l'heterocromatina, que consisteix en una retroalimentació entre les dues proteïnes. Es creu que la funció d'HP1 a l'heterocromatina és alterar l'estructura local de la cromatina reduint l'accessibilitat i alhora fixar un patró nucleosomal ordenat (Wallrath & Elgin, 1995).

Una funció relacionada amb la formació de l'heterocromatina per part d'HP1 és la correcta segregació dels cromosomes durant la mitosis. Hi ha diferents treballs que descriuen els defectes en la segregació cromosòmica que es produeixen en l'absència d'HP1 en diferents organismes (Bernard et al, 2001; Kellum & Alberts, 1995). Es creu que aquests efectes són produïts per la deslocalització de la cohesina, ja que s'ha demostrat que l'HP1 és capaç d'interaccionar amb la cohesina (Nonaka et al, 2002), o en el cas de l'HP1 α humana amb NIPBL, proteïna que és necessària per carregar correctament el complex cohesina (Lechner et al, 2005).

En els darrers temps, s'han publicat moltes dades implicant les proteïnes HP1 en altres funcions a part de la que exerceix a l'heterocromatina.

1.4.2.1. Repressió de gens a l'eucromatina

La proteïna del Retinoblastoma porta l'HP1 α al promotor del gen de la Ciclina E, provocant la tri-metilació de l'H3K9 per part de Suv39H1 (Nielsen et al, 2001b). També s'ha trobat l'HP1 γ associada amb les proteïnes E2F, reprimint els gens diana d'E2F (Ogawa et al, 2002). Tot i que l'estructura de la cromatina resultant en aquests promotors s'assembla molt a la cromatina heterocromàtica en termes de repressió transcripcional i heretabilitat, difereix en el fet que a l'eucromatina aquesta estructura només s'expandeix en un o dos nucleosomes.

Els llocs eucromàtics de l'HP1a de *Drosophila*, no coincideixen en la seva majoria amb els de Su(var)3-9, indicant que la funcionalitat i el mode d'unió de l'HP1 en aquests llocs difereix del que correspon a l'heterocromatina (Greil et al, 2003).

1.4.2.2. Influència sobre l'expressió dels gens heterocromàtics

Malgrat que s'ha observat que l'HP1 silencia transcripcionalment els gens eucromàtics col·locats artificialment a l'heterocromatina (PEV), pràcticament tots els gens que es troben de forma natural ficats a l'heterocromatina, presenten una expressió mitja-alta (Eissenberg et al, 1990). En el cas dels gens *light* i *rolled*, que es troben dins l'heterocromatina pericentromèrica del cromosoma 2, l'HP1 resulta imprescindible per la seva correcta expressió (Clegg et al, 1998; Hearn et al, 1991; Lu et al, 2000). Consistentment, al recol·locar artificialment aquests gens de l'heterocromatina a l'eucromatina, la seva expressió es veu dràsticament reduïda (Wakimoto & Hearn, 1990). Per tant aquests gens necessiten de l'estructura de la cromatina generada per part d'HP1 per tal d'expressar-se eficientment, suggerint que l'HP1 i la transcripció no són excloents.

1.4.2.3. Regulació de l'expressió gènica a l'eucromatina

Ja va resultar sorprenent observar que l'HP1 actuava en zones genòmiques diferents de l'heterocromatina, que encara ho va ser més l'aparició de dades que relacionaven funcionalment l'HP1 amb activació transcripcional a l'eucromatina. Per exemple a *Drosophila* es va observar que l'HP1a s'enriqueix en els *puffs* induïts per *heat shock*, on s'hi concentra una gran activitat transcripcional. Aquesta localització s'ubica en la regió codificant del gen i no en el promotor i sembla que aquesta associació és RNA dependent (Piacentini et al, 2003). També

Introducció

s'ha descrit que l'HP1 γ murina es detecta en les regions codificants juntament amb la trimetilació de l'H3K9 a gens actius. La seva presència depèn totalment de que hi hagi elongació activa (Vakoc et al, 2005).

Un estudi a *Drosophila* analitza els canvis d'expressió en el mutant d'HP1a dels gens que es troben en una regió d'uns 500Kb positiva per HP1a en immunolocalitzacions a cromosomes politènics. Tres dels deu gens que canvien la seva expressió en la condició mutant són positius per ChIP. Sorprenentment però, els nivells d'expressió dels tres gens es veuen disminuïts en absència d'HP1a, suggerint un paper en l'activació transcripcional d'aquests gens. A més, només un d'aquests gens també es positiu per la metilació de l'H3K9, indicant la divergència tant a nivell d'unió a la cromatina com funcional en aquestes regions, de la que exerceix a l'heterocromatina (Cryderman et al, 2005).

1.4.2.4. HP1s i el dany a l'ADN

S'ha descrit recentment la participació de les proteïnes HP1 en reparació de l'ADN (Ayoub et al, 2008; Luijsterburg et al, 2009). S'ha vist que en resposta a DSB(*Double strand break*), la CK2 fosforila l'HP1 β a la Thr51 i causa que es desestabilitzi la unió del cromodomini per l'H3K9 metilada, mobilitzant-se de la cromatina. Aquesta mobilització sembla necessària per la fosforilació de l'H2Ax, senyal necessària pel *checkpoint* i la reparació. També s'ha vist que es produeix un ràpid i específic reclutament de les tres HP1s humanes després de produir-se entrecreuaments o DSB a l'ADN. Sembla que aquest reclutament depèn del cromodomini-shadow, amb lo qual s'ha proposat un model en el què es necessari mobilitzar l'HP1 que es troba unida al lloc del dany fosforilant-la a la Thr51 i posteriorment mitjançant una interacció amb altres proteïnes, és estabilitzada al mateix lloc per realitzar alguna funció que encara es desconeix.

1.4.2.5. HP1 i funció telomèrica

A *Drosophila*, l'HP1a a més de localitzar-se a l'heterocromatina i a diferents llocs eucromàtics, també es localitza als telòmers (Fanti et al, 2003). En els mutants d'HP1a s'observen múltiples fusions telomèriques amb una gran varietat de figures metafàsiques anormals (Fanti et al, 1998). A partir d'aquestes dades s'ha proposat a l'HP1a com una proteïna de tipus "cap", es a dir, que s'ubica al telòmer i fa una funció com de tap per tal d'evitar que es pugui fusionar amb altres extrems lliures. S'ha vist que mutacions al cromodomini, que afecten a la interacció amb la metilació de l'H3K9, no deslocalitzen la proteïna del telòmer ni produeixen cap problema en l'estabilitat d'aquests, tot i que aquesta modificació està present en els telòmers (Cowell et al,

2002). El determinant de la localització telomèrica de l'HP1a és el domini *hinge*, que resulta que interacciona específicament amb l'ADN telomèric (Perrini et al, 2004). L'HP1a a més del seu paper en el *capping* telomèric també té un paper en el manteniment de la longitud telomèrica. A *Drosophila melanogaster* els telòmers estan compostos de dos retrotransposons el HeT-A i el TART, que només es transposen al telòmer. Els mutants d'HP1a presenten una transcripció molt més elevada d'aquests transposons i alhora un elongament dels telòmers (Perrini et al, 2004; Savitsky et al, 2002). Curiosament per aquesta funció en el control de l'elongació dels telòmers, és necessari un cromodomini intacte i la presència de l'H3K9 metilada (Perrini et al, 2004). Així l'HP1a realitza dues funcions diferents al telòmer on utilitza dues maneres diferents per unir-se a la cromatina, pel *capping* unió directe a l'ADN i pel control de l'elongació unió a la metilació de l'H3K9.

Aquesta funció del *capping* telomèric sembla estar en cert grau conservada, tot i que l'estructura i el sistema de manteniment són molt diferents. Així, s'han vist els diferents homòlegs de mamífer localitzats als telòmers en cromosomes metafàsics (Aagaard et al, 2000; Garcia-Cao et al, 2004; Koering et al, 2002; Minc et al, 1999). També s'ha vist que la reducció de qualsevol dels tres homòlegs murins causa una reducció en la longitud dels telòmers (Garcia-Cao et al, 2004).

1.4.3. Modes d'unió a la cromatina

Dades *in vivo* suggereixen que la localització d'HP1 depèn de la metilació d'H3K9, però hi ha multitud de dades que indiquen que la unió d'HP1 a la cromatina és molt més complexa i regulada. S'ha descrit que l'HP1 α de ratolí interacciona amb la subunitat gran de CAF1 a través del consens PxVxL (Murzina et al, 1999). Aquesta interacció ha proporcionat un model en el qual l'HP1 és portada als focus de replicació per ésser incorporada després a la cromatina metilada. En cèl·lules murines que es troben replicant, s'ha pogut determinar per immunofluorescència que HP1 α i γ es localitzen juntament amb CAF1 en els focus de replicació (Quivy et al, 2004).

També s'ha implicat l'ARN com a mediador de la interacció d'HP1 amb la cromatina. El domini *hinge* de l'HP1 α de ratolí uneix ARN *in vitro* (Muchardt et al, 2002). Si un cultiu cel·lular de mamífer és tractat amb RNAsa, l'HP1 α es deslocalitza de l'heterocromatina (Muchardt et al, 2002). Com ja s'ha esmentat anteriorment, l'HP1a de *Drosophila* és reclutada a gens on s'indueix una activació transcripcional, concretament a la regió codificant del gen. Aquesta

Introducció

unió és sensible a RNAsa, suggerint que l'ARN és essencial perquè l'HP1 s'hi uneixi (Piacentini et al, 2003).

La histona H1 també sembla jugar un paper important en la unió d'HP1 a la cromatina. Com ja s'ha esmentat abans, el cromodomini d'HP1 es capaç d'unir específicament la metilació de la K26 d'aquesta histona. A més s'ha determinat que l'HP1 α murina es capaç d'unir a través del domini hinge la histona H1 (Nielsen et al, 2001a). L'HP1 α de *Xenopus* interacciona *in vitro* a través de la regió *hinge* amb cromatina nativa que conté H1 (Meehan et al, 2003).

En termes moleculars, podem dir que la gran diversitat d'interaccions que l'HP1 estableix amb els seus tres dominis, provoquen una gran varietat de modes diferents d'unió a la cromatina dependent de la regió genòmica considerada. El cromodomini a part d'interaccionar amb la metilació de l'H3K9, també ho pot fer amb el domini globular de la histona H3, amb l'H1K26 metilada i amb el complex ORC. Per altra banda el domini hinge pot interaccionar amb ARN i amb la histona H1. Finalment el cromodomini-shadow estableix una miríada d'interaccions amb diferents proteïnes (Fig.i25).

Estudis de dinàmica *in vivo* han mostrat que l'HP1 no és tan immòbil com es pensava, formant un adhesiu per mantenir l'heterocromatina ben condensada. Experiments de *photo-bleaching* a cèl·lules de mamífer amb les proteïnes HP1 fusionades a GFP mostren que aquestes són més aviat dinàmiques. Resulta que les tres isoformes estan sotmeses a un intercanvi molt dinàmic tant a l'eucromatina com a l'heterocromatina, malgrat que hi ha una subfracció més estàtica en aquesta última (Cheutin et al, 2003; Festenstein et al, 2003; Schmiedeberg et al, 2004). S'han obtingut dades similars per a *Swi6* (ortòleg al llevat de fissió) (Cheutin et al, 2004).

La mobilitat d'HP1 també es pot modular per modificacions postraduccionals. Les proteïnes HP1 es poden fosforilar (Eissenberg et al, 1994; Huang et al, 1998; Minc et al, 1999; Zhao & Eissenberg, 1999). S'han trobat diferents quinases capaces de fosforilar HP1: CKII, PKA i Pim-1 (Koike et al, 2000; Lomberg et al, 2006; Zhao & Eissenberg, 1999). Per exemple la fosforilació de la S83 de l'HP1 γ causa que aquesta interaccioni amb Ku70 i marca una subpoblació que es localitza a l'eucromatina i que es troba implicada en l'elongació de la transcripció (Lomberg et al, 2006). En aquest mateix treball s'ha determinat que les tres isoformes humanes estan subjectes a moltes modificacions diferents com acetilació, sumoilació, ubiquitinació, metilació entre d'altres, i que a més algunes d'aquestes són específiques d'isoforma (Lomberg et al, 2006).

Proteïna	Organisme	HP1 variant	Metodologia	Domini	Referències
Regulació de la transcripció					
Modificació de la cromatina					
H1	<i>Drosophila</i>	HP1	rPD	nd	Nielsen et al. (2001a)
HP1-BP74 H1-like	Mouse	mHP1 α	Y2H, FW, rPD	Hinge	Le Douarin et al. (1996); Nielsen et al. (2001a)
H3	Mouse	mHP1 α , mHP1 β , mHP1 γ	exIP, FW, rPD	CHD	Nielsen et al. (2001a); Polioudaki et al. (2001)
H3	<i>Drosophila</i>	HP1	rPD	nd	Nielsen et al. (2001a)
Methylated H3K9	<i>S. pombe</i>	Swi6	rPD, ChIP	CHD	Bannister et al. (2001); Nakayama et al. (2001)
Methylated H3K9	<i>Drosophila</i>	HP1	IF, FAITC, NMR	CHD	Jacobs and Khorasanizadeh (2002); Jacobs et al. (2001)
Methylated H3K9	Mouse	mHP1 α , mHP1 β , mHP1 γ	rPD	CHD	Lachner et al. (2001)
Methylated H3K9	Human	hHP1 α , hHP1 β , hHP1 γ	rPD, SPRA	CHD	Bannister et al. (2001)
Methylated H1.4K26	Human	hHP1 α , hHP1 β , hHP1 γ	BD, exIP, rPD, IF	CHD	Polioudaki et al. (2001)
H4	<i>Drosophila</i>	HP1	rPD	nd	Polioudaki et al. (2001)
H4	Mouse	mHP1 α	<i>In vitro</i> cross linking	CSD	Polioudaki et al. (2001)
MicroH2A1.2	Mouse	mHP1 β (M31)	IF	nd	Turner et al. (2001)
Clr4	<i>S. pombe</i>	Swi6	exIP	nd	Bannister et al. (2001); Nakayama et al. (2001)
Su(VAR)3-9	<i>Drosophila</i>	HP1	Y2H, exIP, IF	CSD	Schotta et al. (2002)
Suv39h1	Mouse	mHP1 β (M31)	exIP, IF, SED	nd	Aagaard et al. (1999); Czikovich et al. (2001)
SUV39H1	Human	hHP1 β	exIP, IF, SED	nd	Aagaard et al. (1999); Czikovich et al. (2001)
Su(VAR)3-7	<i>Drosophila</i>	HP1	Y2H, exIP, IF	CSD	Clear et al. (1997); Delattre et al. (2000)
G9a	Human	hHP1 α , hHP1 γ	exIP, IF	nd	Chin et al. (2007)
Epel	<i>S. pombe</i>	Swi6	Y2H, IF	nd	Zofall and Grewal (2006)
Polycomb	Human	hHP1 α , hHP1 γ	exIP, rPD, IF	CSD	Brasher et al. (2000)
KAP1/TIF β	Mouse	mHP1 α , mHP1 β , mHP1 γ	exIP, rPD, IF, SPRA, GFC	CSD	Lechner et al. (2000); Murzina et al. (1999); Nielsen et al. (2001a)
KAP1/TIF β	Human	hHP1 α , hHP1 γ	Y2H, exIP, rPD, IF, GFC	CSD	Brasher et al. (2000); Murzina et al. (1999); Ryan et al. (1999)
TRF1/PIN2	Mouse	mHP1 β (M31)	IF	nd	Netzer et al. (2001)
TAFII130	Human	hHP1 α , hHP1 γ	Y2H, exPD, transPD	CSD	Vassallo and Tanese (2002)
TIF1 α	Mouse	mHP1 α , mHP1 β , mHP1 γ	Y2H, rPD	CSD	Lechner et al. (2000); Nielsen et al. (1999)
mSNF2 β	Mouse	mHP1 α	Y2H	CSD	Lechner et al. (2000)
Rb	Human	hHP1 α , hHP1 γ	Y2H, exIP, exPD, ChIP	nd	Nielsen et al. (2001b); Williams and Graf (2000)
Rb	Maize	HP1 γ	Y2H, rPD	nd	Williams and Graf (2000)
Dnmt3a	Mouse	mHP1 α	IF	nd	Bachman et al. (2001)
Dnmt3b	Mouse	mHP1 α	IF	nd	Bachman et al. (2001)
ATRX/HP1-BP38	Mouse	mHP1 α , mHP1 β (M31)	Y2H, IF	CSD	Lechner et al. (2000); McDowell et al. (1999)
Pim-1	Human	hHP1 γ	Y2H, exIP, rPD	CSD	Koike et al. (2000)
CKII	<i>Drosophila</i>	HP1	<i>In vitro</i> phosphorylation	nd	Zhao and Eissenberg (1999)
dAF10	<i>Drosophila</i>	HP1	transPD	CSD	Linder et al. (2001)
MITR, HDAC4/5	Mouse	mHP1 α	exIP, rPD	Hinge	Zhang et al. (2002)
Replicació i reparació de l'ADN					
CAF-1 p150	Mouse	mHP1 α , mHP1 β (M31)	Y2H, rPD, IF, GFC, NMR	CSD	Brasher et al. 2000; Murzina et al. (1999)
CAF-1 p150	Human	hHP1 α	rPD	CSD	Lechner et al. (2000)
Ku70	Human	hHP1 α , hHP1 γ	Y2H, exIP, rPD	CSD	Lombard et al. (2006); Song et al. (2001)
BRCA-1	Human	hHP1 α	IF	nd	Maul et al. (1998)
ORC1-6	<i>Drosophila</i>	HP1	transIP	CD, CSD	Pak et al. (1997)
Xorc1	Xenopus	XHP1 α , XHP1 γ	Y2H	nd	Pak et al. (1997)
HOAP	<i>Drosophila</i>	HP1	IF, exIP	nd	Shareef et al. (2001)
SUUR	<i>Drosophila</i>	HP1	Y2H, rPD	CSD+Hinge	Ye and Worman (1996)
Arquitectura nuclear					
Lamin B receptor	Human	hHP1 α , hHP1 β , hHP1 γ	Y2H, exIP, exPD, rPD,	CSD	Lechner et al. (2000); Ye and Worman (1996); Ye et al. (1997)
HP1-BP84	Mouse	mHP1 α , mHP1 β (M31)	Y2H	CSD	Le Douarin et al. (1996)
Lamin B	Mouse	mHP1 β (M31)	BA	CD	Kourmouli et al. (2000)
LAP2 β	Mouse	mHP1 β (M31)	BA	CD	Kourmouli et al. (2000)
Nuclear envelope	Mouse	mHP1 α , mHP1 β , mHP1 γ	BA, IF	CD	Kourmouli et al. (2000)
Altres proteïnes associades als cromosomes					
Psc3	<i>S. pombe</i>	Swi6	Y2H, exPD, IF, ChIP	CD+Glu-rich	Nonaka et al. (2002)
DDP1	<i>Drosophila</i>	HP1	IF	nd	Cortes et al. (1999)
Arp4/dARP6	<i>Drosophila</i>	HP1	IF	nd	Frankel et al. (1997); Kato et al. (2001)
INCENP	Human	hHP1 α , hHP1 γ	Y2H, transPD	Hinge	Ainsztein et al. (1998)
Ki-67	Human	hHP1 α , hHP1 β , hHP1 γ	Y2H, exPD, IF, ChIP	CSD	Scholz et al. (2002)
SP100B	Human	hHP1 α , hHP1 β , hHP1 γ	Y2H, rPD, transPD, IF	CSD	Lechner et al. (2000); Lehming et al. (1998); Seeler et al. (1998)
Hsk1/CDC7	<i>S. pombe</i>	Swi6	exIP, IF	nd	Bailis et al. (2003)
RNA polymerase II	Human	hHP1 γ	exIP	nd	Vakoc et al. (2005)

Proteïna	Organisme	HP1 variant	Metodologia	Domini	Referències
HP3, HP4, HP5	<i>Drosophila</i>	HP1	Y2H, IF	nd	Greil et al. (2007)
Hip	<i>Drosophila</i>	HP1	Y2H, exIP, rPD, IF	CSD	Schwendemann et al. (2008)
PIWI	<i>Drosophila</i>	HP1a	Y2H, exIP, IF	CSD	Yin and Lin, (2007)
hMis12	Human	hHP1 α , hHP1 γ	exIP, IF	nd	Obuse et al. (2004)
MeCP2	Human	hHP1 γ	exIP, rPD, IF	CSD	Agarwal et al. (2007)
POF	<i>Drosophila</i>	HP1	IF	nd	Johansson et al. (2007); Tzeng et al. (2007)
STAT92E	<i>Drosophila</i>	HP1	exIP, rPD, IF	nd	Shi et al. (2006)
CTIP2	Human	hHP1 α	exIP, rPD, TransPD, IF	nd	Rohr et al. (2003)
BRG1	Human	hHP1 α	exIP, rPD, TransPD, IF	CSD	Nielsen et al. (2002)

Figura i25. Interaccions descrites de les proteïnes HP1.

Metodologia: BA, *binding assays*; ChIP, *chromatin immunoprecipitation*; exIP, *co-immunoprecipitation using extract*; exPD, *pull down using extract*; FAITC, *fluorescence anisotropy isothermal calorimetry*; FW, *far western*; GFC, *gel filtration chromatography*; IF, *immunofluorescence colocalitzation*; nd, *not determined*; rIP, *immunoprecipitation using recombinant proteins*; rPD, *pull down using recombinant proteins*; transIP, *immunoprecipitation using in vitro translated proteins*; transPD, *pull down using in vitro translated proteins*; SED, *sedimentation assay*; SPRA, *surface plasmon resonance analysis*; Y2H, *yeast two-hybrid assay*. Extret de (Kwon & Workman, 2008).

1.5. Les proteïnes HP1 de *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster conté cinc gens amb una estructura similar a la de la família HP1. L'HP1a o Su(var)2-5, fou la primera en identificar-se i és el prototipus de proteïna HP1, les propietats de la qual ja han estat comentades. Les altres proteïnes són anomenades HP1b, HP1c, HP1d(rhino) i HP1e. Les tres primeres (a, b i c) estan molt conservades al llarg de les diferents espècies de *Drosophila*. En canvi HP1d varia significativament en mida i composició tot i que estaria sota fortes pressions evolutives. Per altra banda, l'HP1e sembla que sigui el membre menys conservat ja que en alguna espècie estaria degenerat i en altres no estaria present. Tot i que els dominis estructurals estan conservats, hi ha diferències importants. La primera és l'absència de la cua amino-terminal en les isoformes b i c present en la resta. Una altra diferència és la varietat en la llargària del domini hinge, que és més petit en la isoforma c i més llarg en la d. L'última diferència important és la presència en les isoformes b i c d'una cua carboxi-terminal de llargària considerable, absent en la resta d'isoformes (Vermaak et al, 2005) (Fig.i26).

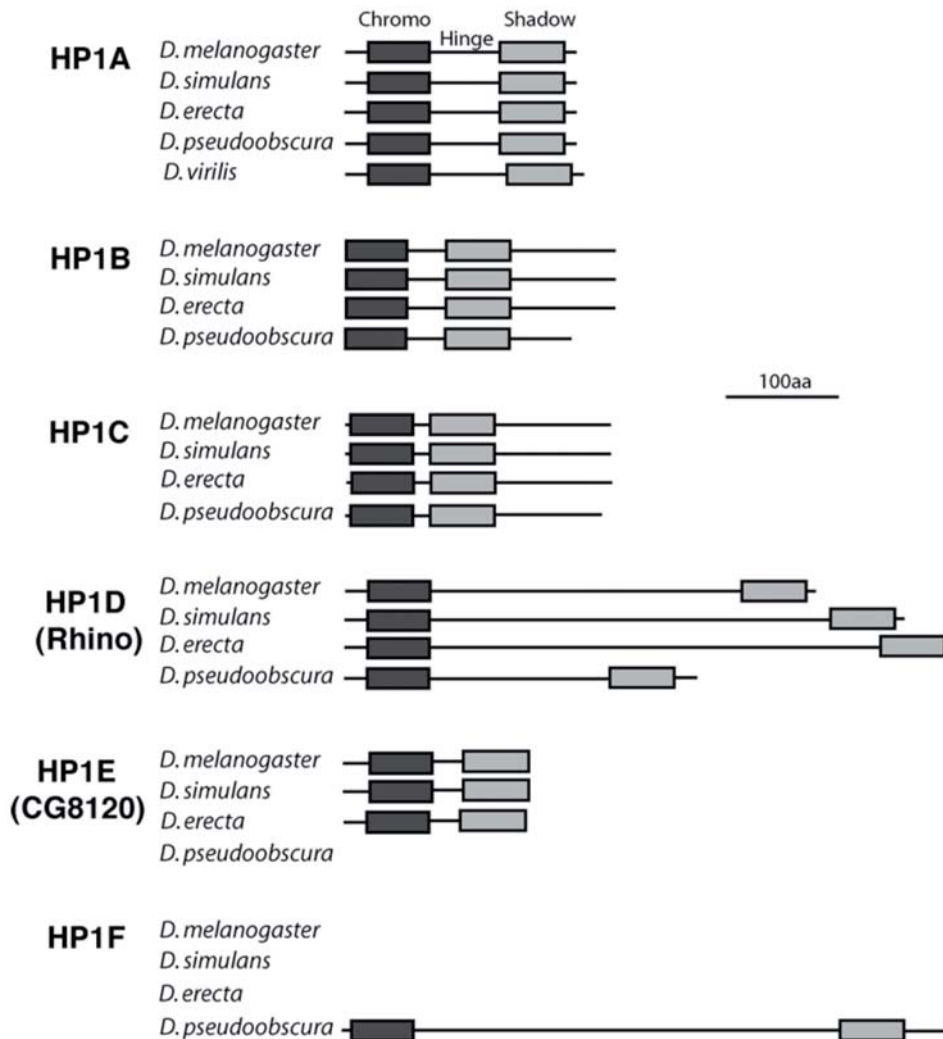


Figura i26. Els paràlegs d'HP1 a *Drosophila*.

Es mostren a escala les proteïnes HP1 de *Drosophila melanogaster* i els paràlegs de diferents espècies seleccionades. El rectangle negre correspon al cromodomini i el gris al cromodomini-shadow. Les regions amino i carboxi-terminals juntament amb els dominis *hinge* no presenten suficient similitud entre qualsevol parell fins i tot dins la mateixa espècie per a poder ésser alineades. Extret de (Vermaak et al, 2005).

Es tenen molt poques dades al voltant de les isoformes diferents d'HP1a de *Drosophila melanogaster*. Es sap que la localització d'HP1b i c és diferent a la d'HP1a. La isoforma b es localitza tant a l'heterocromatina com a la eucromatina i la isoforma c es localitza exclusivament a l'eucromatina (Smothers & Henikoff, 2001)(Fig.i27a). Experiments d'intercanvi de dominis entre a, b i c van determinar que la localització d'HP1c depèn exclusivament del

Introducció

seu cromodomini-shadow (Smothers & Henikoff, 2001). HP1d només s'expressa en la línia germinal femenina. Els mutants presenten defectes en els apèndixs dorsals de la closca de l'ou i també problemes en l'estructura de la cromatina en les *nurse cells* (Volpe et al, 2001). La proteïna marcada expressada en un cultiu cel·lular es concentra en diferents agrupacions dins de les regions heterocromàtiques (Vermaak et al, 2005)(Fig.i27b). Pel que fa a HP1e només se sap que s'expressa exclusivament a la línia germinal masculina.

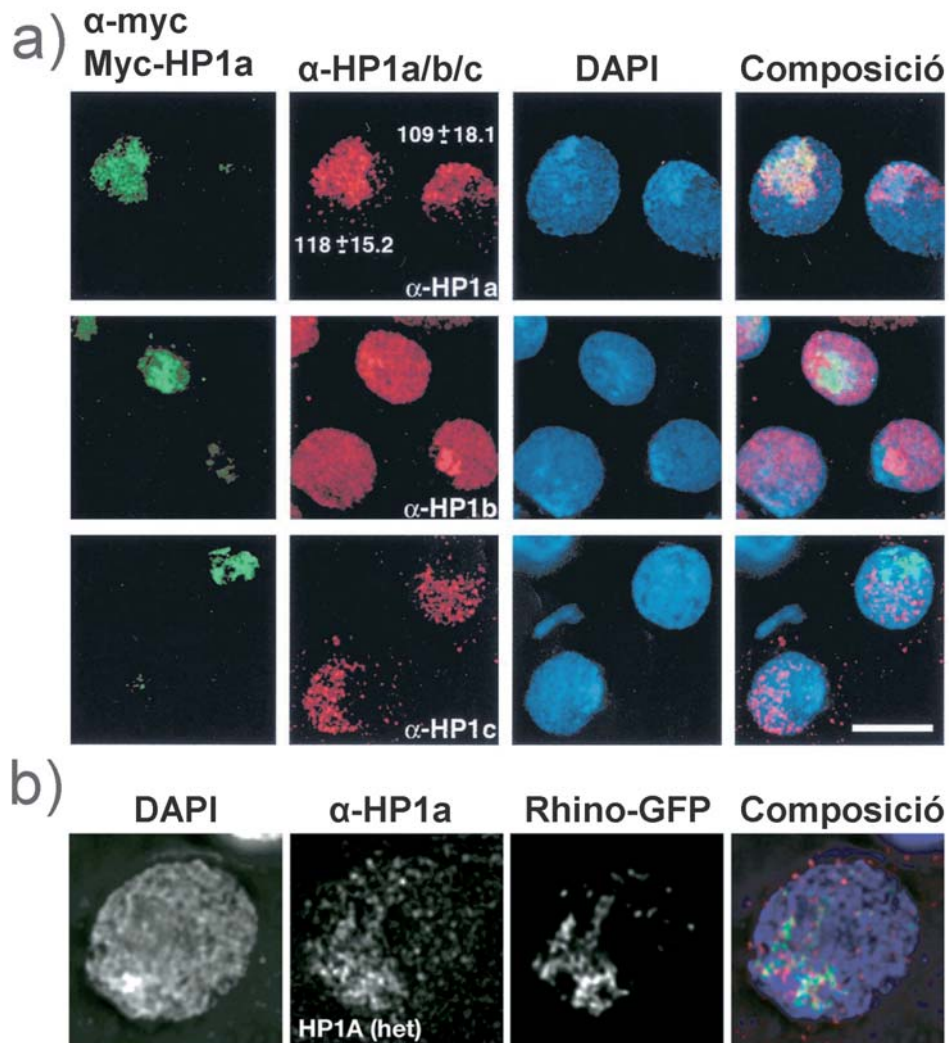


Figura i27. Distribució nuclear de les proteïnes HP1 de *Drosophila melanogaster*.

a) Immunolocalitzacions a cèl·lules SL2 amb un anticòs contra myc per detectar la proteïna HP1a transfectada i a la vegada les tres proteïnes endògenes amb anticossos específics per cadascuna d'elles. Extret de (Smothers & Henikoff, 2001) b) Distribució nuclear de la proteïna Rhino fusionada a FP. S'utilitza la localització de l'HP1a per tal de localitzar l'heterocromatina. Extret de (Vermaak et al, 2005).

2. OBJECTIUS

La diferència en el patró de localització de les proteïnes HP1 de *Drosophila melanogaster*, sobretot els de l'HP1a i HP1c, que presenten una distribució pràcticament excloent, ens resultà interessant per tal d'aprofundir en els mecanismes de localització i en la funcionalitat dels suposats descodificadors del codi de les histones. Teòricament en aquest cas tenim una modificació, la metilació de l'H3K9, i tres possibles descodificadors: les HP1a, b i c. Per tant, ens vam proposar per aquest projecte de tesi:

- 1- Analitzar els mecanismes de localització i unió a la cromatina de l'HP1c i especialment la possible contribució de la metilació de l'H3K9 en la distribució cromosòmica d'aquesta.
- 2- Analitzar funcionalment l'HP1c per tal d'escatir si la diferent localització genòmica reflecteix una funció diferent a les conegudes per l'HP1a o bé realitza la mateixa funció, però en regions diferents.

3. RESULTATS

3.1. CAPÍTOL 1

3.1.1. PUBLICACIÓ:

Drosophila HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression.

ARTICLE:

Títol

Drosophila HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression.

AUTORS (ANY)

Joan Font-Burgada, David Rossell, Herbert Auer i Ferran Azorín (2008)

RESUM

Les proteïnes HP1 (Heterocromatin protein 1) estan conservades als eucariotes, on la majoria de les espècies contenen varies isoformes. A partir de les propietats de l'HP1a de *Drosophila*, s'ha proposat que les proteïnes HP1 uneixen la metilació de l'H3K9 i recluten factors involucrats en l'ensamblatge de l'heterocromatina i el silenciament. No se sap, però, si aquest model és aplicable a totes les isoformes d'HP1 i tots el contextos funcionals. En aquest article aportem que l'HP1c regula l'expressió gènica, ja que (1) localitza a dominis de cromatina activa, on colocalitza abastament amb la forma pausada de la RNA polimerasa II (RNAPolII), PolII^{ser5}, i amb la trimetilació de l'H3K4, suggerint una contribució a la regulació transcripcional; (2) la seva localització ectòpica a un gen reporter no indueix el seu silenciament, ans el contrari, incrementa la seva expressió, i (3) interacciona amb dues proteïnes que contenen varis Zn-fingers, WOC (without children) i ROW (Relative of WOC, que són putatius factors de transcripció. També mostrem que tot i que l'HP1c s'uneix eficientment a la metilació de l'H3K9 *in vitro*, la seva unió a la cromatina *in vivo* depèn estrictament de WOC i ROW. A més a més, les anàlisis d'expressió realitzades indiquen que HP1c, WOC i ROW regulen un programa d'expressió gènica comú, el qual és executat en part, en el context del sistema nerviós. A partir d'aquestes dades, que revelen la contribució de factors que uneixen ADN a la funcionalitat i el reclutament de l'HP1c, les proteïnes HP1 emergeixen com una família de proteïnes reguladores de la cromatina cada cop més diversa.

APORTACIÓ PERSONAL AL TREBALL

Tots els experiments presentats en aquest treball han estat duts a terme per en Joan Font Burgada, excepte els arrays d'expressió que es van realitzar en col·laboració amb el Dr. Herbert Auer; així com també les anàlisis estadístiques de les dades generades en col·laboració amb el Dr. David Rossell.

INFORME DEL DIRECTOR

En Joan Font Burgada ha dut a terme la totalitat dels experiments recollits en aquesta publicació, incloent-hi l'anàlisi de la contribució de WOC/ROW/HP1c a l'expressió gènica, que va realitzar en estreta col·laboració amb en David Rossell i en Herbert Auer. Tanmateix, en Joan Font Burgada ha tingut un paper molt important en el disseny experimental i desenvolupament conceptual d'aquest treball. Els resultats obtinguts per en Joan són de notable interès i novetat doncs estableixen un nou marc funcional per les proteïnes de la família HP1, com a reguladors generals de l'estructura i funcionalitat de la cromatina, i tenen importants implicacions per la comprensió dels mecanismes epigenètics de regulació de les funcions genòmiques.

Signat,

Dr. Ferran Azorín i Marín

Drosophila HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression

Joan Font-Burgada,¹ David Rossell,² Herbert Auer,³ and Fernando Azorín^{1,4}

¹Institute of Molecular Biology of Barcelona, CSIC, and Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; ²Bioinformatics and Biostatistics Unit, Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; ³Functional Genomics Unit, Institute for Research in Biomedicine, IRB Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

Heterochromatin protein 1 (HP1) proteins are conserved in eukaryotes, with most species containing several isoforms. Based on the properties of *Drosophila* HP1a, it was proposed that HP1s bind H3K9me_{2,3} and recruit factors involved in heterochromatin assembly and silencing. Yet, it is unclear whether this general picture applies to all HP1 isoforms and functional contexts. Here, we report that *Drosophila* HP1c regulates gene expression, as (1) it localizes to active chromatin domains, where it extensively colocalizes with the poised form of RNA polymerase II (RNAPol II), Pol II^o^{ser5}, and H3K4me₃, suggesting a contribution to transcriptional regulation; (2) its targeting to a reporter gene does not induce silencing but, on the contrary, increases its expression, and (3) it interacts with the zinc-finger proteins WOC (without children) and Relative-of-WOC (ROW), which are putative transcription factors. Here, we also show that, although HP1c efficiently binds H3K9me_{2,3} in vitro, its binding to chromatin strictly depends on both WOC and ROW. Moreover, expression profiling indicates that HP1c, WOC, and ROW regulate a common gene expression program that, in part, is executed in the context of the nervous system. From this study, which unveils the essential contribution of DNA-binding proteins to HP1c functionality and recruitment, HP1 proteins emerge as an increasingly diverse family of chromatin regulators.

[Keywords: HP1; WOC; ROW/CG8092; chromatin; *Drosophila*]

Supplemental material is available at <http://www.genesdev.org>.

Received March 31, 2008; revised version accepted August 26, 2008.

The contribution of chromatin to the regulation of genomic functions is well established. Most frequently, regulation by chromatin involves the establishment of specific patterns of post-translational histone modifications, which result in recruitment of regulatory nonhistone proteins (Ruthenburg et al. 2007). Heterochromatin protein 1 (HP1) constitutes one of the best-studied examples (Hiragami and Festenstein 2005; Hediger and Gasser 2006; Lomberg et al. 2006), where a regulatory nonhistone protein is recruited to chromatin through the recognition of a specific histone modification, di- or trimethylation of Lys 9 on the histone H3 tail (H3K9me_{2,3}). This interaction, which involves the N-terminal chromodomain of HP1, is known to play a fundamental role in the formation and maintenance of heterochromatic domains.

Except in budding yeast, HP1 is widely conserved in eukaryotes, with most species containing several isoforms (Hiragami and Festenstein 2005; Lomberg et al. 2006). HP1 proteins are characterized by a common structural organization consisting of two conserved domains, the N-terminal chromodomain and the C-terminal chromo-shadow domain, which are spaced by a variable nonconserved hinge domain. The existence of multiple isoforms suggests functional specialization, with different isoforms playing different functions. For instance, in *Drosophila*, three of the five HP1 isoforms (HP1a, HP1b, and HP1c) are ubiquitously expressed, while the other two (HP1d/Rhino and HP1e) are predominantly expressed in the germline (Vermaak et al. 2005). Moreover, ubiquitously expressed HP1 isoforms show differential chromosomal distributions, as HP1a is mainly associated to heterochromatin, while HP1c is excluded from centromeric heterochromatin and HP1b is found both at euchromatic and heterochromatic domains (Smothers and Henikoff 2001). A similar situation is observed in mammals, where the patterns of localiza-

⁴Corresponding author.

E-MAIL fammbc@ibmb.csic.es; FAX 3493-4034979.

Article is online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.481408>.

tion of the three HP1 isoforms (HP1 α , HP1 β , and HP1 γ) overlap only partially and show differential dynamics during differentiation and cell cycle progression (Minc et al. 1999; Hayakawa et al. 2003; Dialynas et al. 2007). On the other hand, in the nematode *Caenorhabditis elegans*, two HP1 isoforms exist (HPL1 and HPL2), showing preferential euchromatic association, partially nonoverlapping expression and localization patterns, and distinct mutant phenotypes (Coustham et al. 2006; Schott et al. 2006). Interestingly, the only HP1 protein (TLF2/LHP1) of *Arabidopsis thaliana* appears to localize exclusively to euchromatin, where it colocalizes with H3K27me3 (Nakahigashi et al. 2005).

The molecular mechanisms that determine the differential distribution of the various HP1 isoforms, and their differential functional properties, remain largely unknown. Most of our knowledge about the mechanisms of action of HP1 proteins derives from studies addressing the functional properties of *Drosophila* HP1a or mammalian HP1 α . From these studies, a general picture emerges by which, through the chromodomain, HP1 proteins bind chromatin regions enriched in H3K9me2,3 while, through the chromo-shadow domain, recruiting different factors resulting in various functional outcomes; namely, heterochromatin assembly and gene silencing (Hiragami and Festenstein 2005; Hediger and Gasser 2006; Lomber et al. 2006). It is uncertain whether this general picture applies to all HP1 proteins and possible scenarios. Actually, *Drosophila* HP1a is known to play a more complex role(s) in the regulation of gene expression, as it is required for the expression of several heterochromatic genes (Hearn et al. 1991; Clegg et al. 1998; Lu et al. 2000), and certain euchromatic genes (Cryderman et al. 2005; De Lucia et al. 2005). Moreover, *Drosophila* HP1a is recruited to developmentally regulated genes and heat-shock-induced puffs in an RNA-dependent manner (Piacentini et al. 2003), and in an erythroid cell line, murine HP1 γ was found associated to actively transcribed genes (Vakoc et al. 2005).

In this study, we report on the functional characterization of HP1c, a *Drosophila* HP1 protein of largely unknown properties. Our results show that HP1c extensively colocalizes with poised RNA polymerase II (RNAPol II) and H3K4me3, a modification that correlates with active chromatin domains (Bernstein et al. 2005; Barski et al. 2007; Heintzman et al. 2007). Moreover, targeting HP1c to a reporter construct does not induce silencing but, on the contrary, results in increased expression of the reporter gene. Here, we also report on the interaction of HP1c with the zinc-finger proteins WOC (without children) (Wismar et al. 2000; Warren et al. 2001), and Relative-of-WOC (ROW), which are putative transcription factors. HP1c efficiently binds H3K9me2,3 in vitro, but its binding to chromatin strictly depends on both WOC and ROW. Moreover, expression profiling indicates that HP1c, WOC, and ROW extensively cooperate to regulate gene expression, especially in the context of the nervous system. These results unveil the essential contribution of sequence-specific

DNA-binding proteins to functionality of HP1c and its recruitment to chromatin.

Results

HP1c localizes to active chromatin domains

HP1c localization was determined both in cultured S2 cells and polytene chromosomes. In interphase S2 cells, heterochromatin regions, which are enriched in H3K9me2,3, show strong colocalization with HP1a (Fig. 1A) but very poor staining with α HP1c antibodies (Fig. 1B), indicating that HP1c preferentially localizes to euchromatin being mostly excluded from heterochromatin. Similar results were reported earlier by others (Smothers and Henikoff 2001). Similarly, in polytene chromosomes, HP1a and HP1c also show drastically different patterns of localization, as HP1a localizes to the heterochromatic chromocentre (Fig. 1C) while HP1c is exclusively found at the euchromatic chromosome arms (Fig. 1D). In addition to the chromocentre, HP1a is known to localize to a number of euchromatic sites (Fanti et al. 2003), where it shows no significant colocalization with HP1c (data not shown). These results indicate that, despite their strong similarity, HP1a and HP1c show mutually exclusive patterns of chromosomal distribution.

HP1c localization is restricted to interbands (Fig. 1E), which correspond to gene-rich regions that stain poorly with DAPI, suggesting a contribution to the regulation of gene expression. To analyze the potential contribution of HP1c to gene regulation, we determined the extent of colocalization of HP1c with different histone modifications that correlate with either gene silencing, H3K9me3 and H3K27me3, or activation, H3K4me3 and H3K36me3 (Fig. 2). HP1c shows partial colocalization with H3K9me3 (Fig. 2A). Approximately, 50% of HP1c bands colocalize with H3K9me3, and most frequently, intense HP1c bands show no significant α H3K9me3 reactivity. On the other hand, colocalization with H3K27me3 is only very scarce (Fig. 2B). In contrast, HP1c shows a strong colocalization with H3K4me3 (Fig. 2C), suggesting that HP1c might be involved in transcriptional regulation. Consistent with this hypothesis, HP1c strongly colocalizes with RNAPol II (Fig. 3). Colocalization with the poised form of RNAPol II phosphorylated at Ser 5, Pol Ilo^{ser5}, is most extensive, as the majority of bands positive for α HP1c are also positive for α Pol Ilo^{ser5} (Fig. 3B). On the other hand, colocalization with the elongating form of RNAPol II phosphorylated at Ser 2, Pol Ilo^{ser2}, is much weaker (Fig. 3C), suggesting that HP1c participates at the initial stages of transcription regulation rather than during elongation. Consistent with this hypothesis, HP1c shows only a weak colocalization with H3K36me3 (Fig. 2D), a modification that occurs during elongation and extends all through transcribed regions (Krogan et al. 2003; Bell et al. 2008).

To further analyze the contribution of HP1c to gene expression, we determined the effects of targeting HP1c to a reporter construct (Fig. 4). In these experiments, we

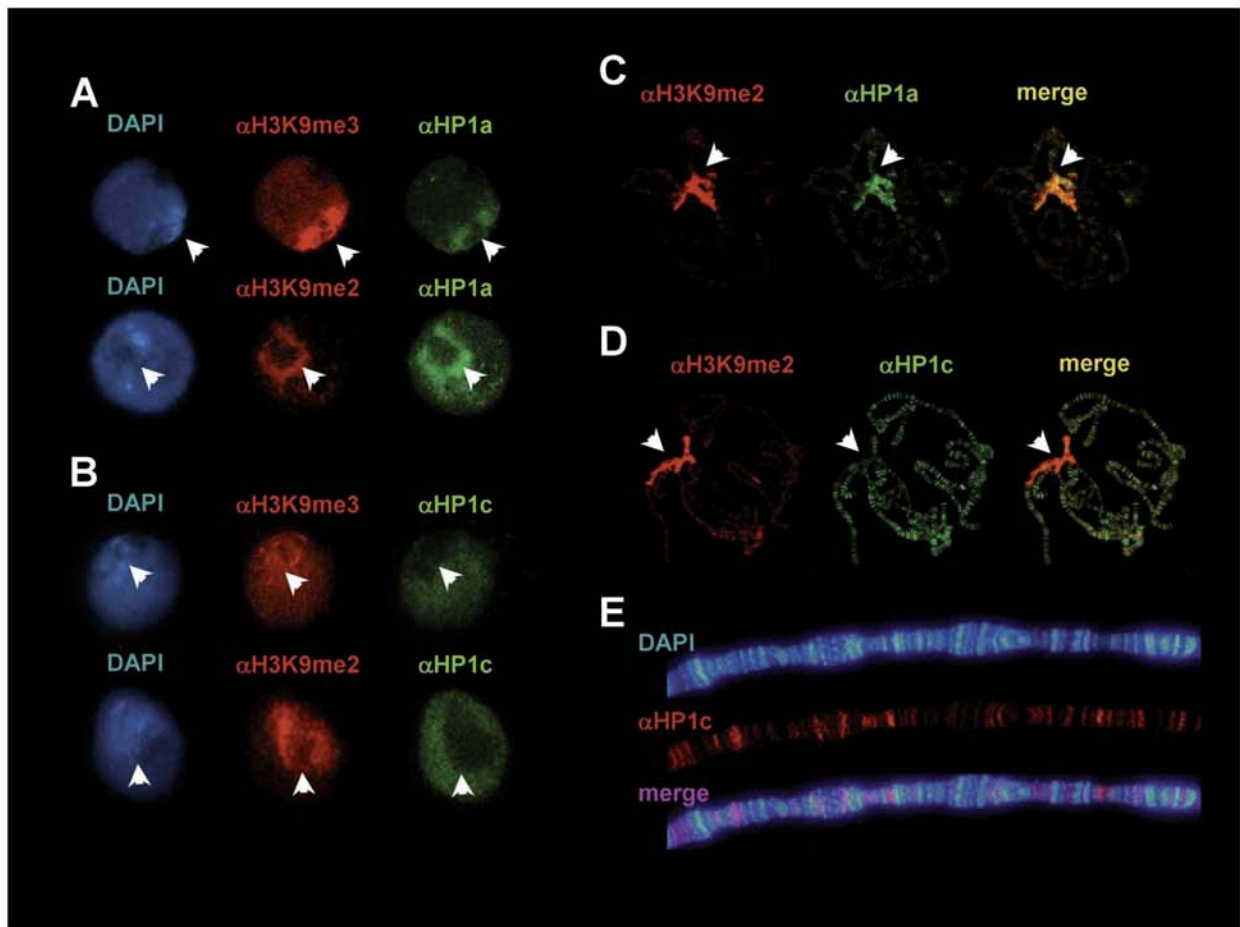


Figure 1. HP1c localizes to multiple euchromatic sites. The patterns of immunolocalization of HP1a (A,C) and HP1c (B,D), in S2 cells (A,B) and polytene chromosomes (C,D), are shown (in green). Arrows indicate the position of the heterochromatic chromocentre determined by staining with α H3K9me3 and/or α H3K9me2 (in red). (E) The pattern of immunolocalization of HP1c (in red) is presented at a higher magnification to show its localization to interbands. DNA was stained with DAPI (in blue).

took advantage of transgenic flies carrying a reporter *white* transgene containing multiple binding sites for the lacI repressor at the regulatory region (Li et al. 2003). Lines S9.2 and 157.1 were used, which contain 46 and 256 lacI-repeats respectively. In these lines, expression of fused proteins carrying the lacI-DNA-binding domain results in their targeting to the reporter gene. Previous studies showed that, in general, targeting HP1 proteins to a reporter gene induces silencing (Ayyanathan et al. 2003; Li et al. 2003; Verschure et al. 2005; Smallwood et al. 2007). Actually, in line S9.2, expression of HP1a-lacI results in silencing of the reporter gene, which is stronger in males (Fig. 4A). Similar results were reported earlier by others (Li et al. 2003). Expression of HP1b-lacI also induces silencing of the reporter gene, but in contrast, expression of HP1c-lacI does not (Fig. 4A). On the contrary, a slightly increased expression of the reporter *white* gene is observed. These results were confirmed when HP1c-lacI was expressed in line 157.1, which is more suitable to detect activating effects, as background

expression of the reporter gene is low. As shown in Figure 4B, *white* expression is increased in flies expressing HP1c-lacI. In these experiments, expression of the fused proteins was driven by the *hsp70*-promoter and, therefore, was induced by repeated heat-shock treatments. The observed activation of the reporter gene is specific of HP1c, as no effect is observed in the absence of heat shock (Fig. 4B) or in flies expressing the lacI-DNA-binding domain alone (Fig. 4A,B).

HP1c interacts with the zinc-finger proteins WOC and ROW

Altogether, the results reported above strongly suggest that *Drosophila* HP1c contributes to transcriptional regulation. Next, we asked about the molecular basis of this contribution. To address this question, multiprotein complexes containing HP1c were purified to identify interacting factors that could account for its functional properties. For this purpose, stable S2-cell lines express-

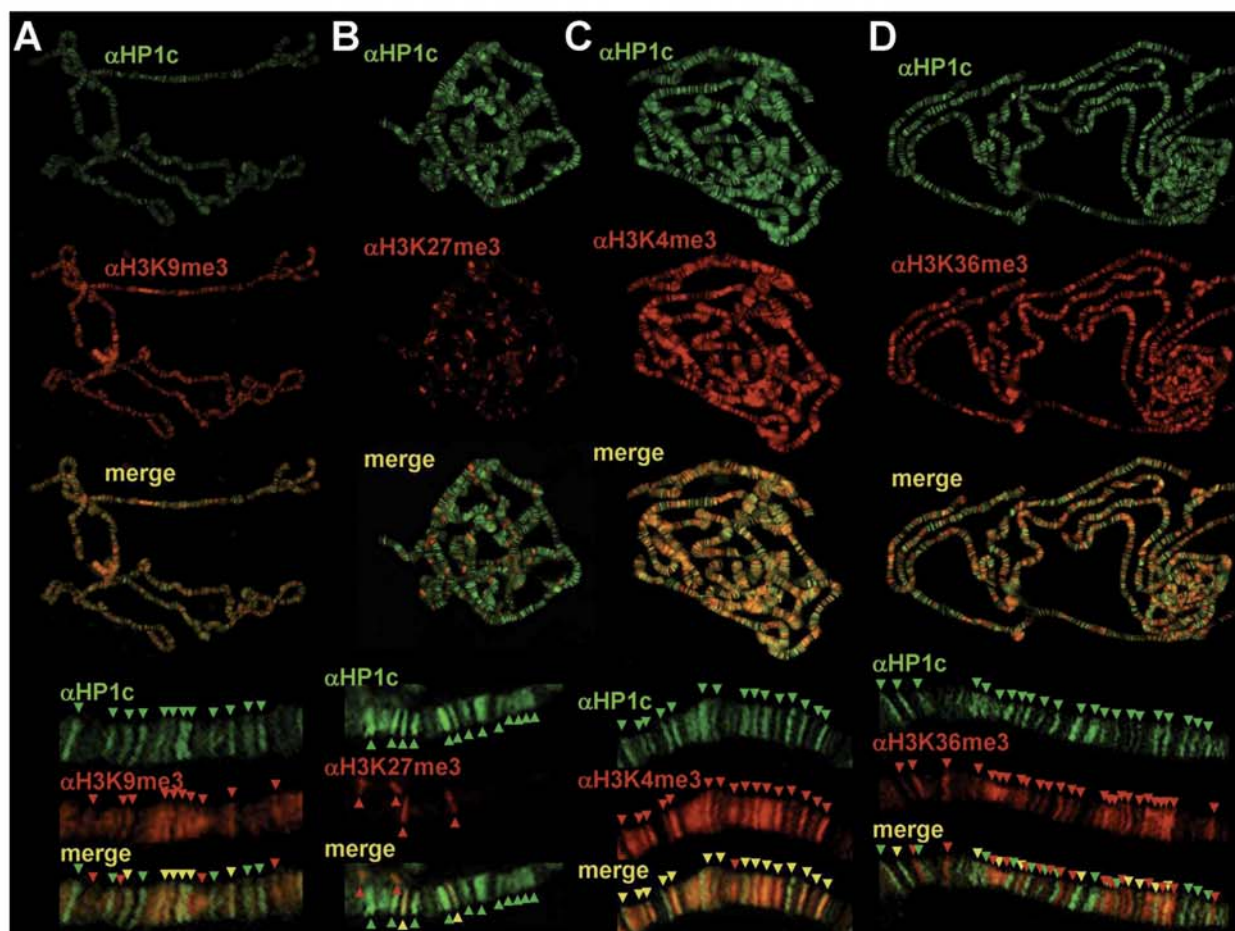


Figure 2. HP1c localizes to active chromatin domains. The extent of colocalization of HP1c (in green) and H3K9me3 (A), H3K27me3 (B), H3K4me3 (C), and H3K36me3 (D) (in red), is determined in polytene chromosomes. Enlarged images are shown at the bottom of each panel. Arrows indicate distinct α HP1c (green) and α H3K9me3, α H3K27me3, α H3K4me3, and α H3K36me3 (red) signals. Yellow arrows indicate colocalization.

ing a TAP-HP1c fusion protein were obtained. Purified complexes contain, in addition to HP1c-TAP, a major band of high molecular weight (Fig. 5A, lane HP1c-TAP), which is absent in mock purifications performed from cells expressing the TAP domain alone (Fig. 5A, lane TAP). A few additional weak bands of lower molecular weight are also observed. Next, we proceeded to identification of the high-molecular-weight band mentioned above. LC/MS analysis provided two major hits—WOC (Mascot score of 1031, with 24 identified peptides corresponding to 11% sequence coverage) (Wisnar et al. 2000; Warren et al. 2001), and CG8092, which we propose to name Relative-of-WOC (ROW) (Mascot score of 1239, with 66 identified peptides corresponding to 30% sequence coverage) (Supplemental Tables S1, S2). A few other polypeptides were also identified but with much lower scores. Domain structure and organization strongly suggest that both WOC and ROW are transcription factors (Fig. 5B), as they contain multiple zinc-finger and AT-hook domains for sequence-specific DNA bind-

ing and, in addition, ROW contains a C-terminal domain that, enriched in glutamine (Q) residues, resembles transactivation domains of some transcription factors (Triezenberg 1995). WOC is homologous to three human zinc-finger proteins: DXS6673E/ZNF261 (van der Maarel et al. 1996), ZNF198/FIM/RAMP (Popovici et al. 1998; Xiao et al. 1998), and ZNF262 (Sohal et al. 1999). Most remarkably, the C-terminal domain (~300 amino acids) is highly conserved in the three human proteins as well as in WOC. On the other hand, ROW shows no significant homology with any known protein.

Coimmunoprecipitation experiments confirmed the interaction between HP1c, WOC, and ROW, as immunoprecipitation with α WOC antibodies results in quantitative coprecipitation of both HP1c and ROW (Fig. 5C). No coimmunoprecipitation of HP1c and ROW was observed when the extracts were treated with unrelated antibodies (α DDP1) or when no antibodies were added. Moreover, addition of α WOC antibodies does not result in coprecipitation of HP1a (Fig. 5C). Consistent with

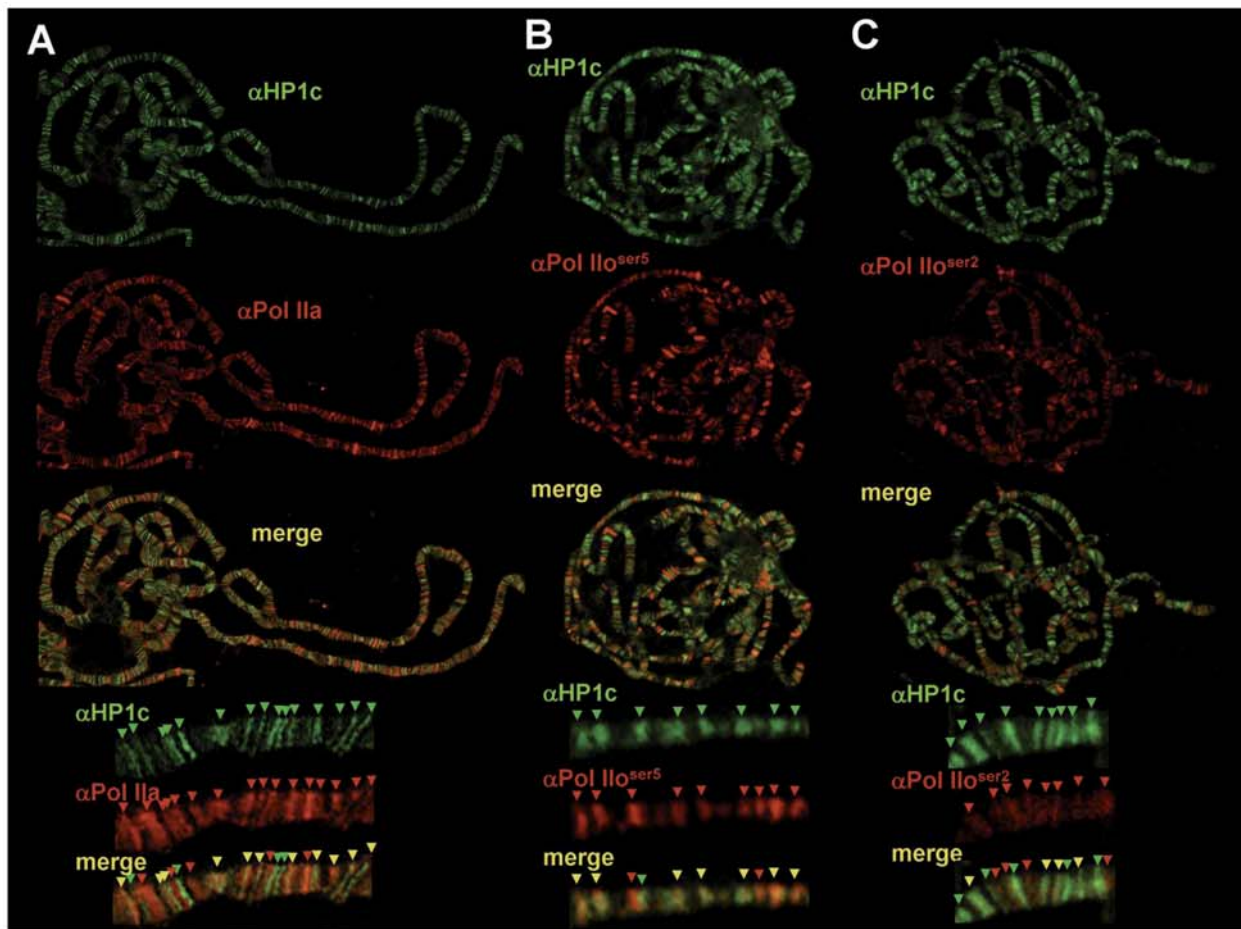


Figure 3. HP1c colocalizes with the poised form of RNAPol II, Pol Ilo^{ser5}. The extent of colocalization of HP1c (in green) and unphosphorylated RNAPol II (A), Pol Ilo^{ser5} (B), and Pol Ilo^{ser2} (C) (in red), is determined in polytene chromosomes. Enlarged images are shown at the bottom of each panel. Arrows indicate distinct αHP1c (green) and αRNAPol IIa, α Pol Ilo^{ser5}, and α Pol Ilo^{ser2} (red) signals. Yellow arrows indicate colocalization.

these results, both HP1c and ROW show the most extensive colocalization with WOC, with virtually all bands positive for αHP1c and αROW being also positive for αWOC and vice versa (Fig. 6A,B). In addition, targeting HP1c-lacI to the lacI-repeats of line 157.1 results in ectopic recruitment of both WOC and ROW, as additional αWOC and αROW signals are detected at the position corresponding to the lacI-repeats (Fig. 6C,D). No such recruitment is observed in flies expressing the lacI-DNA-binding domain alone (Fig. 6C,D).

WOC and ROW mediate chromosomal association of HP1c

The results discussed above indicate that HP1c interacts with the zinc-finger proteins WOC and ROW, which are likely to bind DNA sequences specifically. Therefore, it is possible that binding of HP1c to chromatin is mediated by WOC and ROW. To test this hypothesis, we analyzed chromosomal association of HP1c in *woc* and

row mutants. For this purpose, we used *woc*^{RNAi} and *row*^{RNAi} knockdown transgenic flies, which carry a UAS_{GAL4} construct expressing a synthetic hairpin from the coding region of either *woc* or *row* that, upon crossing with flies expressing GAL4, generates siRNAs to silence expression of the corresponding gene. *woc*^{RNAi} and *row*^{RNAi} show strong silencing of the corresponding gene when crossed to flies carrying a ubiquitous *Actin5C*-GAL4 driver, so that, at the third-instar larvae stage, corresponding mRNA levels are reduced to ~40% of those observed in control larvae (Supplemental Fig. S1A,B). Under these conditions, both mutations show high lethality at the pupae stage, which is stronger in *woc*^{RNAi}.

Chromosomal association of HP1c is strongly compromised in *woc*^{RNAi} and *row*^{RNAi} mutant polytene chromosomes (Fig. 7A). In these experiments, depletion of WOC and ROW was induced in salivary glands by crossing *woc*^{RNAi} and *row*^{RNAi} lines to a *lino*-GAL4 line, where the *limbo* promoter drives GAL4 expression. Mutant salivary glands were then mixed and squashed together

Resultats

Font-Burgada et al.

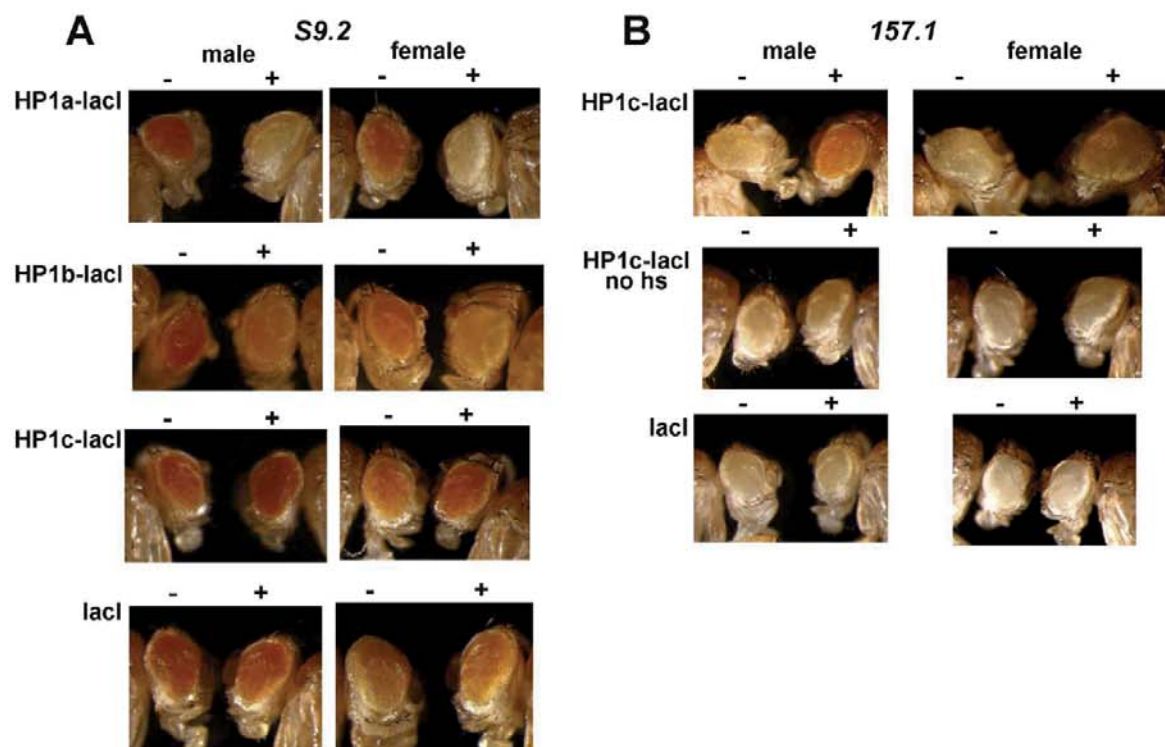
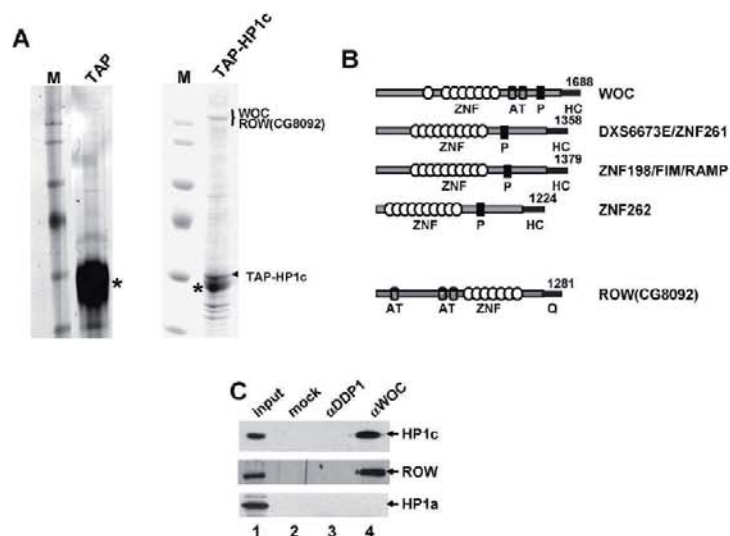


Figure 4. Targeting HP1c to a reporter *white* transgene increases its expression. (A) The eye phenotype of S9.2 flies expressing the indicated fused proteins (+) is compared with that of siblings where no fused protein is expressed (-). Expression was induced by heat-shock treatment. (B) Similar experiments as in A, but performed in 157.1 flies. Results are presented when expression of HP1c-lacI was induced by heat shock (*top*) and when no heat-shock treatment was applied (*middle*).

with glands prepared from control wild-type larvae, which carry a UAS_{GAL4}-H2B::GFP construct and, therefore, incorporate H2B-GFP in polytene chromosomes. In

this way, mutant and control polytene chromosomes, which are identified by their staining with α GFP antibodies, are immunostained and observed under exactly

Figure 5. HP1c interacts with WOC and ROW. (A, lane TAP-HP1c) Multiprotein complexes containing TAP-HP1c were purified and analyzed by SDS-PAGE. Lane TAP corresponds to a mock purification performed from cells expressing the TAP domain alone. Lanes M correspond to molecular-weight markers. The position of the high-molecular-weight band that, as shown by LC/MS analysis, corresponds to WOC and ROW is indicated. The position of the TAP-HP1c bait is also indicated. Bands labeled with an asterisk correspond to IgGs. (B) Structural organization of WOC, ROW, and the three human homologs of WOC (DXS6673E/ZNF261, ZNF198/FIM/RAMP, and ZNF262). The positions of the zinc-finger (ZNF) and AT-hook domains (AT) are indicated. P indicates a proline-rich repeat conserved in WOC and its human homologs. HC corresponds to the highly conserved C-terminal domain present in WOC and its human homologs. Q corresponds to the C-terminal glutamine (Q)-rich domain present in ROW. (C) HP1c and ROW coimmunoprecipitate with WOC. Nuclear extracts were subjected to immunoprecipitation with α WOC antibodies (lane 4) or with control α DDP1 antibodies (lane 3), and analyzed by Western-blot using α HP1c (*top*), α ROW (*middle*), and α HP1a antibodies (*bottom*). Lane 2 corresponds to a mock immunoprecipitation where no antibodies were added. Lane 1 corresponds to 10% of the input material used for immunoprecipitation.



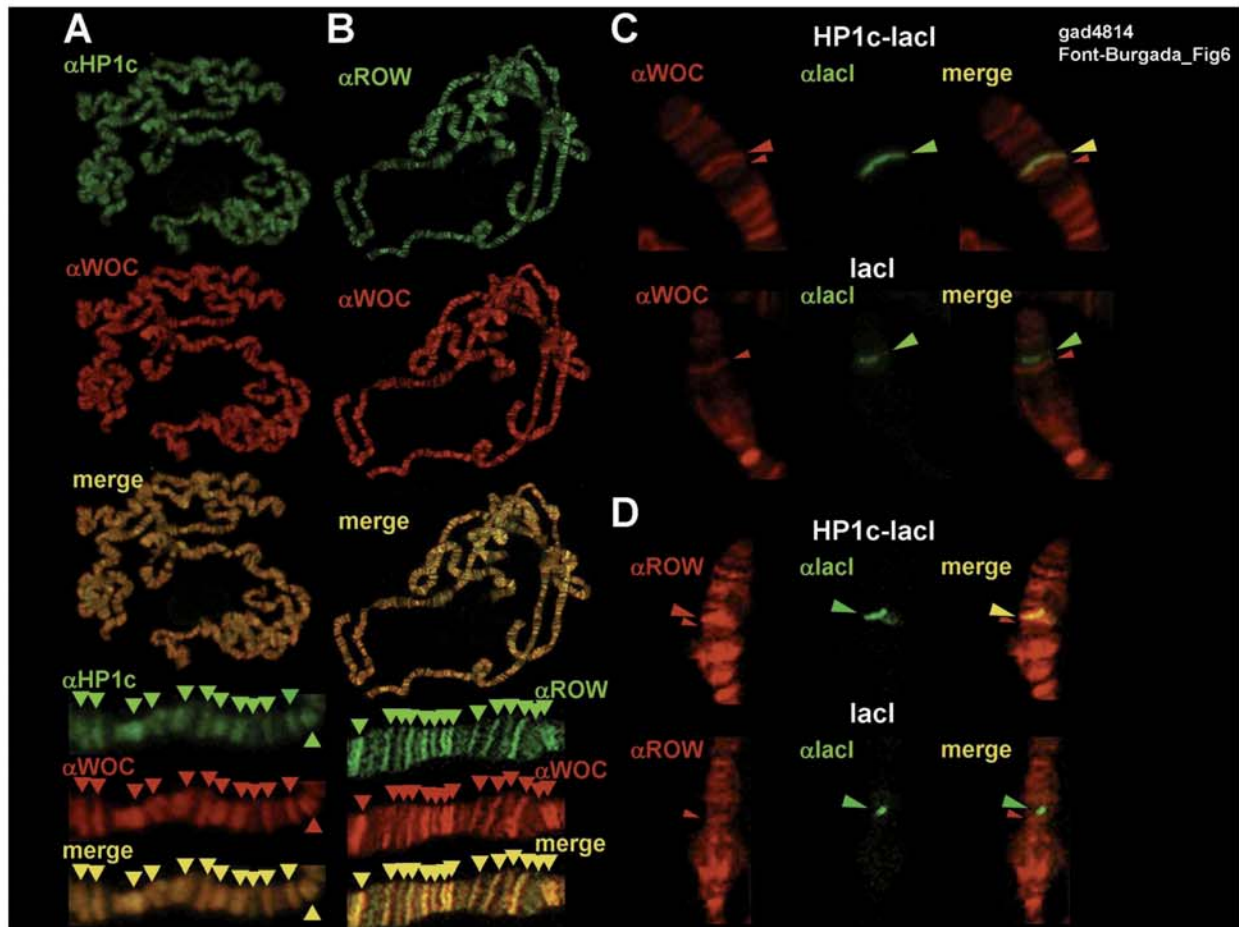


Figure 6. HP1c and ROW colocalize with WOC. (A,B) The extent of colocalization of WOC (in red) with HP1c (A) and ROW (B) (in green) is presented. Enlarged images are shown at the *bottom*. Arrows indicate distinct α HP1c (green), α ROW (green), and α WOC (red) signals. Yellow arrows indicate colocalization. (C,D) Targeting of HP1c-lacI to the lacI insertion of *157.1* flies results in ectopic recruitment of WOC (C) and ROW (D). The patterns of immunolocalization of WOC and ROW (in red) are presented at the region of the lacI insertion in flies expressing HP1c-lacI (panel HP1c-lacI) and lacI alone (panel lacI). The patterns obtained with α lacI antibodies (in green) are also presented. Big arrows indicate the position of the α lacI signal, marking the position of the lacI insertion that colocalizes with additional α WOC and α ROW signals when HP1c-lacI is expressed. Small arrows indicate the position of an endogenous α WOC/ α ROW signal, which does not colocalize with any α lacI signal.

the same experimental conditions. As shown in Figure 7A, *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* mutant chromosomes show highly reduced reactivity with α HP1c antibodies while control polytenes show strong α HP1c reactivity, strongly suggesting that both WOC and ROW are required for binding of HP1c to chromatin.

Lack of HP1c observed in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* polytene chromosomes could also reflect a contribution to synthesis, and/or stability, of HP1c. To address this question, *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* lines were crossed to a *ptc*-GAL4 line, where GAL4 expression is driven by the *patched* promoter that, in the wing disc, is specifically active at the anterior/posterior (A/P)-boundary. Therefore, in these experiments, depletion of WOC and ROW was specifically induced at the A/P-boundary in the wing disc. Under these conditions, *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* mutant cells of the A/P-boundary show reduced HP1c levels

(Fig. 8A). It must be noticed, however, that a much stronger effect is observed when similar experiments are performed in an *hp1c^{RNAi}* mutant background (Fig. 8A), where depletion of HP1c is most efficient (Fig. 8C; Supplemental Fig. S1C). No effect is detected in a control *hp1a^{RNAi}* line (Fig. 8A). Similar results were obtained when WOC and ROW were depleted ubiquitously, by crossing *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* to an *Actin5C*-GAL4 line, and the effects on HP1c levels determined by Western-blot (Fig. 8B). Under these circumstances, depletion of WOC and ROW results in a moderate decrease of HP1c. On the other hand, HP1c mRNA levels are only slightly reduced in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* (Fig. 8C), strongly suggesting that reduced HP1c protein levels observed in the mutants reflects destabilization of the protein due, most likely, to its inability to bind chromatin. Similar effects were reported for HP1a and Polycomb (PC), when their

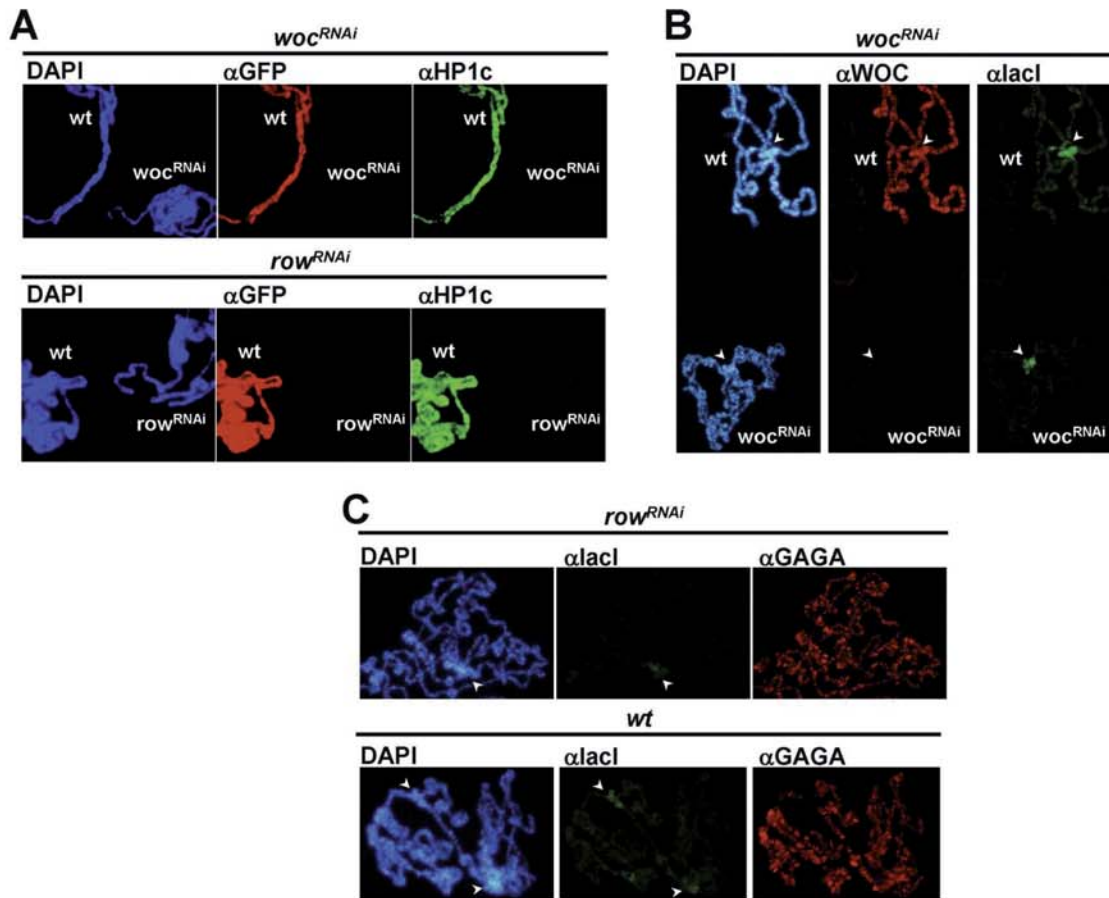


Figure 7. Binding of HP1c to chromatin is mediated by WOC and ROW. (A) The pattern of immunolocalization of HP1c (in green) is presented in polytene chromosomes obtained from *woc^{RNAi}*; *lio-GAL4* (panel *woc^{RNAi}*) and *row^{RNAi}*; *lio-GAL4* mutant larvae (panel *row^{RNAi}*). Polytene chromosomes obtained from control *UAS_{GAL4}-H2B::GFP*; *lio-GAL4* larvae were mixed and squashed together with mutant polytene chromosomes. Control wild-type chromosomes (wt) are identified by their reactivity with α GFP antibodies (in red). (B) HP1c-lacI was overexpressed in *woc^{RNAi}*; *Act5C-GAL4* and in control *gfp^{RNAi}*; *Act5C-GAL4* flies. Binding of HP1c-lacI was determined in polytene chromosomes by immunostaining with α lacI antibodies (in green). Control wild-type chromosomes (wt) are identified by their reactivity with α WOC antibodies (in red). (C) Similar experiments as in B, but HP1c-lacI was overexpressed in *row^{RNAi}*; *Act5C-GAL4* (panel *row^{RNAi}*) and in control *gfp^{RNAi}*; *Act5C-GAL4* flies (panel wt). In this case, mutant and control chromosomes were analyzed separately. As a control, the immunolocalization patterns obtained with α GAGA antibodies (in red) are shown. DNA was stained with DAPI (in blue). Arrows indicate the position of the chromocentre.

binding to chromatin was impaired (Swaminathan et al. 2005; Tan et al. 2007).

To further confirm the contribution of WOC and ROW to recruitment of HP1c, we performed overexpression experiments, where HP1c-lacI was expressed in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* mutants, and its ability to bind polytene chromosomes compared with that observed when overexpression was carried out in control wild-type flies. When HP1c-lacI was expressed in *woc^{RNAi}*, polytene chromosomes from mutant and control larvae were squashed together and immunostained with α lacI antibodies to determine binding of HP1c-lacI (Fig. 7B). In control polytenes, which are identified by their staining with α WOC antibodies, overexpressed HP1c-lacI binds to multiple euchromatic sites, as endogenous HP1c does. On the other hand, in *woc^{RNAi}* chromosomes, binding of

HP1c-lacI to euchromatin is impaired. Similar results were obtained when HP1c-lacI was expressed in *row^{RNAi}* (Fig. 7C). In this case, reactivity with α GAGA was used as a control for comparison since mutant and control wild-type chromosomes were observed separately. As in *woc^{RNAi}*, no significant α lacI reactivity is observed at euchromatin in *row^{RNAi}* chromosomes. On the other hand, binding of WOC and ROW is not significantly affected in mutant *hp1c^{RNAi}* polytene chromosomes (Fig. 9A,B), indicating that HP1c is not required for binding of WOC and ROW. Moreover, WOC and ROW are reciprocally required for binding to chromatin, as binding of ROW to chromatin is severely impaired in *woc^{RNAi}* chromosomes (Fig. 9C) and, vice versa, binding of WOC is also strongly impaired in *row^{RNAi}* chromosomes (Fig. 9D). Altogether, these results strongly indicate that

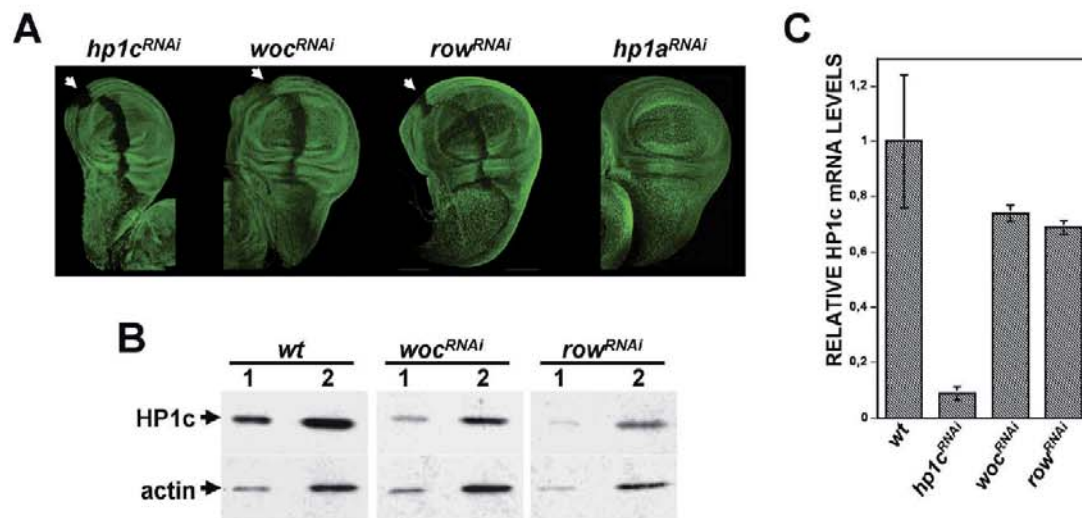


Figure 8. HP1c protein levels are decreased in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}*. (A) Immunostaining with α HP1c antibodies (in green) is presented in wing imaginal discs obtained from *hp1c^{RNAi}*; *ptc*-GAL4 (panel *hp1c^{RNAi}*), *woc^{RNAi}*; *ptc*-GAL4 (panel *woc^{RNAi}*), *row^{RNAi}*; *ptc*-GAL4 (panel *row^{RNAi}*), and *hp1a^{RNAi}*; *ptc*-GAL4 larvae (panel *hp1a^{RNAi}*). The arrows indicate the A/P-boundary where the *ptc*-promoter is specifically active. (B) HP1c levels are analyzed by Western-blot with α HP1c antibodies in extracts prepared from *woc^{RNAi}*; *Act5C*-GAL4 (lanes *woc^{RNAi}*), *row^{RNAi}*; *Act5C*-GAL4 (lanes *row^{RNAi}*), and control wild-type larvae (lanes wt). Two increasing amounts of extract were analyzed in each case (lanes 1,2). The signal obtained with α Actin antibodies was used as loading control for normalization. (C) Quantitative RT-PCR analysis of the levels of HP1c mRNA observed in *woc^{RNAi}*; *Act5C*-GAL4 (column *woc^{RNAi}*), *row^{RNAi}*; *Act5C*-GAL4 (column *row^{RNAi}*), and control wild-type larvae (column wt). Results obtained with *hp1c^{RNAi}*; *Act5C*-GAL4 larvae (column *hp1c^{RNAi}*) are also included for comparison. Relative HP1c mRNA expression was determined in relation to GAP expression.

WOC and ROW form obligated hetero-oligomers that, in turn, bind HP1c and recruit it to specific genomic locations.

Interestingly, overexpression of HP1c-lacI results in its misincorporation to heterochromatin, as it is also detected at the heterochromatic chromocentre (Fig. 7B,C). Binding to heterochromatin, however, is not impaired in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* chromosomes, suggesting that it occurs independently of WOC and ROW. It must also be noticed that mislocalization of HP1c-lacI to heterochromatin induces recruitment of WOC (Fig. 7B) that, otherwise, is excluded from heterochromatin (Fig. 6A).

That binding of HP1c to chromatin is strictly dependent on the zinc-finger proteins WOC and ROW was unexpected, as HP1c contains an N-terminal chromodomain that, being homologous to that of HP1a, could mediate binding to H3K9me_{2,3} (Smothers and Henikoff 2001). In fact, all residues directly involved in this interaction are conserved in the chromodomain of HP1c. Actually, in vitro, HP1c specifically recognizes H3K9me_{2,3} through its chromodomain (Fig. 10). As judged by Far-Western analysis, HP1c binds endogenous, but not recombinant, histone H3 (Fig. 10A). This binding (1) depends on the N-terminal domain of histone H3, as it is abolished after mild digestion with trypsin to cleave the N-terminal tail (Fig. 10B); (2) involves recognition of H3K9me₃, as it is competed by a H3K9me₃-peptide but not by the equivalent unmethylated-peptide (Fig. 10C); and (3) is mediated by the chromodomain of HP1c, as no binding is observed with HP1c^{ΔCHROMO}, a truncated

form missing the chromodomain, while the chromodomain by itself, HP1c^{CHROMO}, shows significant binding (Fig. 10D). Moreover, HP1c is also capable of binding H3K9me_{2,3} in mononucleosomes (Fig. 10E). In these experiments, total mononucleosomes were subjected to pull-down assays with GST-HP1c and GST-HP1a fusion proteins. As shown in Figure 10E, mononucleosomes bound by GST-HP1c are strongly enriched in both H3K9me₃ and H3K9me₂ when compared with the input mononucleosomes. Enrichment is similar to that observed in mononucleosomes bound by GST-HP1a. On the other hand, mononucleosomes bound by both GST-HP1c and GST-HP1a show no significant enrichment in H3K9me₁ as well as in a number of other histone modifications (i.e., H3K27me_{1,2,3}, H4K20me_{1,2,3}) (data not shown). These results indicate that, in vitro, HP1c and HP1a bind chromatin on the basis of a common molecular mechanism; namely, recognition of H3K9me_{2,3}.

HP1c cooperates with WOC and ROW to regulate gene expression

The results reported above show that HP1c associates with the zinc-finger proteins WOC and ROW that, in addition, mediate its binding to chromatin. Next, we asked whether HP1c, WOC, and ROW are also functionally linked. Expression profiling was used to determine the actual contribution of HP1c, WOC, and ROW to gene expression. For this purpose, *hp1c^{RNAi}*, *woc^{RNAi}*, and *row^{RNAi}* lines were crossed to flies carrying an ubiqui-

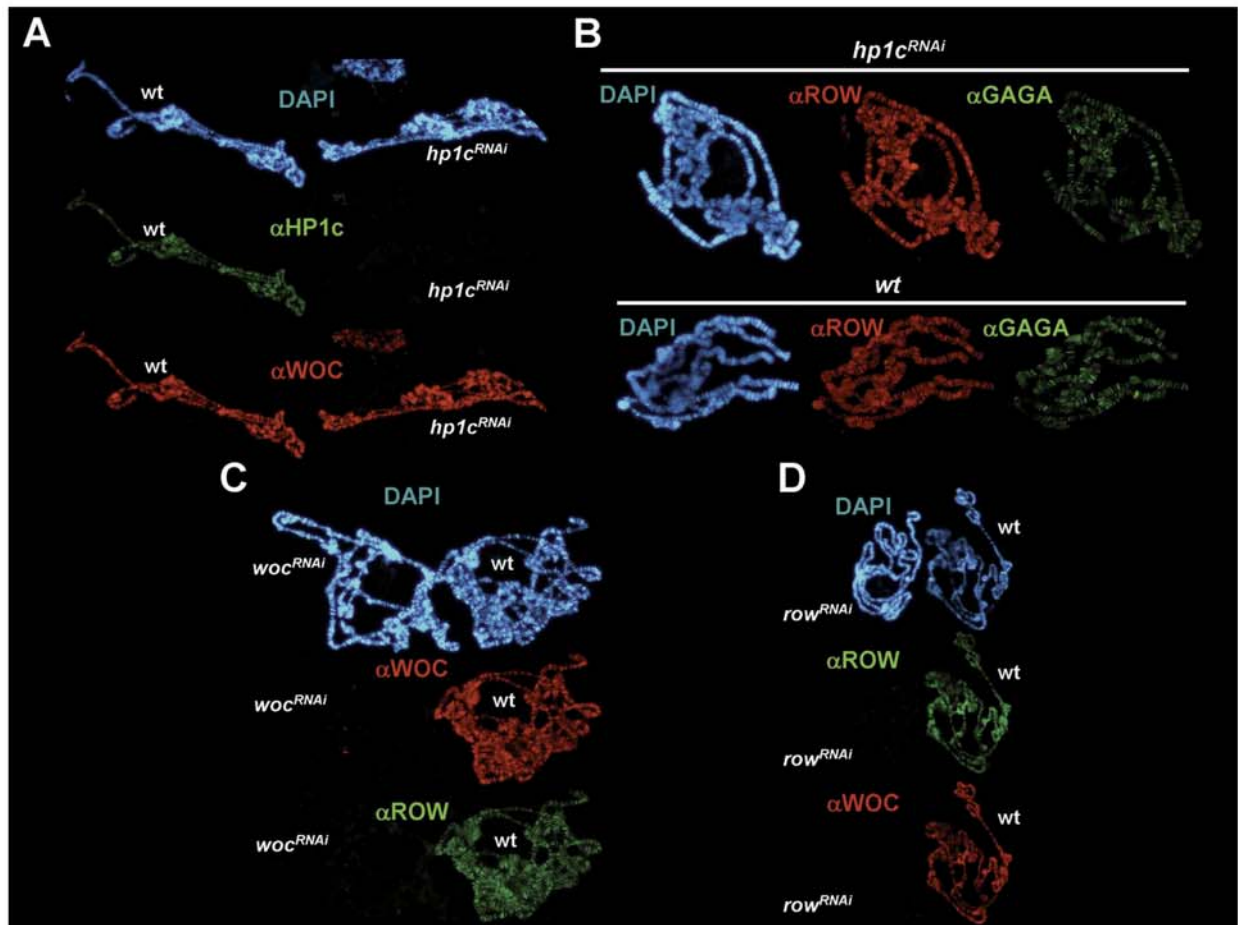


Figure 9. WOC and ROW are reciprocally required for binding to chromatin. (A,B) The patterns of immunolocalization of WOC (A) and ROW (B) (in red) are presented in polytene chromosomes obtained from mutant *hp1c^{RNAi}; Act5C-GAL4* larvae. In A, polytene chromosomes obtained from control wild-type larvae were mixed and squashed together with mutant *hp1c^{RNAi}* polytene chromosomes, which are identified by their lack of reactivity with α HP1c antibodies (in green). In B, mutant and control wild-type (wt) chromosomes were analyzed separately. As a control, the immunolocalization patterns obtained with α GAGA antibodies (in green) are shown. (C) The pattern of immunolocalization of ROW (in green) is presented in polytene chromosomes obtained from mutant *woc^{RNAi}; Act5C-GAL4* larvae. Polytene chromosomes obtained from control wild-type larvae were mixed and squashed together with mutant *woc^{RNAi}* polytene chromosomes, which are identified by their lack of reactivity with α WOC antibodies (in red). (D) The pattern of immunolocalization of WOC (in red) is presented in polytene chromosomes obtained from mutant *row^{RNAi}; Act5C-GAL4* larvae. Polytene chromosomes obtained from control wild-type larvae were mixed and squashed together with mutant *row^{RNAi}* polytene chromosomes, which are identified by their lack of reactivity with α ROW antibodies (in green). DNA was stained with DAPI (in blue).

tous *Act5C-GAL4* driver, and total RNA was prepared from blue staged male larvae. Under these experimental conditions, a number of nonspecific factors could also have an effect on gene expression, so that their contribution needed to be subtracted. These factors include two genomic insertions: the *UAS_{GAL4}* construct expressing the synthetic hairpin against the corresponding gene and the *Act5C-GAL4* insertion. Moreover, in the mutants, the RNAi pathway is hyperactivated and siRNAs are generated to a high concentration, which could also have an effect on gene expression. For each mutant condition, the original *UAS_{GAL4}*-hairpin line was used as control, to account for nonspecific effects due to the corresponding insertion. In addition, to account for nonspe-

cific effects due to the *Act5C-GAL4* insertion and hyperactivation of RNAi, two other controls were used: an *Act5C-GAL4* line carrying an *UAS_{GAL4}*-hairpin construct against an unrelated gene (GFP), and the original line carrying the *UAS_{GAL4}*-hairpin insertion against GFP.

Differential expression was measured with an interval distance that provides a conservative approach to the analysis of complex samples that, as in the case described here, contain different sources of background noise (see the Supplemental Material for details). Briefly, for each gene, the interval of expression in the mutant (determined from the values observed in independent biological replicas) is compared with the interval of ex-

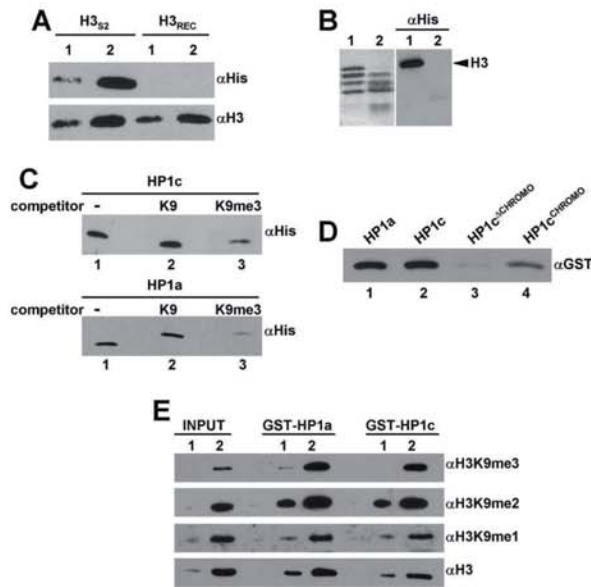


Figure 10. HP1c binds H3K9me2,3 in vitro. (A) Binding of His-tagged HP1c to endogenous histone H3, obtained from S2 cells, (panel H3_{S2}), as well as recombinant histone H3, expressed in bacteria, (panel H3_{REC}), is analyzed by Far-Western using α His antibodies (shown at top). Lanes 1 and 2 correspond to increasing amounts of H3. Western analysis with α H3 antibodies is presented at the bottom, as a loading control. (B) Nucleosomes prepared from S2 cells were treated with trypsin, to cleave the histone N-terminal tails (lanes 2) or not (lanes 1), and then binding of his-tagged HP1c was analyzed by Far-Western using α His antibodies. Staining with Ponceau of the filter before hybridization with α His antibodies is presented on the left. The position corresponding to histone H3 is indicated. (C) Binding of His-tagged HP1c (panel HP1c) or HP1a (panel HP1a) to endogenous histone H3 was analyzed by Far-Western using α His antibodies. Binding was performed in the presence of 50 μ M of a peptide from the H3 N-terminal tail trimethylated at K9 (lanes 3) or unmethylated (lanes 2). Lanes 1 correspond to the binding observed in the absence of any added competitor. (D) Binding to endogenous H3 of GST-tagged HP1c (lane 2) and truncated forms containing only the N-terminal chromodomain, HP1c^{CHROMO} (amino acids 1–62) (lane 4), or missing it, HP1c ^{Δ CHROMO} (amino acids 63–237) (lane 3), is analyzed by Far-Western using α GST antibodies. Lane 1 corresponds to binding of GST-tagged HP1a. (E) Pull-down assays of total mononucleosomes prepared from S2 cells were performed with GST-HP1c and GST-HP1a fused proteins, and bound mononucleosomes analyzed by Western using α H3K9me3, α H3K9me2, α H3K9me1, and α H3 antibodies. Lanes 1 and 2 correspond to increasing amounts of bound mononucleosomes. INPUT corresponds to 10% of mononucleosomes used for pull-down assays.

pression observed in the control samples (determined from the highest and lowest expression observed in all control samples). This defines, for each gene, a distance between intervals of expression in the mutant versus the controls, which is then divided by an estimate of the standard deviation. The distance is set to zero if the intervals overlap. Table 1 summarizes, for each mutant background, the number of differentially expressed genes

observed at increasing cut-off values of the interval distance. At low cut-off values (>0), a similar number of differentially expressed genes are found in all three mutants. However, as the cut-off value is increased, and hence less false positives are expected, a higher number of genes is found in *woc*^{RNAi} and *row*^{RNAi} than in *hp1c*^{RNAi}, suggesting that WOC and ROW regulate more genes than HP1c.

Given the interactions observed between HP1c, WOC, and ROW, we anticipate that these three factors regulate a common set of genes, so that the patterns of differentially expressed genes observed in the three mutants could correlate. To test this hypothesis, we measured the correlation between the patterns of differentially expressed genes in the mutants by computing Spearman's rank correlation coefficient between the interval distances. As shown in Table 2, the patterns of differentially expressed genes show correlations that are much higher than those expected under the hypothesis that no genes are coregulated (P -value $< 1.0 \times 10^{-8}$). Next, to determine to what extent the gene expression programs executed by HP1c, WOC, and ROW overlap, we assessed the range of Spearman's correlation values that would be expected under complete coregulation. For this purpose, a simulation study was carried out under the assumption that all genes are coregulated and that the change in expression relative to the controls is the same for the three mutants. As shown in Table 2, the observed correlation between *woc*^{RNAi} and *row*^{RNAi} falls within the expected interval for complete coregulation, supporting that WOC and ROW execute a common gene expression program. On the other hand, correlations observed between *hp1c*^{RNAi} and either *woc*^{RNAi} or *row*^{RNAi} are lower than expected for complete coregulation, an observation that could be anticipated from the higher number of differentially expressed genes observed in *woc*^{RNAi} and *row*^{RNAi} than in *hp1c*^{RNAi} (Table 1). More relevant, in this case, is the circumstance that virtually all differentially expressed genes in *hp1c*^{RNAi} turn out to be differentially expressed in both *woc*^{RNAi} and *row*^{RNAi} (Table 3). For this analysis, genes were classified into nine different categories according to whether they are not differentially expressed in any of the mutants or they change expression in one, two, or the three mutant conditions. As shown in Table 3, most of the genes are not differentially expressed in any of the three mutants. Consistent with the strong correlation observed between

Table 1. Number of differentially expressed genes observed in *hp1c*^{RNAi}, *woc*^{RNAi}, and *row*^{RNAi} mutants as a function of increasing cut-off value of the interval distance

Cut-off	<i>hp1c</i> ^{RNAi}		<i>woc</i> ^{RNAi}		<i>row</i> ^{RNAi}	
	Down	Up	Down	Up	Down	Up
>0	1142	1002	1319	1148	1165	1642
>1.0	192	149	349	214	259	367
>2.0	53	30	103	48	74	66

The number of genes up-regulated (up) or down-regulated (down) are indicated.

Results

Font-Burgada et al.

Table 2. Spearman's correlation between the patterns of differential gene expression of *hp1c^{RNAi}*, *woc^{RNAi}*, and *row^{RNAi}* mutants

	Observed	No coregulation	Complete coregulation
<i>hp1c^{RNAi}</i> vs <i>woc^{RNAi}</i>	0.14	(−0.02, 0.02)	(0.22, 0.25)
<i>hp1c^{RNAi}</i> vs <i>row^{RNAi}</i>	0.10	(−0.02, 0.02)	(0.22, 0.26)
<i>woc^{RNAi}</i> vs <i>row^{RNAi}</i>	0.30	(0.00, 0.04)	(0.28, 0.32)

The observed correlations are compared with the range expected if no genes were coregulated and if all were coregulated.

woc^{RNAi} and *row^{RNAi}*, a high proportion (92.4%) of total differentially expressed genes change expression both in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}*. On the other hand, most of the genes that are differentially expressed in *hp1c^{RNAi}* also change expression in both *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}*, as only a low proportion are affected solely in *hp1c^{RNAi}* and no genes are differentially expressed in *hp1c^{RNAi}* and in only one of the other two mutants. Actually, 14.1% of total differentially expressed genes change expression in all three mutants, which accounts for 94.6% of the genes that are differentially expressed in *hp1c^{RNAi}*. These results indicate that a vast majority of genes regulated by HP1c are also regulated by both WOC and ROW, which is fully consistent with the interactions described above. It must be noticed, however, that many differentially expressed genes (78.3%) change in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* but not in *hp1c^{RNAi}*.

Next, we asked about the characteristics of the expression program coregulated by HP1c, WOC, and ROW. This analysis was restricted to the 158 genes that were found differentially expressed in the same direction in all three mutants, as they stand the highest probability of being truly coregulated by the three factors (Supplemental Table S3). Gene ontology (GO) analysis of this set of genes shows no statistically significant enrichment in any particular annotation after correction for multiple testing. To some extent, this observation was not unexpected considering the complexity of the samples used in our analysis, total RNA prepared from whole larvae. Clustering analysis, however, shows a number of associations of more than three genes sharing common GO annotations (Fig. 11A). Notably, a cluster of genes implicated in nervous system development and morphogenesis is observed. These include the transcription factor *prospero* (*pros*), the dynein motor *Dhc64C*, and the axon guidance factors, *trio* and *NetrinA* (*NetA*). Actually, a detailed examination of the 158 genes differentially expressed in the same direction in the three mutants, shows that, regardless of their actual GO annotations, 35 have attributed functions related to various aspects of development and functionality of the nervous system (Fig. 11B), including neurogenesis, synapsis formation and function, and sensory perception. Similar results are obtained when all genes differentially expressed in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* mutants are analyzed. In this case, an additional cluster of genes involved in imaginal discs development is observed (data not shown). Altogether, these results suggest that, at least in part, HP1c, WOC,

and ROW execute their genetic program in the context of the nervous system.

Discussion

Here, we report on the interaction between *Drosophila* HP1c and the zinc-finger proteins WOC and ROW. Our results indicate that both WOC and ROW copurify with HP1c. Coimmunoprecipitation experiments corroborate the interaction of WOC with HP1c and ROW. Moreover, in polytene chromosomes, HP1c and ROW extensively colocalize with WOC, and targeting HP1c to an ectopic construct results in recruitment of both WOC and ROW. Altogether, these results indicate that HP1c, WOC, and ROW are components of a distinct multiprotein complex. HP1c–WOC interaction is likely to be direct, as WOC contains a canonical PxVxL motif (¹⁵³⁶PHVLL¹⁵⁴⁰), which is known to mediate binding to the chromo-shadow domain of HP1 proteins (Lechner et al. 2000, 2005; Smothers and Henikoff 2000). This motif is located within the highly conserved C-terminal HC domain of WOC, being also present in the three human homologs. ROW also contains several variant PxVxL motifs, suggesting that it might also bind directly to HP1c. In agreement with these observations, euchromatic localization of HP1c depends on the C-terminal chromo-shadow domain (Smothers and Henikoff 2001), strongly suggesting that it mediates interaction with WOC and ROW.

Binding of HP1c to chromatin relies on the zinc-finger proteins, WOC and ROW

Here, we also show that binding of HP1c to chromatin depends on WOC and ROW that, on the other hand, are reciprocally required for binding to chromatin. Domain structure and organization indicate that WOC and ROW are sequence-specific DNA-binding proteins. These results indicate that chromosomal association of HP1c is largely determined by the recognition of specific DNA sequences, which is in contrast to the situation observed in the case of *Drosophila* HP1a, or mammalian HP1α, where chromosomal association was found to depend on

Table 3. Percentage of genes differentially expressed in none, one, two, and all three *hp1c^{RNAi}*, *woc^{RNAi}*, and *row^{RNAi}* mutants

<i>hp1c^{RNAi}</i>	<i>woc^{RNAi}</i>	<i>row^{RNAi}</i>	% of total genes	% of differentially expressed genes
=	=	=	96.4	—
DE	DE	DE	0.5	14.1
DE	DE	=	0.0	0.0
DE	=	DE	0.0	0.0
DE	=	=	0.0	0.8
=	DE	DE	2.8	78.3
=	DE	=	0.1	3.7
=	=	DE	0.1	3.1

(DE) Differentially expressed; (=) not differentially expressed.

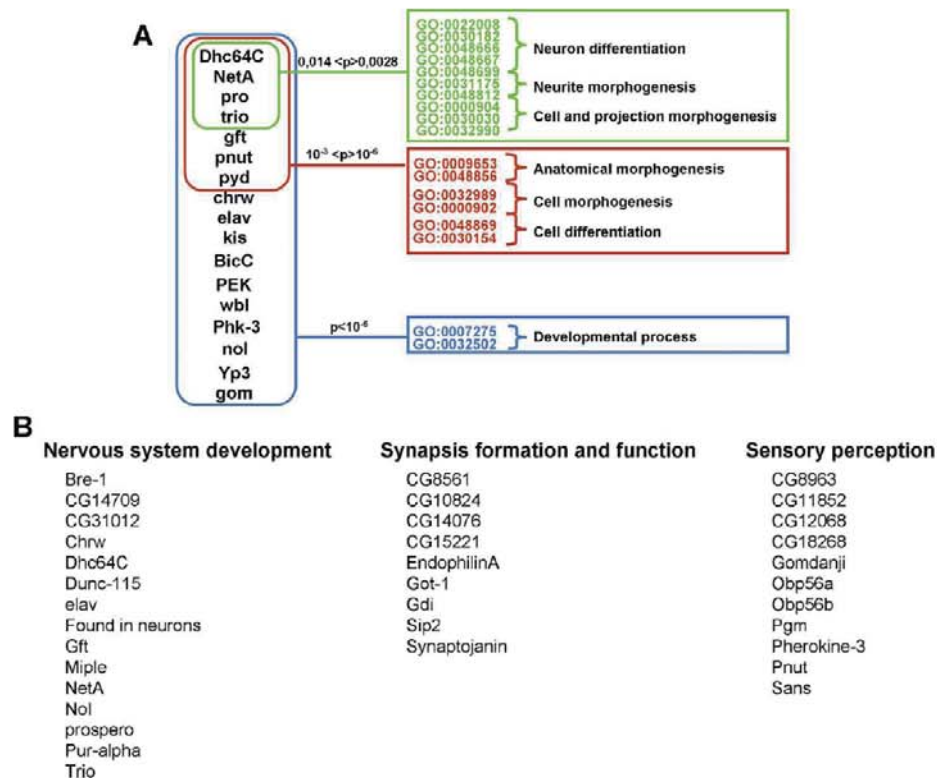


Figure 11. HP1c, WOC and ROW coregulate a common gene expression program that, in part, is executed in the context of the nervous system. (A) Gene-cluster analysis of the 158 genes that are differentially expressed in the same direction in all three mutants. Associations of more than three genes sharing common GO annotations are presented. (B) Out of the 158 genes that are differentially expressed in the same direction in the three mutants, 35 have attributed functions related to development and functionality of the nervous system (neurogenesis, synapsis formation and function, and sensory perception).

the recognition of a specific pattern of histone modifications; namely, H3K9 methylation (Hiragami and Festenstein 2005; Hediger and Gasser 2006). Several HP1 proteins, including HP1a and HP1 α , were reported to interact with a number of transcription factors, replication proteins, and chromatin assembly complexes (Hiragami and Festenstein 2005; Hediger and Gasser 2006; Lomberg et al. 2006). Yet, it is unclear whether these interactions mediate recruitment of HP1 to specific sites, and/or in response to particular processes, or they actually take place after recruitment to regulate their functions. What is striking in the case of *Drosophila* HP1c is that its binding to chromatin is strictly dependent on DNA-binding proteins. Our results, however, also show that, through the chromodomain, HP1c efficiently binds H3K9me_{2,3} in vitro. Actually, overexpression of HP1c-lacI leads to its mislocalization to heterochromatin, likely reflecting binding to H3K9me_{2,3}. In this context, it must be noticed that HP1c shows a partial colocalization with H3K9me₃. However, binding of HP1c at these sites is in general weak, being also obliterated in the absence of WOC and ROW. HP1 proteins have been reported to interact with different histone methyltransferases (HMTs), being involved in their recruitment to specific sites (Hiragami and Festenstein

2005; Hediger and Gasser 2006; Lomberg et al. 2006). Therefore, it is possible that H3K9 methylation at these sites is actually the consequence of HP1c binding. Altogether, these observations indicate that recognition of H3K9me_{2,3} is not a major determinant of the association of HP1c with chromatin in vivo. Consistent with this interpretation, replacing the chromodomain of HP1c by that of HP1a does not alter its chromosomal distribution (Smothers and Henikoff 2001). The interaction with WOC and ROW does not appear to hinder the chromodomain from binding H3K9me_{2,3} since overexpression of HP1c-lacI brings both HP1c and WOC to heterochromatin. Several other possibilities can account for the inability of HP1c to bind H3K9me_{2,3} in vivo. The interaction of HP1c with WOC and ROW might be of higher affinity than the interaction with H3K9me_{2,3}. In addition, post-translational modifications could regulate these interactions. It is also possible that HP1c is actively excluded from heterochromatin. Whether binding to H3K9me_{2,3} plays a role at any stage during development or cell cycle progression remains, however, to be determined.

HP1a and HP1b also localize to euchromatin, yet they show strong binding to heterochromatin. Therefore, WOC and ROW could also play a role in binding of HP1a

and HP1b to euchromatin. In fact, euchromatic localization of HP1b is decreased in both *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* mutants (Supplemental Fig. S2). This effect, however, is much weaker than that observed in the case of HP1c. On the other hand, binding of HP1a to euchromatin is not grossly altered in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* mutants (Supplemental Fig. S3), though its association to some specific loci, such as at the 31C region, appears to be affected (data not shown). On the other hand, binding of HP1a and HP1b to heterochromatin, which depends on H3K9me2,3, is not significantly affected in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* mutants (Supplemental Figs. S2, S3). Similarly, mislocalization of overexpressed HP1c-lacI to heterochromatin, which likely reflects binding to H3K9me2,3, is not affected either in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* mutants.

Altogether, these observations suggest that, in *Drosophila*, HP1 proteins could be recruited to chromatin by at least two independent mechanisms: (1) recognition of H3K9me2,3, which is instrumental in heterochromatin binding, and (2) interaction with sequence-specific DNA-binding proteins, which mediate euchromatic localization of HP1c and, perhaps, of HP1b and HP1a to some specific loci. Actually, the interaction of HP1 proteins with DNA-binding proteins might be more frequent than anticipated. In fact, in *C. elegans*, HPL-2 was found to interact with LIN-13 (Coustham et al. 2006), a sequence-specific DNA-binding protein containing multiple zinc-finger domains.

The contribution of HP1c to gene expression

Here, we report that HP1c localizes at multiple active chromatin domains and cooperates with WOC and ROW, which show features characteristic of transcription factors, to regulate gene expression. Moreover, targeting HP1c to a reporter construct promotes expression of the reporter gene. This effect is specific of HP1c, as targeting both HP1a and HP1b induce silencing. These results indicate that, rather than as a silencing factor, HP1c acts as a transcriptional regulator that is recruited to chromatin by sequence-specific DNA-binding proteins.

Other HP1 proteins have also been shown to contribute to the regulation of gene expression, yet their presence is generally associated to silencing. These include *Drosophila* HP1a, which is required for proper expression of most heterochromatic genes as well as a few euchromatic genes (Hearn et al. 1991; Clegg et al. 1998; Lu et al. 2000; Piacentini et al. 2003; Cryderman et al. 2005; De Lucia et al. 2005). Mammalian HP1 γ has also been shown to localize at active genes in a murine erythroid cell line (Vakoc et al. 2005). In these cases, presence of HP1 appears to be implicated in stabilizing RNA transcripts, or in another RNA-processing event occurring during elongation. In the case of HP1c, however, colocalization with the poised RNAPII form, Pol IIO^{ser5}, is much stronger than with the elongating form, Pol IIO^{ser2}, suggesting that HP1c acts at the promoter level rather than during elongation. Consistent with this hypothesis, HP1c shows a much stronger colocalization with

H3K4me3, a modification that occurs at promoters, than with H3K36me3, which occurs all through transcribed regions and incorporates during elongation. In full agreement with our results, WOC also shows extensive colocalization with Pol IIO^{ser5}, which is stronger than with Pol IIO^{ser2} (Raffa et al. 2005). These results favor a contribution to the regulation of genes containing poised RNAPII. Actually, recent studies show that the presence of poised RNAPII at promoters is more frequent than anticipated, particularly on developmental control genes (Muse et al. 2007; Zeitlinger et al. 2007). Interestingly, a high proportion of genes coregulated by HP1c, WOC, and ROW act during development and morphogenesis.

The precise molecular mechanism(s) underlying the contribution of HP1c to transcription regulation remains to be determined. However, a contribution to RNAPII recruitment appears unlikely since, in the absence of WOC, RNAPII recruitment is not affected (Raffa et al. 2005). A contribution to the regulation of poised RNAPII is also uncertain, as no gross changes in the levels of Pol IIO^{ser5} and Pol IIO^{ser2} are observed in *woc*-null mutants by either immunostaining (Raffa et al. 2005) or Western analysis (data not shown). It is possible, however, that HP1c/WOC/ROW act only on a reduced subset of genes containing poised RNAPII. It must also be noticed that HP1c likely participates both in promoting and inhibiting transcription. In fact, among the 158 genes that are differentially expressed in the same direction in *hp1c^{RNAi}*, *woc^{RNAi}*, and *row^{RNAi}* mutants, the number of up-regulated and down-regulated genes is similar, 80 in front of 78. Moreover, consistent with a contribution to repression, out of the 35 genes that are coregulated by HP1c, WOC, and ROW in the context of the nervous system, a significantly higher number of genes are found up-regulated than down-regulated in the mutants, 22 versus 13. On the other hand, targeting HP1c to a reporter, though modestly, increases its expression. Altogether, these observations suggest that, depending on the actual functional/promoter context, HP1c can be engaged in either promoting or inhibiting transcription.

The patterns of differentially expressed genes observed in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* mutants show a very strong correlation, indicating that WOC and ROW share a common gene expression program. In addition, our results show that genes regulated by HP1c are also regulated by both WOC and ROW. On the other hand, a high proportion (78.3%) of differentially expressed genes change expression both in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* but not in *hp1c^{RNAi}*, suggesting that WOC and ROW could also regulate gene expression independently of HP1c. However, the extensive colocalization observed between WOC, ROW, and HP1c argues against this possibility. On the other hand, our results show that HP1c protein levels are significantly decreased in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* mutants. In this scenario, stronger synergistic effects would be expected in *woc^{RNAi}* and *row^{RNAi}* mutants than in *hp1c^{RNAi}*, which could result in more genes being differentially expressed. Consistent with this hy-

pothesis, a major proportion of genes that are differentially expressed in all three mutants shows stronger changes in *woc*^{RNAi} and *row*^{RNAi} than in *hp1c*^{RNAi}. Actually, out of the 158 genes that are differentially expressed in the same direction in all three mutants, 77 had smaller changes in *hp1c*^{RNAi} than in *woc*^{RNAi} or *row*^{RNAi}, a statistically significant higher number than the 52.6 genes expected under the assumption that the magnitude of change is the same in all three mutants (P -value < 0.0001).

Clustering analysis suggests that the gene expression program coregulated by HP1c, WOC, and ROW is executed, at least in part, in the context of the nervous system. In agreement with this hypothesis, expression of *woc* and *row* is high in the nervous system during embryogenesis and larval development, and mutant larvae have reduced brains (Wismar et al. 2000; Brody et al. 2002). Furthermore, one of the human homologs of WOC, DXS6673E/ZNF261, is implicated in a form of X-linked mental retardation (van der Maarel et al. 1996).

HP1c and telomere function

Others reported that WOC regulates telomere function, as it is required to prevent chromosomal end-to-end fusions (Raffa et al. 2005). The physical and functional interactions between WOC, HP1c, and ROW suggest that HP1c and ROW might also regulate telomere function. Actually, at telomeres, colocalization of WOC with HP1c and ROW is also most extensive, with all detectable α WOC bands overlapping with α HP1c and α ROW bands and vice versa (Supplemental Fig. S4). However, the incidence of telomere fusions in *hp1c*^{RNAi} and *row*^{RNAi} mutants is low, being similar to that observed in control flies, carrying an UAS-hairpin construct against an unrelated gene, GFP (data not shown). This is likely the consequence of both the hypomorph character of the mutations and hyperactivation of the RNAi pathway, which is known to regulate telomere function (Ho et al. 2008). Consistent with this hypothesis, the frequency of telomere fusions is also low in *woc*^{RNAi}. The contribution of ROW to telomere function was also analyzed in *row*^{l(2)SH2172}, which corresponds to a very strong mutation caused by a P-element insertion at the ATG-start codon (Supplemental Fig. S1B). The incidence of telomere fusions is significantly higher in homozygous *row*^{l(2)SH2172} flies than in control wild-type flies (Supplemental Fig. S5), confirming its contribution to telomere function. The use of currently unavailable *hp1c*-null mutations is also likely to confirm the contribution of HP1c to telomere function.

HP1a is also known to regulate telomere function (Fanti et al. 1998). Several observations, however, indicate that the contribution of WOC/ROW/HP1c is not related to that of HP1a. On one hand, *su(var)2-5* mutants show much stronger effects than either *woc* or *row* mutants (Fanti et al. 1998; Raffa et al. 2005). Furthermore, both telomere length and expression of the telomeric retrotransposons *Het-A* and *TART* are increased in *su-*

(*var*)2-5 mutants, but they are not affected in *woc*-null mutants (Perrini et al. 2004; Raffa et al. 2005). In addition, expression profiling data show that, in *hp1c*^{RNAi}, *woc*^{RNAi}, and *row*^{RNAi} mutants, expression of *Het-A* and *TART* is not significantly affected (data not shown). Similarly, other genes known to contribute to telomere function do not change expression in *hp1c*^{RNAi}, *woc*^{RNAi}, and *row*^{RNAi} mutants (data not shown). Altogether, these observations suggest that the contribution of WOC/ROW/HP1c to the regulation of telomere function is direct and independent of their contribution to the regulation of gene expression.

Materials and methods

For a detailed description of the Materials and Methods, see the Supplemental Material.

Fly stocks and antibodies

woc^{RNAi}, *row*^{RNAi}, and *hp1a*^{RNAi} were obtained from VDRC. *row*^{l(2)SH2172} was obtained from Szeged *Drosophila* Stock Center. *hp1c*^{RNAi} transgenic flies were generated according to standard procedures. For targeting experiments, HP1a, HP1b, and HP1c were fused at C terminus to the lacI-DNA-binding domain.

α HP1a, α HP1b, α HP1c, and α ROW antibodies were rat polyclonal. Rabbit polyclonal α WOC antibodies are described by Raffa et al. (2005). Antibodies against histone modifications and RNAPII forms were commercial (Abcam, Upstate Biotechnologies).

Immunostaining experiments and analysis of telomere fusions

Immunostaining experiments were performed in S2 cells and polytene chromosomes and imaginal wing discs from third instar larvae, according to standard procedures (see the Supplemental Material). Telomere fusions were analyzed in brain squashes from third instar larvae. Samples were visualized on a Nikon Eclipse E-800 inverted microscope with a Colorview 12 camera or in a confocal Leica TCS SP2-AOBS microscope.

Purification and characterization of multiprotein complexes containing HP1c

Purification of multiprotein complexes was performed from stable S2 lines expressing TAP-HP1c. LC/MS analysis was performed in the Proteomics Unit of the "Institut de Recerca de la Vall d'Hebrón" (Barcelona).

Coimmunoprecipitation experiments

Coimmunoprecipitation experiments were performed with crude S2 nuclear extracts by the addition of α WOC, α DDP1, or no antibodies, according to standard procedures.

Analysis of the interaction of HP1c with H3K9me2,3 in vitro

Analysis of the interaction of HP1c with H3K9me2,3 in vitro was performed with recombinant GST- and His-tagged proteins. Mononucleosomes and total endogenous histones were obtained from S2 cells. GST-pull-down assays and Far-Western analysis were performed according to standard procedures.

Expression profiling analysis

For expression profiling, *Drosophila* Genome 2.0 GeneChip (Affymetrix) were hybridized with cDNA prepared from total RNA obtained from male larvae. Duplicates were processed for each of the genotypes analyzed. For each mutant condition, differential expression was measured via the distance between the intervals containing the mutant and the control expression values. Lists of differentially expressed genes were obtained by setting several cut-offs for the absolute value of the interval distance. To measure the degree of coregulation between the mutants, we computed the pairwise Spearman's rank correlation between interval distances. GO analysis was performed with GTOolBox.

Acknowledgments

We are grateful to C. Antoniewski, J. Bernués, M. Batllé, M.L. Espinàs, M. Gatti, A. Jordan, K. Furukubo-Tokunaga, J.T. Lis, A. Veraksa, and L. Wallrath for materials, and to A. Casali, D. Huertas, and I. Garcia-Bassets for helpful advice and discussions. We are most thankful to M. Lloret-Llinares for preliminary studies on the effect of *hp1c^{RNAi}* on gene expression. We are also thankful to E. Fuentes and L. Bardia for technical assistance. J.F. acknowledges receipt of a doctoral fellowship from MEC. This work was financed by grants from MEC (BMC2006-1627, CSD2006-00049) and the CIRIT (2001SGR00344).

References

Ayyanathan, K., Lechner, M.S., Bell, P., Maul, G.G., Schultz, D.C., Yamada, Y., Tanaka, K., Torigoe, K., and Rauscher III, F.J. 2003. Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: A mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes & Dev.* **17**: 1855–1869.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**: 823–837.

Bell, O., Conrad, T., Kind, J., Wirbelauer, C., Akhtar, A., and Schübeler, D. 2008. Transcription-coupled methylation of histone H3 at lysine 36 regulates dosage compensation by enhancing recruitment of the MSL complex in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* **28**: 3401–3409.

Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., Gingeras, T.R., et al. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**: 169–181.

Brody, T., Stivers, C., Nagle, J., and Odenwald, W.F. 2002. Identification of novel *Drosophila* neural precursor genes using a differential embryonic head cDNA screen. *Mech. Dev.* **113**: 41–59.

Clegg, N.J., Honda, B.M., Whitehead, I.P., Grigliatti, T.A., Wakimoto, B., Brock, H.W., Lloyd, V.K., and Sinclair, D.A. 1998. Suppressors of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* affect expression of the heterochromatic gene light in the absence of chromosome rearrangement. *Genome* **41**: 495–503.

Coustham, V., Bedet, C., Monier, K., Schott, S., Karali, M., and Palladino, F. 2006. The *C. elegans* HP1 homologue HPL-2 and the LIN-13 zinc finger protein form a complex implicated in vulval development. *Dev. Biol.* **297**: 308–322.

Cryderman, D.E., Grade, S.K., Li, Y., Fanti, L., Pimpinelli, S.,

and Wallrath, L.L. 2005. Role of *Drosophila* HP1 euchromatic gene expression. *Dev. Dyn.* **232**: 767–774.

De Lucia, F., Ni, J.Q., Vaillant, C., and Sun, F.L. 2005. HP1 modulates the transcription of cell-cycle regulators in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* **33**: 2852–2858.

Dialynas, G.K., Terjung, S., Brown, J.P., Aucott, R.L., Baron-Luhr, B., Singh, P.B., and Georgatos, S.D. 2007. Plasticity of HP1 proteins in mammalian cells. *J. Cell Sci.* **120**: 3415–3424.

Fanti, L., Giovino, G., Berloco, M., and Pimpinelli, S. 1998. The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol. Cell* **2**: 527–538.

Fanti, L., Berloco, M., Piacentini, L., and Pimpinelli, S. 2003. Chromosomal distribution of heterochromatin protein 1 (HP1) in *Drosophila*: A cytological map of euchromatic HP1 binding sites. *Genetica* **177**: 135–147.

Hayakawa, T., Haraguchi, T., Masumoto, H., and Hiraoka, Y. 2003. Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: Distinct domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase. *J. Cell Sci.* **116**: 3327–3338.

Hearn, M.G., Hedrick, A., Grigliatti, T.A., and Wakimoto, B. 1991. The effect of modifiers of position-effect variegation on the variegation of heterochromatic genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **128**: 785–797.

Hediger, F. and Gasser, S.M. 2006. Heterochromatin protein 1: Don't judge the book by its cover! *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**: 143–150.

Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K.A., et al. 2007. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* **39**: 311–318.

Hiragami, K. and Festenstein, R. 2005. Heterochromatin protein 1: A pervasive controlling influence. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 2711–2726.

Ho, C.Y., Murnane, J.P., Yeung, A.K., Ng, H.K., and Lo, A.W. 2008. Telomeres acquire distinct heterochromatin characteristics during siRNA-induced RNA interference in mouse cells. *Curr. Biol.* **18**: 183–187.

Krogan, N.J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D.P., Beattie, B.K., Emili, A., Boone, C., et al. 2003. Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.* **23**: 4207–4218.

Lechner, M.S., Begg, G.E., Speicher, D.W., and Rauscher III, F.J. 2000. Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: Direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interactions is essential. *Mol. Cell Biol.* **20**: 6449–6465.

Lechner, M.S., Schultz, D.C., Negorev, D., Maul, G.G., and Rauscher III, F.J. 2005. The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**: 929–937.

Li, Y., Danzer, J.R., Alvarez, P., Belmont, A.S., and Wallrath, L.L. 2003. Effects of tethering HP1 to euchromatic regions of the *Drosophila* genome. *Development* **130**: 1817–1824.

Lomber, G., Wallrath, L.L., and Urrutia, R. 2006. The heterochromatin protein 1 family. *Genome Biol.* **7**: 228. doi: 10.1186/gb-2006-7-7-228.

Lu, B.Y., Emtage, P.C., Duyf, B.J., Hilliker, A.J., and Eissenberg, J.C. 2000. Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics* **155**: 699–708.

Minc, E., Allory, Y., Wormann, H.J., Courvalin, J.C., and Buen-

- dia, B. 1999. Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* **108**: 220–234.
- Muse, G.W., Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Shah, R., Parker, J.S., Grissom, S.F., Zeitlinger, J., and Adelman, K. 2007. RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat. Genet.* **39**: 1507–1511.
- Nakahigashi, K., Jasencakova, Z., Schubert, I., and Goto, K. 2005. The *Arabidopsis* heterochromatin protein 1 homolog (TERMINAL FLOWER 2) silences genes within the euchromatic region but not genes positioned in heterochromatin. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1747–1756.
- Perrini, B., Piacentini, L., Fanti, L., Altieri, F., Chichiarelli, S., Berloco, M., Turano, C., Ferraro, A., and Pimpinelli, S. 2004. HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Mol. Cell* **15**: 467–476.
- Piacentini, L., Fanti, L., Berloco, M., Perrini, B., and Pimpinelli, S. 2003. Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *J. Cell Biol.* **161**: 707–714.
- Popovici, C., Adelaide, J., Ollendorff, V., Chaffanet, M., Guasch, G., Jacrot, M., Leroux, D., Birnbaum, D., and Pcbusque, M.J. 1998. Fibroblast growth factor receptor 1 is fused to FIM in stem-cell myeloproliferative disorder with t(8;13). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 5712–5717.
- Raffa, G.D., Cenci, G., Siriaco, G., Goldberg, M.L., and Gatti, M. 2005. The putative *Drosophila* transcription factor Woc is required to prevent telomeric fusions. *Mol. Cell* **20**: 821–823.
- Ruthenburg, A.J., Li, H., Patel, D.J., and Allis, D.C. 2007. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 983–994.
- Schott, S., Coustham, V., Simonet, T., Bedet, C., and Palladino, F. 2006. Unique and redundant functions of *C. elegans* HP1 proteins in post-embryonic development. *Dev. Biol.* **298**: 176–187.
- Smallwood, A., Estève, P.O., Pradhan, S., and Carey, M. 2007. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes & Dev.* **21**: 1169–1178.
- Smothers, J.F. and Henikoff, S. 2000. The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr. Biol.* **10**: 27–30.
- Smothers, J.F. and Henikoff, S. 2001. The hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of HP1-like proteins. *Mol. Cell Biol.* **21**: 2555–2569.
- Sohal, J., Chase, A., Goldman, J.M., and Cross, N.C. 1999. Assignment of ZNF262 to human chromosome band 1p34-p32 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **85**: 306–307.
- Swaminathan, J., Baxter, E.M., and Corces, V.G. 2005. The role of histone H2Av variant replacement and histone H4 acetylation in the establishment of *Drosophila* heterochromatin. *Genes & Dev.* **19**: 65–76.
- Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Jiang, X., Chen, W., Lee, P.L., Karuturi, R.K., Tan, P.B., Liu, E.T., and Yu, Q. 2007. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes & Dev.* **21**: 1050–1063.
- Trizenberg, S.J. 1995. Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**: 190–196.
- Vakoc, C.R., Mandat, S.A., Olenchok, B.A., and Blobel, G.A. 2005. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 γ are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol. Cell* **19**: 381–391.
- van der Maarel, S.M., Scholten, I.H.J.M., Hubert, J., Philippe, C., Suijkerbuijk, R.F., Gilgenkrantz, S., Kere, J., Cremers, F.P.M., and Ropers, H.-H. 1996. Cloning and characterization of DXS6673E, a candidate gene for X-linked mental retardation in Xq13.3. *Hum. Mol. Genet.* **5**: 887–897.
- Vermaak, D., Henikoff, S., and Malik, H.S. 2005. Positive selection drives the evolution of *rhino*, a member of the heterochromatin protein 1 family in *Drosophila*. *PLoS Genet.* **1**: e9. doi: 10.1371/journal.pgen.0010009.
- Verschure, P.J., van der Kraan, I., de Leeuw, W., van der Vlag, J., Carpenter, A.E., Belmont, A.S., and van Driel, R. 2005. In Vivo HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation. *Mol. Cell Biol.* **25**: 4552–4564.
- Warren, J.T., Wismar, J., Subrahmanyam, B., and Gilbert, L.I. 2001. *Woc* (without children) gene control of ecdysone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **181**: 1–14.
- Wismar, J., Habtemichael, N., Warren, J.T., Dai, J.-D., Gilbert, L.I., and Gateff, E. 2000. The mutation without children (*rgl*) causes ecdysteroid deficiency in third-instar larvae of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **226**: 1–17.
- Xiao, S., Nalabolu, S.R., Aster, J.C., Ma, J., Abruzzo, L., Jaffe, E.S., Stone, R., Weissman, S.M., Hudson, T.J., and Fletcher, J.A. 1998. FGFR1 is fused with a novel zinc-finger gene, ZNF198, in the t(8;13) leukaemia/lymphoma syndrome. *Nat. Genet.* **18**: 84–87.
- Zeitlinger, J., Stark, A., Kellis, M., Hong, J.W., Nechaev, S., Adelman, K., Levine, M., and Young, R.A. 2007. RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat. Genet.* **39**: 1512–1516.

3.1.2. RESULTATS I INFORMACIÓ SUPLEMENTARIS

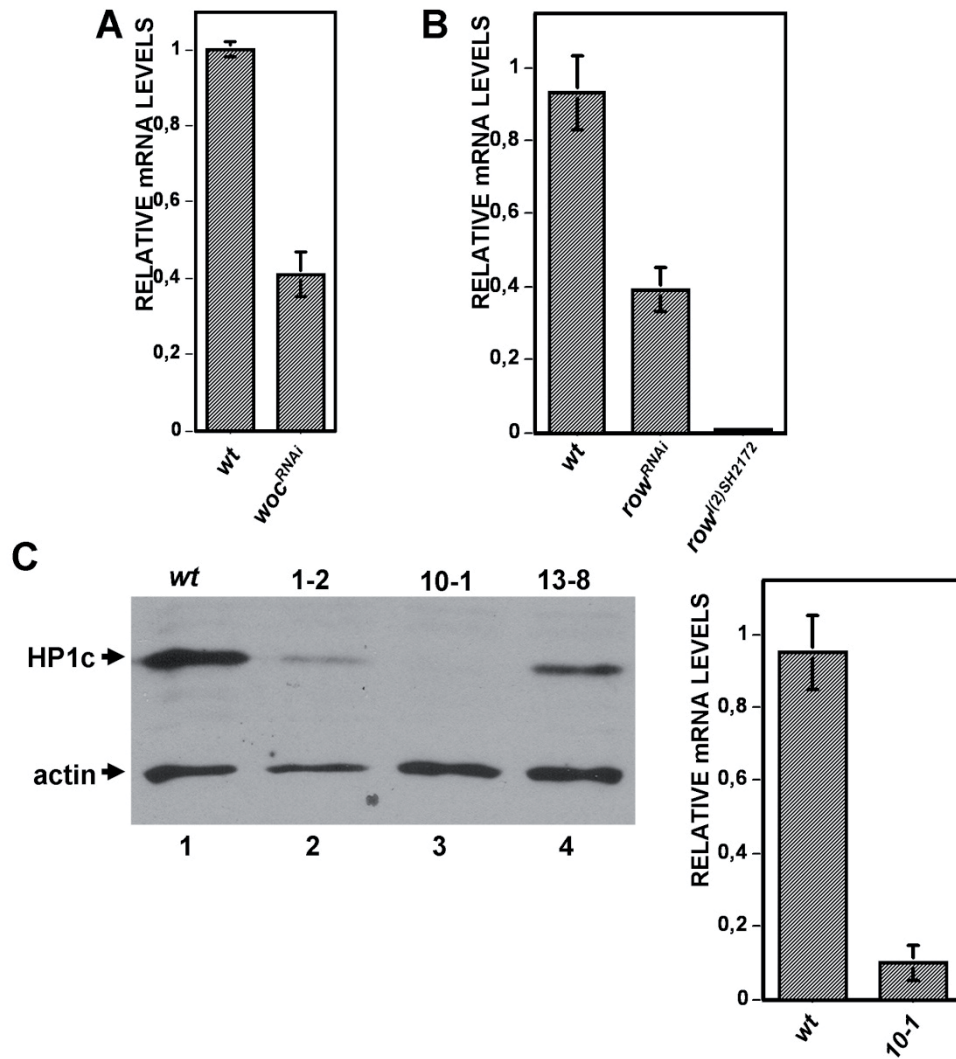


Figure S1. - Characterization of mutants used in these experiments. (A) Relative levels of WOC mRNA determined by qRT-PCR are presented for *woc^{ARNi}*; *Act5C-GAL4* and control wild-type larvae. (B) As in A but for *row^{ARNi}*; *Act5C-GAL4*, homozygous *row^{(2)SH2172}* and control wild-type larvae. (C) On the left, HP1c levels, determined by Western using aHP1c antibodies, are shown for larvae obtained from three independent transgenic lines (1-2, 10-1 and 13-8) carrying UASGAL4-hairpin insertions against the *hp1c* coding region upon crossing to an Actin5C-GAL4 driver. The signal obtained with Actin antibodies is used as loading control for comparison. Line 10-1 corresponds to *hp1c^{ARNi}* used in these experiments. On the right, relative levels of HP1c mRNA determined by qRT-PCR are presented for *hp1c^{ARNi}* (line 10-1); *Act5C-GAL4* and control wild-type larvae. Relative mRNA levels were determined in relation to GAP expression.

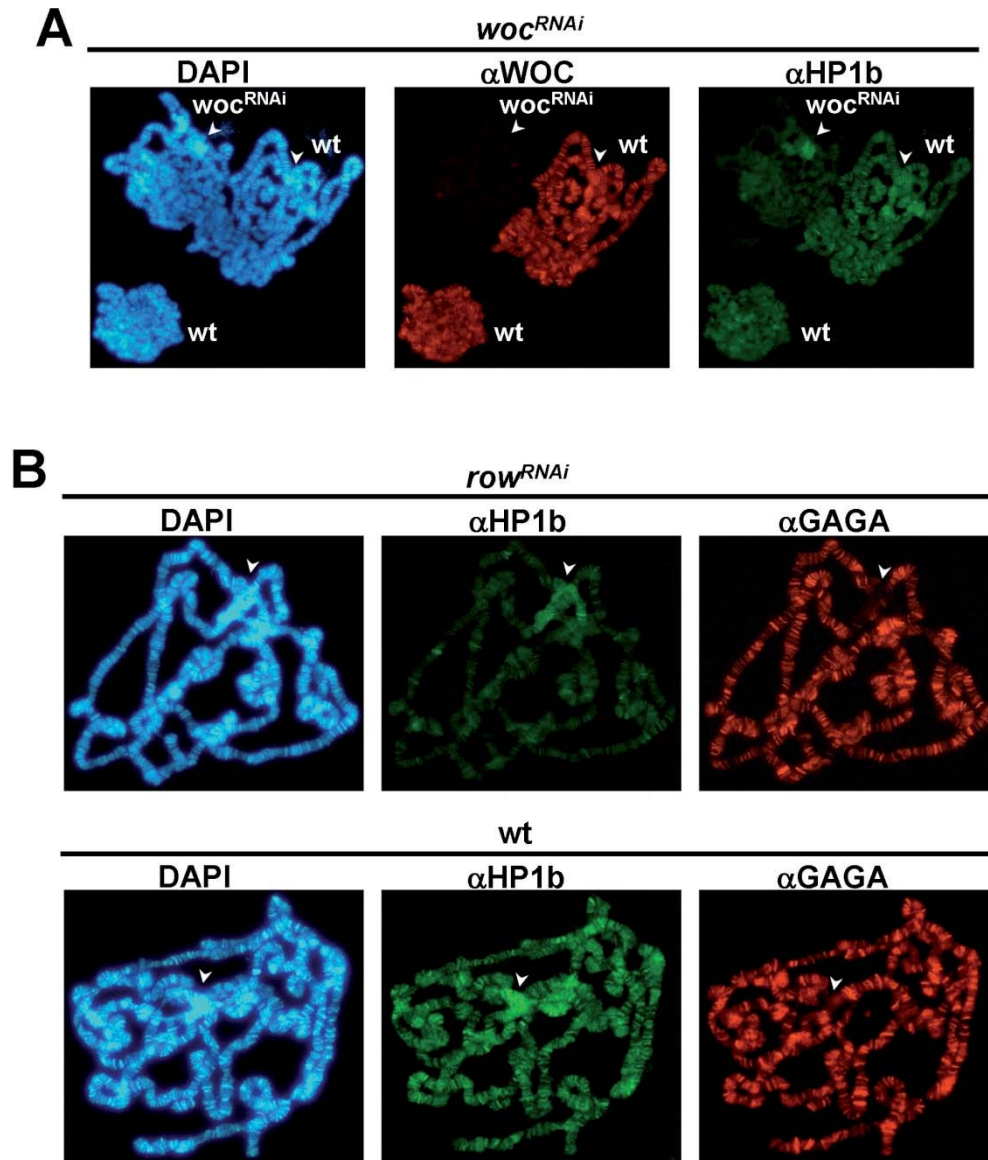


Figure S2.- Binding of HP1b to chromatin is analysed in *woc^{ARNi}* and *row^{ARNi}* mutants. (A) The pattern of immunolocalisation of HP1b (shown in green) is presented in polytene chromosomes obtained from *woc^{ARNi}*; *lio-GAL4* mutant larvae. Polytene chromosomes obtained from control wild-type chromosomes (wt), identified by their reactivity with α WOC antibodies (shown in red), were mixed and squashed together with mutant polytene chromosomes. (B) The pattern of immunolocalisation of HP1b (shown in green) is presented in polytene chromosomes obtained from *row^{ARNi}*; *lio-GAL4* mutant larvae. In this case, mutant and control wild-type (wt) chromosomes were analysed separately. As a control, the immunolocalisation patterns obtained with α GAGA antibodies (shown in red) are shown. DNA was stained with DAPI (shown in blue). Arrows indicate the position of the chromocentre.

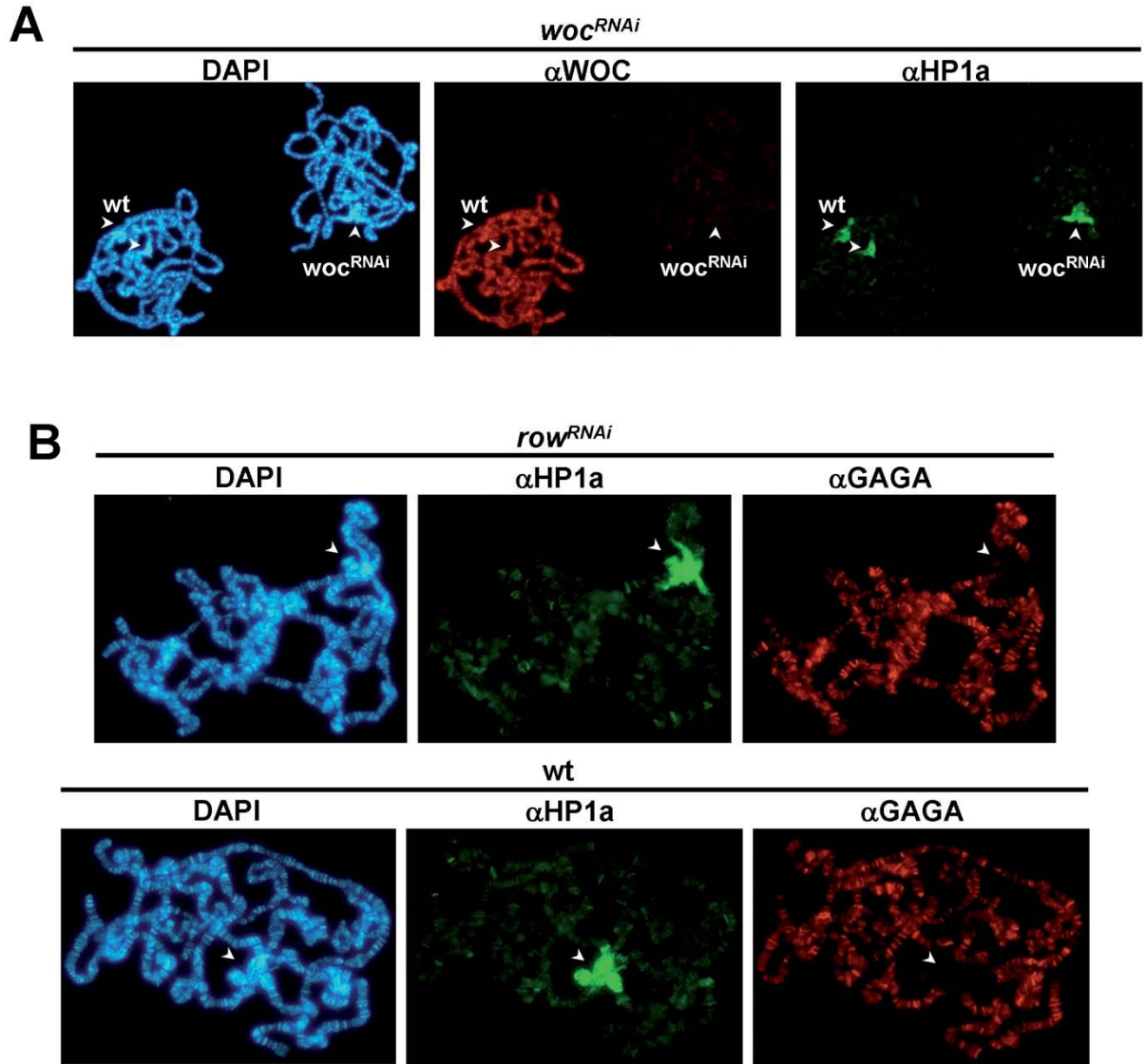


Figure S3.- Binding of HP1a to chromatin is analysed in *woc^{ARNi}* and *row^{ARNi}* mutants. (A) The pattern of immunolocalisation of HP1a (shown in green) is presented in polytene chromosomes obtained from *woc^{ARNi}*; *lio-GAL4* mutant larvae. Polytene chromosomes obtained from control wild-type chromosomes (wt), identified by their reactivity with α WOC antibodies (shown in red), were mixed and squashed together with mutant polytene chromosomes. (B) The pattern of immunolocalisation of HP1a (shown in green) is presented in polytene chromosomes obtained from *row^{ARNi}*; *lio-GAL4* mutant larvae. In this case, mutant and control wild-type (wt) chromosomes were analysed separately. As a control, the immunolocalisation patterns obtained with α GAGA antibodies (shown in red) are shown. DNA was stained with DAPI (shown in blue). Arrows indicate the position of the chromocentre.

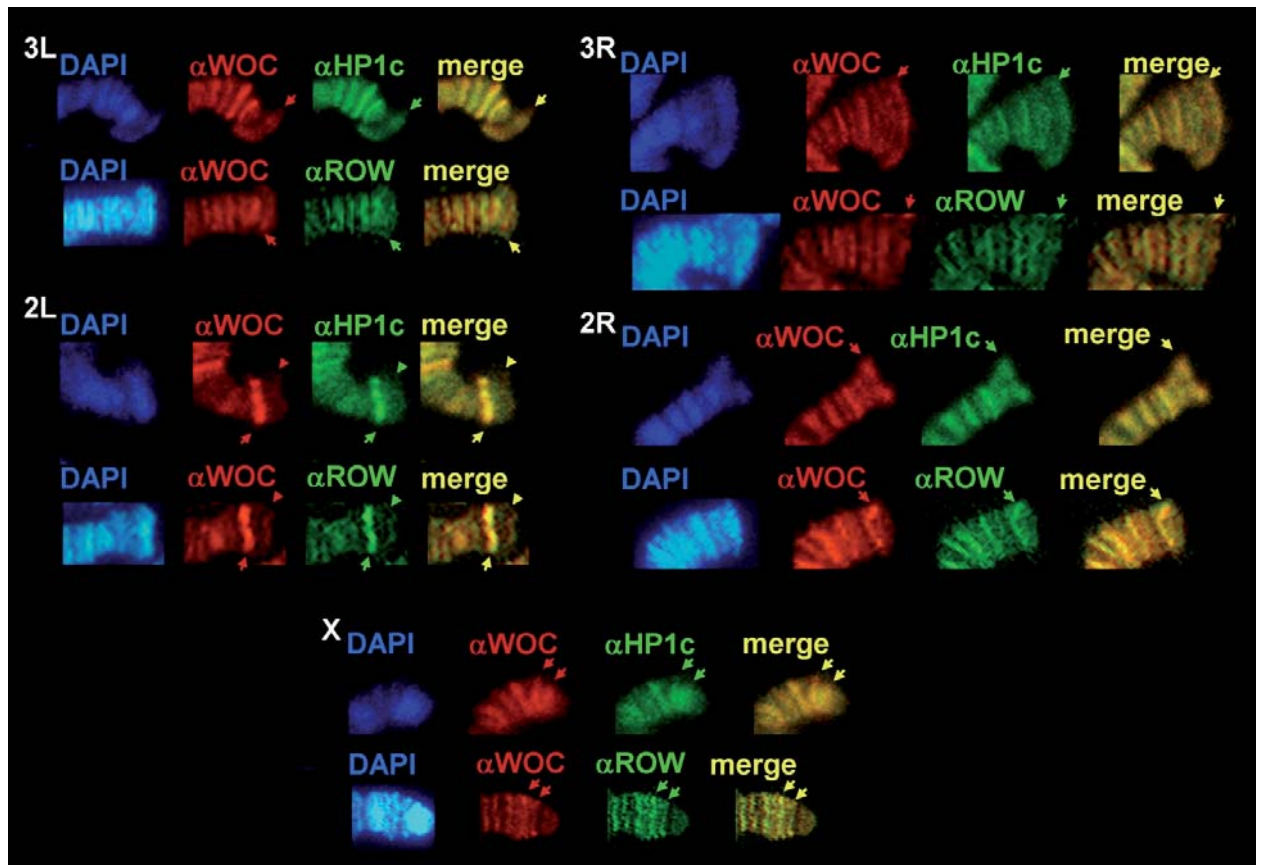


Figure S4.- HP1c and ROW co-localise with WOC at telomeres. The extent of co-localisation of WOC (shown in red) with HP1c and ROW (shown in green) is presented for all five *Drosophila* telomeres. Arrows indicate distinct aHP1c (green), aROW (green) and aWOC (red) signals at telomeres. Yellow arrows indicate co-localisation.

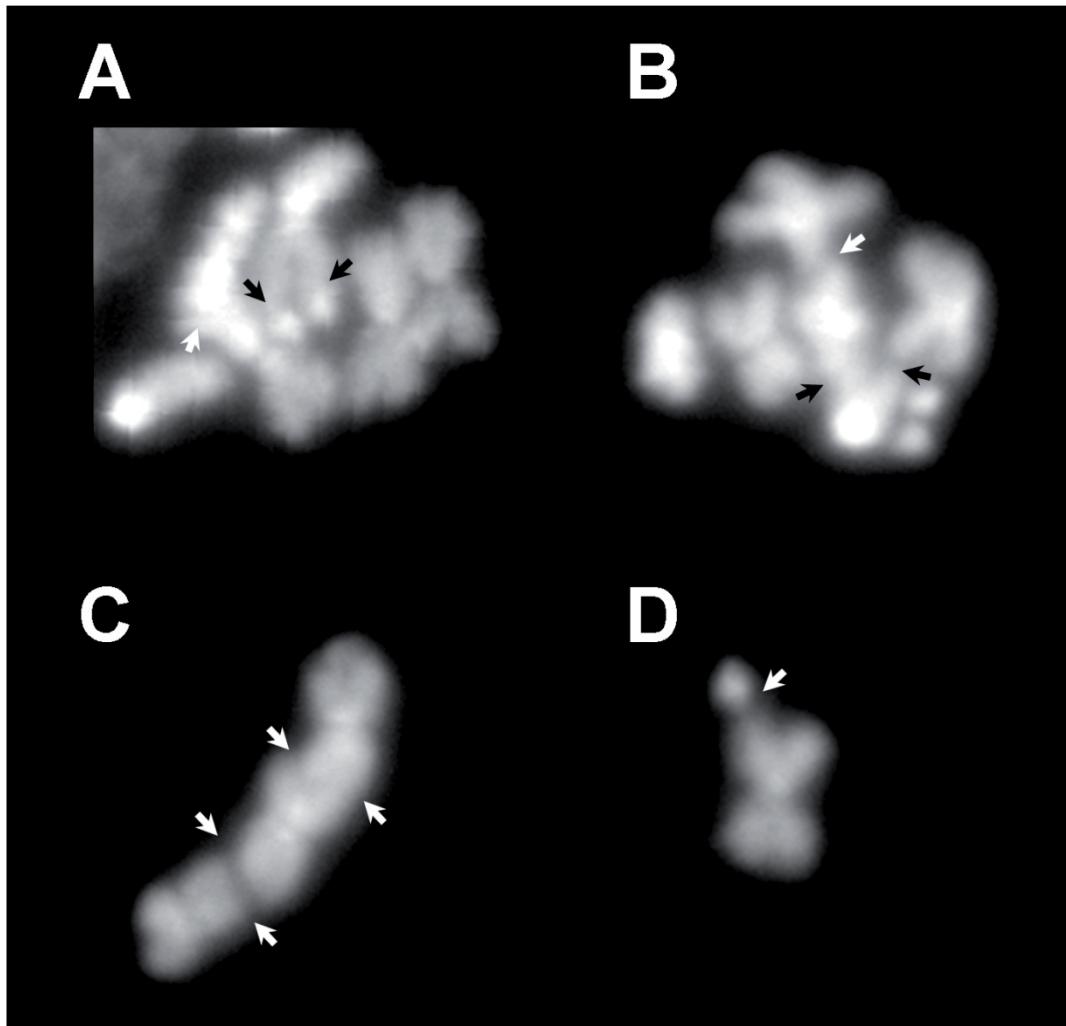


Figure S5.- ROW is required to prevent telomere fusions. In brains prepared from homozygous *row*^{*l(2)SH2172*} mutant larvae, mitotic chromosomes show telomere fusions. Several examples of observed telomere-fusions (indicated by the arrows) are presented: (A) two four-chromosomes are fused to an autosome (black arrows), and an Y-chromosome is fused to an autosome (white arrow); (B) Two autosomes are fused (white arrow) and an Y-chromosome is fused to two autosomes (black arrows); (C) Three autosomes are fused, and (D) one four chromosome is fused to an autosome.

TABLE S1.- Identification of WOC. The results of Mascot Search are presented. Sequence coverage (A) corresponding to the identified peptides (B) is shown.

Match to: Q6AWL3_DROME RE05635p.- *Drosophila melanogaster*

Score: 1239

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

A) Sequence Coverage: 11% (matched peptides are shown in bold)

1	MEEISSLD	SF	GADSNARPES	ATPRSEEQQD	QDRQQTAPAA	SETLDTPAS
51	PAEDAAQES		KPPPSKEADD	DFEQISEGSL	DADDNQSRDK	AASTPADPVD
101	AEEPAAEPTP		NEEPQGGED	QPQTEAVRVD	PQEEPEEAEE	ETDALQATAE
151	EVEAAAAEAD		AVDGGPASPE	AVDVDEGEVD	AEGEAEQEAE	DDAALDREAT
201	DDVDMQSVGA		DSHQAEDAEP	PEGRDEVDT	LEEQENGQDP	DEREKDAAAD
251	EDDPDAEGDA		ESEQVDENAE	ETGEAEHGDD	TVENVLEPEE	SDVCLIPDDQ
301	ETEVTAEKE		LARENAEKAA	EEEEAEERQA	KTPDNDRKSP	ADAAADPEDD
351	SAAAVDATDV		SPTTPTADGV	AAAANEEEEAG	GDVPDPDEPT	AESSSSAGAG
401	EPGSTPKIII		SWIVGSVQKC	KQCGDEKNCG	FRYRSPEESE	EMDKEKENDK
451	AEENAEEGEE		EEARQKPAAP	SGFEYICDTA	CVDALLEDQP	KGYFVRRKKF
501	LVEEVVREEG		AAEAEASADG	EGGDAEEEA	PANTQDCLQC	KDKTRCKYFI
551	KQDQDCFYIC		NDDCFNLLNA	EEPDKFKLKR	HSIRVRNIGA	TTLQPPQNSP
601	TKR TDGSVVA		RTVEEAETAR	LDRIESFRRR	CADCEADINT	DEKQLMWETM
651	DFCNEVCLGS		YQRTIGSTCE	TCKQEVSIA	LGKYCVRFGF	DVRQFCCAGC
701	LNTFKKGLKT		CSCCQKDISG	GQEGFLAPVG	DKDQFKDFCS	QSCLRRYESM
751	CNPRRKLRTD		VCGVCNNQKP	VRVEMLEDR	EHYFCSNCPF	SAFKFVSNVN
801	ADPCAMCSKY		FERRSAESYT	IYNEQQSPKV	FCSRVCINVI	IIVNRHIVSC
851	QWCKVKKYNF		DMIYQIGGPH	DQETLTCSIN	CLTMHGVSCN	ISARAVTKCD
901	NCSNFNTPOY		HLTMSDASMR	NFCTYQCVMQ	FQNQFARAPL	TLDSLDPPSS
951	AGSSKSQQQS		NRGNKNAAPF	PTGLPKRVKL	KLSHTGKGGV	GGKKS GSGTM
1001	LPVISTVQSL		ASGETEARIG	NLTVRRKRGR	PRESGTSSPP	LSMPGVHPPA
1051	QRGRPRKHAV		DYSARSPSPT	MSGGSSHMG	PVRRNTTTT	DFGPATVTET
1101	KIITVPPYPK		AVRNVNISCK	PLTVTQGEQC	SPDVRDCATQ	TEKDYSNKVL
1151	IPVPVPIFVP		QPMYMSAPF	PVPVPIPLPI	PVPIFIPTR	NTAQGILKEI
1201	KKIQDKMPED		PLEAELLMA	EMVAEEKHES	DSDSNEIKP	DPGLVALQYQ
1251	NSLESVAQQQ		QQQQVVDVSG	AGHNPYGDD	LQIALKMATG	DYDNHHQTST
1301	VDLETSMTAN		TISSQSPMGH	DGMGMGVH	LDQQHHMLDA	TQRTARGRKR
1351	GVGVMDPPN		RNSRSPVKRQ	RGGEMDHSAL	QQQSQQAQQP	QEKPDQMFL
1401	KYTFGVNAWK		QWVMTKNADI	EKSSMRRRPF	KTELLQMTAD	ELNYSCLFLV
1451	KEVRKPNNGTE		YAPDTIYYLV	LGIQQYLYVN	GRIDNIFYDP	YYERFTECLD
1501	EVARKFSVLY		NDSQYIVTRV	EEEHLWECKQ	LGASHPHVLL	STLMFFNTKH
1551	FNLTTVEEHM		QLSFESHMKH	WKRSSQNSKV	PGSRNVLLRF	YPPQAGLDAN
1601	PRKKKVYEQQ		ENEENPLRCP	VRLYEFYLSK	CPESVKTRND	VFYLQPERSC
1651	VPDSPVWYST		QALGQDALQR	MLHRVKMVE	INIALTT	

B) Peptides Identified

Start – End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Sequence
319 - 328	581.86	1161.71	1161.48	0.23	K.AAEAAAAEER.Q (Ions score 65)
408 - 419	671.95	1341.89	1341.80	0.08	K.IIIISWIVGSVQK.C (Ions score 58)
500 - 507	495.83	989.65	989.55	0.09	K.FLVEEVVR.E (Ions score 54)
587 - 603	911.99	1821.97	1821.97	-0.00	R.NIGATTLQPPQNSPTKR.T (Ions score 40)
587 - 603	608.36	1822.06	1821.97	0.09	R.NIGATTLQPPQNSPTKR.T (Ions score 22)
612 - 620	503.29	1004.57	1004.48	0.09	R.TVEEAETAR.L (Ions score 56)
938 - 955	871.96	1741.91	1741.87	0.03	R.APLTLDSLDPPSSAGSSK.S (Ions score 85)
938 - 955	871.96	1741.91	1741.87	0.03	R.APLTLDSLDPPSSAGSSK.S (Ions score 77)
963 - 976	706.40	1410.79	1410.76	0.02	R.GNKNAAFPPTGLPK.R (Ions score 49)

966 - 976	556.83	1111.65	1111.60	0.04	K.NAAPFPTGLPK.R (lons score 32)
966 - 977	634.90	1267.79	1267.70	0.08	K.NAAPFPTGLPKR.V (lons score 51)
1019 - 1025	386.75	771.49	771.46	0.03	R.IGNLTVR.R (lons score 59)
1085 - 1101	907.93	1813.85	1813.84	0.01	R.NTTTTMDFGPATVTETK.I (lons score 73)
1085 - 1101	915.94	1829.87	1829.84	0.03	R.NTTTTMDFGPATVTETK.I Oxidation (M) (lons
score55)					
1102 - 1110	514.35	1026.69	1026.61	0.07	K.IITVPPYPK.A (lons score 32)
1191 - 1198	422.77	843.53	843.48	0.04	R.NTAQGILK.E (lons score 50)
1191 - 1201	607.97	1213.93	1213.70	0.22	R.NTAQGILKEIK.K (lons score 35)
1351 - 1361	570.84	1139.67	1139.58	0.09	R.GVGVMMDPPNR.N (lons score 40)
1351 - 1361	578.85	1155.69	1155.57	0.11	R.GVGVMMDPPNR.N Oxidation (M) (lons score 37)
1590 - 1602	723.39	1444.77	1444.71	0.06	R.FYPPQAGLDANPR.K (lons score 69)
1606 - 1618	824.41	1646.81	1646.75	0.05	K.VYEQQENEENPLR.C (lons score 57)
1623 - 1630	531.88	1061.75	1061.54	0.20	R.LYEFYLSK.C (lons score 34)
1637 - 1648	769.43	1536.85	1536.77	0.08	K.TRNDVFYLQPER.S (lons score 55)
1639 - 1648	640.88	1279.75	1279.62	0.13	R.NDVFYLQPER.S (lons score 49)

TABLE S2.- Identification of ROW/CG8092. The results of Mascot Search are presented. Sequence coverage (A) corresponding to the identified peptides (B) is shown.

Match to: Q9V795_DROME CG8092-PA, isoform A (RE01954p).- *Drosophila melanogaster*.

Score: 1239

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

A) Sequence Coverage: 30% (matched peptides are shown in bold)

1	MTRVTRSEIS	LDMEFWVEEL	SPAQLAYYEK	ITNEHNAVKG	ALKNAVSANE
51	GKELFNGQVF	QAYSFKGK VL	QELKEATLPK	KPPKPTDSPS	TPAAQSGGTG
101	RGRGRPPRPQ	SNIAYLESSD	EGDDDMPLAK	RLALSAGKKA	VAVANASSSF
151	TPKSSSKAAS	AASGGSSSPV	PKSSGKLFKE	SKPDIESPPK	NYRPAEVNSV
201	GGLVVGSTDE	SKDSKDGGKDG	KDNKMQGKTY	PSLVVLAKPF	LK IKDMAATR
251	SKLDSKVKL	LMLTPNKFCE	WLLQEGLLRA	QQHCINHRNN	ELK LG IYSDV
301	TKFPYTG GYV	WISECCPYRF	VSVFNNSIFE	GAQHPPTFLL	KLIYHWACQT
351	SIQNVVQWVK	VDSVIYKGIY	TWLRAICTLA	VHQKCKKLGG	PGK FVEVGVI
401	SLGTTSQDGS	QRQVKVEVLG	VDYAEKSIR	LRAVEPITDG	DRNYKKRFQA
451	ILEPLSRWVH	KDSTICIDLT	VDKITLFSMG	FKNIVQAAAT	DNTAKHNNSA
501	VMEYLRRIVP	RMFQNTLSLL	SRQMIQQFLD	ELVWRESFGT	YALQAFNNII
551	IHIAEQTRVT	TNETITQRLY	QVATNPFKDW	SILPANYKET	PANAAPKRLK
601	KPINDADYV	SNKIPKKEKD	RDIASSGVKR	GRPPNALGTP	PPQLPIKKG P
651	GRPPGSTNQ T	KGDRATTSSS	KSLSKSLIAK	GLGKKPK EKD	EKIPMVIKKE
701	EDDLRGLLEL	YYGISDGTDE	YHEIFPYSTP	RTVHNELAKT	VECPICLN
751	SFDSNEK LQT	HLVSHISPEG	KQHQFQCLFC	LEKHPTESVL	AKHNQIMHPT
801	ETKTEGSPSY	YCLICQQRH N	SLHLLTAHLQ	KVHSTLELPY	WCHSCGYRSS
851	SHRDLVRHFY	DDHKHQNFLQ	CPYCLDIFYF	SKLGVVNQLR	IEHYFMHLDE
901	HINKRDP	SLR CQKCSLSFLE	KGDLK QHAVQ	HHVSMTKTNR	PVRLLLLNSM
951	LIPPPKIRTH	HREQPPFSTY	KRPVFFAFLE	GKTCAECNTD	FASEETHYTG
1001	WLHCVKCNYQ	TCCERAQFRH	GVECNNGFVD	AMEVNMPQEM	HCICGFATGN
1051	GNKMAQHLAN	CGLSTCYP	SL EAASENAV	KR NMLDMLGLVR	RDGETSGEGA
1101	DISETADDVA	DQSSDMLPPQ	EDHHLQQHHQ	QVGHQQQM	QGPNEPQAE
1151	QEYLSAPVEH	EPVQNM	VPVHQ SMPVQQT	GP QFGEMEAAPV	LLDTQQQVQ
1201	TPDYAQVSVV	QQHQQQQPYG	LSNYGQSSLA	TDIDMPLIGE	LSEPNAPPTP
1251	QFLGEVHTPM	FDAVAAAEQQ	HYHAQH	HHHP Q	

B) Peptides Identified

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Sequence
69 – 80	1368.74	1367.73	1367.80	-0.07	K.VLQELKEATLPK.K (lons score 48)
69 – 80	684.97	1367.93	1367.80	0.12	K.VLQELKEATLPK.K (lons score 63)
81 –101	679.67	2035.99	2036.03	-0.04	K.KPPKPTDSPSTPAAQSGGTGR.G (lons score 49)
81 –101	1019.01	2036.01	2036.03	-0.02	K.KPPKPTDSPSTPAAQSGGTGR.G (lons score 86)
81 –101	1019.04	2036.07	2036.03	0.04	K.KPPKPTDSPSTPAAQSGGTGR.G (lons score 75)
81 - 101	679.71	2036.11	2036.03	0.08	K.KPPKPTDSPSTPAAQSGGTGR.G (lons score 62)
81 –101	679.73	2036.17	2036.03	0.14	K.KPPKPTDSPSTPAAQSGGTGR.G (lons score 49)
131 – 138	408.29	814.57	814.50	0.06	K.RLALSAGK.K (lons score 32)
132 – 139	394.26	786.51	786.50	0.01	R.LALSAGK.A (lons score 31)
140 - 153	675.39	1348.77	1348.70	0.07	K.AVAVANASSSFTPK.S (lons score 68)
158 - 172	637.33	1272.65	1272.63	0.01	K.AASAASGGSSSPVPK.S (lons score 33)
158 - 172	637.37	1272.73	1272.63	0.09	K.AASAASGGSSSPVPK.S (lons score 101)
177 - 190	808.01	1614.01	1613.87	0.14	K.LFKESKPDIESPPK.N (lons score 68)
180 - 190	613.92	1225.83	1225.62	0.21	K.ESKPDIESPPK.N (lons score 26)
243 - 250	453.30	904.59	904.48	0.11	K.IKDMAATR.S (lons score 44)

294 - 302	498.29	994.57	994.53	0.03	K.LGIYSDVTK.F (lons score 49)
394 - 412	990.52	1979.03	1979.00	0.03	K.FVEVGVISLGTTSQDGSQR.Q (lons score 43)
416 - 427	692.86	1383.71	1383.69	0.01	K.VEVLGVYDYAEK.S (lons score 60)
416 - 427	692.89	1383.77	1383.69	0.07	K.VEVLGVYDYAEK.S (lons score 87)
431 - 442	671.42	1340.83	1340.70	0.12	R.LRAVEPITDGDR.N (lons score 50)
433 - 442	536.77	1071.53	1071.52	0.01	R.AVEPITDGDR.N (lons score 52)
433 - 445	739.37	1476.73	1476.72	0.00	R.AVEPITDGDRNYK.K (lons score 37)
433 - 446	803.43	1604.85	1604.82	0.03	R.AVEPITDGDRNYKK.R (lons score 27)
447 - 457	665.41	1328.81	1328.76	0.05	K.RFQAILEPLSR.W (lons score 22)
448 - 457	587.36	1172.71	1172.66	0.05	R.FQAILEPLSR.W (lons score 52)
448 - 457	587.42	1172.83	1172.66	0.17	R.FQAILEPLSR.W (lons score 46)
483 - 495	658.88	1315.75	1315.67	0.07	K.NIVQAAATDNTAK.H (lons score 49)
483 - 495	658.92	1315.83	1315.67	0.15	K.NIVQAAATDNTAK.H (lons score 80)
496 - 506	667.39	1332.77	1332.62	0.14	K.HNNSAVMEYLR.R (lons score 67)
496 - 507	497.27	1488.79	1488.73	0.06	K.HNNSAVMEYLR.R.I (lons score 20)
512 - 522	655.42	1308.83	1308.69	0.14	R.MFQNTLSLLSR.Q (lons score 82)
512 - 522	663.40	1324.79	1324.68	0.10	R.MFQNTLSLLSR.Q Oxidation (M) (lons score 67)
559 - 568	581.81	1161.61	1161.60	0.01	R.VTTNETITQR.L (lons score 24)
559 - 568	581.83	1161.65	1161.60	0.05	R.VTTNETITQR.L (lons score 61)
569 - 578	590.96	1179.91	1179.63	0.28	R.LYQVATNPFFK.D (lons score 41)
569 - 578	590.96	1179.91	1179.63	0.28	R.LYQVATNPFFK.D (lons score 42)
598 - 613	930.54	1859.07	1859.03	0.04	K.RLKKPINDADYVVSNNK.I (lons score 39)
598 - 613	620.75	1859.23	1859.03	0.20	K.RLKKPINDADYVVSNNK.I (lons score 38)
599 - 616	1021.60	2041.19	2041.16	0.03	R.LKKPINDADYVVSNNKIPK.K (lons score 31)
601 - 613	731.89	1461.77	1461.75	0.02	K.KPINDADYVVSNNK.I (lons score 21)
601 - 616	900.98	1799.95	1799.98	-0.03	K.KPINDADYVVSNNKIPK.K (lons score 36)
601 - 616	601.07	1800.19	1799.98	0.21	K.KPINDADYVVSNNKIPK.K (lons score 25)
620 - 629	524.29	1046.57	1046.54	0.03	K.DRDIASSGVK.R (lons score 29)
620 - 629	524.33	1046.65	1046.54	0.11	K.DRDIASSGVK.R (lons score 56)
620 - 630	602.42	1202.83	1202.64	0.19	K.DRDIASSGVK.R.G (lons score 40)
631 - 647	585.02	1752.04	1752.00	0.03	R.GRPPNALGTPPPQLPIK.K (lons score 32)
631 - 647	877.04	1752.07	1752.00	0.06	R.GRPPNALGTPPPQLPIK.K (lons score 42)
631 - 648	941.06	1880.11	1880.10	0.01	R.GRPPNALGTPPPQLPIK.K.G (lons score 34)
649 - 664	812.96	1623.91	1623.81	0.10	K.GPGRPPGSTNQTKGDR.A (lons score 27)
688 - 698	665.96	1329.91	1328.74	1.17	K.EKDEKIPMVIK.K (lons score 27)
758 - 771	773.46	1544.91	1544.83	0.07	K.LQTHLVSHISPEGK.Q (lons score 66)
758 - 771	515.98	1544.92	1544.83	0.09	K.LQTHLVSHISPEGK.Q (lons score 33)
784 - 792	491.30	980.59	980.53	0.06	K.HPTESVLAK.H (lons score 45)
784 - 792	491.31	980.61	980.53	0.08	K.HPTESVLAK.H (lons score 42)
793 - 803	667.83	1333.65	1334.64	-0.99	K.HNQIMHPTETK.T (lons score 31)
793 - 803	668.36	1334.71	1334.64	0.07	K.HNQIMHPTETK.T (lons score 44)
819 - 831	756.48	1510.95	1510.84	0.11	R.HNSLHLLTAHLQK.V (lons score 68)
883 - 890	449.79	897.57	897.54	0.03	K.LGVVNQLR.I (lons score 61)
926 - 937	701.90	1401.79	1401.69	0.09	K.QHAVQHHSMTK.T (lons score 27)
944 - 956	725.48	1448.95	1448.84	0.10	R.LLLNNSMLIPPPK.I (lons score 44)
944 - 956	733.47	1464.93	1464.84	0.09	R.LLLNNSMLIPPPK.I Oxidation (M) (lons score 45)
959 - 971	814.44	1626.87	1626.79	0.08	R.THHREQPPFSTYK.R (lons score 33)
963 - 971	548.78	1095.55	1095.52	0.02	R.EQPPFSTYK.R (lons score 33)
1081-1090	589.34	1176.67	1176.60	0.07	R.NMLDMLGLVR.R Oxidation (M) (lons score 39)
1081-1090	589.37	1176.73	1176.60	0.13	R.NMLDMLGLVR.R Oxidation (M) (lons score 54)
1081-1090	597.33	1192.65	1192.59	0.05	R.NMLDMLGLVR.R 2 Oxidation (M) (lons score 34)

Resultats

TABLE S3.- The 158 genes that are differentially expressed in the same direction in *hp1c^{ARNi}*, *woc^{ARNi}* and *row^{ARNi}* are listed.

Affy.ID	Title	Symbol	Chromosome	Position
1637411_s_at	Purine-rich binding protein-alpha	Pur-alpha	4	578607
1628767_s_at	Mediator complex subunit 26	MED26	4	799079
1624224_at	---	---	4	1286271
1633329_at	yellow-h	yellow-h	4	248549
AFFX-r2-Dros-Act5C-M_s_at	---	---	---	NA
1636486_at	TBP-associated factor 30kD subunit beta /// Gdi-related	Gdi /// Taf11	2L	9762360
1633147_at	CG10659	CG10659	2L	20025112
1624619_s_at	CG31780 /// CG18477	CG18477 /// CG31780	2L	15696042
1636718_s_at	CG4502	CG4502	2L	7194907
1631604_at	CG9511	CG9511	2L	6395852
1630334_at	CG15406	CG15406	2L	3309222
1641446_s_at	CG5171	CG5171	2L	7402854
1641412_at	CG31809	CG31809	2L	16853745
1626856_at	CG12560	CG12560	2L	8008441
1628644_at	CG17350	CG17350	2L	19380929
1631632_s_at	Bicaudal-C	BicC	2L	16042031
1639997_s_at	---	---	2L	22527648
1636513_a_at	kismet	kis	2L	210731
1635498_at	CG9259	CG9259	2L	21089566
1632903_at	---	---	2L	15230556
1636233_at	CG16995	CG16995	2L	2308026
1635700_at	CG31792	CG31792	2L	18997994

Resultats

1635759_at	CG13775	CG13775	2L	6954584
1624970_s_at	Cullin3	gft	2L	15266026
1623844_at	elfless	elfless	2L	18009909
1631889_at	CG31752	CG31752	2L	18839928
1635914_at	CG10413	CG10413	2L	18599748
1626526_at	Turandot F	TotF	2L	19911897
1635380_at	CG30413	CG30413	2R	19217179
1639299_at	UDP-glycosyltransferase 37c1	Ugt37c1	2R	12730934
1633471_at	Peroxiredoxin 2540	Prx2540-2	2R	6306222
1638676_at	gomdanji	gom	2R	18027439
1640386_at	windbeutel	wbl	2R	15137265
1623659_at	Odorant-binding protein 56d	Obp56d	2R	15590643
1638869_at	CG10112	CG10112	2R	10400046
1623364_at	CG4250	CG4250	2R	18551192
1631427_s_at	synaptojanin	synj	2R	17967675
1624618_at	chrowded	chrw	2R	19407361
1632591_at	Pherokine 3	Phk-3	2R	20858365
1628997_at	CG14763	CG14763	2R	3854278
1631817_a_at	Glutamate oxaloacetate transaminase 1	Got1	2R	12025856
1632797_a_at	Diacyl glycerol kinase	Dgk	2R	3723746
1636620_s_at	lethal (2) 08717	l(2)08717	2R	14684768
1631496_at	CG4563	CG4563	2R	20338604
1638043_a_at	MYOTUBULARIN-like	CG3530	2R	19276528
1629638_at	CG8561	CG8561	2R	10159104
1637056_s_at	CG11200	CG11200	2R	16192019
1627280_s_at	septin	pnut	2R	4124773
1641157_at	CG1888	CG1888	2R	5432676
1634207_at	CG16799 /// GA14157	CG16799	2R	16540719
1640628_at	CG13326	CG13326	2R	9017015
1627084_s_at	Syntaxin Interacting Protein 2	SIP2	2R	8190041
1636906_s_at	Sans	Sans	2R	8824399
1637615_at	CG13192	CG13192	2R	7712920

Resultats

1636495_at	---	---	2R	16189912
1630703_at	CG8963	CG8963	2R	12903839
1634325_a_at	Misexpression suppressor of KSR 2	MESK2	2R	17389590
1637763_a_at	CG8298	CG8298	2R	7876637
1624074_at	Odorant-binding protein 56a	Obp56a	2R	15585227
1636153_at	CG6984	CG6984	2R	12979514
1637174_s_at	---	---	2R	16437837
1639707_a_at	CG4712	CG4712	2R	9136398
1624159_at	Cyp9h1	Cyp9h1	2R	8728340
1631017_at	CG18778	CG18778	3L	6124412
1627026_at	Ecdysone-dependent gene 78E	Edg78E	3L	21289862
1636423_at	CG8012	CG8012	3L	8208538
1633850_at	CG18156	CG18156	3L	6961134
1635047_s_at	trio	trio	3L	995977
1635609_at	CG40294	CG40294	3L	23573352
1631456_at	CG6812	CG6812	3L	19056271
1638991_at	CG5506	CG5506	3L	17876748
1629713_at	Psf1	Psf1	3L	1247065
1638372_at	---	---	3L	2171776
1639587_s_at	CG7458	CG7458	3L	21948210
1626667_at	miple	miple	3L	267763
1633141_at	---	---	3L	13259872
1633093_at	CG12983	CG12983	3L	20955758
1631127_at	CG10424	CG10424	3L	19089492
1629250_at	CG10077	CG10077	3L	6942586
1633803_at	Phosphogluconate mutase	Pgm	3L	16119154
1639457_at	CG32284	CG32284	3L	3186663
1633798_at	Ypsilon Schachtel	yps	3L	12114625
1626645_at	CG8596	CG8596	3L	7334982
1626933_s_at	CG2469	CG2469	3L	1307223
1637137_a_at	dynein	Dhc64C	3L	4812760
1632849_at	no optic lobe	nol	3L	11123934

Resultats

1626561_at	CG7692	CG7692	3L	17346176
1632794_a_at	CG11526	CG11526	3L	3322273
1637269_at	CG6310	CG6310	3L	11062150
1630823_at	CG32210	CG32210	3L	19537444
1626540_at	CG14076	CG14076	3L	18901643
1631514_at	CG6244	CG6244	3L	15801517
1639799_s_at	CG32074 /// CG14143	CG14143	3L	11128105
1624242_at	CG32301	CG32301	3L	2244529
1624863_a_at	CG8042	CG8042	3L	7965548
1624301_at	lethal (3) 01640	Bre1	3L	5783273
1625050_s_at	---	---	3LHet	854127
1635258_s_at	---	---	3LHet	956252
1635512_at	CG11893	CG11893	3R	21115598
1638488_at	---	---	3R	12946200
1628592_at	CG15539	CG15539	3R	26332074
1634998_at	CG9269	CG9269	3R	9441725
1638238_at	CG5778	CG5778	3R	17911092
1633920_at	CG5715	CG5715	3R	20119148
1636489_at	CG5987	CG5987	3R	23073948
1624497_at	---	---	3R	1094802
1624580_at	CG9362	CG9362	3R	5281233
1635693_at	CG32946	CG32946	3R	577555
1640695_at	CG10425	CG10425	3R	21086677
1627946_at	CG12068	CG12068	3R	25620357
1631581_at	CG18268	CG18268	3R	3628751
1635674_at	CG6901	CG6901	3R	12149184
1639046_at	CG5454	CG5454	3R	14808677
1635769_at	CG8773	CG8773	3R	9120471
1630263_at	CG31370	CG31370	3R	21128282
1635500_a_at	a la voile et a la vapeur	pros	3R	7198509
1623398_at	CG4830	CG4830	3R	8033878
1637900_at	CG11852	CG11852	3R	21063346

Resultats

1632106_at	CG9747	CG9747	3R	26011141
1631523_at	CG10824	CG10824	3R	16984954
1626857_at	CG4408	CG4408	3R	19187610
1638567_at	CG1092	CG1092	3R	92695
1632484_at	CG2218	CG2218	3R	26251115
1640850_at	CG31012	CG31012	3R	26648194
1634243_a_at	CG4673	CG4673	3R	21436775
1635725_a_at	unc-115	unc-115	3R	5512781
1628931_at	CG3301	CG3301	3R	17100827
1636197_at	CG31013	CG31013	3R	26469602
1630886_at	methionine-R-sulfoxide reductase	SelR	3R	6689070
1633748_at	CG2014	CG2014	3R	25341566
1639025_at	Trc8	Trc8	3R	25324565
1637439_at	CG14709	CG14709	3R	7394971
1630044_s_at	Glycogen synthase	CG6904	3R	10967561
1633681_at	CG2519	CG2519	3R	1365224
1640406_at	CG31327	CG31327	3R	9983318
1631566_at	CG11069	CG11069	3R	20720465
1637428_a_at	tamou	pyd	3R	4653199
1636580_at	CG17387	CG17387	3R	606992
1641072_at	PEK	PEK	3R	1284284
1640426_at	CG31287	CG31287	3R	12029092
1637944_at	CG10841	CG10841	3R	9457663
1634452_s_at	endophilin	endoA	3R	14732331
1623346_at	CG2861	CG2861	X	4691393
1623874_at	CG14215	CG14215	X	19546339
1627432_at	CG6041	CG6041	X	5842222
1629629_at	CG12151	CG12151	X	7625808
1624408_at	NETRIN	NetA	X	14498035
1631650_a_at	CG2056	CG2056	X	8465131
1624543_s_at	---	---	X	10242886
1641610_at	CG7874	CG7874	X	19107289

Resultats

1631969_at	CG15221	CG15221	X	11628221
1631419_at	yolk protein	Yp3	X	13653577
1627891_at	CG12725	CG12725	X	13296255
1623556_at	CG32669	CG32669	X	10737137
1632896_at	CG18166	CG18166	X	373895
1624758_at	CG4318	CG4318	X	13048182
1633852_at	found in neurons	fne	X	12836632
1636615_at	embryonic lethal, abnormal vision	elav	X	411256

3.1.3. MATERIALS I MÈTODES SUPLEMENTARIS

MATERIALS AND METHODS

Fly stocks and genetic procedures

woc^{RNAi}, *row^{RNAi}* and *hp1a^{RNAi}* correspond to lines 20995, 28196 and 31995 from VDRC. *row^{J(2)SH2172}* was obtained from Szeged Drosophila Stock Centre. *Act5C-GAL4*, *ptc-GAL4* and *llo-GAL4* lines are described in Bloomington Stock Center. Lines S9.2 and 157.1 are described in (Li et al. 2003). To generate *hp1c^{RNAi}*, the entire ORF coding HP1c was cloned in pWIZ (Lee and Carthew 2003), and transgenic flies were generated according to standard procedures. *hp1c^{RNAi}* corresponds to an insertion on chromosome III that, when crossed to an *Act5C-GAL4* line, shows a very strong reduction in HP1c both at the mRNA and protein level (Figure S1C). For depletion by RNAi, crosses were kept at 25 °C. *row^{J(2)SH2172}* corresponds to a P-element insertion at the ATG-start codon that, in larvae, results in a 99% reduction in ROW mRNA levels (Figure S1B).

For targeting experiments, HP1a, HP1b and HP1c were fused at C-terminus to the *lacI*-DNA-binding domain using plasmid Topo-TA-LacI and cloned into pNHT4 plasmid (Nagao et al. 1998), where expression is driven by the *hsp70*-promoter. Transgenic lines were generated in +;+;+;*ry⁵⁰⁶/ry⁵⁰⁶* flies by standard procedures. Expression of fusion proteins was induced by daily heat-shock treatment for 45min.

Antibodies

α HP1a, α HP1b, α HP1c and α ROW polyclonal antibodies were raised in rats from purified recombinant proteins. Rabbit polyclonal α WOC antibodies are described in (Raffa et al. 2005). Mouse monoclonal antibodies against RNAPol II forms were: α Pol Ilo^{ser5} Abcam(ab24759), α Pol Ilo^{ser2} Abcam(ab24758) and α RNAPol Ila Abcam(ab817). Rabbit polyclonal antibodies against specific histone modifications were: α H3K9me3 Abcam(ab8898), α H3K9me2 Upstate(07-212), α H3K27me3 Upstate(07-449) and α H3K4me3 Abcam(ab8580). Mouse α lacI and α GFP were Abcam(ab33832) and Abcam(ab290), respectively.

Immunostaining experiments

In S2 cells, immunostaining experiments were performed as described elsewhere (Moreno-Moreno et al. 2006), using α H3K9me3 (1:250), α H3K9me2 (1:250), α HP1a (1:200) and α HP1c (1:500). In polytene chromosomes, immunostaining with α HP1a (1:200), α HP1c (1:500), α HP1b (1:150), α ROW (1:400), α H3K9me3

(1:500), α H3K9me2 (1:250), α H3K4me3 (1:500) and α lacl (1:150) was performed according to (Stephens et al. 2004). Immunostaining with α WOC (1:500), α Pol Ilo^{ser5} (1:30), α Pol Ilo^{ser2} (1:30) and α RNApol IIa (1:20) was as described in (Lis et al. 2000; Raffa et al. 2005). When HP1c-lacl was over-expressed, larvae were heat-shocked for 45min at 37°C and, after recovery at 25°C for 2h, processed for immunostaining. When immunostaining was performed in imaginal discs, larvae were dissected in PBS and discs were fixed in PBS, 4% paraformaldehyde for 20min at room temperature and stained at 4°C over-night with α HP1c (1:500), α HP1a (1:200) or α WOC (1:1000). For visualisation, slides were mounted in Mowiol (Calbiochem-Novabiochem) containing 0.2ng/ml DAPI (Sigma) and visualised on a Nikon Eclipse E-800 inverted microscope with a Colorview 12 camera or in a confocal microscope (Leica TCS SP2-AOBS).

Analysis of telomere fusions

Telomere fusions were analysed in brain squashes from third instar larvae prepared as described in (Gatti et al. 1994).

Purification and characterisation of multiprotein complexes containing HP1c

For the purification of multiprotein complexes, HP1c was TAP-tagged at N-terminus using plasmid PMK33-NTAP, where expression of the TAP-tagged protein is driven by a metallothionein inducible promoter, and stable S2 lines obtained according to (Veraksa et al. 2005). Expression of TAP-HP1c was induced by over-night treatment with 0.07mM CuSO₄. Crude nuclear extracts were prepared according to (Dignam et al. 1983) and precleared by incubation with BSA-Dynal beads for 2h at 4°C. Extracts were, then, applied to IgG-Dynal beads and incubated over-night at 4°C. After incubation, beads were extensively washed and eluted with 25mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% glycerol, 1% SDS. Eluted material was analysed by SDS-PAGE gel. Bands of interest were excised and subjected to LC/MS-analysis in the Proteomics Unit of the "Institut de Recerca de la Vall d'Hebrón" (Barcelona) for identification.

Co-immunoprecipitation experiments

Co-immunoprecipitation experiments were performed with crude S2 nuclear extracts by the addition of α WOC, α DDP1 (Cortés et al. 1999), or no antibodies. Incubation was performed at 4°C for 2h. 20 μ l of Protein A Sepharose beads (GE Healthcare) were, then, added and incubated at 4°C for 2h. After incubation, beads were pelleted by centrifugation, washed and analysed by Western-blot with α HP1c, α HP1a and α ROW antibodies.

Analysis of the interaction of HP1c with H3K9me2,3 *in vitro*

For the analysis of the interaction of HP1c with H3K9me2,3 *in vitro*, GST- and His-tagged proteins were expressed in *E. coli* and purified on glutathione-sepharose beads (Pharmacia) and Ni²⁺-chelating (Quiagen), respectively. Recombinant Histone H3 was from *X. laevis*. Mononucleosomes and total endogenous histones were obtained from S2 cells according to (Nielsen et al. 2001). For Far-Western analysis, endogenous histones were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose filters. After blocking, filters were washed with 20mM Hepes pH 7.9, 0.2mM EDTA, 250mM NaCl, 0.5mM DTT and 0.1mM PMSF and incubated with the corresponding recombinant protein in the presence of 0.2mg/ml BSA for 6 h at 4°C. After incubation, filters were washed three times in the same buffer and processed as for conventional Western. For GST-pull down assays, 10mg of the corresponding GST-tagged protein were bound to glutathione-sepharose beads in 5mM Hepes pH 7.9, 300mM NaCl, 0.2mM EDTA, 0.1% NP40, 1mM DTT and 0.1mM PMSF and, then, incubated with 100µg of purified mononucleosomes for 2h at 4°C. After incubation, beads were washed five times in the same buffer, eluted with SDS-PAGE loading buffer, resolved by SDS-PAGE and analysed by Western with appropriate antibodies.

Expression profiling analysis

For expression-arrays, RNA was extracted with Trizol (Invitrogen) from twenty-five male blue staged larvae (Andres and Thummel 1994) of each of the genotypes analysed, and subsequently purified using the RNAeasy minikit (Quiagen). Duplicates were processed for each genotype. Hybridization targets were prepared from 25ng total RNA using isothermal amplification SPIA Biotin System v2 (NuGEN Technologies, Inc.). 2.2µg of cDNA was hybridized per *Drosophila* Genome 2.0 GeneChip (Affymetrix). GeneChips were scanned in a GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). CEL files were generated from DAT files using GCOS software (Affymetrix). Expression estimates were calculated from probe intensities using the WPP algorithm (Auer et al. 2007).

For each mutant condition, differential expression was measured via the distance between the intervals containing the mutant and the control expression values. Whenever the intervals overlapped, the distance was set to zero. We standardized this distance dividing by an empirical Bayes estimate of the gene-specific standard deviation (Smyth 2005). Lists of differentially expressed genes were obtained by setting several cut-offs for the absolute value of the interval distance. To measure the degree of co-regulation between the mutants, we computed the pair-wise

Spearman's rank correlation between interval distances. We conducted a parametric bootstrap simulation study 10,000 times to address two difficulties in interpreting the value of the correlation coefficient. First, the woc^{RNAi} and row^{RNAi} interval distances were computed using the same controls, and hence they should present positive correlation even if no genes were co-regulated. Therefore, to assess statistical significance it would be incorrect to test whether the correlation is equal to zero. Second, due to biological variability and experimental noise, the interval distances for two mutant groups would not present perfect correlation, even if all genes were differentially expressed and by the same amount for the two mutants. The simulation study indicated the range of Spearman's correlation that would be expected if no genes were co-regulated, and also if all genes were co-regulated.

The proportion of genes following each expression pattern in Table III was estimated with the GaGa model (Rossell 2007). This Bayesian hierarchical model assumes that the expression data arises from a mixture of several expression patterns, and estimated the number of genes in each pattern. The model was fit via empirical Bayes and the Expectation-Maximization algorithm using the Bioconductor software gaga library.

Gene ontology analysis was performed with GOtoolBox (Martin et al. 2004). For clustering analysis it was set a minimum cluster of 3 genes and 85% of genes had to share at least one GO term.

A more detailed description of the statistical methods used is included as a separate file in Supplemental Information.

REFERENCES

- Andres, A.J. and Thummel, C.S. 1994. Methods for quantitative analysis of transcription in larvae and prepupae. *Methods Cell Biol* 44: 565-573.
- Auer, H., Newsom, D.L., Nowak, N.J., McHugh, K.M., Singh, S., Yu, C.Y., Yang, Y., Wenger, G.D., Gastier-Foster, J.M., and Kornacker, K. 2007. Gene-resolution analysis of DNA copy number variation using oligonucleotide expression microarrays. *BMC Genomics* 8:111.
- Cortés, A., Huertas, D., Fanti, L., Pimpinelli, S., Marsellach, F.X., Piña, B., and Azorín, F. 1999. DDP1, a single-stranded nucleic acid-binding protein of *Drosophila*, associates with pericentric heterochromatin and is functionally homologous to

- the yeast Scp160p, which is involved in the control of cell ploidy. *EMBO J* 18: 3820-3833.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., and Roeder, R.G. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11: 1475-1489.
- Gatti, M., Bonaccorsi, S., and Pimpinelli, S. 1994. Looking at *Drosophila* mitotic chromosomes. *Methods Cell Biol* 44: 371-391.
- Lee, Y.S. and Carthew, R.W. 2003. Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* 30: 322-329.
- Li, Y., Danzer, J.R., Alvarez, P., Belmont, A.S., and Wallrath, L.L. 2003. Effects of tethering HP1 to euchromatic regions of the *Drosophila* genome. *Development* 130: 1817-1824.
- Lis, J.T., Mason, P., Peng, J., Price, D.H., and Werner, J. 2000. P-TEFb kinase recruitment and function at heat shock loci. *Genes Dev* 14: 792-803.
- Martin, D., Brun, C., Remy, E., Mouren, P., Thieffry, D., and Jacq, B. 2004. GOToolBox : functional investigation of gene datasets based on Gene Ontology. *Genome Biol* 5: R101.
- Moreno-Moreno, O., Torras-Llort, M., and Azorín, F. 2006. Proteolysis restricts localization of CID, the centromere-specific histone H3 variant of *Drosophila*, to centromeres. *Nucleic Acids Res* 34: 6247-6255.
- Nagao, T., Leuzinger, S., Acampora, D., Simeone, A., Finkelstein, R., Reichert, H., and Furukubo-Tokunaga, K. 1998. Developmental rescue of *Drosophila* cephalic defects by the human *Otx* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3737-3742.
- Nielsen, A.L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J.A., Remboutsika, E., Chambon, P., and Losson, R. 2001. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell* 7: 729-739.
- Raffa, G.D., Cenci, G., Siriaco, G., Goldberg, M.L., and Gatti, M. 2005. The putative *Drosophila* transcription factor Woc is required to prevent telomeric fusions. *Mol Cell* 20: 821-823.

- Rossell, D. 2007. GaGa: a simple and flexible hierarchical model for microarray data analysis. Technical report, M.D. Anderson Cancer Center. URL <http://rosselldavid.googlepages.com>.
- Smyth, G.K. 2005. Limma: linear models for microarray data. In "Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor" R.Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry and W. Hubert, editors. pp 397-420. Springer, New York.
- Stephens, G.E., Craig, C.A., Li, Y., Wallrath, L.L., and Elgin, S.C. 2004. Immunofluorescent staining of polytene chromosomes: exploiting genetic tools. *Methods Enzymol* 376: 372-393.
- Veraksa, A., Bauer, A., and Artavanis-Tsakonas, S. 2005. Analyzing protein complexes in *Drosophila* with tandem affinity purification-mass spectrometry. *Dev Dyn* 232: 827-834.

3.1.4. MÈTODES ESTADÍSTICS SUPLEMENTARIS

DESCRIPTION OF STATISTICAL METHODS.

Contents

1	Introduction	2
2	Data pre-processing and normalization	4
3	Differentially expressed genes	4
4	Co-regulation between hp1c, Woc and CG8092	6
5	Expression pattern quantification	8
6	Gene ontology clustering	9

1 Introduction

This document details the statistical procedures used for data analysis. As a brief summary, the data consisted of 20 Affymetrix arrays measuring the expression of 18,952 genes. The arrays were obtained in two different sets. Set 1 contained 2 $hp1c^{RNAi}$; Act5C-GAL4 (from now on called *hp1c mutant* for brevity) and 2 $hp1c^{RNAi}$ insertion arrays (called *hp1c insertion*), as well as 2 gfp^{RNAi} ; Act5C-GAL4 (called *ActGAL4 insertion and RNAi pathway activation* and 2 gfp^{RNAi} (called *GFP insertion*) arrays. Set 2 contained 2 woc^{RNAi} ; Act5C-GAL4 (called *Woc mutant*), and 2 $cg8092^{RNAi}$ arrays (called *CG8092 mutant*), as well as 2 woc^{RNAi} (called *Woc insertion*), 2 $cg8092^{RNAi}$ (called *CG8092 insertion*), 2 arrays with ActGAL4 insertion and RNAi pathway activation and 2 GFP insertion arrays.

A Principal Component Analysis revealed relevant differences between the two sets of experiments, and hence we analyzed them separately. The samples used as controls for each of the three mutant types were:

- Controls for *hp1c* mutant: the 2 *hp1c* insertion, 2 ActGAL4 insertion and RNAi pathway activation and 2 GFP insertion arrays from Set 1.
- Controls for *Woc* mutant: the 2 arrays with *Woc* insertion, and the 2 ActGAL4 insertion and RNAi activation and 2 GFP insertion arrays from Set 2.
- Controls for *CG8092* mutant: 2 arrays with *CG8092* insertion, and the 2 ActGAL4 insertion and RNAi activation and 2 GFP insertion arrays from Set 2.

Notice that *hp1c* shares no controls with the other two mutant groups, but *Woc* and *CG8092* share 4 out of the 6 controls.

In Section 2 we describe the data pre-processing, and the transformations used to ensure that some parametric assumptions made during the analysis were met. Section 3 details the procedure used to obtain lists of differentially expressed genes. Section 4 describes the simulation study conducted to assess the range of Spearman's rank correlation values that is expected when assuming that no genes are co-regulated and when assuming that all genes are co-regulated by two of the transcription factors. Section 5 outlines the quantification of the proportion of genes following several expression patterns.

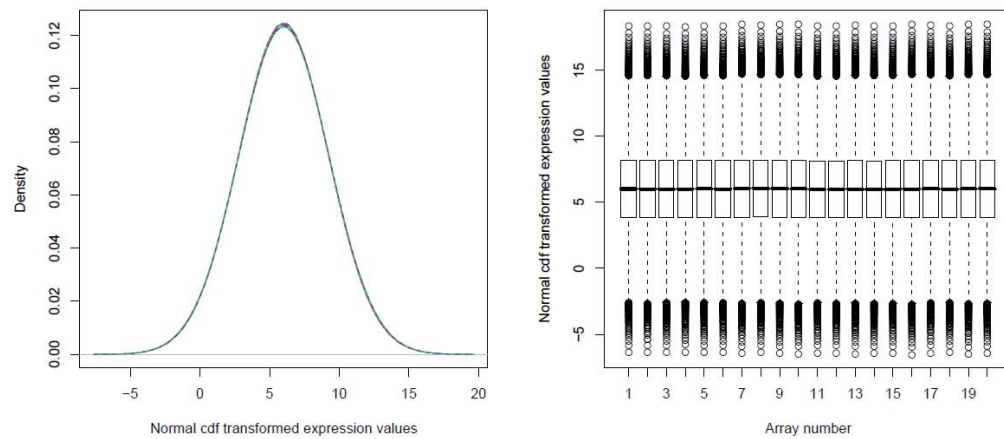


Figure 1: Normal cdf transformed data. (a): marginal density for each array;
(b): boxplot of expression values for each array

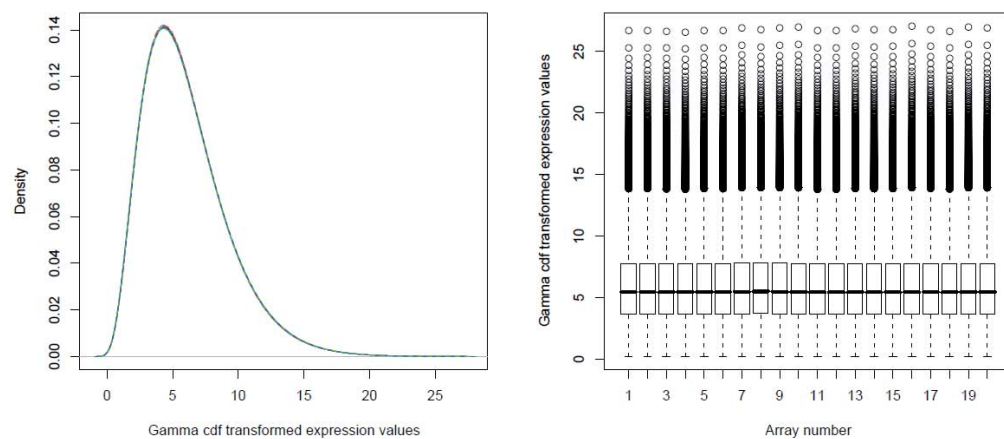


Figure 2: Gamma cdf transformed data. (a): marginal density for each array;
(b): boxplot of expression values for each array

2 Data pre-processing and normalization

CEL files were generated from DAT files using GCOS software (Affymetrix). Expression estimates were calculated from probe intensities using the WPP algorithm (Auer et al., 2007).

At some point during microarray data pre-processing, it is customary to apply a monotone transformation (*e.g.* log-transform). The goal is to improve the extent to which the data *approximates* some parametric distribution, such as the normal distribution. We used a normal cdf transformation that preserves the mean and standard deviation for each array and that ensures that the marginal density of the data for each array follows a normal distribution *exactly*. This is achieved by (i) computing the empirical cdf for each observation within a given array, and (ii) applying an inverse normal cdf transform. Figure 1(a) displays the marginal distribution of the expression values for each array after the cdf transform. The data is exactly normally distributed. Figure 1(b) displays a boxplot for each array, showing that all arrays have comparable expression values.

The analysis described in Section 5 required fitting a model that assumes that the observations arise from a Gamma distribution. For this particular analysis we applied a gamma cdf transform. Figures 2(a)-(b) provide the marginal densities and boxplots for each array, respectively.

3 Differentially expressed genes

For illustration purposes, we focus the discussion on comparing the hp1c mutant expression values with their controls. The analysis for Woc and CG8092 is completely analogous. To quantify the amount of differential expression we used a test statistic which we denominate interval distance. The interval distance measures the distance between the intervals containing the hp1c mutant and the control expression values. Whenever the intervals overlapped, the distance was set to zero. We standardized this distance dividing by an empirical Bayes estimate of the gene-specific standard deviation (Smyth, 2005). This was done with the R functions `lmFit` and `eBayes` in the `limma` package.

More formally, denote by x_{i1}^{hp1c} and x_{i2}^{hp1c} the smallest and largest expression values in the hp1c group for gene i , respectively. Similarly, x_{i1}^{con} and x_{i2}^{con} denote the smallest and largest value in the control group, and s_i denotes the empirical Bayes estimate of the within-group standard deviation for gene i .

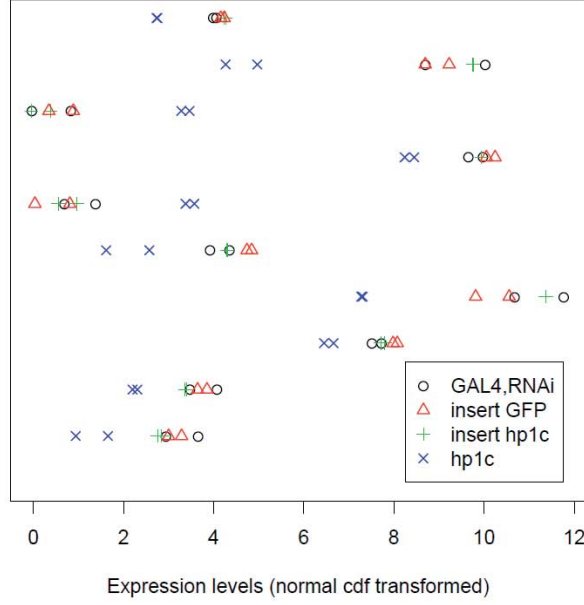


Figure 3: 10 genes with the largest hp1c-control interval distance.

The interval distance for gene i is computed as

$$\begin{aligned} & \frac{x_{i1}^{hp1c} - x_{i2}^{con}}{s_i}, \text{ if } x_{i1}^{hp1c} > x_{i2}^{con} \\ & \frac{x_{i1}^{con} - x_{i2}^{hp1c}}{s_i}, \text{ if } x_{i1}^{con} > x_{i2}^{hp1c} \\ & 0, \text{ else.} \end{aligned} \quad (1)$$

We obtained lists of differentially expressed genes by setting several cut-offs for the absolute value of the interval distance. Figure 3 plots the expression values for the 10 genes with the largest interval distance. We see that the interval distance has the attractive property of finding genes for which the hp1c mutant values fall well outside the range of values from all the control groups (2 from hp1c insertion, 2 from ActGAL4 insertion and RNAi pathway activation and 2 from GFP insertion).

4 Co-regulation between hp1c, Woc and CG8092

We define a gene to be co-regulated between two mutant types if that gene is either over-expressed or under-expressed in the two mutant types. To measure the degree of co-regulation we computed the pair-wise Spearman's rank correlation (Spearman, 1904) between the hp1c, Woc and CG8092 interval distances.

There are two difficulties in interpreting the value of the correlation coefficient. First, 4 out of the 6 controls used to compute the Woc and CG8092 interval distances were the exactly same, and hence the Woc-CG8092 interval distances should present positive correlation even if no genes were co-regulated. Therefore, to assess statistical significance it is incorrect to test whether the correlation is equal to zero. Second, due to biological variability and experimental noise, the interval distances for two mutant groups would not present perfect correlation, even if all genes were differentially expressed and by the same amount for the two mutants. In other words, it is hard to tell how a Woc-CG8092 correlation of say 0.1 compares to what we would expect by chance alone, and to what we would expect under complete co-regulation.

To address these two limitations we conducted a parametric bootstrap simulation study. The purpose of the simulation is to indicate the range of Spearman's correlation values that would be expected if no genes were co-regulated, and also if all genes were co-regulated.

First we describe the simulation under the hypothesis that no genes are co-regulated between hp1c, Woc and CG8092. Algorithm 1 provides a summary of the scheme. Intuitively, we generate expression values for the control group that match the mean and standard deviation that were observed in the control group of the real data. The amount of differential expression in hp1c, Woc and CG8092 is also generated so that it matches the mean differences observed in the real data. The key is that the amount of differential expression for hp1c, Woc and CG8092 are generated independently from each other, *e.g.* the difference between the hp1c group mean and the control mean is not related to the difference between the Woc and the control group mean.

Algorithm 1. Simulation under the hypothesis of no co-regulation

1. For each gene, compute the mean and standard deviation (SD) of the control samples. Compute the difference between the mean of *each mutant group* and the controls.
2. For each gene, obtain residuals by subtracting the gene-specific mean

and dividing by the SD.

3. For each gene, set the simulated control group mean and SD equal to that in the observed data. Sample at random one of the observed differences between the hp1c mutant group mean and the control mean (from any gene). Set the simulated hp1c mutant mean equal to the control group mean plus the sampled value. Repeat the same process for Woc and CG8092, sampling the difference between each of group means and the control means *independently*.
4. Generate simulated expression values by sampling the residuals obtained in Step 2, multiplying the gene-specific SD and adding the group means obtained in Step 3.
5. Compute interval distances between each mutant group and the respective controls. Obtain the correlation between the interval distances.
6. Repeat Steps 3-5 1000 times. The range of simulated correlations indicates what to expect under the hypothesis of no co-regulation.

We now address the simulation under the hypothesis that all genes are co-regulated by the three transcription factors, and that they are co-regulated by the same amount. Algorithm 2 provides a summary of the scheme, which only differs from Algorithm 1 in Steps 1 and 3. Again, the control group means and SDs match those observed in the real data. The difference with Algorithm 1 is that the amount of hp1c, Woc and CG8092 is set to be the same value. This value is determined for each gene by obtaining the average hp1c, Woc and CG8092 differential expression observed in the data.

Algorithm 2. Simulation under the hypothesis of complete co-regulation

1. For each gene, compute the mean and standard deviation (SD) of the control samples. Compute the difference between the mean of *the mutant samples from all groups* and the controls.
2. For each gene, obtain residuals by subtracting the gene-specific mean and dividing by the SD.
3. For each gene, set the simulated control group mean and SD equal to that in the observed data. Sample at random one of the observed differences between the grand mean of all mutant samples and the control mean. Set the mean *for all mutant groups* equal to the control group mean plus the sampled value.

4. Generate simulated expression values by sampling the residuals obtained in Step 2, multiplying the gene-specific SD and adding the group means obtained in Step 3.
5. Compute interval distances between each mutant group and the respective controls. Obtain the correlation between the interval distances.
6. Repeat Steps 3-5 1000 times. The range of simulated correlations indicates what to expect under the hypothesis of complete co-regulation.

5 Expression pattern quantification

The proportion of genes following each expression pattern in Table III was estimated with the GaGa model (Rossell, 2007), a generalization of the Gamma/Gamma model of Kendziora et al. (2003). This Bayesian hierarchical model assumes that the expression data arises from a mixture of several expression patterns, and estimates the proportion of genes in each pattern. We considered the following patterns:

- Pattern 0: $H_{p1c} = W_{oc} = CG_{8092} = \text{Control}$
- Pattern 1: $H_{p1c} \neq W_{oc} = CG_{8092} = \text{Control}$
- Pattern 2: $H_{p1c} = CG_{8092} = \text{Control} \neq W_{oc}$
- Pattern 3: $H_{p1c} = W_{oc} = \text{Control} \neq CG_{8092}$
- Pattern 4: $H_{p1c} = W_{oc} \neq CG_{8092} = \text{Control}$
- Pattern 5: $H_{p1c} = CG_{8092} \neq W_{oc} = \text{Control}$
- Pattern 6: $H_{p1c} = \text{Control} \neq W_{oc} = CG_{8092}$
- Pattern 7: $H_{p1c} = W_{oc} = CG_{8092} \neq \text{Control}$
- Pattern 8: $H_{p1c} \neq W_{oc} \neq CG_{8092} \neq \text{Control}$

Pattern 0 includes genes that are not differentially expressed in any of the three mutant conditions. Patterns 1-3 include genes that are differentially expressed only for one of the mutant groups. Patterns 4-6 consider genes that are differentially expressed for two mutant groups simultaneously and by the same amount. Pattern 7 includes genes that are differentially expressed in the three mutant groups and by the same amount, and Pattern 8 includes genes that are also differentially expressed in the three groups but by different amounts.

The model was fit via empirical Bayes and the Expectation-Maximization algorithm using the Bioconductor `gaga` library (available at <http://rosselldavid.googlepages.com>). Roughly, the algorithm consists of two steps, which are

repeated until convergence is achieved. First (E-step), it finds the posterior probability that each gene follows each of the 9 expression patterns, and then averages these probabilities to estimate the proportion of genes in each pattern. Second (M-step), it finds the value of some hyper-parameters that maximize the likelihood, conditional on the expression pattern probabilities estimated in the E-step. For further details, see Rossell (2007) and Kendzierski et al. (2003).

6 Gene ontology clustering

To analyze gene ontology we selected those genes with non-zero interval distance for hp1c, Woc and CG8092. The analysis was performed with the software GOTOolbox Martin et al. (2004), which finds clusters of genes with similar functions. This results in several gene clusters, each having a list of GO categories. We looked for clusters with at least 3 genes, and only GO categories shared by 100% of the genes in the cluster were considered.

GOTOolbox also tests, for each cluster, whether the number of genes in a given GO category is higher than what would be expected by selecting genes at random. That is, it tests whether the clusters are enriched with respect to the GO categories that have been attributed to them. We adjusted the resulting p-values via the Bonferroni procedure, and only the p-values ≤ 0.05 were considered significant.

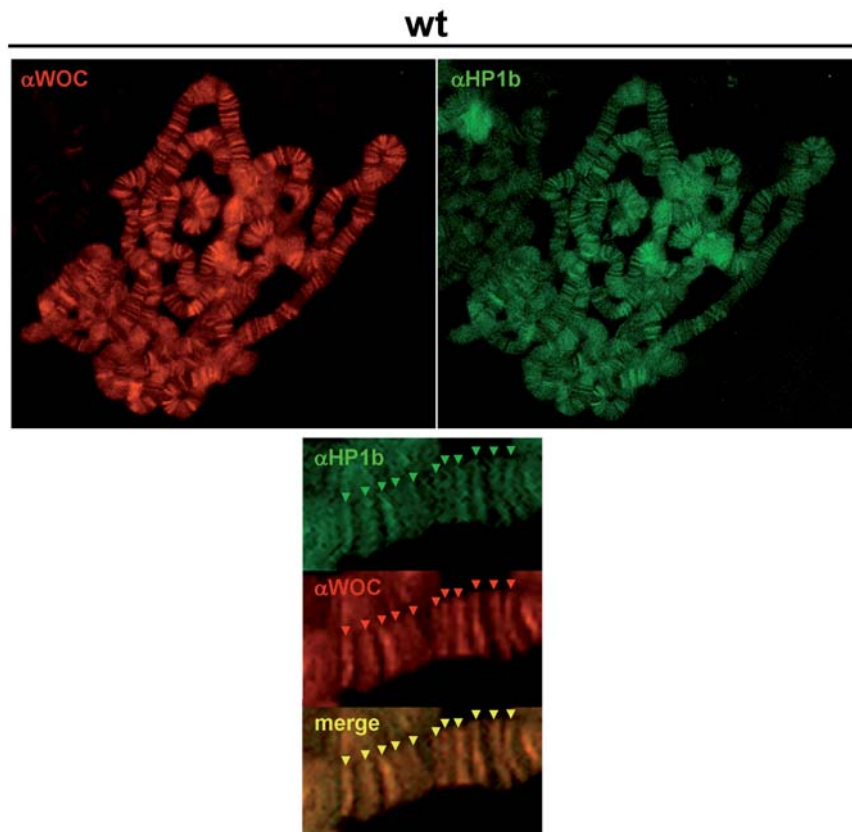
References

- H. Auer, D.L. Newsom, N.J. Nowak, K.M. McHugh, S. Singh, C.Y. Yu, Y. Yang, G.D. Wenger, and K. Gastier-Foster, J.M. Kornacker. Gene-resolution analysis of dna copy number variation using oligonucleotide expression microarrays. *BMC Genomics*, 8:111, 2007.
- C.M. Kendzierski, M.A. Newton, H. Lan, and M.N. Gould. On parametric empirical bayes methods for comparing multiple groups using replicated gene expression profiles. *Statistics in Medicine*, 22:3899–3914, 2003.
- D. Martin, C. Brun, E. Remy, P. Mouren, D. Thieffry, and B. Jacq. Gotoolbox: functional analysis of gene datasets based on gene ontology. *Genome Biology*, 5:R101, 2004.
- D. Rossell. GaGa: a simple and flexible hierarchical model for microarray data analysis. Technical report, M.D. Anderson cancer center, 2007. URL <http://rosselldavid.googlepages.com>.

- G.K. Smyth. Limma: linear models for microarray data. In R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, and W. Huber, editors, *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, pages 397–420. Springer, New York, 2005.
- C. Spearman. The proof and measurement of association between two rings. *American Journal of Psychology*, 15:72–101, 1904.

3.1.5. Annex al Capítol 1. L'HP1b i la seva ambivalència en localització i funció.

Com hem vist al capítol 1 dels Resultats, l'HP1b es localitza tant a l'eucromatina com a l'heterocromatina. La seva localització eucromàtica es veu afectada en absència de WOC o de ROW de la mateixa manera que la de l'HP1c, però la seva localització heterocromàtica no (Fig.RS2). D'aquests resultats es podria desprendre que l'HP1b necessita WOC/ROW per tal de localitzar-se a l'eucromatina, però no necessitaria aquests factors per localitzar-se a l'heterocromatina. Si aquesta hipòtesi fos certa, l'HP1b i WOC/ROW s'haurien de trobar en les mateixes localitzacions genòmiques i que tal com succeeix amb l'HP1c, hi hauria d'haver una colocalització perfecta entre WOC/ROW i HP1c. A la figura A1 veiem una ampliació del cromosoma WT de la figura S2a. Com es pot observar hi ha una colocalització absoluta entre WOC i HP1b, indicant que l'HP1b podria formar un complex independent al de l'HP1c/WOC/ROW i que aquest seria el mecanisme de localització a l'eucromatina de l'HP1b.

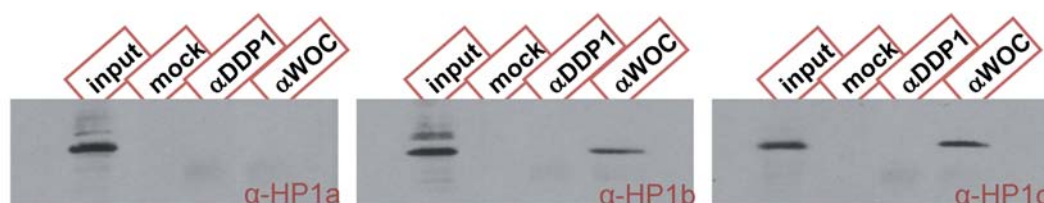


FiguraA1. Colocalització de WOC i HP1b.

Es presenta el grau de colocalització entre WOC (en vermell) i HP1b (en verd). Al panell inferior es presenta una ampliació. Les puntes de fletxa representen els diferents senyals de WOC (vermell) i HP1b (verd). Les fletxes grogues indiquen colocalització.

Resultats

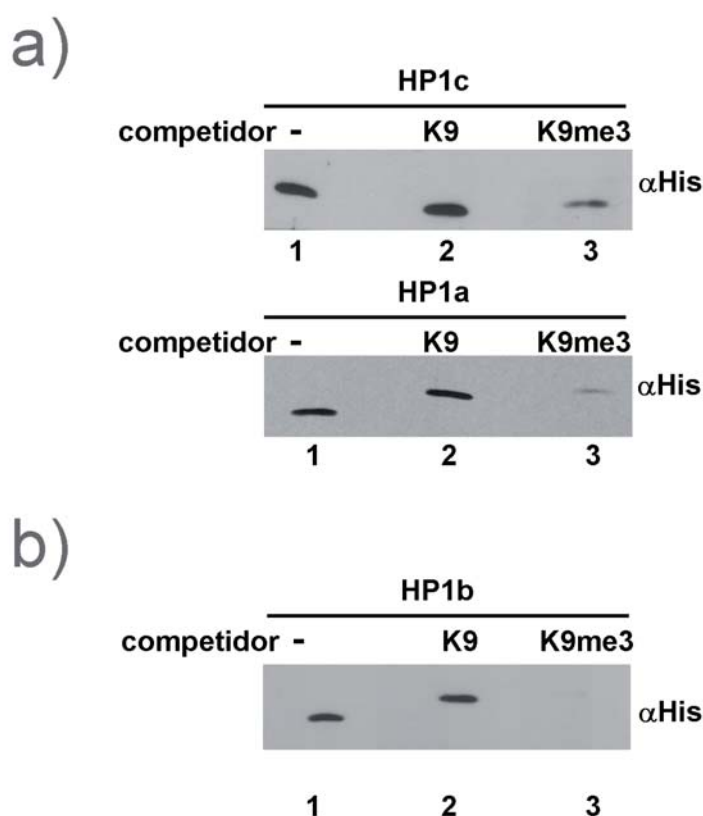
Per tal de determinar si realment hi ha una interacció física entre l'HP1b i WOC, es va realitzar un assaig d'immunoprecipitació com el realitzat a la figura R5c. En aquest cas però les elucions de cadascuna de les immunoprecipitacions es va dividir en tres parts iguals, per tal d'analitzar en paral·lel la presència d'HP1a, HP1b i HP1c i així poder comparar el grau d'interacció. Com es pot apreciar en la figura A2, l'HP1c immunoprecipita clarament amb l'anticòs de WOC mentre que l'HP1a no ho fa, tal com s'ha vist en el capítol 1 dels Resultats. Ara bé l'HP1b també precipita clarament en uns nivells similars als que ho fa l'HP1c. Aquests resultats suggereixen que l'HP1b forma un complex amb WOC i ROW independent d'HP1c, ja que quan es purifica l'HP1c en la figura R5a, no s'hi detecta l'HP1b.



FiguraA2. Coimmunoprecipitacions de WOC amb HP1a, b i c.

L'HP1b coimmunoprecipita amb WOC. Extractes nuclears de cèl·lules SL2 es van immunoprecipitar amb anticossos contra WOC, amb anticossos control contra DDP-1 i una immunoprecipitació control sense anticòs (mock). L'elució de cada immunoprecipitació va ser dividida en tres parts iguals i es va analitzar independentment per *western-blot* fent servir anticossos per HP1a, HP1b i HP1c. El títol Input correspon al 10% de l'extracte usat per la immunoprecipitació.

Un altre aspecte important que s'ha volgut comprovar, és si l'HP1b també és capaç d'interaccionar *in vitro* amb l'H3K9 metilada. Com s'observa en la figura A3b, la unió de l'HP1b a la histona H3 purificada de SL2, es competeix amb un pèptid corresponent a l'extrem amino-terminal de la histona H3 amb la lisina 9 tri-metilada, però no amb un pèptid no metilat. Això és exactament el que passa amb l'HP1a i l'HP1c en el panell a) de la mateixa figura. Aquest resultat indica que l'HP1b també és capaç d'unir-se específicament *in vitro* a l'H3K9 metilada tal com ho fan les altres isoformes que s'han analitzat.



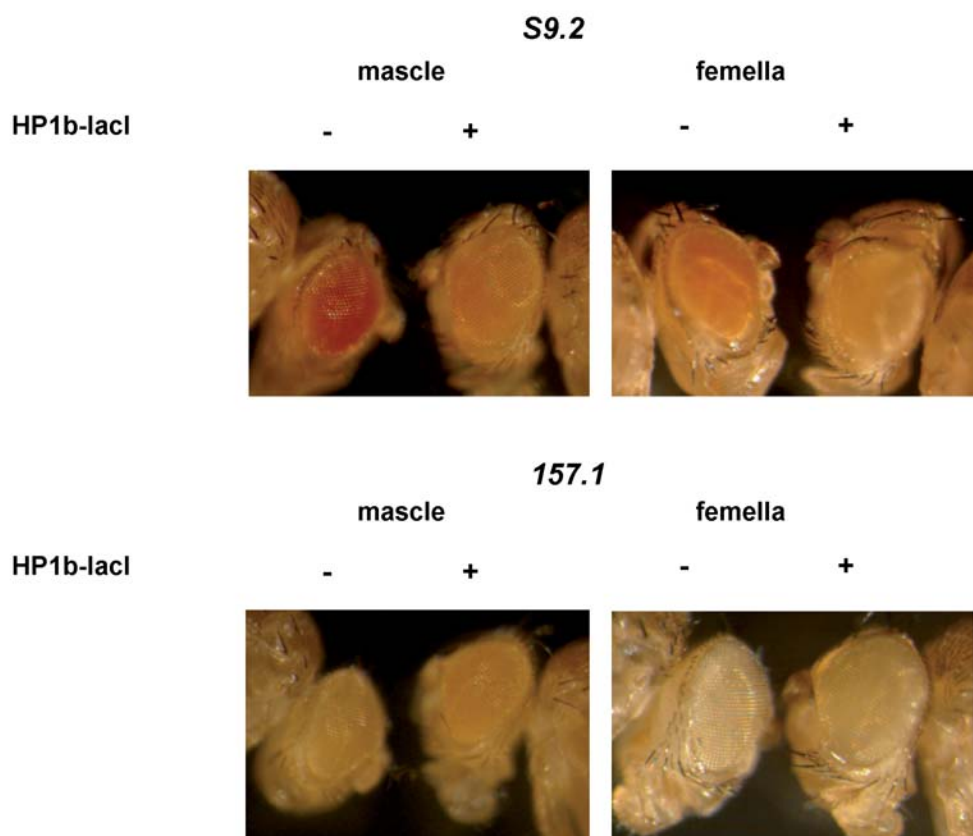
FiguraA3. L'HP1b interacciona in vitro amb l'H3K9 tri-metilada.

a) *Far western* extret de la figura R10 per comparar-la amb el mateix experiment realitzat amb l'HP1b.
 b) Unió de la proteïna HP1b amb una marca d'histidines a la histona H3 purificada de cèl·lules SL2. La unió es visualitza amb un anticòs contra la marca d'histidines. La reacció d'unió es va dur a terme en presència de 50µM d'un pèptid corresponent a l'extrem amino-terminal de la histona H3 metilat a la lisina 9 (línia 3), o sense metilar (línia 2). La línia 1 correspon a la unió que s'observa sense la presència de cap competidor.

Està bastant acceptat que la funció principal de les proteïnes HP1 és reprimir l'expressió gènica. Com s'ha vist en la figura R4 del capítol 1, l'HP1a reprimeix ectòpicament l'expressió d'un gen *reporter*. Com es pot notar a la figura A4, l'HP1b es comporta de la mateixa manera que l'HP1a en la línia S9.2, però no l'HP1c que incrementa molt lleugerament l'expressió del gen *reporter* en aquesta línia. En la línia 157.1, el reclutament ectòpic d'HP1c resulta en un increment molt evident de l'expressió del gen *reporter*, tot el contrari del que s'havia publicat anteriorment per l'HP1a (Li et al, 2003b). En la figura A4, veiem com l'HP1b no es comporta de la mateixa manera en les dues línies analitzades. Com s'ha detallat en la línia S9.2, l'HP1b provoca una repressió transcripcional molt clara, però per altra banda, en la línia 157.1, l'HP1b

Resultats

no causa un silenciament (Li et al, 2003b), sinó que causa un lleuger increment de l'expressió però en cap cas d'una intensitat comparable al de l'HP1c (Fig.R4).



FiguraA4. Efectes del reclutament ectòpic de l'HP1b en dues línies *reporter*.

L'HP1b es localitza ectòpicament al costat d'un gen *white reporter*. En el panell de dalt s'observen els efectes que es produeixen en la línia S9.2 on els nivells basals del gen reporter són alts. En el panell inferior s'observen els efectes produïts en la línia 157.1 on els nivells basals del gen reporter són molt baixos. En cada cas es comparen germans en els quals un expressa la fusió HP1b-lacI (+), i l'altre no (-).

3.2. CAPÍTOL 2.

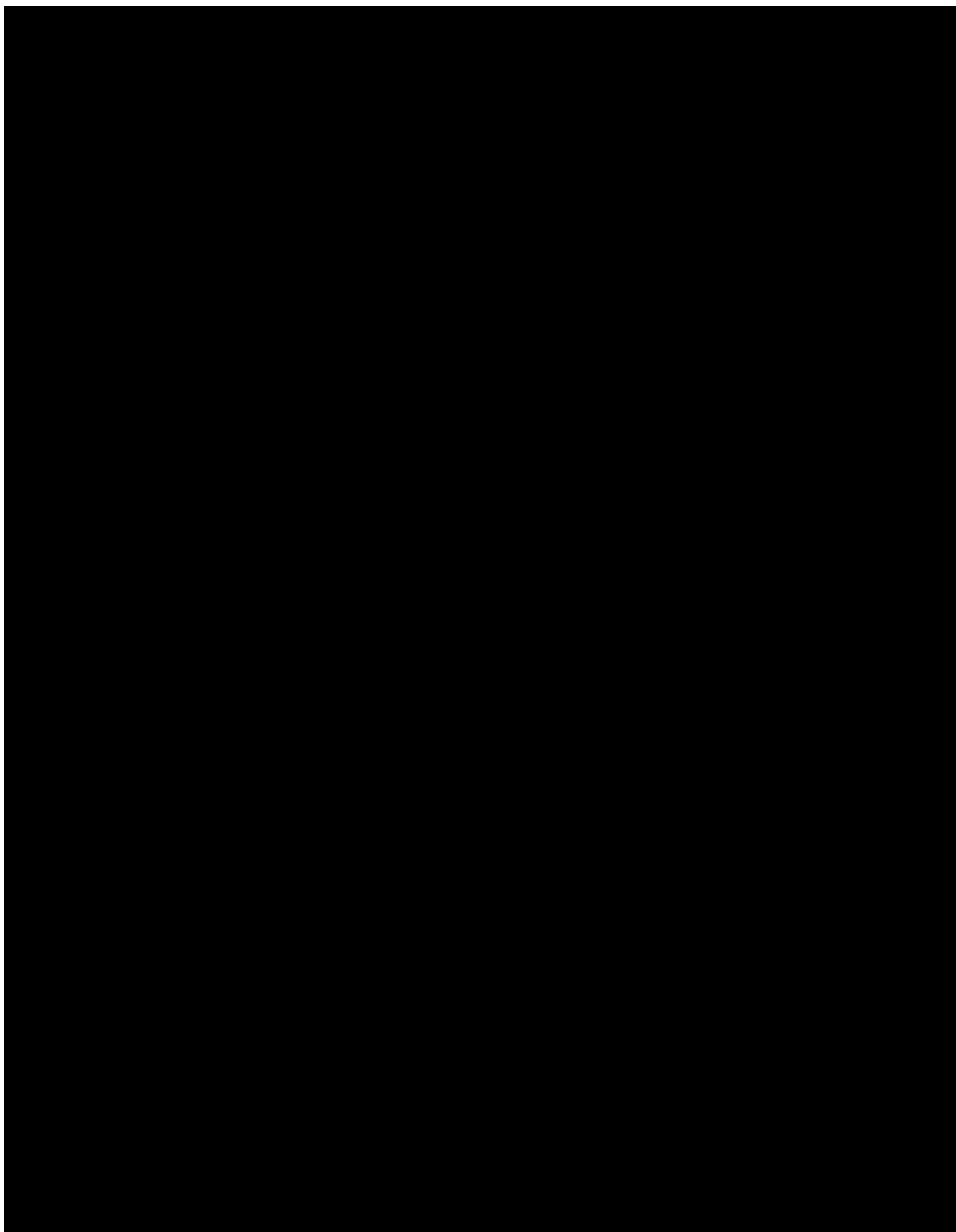
Anàlisi fenotípica d'HP1c/WOC/ROW.

Per tal d'inferir la funció d'un gen/proteïna, l'estratègia més usada consisteix en treure del sistema l'element en qüestió i observar quin fenotip apareix, és a dir, a veure què passa. En funció del fenotip observat és pot col·locar l'element en un procés o funció a partir de les característiques del fenotip i de la comparació d'aquest amb el fenotip conegut causat per la falta d'altres gens/proteïnes.

En aquest estudi s'han usat condicions mutants consistentes en la reducció de la quantitat d'HP1c, WOC i ROW mitjançant l'ARNi. Quan s'utilitza un *driver* constitutiu i ubic, només en el cas de l'HP1c apareixen adults tot i que en mascles hi ha un 50% de letalitat. En el cas de ROW, hi ha pupació però la majoria mor en aquest procés i durant l'eclosió. Pel que fa a WOC tots els individus moren en l'estadi de pupa. Si s'analitza l'al·lel mutant *row*^{(2)SH2172}, s'observa que la letalitat és més severa ja que no s'hi pot trobar cap individu en procés d'eclosionar. Pel que fa a l'al·lel nul *wocB111*, la letalitat és molt més intensa, ja que no hi ha cap larva que arribi a pupar.

Només en una condició experimental s'observa un fenotip morfològic, que és quan es produeix ARNi de WOC amb el *driver* Ptc. Aquest *driver* dirigeix l'activació dl'ARNi en la zona d'expressió del gen *patched*, que principalment es produeix en la frontera dels compartiments anterior i posterior dels discs imaginals d'ala, halteri i pota. En aquestes condicions no hi ha letalitat durant el desenvolupament, i apareixen tres fenotips morfològics a l'ala de l'adult. Un és una disminució de la mida de la zona on es produeix la reducció de WOC, un altre és l'aparició de talls en el marge de l'ala en forma de mossegada, i finalment també es produeix una pèrdua del *crossvein* anterior (Fig.R12). Aquests fenotips no són específics del *driver* Ptc, ja que amb el *driver* Hh observem els mateixos fenotips (s'expressa en el compartiment posterior on el gen *Hedgehog* es transcriu fortament)(Fig.R12). Cal esmentar que aquests fenotips no s'observen quan s'usen els ARNi d'HP1c i de ROW.

Els fenotips observats són típics de gens involucrats en la via de senyalització de Notch. Notch és un receptor transmembrana que a *Drosophila melanogaster* està implicat en la senyalització per contacte entre cèl·lules. Aquesta senyalització està implicada en la morfogènesis del sistema nerviós perifèric i central, de l'ull, de l'ala, potes, antenes, músculs i durant l'oogènesis.



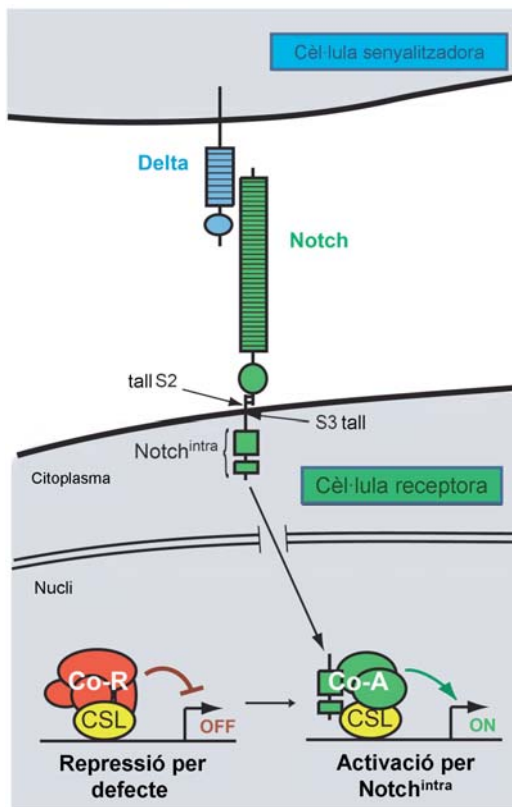
FiguraR12. Fenotips de WOC^{ARNi} a l'ala.

En la part esquerra de la figura es presenten: un disc imaginal d'ala extret d'una larva 3 de soca salvatge tenyit amb DAPI (dalt), un disc imaginal del mateix estadi on es produeix ARNi de WOC a la frontera dels compartiments anterior i posterior amb el *driver* Ptc (mig) i un disc imaginal on es produeix ARNi de WOC en el compartiment posterior amb el driver Hh (baix). S'observa la davallada dels nivells de proteïna WOC en cada cas amb un anticòs contra WOC (en vermell).

A la part dreta de la figura hi ha exemples d'ales extretes d'adults que corresponen a les condicions dels discs imaginals de la part esquerra. La fletxa violeta indica les pertorbacions observades en les *crossveins*. Les fletxes blaves indiquen els talls en el marge de l'ala i les fletxes vermelles indiquen la reducció de mida comparat amb l'ala WT.

Els lligands del receptor Notch a *Drosophila melanogaster* són Delta i Serrate i s'uneixen en el motiu EGF (*Epidermal Growth Factor*) de la proteïna Notch. La proteïna Fringe és molt important ja que és capaç d'unir-se a la mateixa regió EGF de Notch i altera la capacitat d'aquest per unir-se a delta permetent que es pugui discriminar entre els dos lligands (Ju et al, 2000).

Un cop una cèl·lula rep el senyal d'un lligand d'una cèl·lula veïna, el receptor és tallat per un complex on la proteïna *Preselinin* té un paper clau, donant un domini extracel·lular que és alliberat i un intracel·lular (Struhl & Greenwald, 1999). Aquest domini intracel·lular es translocalitza al nucli on amb l'ajuda de la proteïna *Supressor of hairless* (S(H)) constitueix un factor de transcripció que activa la transcripció dels gens diana de la via, principalment els gens que es localitzen en el complex genòmic anomenat *Enhancer of split* (Lecourtois & Schweisguth, 1997) (Fig.R13).



FiguraR13. Senyalització de Notch.

Esquema bàsic de la senyalització de la via de Notch. Els factors importants són els lligands tipus Delta, el receptor Notch i els factors de transcripció CSL que en el cas de *Drosophila melanogaster* és S(H). Delta i Notch són proteïnes transmembrana que contenen varies repeticions EGF (rectangles). L'activació del receptor Notch provoca dos talls proteolítics del propi receptor (S2 i S3). El tall S3 allibera el domini intracel·lular (Notch^{intra}), que es translocalitza al nucli. En absència de Notch^{intra}, CSL s'associa a un complex corepressor per mantenir reprimits els gens diana de la via. Quan Notch^{intra} es translocalitza al nucli, s'associa amb un complex coactivador que seguidament s'acomplexa amb CSL desplaçant el complex corepressor i activant els gens diana. Extret de (Lai, 2004).

El fenotip de Notch més ben caracteritzat a l'ala és el que està associat en la determinació de la frontera dorso-ventral. Cap al final del desenvolupament de l'estadi de larva, els lligands Delta i Serrate s'expressen en les cèl·lules que flanquegen la frontera dorso-ventral del disc d'ala, però no en les cèl·lules que realment formen la frontera (Kooh et al, 1993; Thomas et al, 1995). Aquí es produeix una retroalimentació entre les cèl·lules flanquejants i les frontereres.

Resultats

Les cèl·lules frontera tenen la via de Notch activada la qual activa a la vegada Wingless (Wg), que indueix l'expressió dels lligands Delta i Serrate a les cèl·lules flanquejants. Aquestes senyalitzen a les cèl·lules frontera una altra vegada activant la via de Notch que activa Wg. Aquest sistema de retroalimentació aconseguix mantenir restringida l'activitat de la via només a les cèl·lules frontera gràcies a dos mecanismes accessoris, un és per mitjà de l'expressió del gen *cut* a les cèl·lules frontera que inhibeix l'expressió dels lligands Delta i Serrate (Micchelli et al, 1997; Neumann & Cohen, 1996). L'altre mecanisme és el fet que l'expressió dels lligands de la via disminueix la capacitat de les mateixes cèl·lules flanquejants de respondre a la pròpia via (Neumann & Cohen, 1996) (Fig.R14).

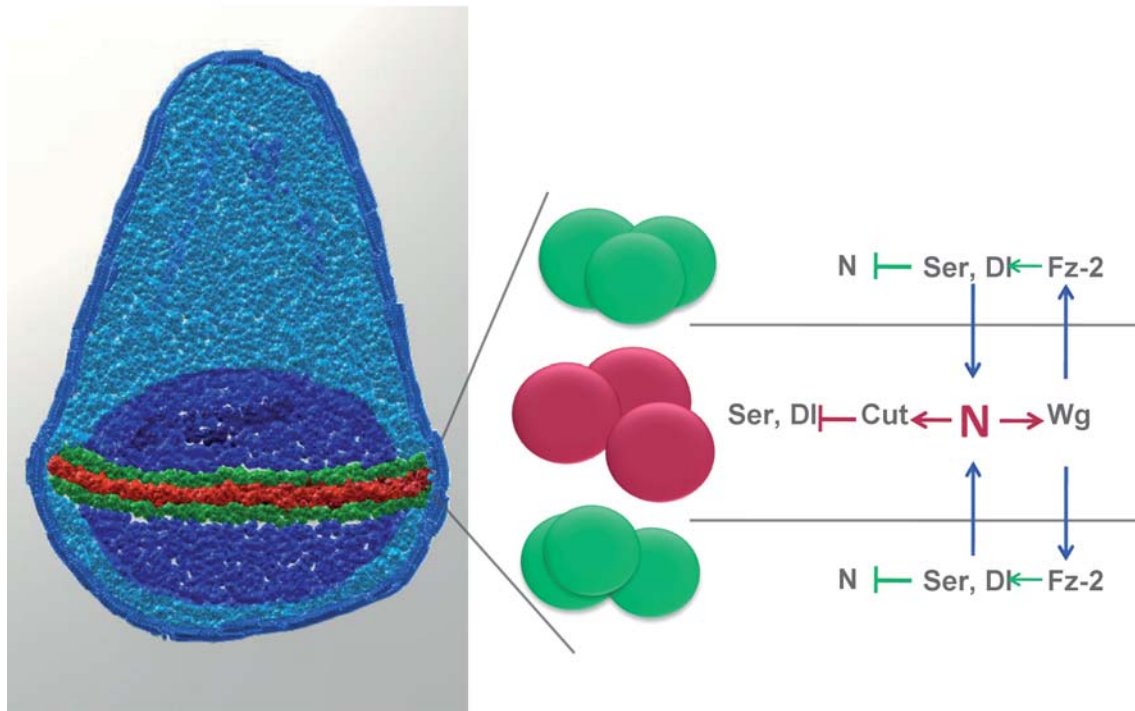


Figura R14. Formació de la frontera dorso-ventral a l'ala.

Esquema d'un disc d'ala de larva 3 de *Drosophila melanogaster* on es ressalten les cèl·lules flanquejants en verd i les cèl·lules frontera en vermell. Es mostra com s'aconsegueix delimitar l'activitat a la via de Notch només en les cèl·lules que formaran la frontera dorso-ventral. En aquestes l'activitat de la via indueix l'expressió dels gens *cut* i *wg*. Wg es secreta i activa a les cèl·lules flanquejants l'expressió dels lligands Delta i Serrate que a la vegada activen la via de Notch a les cèl·lules frontera. La via de Notch no s'activa a les cèl·lules flanquejants perquè la pròpia expressió de Delta i Serrate inhibeix la capacitat d'activar la via de les cèl·lules que els expressen. A més a més l'expressió de *cut* en les cèl·lules frontera inhibeix l'expressió dels lligands que podrien activar la via de Notch en les cèl·lules flanquejants. Modificat de (Irvine & Vogt, 1997).

Un altre dels fenotips de la via de Notch a l'ala és l'engruiximent de les venes (de Celis & Garcia-Bellido, 1994). Sembla que la interacció entre les vies de EGFR i Notch és vital per tal de col·locar i restringir les venes durant l'estadi de larva 3 (Crozatier et al, 2004).

Finalment, la via de Notch també s'ha relacionat amb la proliferació al disc d'ala. Sembla que Notch pot promoure la proliferació però de manera indirecta a través de Wg (Giraldez & Cohen, 2003). L'activitat de la via de Notch en la zona de la frontera dorso-ventral provoca una parada del cicle i, per tant, inhibeix la proliferació en aquestes cèl·lules. Però seria a través de Wg i la posterior inhibició de Notch per part d'aquest el que induiria la proliferació fora de la frontera dorso-ventral (Herranz et al, 2008).

Així doncs, veient que la disminució de WOC al disc d'ala mitjançant ARNi provoca que no es formi bé el marge de l'ala, ens vam plantejar que potser WOC regula d'alguna manera l'activitat de la via de Notch en la frontera dorso-ventral. Els objectius que ens vam plantejar en aquesta part van ser: corroborar mitjançant l'al·lel nul *wocB111* que els fenotips són específics de la falta de WOC i no provocats per algun efecte artefactual de l'ús d'ARNi. Si realment es comprova l'especificitat, analitzar alguns dels gens diana de la via de Notch per veure si hi ha alguna interacció amb la via.

3.2.2. MATERIALS i MÈTODES.

Soques de mosques:

L'al·lel *wocB111* es descriu a (Raffa et al, 2005). Es va generar un recombinant *wocB111* amb el FRT82B a partir de la línia *yw;;FRT82B abd⁻/TM6b* cedida pel Dr. Casali. Els *stocks* portadors de FLP per generar els clons van ser cedits pel Dr. Casali, pel Dr. Franch-Marro i pel laboratori del Dr. Marco Milan.

ywHsFLP; ; FRT82B armLacZ

f⁻ HsFLP; ;FRT82B f⁺/TM6b

ywHsFLP; ; FRT82B M⁻ ubiGFP/TM6b

Per als experiments d'ARNi s'han utilitzat les soques de WOC i Ptc Gal4 descrites als materials i mètodes del capítol 1 de resultats. La soca *yw; tubGal80;Hh Gal4/TM6b* ha estat cedida pel Dr. Franch-Marro.

Anàlisi clonal (Sistema de recombinació mitòtica a la línia somàtica FLP-FRT):

Una cèl·lula que es divideix mitòticament dona dues cèl·lules filles que són genotípicament idèntiques a la mare. Si es produeix però un intercanvi de cromàtides germanes (recombinació mitòtica), les cèl·lules filles resultants poden ser genotípicament diferents depenent que la mare sigui heterozigòtica per un al·lel concret. La recombinació mitòtica pot succeir de forma natural o bé de forma induïda per agents que danyen l'ADN (per exemple, els rajos X). També es pot induir recombinació mitòtica d'una forma més controlada usant recombinació de lloc específic. Es poden crear línies transgèniques que contenen la recombinasa de lloc específic FLP (*Saccharomyces cerevisiae*) i la seva seqüència d'unió FRT. En aquestes línies es podran generar clons de cèl·lules mutants per un gen durant el desenvolupament expressant la FLP amb un promotor de *heat shock* en el moment que es vulgui. Aquests clons es poden visualitzar en els discos imaginals o en les estructures adultes fent servir diferents marcadors cel·lulars o morfològics (Golic & Lindquist, 1989; Xu & Rubin, 1993).

En tots els clons generats en aquest treball, la inducció de la FLP es va realitzar entre 24 i 48hores després de la posta amb un *heat shock* d' 1 hora. Posteriorment es dissecionaren els discos en l'estadi de la larva 3 i s'analitzaren tal com s'explica en els materials i mètodes del capítol 1 de resultats.

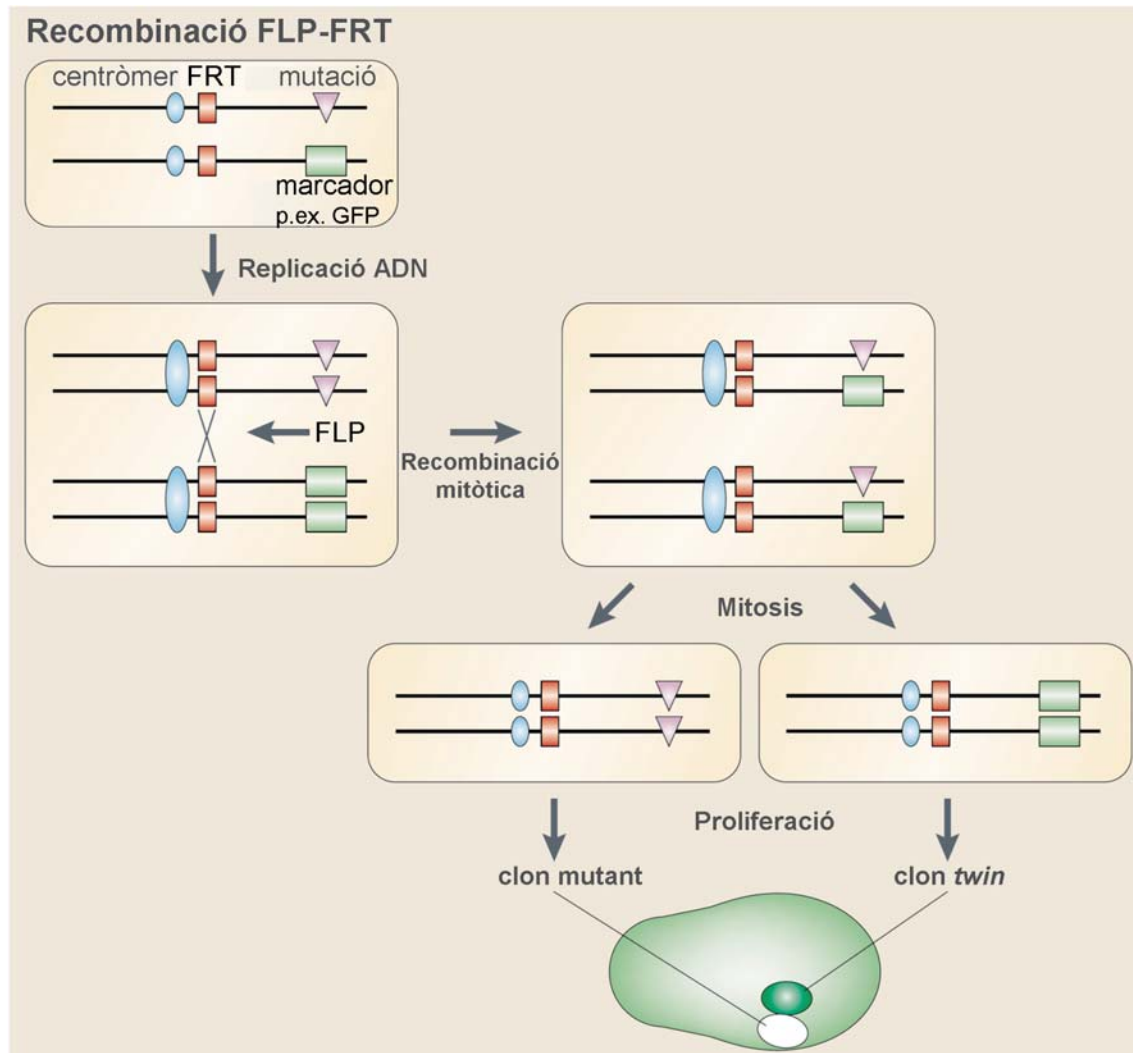


Figura R15. Generació de clons mitòtics en els discos imaginals.

Un cop s'indueix l'expressió de la FLP per *heat shock*, els braços cromosòmics pateixen una recombinació específica en els llocs FRT. Si la recombinació somàtica succeeix en una cèl·lula heterozigòtica per una mutació d'interès, les següents divisions cel·lulars donaran lloc a dues poblacions diferents de cèl·lules filles. Una homozigòtica per al gen mutant (clon mutant) i una altra homozigòtica per al gen salvatge (clon *twin*). Si un marcador cel·lular (GFP) és col·locat en trans a la mutació en la cèl·lula parental, llavors el clon mutant pot ser identificat per l'absència del marcador i el clon *twin* per tenir el doble de marcador. Extret de (Tabata, 2001).

Preparació d'ales:

En primer lloc s'agafen aproximadament 10 mosques adultes i es fiquen en un *ependorf* amb medi SH (glicerol i metanol, en una proporció d'1:3), on es deixen durant un mínim de 24 hores a temperatura ambient. Al dia següent es fiquen les mosques en una cubeta de dissecció amb medi SH. Es dissectionen les mosques amb cura, de manera que les ales no es trenquin. En un porta es fiquen 30 µl de medi Fauré amb l'ajuda d'una punta retallada. S'hi fiquen les ales.

S'estenen bé les ales i es col·loca el cobreobjectes. Es deixa tota la nit el porta sota un pes amb un paper de filtre entremig.

Medi Fauré: Es mesuren 50 ml d'aigua MilliQ. Es pesen 50 g d'hidrat de cloral i 30 g de goma Aràbiga. Es barreja i s'escalfa amb agitació a la campana durant tot el dia, fins que la barreja estigui completament homogènia. A continuació es pesen 20 g de glicerina 100% i es barregen amb la solució anterior. Es deixa O/N amb agitació. Al dia següent es distribueixen en tubs Falcon de 50 ml i es centrifuguen durant 10 minuts al màxim de revolucions. Es recupera el sobrenedant net i s'aliquota. Es pot guardar a temperatura ambient.

Anticossos:

Anti β -galactosidasa (*goat IgG*, 4600-1409; Biogenesis): 1:10.000

Anti Wg(*Hybridoma bank* 4D4): 1:200

Anti cut(*Hybridoma bank* 2B10): 1:100

Genotips:

Figura R12: w; ; PtcGal4/ WOC^{ARNi}

w;tub Gal80;HhGal4/ WOC^{ARNi}

Figura R16: Hs FLPyw; ; FRT82B wocB111/FRT82B armLacZ

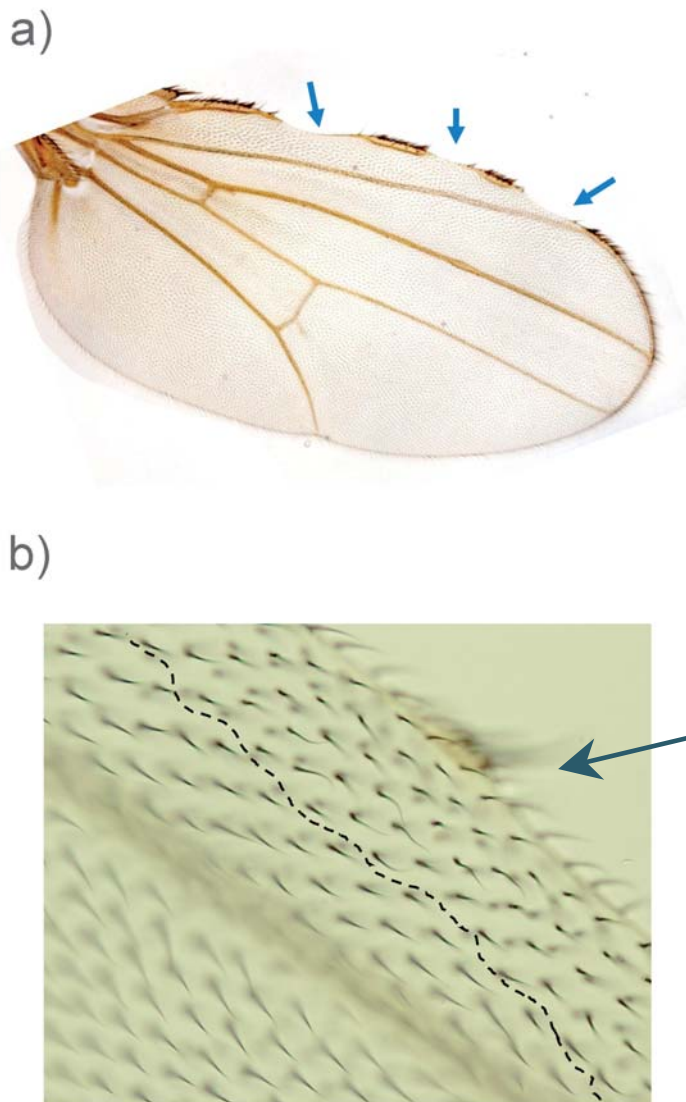
f^{36a} HsFLP; ; FRT82B wocB111/FRT82B f⁺

Figura R17: Hs FLPyw; ; FRT82B wocB111/FRT82B armLacZ

Figura R18: yw; tub Gal80; HhGal4/ WOC^{ARNi}

3.2.2. RESULTATS

Com que els fenotips observats a la figura R12 podrien ésser deguts a efectes indirectes causats per l'ARNi, ja sigui perquè la seqüència emprada per formar el *hairpin* degradi altres missatgers o bé per qualsevol altra inducció de fenotip no relacionada amb la baixada de la proteïna WOC, vam decidir utilitzar l'al·lel nul *wocB111* com a font independent d'anàlisi. El problema d'usar aquest al·lel és que tal com s'ha esmentat anteriorment és letal a l'estadi de larva 3, impossibilitant d'aquesta manera l'escrutini de les ales de mosques adultes. Per dirimir aquesta dificultat vam decidir usar l'anàlisi clonal.



FiguraR16. Anàlisi clonal a l'ala

a) Talls en el marge de l'ala (fletxes blaves) observats en un adult en el qual s'han generat clons de *wocB111* durant el desenvolupament (24h-48h de posta).

b) Detall d'un clon *wocB111* marcat amb el fenotip *forked*. S'observa com el clon envolta el marge tallat de l'ala. La línia discontinua delimita el clon mutant senyalat amb la fletxa.

D'aquesta manera podríem generar clons de cèl·lules que continguessin els dos al·lels *wocB111* i analitzar a l'ala si aquests clons produeixen els mateixos fenotips que els observats amb l'ARNi. Com es pot observar a la figura R16a les ales de les mosques en les quals s'han generat clons mutants a l'atzar presenten el mateix fenotip en el marge de l'ala que l'observat

Resultats

a la figura R12. Podria ser, però, que aquest fenotip no fos causat per la generació d'un clon en el marge dorso-ventral, sinó perquè un clon proper influeix indirectament la formació del marge. Per tal de demostrar que aquest fenotip és causat directament per un clon mutant *woc* vam utilitzar l'al·lel *forked*^{36a} que marca les quetes i els tricomes donant-los una forma característica fàcilment recognizable. Així vam usar un fons genètic mutant per *forked* que és recuperat per un transgen que expressa *forked* en el cromosoma 3 amb el FRT82B i en l'altre cromosoma 3, la mutació *wocB111* amb el FRT82B. D'aquesta manera quan es generen els clons, per una banda es produirà un clon amb el dos al·lells *wocB111* i que per tant deixarà de recuperar el fenotip *forked* i per l'altra un clon amb dues còpies del transgen *forked* que continuarà recuperant el fenotip de l'al·lel *forked*^{36a}. El clon mutant de *woc* a l'ala el podem delimitar gràcies a que presentarà el fenotip *forked* en els tricomes. Com veiem a la figura R16b en una magnificació del marge tallat de l'ala observem que hi ha un clon de cèl·lules marcadess amb *forked* que circumda aquest marge mal format. Aquest resultat ens confirma que la falta de WOC en la frontera dorso-ventral de l'ala causa que no es formi bé el marge de l'ala.

Un cop vista l'especificitat del fenotip sobre el marge dorso-ventral, es va procedir a analitzar si la falta de WOC provoca que la via de Notch es vegi afectada, ja que quan aquesta via no s'activa específicament en la separació dorso-ventral no es forma bé aquesta frontera. Com s'ha esmentat en la introducció d'aquest capítol, hi ha dos gens *diana*, *wingless* i *cut*, que s'activen específicament en la frontera dorso-ventral en el disc d'ala en resposta a l'activació de la via de Notch (fig. R14). Per tal d'analitzar si l'expressió d'aquests dos gens *diana* es veu afectada en absència de WOC es va utilitzar un FRT82B que té un transgen que expressa LacZ sota la direcció del promotor ubic d'armadillo. En la figura R17 podem distingir els clons mutants per l'absència de senyal de LacZ. Com es pot notar els clons són molt petits. Una propietat de l'anàlisi clonal és que quan es genera la primera cèl·lula del futur clon, també es genera una cèl·lula normal, que pot ser marcada, que donarà lloc al que s'anomena el clon *twin*. En el nostre cas en absència de *heat shock* totes les cèl·lules del disc romandrien en heterozigosis per *wocB111* i *armLacZ* i per tant, totes tindrien senyal per LacZ. Ara bé si induïm la formació de clons, obtindrem un clon de cèl·lules mutant per *woc* que no tindrà senyal LacZ, i un clon *twin* homozigòtic per *armLacZ* i que tindrà el doble de senyal per LacZ que les cèl·lules heterozigòtiques. Així es pot diferenciar entre el clon mutant per *woc*, el clon *twin* i la resta del disc. En la figura R17 es veu clarament la desproporció entre els clons mutants i els clons *twins*. Això és un reflex de que en el clon mutant hi ha un problema important de proliferació o bé que les cèl·lules mutants pateixen mort cel·lular. Aquest problema de proliferació també

s'observa en utilitzar l'ARNi com s'ha vist en la figura R12. La mida tan petita dels clons fa molt difícil l'anàlisi molecular de la via de Notch. Per tal d'incrementar la grandària dels clons es va utilitzar un fons mutant *minute* en heterozigosis que alenteix la proliferació i el creixement de les cèl·lules. Així al generar el clon mutant podem aconseguir que perdi l'al·lel *minute* i per tant competeixi amb un clon *twin* homozigòtic *minute* i un disc heterozigòtic *minute*, adquirint per tant un avantatge proliferatiu sobre la resta de les cèl·lules del disc. En el nostre cas per això aquesta aproximació no ha donat els fruits esperats ja que els clons obtinguts tenen una mida molt similar als de la figura R17.

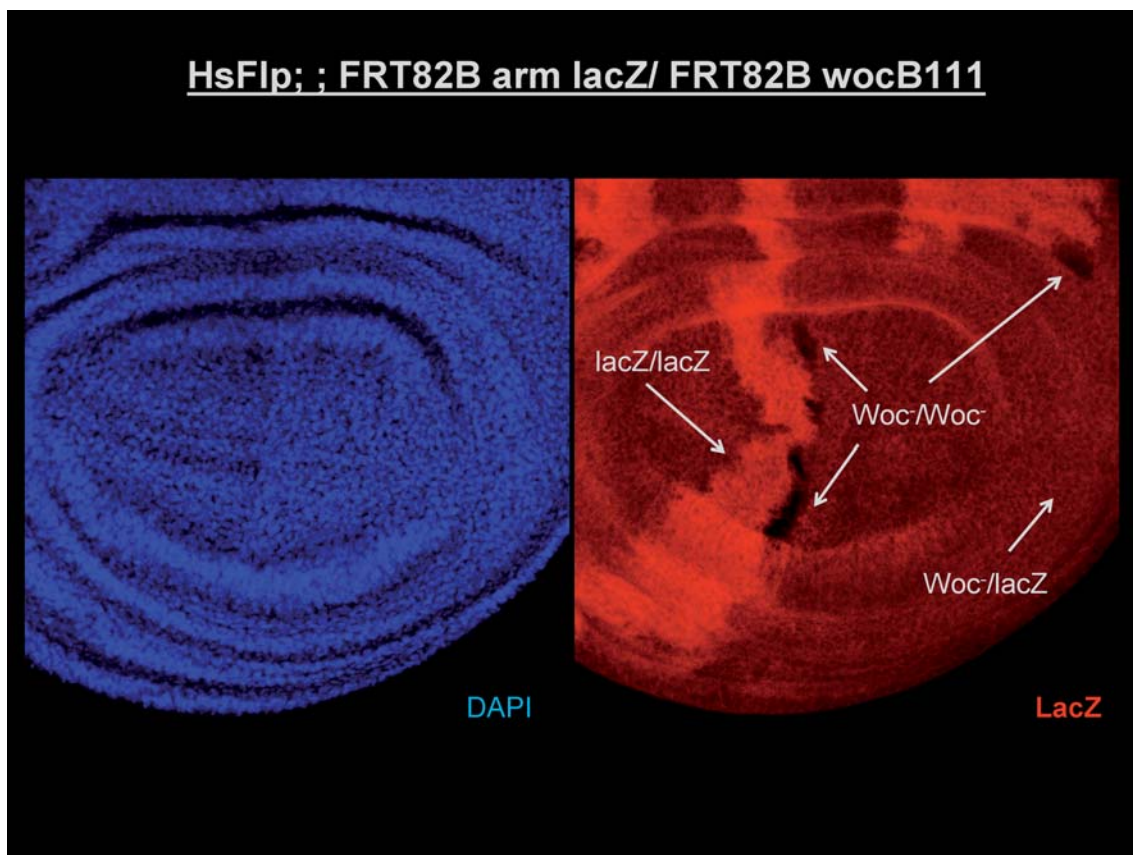


Figura R17. Clons mutants wocB111 al disc d'ala.

Detall del *wing pouch* d'un disc d'ala de larva 3 del genotip HsFlp; ;FRT82B arm lacZ/FRT82B wocB111 on s'han induït clons. A l'esquerra tinció amb DAPI i a la dreta tinció amb un anticòs contra β -galactosidasa. Es senyalen els clons mutants per a *woc* (sense senyal), els clons *twin* amb el doble de senyal que la resta del disc.

Degut a la dimensió tan reduïda dels clons obtinguts es va decidir tornar a usar l'ARNi, ja que ens permet rebaixar la quantitat de WOC a tot el compartiment posterior de l'ala amb el *driver* Hhgal4 i d'aquesta manera podem analitzar l'expressió de Wg i cut en aquest compartiment.

Resultats

Com es pot apreciar en la figura R18a, hi ha una reducció molt important de WOC al compartiment posterior. Si s'analitza l'expressió de Wg, no sembla que hi hagi cap canvi apreciable.

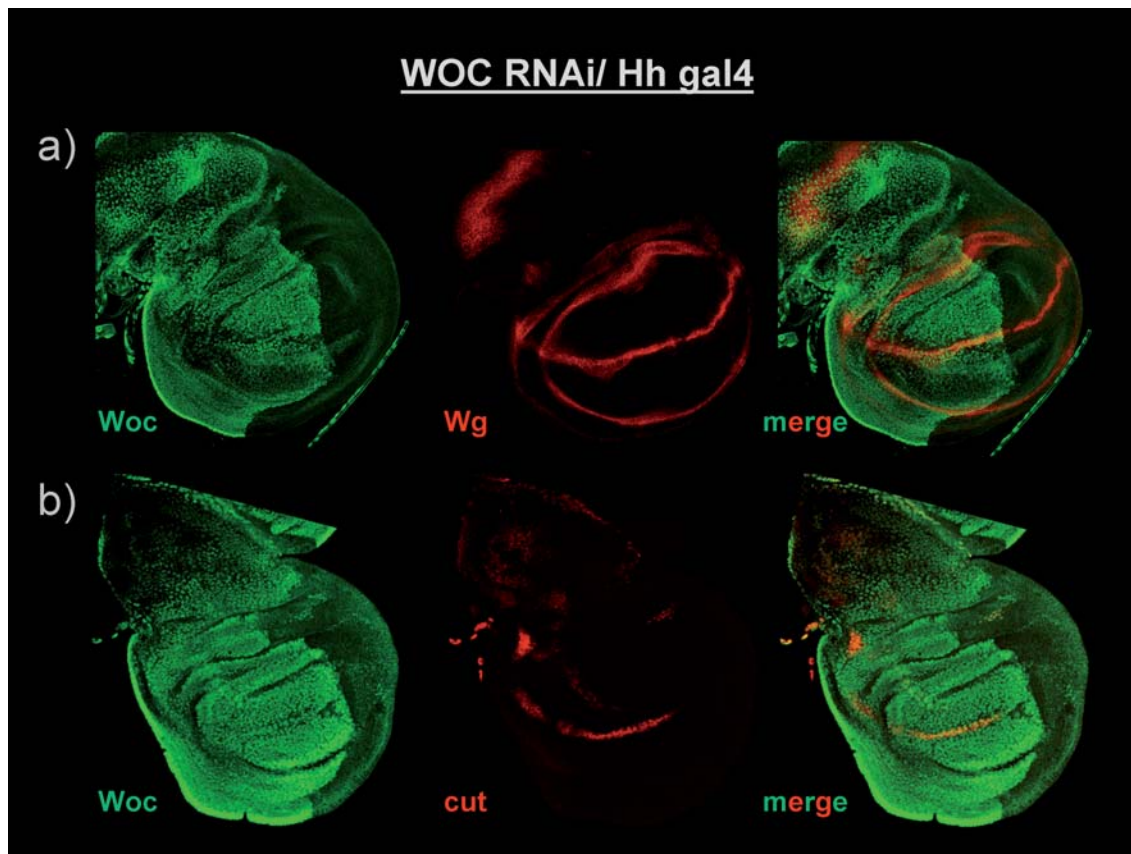


Figura R18. Expressió de Wg i cut amb ARNi de WOC.

Tinció de discs d'ala on es produeix ARNi de WOC al compartiment posterior mitjançant el *driver* HhGal4. a) Tinció amb un anticòs contra Wg (vermell), on no s'aprecia cap canvi. b) Tinció amb un anticòs contra cut. S'aprecia que en el compartiment posterior deixa d'expressar-se.

Per altra banda en la figura R18b, la tinció de cut desapareix del compartiment posterior on la quantitat de WOC es troba fortament disminuïda. És important notar que la baixada de cut no es produeix just en la frontera entre els compartiments anterior-posterior, sinó que comença dins del compartiment anterior on hi ha una expressió normal de WOC. Aquest fet porta a pensar que potser la falta de WOC afecta l'expressió de cut d'una manera no autònoma cel·lular, i que per tant WOC estaria afectant l'expressió d'un altre factor que es secreta que a la vegada regula l'expressió de cut.

4. DISCUSSIÓ

4.1. La unió d'HP1c a la cromatina

Les proteïnes HP1 són proteïnes de cromatina i com a tals no presenten unió preferencial per cap seqüència d'ADN determinada. El seu mode d'unió a la cromatina consisteix principalment en la unió a la lisina 9 de la histona H3 només quan està di- o tri-metilada. S'han descrit altres mecanismes que influeixen en la unió d'HP1, com interaccions amb multitud de diferents proteïnes o interaccions inespecífiques amb ADN o ARN (Fanti & Pimpinelli, 2008; Hediger & Gasser, 2006).

El cas prototípic és l'HP1a de *Drosophila*. Es troba localitzada a l'heterocromatina pericentromèrica on la metilació de l'H3K9 és troba a la vegada enriquida (Fanti et al, 2003). S'ha demostrat que la unió de l'HP1a a l'heterocromatina depèn d'aquesta metilació, ja que en mutants de Su(var)3-9, que és l'enzim responsable de metilar l'H3K9 en aquesta regió, la localització d'HP1a al cromocentre es veu fortament compromesa (Schotta et al, 2002). L'HP1a també es concentra al cromosoma 4 i en menys intensitat es localitza en alguns llocs eucromàtics. S'ha pogut demostrar que en aquests llocs la localització depèn de l'enzim SetDB1 que és l'enzim que metila l'H3K9 en aquestes localitzacions (Seum et al, 2007; Tzeng et al, 2007).

Pel que fa a les altres dues isoformes ubiques de *Drosophila*, l'HP1b i l'HP1c, presenten una localització molt diferent a la de l'HP1a. En el cas de l'HP1b, es troba localitzada a l'heterocromatina igual que la a, però també es troba àmpliament localitzada a l'eucromatina a diferència de l'HP1a (Smothers & Henikoff, 2001). El cas extrem és l'HP1c, que es troba absent de l'heterocromatina, i per contra es troba extensament distribuïda per l'eucromatina (Smothers & Henikoff, 2001). El cas de l'HP1c és paradigmàtic, ja que tot i ser una proteïna HP1 no es troba localitzada allà on la metilació de H3K9 és més abundant, suggerint que la seva unió a la cromatina no depèn d'aquesta metilació.

4.1.1. La relació entre HP1c i la metilació d'H3K9

Tot i que la major part de la metilació de l'H3K9 nuclear es troba a les regions pericentromèriques, podria ser que en regions eucromàtiques, allà on es troba l'HP1c, hi hagués certs nivells de metilació que fossin els responsables de la seva unió a la cromatina. Això es suggereix en les immunolocalitzacions de tri-metil H3K9 a cèl·lules SL2 (Fig.R1a-b), on es pot apreciar un senyal distribuït per la regió eucromàtica. És destacable la diferència entre el



La pregunta a respondre doncs és: té l'HP1c afinitat per l'H3K9 metilada? Si analitzem un alineament de les seqüències de les HP1a/b/c (Fig.D1) i utilitzem els coneixements derivats de l'estructura dels diferents cromodominis cristal·litzats, podem predir si l'HP1c conté tots els determinants estructurals necessaris per interaccionar amb l'H3K9 metilada. Com podem observar, la seqüència dels tres cromodominis presenta un alt grau d'identitat. A més podem veure que els tres residus aromàtics que formen la butxaca on els grups metils són acomodats, estan conservats en l'HP1c. A més a més els tres residus que interaccionen amb la cadena lateral de l'H3K9 també estan conservats de manera que podríem predir que l'HP1c és capaç d'allotjar una lisina metilada (residus en blau fort Fig.D1). Si ens fixem ara en el solc del cromodomini que interacciona amb els aminoàcids que precedeixen l'H3K9, el que podem observar és que els residus que formen el solc estan altament conservats amb petites variacions. Dels residus que formen aquest solc n'hi ha 4 que formen interaccions específiques. D'aquests quatre, l'HP1c presenta variacions en 2. Un d'ells és la C46, però en aquest cas l'homòleg d'HP1 de *S. pombe* (Swi6) presenta també aquest canvi i s'ha demostrat que interacciona específicament amb l'H3K9 metilada (Nakayama et al, 2001). L'altra variació és la N7. Aquesta posició està bastant conservada entre les proteïnes HP1 sent ocupada per un glutàmic. Aquest residu però pot variar sent una valina en les proteïnes polycomb i la proteïna Chp1 de *S.pombe*. Per tant, podem afirmar amb prou confiança que l'HP1c ha de ser capaç d'interaccionar amb una lisina metilada. Ara bé, no podem fer una afirmació concloent sobre si l'HP1c reconeixerà l'H3K9 metilada o bé tindrà afinitat per una altra lisina metilada, tot i que és molt probable que presenti afinitat per l'H3K9.

De l'anàlisi de la capacitat d'HP1c d'interaccionar amb l'H3K9 metilada *in vitro* (Fig.R10), podem concloure bàsicament dues coses: la primera és que com ens esperàvem, l'HP1c interacciona específicament amb la histona H3 i a més de manera dependent d'una modificació postraduccional, ja que és incapaç d'interaccionar amb la histona H3 produïda a bacteri i que per tant està lliure de modificacions postraduccional (Fig.R10a). El fet que aquesta interacció sigui competida amb un pèptid corresponent a la histona H3 tri-metilada en la K9 i no pel mateix pèptid no metilat (Fig.R10c), ens demostra que aquesta interacció es produeix, tal com succeeix amb l'HP1a, mitjançant la metilació de l'H3K9. La segona conclusió és que l'HP1c és capaç d'interaccionar amb mono-nucleosomes purificats de cèl·lules SL2. El fet interessant però, és que els nucleosomes que interaccionen amb l'HP1c estan enriquits amb di- i tri-metilació de l'H3K9, suggerint que la interacció que s'ha descrit anteriorment també és usada per interaccionar amb el substrat natiu de la cromatina, el nucleosoma

Com hem vist, el cromodomini de l'HP1c té la capacitat d'unir la metilació de l'H3K9 *in vitro*. *In vivo* però l'HP1c és troba exclusivament localitzada a l'eucromatina, on aquesta modificació és molt menys abundant que a l'heterocromatina, i que presentaria com a màxim una colocalització del 50% a cromosomes politènics amb aquesta modificació. Així, sembla bastant difícil que la unió d'HP1c a l'eucromatina estigui intervinguda per aquesta modificació. A més a més, s'ha publicat que la propietat de l'HP1c de localitzar a l'eucromatina resideix en el seu cromodomini-shadow, i no en el seu cromodomini o domini hinge (Smothers & Henikoff, 2001). Això suggereix que l'HP1c a través del seu cromodomini-shadow interacciona amb proteïnes diferents a les d'HP1a i que la localitzen a l'eucromatina.

4.1.2. WOC/ROW i la localització eucromàtica d'HP1c.

Seguint el raonament anterior, la purificació de complexos d'HP1c d'extractes nuclears de SL2 porta a la identificació de dues proteïnes WOC i CG8092. Aquestes interaccions s'han corroborat per diferents metodologies (Fig.R5c, Fig.A2). És important notar que l'HP1a no interacciona amb aquestes dues proteïnes (Fig.R5c, Fig.A2), suggerint que aquestes podrien ésser les responsables de la localització eucromàtica específica d'HP1c. Això es reforça en analitzar l'estructura d'aquestes dues proteïnes, ja que les dues presenten múltiples dominis Zn-finger i en menor nombre dominis AT-hook. Aquests dominis són normalment dominis d'unió a ADN. En el cas dels Zn-finger, la seva unió es específica de seqüència, mentre que la unió dels AT-hook sol ser específica de regions riques en AT (Reeves & Nissen, 1990). Degut a que la proteïna CG8092 presenta una estructura molt similar a la de la proteïna WOC, se l'ha batejat com a Relative Of Woc (ROW).

Com es pot observar en la figura R7a, en els cromosomes on els nivells de WOC i ROW han estat rebaixats considerablement per ARNi, no és possible detectar la presència d'HP1c. Aquest resultat es podria interpretar com que HP1c necessita de WOC i de ROW per tal de poder-se unir a la cromatina *in vivo*. Per altra banda tant WOC com ROW es troben correctament localitzades en absència d'HP1c, indicant que tant WOC com ROW no necessiten d'HP1c per unir-se a la cromatina (Fig.R9a). Ara bé, l'absència del senyal corresponent a HP1c en els cromosomes politènics mutants de WOC i ROW es podria interpretar també com una disminució dels nivells proteics d'HP1c, fenomen que comportaria també una baixada en la detecció d'HP1c en aquests cromosomes mutants. De fet com es pot observar en la figura R8a i R8b, els nivells proteics d'HP1c es troben disminuïts en un fons d'ARNi tant de WOC com de ROW. Una altra vegada aquest resultat pot ésser interpretat principalment de dues maneres:

la primera és que l'HP1c necessita de WOC i de ROW per unir-se a la cromatina i que en l'absència d'alguna de les dues, l'HP1c al no poder-se unir a la cromatina es desestabilitza i es degrada, explicant els nivells de proteïna reduïts. La segona és que WOC i ROW afectin directament o indirectament els nivells de transcripció d'HP1c. Així, si l'absència d'aquestes proteïnes causés la disminució de la transcripció d'HP1c, això explicaria els nivells baixos de proteïna i per tant l'absència de senyal als cromosomes politènics també. Hi ha dues dades que recolzen la primera de les possibilitats, una és que els nivells de mRNA d'HP1c són molt similars al control (Fig.R8c), tot i que estan una mica disminuïts però en cap cas aquesta diferència hauria de causar la diferència observada en els politènics de la figura R7a. L'altra dada és l'observació que hi ha una diferència en la unió a la cromatina de l'HP1c-lacI depenent de si s'expressa en una línia salvatge o en una línia on es produeix ARNi de WOC o ROW, sent la unió més gran en el cas de la línia control (Fig.R7b i R7c). Es pot concloure doncs, que a partir d'aquestes dades l'HP1c s'uneix a les proteïnes WOC i ROW i que aquestes permeten que s'associï a la cromatina. En absència d'alguna d'aquestes dues proteïnes l'HP1c no es pot unir a la cromatina i els seus nivells es veuen reduïts. Sembla que la causa major d'aquesta disminució sigui una desestabilització a nivell de proteïna, però no es pot descartar que sigui una combinació d'aquest darrer fenomen juntament amb una davallada dels nivells transcripcionals d'HP1c.

Una observació completament inesperada és la localització ectòpica d'HP1c-lacI a l'heterocromatina (Fig.R7b). És inesperada perquè la localització d'HP1c es caracteritza per estar exclosa de l'heterocromatina, en clar contrast amb la localització d'HP1a. Per què doncs l'HP1c-lacI es localitza a l'heterocromatina? Una resposta simple fóra considerar en primer lloc que hi ha una sobreexpressió d'HP1c-lacI en aquest experiment, i en segon lloc que tal com hem vist, l'HP1c té afinitat per la metilació d'H3K9 in vitro. Així doncs si augmentem la concentració d'HP1c, podem desplaçar una porció de molècules cap a l'heterocromatina on hi ha una gran concentració de metilació d'H3K9.

És important per fer una anàlisi completa notar que l'HP1c és capaç de localitzar WOC i ROW ectòpicament. Això ho podem observar quan es localitza ectòpicament l'HP1c fusionada al domini d'unió a l'ADN del repressor bacterià LacI, a una regió genòmica on hi ha repeticions de la seqüència d'unió per LacI (Fig.R6c i R6d) i també en la localització ectòpica a l'heterocromatina (Fig.R7b). Això suggereix que el complex ternari entre les tres proteïnes es troba preformat i que l'HP1c té la potencialitat de dirigir el complex en circumstàncies especials a altres llocs. En el cas de l'HP1c-LacI se li ha afegit un domini d'unió a ADN a l'HP1c i aquesta es localitza al lloc on hi ha la seqüència d'unió del LacI juntament amb WOC i ROW. En

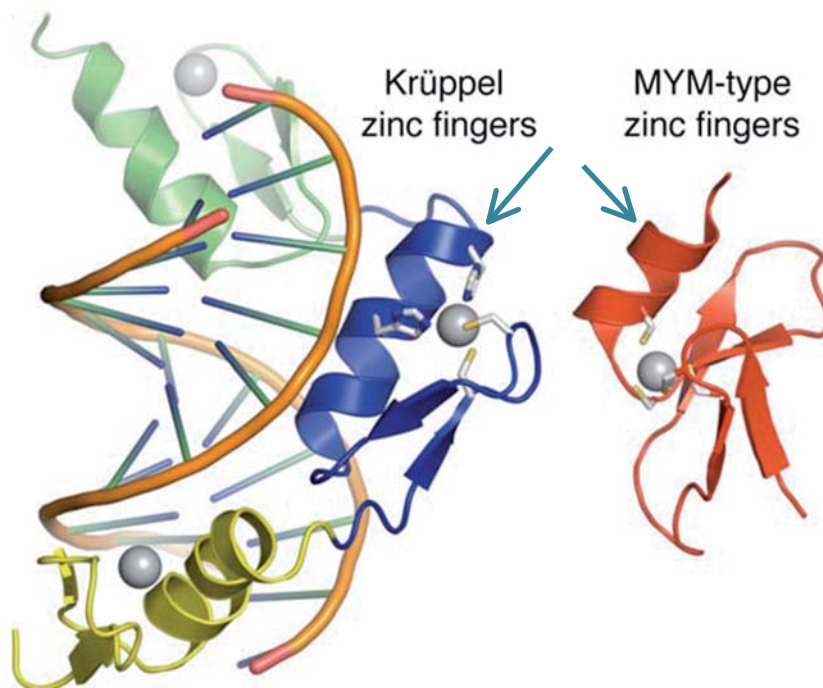
la localització ectòpica a l'heterocromatina podem hipotetitzar que es produeix mitjançant el cromodomini de l'HP1c que presenta afinitat per la metilació de l'H3K9. Això es fonamenta en que aquesta localització ectòpica d'HP1c es produeix en absència de WOC i de ROW (Fig.R7b i R7c), suggerint que la localització heterocromàtica ha de dependre de la pròpia HP1c. Seria definitiu poder analitzar si una HP1c mutada al cromodomini, que és incapaç d'unir la metilació de l'H3K9, al sobreexpressar-se es continua deslocalitzant a l'heterocromatina o no.

També es podria analitzar quins són els efectes de la localització ectòpica d'HP1c a l'heterocromatina. Una explicació seria que es produeix una desestabilització de l'heterocromatina per efectes directes, ja que estaria realitzant les seves funcions en un lloc inadequat, o bé per simple competència amb l'HP1a impedint així la seva funció heterocromàtica. Si aquest fos el cas podríem hipotetitzar que la disminució dels nivells d'HP1c en absència de WOC o ROW, és un mecanisme per tal d'evitar que l'HP1c es deslocalitzi a l'heterocromatina i hi produeixi efectes perjudicials en aquesta estructura.

D'aquesta manera, la situació endògena es pot resumir en que en absència de WOC/ROW, HP1c no es localitza a la cromatina (Fig.R7a), en canvi en absència d'HP1c la localització de WOC/ROW no es veu afectada (Fig.R9a). Aquests resultats juntament amb el fet que WOC i ROW presentin tants dominis que es consideren en general d'unió a ADN, suggereixen que WOC/ROW podrien funcionar com una plataforma per la unió d'HP1c.

Són doncs WOC i ROW dues proteïnes que s'uneixen a l'ADN? Pel que fa a WOC és molt probable que la resposta sigui que no. En un article publicat recentment s'ha determinat que un dels homòlegs de WOC a humans, ZNF198, interacciona amb el complex proteic LHC (Gocke & Yu, 2008). Com que aquest complex també interacciona amb la proteïna REST que presenta múltiples dominis Zn-finger i que s'uneix específicament a les seqüències d'ADN RE-1 en alguns promotors (Andres et al, 1999; Ballas et al, 2001), s'ha assumit que ZNF198 competeix amb REST per tal de reclutar el complex LHC a altres promotors unint una altra seqüència d'ADN mitjançant els seus dominis Zn-finger (Hakimi et al, 2003). La sorpresa és que ZNF198 utilitza els seus dominis Zn-finger per tal d'interaccionar amb el complex LHC, suggerint que aquests dominis de ZNF198 no uneixen ADN sinó que estableixen interaccions proteïna-proteïna. En una anàlisi estructural es determina que els dominis Zn-finger de REST són de tipus Krüppel mentre que els de ZNF198 són de tipus MYM i que presenten plegaments significativament diferents (Fig.D2). Especialment l'hèlix α que en els dominis Krüppel interacciona amb el solc ample de l'ADN, en els dominis de tipus MYM és significativament més petita, indicant que aquests darrers difícilment podran interaccionar amb l'ADN. En aquest treball també realitzen

una recerca en les bases de dades per trobar dominis estructurals similars als dominis MYM, i troben que aquests dominis s'assemblen estructuralment molt als dominis LIM (Gocke & Yu, 2008). Els dominis LIM s'han descrit freqüentment formant blocs de repeticions i realitzant interaccions proteïna-proteïna (Kadmas & Beckerle, 2004).



FiguraD2. Comparació de les estructures dels dominis *Zn-fingers* de Krüppel i els de tipus MYM.

Representació de l'estructura dels tres dominis *Zn-finger* de Krüppel unit a ADN (PDB 1ZAA) i el domini *Zn-finger* de tipus MYM de Znf237 (PDB 2DAS). Les esferes corresponen als àtoms de zinc i les cadenes laterals que contacten amb els àtoms estan representades. S'observa que l'hèlix α dels dominis de Krüppel és gairebé el doble de llarga que la del domini tipus MYM (ambdues senyalades amb fletxes), per tal de realitzar els contactes necessaris dins del solc ample. Extret de (Gocke & Yu, 2008).

Hi hauria la possibilitat que WOC es pogués unir a l'ADN a través dels seus dominis *AT-hook*. Aquests dominis es caracteritzen per unir-se a l'ADN pel solc petit de forma inespecífica de seqüència, tot i que presenten preferència per regions riques en A-T. Hi ha una infinitud de proteïnes que contenen des d'1 a desenes d'aquests dominis (Aravind & Landsman, 1998). S'han descrit casos en que aquests dominis són essencials per la unió a seqüències riques en AT en regions promotores, però també en altres casos en que sembla bastant improbable que aquests dominis exerceixin una gran influència en la localització específica de la proteïna, com

és el cas del remodelador BRG1, en el que el domini AT-*hook* pot incrementar el temps de residència i l'afinitat global per la cromatina (Singh et al, 2006). La proteïna WOC podria presentar certa afinitat per l'ADN a través dels seus dominis AT-*hook*, però difícilment explicarien la seva localització. Cal dir també que el dominis AT-*hook* de WOC no estan conservats en els homòlegs humans. Si a aquests arguments els hi afegim l'observació de que en absència de ROW, WOC no es troba unida a la cromatina (Fig.R9d), podem concloure que és bastant improbable que WOC sigui un factor que s'uneix per si sol a l'ADN mitjançant els seus dominis MYM i AT-*hook*.

Pel que fa a ROW, també presenta varis dominis Zn-finger i AT-hooks. En aquest cas però els dominis Zn-finger són de tipus clàssic, és a dir C2-H2. La denominació prové dels aminoàcids que coordinen l'àtom de Zinc. La seqüència consens d'aquests dominis és: (F/Y)-X-C-X2-5-C-X3-(F/Y)-X5-U-X2-H-X3-4-H. On la X correspon a qualsevol aminoàcid i la U correspon a qualsevol aminoàcid hidrofòbic. Aquest tipus de domini està completament estès a través de tots els regnes animals. A part de trobar-se ubiquament és un dels dominis més abundants en els proteomes eucariotes. En el cas dels humans, les últimes estimacions calculen que un 3% dels gens codifiquen proteïnes amb dominis C2-H2, convertint-se en el segon domini més prevalent (Brayer & Segal, 2008). Aquests dominis han estat considerats des de l'inici dominis d'unió a ADN de manera específica de seqüència, trobant-se habitualment en repeticions en tàndem. Així doncs, al presentar ROW com a mínim 6 dominis Zn-finger dels tipus C2H2, alguns amb petites variacions del consens, podríem afirmar que hauria de ser una proteïna d'unió a ADN. Però tenim una dada experimental que contradiu en certa manera aquesta afirmació. És la mateixa dada que en el cas de WOC però a la inversa, ja que veiem que en absència de WOC, ROW no es troba unida a la cromatina (Fig.R9c). Una propietat dels dominis Zn-finger que uneixen ADN de forma específica és que funcionen com a unitats estructurals independents, és a dir que es poden usar com a mòduls d'unió a ADN per tal de localitzar de manera específica altres elements o mòduls estructurals en forma de quimeres proteiques. Aquesta estratègia està sent estudiada àmpliament per tal de poder dissenyar eines moleculars que es puguin localitzar específicament en una seqüència única del genoma utilitzant dominis Zn-finger C2H2 predissenyats. Tenint en compte aquesta independència estructural d'aquests dominis és difícil reconciliar l'absència d'unió de ROW a la cromatina amb que els seus dominis C2H2 siguin un mòdul d'unió a ADN. Llavors si aquest dominis no uneixen ADN, què fan? En els últims anys ha canviat molt la visió que els dominis Zn-finger són únicament mòduls d'unió a ADN, ja que s'han acumulat moltes dades descrivint la unió d'aquests dominis a ARN i a

proteïnes (Gamsjaeger et al, 2007). En el cas dels dominis C2H2 s'han descrit múltiples exemples que aquests actuen com a mòduls d'unió proteïna-proteïna (Gamsjaeger et al, 2007).

Per tant tenint en compte tots aquest arguments no podem afirmar que pel fet que ROW presenta dominis C2H2, aquesta sigui una proteïna d'unió a ADN com a factor de transcripció clàssic. Per tant, a partir dels resultats discutits sobre la figura R9c i R9d ens podríem decantar per la hipòtesi que els dominis Zn-finger de tipus MYM(WOC) i C2H2(ROW) estableixen múltiples interaccions proteïna-proteïna i que els dominis AT-hook confereixen més afinitat per la cromatina però de manera inespecífica de seqüència.

En resum doncs podem afirmar que HP1c, WOC i ROW formen un complex trimèric estable. També que HP1c necessita WOC i ROW per unir-se a la cromatina i que per altra banda aquestes dues no necessiten HP1c per unir-se a la cromatina. Ara bé WOC i ROW són completament interdependents per unir-se a la cromatina. Així el mecanisme d'unió d'HP1c a la cromatina és a través de WOC/ROW, però no podem saber de moment quin és el mecanisme d'unió de WOC/ROW a la cromatina. Potser és unió a ADN o és unió a alguna modificació de la cromatina, o bé a altres proteïnes no identificades que determinen la seva localització altra vegada a través d'unió a la cromatina o bé a ADN.

4.2. Sobre la funció del complex HP1c/WOC/ROW

4.2.1. Reclutament ectòpic

Les proteïnes HP1 han estat des de l'inici relacionades funcionalment amb l'establiment de silenciament transcripcional. L'HP1a va ésser descrita com a supressor de variegació. A més experiments de localització ectòpica van establir que l'HP1a per si sola era capaç de generar silenciament de nou, establint una estructura cromatínica ordenada (Danzon & Wallrath, 2004; Li et al, 2003b). Vam decidir doncs d'utilitzar aquesta propietat de l'HP1a, per tal de veure si l'HP1c es comporta funcionalment de la mateixa manera. El sistema utilitzat és exactament el mateix que es va usar en els estudis de l'HP1a (Danzon & Wallrath, 2004; Li et al, 2003b). Aquest sistema consisteix a fusionar la proteïna d'interès al domini d'unió a ADN del repressor bacterià LacI i generar mosques transgèniques que expressen aquesta quimera sota un promotor induïble per *heat shock*. L'experiment es realitza combinant genèticament la línia transgènica que expressa aquesta quimera amb una línia transgènica que conté una construcció que inclou varies repeticions de la seqüència d'ADN d'unió del repressor LacI, que

estan col·locades a prop del gen *white* com a *reporter*. Com que aquesta combinació es realitza en absència de la font endògena del gen *white*, tot el color vermell que presentin els ulls de la mosca resultant dependrà del gen *white reporter*. S'han utilitzat dues línies *reporter* diferents, una que presenta un nivell d'expressió del gen *white* considerable, anomenada s9.2(*reporter* actiu), i una altra on els nivells del *reporter* són molt baixos, anomenada 157.1(*reporter* silenciats) (Fig.R4). Si en aquestes línies s'expressa la fusió HP1a-Lacl, en les dues línies (s9.2 i 157.1) hi ha un silenciament molt clar (Fig.R4a). Ara bé, quan s'expressa la fusió HP1c-Lacl, en la línia s9.2 veiem que no hi ha el silenciament observat amb l'HP1a, fins i tot sembla que hi hagi una lleugera activació del gen *reporter*. En el cas de la línia 157.1, l'efecte diferencial encara és més clar, ja que mentre que l'HP1a encara silencia més el *reporter*, l'HP1c produeix un increment força evident en l'expressió.

Podem concloure doncs que l'HP1c al contrari que l'HP1a és un factor activador de la transcripció? Amb les dades obtingudes no es pot fer aquesta afirmació, ja que els resultats de la línia s9.2 no són prou evidents per atribuir-los a un efecte directe d'HP1c. Pel que fa a la línia 157.1, tot i ser un efecte molt clar, el que veiem és que un gen que estava reprimat passa a estar menys reprimat. Aquest fenomen podria ser un efecte indirecte de la localització ectòpica d'HP1c, interferint amb la repressió endògena en aquest locus, però no per un efecte directe i específic com a activador d'HP1c.

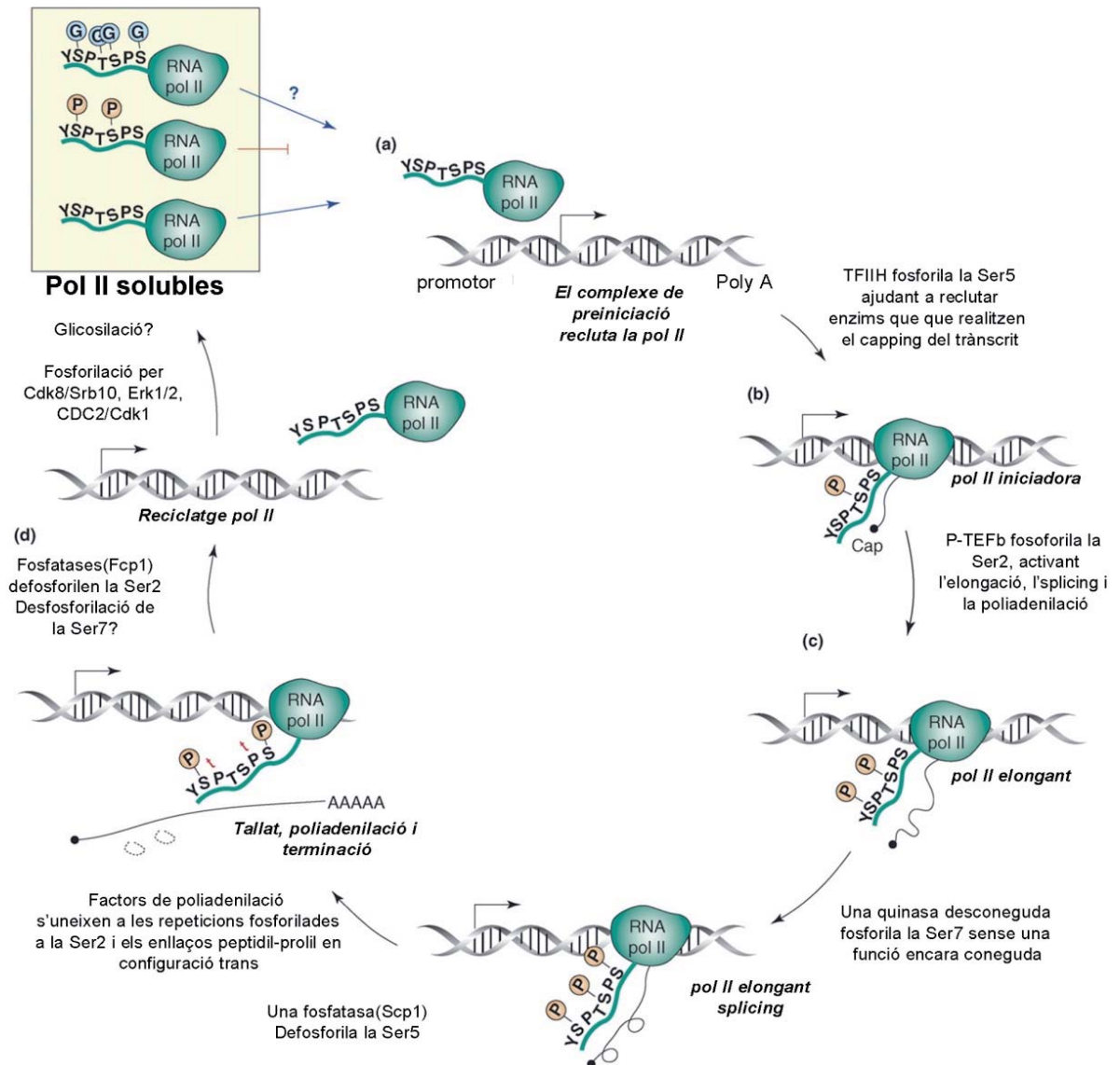
La conclusió que podem treure doncs d'aquests resultats és que l'HP1c no es comporta funcionalment com l'HP1a, ja que en les mateixes condicions en les quals l'HP1a inhibeix la transcripció, l'HP1c no es comporta de la mateixa manera sinó de forma contrària. Ara bé, no podem afirmar que l'HP1c sigui un activador transcripcional.

4.2.2. Sugeriments funcionals a partir dels cromosomes politènics.

Quan es compara la localització d'HP1c, de WOC i de ROW amb la tinció de DAPI als cromosomes politènics, s'observa que aquestes proteïnes es troben en les regions que s'anomenen interbanda, que corresponen a les zones que no es tenyeixen amb DAPI enmig de dues bandes que es troben fortament tenyides (Fig.R1e). Aquest patró interbàndic és típic de factors implicats en la transcripció, com per exemple: SPT5, SPT6, Kis, CHD1, Brahma, FACT que colocalitzen a les interbandes amb la PolII (Andrulis et al, 2000; Armstrong et al, 2002; Kaplan et al, 2000; Saunders et al, 2003; Srinivasan et al, 2005). Per tant a partir d'aquesta localització podem conjecturar que HP1c/WOC/ROW es localitzen en regions actives transcripcionalment,

per tant regions no associades a processos de silenciament transcripcional. Aquesta conjectura es veu reforçada quan comparem el patró de localització d'HP1c/WOC/ROW amb diferents modificacions postraduccionals de les histones que han estat correlacionades amb diferents processos funcionals. Si analitzem primer la colocalització amb la metilació de l'H3K9 i de l'H3K27, veiem que no hi ha una colocalització significativa (Fig.R2a i R2b). Aquestes dues metilacions estan relacionades amb silenciament transcripcional. Així si considerem que HP1c/WOC/ROW estan relacionats amb llocs de transcripció activa no hauríem de veure una colocalització molt extensa. Seguint el raonament, el que sí que hauríem de veure és una forta colocalització amb les modificacions que estan correlacionades amb transcripció activa. La trimetilació de l'H3K4, es troba present en tots els gens que estan sent transcrits activament com també en aquells gens que estan pausats i són potencialment activables (Mikkelsen et al, 2007). El complex colocalitza molt fortament amb aquesta modificació, reforçant la idea que aquestes proteïnes estan involucrades en algun procés que succeeix en regions sensibles a la transcripció (Fig.R2c). Mantenint aquest criteri, s'observa una colocalització important amb la RNAPIII (Fig.R3a). La RNAPIII eucariota està formada per 12 subunitats que estan conservades des del llevat als humans. La subunitat més gran de les tres RNA polimerases comparteixen homologia entre elles i amb la RNA polimerasa dels procariotes (Allison et al, 1985), però la RNAPIII eucariota presenta un element únic a l'extrem carboxi-terminal anomenat CTD, que consisteix en la repetició en tàndem de l'heptapèptid Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser ($Y_1S_2P_3T_4S_5P_6S_7$) (Corden, 1990). El nombre de repeticions varia en diferents espècies, correlacionant bé el major nombre amb la complexitat de l'organisme. El llevat presenta 26 repeticions, 32 als nematodes, 45 a *Drosophila* i 52 als humans. En la majoria dels animals plantes i fongs, les repeticions s'ajusten a la seqüència consens, però en el cas humà les últimes 26 repeticions presenten algunes desviacions de la seqüència consens (Corden, 1990).

El domini CTD és una bastida on es produeixen múltiples interaccions amb diferents factors implicats majoritàriament en transcripció i en el processament dels transcrits de forma cotranscripcional. El CTD es troba profusament modificat postraduccionalment *in vivo*. La Tirosina, la Treonina i les tres Serines es poden fosforilar. Les dues Prolines es poden isomeritzar i les Serines i la Treonina es poden glicosilar. S'ha vist que totes aquestes modificacions modulen les diferents interaccions amb diversos factors per tal de regular els diferents aspectes de la transcripció (Egloff & Murphy, 2008). El gran potencial combinatori d'aquestes modificacions ha fet proposar d'una forma anàlega al codi de les histones, el codi CTD per la transcripció (Buratowski, 2003). En la figura D3 hi ha un diagrama on es resumeix el



FiguraD3. Cicle de modificació del CTD de la RNAPII durant la transcripció.

Modificacions postraduccionals de l'heptapèptid del CTD de la RNAPII durant la transcripció de gens codificants. a) La polII és reclutada als promotors per part del complex de preiniciació, el CTD està desfosforilat, o bé glicosilat. La fosforilació del CTD abans de la iniciació sembla que bloqueja el seu reclutament. El factor general de la transcripció TFIIH fosforila la Ser5 just després de la iniciació ajudant a reclutar i activar enzims que afegeixen una metilguanosina a l'extrem 5' del transcrit naixent. Com que no s'ha pogut trobar el CTD fosforilat i glicosilat al mateix temps, en aquesta fase del cicle la glicosilació ha hagut de ser trenta del CTD. c) La Ser 2 és fosforilada pel factor P-TEFb. Aquesta fosforilació activa l'elongació i el processament de l'ARN. S'ha vist que la Ser7 es fosforila durant la transcripció amb un enriquiment en la zona 3' del gen, però encara no se li ha trobat una funció clara. La Ser5 és desfosforilada a mesura que la PolII arriba a la regió 3' del gen. d) Després del tall i la poliadenilació, la desfosforilació del CTD ajudaria a la PolII a desenganxar-se i ser reciclada per una nova ronda de transcripció. La glicosilació es mostra en les rodones amb una G, la fosforilació amb una P i la isomerització de les prolines en trans amb una t sobre elles. Es mostra només una repetició de l'heptapèptid dels múltiples que conté el CTD. Extret de (Egloff & Murphy, 2008).

coneixement actual sobre la regulació de les modificacions i les proteïnes implicades durant el procés de transcripció.

Les dues modificacions més ben conegudes del CTD són la fosforilació de la S2 i la S5. A més, existeixen anticossos monoclonals molt específics que han estat àmpliament usats en molts estudis. La idea principal és que la fosforilació de la S5 es produeix en la zona 5' del gen, mentre que la fosforilació de la S2 es produeix en la zona 3'. Les dues modificacions coexisteixen en la zona intermèdia durant l'elongació. L'HP1c presenta una forta colocalització amb la fosforilació de la S5 (Fig.R3b), mentre que colocalitza molt poc amb la fosforilació de la S2. Aquest resultat ens indica que HP1c/WOC/ROW es troben associats a regions on hi ha gens que presenten un patró de fosforilació de S5 únicament. Però, què ens està dient aquest resultat funcionalment? El fenomen de la polimerasa pausada va ser descrit per primera vegada en el gen induïble per calor HSP70 de *Drosophila melanogaster* (Gilmour & Lis, 1986). Es va observar que en la situació en què el gen no es troba induït, la polimerasa es troba en el promotor però d'una manera pausada, produint el que s'anomena transcrits abortius de pocs nucleòtids. Un cop s'indueix l'expressió del gen, la polimerasa es desencalla i comença a transcriure de forma productiva. En els últims anys amb l'adveniment de les tècniques anomenades *genome wide*, s'ha pogut determinar que el fenomen de la polimerasa pausada és molt comú en el genoma contràriament al que s'havia pensat (Guenther et al, 2007; Kim et al, 2005; Muse et al, 2007; Zeitlinger et al, 2007). Així hi ha centenars de gens que presenten un patró de localització de la RNAPIII concentrat a la regió 5' i que no presenten expressió. Aquests gens a més, només presenten la fosforilació de la S5 de la RNAPIII, ja que no hi ha elongació i per tant la S2 no es fosforila (Wu & Snyder, 2008). Lligant aquest fenomen amb les modificacions postraduccionals de les histones, s'ha vist que la majoria dels promotors dels gens anotats, estan associats amb la metilació de l'H3K4 i l'acetilació de l'H3K9 i l'H3K14, tot i que aproximadament la meitat no estan actius transcripcionalment (Guenther et al, 2007; Schubeler et al, 2004). El que s'ha definit, és que només els gens que presenten metilació d'H3K36 i d'H3K79 al cos dels gens, són els que presenten elongació produint transcripció productiva (Guenther et al, 2007). Si la nostra hipòtesi és que HP1c/WOC/ROW estan associats a regions on hi ha gens que presenten polimerasa pausada, ja que veiem colocalització amb la metilació de l'H3K4 i també amb la fosforilació de la S5 de la RNAPIII però no amb la fosforilació de la S2, llavors hauríem d'esperar molt poca colocalització amb una modificació relacionada amb elongació com la metilació de l'H3K36. Això és precisament el que s'observa en els cromosomes politènics de la figura R2d.

El grau de colocalització als cromosomes politènics només ens informa de correlacions entre dos elements, ja que la resolució d'aquesta tècnica no ens permet determinar si realment hi ha una coincidència precisa en l'espai entre els factors que s'analitzen. Tot i així, són suficientment informatius per suggerir relacions entre diferents factors i processos i també, no menys important, descartar-ne d'altres. Dels resultats obtinguts als cromosomes politènics, podem concloure que HP1c/WOC/ROW no correlaciona amb cap determinant de silenciament gènic (metilacions d'H3K9 i H3K27 i localització en bandes de DAPI). Per altra banda, HP1c/WOC/ROW correlacionen amb determinants de transcripció activa (metilació H3K4, RNAPolII i localització interbàndica). A més, el fet que s'observi una correlació amb la fosforilació de la S5 i no amb la S2 de la RNAPolII i a més no hi hagi correlació amb la metilació de l'H3K36, suggereix que hi ha una associació amb gens pausats transcripcionalment. Tots aquests resultats van en la línia dels publicats per WOC (Raffa et al, 2005). A més, en aquest mateix treball hi ha un experiment interessant. Indueixen per *heat shock* la transcripció dels gens de resposta a calor, que a cromosomes politènics formen uns estructures cromosòmiques que s'observen amb facilitat anomenades *puffs*. Quan es generen aquests *puffs* s'hi localitzen totes les proteïnes necessàries per produir la transcripció, com la RNA polII fosforilada tan a Ser2 com a Ser5, factors d'elongació etc... Doncs quan s'indueix la formació d'aquests *puffs* WOC no s'hi localitza, suggerint que WOC no és necessària per produir una transcripció estàndard, o dit d'una altra manera que no forma part de la maquinària basal de la transcripció (Raffa et al, 2005). Per acabar el raonament doncs, semblaria que HP1c/WOC/ROW estarien implicades en algun procés relacionat amb la zona iniciadora de la transcripció dels gens en els quals s'ubiquin.

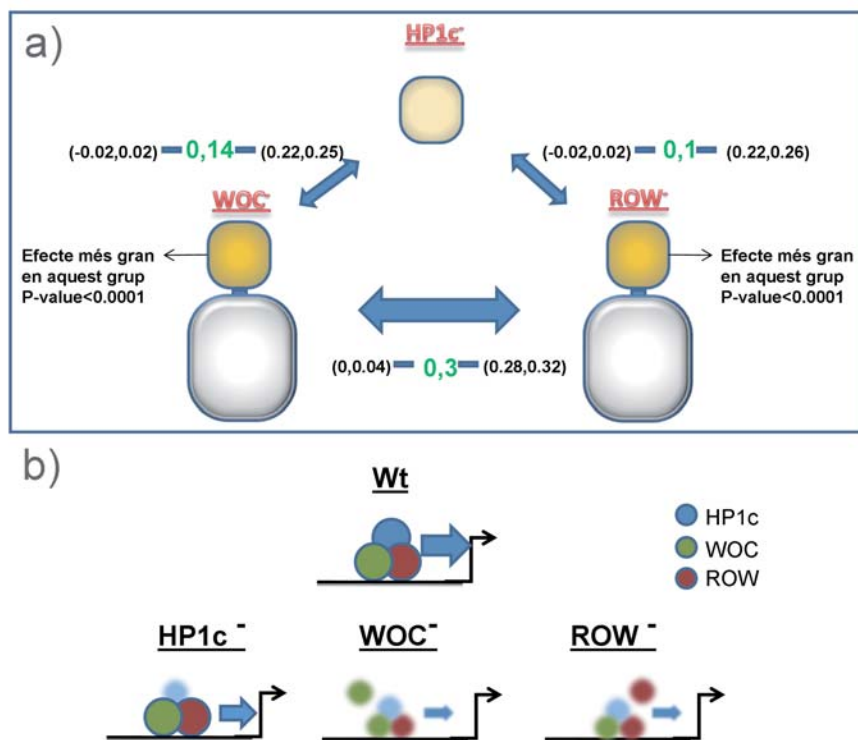
4.2.3. HP1c/WOC/ROW i l'expressió gènica

Un cop examinats el resultats que s'han discutit fins ara, la idea que emergeix és que aquest complex ha d'estar d'alguna manera implicat en el procés de la regulació gènica. Per aprofundir en aquesta línia es van utilitzar els mutants d'ARNi d'HP1c, WOC i ROW per tal d'analitzar amb *arrays* d'expressió quins canvis s'observen respecte de la situació normal. D'aquesta manera es podrà analitzar si realment l'expressió d'alguns gens es veu afectada, en quin sentit i si realment hi ha una cooperació funcional entre les tres proteïnes. El primer efecte que s'observa és que en les tres situacions mutants hi ha gens que canvien la seva expressió respecte als controls. Hi ha més gens que canvien en les condicions mutants per WOC i ROW que per HP1c (taula R1 i Fig.D4). Hom esperaria que els gens que canvien en les

tres condicions fossin molt semblants, és a dir, que hi hagués una forta correlació. Esperaríem doncs que el coeficient de correlació fos major que 0, però també esperaríem que fos menor que 1, ja que no esperem una correlació perfecta. El problema és que la variabilitat experimental que hi ha a l'assaig està rebaixant aquesta correlació perfecta teòrica d'1 fins a un valor que desconeixem. No podem doncs saber com de lluny de la correlació perfecta teòrica estan les correlacions positives observades a la taula R2 i figura D4. Per respondre a aquesta qüestió es va realitzar una simulació a partir de les dades experimentals per tal d'obtenir un interval dels marges de correlació esperats sota l'assumpció de que no hi ha cap correlació i també per l'assumpció d'una completa correlació (apartat4 mètodes estadístics suplementaris). Els resultats que es desprenen són que la correlació entre WOC i ROW cau dins de l'interval per la correlació total i que tant la correlació entre HP1c i WOC com entre HP1c i ROW és més baixa que l'interval de correlació total (taula R2 i Fig.D4). Aquests coeficients ens indiquen que hi ha un programa genètic corregulat entre WOC i ROW, però que només és en part compartit amb HP1c. Aquest espai incomplet de correlació entre WOC/ROW i HP1c podria ser degut a que HP1c regula un altre programa independent o bé que HP1c només està implicat en un subprograma del programa de WOC/ROW. Per afrontar aquesta qüestió es va utilitzar un mètode diferent d'anàlisi anomenada GAGA (apartat5 mètodes estadístics suplementaris). Aquest mètode ens proporciona el percentatge de gens que es distribueixen en patrons prèviament definits. Com es pot veure en la taula 3, la majoria dels gens (96,4%) segueix el patró de no estar diferencialment expressats en cap condició mutant, tal com s'hauria d'esperar. Per altra banda el 92,4% dels gens que estan diferencialment expressats cauen en només dues categories, la de WOC-ROW i la de WOC-ROW-HP1c, i la resta només és marginal en les categories que corresponen a cada situació mutant aïllada. Amb aquests percentatges podem inferir que el nombre de gens que estan diferencialment expressats només en la condició mutant per HP1c, és mínim. Per tant, és molt improbable que la falta de correlació entre HP1c i WOC/ROW es degui a que l'HP1c afecta a un grup de gens diferents. Una altra inferència que podem fer és sobre les mides dels grups de gens diferencialment expressats. Com hem vist, dels gens que estan diferencialment expressats el 92,4% són afectats per WOC-ROW, ara bé, d'aquests el 78,3% corresponen a WOC-ROW i només el 14,1% a WOC-ROW-HP1c. Veiem doncs que el programa compartit pels tres elements és molt petit en comparació amb el de WOC-ROW. Aquesta conclusió entra en conflicte amb les dades que s'han obtingut a cromosomes politènics, on es veu una colocalització pràcticament perfecta, ja que a partir d'aquestes hom esperaria una cooperació funcional completa també. Una explicació a aquesta discrepància, és que tal com hem vist, la natura de les condicions mutants WOC i ROW és diferent a la de l'HP1c. Mentre que en la condició mutant per HP1c, només

Discussió

aquesta és absent de la cromatina, en les condicions WOC o ROW les tres proteïnes són absents.



FiguraD4. Cooperació funcional entre HP1c-WOC i ROW.

a) Es resumeixen esquemàticament els resultats obtinguts de l'anàlisi d'expressió diferencial dels mutants d'HP1c, WOC i ROW. En les condicions mutants de WOC i ROW els gens diferencialment expressats són els mateixos, ja que la correlació experimental de 0,3 cau dins de l'interval esperat per màxima correlació teòrica (0,28-0,32). La majoria d'aquests gens són independents d'HP1c (cercle blanc). Hi ha un subgrup més petit que sí que és compartit amb HP1c (cercle groc). El fet que entre HP1c⁻ i WOC⁻ i ROW⁻, només es comparteixi el globus groc és la raó per la qual les correlacions observades 0,14 i 0,1 són més baixes que les esperades per màxima correlació teòrica. b) Les dades obtingudes en l'anàlisi anterior concorden perfectament amb les dades de la relació d'unió a la cromatina d'HP1c/WOC/ROW. Diagrames que mostren la situació d'un lloc d'unió al genoma pel complex (WT), comparat amb les situacions mutants per ARNi de cadascuna d'elles (HP1c⁻, WOC⁻ i ROW⁻). Aquestes situacions es veuen reflectides en les dades explicades en la part a). Veiem que les situacions WOC⁻ i ROW⁻, són idèntiques, mentre que la de l'HP1c és diferent. A més, comparant els diagrames HP1c⁻, WOC⁻ i ROW⁻, es pot deduir que en la situació HP1c⁻, els efectes sobre l'expressió gènica seran menors que no pas en les altres condicions. Aquest fenomen també s'observa en les dades de l'apartat a) en la intensitat del color groc, ja que s'ha observat que els gens compartits en les tres condicions, els efectes són més pronunciats en les de WOC⁻ i ROW⁻.

Aquest fet implica que si suposem que les tres proteïnes regulen exactament els mateixos gens, llavors en la condició mutant HP1c veurem efectes més lleugers que no pas en les

condicions WOC o ROW, on apart de contenir la pròpia condició també contenen la d'HP1c. Podem testar aquesta predicció en les dades obtingudes, doncs si agafem els gens que estan diferencialment expressats en les tres condicions (taula S3), veiem que els canvis observats, són majoritàriament més forts en les condicions mutants WOC-ROW. De fet dels 158 gens que canvien en les tres condicions en la mateixa direcció, 77 gens tenen efectes més acusats en les condicions WOC-ROW que en la d'HP1c. Aquests 77 gens queden lluny dels 52,6 que s'esperarien per atzar amb un valor P menor a 0,0001. Així, aquest fenomen pot explicar per què la correlació entre HP1c i WOC/ROW no correspon a l'esperada per a una completa corregulació, i per què el conjunt de gens afectats a la condició HP1c és molt més petit que el conjunt WOC-ROW (Fig.D4).

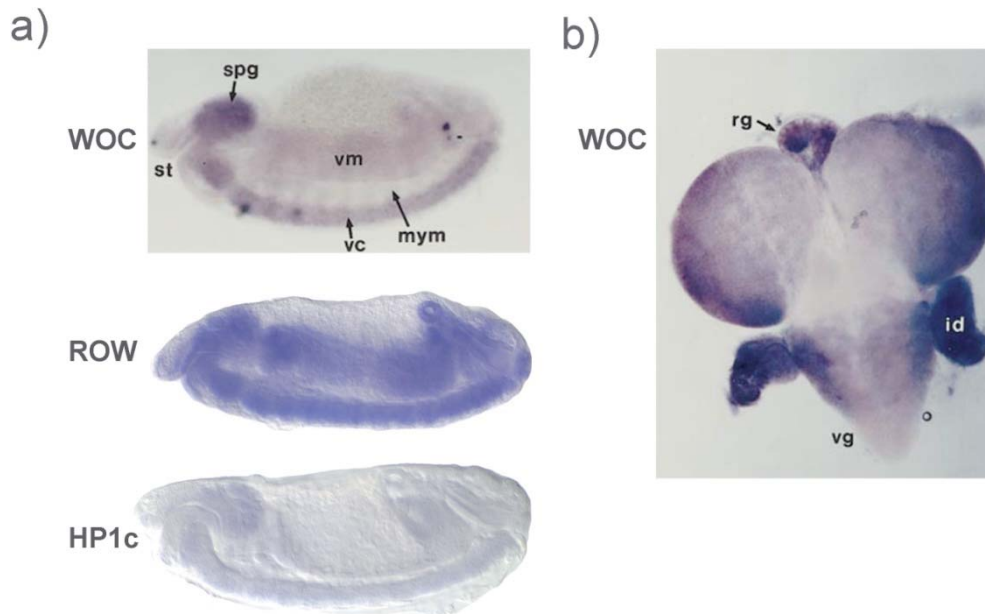
D'aquests resultats podem deduir que WOC/ROW/HP1c cooperen funcionalment per regular el mateix conjunt de gens i que ho fan en la mateixa direcció.

Per tal d'obtenir més informació funcional d'aquesta llista de 158 gens (taula S3), vam analitzar si hi havia alguna entrada de *Gene Ontology* (GO) que es trobés enriquida. El resultat d'aquest anàlisi és que no hi ha cap categoria de GO enriquida de forma estadísticament significativa, després de corregir per test múltiple els valors P. Aquesta falta d'enriquiment en entrades GO individuals podria ésser deguda a l'heterogeneïtat de les mostres d'ARN, ja que corresponen a larva d'estadi 3 sencera. Llavors els canvis d'expressió poden provenir de diferents teixits fent molt difícil trobar alguna GO específica. És per aquest motiu que vam decidir fer servir una altra aproximació, que consisteix en provar si els gens de la llista es poden agrupar entre ells segons el nombre d'entrades GO que comparteixen. És a dir, en el primer cas analitzàvem entrades GO individuals, per tal de veure si hi havia un enriquiment significatiu en la nostra llista, i en el segon cas, el que analitzem és si podem agrupar diferents gens segons les GO que comparteixen en grups funcionals. Fent aquest anàlisi, sorgeixen diferents agrupacions relacionades amb morfogènesis i desenvolupament del sistema nerviós (Fig.R11). Si es realitza una anotació funcional manual, s'observa que 35 d'aquests gens estan implicats en algun aspecte del desenvolupament o fisiologia del sistema nerviós, indicant que el programa genètic regulat per WOC/ROW/HP1c s'executa en part al sistema nerviós.

Hi ha diverses dades que recolzen aquest punt. Primer, les tres proteïnes presenten una expressió preferencial al sistema nerviós en embrions (Fig.D5a) (Kumar & Consortium, 2009; Wismar et al, 2000). En el cas de WOC també hi ha dades que mostren una expressió al sistema nerviós a larva 3 (Fig.D5b). A més, els cervells de les larves mutants per WOC presenten defectes de morfologia i de mida reduïda. A més a més, un dels homòlegs de WOC a

Discussió

humans, DXS6673E/ZNF261, està implicat en una forma de retard mental lligat al cromosoma X (van der Maarel et al, 1996).



FiguraD5. Expressió dHP1c, WOC i ROW al sistema nerviós.

a) Expressió *in situ* de WOC, ROW i HP1c en embrions d'estadi 12-14 de *Drosophila melanogaster*. La *in situ* de WOC està extreta de (Wismar et al, 2000). Spg, supraesophageal ganglion; vm, visceral mesoderm; vc, ventral cord; mym, myomeres. Les *in situ* de ROW i HP1c s'han extret de (Kumar & Consortium, 2009). Les tres *in situs* són molt semblants, i s'observa una clara tinció en la part ventral on hi ha el sistema nerviós (ventral cord). b) *In situ* de WOC a cervell de larva 3. Rg, ring gland; id, imaginal disc; vg, Brain ventral ganglion. S'observa tinció tant en el cervell com als discs imaginals i a la ring gland. Extret de (Wismar et al, 2000).

4.2.4. WOC/ROW/HP1c i la funció telomèrica.

S'ha descrit que mutacions en el gen WOC causen fusions telomèriques (Raffa et al, 2005). A més immunolocalitzacions a cromosomes politènics mostren que WOC és present als telòmers. Sembla ser que la manera en la qual WOC afecta a la funció telomèrica és diferent a la que s'ha observat per als altres factors descrits, ja que no hi ha interacció genètica amb HP1a ni amb HOAP per exemple, que són dos factors descrits implicats en evitar fusions telòmer-telòmer. En fons mutants per HP1a i HOAP la localització de WOC al telòmer en cromosomes politènics no es veu afectada. S'ha vist que les proteïnes ATM i RAD50, són necessàries per la localització als telòmers d'HP1a i de HOAP, en canvi no ho són per la

correcta localització de WOC. Per tant, sembla que WOC defineix una via nova de protecció dels telòmers totalment independent de la ja coneguda.

Havent vist doncs la relació física i funcional entre WOC i ROW/HP1c, la pregunta que emergeix és si aquests darrers podrien estar implicats en la protecció telomèrica. Un primer resultat indicador és la localització telomèrica d'HP1c i ROW, on colocalitzen perfectament amb WOC (Fig.S4).

L'anàlisi de la freqüència de fusions telomèriques es va realitzar amb els fons mutants de WOC^{ARNi}, ROW^{ARNi} i HP1c^{ARNi}. Com a control es va fer servir un ARNi contra la proteïna GFP. Cap de les condicions mutants presenta una freqüència més elevada de fusions telomèriques respecte al control. Això és sorprenent sobretot en el cas de WOC, ja que les mutacions nul·les presenten una freqüència molt alta de fusions. Això podria ser degut a que al utilitzar l'ARNi no aconseguim reduir suficientment els nivells de proteïna per tal de poder observar efectes. En el cas de ROW, s'ha pogut utilitzar un al·lel que consisteix en una inserció d'un transposó en el codó d'inici ATG i que s'anomena *row(2)SH2172*. S'han analitzat els nivells d'expressió de ROW en aquest al·lel i s'ha vist que són pràcticament inexistents comparats amb el control i comparats amb l'ARNi de ROW que correspon a un 40% dels nivells control. Es poden observar algunes fusions telomèriques en aquest al·lel *row(2)SH2172*, tot i que la freqüència és molt baixa, però més alta que en mosques salvatges (Fig.S5). Sense l'opció d'uns mutants completament nuls de ROW i HP1c serà difícil treure una conclusió final.

4.2.5. WOC i la via de Notch.

Quan s'usa un *driver* general com l'actina-Gal4 amb els ARNi de WOC/ROW/HP1c, només en el cas d'HP1c apareixen adults (amb una letalitat per als mascles d'un 50%), però sense cap fenotip morfològic clar. Aparentment doncs, l'absència d'aquests factors provoca només letalitat, suggerint que estarien implicats en un procés o diferents processos generals que afectarien la viabilitat del organisme. El fet que les tres proteïnes es trobin presents en tots els teixits analitzats (cèl·lules SL2, embrions, cervells, discs imaginals, glàndules salivals), reafirma la hipòtesi que aquests factors no sembla que estiguin regulant l'expressió de gens específics d'un procés morfològic determinat, sinó més aviat regulant gens involucrats en processos més generals o si més no, no morfològics. Ara bé, el fet que quan es realitza ARNi per WOC en llocs determinats de l'ala, s'hi observi fenotips morfològics semblants als fenotips associats a la via de Notch (Fig.R12, Fig.R16), qüestiona en certa manera la hipòtesi anterior, ja que semblaria

que WOC podria estar regulant específicament gens involucrats en la via de Notch. S'ha de fer esment, però, de l'absència dels mateixos fenotips de WOC per part de ROW/HP1c. Això es contradiu en certa manera amb les dades que s'han obtingut que relacionen completament a nivell funcional les tres proteïnes. Per tant, ens hauríem de decantar per pensar que o bé la condició ARNi per WOC és més efectiva a l'hora de disminuir la quantitat d'aquesta, o bé que hi ha una certa jerarquia a nivell funcional en la qual WOC esdevé més crític almenys en determinats contextos o gens. L'especificitat del fenotip s'ha confirmat utilitzant l'al·lel nul *wocB111*(Fig.R16). També s'ha pogut relacionar el fenotip observat amb la desregulació d'un gen diana de la via de Notch, el gen *cut*. Ara bé, la disminució de l'expressió de *cut* sembla ser un efecte cel·lular no autònom, és a dir, l'efecte es produeix també en una zona on WOC no es troba disminuït(Fig.R18). Això suggeriria que aquest efecte sobre *cut* no depèn directament de WOC sinó que es veu afectat indirectament. Podria ser que el fenotip primari fos la disminució de la proliferació i que aquest provoqués indirectament els altres fenotips morfològics. Caldria doncs fer un esforç per tal de clarificar quin és l'origen dels fenotips associats a WOC, per tal de determinar si WOC i per extensió ROW/HP1c estan regulant conjunts de gens específics d'un procés o bé gens associats amb processos més generals cel·lulars.

4.3. L'HP1b

L'HP1b presenta una localització que sembla una combinació de la localització heterocromàtica de l'HP1a i eucromàtica de l'HP1c. Potser doncs l'HP1b utilitza diferents mecanismes per unir-se a la cromatina depenent de si ho ha de fer en un lloc o en l'altre. Posats a especular potser a l'heterocromatina ho fa mitjançant la metilació de l'H3K9 i a l'eucromatina a través de WOC i ROW. Si analitzem l'alineament de la figura D1, tal com hem fet amb l'HP1c, veiem que si l'HP1c presentava només alguna petita variació respecte del cromodomini de l'HP1a, l'HP1b és pràcticament idèntic en els residus clau per al reconeixement de la metilació de l'H3K9. A més a més l'HP1b in vitro es comporta igual que les HP1a i c (Fig.R10), unint-se a la metilació d'H3K9 (Fig.A3). Per tant, sembla probable que la localització d'HP1b a l'heterocromatina depengui de la unió del seu cromodomini a la K9 metilada.

Una variació molt interessant en el cromodomini de l'HP1b és la que es produeix en el residu S5. S'ha publicat recentment que les proteïnes amb un cromodomini que presenta alta afinitat per l'H3K9 metilada tenen un glutàmic en aquesta regió que interacciona amb l'H3K4 per

atracció electrostàtica (Schalch et al, 2009). Podria ser doncs que l'HP1b regulés l'afinitat per la metilació de l'H3K9 per mitjà de la fosforilació de la Serina 5. Podríem especular que un cop fosforilada aquesta serina, la major càrrega negativa mimetitzaria el glutàmic dels casos descrits, proporcionant a l'HP1b més afinitat per l'H3K9 metilada i aquest fet permetria que hi hagués una població que romangués localitzada a l'heterocromatina.

La localització d'HP1c a l'eucromatina depèn de WOC i ROW, per tant podria ser que la localització eucromàtica de l'HP1b i de l'HP1a depengués de WOC i ROW també. En el cas de l'HP1a aquesta possible relació resulta bastant improbable, ja que la localització de WOC/ROW i l'HP1a és incompatible amb una interrelació estreta. Aquest apriorisme es veu confirmat en els resultats de la immunoprecipitació (Fig.R5c i Fig.A2) on quan s'utilitza l'anticòs de WOC per realitzar la immunoprecipitació, l'HP1c s'immunoprecipita però l'HP1a no. A més a més, la localització d'HP1a a cromosomes politènics no es veu afectada quan els nivells de les proteïnes WOC o ROW són rebaixats mitjançant ARNi (Fig.S3). Potser sembla que en alguna regió on hi ha colocalització amb l'HP1c, WOC i ROW com la banda 31C, la localització d'HP1a podria veure's afectada, però podria ser per efectes indirectes causats a la regió. Per tant podem descartar que l'HP1a interaccioni amb WOC/ROW a la manera com ho fa l'HP1c i a més que aquestes dues determinin d'alguna manera la seva localització cromosòmica.

Pel que fa a l'HP1b, l'anticòs de WOC immunoprecipita l'HP1b de forma molt similar a com ho fa amb l'HP1c (Fig.A2). Com que en la purificació del complex utilitzant l'HP1c no s'hi pot detectar de manera clara l'HP1b (Fig.R5a), i com que els nivells d'immunoprecipitació entre HP1b i HP1c són molt similars (Fig.A2), podem especular que l'HP1b i l'HP1c formen dos complexos independents bioquímicament amb WOC i ROW. A més a més, la localització d'HP1b als cromosomes politènics es veu afectada quan els nivells de proteïna de WOC o ROW es troben disminuïts per ARNi (Fig.S2). Aquesta afectació no és tan clara com la d'HP1c. Això podria ser degut a que l'HP1b no pateix una davallada en els seus nivells proteics com succeeix amb l'HP1c (Fig.R8). Si analitzem en detall si hi ha colocalització entre l'HP1b i WOC i ROW en cromosomes politènics control podem veure que la colocalització és igual de completa que en el cas d'HP1c (Fig.A1). Curiosament l'HP1b que es localitza a l'heterocromatina en condicions normals, en els cromosomes politènics amb un descens de WOC o ROW, roman inalterada (Fig.S2a i S2b). Això podria suggerir com s'ha esmentat abans que a *Drosophila melanogaster* existeixen dos mecanismes per la localització de les proteïnes HP1, un que seria mitjançant la metilació de l'H3K9 per tal de localitzar les HP1a i HP1b a l'heterocromatina i probablement l'HP1a en alguns llocs eucromàtics; i un segon que seria mitjançant les proteïnes WOC i ROW per tal de localitzar l'HP1b i l'HP1c a l'eucromatina. El cas complex és el de l'HP1b, ja que

sembla que utilitzi els dos mecanismes al mateix temps, i per tant fóra interessant determinar com es regula aquesta bilocalització.

A nivell funcional, en els mateixos experiments utilitzant el sistema del LACI, a l'expressar la fusió HP1b-LacI en la línia s9.2, es comporta com l'HP1a induint silenciament. Inesperadament, l'HP1b en la línia 157.1 es comporta com l'HP1c, incrementant els nivells d'expressió del gen reporter (Fig.A4). Així en l'aspecte funcional, també presenta l'ambivalència que s'observa a nivell de la seva localització. Cal destacar que els efectes que produeix tant en una línia com en l'altra són menors que els observats per l'HP1a i l'HP1c. Aquest resultat podria indicar que l'HP1b té funcions redundants respecte l'HP1a a l'heterocromatina i respecte a l'HP1c a l'eucromatina. Caldrà profunditzar en els aspectes funcionals de l'HP1b respecte l'HP1a i l'HP1c per tal de determinar si el seu rol és estrictament redundant respecte a aquestes o bé està implicada en els mateixos processos que l'HP1a i l'HP1c, però realitzant una tasca diferent.

4.4. Reptes que emergeixen

Arribats en aquest punt de la discussió, analitzarem les preguntes que emergeixen de les dades experimentals obtingudes i de possibles experiments per intentar respondre-les.

- 1- El primer aspecte a tractar és com el complex HP1c/WOC/ROW s'uneix a la cromatina. Sabem que HP1c necessita de WOC i ROW per unir-s'hi, però no sabem com WOC i ROW ho fan. Per tant, serà necessari resoldre si aquestes proteïnes s'uneixen a l'ADN o bé s'uneixen a la cromatina interaccionant amb les histones directament o amb altres proteïnes intermediàries.
- 2- Havent vist que el cromodomini de l'HP1c i l'HP1b són funcionals, s'hauria d'aprofundir en si realment aquests dominis estan interaccionant amb l'H3K9 metilada o bé estan unint un altre substrat. Es poden visualitzar com a mínim tres possibilitats, una és que realment a l'eucromatina hi hagi metilació d'H3K9, però que sigui bastant inestable i per tant difícil de detectar; dos, que no hi hagi metilació de l'H3K9 als llocs d'HP1c/HP1b, però que alguna de les proteïnes amb les quals interaccionen per exemple WOC o ROW o altres no conegudes encara, continguin una lisina amb un entorn similar a la de l'H3K9 que es pugui metilar convertint-se en substrat perquè l'HP1b/HP1c s'hi uneixin; tres, que els cromodominis de les HP1b i c a l'eucromatina

no uneixin cap metilació sinó que realitzin una interacció proteïna-proteïna estàndard, emmascarant la unió a la metilació de l'H3K9.

- 3- Un altre punt clau és quina és la funció d'HP1c i, per extensió, del complex HP1c/WOC/ROW. Les dades obtingudes suggereixen que el complex actua en la regulació transcripcional d'un grup de gens, però no sabem de quina manera. No sabem si actua a nivell del promotor, a nivell de l'inici de la transcripció, en l'elongació etc... Tampoc sabem com aquest complex influencia la transcripció, ja que cap de les tres proteïnes dóna cap pista mecànica. També fóra interessant confirmar el grup de gens regulats per tal de determinar en quins processos biològics està implicat i a la vegada aprofundir en els mecanismes pels quals WOC produeix els fenotips a l'ala i utilitzant mutants nous de ROW/HP1c comprovar si també produeixen els mateixos fenotips. Pel que fa a la funció telomèrica, serà complicat escatir si el complex hi està realment implicat. Els resultats obtinguts per WOC indiquen que la manera com afecta als telòmers és independent de les vies que es coneixen, dificultant una via clara per aprofundir en aquest aspecte (Raffa et al, 2005).
- 4- Determinar el grau de redundància funcional de l'HP1b respecte l'HP1c serà un altra qüestió important a determinar. Si realment hi ha una gran redundància s'hauran de generar eines noves per tal de determinar les implicacions funcionals d'aquesta redundància.

Ara comentarem els experiments que poden ajudar a començar a respondre aquestes preguntes:

- 1- **ChIP-seq.** Realitzar ChIP-seq d'HP1c /HP1b/WOC/ROW, per veure exactament on es localitzen i així poder acotar la zona d'acció dels complexos. Aquestes dades ens ajudarien en pràcticament totes les preguntes de l'apartat anterior. Respecte al repte 1, al tenir tots els llocs d'unió de WOC i ROW podrem realitzar una recerca informàtica per tal de determinar si existeix un consens entre totes aquestes seqüències. Si es trobessin alguns consens clars seria una indicació molt bona que el reclutament dels complexos es produeix per unió a l'ADN. Combinar aquestes dades amb unes de la metilació de l'H3K9, també ens ajudaria a descartar opcions del repte 2. Al voltant de les qüestions funcionals dels reptes 3 i 4 aquestes dades també poden obrir molts camins. Saber on es troben els complexos, serà de molta ajuda per tal de dissenyar

posteriors experiments per determinar el *modus operandi*. Així, si per exemple es localitzen als promotors, es poden fer hipòtesis a provar, com per exemple, que actuen a nivell de la maquinària basal, o bé que interaccionen amb corepressors etc... Aquestes dades també ens acotaran els gens diana d'aquests complexos podent donar resposta a quin procés biològic es regula per mitjà d'aquests factors. També es podran creuar les dades del ChIP-seq amb les dades obtingudes de l'anàlisi d'expressió diferencial per obtenir l'efecte produït en els fons mutants en els gens diana, i a la vegada analitzar gens coneguts de la via de Notch, per si algun és positiu per ChIP aclarint part del repte 3. Aquest raonament serà important per resoldre el repte 4, ja que es podran comparar els efectes produïts sobre un gen diana en les condicions mutants d'HP1b i HP1c i en un doble mutant. Les dades de l'HP1b ens serviran també per precisar si els complexos HP1c i HP1b treballen en el mateix lloc o bé ho fan en zones diferents de la unitat transcripcional. Pel que fa a la funció telomèrica, també podrem saber si realment aquests complexos estan físicament als telòmers i també en quina regió d'aquests es localitzen.

- 2- **Purificació de complexos de WOC i ROW.** Els possibles factors identificats ens podrien donar moltes pistes sobre l'apartat 1 i també sobre la mecànica de la funcionalitat. També ens podria obrir algun camí en la funció telomèrica. Un camí paral·lel podria ser utilitzar els resultats obtinguts a humans amb els homòlegs de WOC (ZNF198 i ZNF261), com a candidats a *Drosophila*. S'ha vist que ZNF198 i ZNF261 purifiquen amb el complex de la desmetilasa LSD1 i la desacetilasa HDAC1 (Hakimi et al, 2003; Lee et al, 2005; Shi et al, 2005). Es podrien realitzar immunoprecipitacions amb anticossos d'aquestes proteïnes a *Drosophila* per tal de comprovar si aquestes interaccions estan conservades. Si així fos, això ens suggeriria fortament que el complex HP1c/WOC/ROW està reprimint la transcripció als promotors d'un grup de gens, desmetilant l'H3K4 i desacetilant les histones.
- 3- **Expressió de mutants al cromodomini.** Per tal de desentrellar el repte 2, es podrien expressar HP1c i HP1b en els seus fons mutants respectius amb una mutació al cromodomini que les inhabilités per unir-se a una lisina metilada (Fig.i21). D'aquesta manera es podria concretar si realment les HP1b i c necessiten un cromodomini funcional per la unió a lisina metilada per tal d'unir-se a l'eucromatina. En el cas que no s'observés cap problema de localització caldria analitzar si aquesta incapacitat implica algun efecte funcional. Seria interessant també aprofundir en com interaccionen HP1c-b/WOC/ROW, ja que també podria aportar dades interessants al

voltant de quin paper poden estar jugant els cromodominis i els *Zn-fingers* en aquest context.

5. CONCLUSIONS

Dades:

- 1- L'HP1c s'uneix específicament *in vitro* a l'H3K9 tri-metilada mitjançant el seu cromodomini.
- 2- L'HP1c forma un complex estable amb les proteïnes WOC i ROW.
- 3- *In vivo*, la unió d'HP1c a la cromatina depèn de WOC i de ROW.
- 4- *In vivo*, la unió de WOC i ROW a la cromatina és interdependent i independent d'HP1c.
- 5- La sobreexpressió d'HP1c, localitza aquesta als llocs eucromàtics endògens i també a l'heterocromatina
- 6- L'HP1c és capaç de localitzar ectòpicament WOC i ROW.
- 7- En absència de WOC o ROW, l'HP1c es desestabilitza.

Conclusions:

- 1- Tot i que l'HP1c posseeix la capacitat d'unir-se a la metilació de l'H3K9, no sembla que aquesta interacció jugui un paper determinant en la unió d'HP1c a la cromatina. Els factors WOC i ROW sí que són determinants necessaris per a l'associació d'HP1c a la cromatina.
- 2- WOC-ROW-HP1c formen un complex que s'uneix a la cromatina. WOC i ROW s'uneixen com a dímer a la cromatina ja que són mútuament necessàries per unir-s'hi. A més, no necessiten d'HP1c per fer-ho. Això implica que WOC-ROW són els elements necessaris de la unió del complex a la cromatina i no HP1c. El fet que l'HP1c sigui capaç de deslocalitzar WOC i ROW a l'heterocromatina implica que el complex es pot trobar preformat de forma soluble i no únicament unit a la cromatina i que ha d'existir un mecanisme per prevenir la deslocalització d'HP1c a l'heterocromatina.

Conclusions

Dades:

- 1- En experiments de localització ectòpica amb un *reporter*, l'HP1c indueix l'expressió d'aquest, comportant-se de forma inversa a com ho fa l'HP1a en les mateixes condicions.
- 2- L'HP1c colocalitza a cromosomes politènics amb la tri-metilació de l'H3K4 i amb la forma pausada de la RNA polimerasa. L'HP1c no colocalitza amb la tri-metilació de l'H3K36 ni amb la forma elongant de la RNA polimerasa.
- 3- Larves a en què els nivells de WOC, ROW o HP1c han estat disminuïts, presenten canvis d'expressió gènica molt similars. El grup de gens que canvia en les tres condicions sembla compartir característiques funcionals associades al desenvolupament i funcionament del sistema nerviós. L'expressió de WOC-ROW-HP1c és més abundant en el sistema nerviós.
- 4- L'absència de WOC provoca fusions telomèriques a neuroblasts del cervell en l'estadi de larva 3. Els ARNi de les tres proteïnes no provoquen aquestes fusions. La mutació per ROW, *rowl(2)SH2172*, presenta fusions telomèriques, però amb una freqüència lluny de la que presenta la mutació de WOC.
- 5- L'absència de WOC provoca tres fenotips a l'ala: disminució de la proliferació, malformació de venes i malformació del marge de l'ala. L'absència de WOC també provoca una disminució de l'expressió del gen *cut* a l'ala de forma no autònoma cel·lular.

Conclusions:

- 1- L'HP1c-WOC-ROW estan associats a zones transcripcionalment actives regulant la transcripció, i ho fan de manera conjunta. No podem treure cap conclusió clara sobre la funció concreta ni el mecanisme d'acció.
- 2- L'HP1c presenta unes característiques funcionals totalment diferents a les funcions generals descrites d'HP1a.

- 3- L'absència de WOC provoca uns fenotips a l'ala semblants als provocats per la falta d'activitat de la via de Notch. No podem concloure si aquests fenotips són directament associats a una desregulació de la via de Notch, o bé són provocats indirectament per la falta de proliferació.

Dades:

- 1- L'HP1b també interacciona *in vitro* amb l'H3K9 metilada.
- 2- L'HP1b també interacciona amb WOC. La seva localització eucromàtica també depèn de WOC i ROW, però la localització a l'heterocromatina no.
- 3- En la purificació del complex d'HP1c no s'hi detecta l'HP1b.
- 4- En els mateixos experiments de localització ectòpica amb un *reporter*, l'HP1b té un comportament funcional diferent segons la línia que s'usa, en una és similar al de l'HP1c, i en l'altra molt similar a l'HP1a.
- 5- L'HP1b colocalitza perfectament amb WOC i ROW.

Conclusions:

- 1- L'HP1b presenta una ambivalència en la localització eucromatina-heterocromatina. La localització eucromàtica depèn de WOC i ROW.
- 2- L'HP1b també presenta una ambivalència a nivell funcional. Podem assumir que recapitula les característiques de l'HP1a a l'heterocromatina i les de l'HP1c a l'eucromatina, aportant certa redundància funcional.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aggaard L, Schmid M, Warburton P, Jenuwein T (2000) Mitotic phosphorylation of SUV39H1, a novel component of active centromeres, coincides with transient accumulation at mammalian centromeres. *J Cell Sci* **113** (Pt 5): 817-829
- Abbott DW, Chadwick BP, Thambirajah AA, Ausio J (2005) Beyond the Xi: macroH2A chromatin distribution and post-translational modification in an avian system. *J Biol Chem* **280**(16): 16437-16445
- Agger K, Cloos PA, Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J, Issaeva I, Canaani E, Salcini AE, Helin K (2007) UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* **449**(7163): 731-734
- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D (2007) Epigenetics.
- Allison LA, Moyle M, Shales M, Ingles CJ (1985) Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell* **42**(2): 599-610
- Andres ME, Burger C, Peral-Rubio MJ, Battaglioli E, Anderson ME, Grimes J, Dallman J, Ballas N, Mandel G (1999) CoREST: a functional corepressor required for regulation of neural-specific gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17): 9873-9878
- Andrulis ED, Guzman E, Doring P, Werner J, Lis JT (2000) High-resolution localization of *Drosophila* Spt5 and Spt6 at heat shock genes in vivo: roles in promoter proximal pausing and transcription elongation. *Genes Dev* **14**(20): 2635-2649
- Angelov D, Verdel A, An W, Bondarenko V, Hans F, Doyen CM, Studitsky VM, Hamiche A, Roeder RG, Bouvet P, Dimitrov S (2004) SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *EMBO J* **23**(19): 3815-3824
- Aravind L, Landsman D (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **26**(19): 4413-4421
- Armstrong JA, Papoulas O, Daubresse G, Sperling AS, Lis JT, Scott MP, Tamkun JW (2002) The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *EMBO J* **21**(19): 5245-5254
- Ausio J, Abbott DW, Wang X, Moore SC (2001) Histone variants and histone modifications: a structural perspective. *Biochem Cell Biol* **79**(6): 693-708
- Ayoub N, Jeyasekharan AD, Bernal JA, Venkitaraman AR (2008) HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* **453**(7195): 682-686
- Badugu R, Yoo Y, Singh PB, Kellum R (2005) Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma* **113**(7): 370-384
- Ball LJ, Murzina NV, Broadhurst RW, Raine AR, Archer SJ, Stott FJ, Murzin AG, Singh PB, Domaille PJ, Laue ED (1997) Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *EMBO J* **16**(9): 2473-2481

Bibliografia

- Ballas N, Battaglioli E, Atouf F, Andres ME, Chenoweth J, Anderson ME, Burger C, Moniwa M, Davie JR, Bowers WJ, Federoff HJ, Rose DW, Rosenfeld MG, Brehm P, Mandel G (2001) Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. *Neuron* **31**(3): 353-365
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**(6824): 120-124
- Bao Y, Konesky K, Park YJ, Rosu S, Dyer PN, Rangasamy D, Tremethick DJ, Laybourn PJ, Luger K (2004) Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *EMBO J* **23**(16): 3314-3324
- Barber CM, Turner FB, Wang Y, Hagstrom K, Taverna SD, Mollah S, Ueberheide B, Meyer BJ, Hunt DF, Cheung P, Allis CD (2004) The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved. *Chromosoma* **112**(7): 360-371
- Barrero MJ, Malik S (2006) Two functional modes of a nuclear receptor-recruited arginine methyltransferase in transcriptional activation. *Mol Cell* **24**(2): 233-243
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**(4): 823-837
- Bauer UM, Daujat S, Nielsen SJ, Nightingale K, Kouzarides T (2002) Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep* **3**(1): 39-44
- Becker PB, Horz W (2002) ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* **71**: 247-273
- Bednar J, Horowitz RA, Grigoryev SA, Carruthers LM, Hansen JC, Koster AJ, Woodcock CL (1998) Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(24): 14173-14178
- Bernard P, Maure JF, Partridge JF, Genier S, Javerzat JP, Allshire RC (2001) Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* **294**(5551): 2539-2542
- Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, McMahon S, Karlsson EK, Kulbokas EJ, 3rd, Gingeras TR, Schreiber SL, Lander ES (2005) Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**(2): 169-181
- Brasher SV, Smith BO, Fogh RH, Nietlispach D, Thiru A, Nielsen PR, Broadhurst RW, Ball LJ, Murzina NV, Laue ED (2000) The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *EMBO J* **19**(7): 1587-1597
- Brayer KJ, Segal DJ (2008) Keep your fingers off my DNA: protein-protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains. *Cell Biochem Biophys* **50**(3): 111-131
- Buratowski S (2003) The CTD code. *Nat Struct Biol* **10**(9): 679-680
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**(45): 42462-42467

- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**(5595): 1039-1043
- Carrozza MJ, Li B, Florens L, Suganuma T, Swanson SK, Lee KK, Shia WJ, Anderson S, Yates J, Washburn MP, Workman JL (2005) Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* **123**(4): 581-592
- Clarkson MJ, Wells JR, Gibson F, Saint R, Tremethick DJ (1999) Regions of variant histone His2AvD required for *Drosophila* development. *Nature* **399**(6737): 694-697
- Clegg NJ, Honda BM, Whitehead IP, Grigliatti TA, Wakimoto B, Brock HW, Lloyd VK, Sinclair DA (1998) Suppressors of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* affect expression of the heterochromatic gene light in the absence of a chromosome rearrangement. *Genome* **41**(4): 495-503
- Cloos PA, Christensen J, Agger K, Maiolica A, Rappsilber J, Antal T, Hansen KH, Helin K (2006) The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature* **442**(7100): 307-311
- Conaway RC, Brower CS, Conaway JW (2002) Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation. *Science* **296**(5571): 1254-1258
- Corden JL (1990) Tails of RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **15**(10): 383-387
- Costanzi C, Pehrson JR (1998) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**(6685): 599-601
- Cowell IG, Aucott R, Mahadevaiah SK, Burgoyne PS, Huskisson N, Bongiorno S, Prantera G, Fanti L, Pimpinelli S, Wu R, Gilbert DM, Shi W, Fundele R, Morrison H, Jeppesen P, Singh PB (2002) Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma* **111**(1): 22-36
- Cowieson NP, Partridge JF, Allshire RC, McLaughlin PJ (2000) Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr Biol* **10**(9): 517-525
- Crozatier M, Glise B, Vincent A (2004) Patterns in evolution: veins of the *Drosophila* wing. *Trends Genet* **20**(10): 498-505
- Cryderman DE, Grade SK, Li Y, Fanti L, Pimpinelli S, Wallrath LL (2005) Role of *Drosophila* HP1 in euchromatic gene expression. *Dev Dyn* **232**(3): 767-774
- Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**(5): 545-553
- Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V (2002) *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexos have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* **111**(2): 185-196

Bibliografia

- Chadwick BP, Willard HF (2001) A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol* **152**(2): 375-384
- Chan HM, La Thangue NB (2001) p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* **114**(Pt 13): 2363-2373
- Chen HT, Bhandoola A, Difilippantonio MJ, Zhu J, Brown MJ, Tai X, Rogakou EP, Brotz TM, Bonner WM, Ried T, Nussenzweig A (2000) Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science* **290**(5498): 1962-1965
- Cheng X, Collins RE, Zhang X (2005) Structural and sequence motifs of protein (histone) methylation enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**: 267-294
- Cheutin T, Gorski SA, May KM, Singh PB, Misteli T (2004) In vivo dynamics of Swi6 in yeast: evidence for a stochastic model of heterochromatin. *Mol Cell Biol* **24**(8): 3157-3167
- Cheutin T, McNairn AJ, Jenuwein T, Gilbert DM, Singh PB, Misteli T (2003) Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* **299**(5607): 721-725
- Choi JK, Howe LJ (2009) Histone acetylation: truth of consequences? *Biochem Cell Biol* **87**(1): 139-150
- Daniel JA, Torok MS, Sun ZW, Schieltz D, Allis CD, Yates JR, 3rd, Grant PA (2004) Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. *J Biol Chem* **279**(3): 1867-1871
- Danzer JR, Wallrath LL (2004) Mechanisms of HP1-mediated gene silencing in *Drosophila*. *Development* **131**(15): 3571-3580
- Daujat S, Zeissler U, Waldmann T, Happel N, Schneider R (2005) HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding. *J Biol Chem* **280**(45): 38090-38095
- de Celis JF, Garcia-Bellido A (1994) Roles of the Notch gene in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mech Dev* **46**(2): 109-122
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**(6735): 491-496
- Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X (2005) The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* **6**(8): 227
- Dougherty MK, Morrison DK (2004) Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci* **117**(Pt 10): 1875-1884
- Dryhurst D, Thambirajah AA, Ausio J (2004) New twists on H2A.Z: a histone variant with a controversial structural and functional past. *Biochem Cell Biol* **82**(4): 490-497
- Du LL, Nakamura TM, Russell P (2006) Histone modification-dependent and -independent pathways for recruitment of checkpoint protein Crb2 to double-strand breaks. *Genes Dev* **20**(12): 1583-1596

- Ebert A, Lein S, Schotta G, Reuter G (2006) Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Res* **14**(4): 377-392
- Ebert A, Schotta G, Lein S, Kubicek S, Krauss V, Jenuwein T, Reuter G (2004) Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev* **18**(23): 2973-2983
- Egloff S, Murphy S (2008) Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet* **24**(6): 280-288
- Eissenberg JC, Ge YW, Hartnett T (1994) Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*, is correlated with heterochromatin assembly. *J Biol Chem* **269**(33): 21315-21321
- Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V, Elgin SC (1990) Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(24): 9923-9927
- Emre NC, Ingvarsdottir K, Wyce A, Wood A, Krogan NJ, Henry KW, Li K, Marmorstein R, Greenblatt JF, Shilatifard A, Berger SL (2005) Maintenance of low histone ubiquitylation by Ubp10 correlates with telomere-proximal Sir2 association and gene silencing. *Mol Cell* **17**(4): 585-594
- Falnes PO, Johansen RF, Seeberg E (2002) AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* **419**(6903): 178-182
- Fanti L, Berloco M, Piacentini L, Pimpinelli S (2003) Chromosomal distribution of heterochromatin protein 1 (HP1) in *Drosophila*: a cytological map of euchromatic HP1 binding sites. *Genetica* **117**(2-3): 135-147
- Fanti L, Giovinazzo G, Berloco M, Pimpinelli S (1998) The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol Cell* **2**(5): 527-538
- Fanti L, Pimpinelli S (2008) HP1: a functionally multifaceted protein. *Curr Opin Genet Dev* **18**(2): 169-174
- Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, Zhang Y (2002) Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol* **12**(12): 1052-1058
- Festenstein R, Pagakis SN, Hiragami K, Lyon D, Verreault A, Sekkali B, Kioussis D (2003) Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells. *Science* **299**(5607): 719-721
- Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H, Allis CD (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**(7071): 1116-1122
- Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S (2003) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* **17**(15): 1870-1881

Bibliografia

Flanagan JF, Mi LZ, Chruszcz M, Cymborowski M, Clines KL, Kim Y, Minor W, Rastinejad F, Khorasanizadeh S (2005) Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* **438**(7071): 1181-1185

Fodor BD, Kubicek S, Yonezawa M, O'Sullivan RJ, Sengupta R, Perez-Burgos L, Opravil S, Mechtler K, Schotta G, Jenuwein T (2006) Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev* **20**(12): 1557-1562

Galasinski SC, Louie DF, Gloor KK, Resing KA, Ahn NG (2002) Global regulation of post-translational modifications on core histones. *J Biol Chem* **277**(4): 2579-2588

Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M, Mackay JP (2007) Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem Sci* **32**(2): 63-70

Gangaraju VK, Bartholomew B (2007) Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling. *Mutat Res* **618**(1-2): 3-17

Garcia-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T, Blasco MA (2004) Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet* **36**(1): 94-99

Gardner RG, Nelson ZW, Gottschling DE (2005) Ubp10/Dot4p regulates the persistence of ubiquitinated histone H2B: distinct roles in telomeric silencing and general chromatin. *Mol Cell Biol* **25**(14): 6123-6139

Gautier T, Abbott DW, Molla A, Verdel A, Ausio J, Dimitrov S (2004) Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep* **5**(7): 715-720

Giet R, Glover DM (2001) *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol* **152**(4): 669-682

Gilmour DS, Lis JT (1986) RNA polymerase II interacts with the promoter region of the noninduced hsp70 gene in *Drosophila melanogaster* cells. *Mol Cell Biol* **6**(11): 3984-3989

Giraldez AJ, Cohen SM (2003) Wingless and Notch signaling provide cell survival cues and control cell proliferation during wing development. *Development* **130**(26): 6533-6543

Gocke CB, Yu H (2008) ZNF198 stabilizes the LSD1-CoREST-HDAC1 complex on chromatin through its MYM-type zinc fingers. *PLoS ONE* **3**(9): e3255

Golic KG, Lindquist S (1989) The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**(3): 499-509

Goto H, Tomono Y, Ajiro K, Kosako H, Fujita M, Sakurai M, Okawa K, Iwamatsu A, Okigaki T, Takahashi T, Inagaki M (1999) Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem* **274**(36): 25543-25549

Greil F, van der Kraan I, Delrow J, Smothers JF, de Wit E, Bussemaker HJ, van Driel R, Henikoff S, van Steensel B (2003) Distinct HP1 and Su(var)3-9 complexos bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location. *Genes Dev* **17**(22): 2825-2838

- Grove GW, Zweidler A (1984) Regulation of nucleosomal core histone variant levels in differentiating murine erythroleukemia cells. *Biochemistry* **23**(19): 4436-4443
- Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**(6649): 349-352
- Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA (2007) A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* **130**(1): 77-88
- Gurley LR, D'Anna JA, Barham SS, Deaven LL, Tobey RA (1978) Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem* **84**(1): 1-15
- Hakimi MA, Dong Y, Lane WS, Speicher DW, Shiekhattar R (2003) A candidate X-linked mental retardation gene is a component of a new family of histone deacetylase-containing complexes. *J Biol Chem* **278**(9): 7234-7239
- Hearn MG, Hedrick A, Grigliatti TA, Wakimoto BT (1991) The effect of modifiers of position-effect variegation on the variegation of heterochromatic genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **128**(4): 785-797
- Hediger F, Gasser SM (2006) Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover! *Curr Opin Genet Dev* **16**(2): 143-150
- Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* **39**(3): 311-318
- Henikoff S, Furuyama T, Ahmad K (2004) Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet* **20**(7): 320-326
- Henry KW, Wyce A, Lo WS, Duggan LJ, Emre NC, Kao CF, Pillus L, Shilatifard A, Osley MA, Berger SL (2003) Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* **17**(21): 2648-2663
- Herranz H, Perez L, Martin FA, Milan M (2008) A Wingless and Notch double-repression mechanism regulates G1-S transition in the *Drosophila* wing. *EMBO J* **27**(11): 1633-1645
- Hiragami K, Festenstein R (2005) Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence. *Cell Mol Life Sci* **62**(23): 2711-2726
- Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM (2005) Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* **438**(7071): 1176-1180
- Huang DW, Fanti L, Pak DT, Botchan MR, Pimpinelli S, Kellum R (1998) Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of *Drosophila* heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins. *J Cell Biol* **142**(2): 307-318
- Huang Y, Fang J, Bedford MT, Zhang Y, Xu RM (2006) Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science* **312**(5774): 748-751

Bibliografia

- Hughes RM, Wiggins KR, Khorasanizadeh S, Waters ML (2007) Recognition of trimethyllysine by a chromodomain is not driven by the hydrophobic effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(27): 11184-11188
- Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA, Jr., Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD (2004) Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* **432**(7015): 406-411
- Irvine KD, Vogt TF (1997) Dorsal-ventral signaling in limb development. *Curr Opin Cell Biol* **9**(6): 867-876
- Jacobs SA, Khorasanizadeh S (2002) Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* **295**(5562): 2080-2083
- Jacobson RH, Ladurner AG, King DS, Tjian R (2000) Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* **288**(5470): 1422-1425
- James TC, Elgin SC (1986) Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol* **6**(11): 3862-3872
- Janknecht R (2002) The versatile functions of the transcriptional coactivators p300 and CBP and their roles in disease. *Histol Histopathol* **17**(2): 657-668
- Jones DO, Mattei MG, Horsley D, Cowell IG, Singh PB (2001) The gene and pseudogenes of Cbx3/mHP1 gamma. *DNA Seq* **12**(3): 147-160
- Jones RS, Gelbart WM (1993) The *Drosophila* Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol Cell Biol* **13**(10): 6357-6366
- Ju BG, Jeong S, Bae E, Hyun S, Carroll SB, Yim J, Kim J (2000) Fringe forms a complex with Notch. *Nature* **405**(6783): 191-195
- Kadrmas JL, Beckerle MC (2004) The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(11): 920-931
- Kalkhoven E (2004) CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* **68**(6): 1145-1155
- Kao CF, Hillyer C, Tsukuda T, Henry K, Berger S, Osley MA (2004) Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B. *Genes Dev* **18**(2): 184-195
- Kaplan CD, Morris JR, Wu C, Winston F (2000) Spt5 and spt6 are associated with active transcription and have characteristics of general elongation factors in *D. melanogaster*. *Genes Dev* **14**(20): 2623-2634
- Kellum R, Alberts BM (1995) Heterochromatin protein 1 is required for correct chromosome segregation in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* **108** (Pt 4): 1419-1431
- Kim S, Benoiton L, Paik WK (1964) Epsilon-Alkyllysine. Purification and Properties of the Enzyme. *J Biol Chem* **239**: 3790-3796

- Kim TH, Barrera LO, Zheng M, Qu C, Singer MA, Richmond TA, Wu Y, Green RD, Ren B (2005) A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* **436**(7052): 876-880
- Klose RJ, Yamane K, Bae Y, Zhang D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y (2006) The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature* **442**(7100): 312-316
- Klose RJ, Yan Q, Tothova Z, Yamane K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Gilliland DG, Zhang Y, Kaelin WG, Jr. (2007) The retinoblastoma binding protein RBP2 is an H3K4 demethylase. *Cell* **128**(5): 889-900
- Klose RJ, Zhang Y (2007) Regulation of histone methylation by demethylation and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(4): 307-318
- Koering CE, Pollice A, Zibella MP, Bauwens S, Puisieux A, Brunori M, Brun C, Martins L, Sabatier L, Pulitzer JF, Gilson E (2002) Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. *EMBO Rep* **3**(11): 1055-1061
- Koike N, Maita H, Taira T, Ariga H, Iguchi-Ariga SM (2000) Identification of heterochromatin protein 1 (HP1) as a phosphorylation target by Pim-1 kinase and the effect of phosphorylation on the transcriptional repression function of HP1(1). *FEBS Lett* **467**(1): 17-21
- Kooh PJ, Fehon RG, Muskavitch MA (1993) Implications of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development. *Development* **117**(2): 493-507
- Kumar S, Consortium F. (2009) A Knowledge-base of Spatiotemporal Expression Patterns at a Genomic-scale in the Fruit-fly Embryogenesis
- Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, Reinberg D (2004) Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell* **14**(2): 183-193
- Kwon SH, Workman JL (2008) The heterochromatin protein 1 (HP1) family: put away a bias toward HP1. *Mol Cells* **26**(3): 217-227
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**(6824): 116-120
- Lai EC (2004) Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**(5): 965-973
- Lan F, Bayliss PE, Rinn JL, Whetstone JR, Wang JK, Chen S, Iwase S, Alpatov R, Issaeva I, Canaani E, Roberts TM, Chang HY, Shi Y (2007) A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature* **449**(7163): 689-694
- Langst G, Becker PB (2004) Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim Biophys Acta* **1677**(1-3): 58-63
- Lecourtois M, Schweisguth F (1997) Role of suppressor of hairless in the delta-activated Notch signaling pathway. *Perspect Dev Neurobiol* **4**(4): 305-311

Bibliografia

- Lechner MS, Schultz DC, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ, 3rd (2005) The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochem Biophys Res Commun* **331**(4): 929-937
- Lee JS, Shukla A, Schneider J, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, Bhaumik SR, Shilatifard A (2007a) Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell* **131**(6): 1084-1096
- Lee MG, Villa R, Trojer P, Norman J, Yan KP, Reinberg D, Di Croce L, Shiekhhattar R (2007b) Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science* **318**(5849): 447-450
- Lee MG, Wynder C, Bochar DA, Hakimi MA, Cooch N, Shiekhhattar R (2006) Functional interplay between histone demethylase and deacetylase enzymes. *Mol Cell Biol* **26**(17): 6395-6402
- Lee MG, Wynder C, Cooch N, Shiekhhattar R (2005) An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* **437**(7057): 432-435
- Li A, Eirin-Lopez JM, Ausio J (2005) H2AX: tailoring histone H2A for chromatin-dependent genomic integrity. *Biochem Cell Biol* **83**(4): 505-515
- Li B, Howe L, Anderson S, Yates JR, 3rd, Workman JL (2003a) The Set2 histone methyltransferase functions through the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* **278**(11): 8897-8903
- Li H, Fischle W, Wang W, Duncan EM, Liang L, Murakami-Ishibe S, Allis CD, Patel DJ (2007) Structural basis for lower lysine methylation state-specific readout by MBT repeats of L3MBTL1 and an engineered PHD finger. *Mol Cell* **28**(4): 677-691
- Li H, Ilin S, Wang W, Duncan EM, Wysocka J, Allis CD, Patel DJ (2006) Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* **442**(7098): 91-95
- Li Y, Danzer JR, Alvarez P, Belmont AS, Wallrath LL (2003b) Effects of tethering HP1 to euchromatic regions of the *Drosophila* genome. *Development* **130**(9): 1817-1824
- Liang G, Klose RJ, Gardner KE, Zhang Y (2007) Yeast Jhd2p is a histone H3 Lys4 trimethyl demethylase. *Nat Struct Mol Biol* **14**(3): 243-245
- Lomberk G, Bensi D, Fernandez-Zapico ME, Urrutia R (2006) Evidence for the existence of an HP1-mediated subcode within the histone code. *Nat Cell Biol* **8**(4): 407-415
- Lu BY, Emtage PC, Duyf BJ, Hilliker AJ, Eissenberg JC (2000) Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics* **155**(2): 699-708
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**(6648): 251-260
- Luijsterburg MS, Dinant C, Lans H, Stap J, Wiernasz E, Lagerwerf S, Warmerdam DO, Lindh M, Brink MC, Dobrucki JW, Aten JA, Fouteri MI, Jansen G, Dantuma NP, Vermeulen W,

- Mullenders LH, Houtsmuller AB, Verschure PJ, van Driel R (2009) Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. *J Cell Biol* **185**(4): 577-586
- Lusser A, Kadonaga JT (2003) Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* **25**(12): 1192-1200
- Ma H, Baumann CT, Li H, Strahl BD, Rice R, Jelinek MA, Aswad DW, Allis CD, Hager GL, Stallcup MR (2001) Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter. *Curr Biol* **11**(24): 1981-1985
- Ma JC, Dougherty DA (1997) The Cation- π interaction. *Chem Rev* **97**(5): 1303-1324
- Macdonald N, Welburn JP, Noble ME, Nguyen A, Yaffe MB, Clynes D, Moggs JG, Orphanides G, Thomson S, Edmunds JW, Clayton AL, Endicott JA, Mahadevan LC (2005) Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol Cell* **20**(2): 199-211
- Mahadevan LC, Willis AC, Barratt MJ (1991) Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* **65**(5): 775-783
- Maison C, Almouzni G (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4): 296-304
- Marmorstein R (2001) Structure and function of histone acetyltransferases. *Cell Mol Life Sci* **58**(5-6): 693-703
- Maurer-Stroh S, Dickens NJ, Hughes-Davies L, Kouzarides T, Eisenhaber F, Ponting CP (2003) The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci* **28**(2): 69-74
- Meehan RR, Kao CF, Pennings S (2003) HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *EMBO J* **22**(12): 3164-3174
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R, Schule R (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* **437**(7057): 436-439
- Micchelli CA, Rulifson EJ, Blair SS (1997) The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* **124**(8): 1485-1495
- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**(7153): 553-560
- Min J, Zhang Y, Xu RM (2003) Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev* **17**(15): 1823-1828
- Minc E, Allory Y, Worman HJ, Courvalin JC, Buendia B (1999) Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* **108**(4): 220-234

Mito Y, Henikoff JG, Henikoff S (2005) Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat Genet* **37**(10): 1090-1097

Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, Nakatani Y, Allis CD (1996) The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**(7): 1261-1270

Moazed D (2001) Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol Cell* **8**(3): 489-498

Mottet D, Castronovo V (2008) Histone deacetylases: target enzymes for cancer therapy. *Clin Exp Metastasis* **25**(2): 183-189

Muchardt C, Guilleme M, Seeler JS, Trouche D, Dejean A, Yaniv M (2002) Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1 α . *EMBO Rep* **3**(10): 975-981

Mulder KW, Brenkman AB, Inagaki A, van den Broek NJ, Timmers HT (2007) Regulation of histone H3K4 tri-methylation and PAF complex recruitment by the Ccr4-Not complex. *Nucleic Acids Res* **35**(7): 2428-2439

Murnion ME, Adams RR, Callister DM, Allis CD, Earnshaw WC, Swedlow JR (2001) Chromatin-associated protein phosphatase 1 regulates aurora-B and histone H3 phosphorylation. *J Biol Chem* **276**(28): 26656-26665

Murzina N, Verreault A, Laue E, Stillman B (1999) Heterochromatin dynamics in mouse cells: interaction between chromatin assembly factor 1 and HP1 proteins. *Mol Cell* **4**(4): 529-540

Muse GW, Gilchrist DA, Nechaev S, Shah R, Parker JS, Grissom SF, Zeitlinger J, Adelman K (2007) RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat Genet* **39**(12): 1507-1511

Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, Shaw AS (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**(6): 889-897

Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M (2002) Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J Biol Chem* **277**(51): 49562-49568

Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI (2001) Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* **292**(5514): 110-113

Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**(4): 475-487

Neumann CJ, Cohen SM (1996) A hierarchy of cross-regulation involving Notch, wingless, vestigial and cut organizes the dorsal/ventral axis of the *Drosophila* wing. *Development* **122**(11): 3477-3485

Ng HH, Feng Q, Wang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Zhang Y, Struhl K (2002) Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev* **16**(12): 1518-1527

- Ng HH, Robert F, Young RA, Struhl K (2003) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* **11**(3): 709-719
- Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R (2001a) Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell* **7**(4): 729-739
- Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE, Kouzarides T (2001b) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**(6846): 561-565
- Nightingale KP, Pruss D, Wolffe AP (1996) A single high affinity binding site for histone H1 in a nucleosome containing the *Xenopus borealis* 5 S ribosomal RNA gene. *J Biol Chem* **271**(12): 7090-7094
- Nonaka N, Kitajima T, Yokobayashi S, Xiao G, Yamamoto M, Grewal SI, Watanabe Y (2002) Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* **4**(1): 89-93
- Norwood LE, Grade SK, Cryderman DE, Hines KA, Furiase N, Toro R, Li Y, Dhasarathy A, Kladde MP, Hendrix MJ, Kirschmann DA, Wallrath LL (2004) Conserved properties of HP1(Hsalpha). *Gene* **336**(1): 37-46
- Nowak SJ, Corces VG (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* **20**(4): 214-220
- Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM, Nakatani Y (2002) A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* **296**(5570): 1132-1136
- Owen DJ, Ornaghi P, Yang JC, Lowe N, Evans PR, Ballario P, Neuhaus D, Filetici P, Travers AA (2000) The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J* **19**(22): 6141-6149
- Pak DT, Pflumm M, Chesnokov I, Huang DW, Kellum R, Marr J, Romanowski P, Botchan MR (1997) Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* **91**(3): 311-323
- Palmer DK, O'Day K, Wener MH, Andrews BS, Margolis RL (1987) A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J Cell Biol* **104**(4): 805-815
- Perrini B, Piacentini L, Fanti L, Altieri F, Chichiarelli S, Berloco M, Turano C, Ferraro A, Pimpinelli S (2004) HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*. *Mol Cell* **15**(3): 467-476
- Piacentini L, Fanti L, Berloco M, Perrini B, Pimpinelli S (2003) Heterochromatin protein 1 (HP1) is associated with induced gene expression in *Drosophila* euchromatin. *J Cell Biol* **161**(4): 707-714

Bibliografia

Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, de la Cruz CC, Otte AP, Panning B, Zhang Y (2003) Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* **300**(5616): 131-135

Polioudaki H, Kourmouli N, Drosou V, Bakou A, Theodoropoulos PA, Singh PB, Giannakouros T, Georgatos SD (2001) Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep* **2**(10): 920-925

Preuss U, Landsberg G, Scheidtmann KH (2003) Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res* **31**(3): 878-885

Pruss D, Bartholomew B, Persinger J, Hayes J, Arents G, Moudrianakis EN, Wolffe AP (1996) An asymmetric model for the nucleosome: a binding site for linker histones inside the DNA gyres. *Science* **274**(5287): 614-617

Pusarla RH, Bhargava P (2005) Histones in functional diversification. Core histone variants. *FEBS J* **272**(20): 5149-5168

Quivy JP, Roche D, Kirschner D, Tagami H, Nakatani Y, Almouzni G (2004) A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication. *EMBO J* **23**(17): 3516-3526

Raffa GD, Cenci G, Siriaco G, Goldberg ML, Gatti M (2005) The putative *Drosophila* transcription factor woc is required to prevent telomeric fusions. *Mol Cell* **20**(6): 821-831

Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**(6796): 593-599

Reeves R, Nissen MS (1990) The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* **265**(15): 8573-8582

Rice JC, Allis CD (2001) Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* **13**(3): 263-273

Ringrose L, Ehret H, Paro R (2004) Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexos. *Mol Cell* **16**(4): 641-653

Ringrose L, Paro R (2007) Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* **134**(2): 223-232

Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM (2000) Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* **275**(13): 9390-9395

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**(10): 5858-5868

Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J (2007) Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* **25**(1): 15-30

- Sampath SC, Marazzi I, Yap KL, Krutchinsky AN, Mecklenbrauker I, Viale A, Rudensky E, Zhou MM, Chait BT, Tarakhovsky A (2007) Methylation of a histone mimic within the histone methyltransferase G9a regulates protein complex assembly. *Mol Cell* **27**(4): 596-608
- Sanders SL, Portoso M, Mata J, Bahler J, Allshire RC, Kouzarides T (2004) Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* **119**(5): 603-614
- Sarma K, Reinberg D (2005) Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2): 139-149
- Saunders A, Werner J, Andrulis ED, Nakayama T, Hirose S, Reinberg D, Lis JT (2003) Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo. *Science* **301**(5636): 1094-1096
- Saurin AJ, Shiels C, Williamson J, Satijn DP, Otte AP, Sheer D, Freemont PS (1998) The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *J Cell Biol* **142**(4): 887-898
- Savitsky M, Kravchuk O, Melnikova L, Georgiev P (2002) Heterochromatin protein 1 is involved in control of telomere elongation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **22**(9): 3204-3218
- Schalch T, Job G, Noffsinger VJ, Shanker S, Kuscus C, Joshua-Tor L, Partridge JF (2009) High-affinity binding of Chp1 chromodomain to K9 methylated histone H3 is required to establish centromeric heterochromatin. *Mol Cell* **34**(1): 36-46
- Schmiedeberg L, Weissbart K, Diekmann S, Meyer Zu Hoerste G, Hemmerich P (2004) High- and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin of mammalian cells. *Mol Biol Cell* **15**(6): 2819-2833
- Schotta G, Ebert A, Krauss V, Fischer A, Hoffmann J, Rea S, Jenuwein T, Dorn R, Reuter G (2002) Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J* **21**(5): 1121-1131
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**(11): 1251-1262
- Schubeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, van Leeuwen F, Gottschling DE, O'Neill LP, Turner BM, Delrow J, Bell SP, Groudine M (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* **18**(11): 1263-1271
- Seum C, Reo E, Peng H, Rauscher FJ, 3rd, Spierer P, Bontron S (2007) *Drosophila* SETDB1 is required for chromosome 4 silencing. *PLoS Genet* **3**(5): e76
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, Casero RA (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**(7): 941-953
- Shi Y, Whetstone JR (2007) Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell* **25**(1): 1-14

Bibliografia

- Shi YJ, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T, Shi Y (2005) Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell* **19**(6): 857-864
- Shiio Y, Eisenman RN (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13225-13230
- Sims RJ, 3rd, Nishioka K, Reinberg D (2003) Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* **19**(11): 629-639
- Singh M, D'Silva L, Holak TA (2006) DNA-binding properties of the recombinant high-mobility-group-like AT-hook-containing region from human BRG1 protein. *Biol Chem* **387**(10-11): 1469-1478
- Singh PB, Georgatos SD (2002) HP1: facts, open questions, and speculation. *J Struct Biol* **140**(1-3): 10-16
- Smothers JF, Henikoff S (2000) The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr Biol* **10**(1): 27-30
- Smothers JF, Henikoff S (2001) The hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of HP1-like proteins. *Mol Cell Biol* **21**(7): 2555-2569
- Soloaga A, Thomson S, Wiggin GR, Rampersaud N, Dyson MH, Hazzalin CA, Mahadevan LC, Arthur JS (2003) MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J* **22**(11): 2788-2797
- Srinivasan S, Armstrong JA, Deuring R, Dahlsveen IK, McNeill H, Tamkun JW (2005) The *Drosophila* trithorax group protein Kismet facilitates an early step in transcriptional elongation by RNA Polymerase II. *Development* **132**(7): 1623-1635
- Stassen MJ, Bailey D, Nelson S, Chinwalla V, Harte PJ (1995) The *Drosophila* trithorax proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mech Dev* **52**(2-3): 209-223
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765): 41-45
- Strahl BD, Grant PA, Briggs SD, Sun ZW, Bone JR, Caldwell JA, Mollah S, Cook RG, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD (2002) Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **22**(5): 1298-1306
- Struhl G, Greenwald I (1999) Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* **398**(6727): 522-525
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**(7): 1213-1226
- Sullivan KF, Hechenberger M, Masri K (1994) Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J Cell Biol* **127**(3): 581-592
- Tabata T (2001) Genetics of morphogen gradients. *Nat Rev Genet* **2**(8): 620-630

- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexos mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**(1): 51-61
- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ (2007) How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* **14**(11): 1025-1040
- Thiru A, Nietlispach D, Mott HR, Okuwaki M, Lyon D, Nielsen PR, Hirshberg M, Verreault A, Murzina NV, Laue ED (2004) Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J* **23**(3): 489-499
- Thomas U, Jonsson F, Speicher SA, Knust E (1995) Phenotypic and molecular characterization of SerD, a dominant allele of the *Drosophila* gene Serrate. *Genetics* **139**(1): 203-213
- Thorne AW, Kmiecik D, Mitchelson K, Sautiere P, Crane-Robinson C (1990) Patterns of histone acetylation. *Eur J Biochem* **193**(3): 701-713
- Tordera V, Sendra R, Perez-Ortin JE (1993) The role of histones and their modifications in the informative content of chromatin. *Experientia* **49**(9): 780-788
- Trewick SC, Henshaw TF, Hausinger RP, Lindahl T, Sedgwick B (2002) Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature* **419**(6903): 174-178
- Trewick SC, McLaughlin PJ, Allshire RC (2005) Methylation: lost in hydroxylation? *EMBO Rep* **6**(4): 315-320
- Tschiersch B, Hofmann A, Krauss V, Dorn R, Korge G, Reuter G (1994) The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexos. *EMBO J* **13**(16): 3822-3831
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**(7078): 811-816
- Turner BM (1993) Decoding the nucleosome. *Cell* **75**(1): 5-8
- Turner JM, Burgoyne PS, Singh PB (2001) M31 and macroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis. *J Cell Sci* **114**(Pt 18): 3367-3375
- Tyler-Smith C, Floridia G (2000) Many paths to the top of the mountain: diverse evolutionary solutions to centromere structure. *Cell* **102**(1): 5-8
- Tzeng TY, Lee CH, Chan LW, Shen CK (2007) Epigenetic regulation of the *Drosophila* chromosome 4 by the histone H3K9 methyltransferase dSETDB1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(31): 12691-12696
- Utey RT, Cote J (2003) The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* **274**: 203-236

Bibliografia

- Vakoc CR, Mandat SA, Olenchock BA, Blobel GA (2005) Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* **19**(3): 381-391
- van der Maarel SM, Scholten IH, Huber I, Philippe C, Suijkerbuijk RF, Gilgenkrantz S, Kere J, Cremers FP, Ropers HH (1996) Cloning and characterization of DXS6673E, a candidate gene for X-linked mental retardation in Xq13.1. *Hum Mol Genet* **5**(7): 887-897
- van Leeuwen F, Gafken PR, Gottschling DE (2002) Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* **109**(6): 745-756
- VanDemark AP, Kasten MM, Ferris E, Heroux A, Hill CP, Cairns BR (2007) Autoregulation of the rsc4 tandem bromodomain by gcn5 acetylation. *Mol Cell* **27**(5): 817-828
- Vermaak D, Henikoff S, Malik HS (2005) Positive selection drives the evolution of rhino, a member of the heterochromatin protein 1 family in *Drosophila*. *PLoS Genet* **1**(1): 96-108
- Vetting MW, LP SdC, Yu M, Hegde SS, Magnet S, Roderick SL, Blanchard JS (2005) Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* **433**(1): 212-226
- Volpe AM, Horowitz H, Grafer CM, Jackson SM, Berg CA (2001) *Drosophila* rhino encodes a female-specific chromo-domain protein that affects chromosome structure and egg polarity. *Genetics* **159**(3): 1117-1134
- Wakimoto BT, Hearn MG (1990) The effects of chromosome rearrangements on the expression of heterochromatic genes in chromosome 2L of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **125**(1): 141-154
- Wallrath LL, Elgin SC (1995) Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev* **9**(10): 1263-1277
- Wang G, Ma A, Chow CM, Horsley D, Brown NR, Cowell IG, Singh PB (2000) Conservation of heterochromatin protein 1 function. *Mol Cell Biol* **20**(18): 6970-6983
- Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P, Zhang Y (2001) Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* **293**(5531): 853-857
- Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2004a) Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* **431**(7010): 873-878
- Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA (2004b) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. *Science* **306**(5694): 279-283
- Ward IM, Chen J (2001) Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* **276**(51): 47759-47762
- Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **97**(1): 99-109

- West MH, Bonner WM (1980) Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* **19**(14): 3238-3245
- Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M, Shi Y (2006) Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* **125**(3): 467-481
- Wismar J, Habtemichael N, Warren JT, Dai JD, Gilbert LI, Gateff E (2000) The mutation without children(rgl) causes ecdysteroid deficiency in third-instar larvae of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **226**(1): 1-17
- Wood A, Schneider J, Dover J, Johnston M, Shilatifard A (2003) The Paf1 complex is essential for histone monoubiquitination by the Rad6-Bre1 complex, which signals for histone methylation by COMPASS and Dot1p. *J Biol Chem* **278**(37): 34739-34742
- Wu JQ, Snyder M (2008) RNA polymerase II stalling: loading at the start prepares genes for a sprint. *Genome Biol* **9**(5): 220
- Wyce A, Xiao T, Whelan KA, Kosman C, Walter W, Eick D, Hughes TR, Krogan NJ, Strahl BD, Berger SL (2007) H2B ubiquitylation acts as a barrier to Ctk1 nucleosomal recruitment prior to removal by Ubp8 within a SAGA-related complex. *Mol Cell* **27**(2): 275-288
- Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, Kauer M, Tackett AJ, Chait BT, Badenhurst P, Wu C, Allis CD (2006) A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* **442**(7098): 86-90
- Xu T, Rubin GM (1993) Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**(4): 1223-1237
- Xu W (2005) Nuclear receptor coactivators: the key to unlock chromatin. *Biochem Cell Biol* **83**(4): 418-428
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC (1997) The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**(7): 961-971
- Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y (2006) JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* **125**(3): 483-495
- Zeitlinger J, Stark A, Kellis M, Hong JW, Nechaev S, Adelman K, Levine M, Young RA (2007) RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat Genet* **39**(12): 1512-1516
- Zeng L, Zhou MM (2002) Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* **513**(1): 124-128
- Zhao T, Eissenberg JC (1999) Phosphorylation of heterochromatin protein 1 by casein kinase II is required for efficient heterochromatin binding in *Drosophila*. *J Biol Chem* **274**(21): 15095-15100

Bibliografia

Zhao T, Heyduk T, Eissenberg JC (2001) Phosphorylation site mutations in heterochromatin protein 1 (HP1) reduce or eliminate silencing activity. *J Biol Chem* **276**(12): 9512-9518