



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Paper de SirT2 en el control epigenètic de la mitosi

Núria Sima Teruel



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**

Paper de SirT2 en el control epigenètic de la mitosi

Memòria presentada per **Núria Sima Teruel** per optar al títol de
Doctor per la
Universitat de Barcelona.

Aquesta tesi s'ha realitzat sota la supervisió del **Dr. Alejandro Vaquero García** en el Programa d'Epigenètica i Biologia del Càncer (PEBC) de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

Núria Sima Teruel
Doctoranda

Dr. Alejandro Vaquero García
Director

Dr. Antonio Felipe Campo
Tutor

Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia.
Programa de Doctorat de Biomedicina
Barcelona, 2016

TAULA DE CONTINGUT

TAULA DE CONTINGUT

AGRAÏMENTS	1
RESUM	5
ABREVIATURES	9
INTRODUCCIÓ	17
1. Estructura de la cromatina	19
2. Dinàmica de la cromatina.....	20
2.1. Modificacions postraduccionals de les histones	20
2.1.1. Acetilació	23
2.1.1.1. H4K16Ac	24
2.1.2. Metilació.....	25
2.1.2.1. H4K20me	27
2.1.3. Fosforilació	30
2.1.4. Ubiquitinació	31
2.1.5. Sumoilació	31
2.1.6. ADP-Ribosilació.....	31
2.2. Metilació del DNA.....	32
2.3. Remodeladors de la cromatina dependents d'ATP	33
3. El cicle cel·lular	33
3.1. Regulació de la cromatina al llarg del cicle cel·lular	33
3.1.1. Biogènesi de les histones.....	35
3.1.2. Replicació del DNA.....	35
3.1.2.1. Licensing	35
3.1.2.2. Firing.....	36
3.1.3. Compactació de la cromatina durant mitosi i segregació dels cromosomes	37
3.2. Mecanismes de control del cicle: Checkpoints.....	38
3.2.1. Checkpoint de G1/S	39
3.2.2. Checkpoints de la fase S	39
3.2.2.1. Checkpoint de intra-S	40
3.2.2.2. Checkpoint de replicació	41
3.2.2.3. Checkpoint de S-M	41
3.2.3. Checkpoints de mitosi	41
3.2.3.1. Checkpoint de G2/M	41
3.2.3.2. Checkpoint d'antefase.....	42

3.2.3.3. Checkpoint del fus mitòtic.....	43
4. Resposta al dany al DNA.....	44
4.1. Dinàmica de la cromatina.....	45
5. Acetiltransferases.....	46
5.1. Família MYST.....	47
5.1.1. MOF, una acetiltransferasa singular.....	48
6. Desacetilases.....	52
6.1. HDACs III: Família de les Sirtuïnes.....	52
6.1.2. SirT2.....	55
7. Relació funcional entre H4K16Ac i H4K20me.....	61
OBJECTIUS.....	65
MATERIALS I MÈTODES.....	69
1. Ratolins.....	71
1.1. Ratolins <i>knockout</i> de sirt2.....	71
1.2. Ratolins <i>knockout</i> de mof.....	71
1.3. Ratolins doble <i>knockout</i> de sirt2 i mof.....	72
2. Cultius Cel·lulars.....	72
2.1. Fibroblasts embrionaris de ratolí primaris.....	72
2.2. Línies cel·lulars.....	72
2.3. Procediments cel·lulars.....	73
2.3.1. Transfecció.....	73
2.3.1.1. Clonatges i mutagènesi dirigida.....	73
2.3.2. Procediment de sincronització.....	74
2.3.3. Tractaments cel·lulars.....	74
3. Procediments amb proteïnes.....	74
3.1. Extractes proteics i fraccionament cel·lular.....	74
3.2. Western blot.....	75
3.3. Tinció de plata i coloidal-coomassie.....	75
3.4. Co-immunoprecipitació de proteïnes i pull downs.....	76
4. Procediments de purificació.....	76
4.1. Purificació de nucleosomes i histones del nucleosoma central.....	76
4.2. Purificació de MOF, SirT2 i PR-SET7 de cèl·lules de mamífer.....	76
4.3. Purificació de proteïna recombinant.....	77
4.4. Purificació de complexos.....	77

5.	Assajos enzimàtics <i>in vitro</i>	78
5.1.	Assaig d'acetilació.....	78
5.2.	Assaig de desacetilació de MOF per SirT2.....	78
5.3.	Assaig de metilació de nucleosomes post assaig d'acetilació.....	78
6.	Anàlisi del cycle cel·lular.....	79
7.	Tècniques de microscopia.....	80
7.1.	Immunohistoquímica (IHC).....	80
7.2.	Immunofluorescència (IF).....	80
8.	Procediments amb DNA i RNA.....	81
8.1.	Genotipació.....	81
8.1.1.	Purificació de DNA.....	81
8.1.2.	PCR.....	81
8.2.	Purificació de mRNA i RT-qPCR.....	81
	RESULTATS.....	83
1.	SirT2 regula la dinàmica de MOF a la cromatina durant G2/M.....	85
1.1.	SirT2 interacciona amb MOF a través del seu domini catalític.....	85
1.2.	SirT2 interacciona amb MOF durant G2/M.....	86
1.3.	SirT2 regula els nivells de MOF a la cromatina i promou la seva degradació durant G2/M.....	88
1.4.	SirT2 controla l'activitat catalítica de MOF.....	92
1.4.1.	SirT2 desacetila i inactiva MOF.....	92
1.4.2.	La fosforilació de la serina 348 de MOF és necessària per la desacetilació per SirT2.....	94
1.1.1.	La desacetilació de MOF per SirT2 desestabilitza la interacció entre els dos enzims.....	95
2.	MOF i SirT2 són importants pel manteniment de l'estabilitat genòmica.....	96
2.1.	Generació del ratolí <i>sirt2^{-/-}/mof^{-/-}</i>	96
2.2.	SirT2 i MOF són essencials per la dinàmica de la cromatina.....	97
2.2.1.	H4K16Ac determina la deposició d'H4K20me1.....	97
2.2.2.	MOF controla la localització de PR-SET7 a la cromatina.....	99
2.2.3.	SirT2 i MOF regulen els nivells d'H4K20me al llarg del cycle cel·lular.....	103
2.3.	SirT2 participa en el checkpoint de G2/M activat per la pèrdua de MOF.....	104
2.4.	El balanç entre SirT2 i MOF controla l'expressió de gens del cycle cel·lular.....	107
2.5.	La pèrdua de SirT2 i MOF té un efecte compensatori sobre la inestabilitat genòmica.....	107
	DISCUSSIÓ.....	111
1.	SirT2 controla els nivells d'H4K16Ac durant mitosi a través de la regulació de MOF.....	114
2.	SirT2 condueix a una reprogramació epigenètica durant mitosi.....	115

3. SirT2 controla el pas per mitosi.....	119
4. SirT2 i MOF són importants per l'estabilitat genòmica.....	122
5. MOF, SirT2 i càncer.....	126
CONCLUSIONS.....	129
BIBLIOGRAFIA.....	133

AGRAÏMENTS

Fa ara gairebé 5 anys que em vaig embarcar en quelcom anomenat tesi. Ha sigut un temps d'esforç i suor, d'aprenentatge i saber, no només a nivell professional, sinó a nivell personal. Una etapa en la que he compartit moments enriquidors amb tots vosaltres, i gràcies a això ara sóc qui sóc i em trobo on em trobo. Un camí que va començar llavors i que no acaba aquí, només es ramifica i pren una altra direcció.

Recordo aquell dia en el que la Gemma em va parlar de l'Àlex, un científic entusiasta que es dedicava a estudiar quelcom anomenat Sirtuïnes. Poc després, vaig poder comprovar la passió que l'Àlex sentia per la ciència i pel saber en general. Des del primer dia i durant tots aquests anys, no hi ha hagut un sol moment en el que la porta del seu despatx hagi estat tancada, sempre disposat a discutir resultats i divagar pel coneixement, fent teories i noves hipòtesis, per finalment, acabar parlant de qualsevol altre tema d'actualitat, història, "cotilleos"... en fi, un home apassionat com pocs n'hi ha. *Gràcies Àlex per haver-me donat l'oportunitat de formar part d'aquest projecte.*

Aquells primers dies van ser decisius, van marcar el destí de la meua tesi. La Paloma, la Irene, en Max i l'Helena van dedicar 2 dies cadascú a explicar-me els seus projectes i un cop vaig haver fet tota la ronda, l'Àlex em va deixar escollir el treball que més m'hagués captivat. En aquells dies doncs, es va decidir tot. Vaig començar a treballar amb la Paloma, a la que li dec gran part del meu treball. Ella em va transmetre el seu coneixement i la seva passió i energia per fer ciència. *Siempre estaré agradecida por todo lo que aprendí de ti.* Cada dia, de bon matí, al laboratori sempre hi trobava l'Anna, la Irene i la Laia. La Laia, pura energia i disciplina. *Sempre recordaré aquells moments difícils en els que vaig poder comptar amb tu.* L'Anna, atabalada amunt i avall, però sempre disposada a ajudar-me en allò que calgués. *Moltes gràcies, Anna, per escoltar totes les meves històries i entendre'm com ho has fet.* La Irene, un huracà d'energia matutina, treballadora com ella sola. *Pueblo, fue divertido trabajar contigo.* L'Helena arribava després, a mig matí, amb el seu somriure d'orella a orella i carregada com si portés la casa al damunt. Amb ella he compartit creps, viatges i converses infinites. *Helena, gràcies per la teva sintonia, paciència i calma.* Quan ja tot estava engranat, van arribar en George i en Nico, aportant aire nou al lab. En George, tot i sempre estar encaboirat amb el seu "complex", mai li faltaven ganes de discutir sobre cine. El "chileno", va revolucionar el laboratori amb la seva frescor, senzillesa i aquell riure contagiós. Company de poyata, de discussions matrimonials, birres i festes, amb ell hi ha diversió assegurada. *Nico, siempre recordaré esas preguntitas made in Nico, que conseguían sacarme de quicio al principio y que al final llegaron a hacerme reír.* Llavors, van arribar en Pau, la Jess i la María. La María em va renovar l'energia, em va donar l'oportunitat d'aprendre a ensenyar i va representar aire fresc pel meu projecte. *María, a pesar de la locura de los últimos tiempos, gracias a ti, la recta final ha sido mucho más llevadera.*

Fora de les fronteres del PEBC4, sempre vaig poder comptar amb la Natalia, la Jana i la Rute. Amb la Natalia vam fer llargues sessions de perruqueria a cultius. *Natalia, contigo siempre me ha resultado fácil mostrarme como soy y siempre me has hecho sentir que mis cosas eran importantes, no sabes lo satisfactorio que es eso, gracias por tu apoyo.* La Jana... pura vida! Una apassionada del seu temps, a la que mai se li acaben les històries per explicar. *Jana, gràcies per la teva alegria, inclòs en els moments més difícils.* Amb la Rute hem compartit les inquietuds dels últims temps i la tortuosa escriptura. *Rute, le has dado un toque de música clásica al fin de mi tesis.*

Però que haurien estat aquests anys sense vosaltres, els meus amics, la gent que enriqueix i embelleix la meua vida cada dia. La Sara i la Marta són úniques, insubstituïbles. Sara, la millor companyia que ningú pugui imaginar, genuïna, divertida. *Gràcies per compartir el teu temps amb mi.* Marta, amiga del cor, pacient i divertida. *Gràcies per ser allà sempre.* Tots junts, amb en Joanot, que des de Grècia s'ha convertit en el meu nou germà petit amb qui fer entremeliadures, la Laia, en Martí i l'Albert som un equip imparabile, sense fronteres. Ara em transportaria altra vegada a aquell viatge a Grècia, per reviuire les postes de sol, els esmorzars a la terrassa de la mama Katerina, les aventures amb el catamarà i mil coses més que vam fer i

repetiria amb vosaltres infinites vegades. L'Àlex, sempre disposada a fer un soparet amb mi i parlar de les nostres coses o desconnectar, a modo de croqueta, en alguna illa del Mediterrani. I la Laia, que durant els últims deu anys sempre ha estat allà, per compartir estones amb mi. *Laia, menudas historietas tenemos tu y yo! Jaja! Gracias, por mantenerte ahí!*

Del que estic summament orgullosa i agraïda és d'haver trobat uns companys de pis tant meravellosos com l'Albert i l'Aran, que han fet d'un pis compartit una llar. Durant aquests tres anys, que he tingut l'honor de compartir el dia a dia amb vosaltres, he après infinitat de coses, m'he divertit, he rondinat, he rigut, he plorat, però el més important és que he estimat i m'he sentit estimada. *Albert, amb tu sobren les paraules. Tots dos sabem que allà estem l'un per l'altre i del que més m'enorgulleixo és de com és la nostra relació: senzilla, fluida, sincera, amorosa però sense afeció, en definitiva, lliure. Aran, contigo no hay palabras suficientes que puedan expresar cuán importante has sido y eres para mí. Hay un antes y un después de haberte conocido y me siento sumamente contenta de tenerte en mi vida y que podamos contar la una con la otra para absolutamente todo. Si hay una cosa cierta es que nada es constante, que todo cambia, y la mayoría de los cambios están fuera de nuestro control, pero deseo con todo mi corazón que nuestros caminos vayan en paralelo durante mucho mucho tiempo. Mil gracias, Arantzita!* Però en Viladomat... la família crece!! Y gracias a Bea, Marta y Marina, lo que se avecinaba como algo triste y decadente, ha transcurrido con alegría e ilusión. *Gracias chicas!*

Tot i que aquesta etapa ha transcorregut entre Barcelona i Bellvitge, l'origen està a Badalona, la ciutat que m'ha vist créixer i on sempre serà casa meva. Allà he passat tots els periples fins arribar on sóc ara. Des de la Jungfrau, que junt amb la meva família, em va fer com a persona i d'on m'emporto la Zaida i la Judit, fins al Moll, on vaig aprendre infinitat de coses de la vida i on vaig conèixer en Dan. *Dan, tú siempre me has hecho sentir que soy la mejor, la más divertida, la más habladora, la más interesante, la más bonita... Gracias por tener ese don de hacer sentir bien a la gente y que hace que el hablar contigo sea un subidón de endorfinas gratuito. Gracias por creer siempre en mí y por ser como eres conmigo.*

No podria haver fet aquesta tesi sense l'ajut incondicional dels de casa. *Marc, gràcies per donar aquesta xispa personal a tot el que t'envolta i que fa que compartir el temps amb tu sigui de tot menys avorrit. Estic molt contenta i orgullosa de tenir-te com a germà. Gràcies per aguantar-me, Anselmet! Mama, aquest treball va dedicat a tu, al teu suport, al teu amor generós, a la teva comprensió, a la teva complicitat, a la teva saviesa. Perquè sense tu res d'això hagués estat possible. Gràcies per entendre i respectar cada pas que he fet a la vida, inclosos aquells que s'intuïen catastròfics. Gràcies per ser la millor mare que es pugui imaginar.*

Moltes gràcies a tots,

Núria

RESUM

RESUM

La cromatina és una estructura nucleoproteïca, dinàmica i jeràrquicament organitzada dins del nucli cel·lular. La seva estructura, organització i funció està controlada al llarg del cycle cel·lular, per processos epigenètics que produeixen canvis heretables que no afecten la seqüència de DNA. Entre aquests canvis es troben la metilació del DNA, les modificacions postraduccionals de les histones i el plegament de la cromatina orquestrat pels complexos remodeladors i proteïnes estructurals. Les modificacions postraduccionals de les histones es donen principalment de forma dinàmica i regulada a l'extrem N-terminal, canviant la seva càrrega i funció. Entre les diferents modificacions descrites, l'acetilació i la metilació de les histones H3 i H4, semblen tenir una importància especial sobre l'estructura i estat de la cromatina. En particular, l'acetilació de la lisina 16 de la histona H4 (H4K16Ac) *per se* impedeix la formació d'estructures compactes de cromatina. D'aquesta manera, s'associa l'estat desacetilat d'aquest residu a zones d'heterocromatina i transcripcionalment inactives, mentre que la hiperacetilació d'H4K16 està estretament vinculada a zones eucromàtiques i transcripcionalment actives. La dinàmica d'acetilació-desacetilació d'H4K16 està controlada principalment per l'equilibri de les activitats acetiltransferasa de MOF i desacetilasa de SirT1 i SirT2. Per tant, aquests dos grups d'enzims són essencials per el control de l'expressió gènica i de l'arquitectura de la cromatina dins del nucli, regulant la transició entre l'estat transcripcionalment actiu i inactiu de la cromatina. MOF és crucial per el desenvolupament embrionari, la reparació del DNA i la progressió del cycle cel·lular, i la seva pèrdua està associada a l'augment de les aberracions cromosòmiques, a l'aturada del cycle cel·lular en G2/M i a l'augment de la inestabilitat genòmica. SirT1 i SirT2 pertanyen a la classe III de desacetilases d'histones (HDACs), conegudes com sirtuïnes, i són crucials pel manteniment de la integritat genòmica, l'adaptació a l'entorn i l'envelliment, entre altres funcions. No obstant, dels set membres de sirtuïnes presents a mamífers, només

SirT2 i en menor mesura SirT1, han estat vinculades amb el control del cycle cel·lular. Concretament, SirT2, tot i ser principalment citoplasmàtica, és transportada al nucli durant la transició G2/M, moment en el que a través de la desacetilació d'H4K16 permet la monometilació d'H4K20 per PR-SET7 (la monometiltransferasa d'H4K20), determinant els nivells d'H4K20me_{2,3} en la resta del cycle cel·lular. Com a conseqüència, SirT2 està implicat en processos estrictament associat a aquestes modificacions, com la compactació dels cromosomes metafàsics, la progressió a través de mitosi, la replicació i reparació del DNA o la formació de l'heterocromatina. Fins al moment el paper de SirT2 en el control de la progressió a través de la mitosi ha estat atribuït a la regulació de diferents substrats. En particular, el control d'H4K20me₁ dependent de SirT2 ha estat relacionat amb l'activació del *checkpoint* de G2/M en resposta a estrès, tot i que els mecanismes involucrats en l'aturada del cycle cel·lular eren del tot desconeguts. En aquest treball hem volgut indagar sobre com SirT2 regula la transició G2/M i la seva coordinació amb la maquinària regulatòria del *checkpoint*. Les nostres dades semblen indicar que SirT2 condueix a l'activació del *checkpoint* de G2/M a través de la regulació d'H4K16Ac, H4K20me₁ i el control de la transcripció de gens relacionats amb el cycle cel·lular. Es descriu per primera vegada, com SirT2 controla H4K16Ac a través de la regulació de l'activitat i de l'estabilitat proteica de MOF durant G2/M. Concretament, SirT2 desacetila MOF durant G2/M i en promou la sortida de la cromatina, la inactivació i degradació, afavorint l'estat desacetilat d'H4K16 i la monometilació d'H4K20. En concordança, hem vist que MOF controla negativament la presència de PR-SET7 a la cromatina, mantenint així uns nivells adequats d'H4K20me₁ abans d'entrar a mitosi i evitant la condensació prematura dels cromosomes. El nostre estudi suggereix que la interconnexió entre SirT2 i MOF està directament implicada en el control epigenètic del cycle cel·lular, contribuint al manteniment de l'estabilitat genòmica.

ABREVIATURES

ABREVIATURES

7AAD	7-aminoactinomicina D
53BP1	p53-binding protein 1
AADPR	O-acetil-ADP-Ribosa
Ac	Acetilat
ADP	Adenosina difosfat
APC/C	Complex promotor de l'anafase/ciclosoma, de les sigles en anglès
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosina trifosfat
ATR	ATM and Rad3-related
BER	Reparació per excisió de base, de les sigles en anglès
BRCA1	Breast cancer 1
BSA	Albúmina sèrica bovina
BUBR1	Budding unhibited by benzimidazoles related 1
CAK	Quinasa activadora de CDKs, de les sigles en anglès
CAPs	Chromatin architectural proteins
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CBD	Domini chromo-barrel; de les sigles en anglès
CBP	Proteïna d'unió al factor de transcripció CREB, de les sigles en anglès
CDC14	Cell division cycle 14
CDC20	Cell division cycle 20
CDH1	E-Cadherina
CDK	Quinasa dependent de ciclina
CENT	Proteïna del centròmer, de les sigles en anglès
CHD	Chromo domain helicase/ATPase binding protein
CHFR	Checkpoint with forkhead-associated (FHA) and ring finger domains
CHK2	Check point kinase
CHX	Ciclohexamida
CK2	Casein kinase 2
Co-IP	Co-immunoprecipitació
CRL4	Cullin-ring finger ligase 4
CRM1	Chromosomal region maintenance 1
CTCF	Factor d'unió aïllant
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilindol
DCC	Complex de compensació de dosi, de les sigles en anglès
DDR	Resposta al dany al DNA, de les sigles en anglès
DKO	Doble knockout
DNA	Àcid desoxiribonucleic, de les sigles en anglès

ABREVIATURES

DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DNMT	Metiltransferasa de DNA, de les sigles en anglès
dNTPs	Desoxiribonucleòtids trifosfat
DTB	Doble bloqueig de timidina
DSB	Trencament de doble cadena, de les sigles en anglès
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
ES	Extracte soluble
ESCs	Cèl·lules mare embrionàries, de les sigles en anglès
Ezh2	Enhancer of Zeste 2
FBS	Suero fetal boví, de les sigles en anglès
FOXO	Forhead box class O
Gcn5	General control nonderepressible-5
GNAT	Gcn5-related histone N-acetyltransferases
GST	Glutathion transferasa
HA	Hemaglutinina A
HATs	Acetiltransferases d'histones, de les sigles en anglès
HAS	High affinity sequence
HBO 1	Histone acetyltransferase binding protein to ORC1
HDACs	Desacetilases d'histones, de les sigles en anglès
HDMs	Desmetilases d'histones, de les sigles en anglès
HeLa	Henrietta Lacks
HMT	Metiltransferases d'histones
HP1	Heterochromatin protein-1
HR	Inositol 80
INO80	Recombinació homòloga, de les sigles en anglès
ISWI	Imitation of switch
IF	Immunofluorescència
IHC	Immunohistoquímica
IP	Immunoprecipitació
KAT	Acetiltransferasa de lisines
KO	Knockout
L3MBTL1	Lethal 3 malignant brain tumor 1
lncRNAs	Àcid ribonucleic llarg no codificant, de les seves sigles en anglès
MBT	Malignant brain tumor
MCC	Mitotic checkpoint complex
MDM2	Murine doble minute 2
Me	Metilat

ABREVIATURES

MEFs	Fribroblasts embrionaris de ratolí, de les sigles en anglès
MLE	Maleless
MLL	Mixed lineage in leukemia
MOF	Males absent On the First
MORF	MOZ related factor
MOZ	Monocytic leukemia zinc finger protein
mRNA	RNA missatger
MS	Espectrometria de masses, de les sigles en anglès
MSL	Male specific lethal
MTS	Seqüència de direccionament mitocondrial, de les sigles en anglès
MYST	MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 i TIP60
NAD⁺	Dinucleòtid d'adenina i nicotinamida
NAM	Nicotinamida
ncRNAs	Àcid ribonucleic no codificant, de les seves sigles en anglès
NER	NF-E2-related factor 2
NFR2	Reparació per excisió de nucleòtid, de les sigles en anglès
NHEJ	Nonhomologous end-joining
NSB1	Nijmegen breakage syndrome 1
NES	Seqüència d'exportació nuclear, de les sigles en anglès
NF-KB	Nuclear factor-KB
nLS	Seqüència de localització nucleolar
NLS	Seqüència de localització nuclear
NSCLC	Non-small cell lung cancer
NSL	Non specific lethal
NuA4	Nucleosomal acetyltransferases of H4
NuRD	Nucleosome remodeling and deacetylase
ORC	Origin recognition complex
p	Fosforilat
PARP	Poly-ADP-ribose polymerase
Pb	Parell de bases
PCAF	P300/CBP-associated factor
PcG	Grup Polycomb
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa, de les sigles en anglès
PHD	Plant homeo domain
PHF8	Plant homeo domain finger protein 8
PLK1	Polo kinase 1

ABREVIATURES

PML	Fluorur de fenilmetilsulfonil
PMSF	Protein phosphatase 2
PP2A	Complex de repressió Polycomb, de les sigles en anglès
PRC	Element de resposta a Polycomb
PRE	Pre-Replication complex
Pre-RC	Protein arginine N-methyltransferases
PRMTs	Factor d'elongació de la transcripció
PN	Pellet nuclear
pTEF	Modificacions postraduccional
PTMs	Àcid ribonucleic, de les sigles en anglès
qPCR	PCR quantitativa
Rb	Retinoblastoma
rDNA	DNA ribosomal
RNA	RNA polimerasa II
RNA Pol II	Proteïna mielocítica de leucèmia
RPA	Replication protein A
RSR	Resposta a l'estrès replicatiu, de les sigles en anglès
roX	RNA on the X
RSC	Remodelador de l'estructura de la cromatina
RT-PCR	PCR a temps real
SAC	Checkpoint del fus, de les sigles en anglès
SAGA	Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase
SAM	S-adenosylmetionina
Sas	Something about silencing
SgoI	Shogoshin
SIMs	SUMO interacting motifs
SINE	Short interspersed nuclear elements
SirT1-7	Silent mating type information regulation 2 homolog 1-7
SKP2	S-phase kinase associated protein 2
SMC	Structural maintenance chromosomes
sncRNAs	Àcid ribonucleic curt no codificant, de les seves sigles en anglès
SRC	Coactivador de receptors d'esteroids, de les sigles en anglès
SSB	Trencament de cadena senzilla, de les sigles en anglès
ssDNA	DNA de cadena senzilla, de les sigles en anglès
SUMO	Small ubiquitin-like modifiers
Suv39h1	Suppressor of variegation 3-9 homolog1
Suv420h1	Suppressor of variegation 4-20 homolog 1

ABREVIATURES

Suv420h2	Supressor of variegation 4-20 homolog 2
SWI/SNF	Switch/sucrose nonfermenting
TIP60	HIV Tat interacting prtoein of 60 KDa
Ub	Ubiquitina
UV	Ultravioleta
TAF1	Factor d'iniciador de la transcripció 1, de les sigles en anglès
TFTC	TBP-free TAF-containing complex
TIP60	HIV Tat interacting protein of 60 KDa
TM	Tamoxifè
TopBP1	Topoisomerasa II Beta
TRE	Element de resposta a Trithorax
TSA	Trichostatin A
TSS	Lloc d'inici de la transcripció, de les sigles en anglès
WB	Western blot
WT	Wild type
XPA	Xeroderma pigmentosum A
XPC	Xeroderma pigmentosum C

Apolars			Polars sense càrrega			Polars càrrega -			Polars càrrega +		
Alanina	Ala	A	Glicina	Gly	G	Aspartat	Asp	D	Lisina	Lys	K
Valina	Val	V	Serina	Ser	S	Glutamat	Glu	E	Arginina	Arg	R
Leucina	Leu	L	Treonina	Thr	T				Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I	Cisteïna	Cys	C						
Prolina	Pro	P	Tirosina	Tyr	Y						
Metionina	Met	M	Glutamina	Gln	Q						
Fenilalanina	Phe	F									
Triptofan	Trp	W									

INTRODUCCIÓ

1. Estructura de la cromatina

El DNA és la macromolècula primària que emmagatzema la informació genètica i la propaga de cèl·lula mare a filla, i a la següent generació a través de la línia germinal. A les cèl·lules eucariotes, la doble hèlix de DNA es troba acomplexada amb proteïnes històniques i no històniques, formant la cromatina. La unitat bàsica i repetitiva de la cromatina és el nucleosoma, constituït per el nucleosoma central, la histona H1 i el DNA connector. El nucleosoma central consisteix en 146 parells de bases (pb) de DNA envoltant un octàmer d'histones, format per un tetràmer d'H3-H4 i dos dímers d'H2A-H2B (Kornberg & Lorch, 1999; Luge et al., 1997; Thomas & Kornberg, 1975).

La cromatina és una molècula dinàmica, jeràrquicament organitzada dins del nucli cel·lular. La forma més laxa i accessible de cromatina que es coneix són els nucleosomes en cadena o *beads-on-a-string*, descrita per primera vegada al 1976 gràcies a les observacions en microscopi electrònic d'alta resolució (Olins et al., 1976). En aquesta forma descondensada, els nucleosomes es troben units de mitjana per 20 pb de DNA connector per formar la fibra de cromatina d'11 nm. Ara bé, per tal de que tot el DNA contingut en una cèl·lula càpiga dins del nucli, calen ordres més alts d'organització.

El següent esglaó en la compactació de la cromatina és la fibra de 30nm, anomenada així per primera vegada l'any 1976 per Finch i Klug (Finch & Klug, 1976). Hi ha controvèrsia sobre com els nucleosomes de la fibra de cromatina interaccionen entre sí per formar la citada estructura de 30nm i si realment, aquesta estructura existeix *in vivo*. Per una banda, les observacions en microscopi electrònic de cromatina nativa aïllada de nuclis mostren l'existència de dues possibles estructures de fibra de 30 nm (Finch & Klug, 1976; Gerchman & Ramakrishnan, 1987; Langmore & Paulson, 1983; Robinson et al., 2006; Woodcock et al., 1984). En primer lloc, el *solenoid* consisteix en una hèlix amb un únic començament on els nucleosomes s'enrotllen linealment al voltant d'un eix central per mitjà del plegament del DNA connector (Finch & Klug, 1976). En segon lloc, el

model *zig-zag* és una hèlix amb dos començaments on els nucleosomes s'apilen de manera alterna mitjançant el DNA connector (Woodcock et al., 1984; Woodcock et al., 1993). En ambdós casos, s'estableixen interaccions intra-fibra que permeten el plegament de la cromatina i es creu que la histona H1 juga un paper fonamental en la formació d'aquestes estructures (Robinson et al., 2008). Cal remarcar que totes aquestes observacions estan fetes en condicions *in vitro*, en les que la concentració de sal no és la fisiològica, i aquest fet podria afectar la manera en que els nucleosomes interaccionen entre sí i amb el DNA. Per una altra banda, al 1988, Dubochet i col·laboradors observen per mitjà de Cryo-EM (tècnica de visualització per microscopi electrònic amb mostres congelades que permet l'observació *in vivo* sense la necessitat de fixar ni marcar el material de treball) que la cromatina compactada en cromosomes metafàsics no presenta cap tipus d'organització més enllà de la fibra d'11 nm. Estudis més recents defensant aquesta teoria proposen l'anomenat *polymer melt model*, en el qual la cromatina, tant la interfàsica com la mitòtica estaria dins del nucli empaquetada desorganitzadament i només existiria la forma de 30 nm en els casos on la concentració de nucleosomes fos baixa (Fig. 1). En aquest model, les interaccions de nucleosomes inter-fibra guanyarien força, desplaçant les interaccions intra-fibra establertes per formar la fibra de 30nm (Dubochet et al., 1988; Eltsov et al., 2008; Maeshima et al., 2014).

En el següent nivell jeràrquic, la cromatina s'organitza en dominis de 300-700 nm, possiblement a través de l'ancoratge de la fibra de cromatina a la perifèria del nucli o a altres proteïnes nuclears que serveixen de plataforma (Kind et al., 2015). Finalment, l'estructura de cromatina més condensada s'observa en els cromosomes metafàsics, on s'aconsegueix compactar el DNA fins a 10.000 vegades.

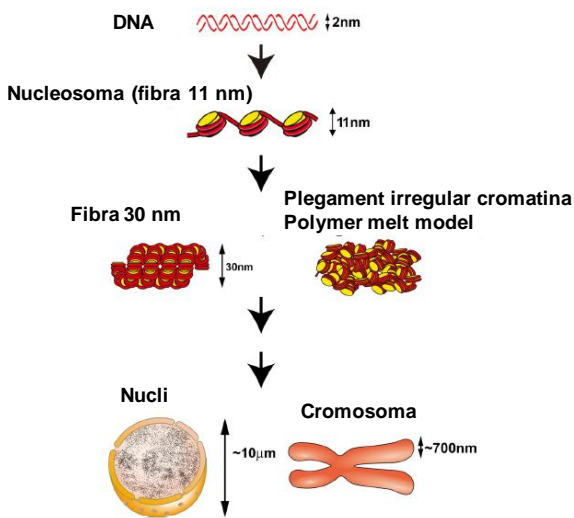
A més de la classificació jeràrquica, històricament, la cromatina ha estat dividida en eucromàtica o heterocromàtica basant-se en el marcatge amb tincions per visualitzar el DNA (Heitz, 1928). L'eucromatina comprèn zones de cromatina descondensada, accessible i en la seva major part,

INTRODUCCIÓ

transcripcionalment actives. L'heterocromatina, en canvi, està altament compactada i silenciada. Les regions heterocromàtiques són riques en seqüències repetitives, com les presents en telòmers i centròmers, i pobres en gens. Així doncs, l'heterocromatina té un paper fonamental en la protecció dels caps dels cromosomes i en la segregació de les cromàtides durant la mitosi.

dins del nucli interfàsic en diferents dominis, anomenats dominis topològics. Aquesta organització espacial sembla ser un tret general de tot el genoma i s'ajustaria a la funció de cada regió de cromatina. Les regions flanquejants d'aquests dominis estan ben definides per factors que controlen la difusió de l'heterocromatina com CTCF (factor d'unió a aïllant), gens d'expressió constitutiva (*housekeeping*) o elements retrotransposables SINE (Dixon et al., 2012).

A



B

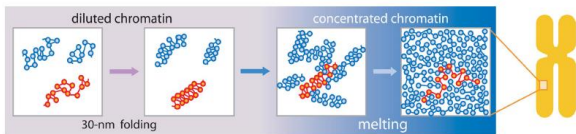


Figura 1. Visió convencional i moderna dels nivells d'estructuració de la cromatina. A, La molècula de DNA s'enrotlla al voltant dels nucleosomes per formar la fibra d'11nm. En el model convencional el següent grau de compactació és la fibra de 30 nm, representada aquí en la forma de solenoid per, progressivament, compactar-se fins a cromosoma metafàsic. B, esquema del model del *polymer melt*, on la cromatina, a altes concentracions de nucleosomes, es trobaria desorganitzada, donant-se lloc interaccions inter-fibra i permeten la màxima condensació cromosòmica.

Alhora, l'heterocromatina es divideix en regions d'heterocromatina constitutiva, o permanentment silenciada, i en zones d'heterocromatina facultativa, en la que alguns gens es poden activar en algun determinat tipus cel·lular o estadi del desenvolupament (Allis et al., 2015; Kouzarides, 2007).

A part de les classificacions esmentades, recents estudis proposen que la cromatina està organitzada

2. Dinàmica de la cromatina

La regulació de l'estructura de la cromatina és un procés finament modulad al llarg del cicle cel·lular, que copren diferents mecanismes epigenètics que poden propagar-se al llarg de les divisions cel·lulars i a través de la línia germinal (Holliday, 2006). Aquests mecanismes consisteixen en la modificació postraduccional (PTM) de les histones, el desplaçament i modificació de l'estructura dels nucleosomes per remodeladors de la cromatina dependents d'ATP, el recanvi dinàmic de les variants d'histones als nucleosomes, el paper senyalador dels RNAs no codificants (ncRNAs) i la metilació del DNA en els residus de citosina (Allis et al., 2015). Tots ells es coordinen per assegurar la correcta organització de la cromatina en cada moment del cicle cel·lular i per preservar la integritat genòmica (Fig. 2).

2.1. Modificacions postraduccional de les histones

Les histones del nucleosoma central són proteïnes petites i bàsiques, compostes per un domini globular i un extrem N-terminal desestructurat, o cua d'histona, que sobresurt de la superfície del nucleosoma i que interaccionen tant amb proteïnes com amb el DNA. Les cues d'histona participen en les interaccions intra- i inter-nucleosoma per formar la fibra de 30 nm. Aquestes interaccions no només es

INTRODUCCIÓ

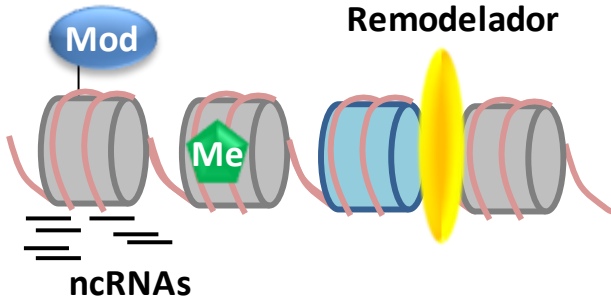


Figura 2. Epigenètica. Les variacions a l'estructura de la cromatina modulen l'ús del genoma per mitjà de: PTM de les histones (Mod), remodeladors de la cromatina, variants d'histones (nucleosoma blau), metilació del DNA (Me) i RNAs no codificants (ncRNAs). Modificat d'Epigenetics, 2015 (Allis et al., 2015).

donen en *cis*, sinó que també hi ha evidències de que succeeixen en *trans*, és a dir, entre diferents fibres de cromatina, fet que afavoreix la formació de nivells més alts de compactació (Dorigo et al., 2003; Shogren-Knaak et al., 2006; Zheng et al., 2005). Les cues d'histona i, en menor mesura els dominis globulars, contenen molts residus potencialment modificables, com ja va descriure per primera vegada als anys 60 Vincent Allfrey (Allfrey et al., 1964). Les modificacions de les cues d'histones en varien la càrrega i proporcionen una superfície de

reconeixement per a factors reguladors de la cromatina (*readers*), jugant un paper essencial en la transcripció, replicació i reparació del DNA i en la compactació de la cromatina.

Hi ha com a mínim 8 tipus de modificacions postraduccionals descrites fins al moment: Acetilació, metilació, fosforilació, ubiquitinació, sumoilació, ADP-ribosilació, citrulinació i isomerització de prolina (Fig. 3, Taula 1) (Huang et al., 2014; Kouzarides, 2007).

Els enzims implicats en la deposició i l'eliminació d'aquestes marques són coneguts com a *writers* i *erasers* respectivament. Aquests enzims normalment formen part de complexos amb varies subunitats i catalitzen la incorporació o l'eliminació d'un tipus de modificació específica de les histones i també de proteïnes no històniques. Aquestes activitats antagoniques governen l'equilibri de cada modificació en qüestió. Entre els *writers* es troben les acetiltransferases (HATs), metiltransferases (HMTs), quinases i lligases d'ubiquitina. En el grup d'enzims que eliminen les modificacions s'inclouen les desacetilases (HDACs), desmetilases (HDMs), fosfatases i desubiquitinases (Bannister & Kouzarides, 2011).



Figura 3. Llocs de modificació de les histones. Es mostra la seqüència detallada de la cua de les histones del nucleosoma central i els residus modificats. Estan representades algunes modificacions del domini globular de cada histona. aa, aminoàcids. Adaptat de Huang et al., 2014 (Huang et al., 2014)

INTRODUCCIÓ

Els *readers*, anomenats així perquè són els que llegeixen o interpreten les modificacions postraduccionals de les histones, són reclutats a la cromatina per fer la seva funció mitjançant dominis de reconeixement. Els més rellevants són els dominis Bromo, Chromo (*Chromosome organization modifier*), dit de PHD (*Plant homeodomain*) i els dominis Tudor (Fig. 4).

Modificacions històniques	Residus modificats	Funcions regulades
Acetilació	K-ac	Transcripció, Reparació, Replicació, Condensació
Metilació (lisines)	K-me1 K-me2 K-me3	Transcripció, Reparació
Metilació (arginines)	R-me1 R-me2a R-me2s	Transcripció
Fosforilació	S-ph T-ph	Transcripció, Reparació, Condensació
Ubiquitinació	K-ub	Transcripció, Reparació
Sumoilació	K-su	Transcripció
ADP-ribosilació	E-ar	Transcripció

Taula 1. Classes de modificacions postraduccionals presents en histones. Modificat de Kouzarides, 2007 (Kouzarides, 2007).

Els dominis Bromo són mòduls d'uns 110 aminoàcids presents en moltes proteïnes associades a la cromatina i són els únics que selectivament reconeixen lisines acetilades, tot i que últimament s'ha descrit que els dits de PHD també poden reconèixer algunes histones acetilades (Bannister & Kouzarides, 2011; Dhalluin et al., 1999; Jeanmougin et al., 1997). Els dominis Bromo es troben sovint a HATs i complexos remodeladors de la cromatina.

El reconeixement de la metilació de les histones és més complex, fet que no sorprèn si es té en compte que tant arginines com lisines poden ser metilades i que ho poden estar en diferents graus. Les lisines poden estar, mono- di- o trimetilades, mentre que les arginines només poden ser mono- o dimetilades. Així doncs, diferents dominis poden reconèixer les metil-lisines, incloent els dominis Chromo, MBT, PHD, Tudor, WD40 i les repeticions d'anquirina (Brent & Marmorstein, 2008; Fischle et al., 2003; Jacobs et al., 2001; Musselman & Kutateladze, 2009; Schindler et al., 1993). Els dominis Chromo són regions peptídiques conservades de 40-50 aminoàcids, que a

través d'un solc format per tres aminoàcids aromàtics reconeixen metil-lisines específiques en base a la seqüència contigua a l'aminoàcid modificat (Fischle et al., 2003). A més, els dominis Chromo també poden unir-se a seqüències de DNA i RNA (Akhtar et al., 2000; Bouazoune et al., 2002). Entre d'altres, presenten aquest domini, la família de metiltransferases d'histones, la família HP1 (*Heterochromatin protein 1*), la família de Polycomb, les acetiltransferases d'histones, la família d'homòlegs de MSL3 i la família SWI3 (Tajul-Arifin et al., 2003). Igualment, els dominis MBT (*malignant brain tumor*) són mòduls de reconeixement de metil-lisines i es troben en proteïnes d'unió a la cromatina relacionades amb repressió de la transcripció (Wang et al., 2003). La gran família de dits de PHD (*plant homeodomain*) es pot dividir en diferents subgrups segons la PTM que reconeixen. Els dos grups més rellevants són el que comprenen els mòduls PHD capaços d'unir-se a la histona H3 trimetilada a la Lys4 (H3K4me3) i a la cua no modificada de la histona H3 (unH3) (Musselman & Kutateladze, 2009). Per una altra banda, les arginines metilades són reconegudes per dominis Tudor, així com per mòduls PHD (Jin et al., 2009; Musselman & Kutateladze, 2009). Els dominis Tudor contenen aproximadament 60 aminoàcids que reconeix selectivament lisines o arginines metilades. Hi ha quatre grups de dominis Tudor, però el més representatiu és el que presenta la família de desmetilases d'histona JMJD (Jin et al., 2009).

Els dominis SANT van ser originalment descrits l'any 1996 per Aasland i col·laboradors com a dominis d'intracció proteïna-proteïna o proteïna-DNA. El nom prové de les inicials dels complexos on va ser observat per primera vegada (SWI3, ADA2, N-CoR i TFIIB B"). S'ha vist que aquests dominis s'uneixen a les cues d'histona no modificada i estan presents a nombrosos enzims modificadors d'histones i a remodeladors de la cromatina (Aasland et al., 1996; De La Cruz et al., 2005).

Aquests dominis de reconeixement poden trobar-se junts en una mateixa proteïna o aïllats. El més important és que seran capaços d'unir-se al seu

INTRODUCCIÓ

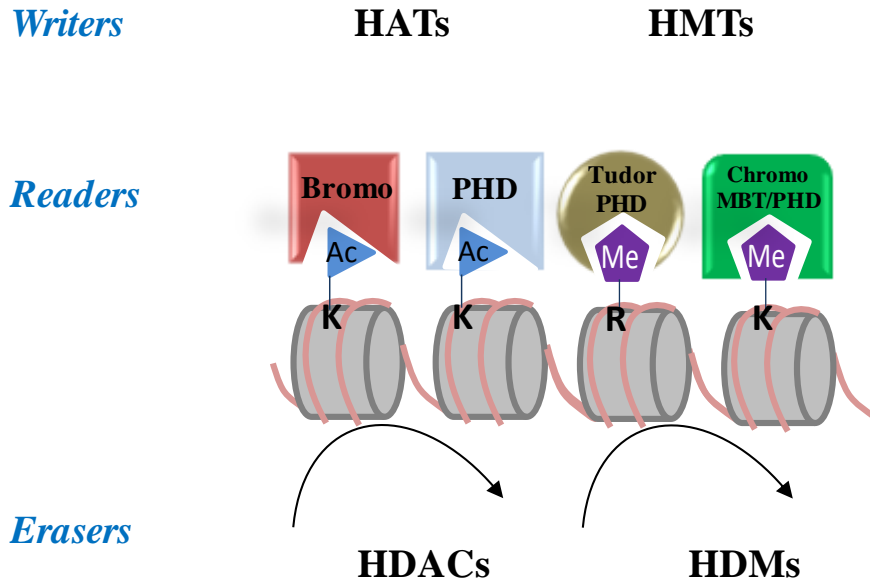


Figura 4. Enzims modificadors d'histones i dominis de reconeixement. Les modificacions postraduccionals de les histones són dutes a terme pels *writers* i eliminades pels *erasers*. Els *readers* contenen dominis de reconeixement de les PTM de les histones a través dels quals s'uneixen al substrat específic i duen a terme la seva funció. HAT, histone acetyltransferase; HMT, histone methyltransferase; HDAC, histone deacetylase; HDM, histone demethylase; Ac, acetilació; Me, metilació; K, lisina; R, arginina. Adaptat de Epigenetics, 2015 (Allis et al., 2015).

substrat dependent de si està o no modificat. L'any 2001 Jenuwein i Allis van proposar la teoria del codi histònic (Jenuwein & Allis, 2001), segons la qual, les modificacions de les histones poden tenir un efecte sinèrgic o antagònic en el reclutament dels factors que modulen la cromatina. Per tant, els factors que reconeixen la cromatina i en regulen la seva conformació i funció estan subjectes a múltiples nivells de regulació que no només concerneixen la modificació específica que reconeixen.

2.1.1. Acetilació

Gràcies als descobriments dels Premis Nobel Lipmann, Bloch i Lynen, que demostraven que l'Acetil-CoA era la molècula precursora de les reaccions d'acetilació, ha sigut possible tot el coneixement actual sobre proteïnes acetilades (Lipmann, 1947; Lipmann & Kaplan, 1946). L'acetilació de proteïnes consisteix en la transferència d'un grup acetat al grup ϵ -amino d'un residu de Lys (Vidali et al., 1968).

L'acetilació de proteïnes, no només d'histones, s'ha establert com una importantíssima modificació postraducciona que regula la funció de milers de

proteïnes i processos, tals com el cicle cel·lular, la remodelació de la cromatina, el metabolisme mitocondrial o la polimerització de l'actina (Kim et al., 2006; Schwer et al., 2006). Des de que Vincent Allfrey va descobrir la primera acetilació fa 50 anys, i va proposar que les modificacions de les histones, incloent també la metilació, controlaven l'expressió gènica regulant l'accés al DNA, han hagut nombrosos estudis en aquest camp intentant explicar com es duu a terme aquest fenomen (Allfrey et al., 1964).

Actualment el coneixement és suficient per afirmar que l'acetilació de les histones regula l'estructura de la cromatina i activa l'expressió gènica de dues maneres diferents però coordinades. Primerament, el canvi de càrrega que proporciona el grup acetat a la cadena lateral de la lisina acetilada genera una repulsió de càrregues entre nucleosomes adjacents i dins del propi nucleosoma (Shogren-Knaak et al., 2006). En un estudi fet per Görisch i col·laboradors, basant-se en la distribució de dextrans de diferents mides a la cromatina, mostren com després d'induir un estat d'hiperacetilació cel·lular, augmenta l'accessibilitat de dextrans de mida més gran a la cromatina, indicant que la cromatina d'aquestes regions es troba més descondensada, estat que es

INTRODUCCIÓ

reverteix quan es restauren els nivells d'acetilació (Görisch et al., 2005). A més, les regions promotores de gens transcripcionalment actius presenten alts nivells d'acetilació d'H3K9, H3K14 i H4K16 i la densitat de nucleosomes en tota la regió gènica, i en particular als promotors d'aquests gens, és menor que a les regions intergèniques (Pokholok et al., 2005). Segon, però no menys important, la lisina acetilada és reconeguda per proteïnes amb dominis bromo. Degut a la variabilitat d'aquests dominis es genera un reconeixement específic entre la modificació en concret i la proteïna reclutada. Per exemple, el domini bromo contingut en el complex remodelador de la cromatina SWI/SNF conté el domini bromo Swi2/Snf2 que s'uneix específicament a H3K9Ac, H3K14Ac i a la histona H4 acetilada en cada un dels 4 residus de Lys de la seva cua, en canvi el domini bromo Spt7 de l'acetiltransferasa SAGA només s'uneix a H3K9Ac. Aquestes proteïnes actuen corrent avall modulant l'estructura de la cromatina i l'expressió gènica (Dhalluin et al., 1999; Hassan et al., 2007).

L'acetilació d'H3 i H4 té patrons diferents. Mentre que l'acetilació d'H4 és depenent del cicle cel·lular, presentant el seu màxim durant fase S, coincidint amb la replicació del DNA, l'acetilació d'H3 és totalment independent i els seus nivells són estables al llarg del cicle (Jasencakova et al., 2000).

L'equilibri entre la forma acetilada i desacetilada de les histones està controlat per les activitats enzimàtiques de HATs i HDACs. De manera general, les HATs catalitzen la incorporació d'un grup acetat al residu de lisina del seu substrat, fent servir una molècula d'Acetil-CoA com a co-substrat de la reacció. Així doncs, promovent l'obertura de la cromatina i afavorint l'expressió gènica. Per una altra banda, les HDACs eliminen aquest grup acetil conduint a un estat de cromatina més condensat i transcripcionalment inactiu. Tant HATs com HDACs acostumen a desenvolupar la seva funció en formacions de complexes multiproteics.

2.1.1.1. H4K16Ac

Entre les quatre lisines (K5, K8, K12, K16) potencialment acetilables de la histona H4,

H4K16Ac juga un paper clau en la regulació de l'estructura de la cromatina i les seves funcions. El principal enzim encarregat de l'acetilació d'H4K16 és l'acetiltransferasa MOF (*Males absent On the First*), mentre que l'eliminació d'H4K16Ac es duu a terme per diferents enzims (Akhtar & Becker, 2000; Hilfiker et al., 1997; Smith et al., 2000; Taipale et al., 2005). Les HDACs que desacetilen majoritàriament H4K16Ac són SirT1 i SirT2. SirT1 ho fa durant tot el cicle cel·lular en regions específiques i dirigides del genoma, mentre que SirT2 és el responsable de la desacetilació global de K16Ac durant la transició G2/M (Imai et al., 2000; Vaquero et al., 2004, 2006). De manera més localitzada i puntual, HDAC 1 i 2 desacetilen H4K16Ac en els llocs de dany al DNA promovent la reparació per NHEJ (*Nonhomologous end-joining*) i HDAC3 desacetila K16Ac a *Drosophila*, fet que té un efecte sobre el creixement de l'insecte (Lv et al., 2012; Miller et al., 2010).

H4K16 és el residu més freqüentment acetilat en eucariotes i mentre la seva forma acetilada és una marca d'eucromatina transcripcionalment activa, la seva variant desacetilada promou el silenciament gènica i la formació d'heterocromatina des de llevats fins a humans (Carmen et al., 2002; Imai et al., 2000; Jeppesen & Turner, 1993; Kimura et al., 2002; Millar & Grunstein, 2006; Suka et al., 2002; Vaquero et al., 2004). Les funcions atribuïdes a la cua d'H4 acetilada es donen, primerament, d'una manera inespecífica, degut a la neutralització de la càrrega de les quatre lisines pels grups acetil i en segon lloc, mitjançant les funcions específiques de K16Ac que tenen relació amb el reconeixement d'aquesta marca per altres factors (Vaquero et al., 2007).

En estudis *in vitro* en els que s'utilitzen *arrays* de nucleosomes homogèniament modificats a la Lys 16 de la histona H4, es demostra que la cua d'aquesta histona és necessària per a que es formin les interaccions intra-fibra i per tant l'estructura de 30 nm. L'acetilació d'H4K16 impedeix que aquestes interaccions tinguin lloc, inhibint la formació de la fibra de 30 nm i també les interaccions inter-fibra i per tant impedit nivells més alts de compactació (Allahverdi et al., 2011; Robinson et al., 2008; Shogren-Knaak et al., 2006; Tse et al., 1998). No obstant, hi ha controvèrsia sobre la relació entre

INTRODUCCIÓ

H4K16Ac i la compactació de la cromatina *in vivo*. Per una banda, diferents treballs en *Drosophila*, demostren el lligam entre l'acetilació de K16 i la descompactació del cromosoma X dels mascles, però per una altra banda, en un estudi recent en ESCs (cèl·lules mare embrionàries, de les sigles en anglès) de ratolí, s'ha vist que la pèrdua d'H4K16Ac no correspon amb una major compactació de la cromatina (Akhtar & Becker, 2000; Lavender et al., 1994; Taylor et al., 2013; Turner et al., 1992).

Durant el cicle cel·lular, la lisina 16 és la primera de les quatre lisines d'H4 en acetilar-se, seguida per K12 i K8/K5 (Turner et al., 1998). Els nivells d'H4K16Ac presenten un pic durant la fase S i decreixen dramàticament durant la transició G2/M, promovent la compactació de la cromatina fins a cromosoma metafàsic (Rice et al., 2002; Serrano et al., 2013; Vaquero et al., 2006).

L'acetilació d'H4K16 està estretament lligada a l'activació de la transcripció. H4K16Ac als nucleosomes de regions promotores permet l'ancoratge dels complexos remodeladors en aquestes zones, desestabilitza l'estructura dels propis nucleosomes i conseqüentment porta a la disminució de nucleosomes en aquestes regions, facilitant la unió de la RNA Pol II (Polimerasa II) (Boeger et al., 2003; Hassan et al., 2001; Schones et al., 2008). Coincidint amb això, H4K16Ac s'ha trobat enriquida en zones promotores properes al TSS (llocs d'iniciació de la transcripció, de les sigles en anglès) en ESCs de ratolí (Li et al., 2012). També té un paper important en elongació, ja que recluta proteïnes com el factor d'elongació p-TEFb. Se la relaciona amb el manteniment de la pluripotència cel·lular, ja que la presència d'H4K16Ac a les regions gèniques de Nanog i Oct4 és fonamental per a la expressió d'aquests factors de transcripció característics i indispensables en cèl·lules mare (Akhtar & Becker, 2000; Li et al., 2012; Taylor et al., 2013; Zippo et al., 2009). En cèl·lules de ronyó embrionàries humanes (HEK293), H4K16Ac està enriquit a les zones terminals dels cromosomes i és pràcticament inexistent a les regions centromèriques. Més concretament, el 82% d'aquesta marca es troba dins de gens: 45% dins d'introns, 10% en llocs al voltant dels TSS, 10% al voltant dels TES i només el 5% en

regions exòniques. A les regions intergèniques només hi ha el 18% de l'acetilació de K16. No obstant, la regulació de la transcripció per part d'H4K16Ac no és igual en tots els organismes i tipus cel·lulars. Tot i això, està clara la contribució d'H4K16Ac en l'expressió de gens relacionats amb la progressió del cicle cel·lular, proliferació i apoptosi (Horikoshi et al., 2013).

H4K16Ac desenvolupa dues funcions claus en la reparació del dany al DNA. En primer lloc, els nivells inicials d'H4K16Ac són necessaris per a senyalitzar els llocs de dany. En segon lloc, els canvis que K16Ac produeix a la cromatina permeten l'accés de la maquinària de reparació (Hunt et al., 2013; Sharma et al., 2010). Defectes en l'acetilació de K16 produeixen inestabilitat genòmica i retràs en la progressió del cicle cel·lular a través de G2/M com a conseqüència del dany acumulat (Megee et al., 1990; Megee et al., 1995).

L'acetilació de K16 també coordina la recombinació associada a la transcripció de les regions de rDNA (DNA ribosòmic) (Cesarini et al., 2012).

Finalment, la Lys 16 està implicada en diferents fenòmens epigenètics. A *Drosophila*, controla la compensació gènica entre gèneres, mantenint el cromosoma X dels mascles d'aquesta espècie descondensat i duplicant la taxa de transcripció dels gens continguts en ell (Akhtar & Becker, 2000; Lavender et al., 1994; Turner et al., 1992). Contràriament, el cromosoma X de les femelles de mamífer està hipoacetilat en la Lys 16, promovent la formació d'heterocromatina i el silenciament gènic (Jeppesen & Turner, 1993).

2.1.2. Metilació

La metilació de les histones es produeix en tots els residus bàsics: lisina, arginina i histidina, tot i que aquest últim ha estat poc caracteritzat. Les lisines poden ser mono- (me1), di- (me2) o tri- (me3) metilades en el seu grup ϵ -amino i les arginines poden ser monometilades (me1) o dimetilades, simètricament (me2s) o asimètricament (me2a) en el seu grup guanidinil (Borun et al., 1972; Byvoet et al., 1972; Haempel et al., 1968; Murray, 1964; Paik &

INTRODUCCIÓ

Kim, 1971). Els llocs de metilació d'histones més estudiats inclouen H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 i H4K20. En el cas de residus d'arginina, els més coneguts són H3R2, H3R8, H3R17, H3R26 i H4R3 (Greer & Shi, 2012).

A diferència de l'acetilació, la metilació d'histones és una marca químicament més estable. Tot i així, l'equilibri entre els diferents nivells de metilació i la forma desmetilada està finament controlat per les activitats HMTs i HDMs (Byvoet et al., 1972; Greer & Shi, 2012). A la taula 2, es detallen les histones metilades als diferents residus i els enzims responsables de cada modificació. S'han observat diferents taxes d'intercanvi d'aquestes marques segons el procés en el que estan implicades. Per exemple, en el cas del manteniment d'un estat de cromatina compactada durant la segregació mitòtica hi ha una taxa d'intercanvi baix, essent la modificació estable a la cromatina, en canvi, en processos que tenen a veure amb una resposta a estímul, la taxa d'intercanvi és més alta, permetent una regulació ràpida i fina de l'estat de la cromatina segons les necessitats (Zee et al., 2010).

La regulació de la metilació d'histones té efectes en diferents processos biològics, com la regulació del cicle cel·lular, reparació de dany al DNA, resposta a l'estrès, desenvolupament i diferenciació.

Les metiltransferases transfereixen el grup metil de la molècula donadora S-adenosilmetionina (SAM) a la lisina o arginina de la histona en qüestió (Murray, 1964). Es classifiquen en tres famílies: La família de proteïnes que contenen el domini SET (Rea et al., 2000) i la família de proteïnes DOT1-like (Feng et al., 2002), que metilen residus de lisina, i la família d'N-metiltransferases d'arginines (PRMTs) (Bannister & Kouzarides, 2011). Les desmetilases d'histones es classifiquen en dues famílies, les oxidases d'amina (Shi et al., 2004) i les dioxigenases dependents de ferro que contenen un domini JumonjiC (Tsukada et al., 2006).

El reclutament d'aquests enzims a zones específiques de la cromatina es dona mitjançant varis mecanismes

independents o coordinats. Poden ser dirigits a elements de reconeixement del DNA, mitjançant la unió a factors de transcripció. Per exemple, les proteïnes del grup *Trithorax*, que són metiltransferases d'H3K4 a *Drosophila*, són conduïdes a regions específiques del genoma a través dels elements de resposta TREs (*Trithorax Response Elements*) i el grup de proteïnes *Polycomb* (PcG), responsables de la trimetilació d'H3K27, és dirigit a elements de resposta PREs (*Polycomb Response Elements*) (Chan et al., 1994; Tillib, 1999). Els lncRNAs (*long non-coding RNAs*) i els sncRNA (*small non-coding RNAs*) semblen tenir un paper direccional, unint-se a metiltransferases i desmetilases, conduint-les a regions genòmiques específiques (Noma et al., 2004; Tsai, 2010; Verdel et al., 2004). La metilació del DNA també resulta una superfície de reconeixement per aquests enzims, així com les diferents PTMs de les histones. D'aquesta manera, s'estableix un entramat entre les diferents marques epigenètiques, la seva regulació i funció.

És important remarcar que la metilació de les histones no acostuma a ser un fet aïllat, varis residus de la mateixa cua d'histona poden estar modificats alhora i la metilació d'un pot requerir la metilació d'un altre, però també es pot donar un efecte antagònic. Per exemple, la trimetilació d'H3K4 inhibeix la metilació d'H3R2 i el mateix passa a la inversa, H3R2me2a impedeix la metilació d'H3K4 (Kirmizis, 2007). Per una altra banda, el reconeixement de residus metilats per proteïnes amb dominis específics es pot veure compromès o afavorit per la presència d'un altre residu metilat.

Diferents marques de metilació estan associades a la formació de l'heterocromatina. Aquest és el cas d'H3K9me3, H4K20me3 i H3K27me3. Concretament, H3K9 és trimetilada per Suv39h1 (*supressor of variegation 3-9 homolog 1*) i serveix de superfície d'unió a HP1. Alhora, HP1 recluta Suv39h1, promovent la trimetilació de K9 i la formació d'heterocromatina (Lachner et al., 2001). En estudis recents, s'ha suggerit que H3K27me3 també participaria en el reclutament d'HP1 (Boros et al., 2014). H4K20me3 és dipositada per Suv420h2

INTRODUCCIÓ

Histona i residu	Metiltransferases			Desmetilases		
	me1	me2	me3	me1	me2	me3
H3R2	CARM1; PRMT6; PRMT5; PRMT7	CARM1(a); PRMT6(a); PRMT5(s); PRMT7(s)				
H3K4	SETD1A;SETD1B; ASH1L; MLL; MLL2; MLL3; MLL4; SETD7	SETD1A;SETD1B; MLL; MLL2; MLL3; MLL4; SMYD3	SETD1A;SETD1B; ASH1L; MLL; MLL2; MLL3; MLL4; SMYD3; PRMD9	KDM1A; KDM1B; KDM5B; NO66	KDM1A; KDM1B; KDM5A; KDM5B; KDM5C; KDM5D; NO66	KDM2B; KDM5A; KDM5B; KDM5C; KDM5D; NO66
H3R8	PMRT5	PMRT5(s)				
H3K9	SETDB1; G9a; EHMT1; PRDM2	SUV39H1; SUV39H2; SETDB1; G9a; EHMT1; PRDM2	SUV39H1; SUV39H2; SETDB1; PRDM2	KDM3A; KDM3B; PHF8; JHDM1D	KDM3A; KDM3B; KDM4A; KDM4B; KDM4C; KDM4D; PHF8; KDM1A; JHDM1D	KDM3B; KDM4A; KDM4B; KDM4C; KDM4D
H3R17	CARM1	CARM1(a)				
H3R26	CARM1	CARM1(a)				
H3K27		EZH2; EZH1	EZH2; EZH1	JHDM1D	KDM6A; KDM6B; JHDM1D	KDM6A; KDM6B
H3K36	SETD2; NSD3; NSD2; NSD1	NSD3; NSD2; NSD1; SMYD2; SETD2	SETD2	KDM2A; KDM2B	KDM2A; NO66; KDM2B; KDM4A; KDM4B; KDM4C	NO66; KDM4A; KDM4B; KDM4C
H3K79	DOT1L	DOT1L	DOT1L			
H4R3	PRMT1; PMRT6; PRMT5; PRMT7	PRMT1(a); PMRT6(a); PRMT5(s); PRMT7(s)				
H4K20	PR-SET7	SUV420H1 SUV420H2; MMSET	SUV420H1 SUV420H2	PHF8		

Taula 2. Metiltransferases i desmetilases d'histones (*homo sapiens*). Les metiltransferases i desmetilases d'histones estan indicades en columnes segons el grau de metilació (monometilació (me1); dimetilació (me2); trimetilació (me3)). Algunes metiltransferases dimetilen asimètricament o simètricament. ASH1, *absent, small or homeotic discs 1*; ASH1L, *ASH1-like protein*; CARM1, també coneguda com PRMT4; DOT1L, *DOT1-like protein* (també coneguda com GPP a *D. melanogaster*); EZH, *Enhancer of Zeste*; G9a, també coneguda com EHMT2; MES-2, *maternal effect sterile 2*; MLL, *mixed lineage in leukemia*; SUV39, *suppressor of variegation 3-9*; KDM1A, *lysine-specific demethylase 1A* (també coneguda com LSD1); JHDM1D, *JmjC-domain-containing histone demethylation protein 1D*. Modificat de Greer et al. 2012 (Greer & Shi, 2012).

(*supressor of variegation 4-20 homolog 2*) en regions d'heterocromatina pericentromèrica i se la relaciona amb la unió dels complexos de cohesina durant la mitosi, essencials per a la correcta segregació dels cromosomes (Hahn et al., 2013).

La metilació té un paper important en la regulació de la transcripció. Per exemple, H3K9me1/2 estan restringides a zones d'eucromatina i s'associen a silenciament gènic. H3K9me3 també s'ha trobat a eucromatina, regulant tant l'activació com la repressió de l'expressió. H3K27me3 promou el silenciament gènic mitjançant la ubiquitinació d'H2A. H3K27me3 junt amb H4K20me1 participen en la inactivació del cromosoma X a les femelles dels mamífers (Kohlmaier et al., 2004). Per una altra banda, la metilació d'H3K4, K36 i K79 és important

per a l'activació de la transcripció. (Martin & Zhang, 2005).

2.1.2.1. H4K20me

Durant la última dècada, els estudis fets sobre la metilació d'H4K20, han confirmat la importància d'aquesta marca en processos biològics que assegurin l'estabilitat genòmica i la progressió del cicle cel·lular, com la transcripció, replicació i reparació del DNA i la compactació de la cromatina.

H4K20 pot estar monometilada (me1), dimetilada (me2) o trimetilada (me3). Cada una d'aquestes modificacions s'associa a una localització i funció diferent i està catalitzada per un enzim concret. PR-SET7 és la monometiltransferasa de K20, mentre que

INTRODUCCIÓ

tant Suv420h1 i Suv420h2 poden di- i trimetil·lar K20 *in vitro*, però *in vivo*, Suv420h1 té preferència per la dimetil·lació i Suv420h2 és la responsable de la trimetil·lació d'H4K20. Tot i que cada enzim té una activitat catalítica independent, la di- i trimetil·lació d'H4K20 són dependents d'H4K20me1 (Nishioka et al., 2002; Schotta et al., 2004, 2008).

Com ja s'ha dit anteriorment, la metil·lació és més estable que l'acetil·lació. Actualment no està clar si H4K20me2/3 són activament eliminades. En canvi, H4K20me1 és desmetil·lada per PHF8 (*plant homeo domain*) *finger protein* 8) (Qi et al., 2010). Recentment, s'ha identificat LSD1n, una isoforma d'*splicing* present només a neurones, com a desmetil·lase d'H4K20me1 i reguladora de la transcripció de gens relacionats amb l'aprenentatge i la memòria (Wang et al., 2015).

L'establiment dels diferents estats de metil·lació d'H4K20 no està clarament definit, tot i que els estudis fets fins ara apunten al següent model: Els braços dels cromosomes mitòtics estan enriquits en H4K20me1 i H4K20me2 i les regions pericentromèriques en H4K20me3. Un cop finalitza la mitosi, els nivells d'H4K20me1 decreixen dràsticament, suposadament degut a la conversió a H4K20me2 i me3 per Suv420h1/2, però també a la desmetil·lació per PHF8 i a la degradació de PR-SET7 (Houston et al., 2008; Schotta et al., 2004). A les regions d'heterocromatina, HP1 dirigeix Suv420h2 per a la deposició d'H4K20me3 (Schotta et al., 2004). En el cas de Suv420h1, es desconeix si hi ha algun factor que el guii per dimetil·lar K20 en alguna regió concreta. Durant la fase G1 i S, els nivells d'H4K20me1 es mantenen baixos (Houston et al., 2008), però no desapareixen, de manera que ha d'haver algun factor que protegeixi H4K20me1 de la conversió a H4K20me2 i me3 i de la desmetil·lació. Durant la fase S, es duu a terme la replicació i s'incorporen a la cromatina nous nucleosomes no modificats. Un cop a G2, PR-SET7 recupera els nivells i monometila H4K20 del nucleosomes no modificats. Durant G2/M els nivells de Suv420h no varien, per tant ha d'haver algun mecanisme regulador que protegeixi H4K20me1 (Fig. 5) (Jørgensen et al., 2013; Serrano et al., 2013).

H4K20me2 és la més abundant de les tres metil·laci-

ons i es troba distribuïda per tot el genoma (Pesavento et al., 2008; Schotta et al., 2004, 2008). Fins al moment, se la relaciona amb reparació i replicació del DNA. H4K20me3 es troba enriquida en regions d'heterocromatina pericentromèrica, telòmers, zones d'imprinting i regions repetitives, suggerint un paper en silenciament i integritat genòmica (Jørgensen et al., 2013; Schotta et al., 2004). H4K20me1 es troba en menys abundància distribuïda arreu, regulant la compactació de la cromatina i la replicació, transcripció i reparació del DNA (Fig. 6). (Houston et al., 2008).

H4K20me1 és necessària per a la compactació de la cromatina, tant en interfase com a la mitosi (Centore et al., 2011; Jørgensen et al., 2011). Es creu que aquesta funció la duu a terme per una banda, impedit la deposició d'H4K16Ac i per una altra, servint de plataforma de reconeixement per factors de compactació de la cromatina com L3MBTL1 (Lethal 3 malignant brain tumor 1) en interfase i CAP-D3 i CAP-G2 durant la mitosi. L3MBTL1 conté 3 dominis MBT i reconeix H4K20me1 amb el del mig (Gurvich et al., 2010; Liu et al., 2010; Trojer et al., 2007).

A més, H4K20me1 és important en la repressió de la transcripció. A *Drosophila*, H4K20me1 està enriquida en les zones de cromatina compactada i transcripcionalment inactiva dels cromosomes politènics, tant en regions eucromàtiques com d'heterocromatina constitutiva (Nishioka et al., 2002). En aquest treball, Nishioka i col·laboradors demostren que H4K20me1 i H4K16Ac són incompatibles, la presència d'un impedeix la de l'altre, i proposen que H4K20me1 reprimeix la transcripció mantenint la zona de cromatina lliure d'H4K16Ac. La incompatibilitat entre aquests dos residus va ser posteriorment demostrada en mamífers (Serrano et al., 2013). Es va veure que, durant G2/M, la desacetil·lació d'H4K16Ac era un requisit indispensable per a la monometil·lació d'H4K20 i la subsegüent entrada a mitosi. Addicionalment, a mamífers, també s'ha trobat H4K20me1 sobretot al cos de gens reprimits, indicant la importància d'aquesta marca en el control de la transcripció (Abbas et al., 2010; Congdon et al., 2010).

INTRODUCCIÓ

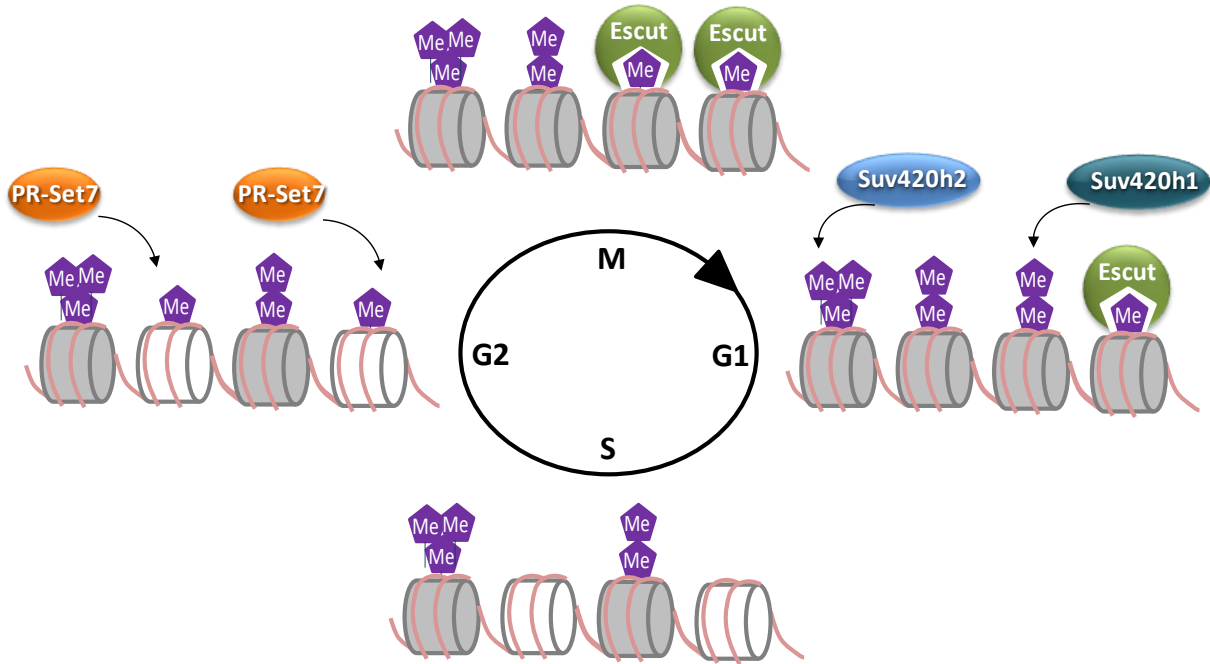


Figura 5. Regulació de la metilació d'H4K20 al llarg del cicle cel·lular. Durant la fase G1 els nivells d'H4K20me3 a l'heterocromatina es mantenen alts i H4K20me2 està distribuïda per tot el genoma, mentre que H4K20me1 està restringida a regions concretes. Quan les cèl·lules entren a la fase S, noves molècules d'H4 que no contenen H4K20 metilat (nucleosomes blancs) són incorporades. Com que els nivells de PR-SET7 es mantenen baixos, molt poca H4K20me1 es diposita durant la fase S. Cap al final de S i principi de G2, PR-SET7 s'estabilitza i comença a monometil·lar H4K20 en les noves molècules d'H4. Els nivells alts d'H4K20me1, probablement estan protegits durant mitosi de la conversió a H4K20me2 o me3 per mitjà d'algun mecanisme encara desconegut. A la sortida de mitosi, la majoria d'H4K20me1 és convertit a H4K20me2 i me3 per les metiltransferases Suv420h1/2. Adaptat de Jørgensen et al., 2013 (Jørgensen et al., 2013).

Tots tres estats de metilació són reguladors positius de la replicació. Són necessaris per al reclutament del pre-Replication Complex (RC) als orígens de replicació i la disrupció d'alguna d'aquestes marques causa retràs en la progressió del cicle cel·lular per la fase S, indicant que hi ha problemes per replicar el DNA (Bartke et al., 2010; Beck et al., 2012; Tardat et al., 2010; Vermeulen et al., 2010).

Tant la mono- com la di- metilació de K20 són importants en la resposta al dany al DNA. Ambdues modificacions participen en la estabilització de 53BP1 en els focus de dany, tot i que el paper d'H4K20me2 està més clar. Les cèl·lules deficientes en els enzims Suv420h presenten defectes en la reparació i com a conseqüència acumulen més dany (Botuyan et al., 2006). Per una altra banda, s'ha trobat que la metiltransferasa MMSET dimetila H4K20 als focus de dany promovent el reclutament de 53BP1 (Pei et al., 2011). En el cas de PR-SET7 i H4K20me1 hi ha resultats controvertits. Per una banda, s'ha vist que en condicions de dany, PR-SET7 és reclutat a la cromatina mitjançant la interacció

amb PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Un cop als llocs de dany, PR-SET7 monometila H4K20 *de novo*, facilitant l'ancoratge de 53BP1. Durant la resposta a dany al DNA, la interacció de PR-SET7 amb PCNA condueix a la degradació de PR-SET7 dependent de CRL4^{Cdt2} (Oda et al., 2011). En canvi, en un altre estudi, tot i confirmar la degradació de PR-SET7 dependent de PCNA i CRL4^{Cdt2}, observen que els nivells d'H4K20me1 disminueixen quan s'indueix dany al DNA (Centore et al., 2011; Jørgensen et al., 2011).

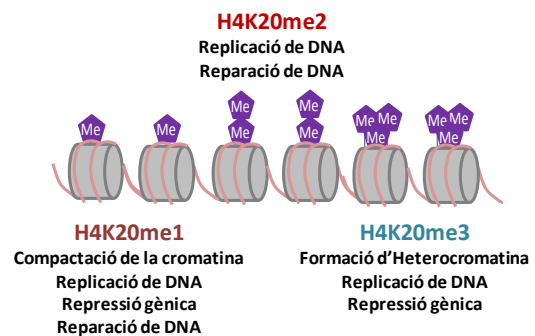


Figura 6. Funcions de la metilació d'H4K20.

INTRODUCCIÓ

El manteniment dels estats de metilació d'H4K20 durant el cicle cel·lular és crucial per l'homeòstasi de la cèl·lula. Així doncs, els enzims encarregats del seu control s'han establert com a peces clau en el manteniment de la integritat genòmica i la progressió del cicle cel·lular.

Els nivells de PR-SET7 i com a conseqüència els d'H4K20me1, estan finament controlats al llarg del cicle cel·lular, fet indicatiu de la seva importància en la regulació de la progressió del cicle (Houston et al., 2008; Rice et al., 2002). Prova d'això és que els ratolins deficientes en PR-SET7 moren abans de la implantació i les cèl·lules *pr-set7^{-/-}* tenen una fase S més llarga i s'aturen abans d'entrar a mitosi (Oda et al., 2009). Durant G1, PR-SET7 és ubiquitinat per la E3 lligasa SCF^{Skp2} i és degradat coincidint amb l'entrada a la fase S (Yin et al., 2008). PR-SET7 és gairebé indetectable durant la replicació del DNA, ja que per una banda el PR-SET7 unit als llocs de replicació a través de PCNA, és ubiquitinat per CRL4^{Cdt2} i subsegüentment degradat (Abbas et al., 2010; Jørgensen et al., 2011; Oda et al., 2011; Tardat et al., 2007; 2010); i per una altra banda, el PR-SET7 soluble és ubiquitinat per SCF^{Skp2} i degradat (Oda et al., 2011). El manteniment dels nivells de PR-SET7 baixos durant fase S és imprescindible per prevenir un patró d'H4K20me1 aberrant i la conseqüent compactació prematura de la cromatina (Centore et al., 2011) i la re-replicació del DNA deguda a la no finalització de la senyal per a reclutar el pre-RC als orígens de replicació, fet que conduiria a l'activació repetida d'un mateix origen (Tardat et al., 2010). Durant G2, els nivells de PR-SET7 incrementen ràpidament coincidint amb la disminució de l'activitat de SCF^{Skp2} i CRL4^{Cdt2}, resultant en la monometilació d'H4K20 dels nous nucleosomes dipositats a la cromatina. Seguidament, es produeix la condensació de la cromatina. Durant la profase i fins l'anafase, el PR-SET7 unit a la cromatina és fosforilat per CDK1-CiclinaB, protegint-lo de la degradació. Durant anafase, CDC14 desfosforila PR-SET7 resultant en la ubiquitinació per APC^{Cdh1} i promovent la seva degradació des d'anafase fins a la fase G1. La desfosforilació i degradació de PR-SET7 durant anafase és un requisit per a passar al següent cicle cel·lular, com ho demostra el retràs en la sortida

de mitosi d'un mutant de PR-SET7 fosforilat constitutivament (Wu et al., 2010).

Suv420h1/2 també juguen un paper important en la progressió del cicle cel·lular. Els animals doble *knock-out* (DKO) per aquestes metiltransferases moren just després del naixement. Les cèl·lules DKO tenen dèficits en la proliferació, amb fases G1 prolongades i fases S més curtes, indicant problemes en la entrada a fase S (Schotta et al., 2008).

2.1.3. Fosforilació

Totes les cues de les histones que conformen el nucleosoma central contenen residus que poden ser fosforilats per nombroses quinases i desfosforilats per fosfatases. La fosforilació es pot donar en residus de serina (S), treonina (T) i tirosina (Y) i constitueix una part essencial del codi genètic on diferents combinacions de PTMs són descifrades per els anteriorment anomenats *readers* o proteïnes efectores, que contenen dominis de reconeixement del tipus 14-3-3 o BRCT. La fosforilació de les histones s'ha vist relacionada en processos de reparació del DNA, compactació de la cromatina al llarg del cicle cel·lular i regulació de la transcripció.

La fosforilació de la serina 139 de la variant d'histona H2AX (γ -H2AX) de mamífers juga un paper fonamental en la senyalització del trencament de doble cadena del DNA (Rogakou et al., 1998). A llevats, la histona H2AX no existeix i la senyalització es dona via la serina 129 d'H2A (Downs et al., 2000). En resposta a dany, ATM i ATR fosforilen aquesta histona que serveix com a plataforma de reconeixement de factors implicats en la senyalització i reparació (Downs et al., 2000; Scroff et al., 2004). Les vies de reparació activades són el NHEJ, la recombinació homòloga (HR) i la reparació del DNA acoblada a replicació. A partir de la fosforilació d'H2AX es desencadena una cascada de senyalització que condueix a l'aturada del cicle cel·lular per a permetre la reparació del dany. La finalització de la senyal es dona per reemplaçament de γ -H2AX o desfosforilació per PP2A, Wip1, PP6 i PP4. Aquesta desfosforilació és requerida per a que la reparació sigui eficient i condueix a la recuperació

INTRODUCCIÓ

del cicle cel·lular (Chowdhury et al., 2008; Douglas et al., 2010; Macûrek et al., 2010).

La fosforilació de la histona H3, tot i estar associada a l'activació de la transcripció en determinants casos, també se la relaciona amb la compactació de la cromatina durant la mitosi. En concret, se li atribueix aquesta funció als residus T3, S10, T11 i S28, essent la fosforilació de la serina 10 la més caracteritzada (Goto et al., 1999; Wei et al., 1999; Wilkins et al., 2014). La regulació d'aquesta marca es dona per l'equilibri entre les activitats de la quinasa Aurora B i la fosfatasa PP1 (Hsu et al., 2000).

2.1.4. Ubiquitinació

La ubiquitina és una proteïna d'aproximadament 9KDa que pot ser covalentment afegida a la cadena lateral de les lisines d'histona o d'altres proteïnes. La conjugació d'ubiquitina és un procés enzimàtic de tres passos, en el que els enzims E1, E2 i E3 activen la molècula d'ubiquitina i modifiquen la proteïna diana específica. H2A va ser la primera proteïna ubiquitinada en ser identificada (Goldknopf et al., 1975). Entre el 5-15% d'H2A i el 1-2% d'H2B del nucli es troben ubiquitinades. La forma dominant és la monoubiquitinació dels residus K119 d'H2A, i K125 i K120 d'H2B (Goldknopf et al., 1975; West & Bonner, 1880). La ubiquitinació d'H2A (H2Aub) està catalitzada per les E3 lligases RING1A, 2AHUB i BRCA1 (Cao et al., 2005; Chen et al., 2002; Zhou et al., 2008), es troba en regions repetitives del genoma i està associada a silenciament gènic. Mentre que H2Bub, catalitzada per RNF20/40, és present al cos dels gens transcripcionalment actius (Kim et al., 2005; Minsky et al., 2008; Zhu et al., 2011). A part de la monoubiquitinació, H2A i H2B poden ser modificades per cadenes d'ubiquitina. La poliubiquitinació de la K63 d'H2A està catalitzada per RNF8 en resposta al dany i forma part de la cadena de senyalització per a la reparació del DNA (Stewart et al., 2009).

Les histones ubiquitinades desenvolupen les seves funcions, molt probablement a través del reclutament de proteïnes efectores. També s'ha vist que hi ha interacció entre la ubiquitinació d'H2A i H2B i altres residus d'histona modificats. Per exemple, la

ubiquitinació d'H2B promou la mono- i trimetilació d'H3K4 i la dimetilació d'H3K79, activant la transcripció (Zhu et al., 2005).

2.1.5. Sumoilació

La sumoilització de proteïnes és una modificació postraduccionals reversible molt similar a la ubiquitinació, ja que la molècula de SUMO (*small ubiquitin-like modifiers*) és afegida igualment a residus de lisina de la proteïna diana específica mitjançant els enzims E1, E2 i E3. SUMO, igual que la ubiquitina, és una proteïna d'aproximadament 11KDa que serveix com a plataforma de reconeixement per a proteïnes efectores amb motius d'interacció amb SUMO (SIMs) (Hecker et al., 2006).

Els ratolins deficientes en UBC9 (la única E2 lligasa del procés de sumoilació que es coneix fins al moment) moren en el estadi de pre-implantació degut a defectes en la compactació de la cromatina i en la segregació dels cromosomes, suggerint que la sumoilació és important pel manteniment de la integritat genòmica (Nacerddine et al., 2005). La sumoilació de proteïnes regula la interacció proteïna-proteïna, la localització, inhibeix la degradació de proteïnes depenent d'ubiquitina i s'ha relacionat amb activació de la transcripció. Les funcions associades a la sumoilació d'histones són més desconegudes. Fins al moment, s'ha descrit que la histona H4 sumoilada participa en la repressió de la transcripció mitjançant el reclutament d'HP1 i HDAC1 (Shiio & Eisenman, 2003). En estudis recents s'ha trobat que la histona H3 també està sumoilada, tot i que se'n desconeix la funció (Hendriks et al., 2014).

La sumoilació està coordinada amb altres modificacions postraduccionals d'histones. Per exemple, l'acetilació de les histones H3 i H4 afavoreix la seva sumoilació (Hendriks et al., 2014; Shiio & Eisenman, 2003).

2.1.6. ADP-Ribosilació

Les histones i les proteïnes no històniques poden ser reversiblement mono- o poli(ADP)ribosilades. La

INTRODUCCIÓ

mono(ADP)ribosilació consisteix en la transferència d'una ADP-ribosa provinent del NAD^+ (dinucleòtid d'adenina i nicotinamida) a un aminoàcid específic de la proteïna substrat, alliberant simultàniament nicotinamida. La proteïna unida a la ADP-ribosa serveix d'acceptor per a noves reaccions d'ADP-ribosilació en les que unitats d'ADP-ribosa provinents del NAD^+ poden formar un polímer unint-se entre elles mitjançant un enllaç glicosídic 1'-2' i donant lloc a una proteïna poli(ADP)ribosilada. La llargada de la cadena de poli(ADP)riboses pot variar des de diverses molècules a centenars (Hassa et al., 2006).

Actualment, es coneixen tres famílies d'enzims que poden mono- i/o poli(ADP)ribosilar proteïnes. Primer, la família de les PARP (*Poly(ADP)ribose polymerase*), segon la família PARP-like i finalment, les desacetilases i ADP-ribosil transferases d'histones dependents de NAD^+ , les sirtuïnes (Hassa et al., 2006). Totes tres famílies contenen membres amb capacitat mono(ADP)ribosil transferasa, mentre que només les PARP poden poli(ADP)ribosilar (Messner & Hottiger, 2011).

Totes les histones són susceptibles de ser mono- o poli(ADP)ribosilades en residus de glutamat, arginina i fosfo-serina. Els estudis que hi ha fins al moment suggereixen que aquesta PTM pot estar regulant processos com la compactació de la cromatina, el cicle cel·lular, la replicació, la reparació i la transcripció del DNA (Messner & Hottiger, 2011).

2.2. Metilació del DNA

La metilació del DNA és una marca epigenètica heretable que consisteix en la transferència d'un grup metil al carboni 5 de citosines del DNA per les metiltransferases de DNA (DNMTs). Junt amb les PTMs de les histones són les modificacions epigenètiques més estudiades (Fig. 7).

A mamífers, la metilació del DNA es dona al llarg de tot el genoma, majoritàriament en illes de dinucleòtids CpG i està associada al silenciament gènic (Lister et al., 2009). DNMT3A i B són les principals metiltransferases responsables de la

metilació *de novo* durant el desenvolupament (Okano et al., 1999) i es creu que DNMT1, que s'uneix preferentment al DNA hemimetilat, és el responsable de copiar el patró de metilació durant la replicació (Chuang et al., 1997; Hermann et al., 2004). La metilació del DNA és essencial en el desenvolupament, en la determinació i manteniment del llinatge cel·lular i a més juga un paper molt important en processos com imprinting, inactivació del cromosoma X, i supressió de la transcripció de regions repetitives del genoma (Jin et al., 2011).

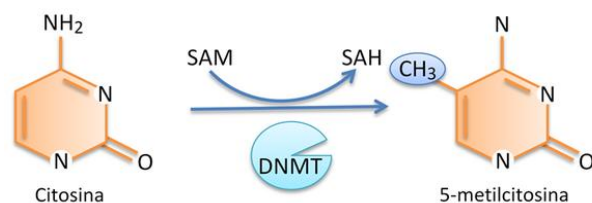


Figura 7. Metilació del DNA. La metilació del DNA té lloc al carboni 5 de la citosina. SAM, S-adenosil-metionina (donador del grup metil); SAH, S-adenosil-homocisteïna; DNMT, metiltransferasa de DNA.

La metilació del DNA interacciona amb les PTMs de les histones, els complexos remodeladors de la cromatina i altres proteïnes modificadores dels nucleosomes per coordinar les funcions de la cromatina, assegurar la integritat genòmica i propagar la informació epigenètica a la següent generació.

Durant el desenvolupament en mamífers, la trimetilació d'H3K9 i H3K27 és un pre-requisit per a la metilació del DNA. Mitjançant la interacció proteïna-proteïna, les DNMTs són dirigides a zones específiques del genoma. Per exemple, Suv39h1 dirigeix les DNMTs a regions pericentromèriques i EZH2, component del complex de repressió de polycomb 2 (PRC2), condueix les DNMTs a promotors específics on la metilació del DNA junt amb el reclutament de PRC1 i altres marques epigenètiques, desencadenaran el silenciament de la transcripció (Lehnertz et al., 2003; Viré et al., 2005).

En la regulació de la transcripció, les proteïnes d'unio a CpG metilades (MBDs) s'uneixen al DNA metilat i reprimeixen la transcripció. Com és el cas de MeCP2, que a través del reconeixement de CpG

INTRODUCCIÓ

metilades recluta un complex repressor amb activitat desacetilasa (Nan et al., 1998). Així doncs, aquests dos mecanismes globals de repressió de l'expressió gènica com són la metilació del DNA i la desacetilació d'histones estan connectats per MeCP2 per desenvolupar aquesta funció.

La metilació del DNA és una marca epigenètica molt més estable que les PTMs de les histones. Tot i així, es pot revertir. El procés de desmetilació pot ser passiu, quan la citosina metilada és renovada per una citosina no metilada en el procés de replicació, o actiu, quan la citosina metilada és oxidada, posteriorment escindida i intercanviada per una citosina en un procés de reparació del DNA per excisió de base (BER) (Kohli & Zhang, 2013). Encara que, els mecanismes de la desmetilació activa no es coneixen en profunditat fins al moment.

2.3. Remodeladors de la cromatina dependents d'ATP

Els complexos remodeladors de la cromatina participen en la dinàmica de la cromatina, cooperant amb els altres mecanismes epigenètics i produint canvis ràpids en la seva estructura. Utilitzen l'energia de la hidròlisi de l'ATP per desplaçar, intercanviar o eliminar nucleosomes. En aquest procés de remodelació de nucleosomes poden ser incorporades variants d'histona com CENP-A, macroH2A o H2AZ per reemplaçar les històniques canòniques i així regular l'estructura de la cromatina (Ausió, 2006). D'aquesta manera, controlen la distribució dels nucleosomes i l'accessibilitat dels factors de transcripció i d'altres proteïnes amb funció a la cromatina, regulant així processos com la transcripció, replicació, recombinació i reparació del DNA.

Els remodeladors de la cromatina són complexos multiproteics i es poden classificar en quatre grups segons les característiques de la subunitat central ATPasa: SWI/SNF (*switch/sucrose nonfermenting*) o BAF a mamífers, ISWI (*imitation of switch*), CHD (*chromo domain helicase/ATPase binding protein*) i INO80 (inositol) (Wu, 2012).

Cal remarcar que, en alguns casos, els complexos remodeladors són conduïts a la cromatina per les modificacions postraduccionals de les histones i/o pels enzims modificadors. Mostra d'aquest fet és que alguns dels components d'aquests complexos contenen dominis bromo, PHD o chromo, mitjançant els quals són reclutats a la cromatina de manera específica (Horn et al., 2013).

3. El cicle cel·lular

Les cèl·lules eucariotes en proliferació es caracteritzen per tenir un cicle cel·lular dividit en diferents fases: G1, S, G2 i mitosi. La finalitat del cicle cel·lular és el creixement de la cèl·lula, la duplicació del material genètic i la repartició equitativa d'aquest en les dues cèl·lules filles. La progressió per les diferents fases està finament controlada per diferents mecanismes moleculars conservats des de llevats fins a humans. Moltes de les proteïnes implicades en el control del cicle cel·lular han estat identificades gràcies a l'homologia existent amb *Saccharomyces cerevisiae*, organisme del qual es coneixen extensivament la majoria de proteïnes implicades en la progressió del cicle.

Cada fase del cicle cel·lular es caracteritza per un seguit de processos que s'han de produir de manera ordenada i correlativa. En diferents punts del cicle cel·lular hi ha mecanismes de control o *checkpoints*, que asseguruen el correcte assoliment de cada esdeveniment i prevenen de qualsevol tipus d'error en la progressió del cicle.

3.1. Regulació de la cromatina al llarg del cicle cel·lular

Des de les primeres observacions de cèl·lules en divisió, ha estat clara la relació entre el cicle cel·lular i l'arquitectura de la cromatina. L'embolcall nuclear i la cromatina experimenten l'assemblatge i desassemblatge durant el cicle cel·lular. La biogènesi de les histones i les modificacions de la cromatina també són dependents de la progressió del cicle. Alhora, les modificacions i les proteïnes d'unió

INTRODUCCIÓ

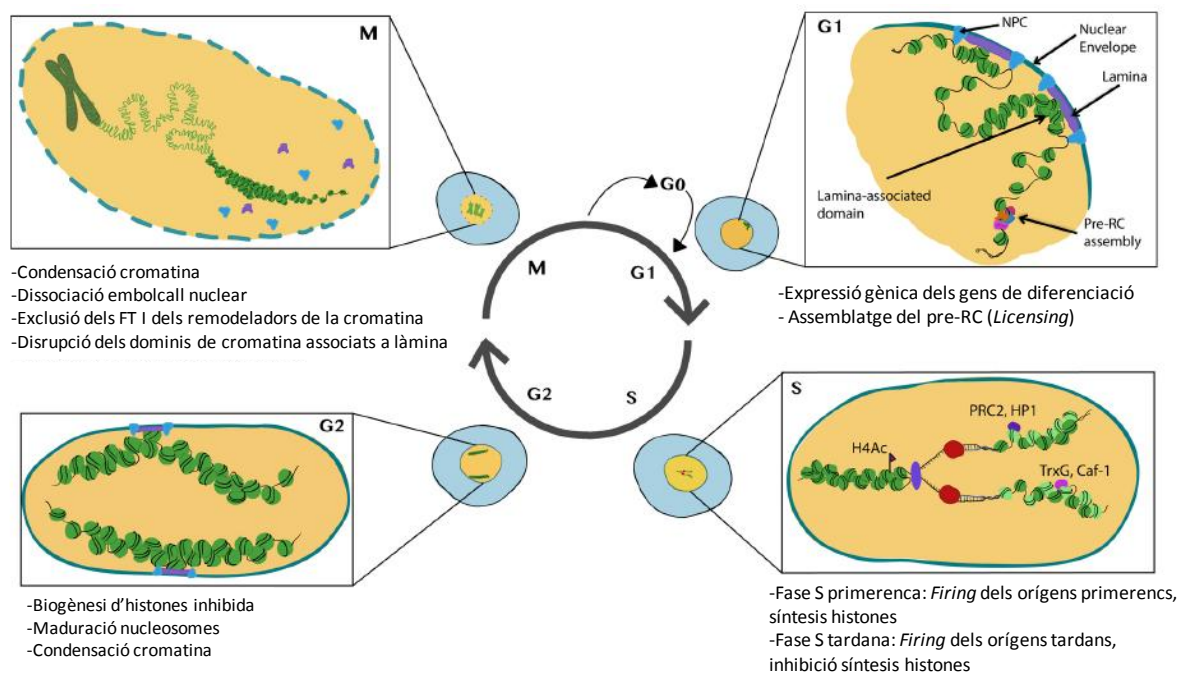


Figura 8. Principals característiques de la cromatina durant el cicle cel·lular. Les cèl·lules a la fase G1 exhibeixen dominis nuclears amb algunes regions de la cromatina associades als porus de l'embolcall i a la làmina nuclear. Els pre-RC es formen preferencialment a les regions de cromatina accessible. Durant la fase S es transcriuen i se sintetitzen les histones, el DNA es replica i els nucleosomes nous (verd clar) i vells (verd fosc) són assemblats per formar la cromatina filla. Els writers i els readers de les PTM també s'associen a la nova cromatina. Durant G2, els nucleosomes maduren i s'inhibeix la biogènesi d'histones. A la mitosi, els cromosomes es condensen i la majoria de factors de transcripció (FT) i remodeladors de la cromatina són exclosos de la cromatina. L'embolcall nuclear es trenca i es desfan els dominis associats a la làmina nuclear (Ma et al., 2015).

a la cromatina influencien l'expressió de reguladors crítics pel cicle cel·lular, l'accessibilitat als orígens de replicació i la reparació del DNA. Durant la fase G1, l'estat general de la cromatina és descondensat, sempre mantenint els dominis d'eucromatina i heterocromatina ben diferenciats. Durant aquesta fase, les cèl·lules comencen a sintetitzar les proteïnes necessàries per les funcions cel·lulars, entre altres, aquelles implicades en la replicació del DNA.

Durant la fase S, es duu a terme la replicació del DNA i l'estructura de la cromatina és similar a la de la fase G1, amb excepció de les zones de les forquilles de replicació, on la cromatina pateix processos de remodelació. Durant aquesta fase, no només es replica la informació genètica, sinó la epigenètica. Aquelles modificacions de la cromatina que eren presents a la cadena mare, són replicades a la cadena filla. A la fase G2, la cromatina es comença a condensar i es prepara per a l'entrada a mitosi. Durant mitosi la cromatina se segueix condensant fins arribar al màxim empaquetament durant la metafase. Els cromosomes queden units al fus mitòtic

a través del cinetocor. Els microtúbuls de cada centrosoma estiren del cinetocor en direccions oposades i a l'anafase, les cromàtides germanes comencen a separar. Un cop a la telofase, la cromatina es descondensa lentament fins que es completa la divisió cel·lular (Fig. 8).

Al llarg dels últims anys s'han dut a terme extensius estudis per intentar mapar les modificacions de la cromatina i la seva accessibilitat. El fet de que la majoria d'aquests estudis s'hagin fet en cèl·lules asincròniques, sense tenir en compte la fase del cicle cel·lular, en diferents tipus cel·lulars o diferents estadis del desenvolupament, fa que no es tingui una informació exacta de com l'estat de la cèl·lula impacta sobre l'estat de la cromatina i els processos que es donen en ella.

Durant el cicle cel·lular dos processos importants condueixen a la reestructuració global de la cromatina. En primer lloc, la replicació del DNA i la incorporació de les noves histones durant la fase S i en segon lloc, durant la mitosi, molts complexos

INTRODUCCIÓ

remodeladors i factors de transcripció es dissocien de la cromatina i l'arquitectura nuclear, incloent els dominis de la cromatina i les associacions amb la làmina nuclear es perden.

3.1.1. Biogènesi de les histones

La velocitat en que es replica el DNA està controlada en part per la taxa de síntesis de les histones (Groth et al., 2007; Günesdogan et al., 2014). Els gens de les histones canòniques s'organitzen en *clusters* i en pot haver des d'una a milers de còpies, segons l'espècie (Hentsche & Birnstiel, 1981). El començament i la finalització de l'expressió de les histones està finament regulat. L'entrada a la fase S es desencadena gràcies a l'activitat del complex Ciclina de G1-S, CDK2-Ciclina E (Fig. 10). CDK2-Ciclina E activa l'expressió de les histones al principi de la fase S. L'activitat de la CDK2-Ciclina E té el seu punt màxim a la fase S primerenca, després decreix degut a la degradació de la Ciclina E i no tornarà a activar-se fins al proper cicle cel·lular (Ma et al., 2000). Recentment, s'ha descobert un altre sistema de control que es dona a la fase S tardana. En aquest estadi, el complex ciclina de S-G2, CDK1-Ciclina A, fosforila i activa el factor epigenètic de repressió d'histones de la fase S tardana, HERS (*histone gene-specific epigenetic repressor in late S phase*). HERS, silencia l'expressió gènica mitjançant el reclutament de Suv39h1, que trimetila H3K9, modificació reconeguda posteriorment per HP1. HP1 manté aquestes regions de cromatina silenciada durant G2 i M (Ito et al., 2012). L'activitat CDK1-Ciclina A es manté baixa durant les fases G1 i S, gràcies a la degradació de la Ciclina A durant anafase pel complex promotor de l'anafase/ciclosoma (APC/C), permetent la reactivació de l'expressió de les histones per CDK2-Ciclina E a la següent fase S. Aquesta regulació permet que la biogènesi de les histones s'ajusti a cada cicle cel·lular, segons l'estat del desenvolupament, la identitat cel·lular o els estímuls interns o externs.

3.1.2. Replicació del DNA

La maquinària de replicació de DNA està meticulosament regulada per assegurar que el DNA

genòmic només es duplica una vegada per cicle cel·lular. El control de la replicació es pot dividir en dos passos principals i correlatius: el *licensing* i el *firing* dels orígens de replicació. El *licensing* és el procés mitjançant el qual es produeix el correcte assemblatge del pre-RC (*replication complex*) als orígens de replicació (ORI). Primerament, el complex de reconeixement dels orígens (ORC), d'alguna manera identifica els ORI i s'hi uneix. ORC serveix de plataforma d'unió per Cdt1 i Cdc6 i el complex MCM 2-7 (*minimichromosome maintenance complex*). Els quatre components donen lloc al pre-RC. Aquest primer pas es dona entre final de mitosi i durant G1. Al final de G1, el correcte assemblatge dels pre-RCs autoritza (*licenses*) als orígens per al següent pas, el *firing*, o activació dels orígens durant la fase S (Iizuka et al., 2006; Lubelsky et al., 2014; MacAlpine et al., 2010; Tardat et al., 2010). Aquest segon pas, es desencadena en part, per la fosforilació dels components del complex de l'origen. Aquesta fosforilació és dependent de les quinases Dbf4/Cdc7 (DDK) i CDK2-Ciclina E. La fosforilació dels components del pre-RC porta al reclutament d'helicases i complexos d'enzims necessaris per la replicació del DNA (Ramer et al., 2013; Zegerman & Diffley, 2007).

3.1.2.1. Licensing

Una qüestió fonamental que encara avui roman sense resoldre's és, a quina part del genoma comença la replicació. En els eucariotes superiors, a diferència dels llevats, no hi ha una seqüència consens que marqui els orígens de replicació. Sembla que el reconeixement dels orígens es dona per diferents mecanismes coordinats que inclouen la remodelació de nucleosomes i les PTM de les histones.

En el primer pas del *licensing*, els diferents components del complex ORC són reclutats a la cromatina, encara que no tots els llocs on s'ha unit ORC seran posteriorment marcats per a l'activació. Els ORC estan enriquits en zones lliures de nucleosomes, tot i que no totes les regions obertes de cromatina serveixen d'origen, indicant que hi ha altres mecanismes que identifiquen l'origen com a tal (Lubelsky et al., 2014; MacAlpine et al., 2010). A més, els ORC també es poden unir a regions

INTRODUCCIÓ

d'heterocromatina i promoure la unió dels pre-RC en aquestes zones (Cayrou et al., 2011; Schwaiger et al., 2010). La unió del pre-RC als orígens està influenciada per les modificacions de la cromatina. L'acetilació de la histona H4 i H3 promou el *licensing* dels orígens. Per exemple, l'acetiltransferasa HBO1, que acetila H4K5, K8 i K12, és essencial per al correcte assemblatge del complex MCM i formar el pre-RC en cèl·lules humanes i a *Drosophila* (Iizuka et al., 2006; Miotto & Struhl, 2008, 2010). La metilació d'H4K20 també juga un paper fonamental en la identificació dels orígens. Concretament la monometilació d'H4K20 per PR-SET7 durant G2/M, i la seva posterior di- i trimetilació per Suv420h1/2, són essencials per a que ORC reconegui els orígens al final de mitosi i durant G1 i es produeixi el posterior reclutament de Cdt1, Cdc6 i MCM2-7. Concretament, el component ORC1 a través del seu domini BAH s'uneix a H4K20me2 i ORCA, mitjançant un domini WD40, reconeix H4K20me3. La degradació de PR-SET7 per CRL4^{Cdt2} al final de G1 és essencial per a que els orígens només siguin marcats un cop per cicle cel·lular i evitar la re-replicació (Beck et al., 2012; Tardat et al., 2010).

3.1.2.2. Firing

L'estat de la cromatina no només afecta al *licensing* dels orígens, sinó també al moment d'activació d'aquests. El *firing* es dona seqüencialment, de manera que algunes regions del genoma són replicades primerencament i altres tardanament durant la progressió de la fase S (Méchali, 2010). El ritme d'activació dels orígens varia al llarg del desenvolupament i segons el tipus cel·lular, igual que ho fa la distribució dels diferents dominis de la cromatina (Farrell et al., 2012; Hansen et al., 2010). En primer lloc, l'activació primerenca està associada a regions d'hiperacetilació d'H4 i zones transcripcionalment actives, fet que suggereix que l'obertura de la cromatina té conseqüències funcionals en el *firing* dels orígens (Lubelsky et al., 2014; Schwaiger et al., 2009). L'acetilació d'H4 promou l'activació dels orígens incrementant l'accessibilitat del DNA a les helicases necessàries per al moviment de la forquilla de replicació i també

facilitant l'evacuació de l'octàmer d'histones, fent possible el desenrotllament del DNA mitjançant els complexos remodeladors SWI/SNF i RSC (remodelador de l'estructura de la cromatina) (Ferreira et al., 2007). Si l'acetilació d'H4 regula d'alguna manera l'habilitat de CDK2-CiclinaE per fosforilar els seus substrats als orígens per iniciar el *firing* encara és matèria d'estudi. En segon lloc, l'activació tardana dels orígens correlaciona amb zones de cromatina més compactada, rica en HP1 i transcripcionalment inactiva (Schwaiger et al., 2010). Aquest retràs pot ser degut a una menor densitat de ORC units a la cromatina, menor nombre de pre-RC o simplement al fet que el DNA és menys accessible a les helicases i a les proteïnes requerides per a la replicació. En canvi, cal remarcar que alguna regió d'heterocromatina de *Drosophila* i de llevat es repliquen primerencament. En aquests casos, HP1 s'associa a ORC i promou el reclutament de ORC als orígens i l'activació primerenca d'aquests (Cayrou et al., 2011; Hayashi et al., 2009; Schwaiger et al., 2010). Els diferents rols d'HP1 en la replicació de l'heterocromatina suggereixen que no només l'arquitectura de la cromatina és la que està dictant el ritme del *firing* dels orígens de replicació.

Al final de la fase S, la replicació ha de ser reprimida, per assegurar que el DNA no es duplica més d'un cop. L'acetilació de les histones és molt important per la progressió de la fase S, tant per l'activació dels orígens de replicació com per l'activació de la transcripció de les histones. Així doncs, per a finalitzar amb la replicació, ha de produir-se la desacetilació de les histones al final de la fase S. Durant el cicle cel·lular, el quocient NAD⁺/NADH oscil·la. En particular, el quocient és baix durant la transició G1/S i entrada de la fase S, però conforme les cèl·lules progressen per la fase S, el quocient augmenta (Yu et al., 2009). L'NAD⁺ activa les sirtuïnes, les quals disminuiran els nivells d'acetilació de la cromatina, promovent la compactació (He et al., 2011). A part de les sirtuïnes, altres HDACs, com HDAC1, HDAC2 i HDAC3 s'uneixen a la cromatina durant la fase S tardana. Addicionalment, altres marques històniques relacionades amb la compactació de la cromatina incrementen durant la progressió de la fase S (Li et al., 2002; Peixoto et al., 2012). Aquest és el cas

INTRODUCCIÓ

d'H3K79me₂, modificació postraducciona important per evitar la re-replicació (Fu et al., 2013).

3.1.3. Compactació de la cromatina durant mitosi i segregació dels cromosomes

Per assegurar la fidelitat en la separació de la informació genètica en les dues cèl·lules filles, la cromatina experimenta una dramàtica compactació durant la transició G₂/M fins arribar a l'estructura de cromosoma metafàsic. Durant aquest procés de compactació, la majoria de factors de transcripció i remodeladors són exclosos de la cromatina i es produeixen canvis en les PTM de les histones (Rizkallah et al., 2011).

La fosforilació de la histona H3, concretament dels residus T3, S10, T11 i S28, juguen un paper molt important en la compactació i segregació dels cromosomes durant mitosi. La fosforilació de la serina 10 i la serina 28 són les més estudiades. Aurora B és la quinasa responsable de la fosforilació d'H3S10 durant la fase G₂ tardana i profase i d'H3S28 durant profase. La fosfatasa PP1 desfosforila aquests residus durant anafase, abans de que comenci la descondensació dels cromosomes a la telofase (Goto et al., 2002; Hendzel et al., 1997; Hsu et al., 2000).

La fosforilació d'H3S10 per Aurora B té varies conseqüències sobre l'estructura de la cromatina (Fig. 9). Principalment, promou el reclutament del complex Condensina I, conduint a la compactació de la cromatina mitjançant el superenrotllament del DNA (Giet & Glover, 2001). A llevat, aquesta marca permet el reclutament de la desacetilasa Hst2p als nucleosomes. D'aquesta manera, Hst2p desacetila H4K16Ac promovent la compactació de la cromatina (Wilkins et al., 2014). Fet recolzat per l'observació que la desacetilació d'H4K16Ac per SirT2 durant mitosis en mamífers i la conseqüent monometilació d'H4K20 per PR-SET7, promou la compactació de la cromatina (Houston et al., 2008; Oda et al., 2009; Serrano et al., 2013; Vaquero et al., 2006). La fosforilació dinàmica d'H3S10 interfereix en la lectura d'H3K9me₃ per HP1 en les regions d'heterocromatina pericentromèrica. Les diferents isoformes d'HP1 són excloses de la cromatina quan Aurora B fosforila H3S10 (Fischle et al., 2005; Hirota et al., 2005). Tot i així, un romanent d'HP1 resta a regions centromèriques, on desenvolupa diferents funcions importants per a la correcta segregació dels cromosomes, com promoure la unió a la cromatina de les cohesines a través de Sgo1

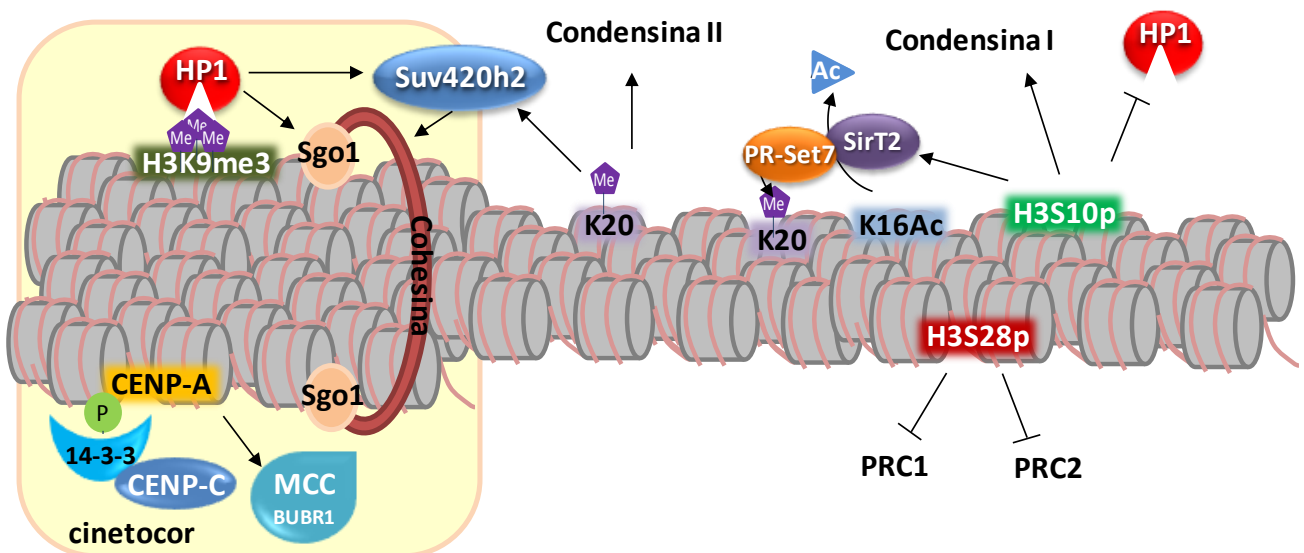


Figura 9. Regulació de la cromatina durant mitosi. La fosforilació de la histona H3S10 promou la desacetilació d'H4K16Ac per SirT2 i el reclutament del complex Condensina I, facilitant la compactació de la cromatina. A les zones centromèriques HP1 i Suv420h2 permeten la unió de la cohesina, ajudant al manteniment de l'estructura dels centròmers. La fosforilació de la variant d'histona CENP-A regula positivament la unió de proteïnes del cinetocor implicades en el checkpoint de mitosi. MMC, *mitotic checkpoint complex*

INTRODUCCIÓ

(shugoshin), facilitar l'assemblatge del cinetocor o prevenir errors en la unió dels microtúbuls al cinetocor (Yamagishi et al., 2008). A part d'HP1, Suv420h2, també participa en el reclutament de les cohesines a les regions d'heterocromatina (Hahn et al., 2013).

La fosforilació d'H3S28 per Aurora B desplaça els complexos PRC1 i PRC2 dels seus llocs d'unió a H3K27me3 durant mitosi. Les proteïnes del grup polycomb (PcG) s'uneixen a regions de la cromatina concretes, mantenint-les reprimides i assegurant la identitat cel·lular. S'ha proposat que la determinació de llinatge es dona en part, gràcies al canvi de dianes de PcG. Sembla que durant mitosi, la doble modificació H3K27me3-S28p afavoreix la dissociació de PcG de la cromatina i promou la diferenciació cel·lular (Fonseca et al., 2012; Gehani et al., 2010).

És interessant remarcar, que algunes marques dipositades durant la mitosi, no només són essencials per a la compactació de la cromatina durant aquesta fase del cicle cel·lular, sinó que juguen un paper fonamental en el següent cicle. Aquest és el cas d'H4K20me1. La monometilació d'H4K20 per PR-SET7 permet la compactació de la cromatina. H4K20me1 es manté alt durant mitosi per l'activitat de PR-SET7 i per la inactivació per fosforilació de PHF8 (Liu et al., 2010; Oda et al., 2009; Serrano et al., 2013). H4K20me1 és reconegut per dues subunitats del complex Condensina II, CAP-D3 i CAP-G2. La Condensina II s'uneix a la cromatina al principi de profase i s'hi manté associada fins al final de mitosi, facilitant la compactació dels cromosomes (Liu et al., 2010). Addicionalment, PR-SET7 subministra el substrat per les di- i trimetiltransferases Suv420h1 i h2. Com s'ha mencionat anteriorment, Suv420h2 participa en el reclutament de la cohesina i per tant en la segregació dels cromosomes (Hahn et al., 2013). A més, H4K20me1 permet la formació del pre-RC durant el final de mitosi i la següent fase G1 (Beck et al., 2012; Tardat et al., 2010) i determina els nivells d'H4K20me2 i me3 durant el següent cicle cel·lular, impactant en la eficiència de la reparació del DNA i en l'estructura de la cromatina i per tant, sobre l'estabilitat genòmica (Serrano et al., 2013).

Finalment, a la zona centromèrica, es requereix una organització particular de la cromatina per assegurar el bon funcionament i la segregació de les cromàtides germanes. CENP-A (*centromere protein A*) és una variant d'histona que reemplaça H3 als centròmers. La presència de CENP-A és necessària per l'assemblatge del cinetocor i pel correcte alineament i segregació dels cromosomes pel fus mitòtic. Concretament, la fosforilació de la cua N-terminal de CENP-A durant mitosi als nucleosomes dels centròmers és reconeguda per 14-3-3, que alhora fa de plataforma d'unió de les proteïnes del cinetocor, com CENP-C (Goutte-Gattat et al., 2013; Régnier et al., 2005). A més, CENP-A també és important per a la localització al cinetocor de la proteïna del *checkpoint* del fus, BUBR1. Com a conseqüència, la pèrdua de CENP-A produeix errors en l'activació del *checkpoint* dependent de BUBR1 (Régnier et al., 2005).

Així doncs, durant la mitosi, diferents proteïnes amb funció a la cromatina i les PMT de les histones es coordinen per permetre la compactació dels cromosomes i assegurar la correcta segregació de les cromàtides germanes en les cèl·lules filles, mantenint la identitat pròpia de la cèl·lula i l'estabilitat genòmica.

3.2. Mecanismes de control del cicle: Checkpoints

En cada cicle cel·lular, les cèl·lules han d'assegurar la correcta replicació del DNA, l'empaquetament de la cromatina fins a cromosoma metafàsic i l'adequada unió dels cromosomes al fus mitòtic, per a que la segregació es doni fidelment i cada cèl·lula filla obtingui la meitat de la dotació genòmica. Les cèl·lules estan sotmeses a nombrosos atacs externs, com agents químics o radiacions, i interns del propi metabolisme que poden danyar el DNA. Les cèl·lules eucariotes han desenvolupat diferents mecanismes de control anomenats *checkpoints*, que junt amb la reparació del DNA ajuden a mantenir l'estabilitat genòmica durant la divisió cel·lular.

La progressió coordinada i seqüencial del cicle cel·lular a través dels diferents estadis està regulada principalment per les quinases dependents de ciclina,

INTRODUCCIÓ

CDKs (Morgan, 1997). L'activació d'aquestes quinases es deu a la unió a una ciclina específica. Les cicles, com el seu nom indica, fluctuen al llarg del cicle cel·lular. Cada tipus de ciclina és específica d'un estadi del cicle i regula una CDK concreta (Fig. 10). De manera que, un complex CDK-Ciclina específic governa la progressió de cada fase del cicle cel·lular mitjançant la fosforilació de les seves dianes. Els substrats de les CDK-Cicles són proteïnes efectores necessàries per a la progressió del cicle cel·lular (Sherr & Roberts, 2004).

El terme *checkpoint* fa referència al conjunt de mecanismes que per una banda detecten alteracions en el DNA, en les funcions que es donen en aquest, o en les condicions ambientals i, per una altra banda, aturen la progressió del cicle cel·lular per a donar temps a solucionar el problema. Els complexos CDK-Ciclina, estan corrent avall en la via del *checkpoint*, de manera que, diferents proteïnes corrent amunt regulen l'activitat de les CDK-Cicles i així la progressió del cicle cel·lular en funció de les necessitats. La xarxa jerarquizada de proteïnes que regulen els *checkpoints* es divideix en: 1) Sensors, que inclouen el complex pinça RAD9-HUS1-RAD1, el complex carregador de la pinça RAD17-RFC i el complex nucleasa MRE11-RAD50-NBS (MRN); 2) Mediadors, on es troben proteïnes com BRCA1, MDC1, 53BP1 i Claspin; 3) Quinases transductores de la senyal apical, ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) i ATR (*ATM-and Rad3-related*); 4) Quinases efectores, CHK1 i CHK2 i 5) Proteïnes efectores, com les fosfatases CDC25, proteïnes reparadores del DNA com RAD51C o factors de transcripció com E2F o p53 (Lukas, Lukas, & Bartek, 2004).

3.2.1. Checkpoint de G1/S

Per evitar entrar a la fase S amb DNA danyat, les cèl·lules en progressió per G1 activen el *checkpoint* de G1/S mitjançant les quinases transductores de la senyal apical ATM i ATR, que alhora activen les quinases efectores CHK1 i CHK2. A partir d'aquí, el *checkpoint* de G1/S es ramifica i CHK1/CHK2 poden induir l'arrest cel·lular a través de la fosfatasa CDC25A o mitjançant el factor de transcripció p53.

Tot i que la fosforilació de CDC25A i p53 per les CHK es dona simultàniament, l'aturada del cicle promoguda per la via de CDC25A és més ràpida que la de p53 (Bartek & Lukas, 2001).

CDC25A es comença a expressar al final de G1, després de l'alliberació i activació del factor de transcripció E2F. CDK4-CiclinaD, fosforila RB (retinoblastoma) i allibera E2F, que alhora regula la transcripció de proteïnes necessàries per a la progressió del cicle. Una d'aquestes proteïnes és CDC25A. En resposta a dany, CDC25A és fosforilat per CHK1 i CHK2, promovent la seva degradació al proteosoma (Sørensen et al., 2003). CDC25A desfosforila i activa CDK2, la subunitat catalítica dels complexos CDK2-Ciclina E i CDK2-CiclinaA (Falck et al., 2001). Per tant, durant el *checkpoint* de G1/S la degradació dependent de fosforilació de CDC25A porta a la inactivació del complex CDK2-CiclinaE necessari per a la progressió cap a a fase S. L'arrest del cicle mediat per CDC25A és temporal i les cèl·lules només resten aturades unes quantes hores (Falck et al., 2001).

Contràriament, p53 promou una aturada prolongada en G1/S en resposta al dany al DNA. Els nivells de p53 estan finament controlats per la lligasa d'ubiquitina E3, MDM2. En condicions normals, MDM2 regula el ràpid recanvi de p53. En resposta a dany al DNA, ATM/ATR i CHK1/CHK2 fosforilen tant p53 com MDM2, conduint a l'estabilització de p53 i a l'activació de la transcripció dels seus gens diana, entre ells, p21 (WAT1/Cip1) (Khosravi et al., 1999; Lukas et al., 2004). L'acumulació de p21 inhibeix l'activitat CDK2-CiclinaE i és capaç de bloquejar les cèl·lules en la transició G1/S durant un temps prolongat o inclòs permanentment (Sherr & Roberts, 1999).

3.2.2. Checkpoints de la fase S

Els *checkpoints* de la fase S activats per errors en la replicació o dany al DNA, produeixen un retràs reversible en la progressió pel cicle cel·lular, principalment per la inhibició o desacceleració de la replicació. Si el retràs en la fase S produït per aquests *checkpoints* no és suficient per reparar el dany, les cèl·lules continuaran la seva progressió fins arribar al

INTRODUCCIÓ

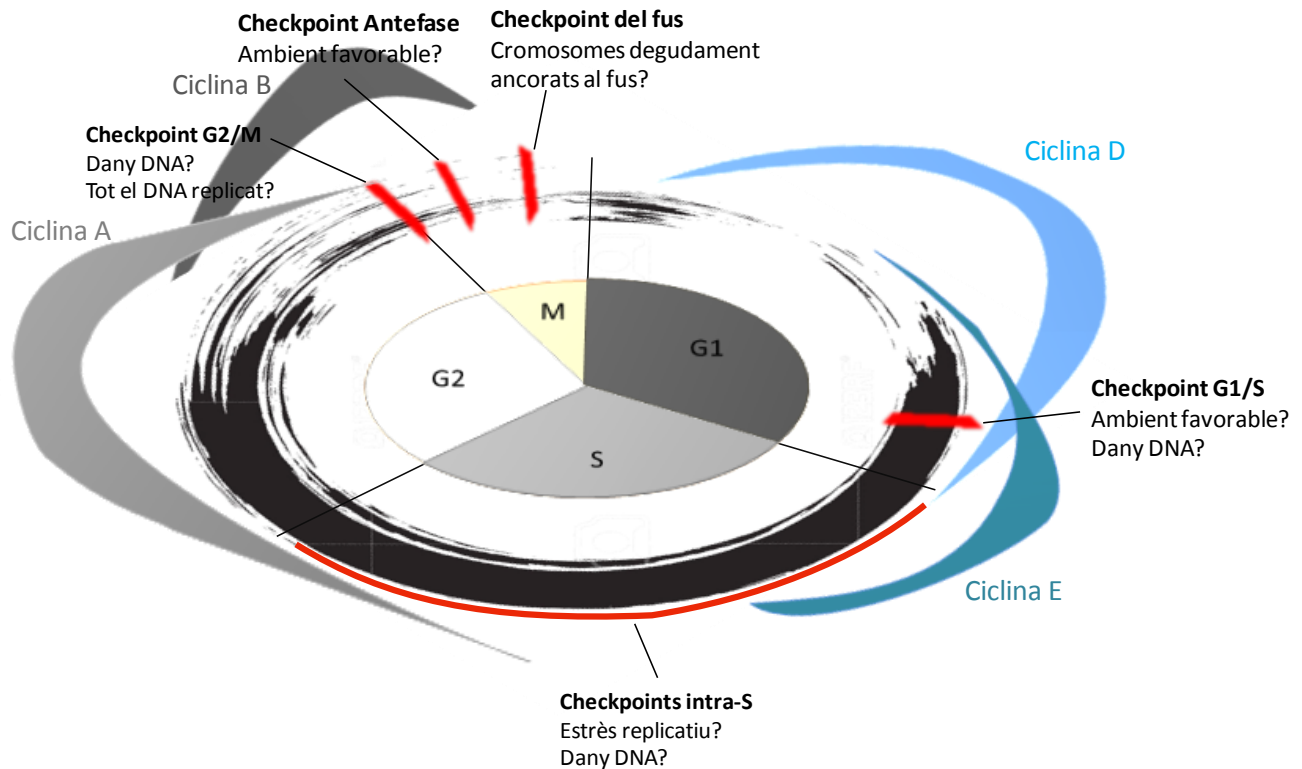


Figura 10. Mecanismes de control del cicle cel·lular. L'esquema inclou els diferents *checkpoints* del cicle cel·lular explicats en el cos del text i la representació dels nivells d'expressió de les ciclina en les diferents fases del cicle.

checkpoint de G2/M. Varis autors consideren que dins de la fase S hi ha tres *checkpoints* diferenciats, tot i que estan íntimament relacionats i comparteixen alguns dels components de la cascada de senyalització. Dos d'ells estan estrictament lligats a la replicació: el *checkpoint* de replicació i el *checkpoint* de S/M; i l'altre no: el *checkpoint* de intra-S. Tots ells són independents de p53 (Bartek et al., 2004).

3.2.2.1. Checkpoint de intra-S

Aquest *checkpoint* està activat per dany al DNA fora dels llocs de replicació i el principal mecanisme que fa servir per a retrassar la progressió de la fase S és la inhibició del reclutament de proteïnes iniciadores de la replicació als orígens de replicació pendents de ser activats (Costanzo et al., 2000). El trencament de doble cadena (DSB) al DNA activa ATM i ATR. L'activació d'ATM és ràpida i és la resposta

dominant als DSBs (Bakkenist & Kastan, 2003). La cascada de senyalització activada per ATM condueix a l'activació de diferents proteïnes efectores, dividint-se el *checkpoint* de intra-S en dues branques. En la primera, ATM fosforila SMC1 de manera dependent de NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*). SMC1 és una subunitat del complex cohesina, necessari per a la unió de les cromàtides germanes. La fosforilació de SMC1 per ATM activa el *checkpoint* d'intra-S promovent l'aturada transitòria de les forquilles de replicació (Kim et al., 2002; Yazdi et al., 2002). En la segona branca, l'activació d'ATM condueix a la degradació dependent de fosforilació de CDC25A. CDC25A és necessària per a l'activació de CDK2-Ciclina A. Així doncs, l'activació d'ATM es tradueix en a la inactivació de CDK2-CiclinaA, fet que alhora frena la unió a la cromatina del factor d'iniciació CDC45 i d'aquesta manera es retarda el *firing* dels orígens de replicació pendents d'activar (Bartek et al., 2004).

INTRODUCCIÓ

3.2.2.2. Checkpoint de replicació

En aquest punt de control, les cèl·lules detenen la progressió per la fase S en resposta a l'aturada de les forquilles de replicació, que pot ser deguda a estrès, per exemple per falta de desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTPs) o per exposició a químics que inhibeixen les polimerases, o per topada amb dany al DNA. L'aturada de les forquilles de replicació activa el *checkpoint*, bloquejant tant la replicació de la pròpia forquilla, com l'activació d'origens de replicació tardans en *cis* o en *trans*. ATR és activat pel DNA de cadena senzilla (ssDNA) generat per les forquilles de replicació aturades (Byun et al., 2005), al qual s'uneix la proteïna d'unió a ssDNA, RPA (*replication protein A*) (Costanzo et al., 2003). El dímer ATR-ATRIP és reclutat per RPA-ssDNA, fet que promou l'autofosforilació i activació d'ATR (Liu et al., 2011; Zou & Elledge, 2003). Per una altra banda, RPA també recluta altres complexos que permeten la incorporació de la proteïna d'unió a la topoisomerasa II beta (TopBP1) (Kumagai et al., 2006). L'activació final d'ATR està facilitada per la interacció entre ATRIP i TopBP1 (Kumagai et al., 2006; Mordes et al., 2008). Un cop activat, ATR fosforila nombrosos substrats, entre ells CHK1, que ajuden a dispersar la senyal. De la mateixa manera que passava en el *checkpoint* de G1/S i en el de intra-S, CHK1 promou l'aturada del cicle mitjançant la degradació de CDC25A (Sørensen et al., 2003).

3.2.2.3. Checkpoint de S-M

Aquest *checkpoint* evita que les cèl·lules amb replicació del DNA incompleta progressin cap a mitosi. Com s'ha explicat en el punt anterior, en resposta a les forquilles de replicació aturades, s'activa la via ATR-CHK1. L'aturada del cicle que es produeix és temporal i encara que la replicació no s'hagi completat, el cicle continua. Arribada la fase G2, CHK1 fosforila CDC25C i l'inactiva. CDC25C és necessari per l'activació de CDK1-CiclinaB i l'entrada a mitosi. D'aquesta manera, la cèl·lula evita l'entrada a mitosi quan el DNA no ha estat completament replicat durant la fase S (Brown, 2003).

3.2.3. Checkpoints de mitosi

3.2.3.1. Checkpoint de G2/M

El *checkpoint* de G2/M evita que les cèl·lules iniciïn la mitosi quan hi ha dany al DNA durant G2, o si han arribat a G2 amb dany sense reparar produït a les prèvies fases G1 o S. A més, les cèl·lules amb el DNA replicat incompletament poden arrestar-se a G2/M com a conseqüència del *checkpoint* de S-M. Anàlogament al *checkpoint* de G1, el retràs en el cicle o l'aturada en G2/M és el resultat d'una combinació de mecanismes que operen via modificacions postraduccionals de diverses proteïnes efectores, i de manera més retardada però més sostinguda en el temps, mitjançant l'alteració de programes transcripcionals.

L'efector principal d'aquest *checkpoint* és la CDK1-CiclinaB, la qual fosforila i regula nombrosos substrats imprescindibles per l'entrada a mitosi. En resposta a dany, s'anul·la l'activació de CDK1-CiclinaB per diferents vies. La primera, dependent de CDC25, produeix un retràs en el cicle cel·lular de manera ràpida, i la segona, implica la regulació de la transcripció per p53 i causa un arrest en G2/M prolongat. Per produir l'aturada ràpida del cicle en G2/M, s'inhibeix l'activació de CDK1-CiclinaB mitjançant el segrest dependent d'ATR/ATM-CHK1/CHK2 i/o per inactivació de la fosfatasa CDC25C, que normalment desfosforila CDK1 durant G2/M i l'activa (Fig. 11) (Lukas et al., 2004). No obstant, l'activació de CDK1 en un cicle cel·lular normal es dona per l'acció coordinada de CDC25A, B i C, de manera que el model es complica notablement (Donzelli & Draetta, 2003; Mailand et al., 2002). En resposta a dany o replicació incompleta del DNA, CDC25A és degradat durant G2, molt probablement pel mateix mecanisme que s'ha descrit abans en el *checkpoint* de G1/S i en el *checkpoint* de intra-S (Donzelli & Draetta, 2003; Mailand et al., 2002; Xiao et al., 2003)

La via de degradació de CDC25A és l'únic mecanisme compartit entre els tres *checkpoints* principals del cicle cel·lular, operant a G1/S, dins de S i en G2/M (Bartek & Lukas, 2003). El destí de CDC25B després d'estrès genotòxic està menys clar,

INTRODUCCIÓ

tot i que sembla que és fosforilat per la quinasa p38 (s'activa en resposta a radiació UV i de manera independent de ATM/ATR) i reconegut per 14-3-3, perturbant la unió al substrat (Bulavin et al., 2001; Forrest & Gabrielli, 2001). A part de l'activació del *checkpoint* per la via directa ATR/ATM-CHK1/CHK2, els mediadors 53BP1 i BRCA1 també contribueixen a l'arrest en G2 (Wang et al., 2002; Xu et al., 2001). A més, les quinases Polo-like, PLK3 i PLK1, han emergit com a dos reguladors addicionals de CDC25C i CDK1-CiclinaB. Per una banda, PLK3 té una funció similar a CHK1/CHK2, ja que és activat per ATM en resposta a dany i fosforila CDC25C, inhibint la seva activitat. Per contra, PLK1 en un cicle normal, fosforila CDC25C promovent la seva activació i es creu que participa en la sortida del *checkpoint* de G2/M (Nyberg et al., 2002; Reinhardt & Yafe, 2013). Tot i que els detalls de funcionament d'aquests dos últims mecanismes estan pendents de ser determinats, sembla que participen en l'aturada ràpida del cicle en resposta a estrès genotòxic.

El silenciament prolongat de CDK1-CiclinaB es dona principalment a través de la via de p53, que a part de regular la transcripció de p21 (quinasa inhibidora de CDKs imprescindible per el *checkpoint* de G1), controla l'expressió de les proteïnes GADD45, que inhibeix el complex CDK1-CiclinaB i 14-3-3, que segresta el complex i n'afavoreix la degradació (Taylor & Stark, 2001). A part de l'activació de la transcripció dependent de p53, BRCA1 també estimula l'expressió de p21 i GADD45 i coopera amb p53 per regular el l'arrest en la fase G2 (Nyberg et al., 2002).

3.2.3.2. Checkpoint d'antefase

En aquest punt de control, anomenat *checkpoint* d'antefase per primera vegada per Matsusaka i Pines (Matsusaka & Pines, 2004), les cèl·lules, en resposta a agents estressants, retarden l'entrada a mitosi, evitant la condensació dels cromosomes a profase i retornant reversiblement cap a G2. El *checkpoint* d'antefase és independent d'ATM/ATR (Jha et al., 1994; Mikhailov et al., 2004). No s'activa per DSBs sinó per condicions cel·lulars desfavorables. Aquestes condicions poden venir donades per canvis en la osmolaritat cel·lular, per el desassemblatge dels

microtúbuls o per alteracions en l'estructura de la cromatina, causades per exemple per anomalies en l'acetilació de les histones. La cèl·lula pot activar el *checkpoint* d'antefase fins just abans d'entrar a prometafase, punt de no retorn, en el que els cromosomes ja no podran descondensar-se i el cicle avançarà irremediablement cap a metafase (Chin & Yeong, 2010)

CHFR (*checkpoint with forkhead and ring finger domains*) és clau per a que els cromosomes es descondensin durant el *checkpoint* d'antefase (Matsusaka & Pines, 2004). A través de la seva activitat ubiquitin-lligasa, promou la degradació de diversos substrats, com PLK1, Aurora A i HDAC1, importants per a la progressió per mitosi (Kang et al., 2002; Oh et al., 2009; Yu et al., 2005). Tot i que el coneixement dels mecanismes pels quals actua CHFR és força escàs, es creu que la ubiquitinació dependent de CHFR pot tenir una funció senyalitzadora (Chin & Yeong, 2010). Sembla que CHFR actuaria corrent amunt de la quinasa p38. L'activació de p38 condueix a l'aturada d'antefase per inhibició de CDK1-CiclinaB (Matsusaka & Pines, 2004). A més, CHFR reconeix proteïnes poli(ADP)ribosilades (Matsusaka & Pines, 2004) i s'uneix als cossos de proteïna promielocítica de leucèmia (PML), fet que sembla ser important en l'activació del *checkpoint* (Daniels et al., 2004).

Fins el moment, no es té la certesa de quin és la via de senyalització que porta a la descondensació dels cromosomes durant el *checkpoint* d'antefase. Tot sembla apuntar a que els efectors d'aquesta via són els complexos Condensina I i II (Chin & Yeong, 2010). El complex Condensina I canònic està conformat per dues subunitats centrals de la família d'ATPases conegudes com les proteïnes de manteniment estructural dels cromosomes (SMC2/CP-E i SMC4/CAP-C) i tres proteïnes no-SMC (CAP-D2, CAP-G i CAP-H) (Hagstrom & Meyer, 2003). El complex Condensina II consisteix en les subunitats SMC2 i SMC4 i les subunitats no-SMC CAP-D3, CAP-G2 i CAP-H2 (Ono et al., 2004; Yeong et al., 2003). La Condensina II promou la condensació dels cromosomes durant la profase primerenca, mentre que la Condensina I es requereix durant prometafase (Hirano, 2005). Així doncs, el

INTRODUCCIÓ

separada, l'enzim encarregat de l'escissió del complex cohesina que manté les cromàtides germanes juntes. Un cop la ciclina B és degradada, CDK1 s'inactiva i permet la unió de CDH1 a APC/C, que dirigeix la seva activitat fins el final de G1 (Pines, 2011). Així doncs, la regulació de l'activitat de l'APC/C durant mitosi és crucial per assegurar que les cromàtides germanes no se separin i no se surt de mitosi fins que tots els cromosomes estan units a l'aparell mitòtic, d'aquesta manera, assegurant que les dues cèl·lules filles hereten un conjunt idèntic de cromosomes. Per aconseguir aquest repte, l'APC/C està finament controlat per les proteïnes del SAC, les quals responen a si els cinetocors estan o no, adherits als microtúbuls del fus (Musacchio & Salmon, 2007).

Les proteïnes del SAC tenen com a diana CDC20. Mantinent CDC20 sota control, el SAC assegura la prolongació de la prometafase fins que tots els cromosomes estan bi-orientats entre els pols oposats del fus. En els últims anys, s'ha establert que el principal complex efector del SAC és MCC (*mitotic checkpoint complex*). Aquest complex està compost per MAD2, BUBR1, BUB3 i la pròpia CDC20 (Sudakin et al., 2001). A part del MCC, altres proteïnes centrals del SAC són MAD1, BUB1, MPS i Aurora B. A més, hi ha proteïnes addicionals que regulen l'activitat d'aquest *checkpoint*, com membres dels complexos ROD (*rough deal*), ZW10 (*zeste white 10*) i ZWILCH; p31^{comet}; CDK1-CiclinaB, NEK2 i PLK1; i les proteïnes motores de microtúbuls CENP-E i dineïna entre d'altres. Durant prometafase, CDC20 i totes les proteïnes del SAC es troben als cinetocors, monitoritzant la unió entre els microtúbuls del fus i el cinetocor. Les proteïnes del SAC romandran actives, idealment fins que tots els cromosomes estiguin perfectament bi-orientats en el fus (Musacchio & Salmon, 2007).

4. Resposta al dany al DNA

Les cèl·lules estan equipades amb vies per al manteniment de l'estabilitat genòmica. Fet que és important si es té en compte que les cèl·lules estan constantment exposades a condicions que poden

alterar la seqüència del DNA. Aquestes lesions es poden produir en diferents punts del cicle cel·lular i les fonts causants més comuns són el propi metabolisme, l'exposició a la llum ultraviolada o a radiació ionitzant, així com errors en la replicació del DNA. Segons l'agent genotòxic es poden donar lesions a les bases del DNA, unió entre les cadenes del DNA o entre DNA i proteïnes, o trencaments de cadena simple o doble del DNA (SSB o DSB, respectivament). Els DSB són les lesions més agressives i l'error en la reparació produeix alteracions cromosòmiques i inestabilitat genòmica (Sancar et al., 2004).

La resposta al dany del DNA (DDR) consisteix en un entramat de vies de senyalització que activen *checkpoints* i mecanismes de reparació i és un factor clau en el manteniment de la integritat genòmica. La via de reparació activada varia segons el tipus de lesió i moment del cicle cel·lular. Els mecanismes de reparació principals dels DSBs són el non-homologous end joining (NHEJ) i la recombinació homòloga (HR). El NHEJ és el mecanisme majoritari de reparació de DSBs i es dona durant tot el cicle cel·lular, en canvi, la HR, degut a la seva necessitat de la cromàtida germana com a motlle de DNA per a la reparació, queda restringida a la fase S tardana i a G2. Igualment, durant aquestes fases del cicle, el NHEJ també pot operar, de manera que l'elecció entre aquestes dues vies de reparació és un procés finament regulat per la cèl·lula (Kakarougkas & Jeggo, 2014).

La reparació per NHEJ s'inicia per la unió de l'heterodímer Ku als DSBs, protegint els extrems de l'acció de les nucleases, tot i que sense impedir l'activació d'ATM i la posterior cascada de senyalització (Liang & Jasin, 1996). El DNA-Ku recluta i activa la subunitat catalítica de la proteïna quinasa de DNA (DNA-PKcs) (Gottlieb & Jackson, 1993), que alhora uneix el complex lligasa que s'encarregarà de la unió dels extrems de DNA escindits (Cottarel et al., 2013). La HR fa servir un motlle de DNA homòleg "sa" per restaurar qualsevol tros de seqüència perdut en el lloc del DSB. Fet que fa a la HR més fidedigna que al NHEJ. La reparació per recombinació homòloga es divideix en tres parts. Primer, es dona la resecció 5'-3' dels extrems,

INTRODUCCIÓ

generant-se una regió de cadena senzilla amb extrem 3' (Symington & Gautier, 2011) reconeguda per RPA (*replication protein A*), que ràpidament s'hi uneix. Posteriorment, RPA és desplaçada per RAD51 via BRCA2 (*breast cancer associated gene 2*) (Pellegrini et al., 2002). La unió de RAD51 porta al segon pas de la HR, la invasió de la cadena homòloga i la formació d'un heterodúplex. Finalment, la reparació es du a terme fent servir la cadena "sana" com a motlle, seguit de la lligació. Una proteïna clau per a l'elecció entre la reparació per NHEJ i HR és 53BP1. S'ha vist que 53BP1 bloqueja la resecció dels extrems, inhibint així la recombinació homòloga i promovent la reparació per NHEJ (Zimmermann & de Lange, 2013).

4.1. Dinàmica de la cromatina

Cada vegada està més clar que l'entorn de la cromatina creat per les PTM de les histones i proteïnes reguladores juga un paper determinant en la DDR (Lukas et al., 2011). Les lesions al DNA desencadenen alteracions en les histones, resituen els nucleosomes i canvien l'estat conformacional de la cromatina. Aquestes modificacions condueixen a l'acumulació massiva de proteïnes a les regions de dany que finalment seran les responsables de l'amplificació de la senyal i reparació del dany.

La primera modificació detectable a la cromatina danyada és la poli(ADP)ribosilació (Polo & Jackson, 2011). Les histones poli(ADP)ribosilades són reconegudes per complexos com NuRD (*nucleosome remodeling and deacetylase*) i polycomb, fet que incrementa la compactació de la cromatina i reprimeix la transcripció de les zones danyades (Messner et al., 2010). No obstant, en determinades ocasions, la poli(ADP)ribosilació pot donar lloc a la relaxació de la cromatina i facilitar l'accés a proteïnes de reparació (Ahel et al., 2009; Gottschalk et al., 2009).

La fosforilació de la Ser 139 d'H2AX (γ -H2AX) per ATM és una altra de les modificacions que primer apareixen als llocs de dany en la DDR (Xiao et al., 2008). MDC1, el principal sensor dels DSBs, s'uneix a γ -H2AX promovent la seva pròpia fosforilació per diferents proteïnes quinases, fet que desencadena una

sèrie d'esdeveniments coordinats a la cromatina i proporciona una plataforma d'unió a diferents proteïnes corrent avall en la DDR (Jungmichel & Stucki, 2010). Tan bon punt MDC1 és reclutat per γ -H2AX és fosforilat per CK2 (casein kinase 2), fet que assegura l'ancoratge d'ATM a la cromatina a través de NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*), el qual uneix simultàniament ATM i MDC1 fosforilat (Polo & Jackson, 2011). Això permet l'escampament de γ -H2AX als nucleosomes veïns. MCPH1 (microcephalin) també pot unir-se a γ -H2AX de manera independent de MDC1. Ambdós poden reclutar enzims remodeladors com SWI-SNF, incrementant la relaxació i impulsant la reestructuració de la cromatina iniciada per els mecanismes dependents de la poli(ADP)ribosilació (Lukas et al., 2011). Quan el dany s'ha reparat, γ -H2AX ha de ser desfosforilat per restaurar l'estat inicial de la cromatina.

MDC1 també coordina l'acetilació de les histones en la DDR a través del reclutament de NuA4 (Xu & Price, 2011). Una de les subunitats del complex NuA4 és l'acetiltransferasa TIP60 que necessita H3K9me3, a més de MDC1, per ser ancorada a la cromatina i activada. Així doncs, per a que TIP60 pugui ser activat, HP1 ha de sortir transitòriament de la cromatina per desemmascarar H3K9me3 (Sun et al., 2009). L'acetilació als llocs de dany, probablement contribueix a l'obertura de la cromatina iniciada per les marques de fosforilació. A més, el complex NuA4 conté la proteïna motora p400, que altera les interaccions entre les histones i el DNA, incrementant l'accessibilitat de les proteïnes reparadores del DNA (Xu et al., 2010). En contraposició, els DSBs també desencadenen l'acumulació de desacetilases d'histones en els llocs de dany. Per exemple, HDAC1 i HDAC2 desacetilen H4K56Ac i H4K16Ac i promouen la reparació per NHEJ (Miller et al., 2010). Això dona suport a quan dinàmica és la regulació de la cromatina en la resposta al dany.

La cromatina adjacent als llocs danyats està poliubiquitinada. Novament, MDC1 coordina la deposició d'aquesta modificació. La fosforilació de MDC1 dependent d'ATM permet el reclutament de les ubiquitin-lligases RNF8 i RNF168, les quals

INTRODUCCIÓ

inicien la cascada d'ubiquitinació (Doil et al., 2009; Stewart et al., 2009). Com a conseqüència, són dirigides a la cromatina les proteïnes protectores del genoma BRCA1, RAD18, PTIP i 53BP1 (Doil et al., 2009; Lukas et al., 2011; Stewart et al., 2009). Alhora, BRCA1 i RAD18 tenen activitat ubiquitinligasa. RAD18, actua com a tal, ubiquitinant 53BP1 i retenint-lo a la cromatina, promovent la reparació per NHEJ durant G1 (Watanabe et al., 2009), però també pot actuar com a plataforma d'unió per a factors de reparació com RAD51C, participant en aquest cas en la reparació per recombinació homòloga (Huang et al., 2009). El complex BRCA1, a part de l'activitat lligasa d'ubiquitina, conté subunitats amb activitat de-ubiquitinasa, de manera que participa en la finalització de la senyal de reparació (Shao et al., 2009). La ubiquitinació d'H2A dependent de RNF8 i RNF168, a part de ser necessària per la reparació, inhibeix l'elongació de la transcripció en les zones danyades, impedit l'activitat de la RNA polIII (Shanbhag et al., 2010). Finalment, la sumoilació d'histones també és important en l'alteració de la cromatina causada com a resposta al dany. Particularment, participa en la formació dels conjugats d'ubiquitina generats per RNF8, RNF168 i BRCA1 (Galanty et al., 2009; Morris et al., 2009).

La metilació d'H3K79 i d'H4K20 participa en la unió i retenció de 53BP1 als llocs de dany. Aquestes marques són constitutives a la cromatina i no semblen variar en la resposta al dany al DNA. Ara bé, es creu que un procés de reubicació dels nucleosomes deixa al descobert les modificacions per ser reconegudes per 53BP1 (Botuyan et al., 2006; Huyen et al., 2004). No obstant, s'ha identificat una metiltransferasa, MMSET, que dimetila H4K20 en els llocs de dany, facilitant la unió de 53BP1. MMSET és fosforilat per ATM, permetent el reclutament per MDC1 als llocs de trencament. Les evidències indiquen que la via per la qual MMSET dimetila H4K20 és independent de la via RNF8-RNF168 (Pei et al., 2011). En un altre treball proposen que la monoubiquitinació d'H4K91 per BBAP (*B-lymphoma and BAL-associated protein*) regula el recanvi de PR-SET7 a la cromatina, fet que directament afecta els nivells d'H4K20me1 i indirectament als d'H4K20me2 i en conseqüència, al

reclutament de 53BP1 per aquesta via (Botuyan et al., 2006; Schotta et al., 2004, 2008; Yan et al., 2009). Fins al moment, segueix havent discrepàncies sobre com 53BP1 reconeix la metilació als llocs de dany i el debat sobre com la metilació i la ubiquitinació cooperen per retenir 53BP1 a la cromatina continua obert.

En resum, el conjunt de modificacions postraduccionals concentrades en els llocs de dany desencadena un seguit d'esdeveniments que condueixen a la reestructuració de l'arquitectura de la cromatina i faciliten l'accés i la unió de les proteïnes implicades en els diferents mecanismes de reparació. En termes generals, una cromatina relaxada i oberta s'associa amb una major eficiència en la DDR. Per contra, com més compactada està la cromatina, més difícil és l'accés de les proteïnes de reparació i més passos intermedis es necessiten per a produir una resposta eficient al dany.

5. Acetiltransferases

Com ja s'ha mencionat anteriorment, l'acetilació de les histones està regulada per les activitats enzimàtiques acetiltransferasa i desacetilasa. Les acetiltransferases d'histones (HATs) estan conservades des de llevats fins a humans. Acostumen a desenvolupar les seves funcions en complexos multiproteics i l'especificitat de substrat ve donada per la composició de les subunitats del complex.

Al 1996, Allis i col·laboradors van purificar per primera vegada l'acetiltransferasa d'histona (HAT1) del protozou *Tetrahymena thermophila*. HAT1 és l'ortòleg del prèviament identificat com a adaptador de la transcripció en llevat, Gcn5 (Brownell et al., 1996). En els últims 20 anys, l'estudi en aquest camp ha avançat notablement i actualment, les HATs es classifiquen en quatre famílies segons l'homologia del seu domini catalític: GNAT (*Gcn5-related histone N-acetyltransferases*), MYST (deuen el seu nom als membres fundadors MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 i TIP60), p300/CBP (Anomenada així pels dos paràlegs humans p300 i CBP) i SRC (*Steroid receptor coactivators*). Cada família de HATs, tot i

INTRODUCCIÓ

realitzar el mateix tipus de reacció, fa servir una estratègia catalítica diferent. A més, l'activitat acetiltransferasa està regulada al menys de dues maneres, a través de la interacció amb altres proteïnes reguladores formant complexos multiproteïcs i a través de l'autoacetilació (Taula3).

Les proteïnes del complex modulen l'activitat acetiltransferasa, i a través de dominis de reconeixement de PTMs donen especificitat de substrat i dirigeixen a la HAT a un locus específic.

5.1. Família MYST

A mamífers hi ha 5 acetiltransferases MYST descrites. Totes elles contenen un domini catalític

MYST amb un lloc d'unió a acetil-CoA i un dit de zinc del tipus C2HC. S'agrupen en tres grups segons els dominis que comparteixen. Primer, MOZ (KAT6A) i MORF (KAT6B), ortòlegs de l'acetiltransferasa de llevat Sas3 (KAT6), contenen mòduls PHD que reconeixen lisines i arginines metilades. Segon, MOF (KAT8) i TIP60 (KAT5) són els equivalents de llevat Sas2 i Esa1, respectivament i comparteixen un domini chromo-barrel (CBD), que a diferència dels dominis chromo, no pot unir-se a metil-lisines per falta de l'anell aromàtic clau pel reconeixement d'aquesta marca (Nielsen et al., 2005). Finalment, HBO1 (KAT7) que conté un dit de zinc (Sapountzi & Côté, 2011).

Família HAT	HAT (mamífers)	Complex	Histona substrat	Funcions principals
GNAT	HAT1 (KAT1)	HatB	H4 (K5, 12)	Deposició d'histones, Reparació DNA
	Gcn5 (KAT2A)	SAGA, TFIC, ATAC	H3 ((K9, 14, 18) H2B)	Activació transcripció
	PCAF (KAT2B)	PCAF	H3 (K9, 14, 18), H2B	Activació transcripció
	TAF1 (KAT4)	n.d.	H3, H4	Activació transcripció
P300/CBP	CBP (KAT3A)	n.d.	H2A (K5), H2B (K12, 15)	Activació transcripció
	P300 (KAT3B)	n.d.	H2A (K5), H2B (K12, 15)	Activació transcripció
MYST	TIP60 (KAT5)	NuA4, piccolo NuA4	H4 (K5, 8, 12, 16), H2A, H2AX, H2AZ	Activació transcripció, Reparació DNA, Desenvolupament, Renovació cèl·lules mare
	MOZ (KAT6A)	ING5	H3 (K14)	Activació transcripció
	MORF (KAT6B)	ING5	H3 (K14)	Activació transcripció
	HBO1 (KAT7)	ING4, ING5	H4 (K5, 8, 12), H3	Activació transcripció, Replicació DNA
	MOF (KAT8)	MSL, NSL, MLL	H4 (K16)	Regulació transcripció, Reparació DNA, Control cicle cel·lular, Apoptosi, Resposta estrès, hiperactivació cromosoma X Drosophila
SRC	SRC1 (KAT13A)	n.d.	H3, H4	Coactivador de receptor d'esteroids
	ACTR (KAT13B)	n.d.	H3, H4	Coactivador de receptor d'esteroids

Taula 3. Acetiltransferases d'histona. S'especifica la família a la que pertany l'acetiltransferasa, el complex majoritari del que forma part, així com els substrats i les funcions principals. CBP, *CREB transcriptional factor binding protein*; Gcn5, *general control nonderepressible-5*; GNAT, *Gcn5-related histone N-acetyltransferases*; HBO1, *histone acetyltransferase binding protein to ORC1*; MORF, *MOZ related factor*; MOZ, *monocytic leukemia zinc finger protein*; NuA4, *nucleosomal acetyltransferases of H4*; PCAF, *p300/CBP-associated factor*; SAGA, *Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase*; SRC, *steroid receptor coactivators*; TAF1, *transcription initiation factor 1*; TFIC, *TBP-free TAF-containing complex*; TIP60, *HIV Tat interacting protein of 60 KDa*. Adaptat de Allis et al. 2007 (Allis et al., 2007)

INTRODUCCIÓ

5.1.1. MOF, una acetiltransferasa singular

Històricament, dMOF, va emergir com l'acetiltransferasa responsable de l'acetilació d'H4K16 en la compensació de dosi a *Drosophila* (Akhtar & Becker, 2000; Hilfiker et al., 1997; Turner et al., 1992). Els mascles de *Drosophila* tenen una còpia del cromosoma X, mentre que les femelles en tenen dues. La compensació gènica entre els dos gèneres es dona per duplicació de la taxa de transcripció dels gens del cromosoma X dels mascles. Això està mediat pel complex de compensació de dosi (DCC), també conegut com el complex *Male Specific Lethal* (MSL), degut a que els mutants de pèrdua de funció dels seus components són letals específicament en mascles (Turner et al., 1992). El complex MSL de *Drosophila* només és present als mascles i està conformat per 5 proteïnes, anomenades MSL1 (*male specific lethal-1*, proteïna plataforma), MSL2 (*male specific lethal-2*, proteïna amb dit de RING), MSL3 (*male specific lethal-3*, proteïna amb domini chromo), dMOF (*males absent on the first*, acetiltransferasa d'histona) i MLE (*maleless*, helicasa d'RNA), i dos RNA no codificants funcionalment redundants: roX1 (*RNA on the X1*) i roX2 (*RNA on the X2*) (Akhtar et al., 2000; Beckmann et al., 2005; Gu et al., 1998; Meller et al., 2000). Tot i que hi ha controvèrsia sobre com el complex MSL és dirigit específicament al cromosoma X, sembla que el més probable és que hi hagi una coordinació entre diferents factors, incloent seqüències específiques d'alta afinitat (HAS, *high affinity sequence*) al DNA que serien reconegudes per MSL2, dominis de reconeixement en els components del complex i les modificacions d'histona H3K36me3 i H4K20me1/me2 (Keller & Akhtar, 2015; Larschan et al., 2007; Moore et al., 2010). Un cop al cromosoma X, dMOF s'encarrega de l'acetilació d'H4K16 fet que correlaciona amb la duplicació de la transcripció (Akhtar & Becker, 2000).

Posteriorment, es va identificar dMOF com a part del complex de *Drosophila* NSL (*non specific lethal*). NSL s'uneix a zones promotores de gens en autosomes i al cromosoma X tant de mascles com femelles i és el responsable de l'acetilació de K16 al

llarg de tot el genoma (Cai et al., 2010; Mendjan et al., 2006; Raja et al., 2010). NSL regula l'expressió de gens de manteniment cel·lular (Lam et al., 2012).

Ambdós complexos, MSL i NSL, es troben a mamífers i són els responsables de l'acetilació d'H4K16 en tot el genoma (Mendjan et al., 2006; Smith et al., 2005). L'ortòleg humà del dMOF de *Drosophila* (MOF) presenta una activitat catalítica i especificitat de substrat conservada, tot i que a més d'H4K16 també acetila altres substrats no histònics (Neal et al., 2000). Les funcions de MOF als mamífers difereixen de les de *Drosophila*, doncs tant mascles com femelles deficientes en MOF moren durant l'estadi de blastocist, essent MOF imprescindible pel desenvolupament embrionari (Gupta et al., 2008; Thomas et al., 2008). La pèrdua de MOF porta a la desaparició d'H4K16Ac i correlaciona amb la disminució de l'expressió gènica i la proliferació, anomalies en l'estructura de la cromatina i la reparació del DNA i la consegüent aparició d'aberracions cromosòmiques i inestabilitat genòmica (Gupta et al., 2008; Smith et al., 2005; Thomas et al., 2008).

L'estructura de MOF està conservada al llarg de l'evolució. Com la resta d'enzims de la família MYST conté un domini catalític amb un dit de zinc C2HC que, a *Drosophila*, és necessari per l'activitat i pel reconeixement de substrat, i una regió d'unió a acetil-CoA, amb un residu glutamina conservat (E350), imprescindible per l'activitat de l'enzim (Akhtar & Becker, 2001; Berndsen et al., 2007; Hilfiker et al., 1997). A més, conté un domini chromo-barrel que sembla ser important per la unió als nucleosomes i per l'activitat de l'enzim (Fig. 12) (Conrad et al., 2012; Nielsen et al., 2005).

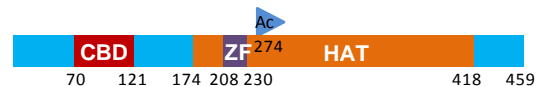


Figura 12. Diagrama dels dominis de MOF. CBD, domini chromo-barrel; HAT, domini catalític, ZF, dit de zinc del tipus C2HC.

L'activitat catalítica de MOF es regula a dos nivells. En primer lloc, MOF pot ser modificat postraduccionament. L'autoacetilació de la lisina 274, dins del domini catalític comporta un canvi

INTRODUCCIÓ

conformacional permetent la unió del substrat i la subsegüent acetilació (Yuan et al., 2012). S'ha descrit que SirT1 desacetila aquest residu, inactivant l'enzim i promovent la seva degradació pel proteosoma (Peng et al., 2012). Per una altra banda, l'activitat i localització de MOF està modulada pels components dels complexos dels que forma part. Fins al moment, es coneixen tres complexos que contenen MOF, els ja esmentats MSL i NSL, i el complex activador de la transcripció MLL (*mixed lineage in leukemia*) (Taula 4).

Estudis recents a escala genòmica en mESCs (cèl·lules mare embrionàries de ratolí, de les sigles en anglès) mostren que tot i que MOF es troba majoritàriament formant part del complex NSL, és el complex MSL el responsable de l'acetilació global d'H4K16 (Chelmicki et al., 2014; Ravens et al., 2014; Smith et al., 2005). Es proposa que el complex MSL és reclutat a la cromatina pel reconeixement específic d'H3K36me3 i d'H4K20me1/me2 mitjançant el domini chromo de MSL3, tot i que això s'ha vist a *Drosophila* i manca un estudi detallat en mamífers (Larschan et al., 2007; Moore et al., 2010). MSL i NSL tenen un efecte combinatori en la regulació de gens de manteniment cel·lular en mESCs, trobant-se MSL majoritàriament al cos dels gens i NSL a la regió promotora. Encara que, MSL i NSL també tenen funcions diferenciades. Per exemple, MSL està enriquit en gens de manteniment de la pluripotència com Nanog, Oct4 o Sox2, gens específics de tipus cel·lular, així com a la regió reguladora del gen Tsix (gen invers de Xist), que

juga un paper controlador del lncRNA Xist durant la inactivació del cromosoma X de les femelles (Augui et al., 2011; Chelmicki et al., 2014; Li et al., 2012; Ravens et al., 2014). En canvi, NSL és important en la regulació de gens de proliferació, doncs les cèl·lules deficientes en NSL1 s'aturen a la fase G1 del cicle cel·lular (Ravens et al., 2014).

Tot i que NSL i MSL estan estrictament lligats a la regulació de la transcripció, en molts casos, especialment en el cas del complex NSL, la distribució de MOF i K16Ac no sempre coincideix, indicant que MOF, en el complex NSL, controla l'expressió gènica a través de vies alternatives a l'acetilació de K16 (Li et al., 2012). En el complex NSL, MOF presenta una especificitat de substrat més àmplia, ja que acetila els residus K5, K8 i K16 d'H4 i se l'associa amb activitats metiltransferasa (Cai et al., 2010). En determinats gens diana, l'activitat acetiltransferasa de MOF en el complex NSL es coordina mitjançant WDR5 amb l'activitat metiltransferasa del complex MLL. Aquest procés és dependent de p53. En resposta a dany NSL1 interacciona amb p53 i MOF l'acetila a la lisina 120. A les regions promotores d'aquests gens, MOF acetila H4K16 i a través de l'activitat metiltransferasa de MLL es diposita H3K4me3, resultant amb l'activació de la transcripció (Fig.13) (Dou et al., 2005; Li et al., 2009). Entre d'altres gens regulats per p53, MOF activa l'expressió de PUMA i BAX, dues proteïnes essencials en la via de l'apoptosi (Li et al., 2009).

COMPLEX	COMPONENTS	SUBSTRAT	FUNCIÓ
MSL	MSL1, MSL2, MSL3, MOF	H4K16	Transcripció gens específics i Housekeeping, Inactivació del X
NSL	MCRS1, HCF1, WDR5, PHF20, OGT1, NSL1, NSL2, NSL3, MOF	H4K5, K8, K16	Transcripció gens Housekeeping
MLL	ASH2L, MLL1, MLL2, MLL3, MLL4, MENIN, HCF1, WDR5, SETD1A, PTIP, RBBP5, MOF	H4K16 H3K4	Transcripció gens diana dependent de factors de transcripció

Taula 4. Complexes de MOF. S'especifica el nom del complex, els principals components, substrats i funcions. MSL, *male specific lethal*; NSL, *non specific lethal*; MLL, *mixed lineage in leukemia*; MCRS1, *microspherule protein 1*; HCF1, *host cell factor 1*; WDR5, *WD repeat-containing protein 5*; PHF20, *plant homeodomain finger protein 20*; OGT1, *O-linked N-acetylglucosamine transferase isoform 1*; RBBP5, *retinoblastoma binding protein 5* (Cai et al., 2010; Dou et al., 2005; Smith et al., 2005).

INTRODUCCIÓ

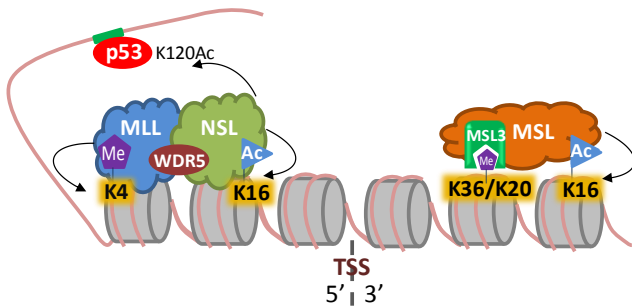


Figura 13 Paper dels complexos de MOF en l'activació de la transcripció. El complex NSL és reclutat als promotors dels gens diana a través de la interacció coordinada amb el complex MLL i p53. Un cop a la cromatina, NSL acetila p53K120 i H4K16 i MLL trimetila H3K4, activant la transcripció. El reclutament del complex MSL a 3' del TSS juga un paper molt important en l'elongació de la transcripció (Dou et al., 2005; Kapoor-Vazirani et al., 2011; Li et al., 2009; Zippo et al., 2009).

A part de les funcions que MOF exerceix a la cromatina en forma dels complexos descrits, MOF està associat a molts altres processos en els que encara es desconeix si actua sol o en forma de complex. Entre aquestes funcions es troben la regulació de la transcripció, el control del cicle cel·lular, la proliferació i la resposta a estrès, incloent la reparació del DNA i l'apoptosi.

MOF regula la transcripció de diferents maneres: Primer, acetilant H4K16 a la regió 3' del TSS i en zones intergèniques marcant *enhancers* actius, i segon, unint-se a la regió promotora al voltant del TSS, on regula la transcripció a través de l'acetilació de K16 però també via mecanismes independents d'H4K16Ac. A més, sembla que la implicació de MOF i H4K16Ac en la regulació de la transcripció és dependent de tipus cel·lular i del moment de l'estadi de diferenciació (Horikoshi et al., 2013; Li et al., 2012; Ravens et al., 2014; Sheikh et al., 2015; Taylor et al., 2013). Concretament, en cèl·lules mare embrionàries, MOF regula gens implicats en el manteniment de la pluripotència i l'autorenovació, com són Nanog, Oct4 i Sox2, unint-se a les regions promotores, adjacents als TSS. En aquestes zones però, la unió de MOF i la distribució de K16Ac no sempre coincideix, indicant que la regulació en aquest cas no és només a través d'H4K16 (Li et al., 2012; Ravens et al., 2014). En les mateixes cèl·lules, MOF s'uneix a les regions 3' dels TSS i manté reprimida l'expressió de gens implicats en la diferenciació cel·lular i el desenvolupament

embrionari (Li et al., 2012). Confirmant el paper de MOF en la iniciació de la transcripció, s'ha trobat que MOF colocalitza amb H3K4me3 i WDR5 en zones de 2 kb al voltant del TSS de gens que estan positivament regulats per MOF. Aquestes regions són dominis de cromatina bivalents (Bernstein et al., 2006), marcats tant amb la modificació d'activació H3K4me3 com amb la de repressió H3K27me3. Quan comença la diferenciació cel·lular, els nivells de MOF i K16Ac disminueixen, permetent la ràpida expressió d'aquests gens (Li et al., 2012). En un altre estudi, es proposa un nou tipus d'*enhancers* actius en ESCs, marcats amb MOF, H4K16Ac i H3K4me1 i que són independents d'H3K27Ac i p300 (Taylor et al., 2013). Recentment, en cèl·lules de ronyó humanes, s'ha descrit que prop dels 3000 gens regulats per MOF en ESCs, només 73 estan controlats per MOF a través de l'acetilació de K16 a les regions a 10kb dels TSS (Horikoshi et al., 2013; Li et al., 2012). Indicant que en aquest tipus cel·lular, la regulació de la transcripció dependent de MOF es fa a través de K16Ac en les regions promotores en una molt petita proporció, i que possiblement, MOF regula l'expressió gènica a través de l'acetilació de K16 en altres regions allunyades del TSS, o a través de vies independents de K16Ac. Aquestes dades juntes indiquen que MOF i H4K16Ac són molt importants per la transcripció en ESCs i que possiblement el paper en cèl·lules més diferenciades sigui menor, tot i que segueix sent indispensable, ja que en tots els tipus cel·lulars estudiats, MOF regula gens implicats en la progressió del cicle cel·lular, la replicació del DNA, reparació de dany i apoptosi (Horikoshi et al., 2013; Li et al., 2012; Taylor et al., 2013). En un estudi independent, es mostra la possible interacció entre diferents marques epigenètiques en el control de la transcripció. En molts gens humans, la RNA Pol (polimerasa) II s'uneix als promotors, inicia la transcripció però poc després del TSS s'atura. Es proposa que aquests promotors tenen les illes CpG desmetilades i H4K20me3. Per alliberar la RNA Pol II de la pausa, s'ha de desmetilar H4K20 i MOF ha de ser reclutat a aquestes regions per acetilar H4K16Ac (Kapoor-Vazirani et al., 2011). Subsegüentment, es reactiva la transcripció gràcies al reclutament del complex BRD4-pTEF mitjançant el reconeixement específic d'H4K16Ac pel domini bromo de BRD4 (Kapoor-

INTRODUCCIÓ

Vazirani et al., 2011; Zippo et al., 2009). Aquest fet indica que H4K20me3 inhibeix la transcripció impedit l'acetilació d'H4K16 dependent de MOF (Kapoor-Vazirani et al., 2011).

Majoritàriament, MOF, a través de l'acetilació d'H4K16, promou el relaxament de la cromatina. No obstant, MOF promou el silenciament i la formació d'heterocromatina a les regions d'rDNA, mitjançant l'acetilació de TIP5, el component més gran del complex remodelador de la cromatina NoRC. NoRC recluta enzims modificadors d'histones i metiltransferases de DNA i desencadena la compactació de la cromatina de les regions de rDNA que s'han de mantenir silenciades (Zhou et al., 2009).

MOF juga un paper important en la resposta al dany al DNA i en el manteniment de la integritat del genoma. Així ho indica l'aparició espontània d'instabilitat genòmica, l'augment de les aberracions cromosòmiques, l'activació el *checkpoint* de G2/M dependent d'ATM i la disminució de la supervivència en les cèl·lules deficientes en MOF (Gupta et al., 2008; Gupta et al., 2005; Li et al., 2010; Taipale et al., 2005). MOF és important per la reparació del DNA tant per NHEJ com per HR a dos nivells diferents. Primer, a través de l'acetilació d'H4K16 en resposta a dany, influeix en el reclutament de proteïnes mediadores entre la senyalització del dany i la reparació. Tot i que els nivells d'H4K16Ac no semblen augmentar d'una manera localitzada als llocs de trencament, si que ho fan globalment, permetent l'obertura de la cromatina (Gupta et al., 2005; Sharma et al., 2010). La cua bàsica d'H4 interacciona amb la butxaca àcida d'H2AX per formar estructures de cromatina condensada. L'acetilació de K16 pertorba aquesta interacció i permet la unió entre γ -H2AX i MDC1 als llocs de trencament i el posterior reclutament de 53BP1 (Li et al., 2010). Segon, mitjançant la interacció amb 53BP1, MOF és determinant a l'hora d'escollir entre NHEJ o HR. Durant les fases S i G2, després de sotmetre cèl·lules a irradiació, ATM fosforila MOF392. MOF fosforilat interacciona més feblement amb 53BP1, el qual és eliminat de la cromatina permetent la resecció del DNA i el reclutament de proteïnes necessàries per la HR, com BRCA1, CtIP, RAD51, RAD52, RPA2, hSSB1

(*human single-stranded DNA binding protein*) MRE11, RAP80 i FANCD2. En situació de dany durant G1, ATM no fosforila a MOF, MOF és reclutat a la cromatina i interacciona fortament amb 53BP1 que desencadena la reparació per NHEJ (Gupta et al., 2014; Sharma et al., 2010). Contràriament, Hsiao i col·laboradors mostren que els nivells d'H4K16Ac baixen en els focus de dany i això afavoreix la unió de 53BP1 a H4K20me2 (Fig. 17) (Hsiao & Mizzen, 2013). Aquesta controvèrsia pot ser deguda a la variabilitat experimental. Depenent del moment en que es faci l'estudi després del dany, els nivells d'H4K16Ac poden variar. Possiblement, en un inici augmentin, permetent el reclutament de MDC1 i al cap d'una hora, com mostren Hsiao i col·laboradors, disminueix quedant al descobert H4K20me2 i permetent el reclutament de 53BP1.

Cèl·lules humanes tractades amb shRNA de MOF i cèl·lules de ratolí *mof*^{-/-} presenten anomalies en la progressió del cycle cel·lular, acumulant-se en G2/M, possiblement per l'alteració de l'expressió de gens implicats en replicació i progressió del cycle cel·lular i/o per l'activació del *checkpoint* de G2/M degut al dany acumulat (Li et al., 2010; Sheikh et al., 2015; Smith et al., 2005; Taipale et al., 2005). La pèrdua de MOF, d'H4K16Ac i les anomalies del cycle van acompanyades d'una senescència prematura (Krishnan et al., 2011; Li et al., 2010). Els últims estudis que relacionen MOF amb la progressió del cycle cel·lular a través de G2/M, suggereixen que MOF és necessari, no només per la resposta al dany al DNA, sinó pel manteniment de l'expressió de gens implicats en la progressió del cycle cel·lular (Sheikh et al., 2015).

Hi ha diversos estudis que relacionen MOF amb l'aparició i desenvolupament tumoral. La sobreexpressió de MOF correlaciona amb augment d'H4K16Ac i transformació oncogènica en ratolins (Gupta et al., 2008). En càncer de pulmó de cèl·lules no petites (NSCLC) MOF està sobreexpressat, fet que correlaciona amb el creixement tumoral, metastasi i pitjor prognosi. MOF regula el factor de transcripció Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*). Nrf2 regula la transcripció de gens amb funció antioxidant i detoxificant. MOF acetila Nrf2 retenint-lo a nucli i

promovent la transcripció dels gens esmentats proporcionant resistència davant de l'estrès oxidatiu i del tractament anticancerós (Chen et al., 2014). En canvi, en altres tipus de càncer com càncer de pit primari, medul·loblastoma, carcinoma de cèl·lula renal o càncer d'ovari, els nivells de MOF estan regulats a la baixa (Liu et al., 2013; Pfister et al., 2008; Wang et al., 2013).

6. Desacetilases

Com ja s'ha dit abans, l'acetilació d'histones està regulada per l'activitat oposada d'acetiltransferases i desacetilases d'histona (HDACs). Les HDACs són enzims arcaics evolutivament parlant i estan presents a eucariotes i a procariotes, tot i que aquests últims no tenen histones. Així doncs, les HDACs van aparèixer abans que els seus substrats cromatínics, el que indica que a part de la funció desacetilasa d'histona i reguladora de la cromatina, estan involucrades en altres processos dins la cèl·lula. Tant és així que aquests enzims se'ls relaciona amb la formació de l'heterocromatina, la reparació del DNA, la regulació del cicle cel·lular, diferenciació cel·lular i desenvolupament. Han estat dividits filogenèticament en 3 classes segons la seva homologia amb *Saccharomyces cerevisiae*: Rpd3 (classe I), Hda1 (classe II) i Sir2 (classe III). Recentment, HDAC11 s'ha agrupat en la classe IV (Taula 5). La classe I, II i IV són mecanísticament semblants. Requereixen d'un ió de zinc per a la hidròlisi i alliberació del grup acetil al medi aquós. S'inhibeixen amb tractament de TSA (*Trichostatin A*) (Ekwall, 2005). En canvi, la classe III o sirtuïnes conforma una família d'enzims que fa servir NAD^+ com a cofactor de la reacció i transfereixen el grup acetil a una molècula d'ADP-ribosa provinent del NAD^+ . En comptes d'inhibir-se amb TSA s'inhibeixen amb nicotinamida (NAM) (Imai et al., 2000).

6.1. HDACs III: Família de les Sirtuïnes

La família Sir2 (*silent information regulator*) o sirtuïnes van ser descrites originalment a *S.*

cerevisiae, com a enzims involucrats en el silenciament transcripcional de tres locus principals del llevat (locus del *mating type*, telòmers i rDNA repetitiu), la recombinació dels rDNA, la reparació del DNA i el control de la longevitat (Guarente, 1999). Per a dur a terme la reacció enzimàtica necessiten NAD^+ com a co-factor, fet que uneix el metabolisme cel·lular amb el control de la transcripció i l'envelliment (Imai et al., 2000). La reacció de desacetilació es duu a terme en tres passos: 1. l'enzim s'uneix al NAD^+ , 2. en presència del substrat amb la lisina acetilada, Sir2 catabolitzava el NAD^+ generant una molècula d'ADP-ribosa activada i nicotinamida, que és alliberada, 3. l'enzim catalitza la transferència del grup acetil a l'ADP-ribosa, donant lloc al producte desacetilat i a *O*-acetil(ADP)ribosa (Fig. 14) (Landry et al., 2000; Sauve & Schramm, 2003). S'ha descrit que l'*O*-acetil(ADP)ribosa pot, posteriorment, servir com a molècula senyalitzadora mitjançant la unió a diferents factors i que l'ús de nicotinamida inhibeix l'activitat catalítica de les sirtuïnes. A part, les sirtuïnes també presenten activitat ADP-ribosiltransferasa, desuccinilasa i demalonilasa, tot i que el coneixement d'aquests processos és més limitat (Fahie et al., 2009; He et al., 2012).

Els homòlegs procariotes de la família Sir2 estan relacionats amb fosforibosiltransferases implicades en metabolisme. Això podria explicar les similituds entre el mecanisme catalític de Sir2 i les mono- i poli(ADP)ribosiltransferases. Un dels ortòlegs més primitius que es coneix és CobB, un enzim de *Salmonella* que modula l'activitat de l'acetil-CoA sintetasa (ACS) a través de la desacetilació dependent de NAD^+ (Starai et al., 2002). Aquest enzim també és important per la síntesis de la vitamina B12 o cobalamina (Tsang & Escalante-semerena, 1998). Posteriorment, als eucariotes, les sirtuïnes van divergir en 5 membres (Sir2p, Hst1-4p (*homologs of Sir2*)) i es van diversificar les seves funcions. Tots ells comparteixen un domini catalític central d'aproximadament 250 aminoàcids, conservat des de bacteris a humans. Aquesta regió conté dos dominis diferenciats: un plegament de Rossmann on s'uneix el NAD^+ i un llaç de zinc que estabilitza l'estructura (Min et al., 2001). Al llarg de l'evolució han anat apareixent motius addicionals cap a la regió

INTRODUCCIÓ

Família HDAC	HDAC (mamífers)	Complex	Histona substrat	Funcions principals
Classe I (Rpd3)	HDAC1	Sin3, NuRD, CoREST, NCoR/SMRT, PRC2	H3Ac, H4K16Ac	Co-repressió transcripcional
	HDAC2	Sin3, NuRD, CoREST, PCR2	H3(K56, K9)Ac, H4K16Ac	Co-repressió transcripcional
	HDAC3	NCoR/SMRT	H2AAc, H3(K9, K14)Ac, H4 (K5, K12)Ac	Heterocromatina, Reparació DNA, Co-repressió transcripcional, Cicle cel·lular
	HDAC8	n.d.	H2A, H2B, H3, H4	Co-repressió transcripcional, Cicle cel·lular
Classe II (Hda1)	HDAC4	NCoR/SMRT	H3	Co-repressió transcripcional, Reparació DNA
	HDAC5	NCoR/SMRT	n.d.	Co-repressió transcripcional, Heterocromatina, Replicació
	HDAC6	n.d.	n.d.	Reparació DNA, Migració cel·lular
	HDAC7	NCoR/SMRT	n.d.	Co-repressió transcripcional
	HDAC9	n.d.	H3, H4	Co-repressió transcripcional
	HDAC10	n.d.	H4	Co-repressió transcripcional
Classe III (Sir2)	SirT1	NCoR/SMRT	H1K26Ac, H3K9Ac, H4K16Ac	Repressió transcripció, Formació heterocromatina, Apoptosi, Supervivència cel·lular, Cicle cel·lular, Reparació DNA
	SirT2	n.d.	H4K16Ac	Cicle cel·lular, Reparació DNA, Supervivència cel·lular
	SirT3	n.d.	H3K9Ac, H4K16Ac	Repressió transcripció, Reparació DNA, Mort cel·lular
	SirT4	n.d.	n.d.	Catabolisme
	SirT5	n.d.	n.d.	Catabolisme
	SirT6	n.d.	H3(K9, K56)Ac	Reparació DNA, Repressió transcripció, Estructura cromatina
	SirT7	n.d.	H3K18Ac	Regulació rDNA, Repressió transcripció
Classe IV	HDAC11	n.d.	H3, H4	Replicació, Regulació transcripció

Taula 5. Classificació de desacetilases. NCoR, correpresor 1 de receptor nuclear; n.d., no hi ha dades; NuRD, *nucleosome remodeling deacetylase*; PRC2, *polycomb repressive complex 2*; SMRT, *silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*. Adaptat de Ruijter et al. 2003 (Ruijter et al., 2003).

C-terminal i N-terminal. Aquests dominis han permès noves localitzacions dins de la cèl·lula i la diversificació i especialització de les funcions de les sirtuïnes. A mamífers hi ha 7 sirtuïnes, anomenades SirT1-SirT7 (Taula 6). Cada una d'elles difereix en la localització cel·lular, l'activitat catalítica i substrat, fet que els permet cobrir un ampli ventall de funcions classificades en quatre processos: regulació de la cromatina, supervivència cel·lular en condicions d'estrès, regulació del metabolisme i desenvolupament i diferenciació cel·lular. La importància de les sirtuïnes en totes aquestes vies les relaciona amb

diferents desordres com càncer, diabetis, malalties cardiovascular i malalties neurodegeneratives (Vaquero & Reinberg, 2008).

Les sirtuïnes han estat classificades filogenèticament des de bacteris fins a humans en cinc grups d'acord amb Frye (Frye, 2000): Classe I, inclou membres relacionats amb la regulació de la cromatina, entre altres funcions, que presenten activitat desacetilasa real (SirT1-SirT3). Les sirtuïnes d'origen procariota implicades en el control del metabolisme conformen la classe II, les quals semblen tenir una activitat primària ADP-ribosiltransferasa i estan localitzades

INTRODUCCIÓ

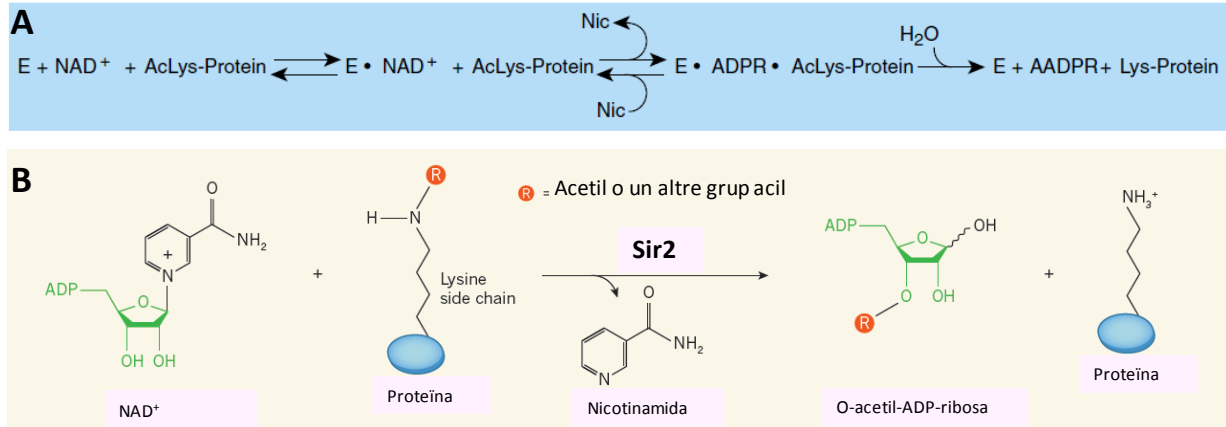


Figura 14. Reacció enzimàtica de desacetilació de la família Sir2. A, La reacció enzimàtica de les sirtuïnes està composta per tres passos seqüencials, els dos primers són reversibles i l'últim és irreversible. L'enzim (E) catalitza la desacetilació d'un substrat acetilat (AcLys-Protein) en presència de NAD^+ . Els tres passos impliquen, la unió de l'enzim al NAD^+ , la catabolització del NAD^+ en presència de la proteïna acetilada alliberant nicotinamida (Nic) i formant-se l'intermediari enzim-ADP-Ribosa-proteïna acetilada i finalment, l'alliberació de la proteïna desacetilada i una molècula d'O-acetil-ADP-ribose (AADPR). B, reacció simplificada de desacetilació. Adaptat de Sauve i Schramm, 2003 i Vaquero et al., 2007 (Sauve & Schramm, 2003; Vaquero et al., 2007)

al mitocondri (SirT4). La classe III també consisteix en un grup relacionat amb sirtuïnes procarïotes i inclou la majoria de les sirtuïnes de bacteris, però també membres de les eucariotes localitzats a mitocondri (SirT5). La classe IV agrupa membres de sirtuïnes eucariotes relacionats amb la cromatina (SirT6, SirT7) i tot i que originalment es va suggerir que només tenien activitat ADP-ribosiltransferasa, recentment s'ha descrit que SirT6 desacetila H3K9Ac a telòmers i que SirT7 desacetila H3K18Ac controlant l'expressió gènica (Barber et al., 2012; Michishita et al., 2008). Finalment, la classe U engloba altres sirtuïnes procarïotes poc caracteritzades.

La majoria de sirtuïnes pot canviar la seva localització en funció del tipus cel·lular, estadi del desenvolupament, moment del cycle cel·lular o estat metabòlic de la cèl·lula, fet que suggereix que la localització té un paper important en la regulació de la funció d'aquests enzims (Vaquero & Reinberg, 2008).

Al llarg de l'evolució, les sirtuïnes s'han diversificat i han adquirit noves funcions. Moltes d'aquestes noves adquisicions estan directament relacionades amb un increment de la complexitat i amb el control de l'estabilitat genòmica. Prova d'això és que ratolins deficientes en SirT1-4 i SirT6 presenten nivells més alts d'instabilitat genòmica. En aquesta línia, les

sirtuïnes coordinen diferents processos relacionats amb l'estructura de la cromatina, la reparació del DNA i la progressió del cycle cel·lular per assegurar la integritat genòmica en condicions d'estrès (Sima et al., 2015).

A nivell d'estructura de cromatina, SirT1 i SirT6 han estat relacionades amb el manteniment de l'heterocromatina constitutiva, tot i que només SirT1 té un paper important en la formació de l'heterocromatina facultativa. En condicions d'estrès, SirT1 desacetila H4K16Ac en regions eucromàtiques, promovent la trimetilació d'H3K9 per Suv39h1, el reclutament de la histona H1 i la propagació de les marques d'heterocromatina H3K9me3 i H4K20me1, donant lloc a regions d'heterocromatina facultativa. En la regulació de l'heterocromatina constitutiva, SirT1 també té un paper destacat, ja que regula tant les regions pericentromèriques com les telomèriques (Vaquero et al., 2007). Fins ara, SirT6 només havia estat relacionada amb el manteniment de l'heterocromatina dels telòmers, tot i que en un treball recent, se l'ha involucrat en el control de l'heterocromatina centromèrica (Michishita et al., 2009; Tasselli et al., 2016).

Les sirtuïnes participen en la senyalització i reparació del dany al DNA, tant de trencament de cadena senzilla (SSB) com de doble cadena (DSB).

INTRODUCCIÓ

Concretament, en el cas de la reparació de SSB, SirT6 promou la reparació per excisió de base (BER) facilitant l'accés a la cromatina de factors de reparació (Mostoslavsky et al., 2006). SirT1 regula la reparació per excisió de nucleòtid (NER) promovent la interacció entre XPA i RPA32, succés essencial en aquesta via de reparació i per una altra banda, SirT1 afavoreix l'expressió d'XPC, mantenint el seu repressor fora del nucli (Fan & Luo, 2010; Ming et al., 2010). En la reparació de DSB, SirT1, SirT2 i SirT6 treballen a diferents nivells. SirT1 participa en la senyalització del dany en diferents punts i tant SirT1 com SirT6 estan implicats en la reparació per NHEJ i per HR. Sobre SirT2 i reparació de DNA se'n sap bastant menys. Les dades que hi ha semblen indicar que SirT2 estaria implicat en la resposta al dany de manera dependent del cicle cel·lular, ja que SirT2 desacetila H3K56Ac durant la fase S i H4K16Ac durant G2/M, dues marques relacionades amb reparació (Sima et al., 2015).

De totes les sirtuïnes, només SirT2 i en menor mesura SirT1, han estat relacionades amb el control del cicle cel·lular. SirT2 és necessària per a la progressió per la fase S i té un paper fonamental durant la mitosi, reflex d'això és el seu canvi de localització de citoplasma a nucli durant aquesta fase del cicle (North & Verdin, 2007b; Vaquero et al., 2006). SirT2 controla l'entrada a mitosi a través de la desacetilació d'H4K16Ac i la regulació de la deposició d'H4K20me1, i en situació d'estrès participa en l'activació del *checkpoint* de G2/M (Serrano et al., 2013). SirT2 també se l'ha relacionat amb el *checkpoint* del fus mitòtic, regulant l'activitat d'APC/C i de BUBR1 (Kim et al., 2011; North et al., 2014; Suematsu et al., 2014). El paper de SirT1 en el cicle està relacionat amb la transició G1/S i mitosi. En el primer cas, SirT1 regula RB i E2F1. RB és un supressor tumoral que controla la transició G1/S mantenint inhibida l'expressió dependent de E2F. SirT1 desacetila RB inhibint l'apoptosi dependent de RB i promovent la progressió cel·lular (Wong & Weber, 2007). En el segon cas, SirT1, mitjançant la desacetilació d'histones, participa en el reclutament del complex Condensina I i de la histona H1 a la cromatina, assegurant la correcta compactació de la cromatina durant mitosi (Fatoba & Okorokov, 2011).

Així doncs, sota condicions d'estrès, les sirtuïnes cooperen per mantenir la integritat cel·lular i l'estabilitat genòmica. Tot i així, quan la situació no pot ser solucionada amb èxit, les sirtuïnes també participen en l'activació de l'apoptosi. Per exemple, en situació d'estrès sever, SirT1 i SirT2, a través de la regulació del factor de transcripció FOXO, activen la mort cel·lular programada (Sima et al., 2015).

6.1.2. SirT2

SirT2 és l'ortòleg de mamífer de la proteïna Hst2p de llevat (Afshar & Murnane, 1999; Perrod et al., 2001). Ambdues proteïnes són majoritàriament citoplasmàtiques i els manca la regió N-terminal compartida entre Sir2p i Hst1p de *S. cerevisiae* i Sir2p de *Kluyveromyces lactis* (Afshar & Murnane, 1999; Dryden et al., 2003; Perrod et al., 2001; Vaquero et al., 2006). Com ja s'ha dit anteriorment, la família Sir2 a llevat és responsable del silenciament del locus *mating type*, dels telòmers i evita la recombinació homòloga entre les seqüències repetitives del rDNA (Guarente, 1999). És a dir, la família Sir2 i concretament Sir2p controla la formació d'heterocromatina facultativa, el manteniment de l'heterocromatina constitutiva i la recombinació homòloga, funcions que també es troben en les sirtuïnes d'eucariotes més complexes. No obstant, la localització citoplasmàtica d'Hst2p i de SirT2, i el fet de que la sobreexpressió de Hst2p en llevats deficients en Sir2 només compensi parcialment els defectes de silenciament dependents de Sir2, necessàriament implica una diversificació en les tasques d'aquesta família fora de la cromatina (Perrod et al., 2001).

Existeixen dues variants de SirT2: la variant 1 amb 389 aminoàcids i la variant 2, que apareix per *splicing* alternatiu i que compta amb 352 aminoàcids. Ambdues variants contenen un domini catalític conservat entre totes les sirtuïnes i un extrem N-terminal que conté un motiu d'exportació nuclear. La regió catalítica es divideix en un domini gran, en forma de plegament de Rossman, típic d'enzims d'unió a NAD(H)/NADP(H), i en un domini petit que coordina un àtom de zinc. Com la resta de sirtuïnes, l'activitat desacetilasa de SirT2 requereix NAD⁺ com a co-factor de la reacció. El NAD⁺

INTRODUCCIÓ

DOMINI CATALÍTIC CONSERVAT	ACTIVITAT	LOCALITZACIÓ
<p>SirT1: NLS (32-39, 138-145, 223-230, 425-431), NES (254-489), 747</p>	Desacetilasa	Nucli/Citoplasma
<p>SirT2: NES (18-74), 40, 360-389</p>	Desacetilasa	Citoplasma/Nucli
<p>SirT3: MTS (19-58), 138, 373-399</p>	Desacetilasa	Matriu mitocondrial/ Nucli
<p>SirT4: MTS (1-10), 47, 308-314</p>	ADP-ribosiltransferasa	Matriu mitocondrial
<p>SirT5: MTS (40-58), 51, 301-310</p>	Desacetilasa	Matriu mitocondrial
<p>SirT6: NLS (45-345), 297, 303</p>	ADP-ribosiltransferasa, Desacetilasa	Nucli
<p>SirT7: MTS (61-76), 100, 314, 392-400, 410</p>	Desacetilasa	Nuclèol

Taula 6. Sirtuïnes: Estructura, localització cel·lular i activitat enzimàtica. SirT1 és principalment nuclear, però es trasllada al citoplasma en determinades condicions; SirT2 és citoplasmàtica, encara que durant la transició G2/M va cap a nucli; SirT3 és principalment mitocondrial, tot i que una petita part es troba a nucli; SirT4 i SirT5 són sirtuïnes mitocondrials; SirT6 és nuclear; i SirT7 es troba al nuclèol. MTS, seqüència de localització mitocondrial; NES, seqüència d'exportació nuclear; NLS, seqüència de localització nuclear; nLS, seqüència de localització nucleolar. Adaptat de Sima et al. 2015 (Sima et al., 2015).

s'uneix al domini gran de SirT2, mentre que el reconeixement del substrat sembla donar-se a través del domini petit (Finnin et al., 2001; Perrod et al., 2001; Vaquero et al., 2006).

La localització de SirT2 està regulada al llarg del cicle cel·lular (Dryden et al., 2003; North & Verdin, 2007a, 2007b; A Vaquero et al., 2006). Durant tot el cicle, SirT2 és exportada de nucli a citoplasma pel sistema d'exportació dependent de l'exportina Crm1 (*Chromosomal region maintenance 1*), gràcies al reconeixement de la seqüència d'exportació nuclear (NES) rica en leucines (North & Verdin, 2007a). La major part de SirT2 durant la interfase és citoplasmàtica, tot i que hi ha una petita proporció que roman al nucli. Durant la transició G2/M, SirT2 és transportada al nucli i fosforilada a la serina 368 per la quinasa dependent de ciclina CDK1-CiclinaB1 (Dryden et al., 2003; North & Verdin, 2007b; Vaquero et al., 2006). La forma fosforilada de SirT2 es localitza als centrosomes i a la cromatina durant la profase, al fus mitòtic durant la metafase i en el cos intermedi durant la citocinesi, suggerint un paper clau en la progressió per mitosi (North & Verdin, 2007b; Vaquero et al., 2006). Al final de mitosi, CDC14A i B desfosforilen SirT2S368p, procés que

sembla necessari per a la sortida de mitosi. De fet, diferents treballs relacionen aquesta fosforilació amb l'aturada del cicle cel·lular a mitosi i suggereixen que estaria regulant el *checkpoint* del fus mitòtic, ja que quan se sobreexpressa SirT2 o el mutant que mimetitza la forma fosforilada, les cèl·lules romanen més temps en mitosi i tenen una fase G1 més curta (Dryden et al., 2003; North & Verdin, 2007b). La prova més clara de la implicació de SirT2 en la regulació del cicle cel·lular és el patró aberrant de la distribució de les fases del cicle en les cèl·lules deficientes per SirT2. Aquestes cèl·lules presenten una fase G1 més llarga i una fase S més curta, mentre que no hi ha diferències clares respecte les WT en G2/M (Serrano et al., 2013; Vaquero et al., 2006). Suggestint que les cèl·lules sense SirT2 es troben amb algun problema en l'entrada a la fase S. Diferents dades apunten a que aquestes alteracions en el cicle són degudes a la regulació d'H4K16 per SirT2 durant mitosi. Ja sigui per, la importància d'H4K16Ac en la senyalització i reparació del dany o per la influència d'H4K16Ac en la metilació d'H4K20 i en conseqüència en la replicació, la resposta al dany i formació d'heterocromatina (Gupta et al., 2014; Serrano et al., 2013; Sharma et al., 2010).

INTRODUCCIÓ

Regulació del cicle cel·lular a través del citoesquelet:

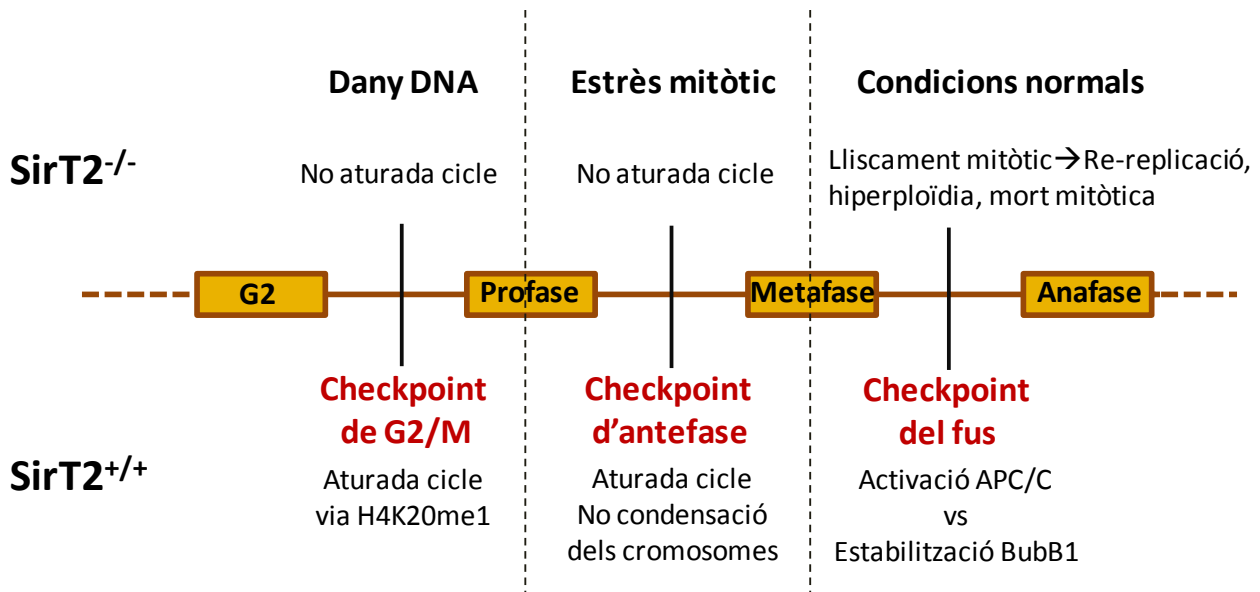
Els microtúbuls són un component important del citoesquelet i són essencials per la segregació dels cromosomes, el transport intracel·lular i l'establiment i manteniment de la polaritat cel·lular. La xarxa de microtúbuls està conformada per polímers de l'heterodímer d' $\alpha\beta$ -tubulina. L'acetilació de la lisina 40 de l' α -tubulina estabilitza els polímers de microtúbuls. SirT2 interacciona amb HDAC6 per desacetilar l' α -tubulina (Nahhas et al., 2007; North et al., 2003). Tot i que hi ha algunes dades que no reconeixen l' α -tubulina com a substrat de SirT2 (Bobrowska et al., 2012), la major part de publicacions recolzen que els nivells d'acetilació d'aquest component microtubular estan controlats per aquesta sirtuïna. En consonància, la sobreexpressió de SirT2 altera la localització dels microtúbuls i produeix l'acumulació de cèl·lules en G2/M (Dryden et al., 2003; Hiratsuka et al., 2003; North et al., 2003; Suzuki & Koike, 2007). En condicions d'estrès mitòtic, produït per exemple pel tractament amb Nocodazol (agent promotor de la despolimerització dels microtúbuls), l'activitat de SirT2 (concretament de la forma fosforilada de SirT2) sembla ser essencial per a l'activació del *checkpoint* d'antefase (North & Verdin, 2007b; L. Zhang et al., 2014). En aquestes condicions, SirT2 evita que els cromosomes es compactin, demorant l'entrada a metafase i evitant que es produeixi un lliscament mitòtic durant el *checkpoint* del fus, disminuint així les aneuploïdies derivades d'aquest error en el control de la mitosi (Fig. 15). Per exemple, les cèl·lules derivades de gliomes tenen baixos nivells de SirT2 i això correlaciona amb la no aturada en el *checkpoint* d'antefase després de patir estrès mitòtic i amb el posterior lliscament mitòtic que condueix a l'aparició d'hiperploïdia i mort cel·lular (Inoue et al., 2007). A més, la pèrdua de SirT2 també es relaciona amb l'aparició d'aneuploïdies en els oòcits. Durant la meiosi, els oòcits deficientes en SirT2 presenten anomalies en la formació del fus meiótic, una incorrecta unió dels microtúbuls al cinetocor i conseqüentment, la mala segregació dels cromosomes. Tot això, possiblement, degut a la hiperacetilació de l' α -tubulina i d'H4K16 (en condicions normals completament desacetilada a la regió del cinetocor) (Zhang et al., 2014).

Tot i la importància que sembla tenir SirT2 en la regulació de la dinàmica dels microtúbuls, el fet que l' α -tubulina no estigui acetilada als eucariotes més simples (Polevoda & Sherman, 2002), fa pensar que aquesta funció no és la que ha fet que SirT2 estigui conservada al llarg de l'evolució.

Regulació del cicle cel·lular a través de la cromatina:

Degut a la seva localització principalment citoplasmàtica, sorprèn la funció de SirT2 a la cromatina. Diferents estudis corroboren que SirT2 i la seva ortòloga Hst2p, són la principal desacetilasa d'H4K16Ac (Serrano et al., 2013; Vaquero et al., 2006). SirT2 és transportada al nucli durant la transició G2/M, moment en el que s'uneix a la cromatina i desacetila H4K16Ac d'una manera global. D'acord amb el paper que té H4K16 en la compactació de la cromatina, SirT2 desencadena la condensació fins a cromosoma metafàsic i assegura l'estabilitat genòmica (Robinson et al., 2008; Shogren-Knaak et al., 2006; Vaquero et al., 2006). No obstant, el fet que els ratolins *sirt2^{-/-}* siguin aparentment normals, fa sospitar que hi ha algun tipus de redundància de funcions (Serrano et al., 2013). Hi ha dos línies d'evidències que suporten l'existència d'una redundància d'activitat que pot substituir la pèrdua de SirT2: En primer lloc, el tractament amb TSA, inhibidor de les classes I i II d'HDACs, també produeix un increment en els nivells d'H4K16Ac durant mitosi. En segon lloc, els nivells d'H4K16Ac en cèl·lules *sirt2^{-/-}* durant G1 són més baixos comparats amb S i G2/M, indicant que hi ha una altra activitat que desacetila H4K16Ac al final de mitosi o G1. No obstant, la distribució d'H4K16Ac durant la fase S en les cèl·lules *sirt2^{-/-}* està alterada, ja que aquesta marca eucromàtica no està completament desacetilada en zones d'heterocromatina, indicant que encara que les activitats redundants poden restablir els nivells globals d'H4K16Ac, no poden compensar completament la pèrdua de SirT2 (Vaquero et al., 2006). S'ha mencionat abans que la sobreexpressió de SirT2 provoca un retràs en la sortida de mitosi i en condicions d'estrès es requereix per activar el *checkpoint* de G2/M. Així doncs, SirT2 actua com a

INTRODUCCIÓ



controlador de la mitosi en diferents punts i la seva activitat sobre H4K16Ac és important per la progressió durant la fase S (Dryden et al., 2003; North & Verdin, 2007b; Serrano et al., 2013; Vaquero et al., 2006; Zhang et al., 2013).

Regulació del cicle cel·lular a través d'altres substrats:

A part de la regulació del cicle a través del citoesquelet i la cromatina, SirT2 controla el cicle cel·lular a través d'altres substrats. Es creu que mitjançant la desacetilació de CDC20 i CDH1, SirT2 promou l'activació de l'APC/C, pas imprescindible per desencadenar la transició de metafase a anafase. Així doncs, l'activitat de SirT2 permet la degradació dependent d'APC/C de nombroses proteïnes amb funcions diverses durant mitosi, com per exemple Aurora A i B, PLK1, Securina i Cyclina A2. Aquestes proteïnes estan implicades en l'amplificació dels centrosomes, la mort cel·lular durant mitosi i l'arrest del cicle cel·lular a metafase. Es proposa que SirT2,

per mitjà de la regulació d'aquestes proteïnes asseguraria la correcta progressió de la mitosi i evitaria la formació d'aneuploïdies (Kim et al., 2011). No obstant, en dos treballs independents, es mostra que BUBR1 és substrat de SirT2. BUBR1 és un inhibidor de l'APC/C, i mentre que en un dels estudis veuen com SirT2 promou l'estabilització de BUBR1 (North et al., 2014), en l'altre observen que la desacetilació de BUBR1 dependent de SirT2 no té cap efecte sobre els nivells de la proteïna (Suematsu et al., 2014). De manera que el paper de SirT2 en el control de la transició de metafase a anafase és font de controvèrsia fins al moment.

Tot i que SirT2 és majoritàriament citoplasmàtica durant interfase i hi ha estudis que han demostrat el continu transport de SirT2 del nucli cap a citoplasma (North & Verdin, 2007a), es creu, que hi ha una petita part de SirT2 que està present al nucli durant tot el cicle cel·lular. D'acord amb això, SirT2 té un paper fonamental en la resposta a l'estrès replicatiu (RSR) que es dona durant la fase S. En la RSR les forquilles de replicació s'aturen per dos motius

INTRODUCCIÓ

principals: la forquilla de replicació topa amb dany al DNA, o per dèficit en dNTPs. Fins al moment s'ha relacionat SirT2 amb la RSR en dos punts diferents. En el primer, SirT2 desencadena l'activació del *checkpoint* de la fase S dependent de replicació (*checkpoint* de replicació) mediat per ATR. SirT2, en resposta a l'estrès replicatiu, desacetila ATRIP a la lisina 32 i en promou la unió a RPA-ssDNA. El reclutament d'ATRIP-ATR a les regions de ssDNA activa l'autofosforilació d'ATR i la conseqüent cascada de senyalització que porta a l'activació del *checkpoint* i a la recuperació de les forquilles de replicació (Zhang et al., 2016). El segon punt on està implicada SirT2 és més corrent avall. Aquí SirT2 desacetila CDK9 a la lisina 48, activant la quinasa i promovent la recuperació de les forquilles de replicació i l'avançament del cicle cel·lular (Zhang et al., 2013).

Tot i que la funció principal de SirT2 és la regulació del cicle cel·lular a través de la modulació del citoesquelet, la cromatina i altres substrats relacionat, li han estat assignades altres funcions, com la participació en la reparació del dany al DNA o la regulació de certs factors de transcripció, tenint implicacions en processos de diferenciació cel·lular o en la via de l'apoptosi (Das, Lucia, Hansen, & Tyler, 2009; Han et al., 2008; Y. Jin et al., 2008; Jing, Gesta, & Kahn, 2007; F. Wang, Nguyen, Qin, & Tong, 2007). Últimament també se li ha associat un paper en el desenvolupament de malalties neurodegeneratives (Outeiro et al., 2007).

SirT2 i reparació de dany al DNA:

L'acetilació del domini globular de la histona H3, concretament de la lisina 56, H3K56Ac, juga un paper molt important en la regulació de l'assamblatge de la cromatina durant la replicació i la reparació del dany al DNA, el desassamblatge durant la transcripció i la supervivència cel·lular. L'enzim responsable d'aquesta acetilació és CBP/p300 (CBP, a *Drosophila*; Rtt9 a llevat). CBP/p300 és reclutat als llocs de replicació del DNA per PCNA i amb l'ajuda de les xaperones ASF1 i CAF1, acetila i incorpora H3K56Ac a la cromatina. Quan es produeix dany al DNA, H3K56Ac augmenta i es localitza als llocs de

reparació. SirT2 i en menor mesura SirT1, són les responsables de la desacetilació d'aquesta marca, un cop la histona ha estat incorporada a la cromatina (Das et al., 2009; Vempati et al., 2010; Yuan et al., 2009). Això no obstant, el paper de SirT2 en la regulació d'H3K56Ac durant la reparació del DNA és, fins ara, desconegut. En altres estudis, s'ha vist que SirT2 regula la transcripció dependent de p300, regulant els nivells d'acetilació i el reclutament de p300 a la cromatina, però si aquest procés té un efecte sobre els nivells de H3K56Ac i sobre la reparació del DNA és, encara, matèria d'estudi (Black et al., 2008).

Regulació de la transcripció

SirT2, a través de la regulació de diferents factors de transcripció, participa en el control del metabolisme, la diferenciació cel·lular, la resposta a l'estrès oxidatiu i calòric i en la via de l'apoptosi, entre altres processos (Wang et al., 2007). Per exemple, SirT2 actua com a regulador important de la diferenciació adipocítica i manté l'homeòstasi energètica, a través de la modulació de l'acetilació/fosforilació de FoxO1. Aquest membre de la família de factors de transcripció *forkhead classe O* té un efecte negatiu sobre la diferenciació adipocítica i l'adipogènesi. La fosforilació de FoxO1 dependent d'AKT, en resposta a insulina, factors de creixement i citocines, promou el seu transport de nucli a citoplasma, impeding la seva tasca al DNA. SirT2, desacetila FoxO1, alterant l'estat de fosforilació i afavorint la localització nuclear, portant a la inhibició de l'adipogènesi. En concordança, SirT2 està regulat a la baixa en els preadipòcits durant el procés de diferenciació i a l'alça durant la restricció calòrica (Jing et al., 2007; Wang et al., 2007). En condicions d'estrès oxidatiu, SirT2 desacetila FoxO3a i activa l'expressió dels seus gens diana, p27^{Kip1}, MnSOD (manganès superòxid dismutasa) i BIM. Quan l'estrès oxidatiu és moderat, SirT2 promou l'aturada del cicle i la detoxificació cel·lular a través de l'expressió dels factors p27^{Kip1} i MnSOD, respectivament. Quan l'estrès oxidatiu és sever, SirT2 promou l'activació de l'apoptosi, induint l'expressió del factor proapoptòtic BIM (Wang et al., 2007). Contràriament, s'ha vist que SirT2 inhibeix la mort cel·lular programada per la via de p53. SirT2

INTRODUCCIÓ

desacetila p53 inhibint la transcripció dels seus gens diana (Jin et al., 2008). Alhora, SirT2 és acetilat per p300, fet que disminueix l'activitat desacetilasa de SirT2 i atura l'efecte inhibitori sobre p53 (Han et al., 2008). En un estudi independent, veuen que, al tractar línies cel·lulars de càncer de mama amb inhibidors de SirT1 i SirT2, hi ha un augment de la mort programada dependent de p53. És a dir, que SirT2 i SirT1, combinadament, mantenen els nivells d'acetilació de p53 baixos, inhibint la seva activitat transcripcional sobre gens de la via de l'apoptosi (Peck et al., 2010). A més, SirT2 també participa en la regulació de NF- κ B, desacetilant la subunitat p65 d'aquest factor de transcripció que controla processos tan importants com el cycle cel·lular, l'angiogènesi o l'apoptosi (Karin & Lin, 2002; Rothgiesser et al., 2010). Recentment, s'ha descrit un altre substrat histònic, H3K18Ac, mitjançant la desacetilació del qual, SirT2 controla la transcripció. En resposta a la infecció per *Lysteria monocytogenes*, SirT2 és translocada al nucli i dirigida a zones promotores d'un determinat subgrup de gens, on desacetila H3K18Ac reprimint la transcripció i permetent el control de la infecció al bacteri (Eskandarian et al., 2013).

SirT2 té una altra via més directa de controlar l'expressió gènica. A través de la desacetilació d'H4K16Ac a la regió promotora de gens, SirT2 en reprimeix l'expressió. Aquest és el cas de *nedd4*, gen que codifica per una lligasa E3 d'ubiquitina que promou la degradació de l'oncoproteïna MYC. En cèl·lules de neuroblastoma i en cèl·lules de càncer de pàncreas, SirT2 està regulat a l'alça per MYC. Alhora, SirT2 desacetila H4K16Ac del promotor de *nedd4* i en reprimeix l'expressió, afavorint l'estabilització de la proteïna MYC i la proliferació de les cèl·lules canceroses (Liu et al., 2013).

Regulació del metabolisme independent de transcripció

Les sirtuïnes tenen un paper important en la regulació del metabolisme. Tot i ser una funció poc estudiada en SirT2, s'ha vist que modula l'activació de la gluconeogènesi a través de la regulació de l'estabilitat de PEPCK1. El pas limitant de la

gluconeogènesi és la transformació del piruvat en fosfoenolpiruvat, procés pel que es necessita l'enzim PEPCK1. L'acetilació de PEPCK1 per p300 promou la seva degradació, mentre que la desacetilació per SirT2, l'estabilitza. La regulació de l'estat d'acetilació de PEPCK1 és sensible als nutrients. En condicions d'alta quantitat de glucosa, SirT2 està regulada a la baixa i consegüentment, es promou la degradació de PEPCK1, inhibint-se la via gluconeogènica (Jiang et al., 2011).

Tot el mencionat en aquest apartat, destaca el paper de SirT2 com a regulador d'una xarxa de proteïnes implicades en el manteniment de la integritat genòmica i la supervivència cel·lular. En resum, SirT2 participa en el manteniment de l'estructura de la cromatina al llarg del cycle cel·lular, en la regulació del citoesquelet i la segregació dels cromosomes durant mitosi i en la correcta progressió del cycle cel·lular. En condicions d'estrès, dependent del tipus d'estímul i de la intensitat, SirT2 modula diferents vies per assegurar la supervivència cel·lular o condueix cap a la mort cel·lular programada, preservant la integritat genòmica. Tot apunta a que SirT2 és un gen supressor tumoral, i així ho corroboren la majoria d'estudis on es veu que SirT2 està regulat a la baixa en diferents tipus de càncer com glioma, neuroblastoma, melanoma, càncer gàstric, carcinoma hepatocel·lular i càncer de mama (Hiratsuka et al., 2003; Kim et al., 2011; Lennerz et al., 2005; Serrano et al., 2013). Contràriament, dades provinents d'estudis en cèl·lules de càncer pancreàtic i neuroblastoma amb MYC alterat, mostren que en aquests tipus de càncer SirT2 pot estar regulat a l'alça (Liu et al., 2013). A més, en un estudi recent amb pacients de càncer de mama, es mostra que dependent del grau de desenvolupament del tumor, SirT2 està regulat a l'alça o a la baixa i pot tenir un paper positiu o negatiu en la prognosi de la malaltia (Mcglynn et al., 2013). En càncer colorectal, la pèrdua de SirT2 causa resistència als tractaments dirigits contra la via de les MAP quinases (Bajpe et al., 2014). Així doncs, SirT2 sembla tenir un paper dual en càncer. Encara que la majoria d'evidències l'encasellen com a supressor tumoral, seran necessaris més estudis per acabar de perfilar la funció de SirT2 en determinats càncers humans. Aquests estudis seran crítics per desenvolupar noves

estratègies terapèutiques per un tractament eficient del càncer.

7. Relació funcional entre H4K16Ac i H4K20me

Són vàries les evidències que permeten afirmar que l'acetilació d'H4K16 i la metilació d'H4K20 estan íntimament relacionades i que juguen un paper conjunt en la progressió del cicle cel·lular i en el manteniment de la integritat genòmica. Un dels primers vincles observats entre aquestes dues marques prové de *Drosophila*, on els cromosomes X hiperactivats dels mascles d'aquesta espècie mostren alts nivells d'H4K16Ac i baixos d'H4K20me1 (Nishioka et al., 2002). A mamífers, el cromosoma X inactivat de les femelles conté alts nivells d'H4K20me1 i com a conseqüència baixos d'H4K16Ac. Estudis *in vitro* van demostrar que l'acetilació d'H4K16 impedia la monometilació d'H4K20 i a la inversa (Nishioka et al., 2002; Serrano et al., 2013).

Funcionalment, H4K16Ac i H4K20me1 són discriminatòries entre elles en la majoria dels processos observats (Fig.16). El primer fet que ho demostra és el paper d'aquestes marques en la compactació de la cromatina. Per una banda, H4K16Ac impedeix la formació d'estructures compactes de cromatina *in vitro* (Robinson et al., 2008; Shogren-Knaak et al., 2006). En canvi, H4K20me1 és necessari per a la compactació de la cromatina fins a cromosoma metafàsic (Oda et al., 2009; Rice et al., 2002). En concordança amb això, aquestes dues marques presenten una regulació inversa durant el cicle cel·lular. Durant G2/M, SirT2 és transportada al nucli, on és reclutada a la cromatina per desacetilar PR-SET7 i H4K16Ac (Serrano et al., 2013; A Vaquero et al., 2006). La desacetilació d'H4K16 durant G2/M és necessària per la subsegüent monometilació d'H4K20 per PR-SET7 i per a la correcta compactació de la cromatina fins a cromosoma metafàsic (Nishioka et al., 2002;

Robinson et al., 2008; Serrano et al., 2013; Shogren-Knaak et al., 2006). SirT2 roman unida a la cromatina fins metafase, mantenint els nivells d'H4K16Ac baixos i coincidint amb el pic en els nivells d'H4K20me1 (Houston et al., 2008; Rice et al., 2002; Vaquero et al., 2006). No obstant, l'aparent necessitat de que es produeixi la desacetilació d'H4K16Ac per a que es pugui donar la monometilació d'H4K20 i en conseqüència la compactació de la cromatina, no sembla ser un requeriment essencial, al menys durant tot el cicle cel·lular. Així ho mostra la sobreexpressió d'un mutant de degradació de PR-SET7. Quan PR-SET7 no és degradat durant la fase S, els nivells d'H4K20me1 augmenten durant aquesta fase i es desencadena la compactació prematura de la cromatina, tot i que els nivells d'H4K16Ac són elevats (Centore et al., 2011). Els estudis per determinar el paper d'H4K16Ac en la compactació de la cromatina, fets fins al moment en cèl·lules mare embrionàries, no treuen l'aigua clara. En un dels treballs suggereixen que la pèrdua d'H4K16Ac no correlaciona amb una major compactació de la cromatina (Taylor et al., 2013), contràriament, en l'altre estudi veuen que la pèrdua de MOF implica la compactació de la cromatina (Li et al., 2012).

La regulació dels nivells d'H4K20me1 durant mitosi té incidència directa sobre els nivells d'H4K20me2/3 en totes les fases del cicle cel·lular (Serrano et al., 2013), doncs H4K20me1 serveix de substrat a Suv420h1/2 durant el final de mitosi i principi de G1 per di- i trimetilar H4K20 (Schotta et al., 2004, 2008). El fenotip derivat de la regulació aberrant d'H4K20me1 en les cèl·lules *sirt2^{-/-}*, coincideix amb els defectes propis de la desregulació d'H4K20me2 i H4K20me3, és a dir, problemes en la replicació per possibles errors en el *licensing* dels orígens de replicació (H4K20me1-3), deficiència en la reparació del DNA (H4K20me1-2) i desestructuració de regions heterocromàtiques (H4K20me3), i com a conseqüència una demora en sortir de la fase G1, un escurçament de la fase S i finalment l'augment de la inestabilitat genòmica (Schotta et al., 2004; Serrano et al., 2013; Tardat et al., 2010). A més, el vincle funcional entre SirT2 i PR-SET7 està lligat a la

INTRODUCCIÓ

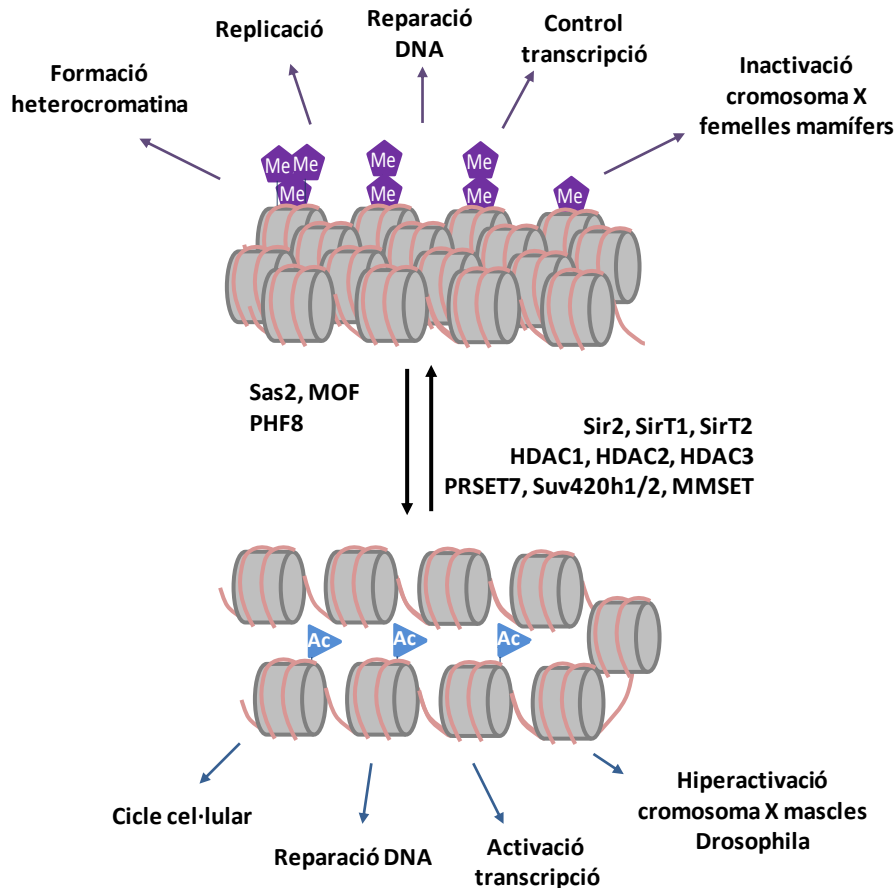


Figura 16. Funcions d'H4K16Ac vs H4K20me. L'acetilació d'H4K16 (representada amb els triangles blaus) desenvolupa diferents tasques afavorint la transcripció i l'estat d'obertura de la cromatina. Mentre que la metilació d'H4K20 (representats amb un, dos o tres pentàgons liles segons els estats me1, me2 o me3, respectivament) està implicada en els mateixos processos però en la direcció oposada.

resposta a l'estrès. Sota aquestes condicions, els nivells d'H4K20me1 durant G2/M incrementen de manera dependent de SirT2. En concordança, les cèl·lules deficientes en SirT2 tenen nivells d'H4K20me1 més baixos i no s'aturen en la transició G2/M quan s'indueix dany, fet indicatiu del paper de SirT2 i H4K20me1 en el *checkpoint* de G2/M (Serrano et al., 2013).

Una altra funció en la que aquests dues marques semblen ser excloents és en la regulació de la transcripció. Mentre H4K16Ac es troba en promotors i cossos de gens transcripcionalment actius (Horikoshi et al., 2013; Li et al., 2012; Taylor et al., 2013) i correlaciona amb l'activació de la transcripció (Akhtar & Becker, 2000; Lavender et al., 1994; Li et al., 2012) H4K20 metilada es troba en regions silenciades com zones repetitives, transposons o cromatina pericentromèrica i en termes generals, se l'associa a silenciament gènic

(Karachentsev et al., 2005; Martens et al., 2005). Diferents laboratoris han identificat a llevat, l'activitat desacetilasa d'H4K16Ac de Sir2p, junt amb Sir3 i Sir4, com un component essencial per al silenciament de la cromatina als telòmers i als llocs del *mating type* (Braunstein et al., 1993; Carmen et al., 2002; Imai et al., 2000). En aquesta línia, s'ha vist que H4K16Ac i H4K20me regulen de manera oposada l'activitat de la RNA Pol II. Per a que es doni l'inici de la transcripció, factors remodeladors de la cromatina com SWI/SNF, són reclutats a través dels seus dominis bromo a zones promotores de gens marcades amb histones acetilades, en particular H4K16Ac. Aquests complexes són capaços d'alterar l'estructura dels nucleosomes i modificar la quantitat de DNA que hi ha a la superfície de l'octàmer d'histones, augmentat l'accessibilitat de proteïnes d'unió al DNA com els factors de transcripció i la RNA Pol II (Boeger et al., 2003; Hassan et al., 2007, 2001; Schones et al., 2008). La RNA Pol II està

INTRODUCCIÓ

controlada a nivell de reclutament, d'iniciació, elongació i terminació de la transcripció. Un cop reclutada a la cromatina i iniciada la transcripció, en molts gens es produeix el fenomen de pausa de la RNA Pol II (Bernstein et al., 2006). Durant aquesta pausa, tot i haver-se activat la transcripció no es produeix transcrit, fins que la RNA Pol II no és alliberada. S'ha vist que en les regions on es produeix l'aturada de la transcripció hi ha enriquiment en H4K20me3. La presència d'H4K20me3 impedeix que MOF acetili H4K16 en

aquestes zones. L'acetilació d'H4K16 permet la unió del complex BRD4/pTEFb, necessari per a que la RNA Pol II continuï amb l'elongació. Així doncs, per a l'alliberació de la RNA Pol II de la pausa és necessari el pas d'H4K20me3 a H4K16Ac (Kapoor-Vazirani et al., 2011). Per una altra banda, L3MBTL1, proteïna coneguda per a la seva activitat repressora de la transcripció de diferents gens, és reclutada a la cromatina d'una manera dependent d'H4K20me1 (Trojer et al., 2007).

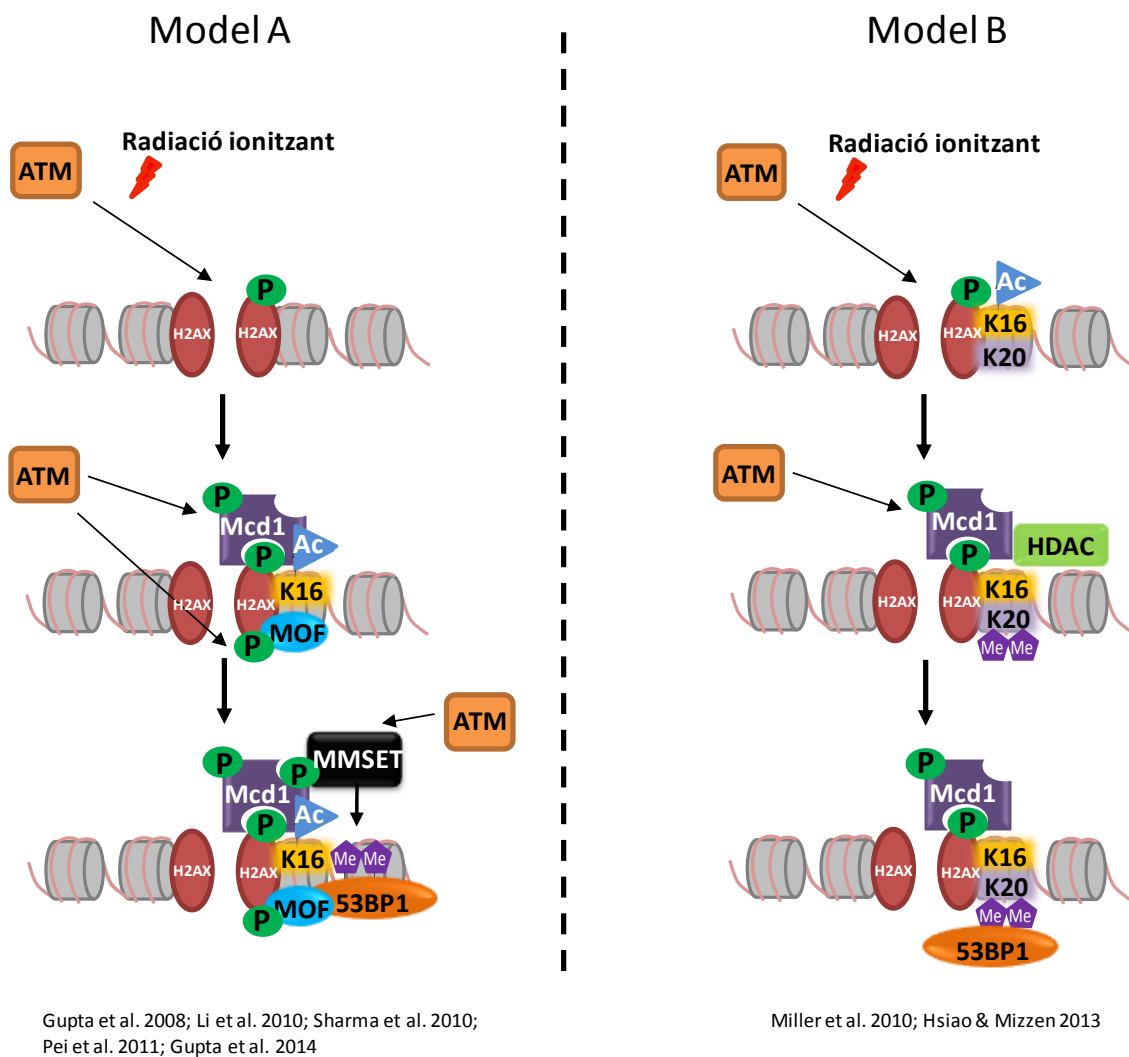


Figura 17. Reclutament de 53BP1 en la resposta al dany al DNA. Es representen les dues possibles vies per les quals 53BP1 reconeix i s'uneix a H4K20me2 en els llocs de dany del DNA. Model A, L'activació d'ATM en resposta a dany promou la fosforil·lació d'H2AX, MDC1 i MOF. MOF acetila H4K16 i MDC1 és reclutat a la cromatina. MMSET fosforilat per ATM és reconegut per MDC1 i reclutat als llocs de dany, on dimetila de novo H4K20me, permetent l'ancoratge de 53BP1. Model B, En resposta a dany, ATM fosforila H2AX i MDC1. Una activitat desacetilasa és reclutada a la cromatina i desacetila H4K16Ac, deixant al descobert H4K20me2 i permetent la unió de 53BP1.

INTRODUCCIÓ

Tot i que en termes generals sembla que la distribució d'H4K20 sigui totalment antagonista a la d'H4K16Ac, hi ha exemples en els que aquesta incompatibilitat no és tan clara, i fins i tot en alguns casos poden arribar a coexistir. Així s'ha vist en un estudi amb cèl·lules d'eritroleucèmia, en el que H4K20me1 i H4K16Ac colocalitzen en determinats gens actius (Talaszi et al., 2005). En concordança, altres estudis mostren que H4K20me1 és present al cos de gens actius i participa en l'elongació de la transcripció. En aquests treballs però, no s'ha mirat l'estat d'acetilació d'H4 (Barski et al., 2007; Vakoc et al., 2006). Per una altra banda, en un estudi en ESCs, es mostra que la presència de MOF i H4K16Ac a la regió codificant dels gens correlaciona amb repressió de la transcripció. Durant el procés de diferenciació, els nivells de MOF i H4K16Ac disminueixen i s'activa l'expressió d'aquests gens (Li et al., 2012).

Els experiments *in vitro* de Nishioka i col·laboradors van mostrar que la metilació d'H4K20 impedia l'acetilació d'H4K16. Aquests experiments van ser fets amb pèptids sintètics i l'enzim utilitzat va ser p300 (Nishioka et al., 2002). Això no permet assegurar que en un context de nucleosoma i essent MOF l'acetiltransferasa no es produís l'acetilació. Un altre estudi que mostra l'antagonisme entre l'acetilació de K16 i la metilació de K20 va ser fet per Serrano i col·laboradors, on suggereixen que l'acetilació de K16 impedeix la monometilació de K20 *in vivo*, durant mitosi i de manera global (Serrano et al., 2013). Per tant, tampoc permet assegurar que aquest efecte es doni a la resta de fases del cicle cel·lular i en totes les regions del genoma. Contràriament, s'ha vist que MOF, quan forma part del complex MSL, és reclutat a la cromatina a través del reconeixement d'H4K20me1/me2 pel domini

chromo de MSL3 (Moore et al., 2010; Pesavento et al., 2008). El conjunt d'aquestes dades suggereix que H4K16Ac inhibeix H4K20me1 durant mitosi, que H4K20me1 inhibeix l'acetilació d'H4K16 de la mateixa histona, i que en determinades circumstàncies, la metilació d'H4K20me1 pot arribar a afavorir l'acetilació d'H4K16.

Una funció molt important atribuïda a H4K20me2 és la participació en el reclutament de 53BP1 durant la DDR (Botuyan et al., 2006; Sanders et al., 2004). Hi ha un gran debat sobre com 53BP1 discerneix entre els llocs de trencament, ja que els nivells d'H4K20me2 estan distribuïts per tot el genoma. Alguns proposen que en resposta a dany, MMSET dimetila *de novo* H4K20 en els llocs de trencament (Pei et al., 2011), altres suggereixen que l'acetilació d'H4K16 en la mateixa molècula d'H4 impedeix el reconeixement d'H4K20me2 per 53BP1 i que és necessària la desacetilació de K16Ac localitzada en els llocs de dany per a la unió de 53BP1 al H4K20me2 prèviament establert per PR-SET7 i Suv420h1 (Fig. 17) (Hsiao & Mizzen, 2013; Miller et al., 2010). El model proposat per Hsiao i col·laboradors contradiu varis estudis fets anteriorment, no només en quant a H4K20me2, sinó a H4K16Ac. En la majoria d'estudis publicats, els nivells d'H4K16Ac després d'induir dany augmenten, fet que es creu que és necessari per al reclutament de MDC1 per γ -H2AX (Gupta et al., 2008; Gupta et al., 2005; Li et al., 2010; Sharma et al., 2010). No obstant, un possible motiu d'aquestes discrepàncies sigui el temps esperat després del dany en que s'han dut a terme els experiments.

Finalment, no s'exclou la possibilitat de que durant la DDR hi hagi una remodelació de la cromatina als llocs de dany que permeti el reconeixement d'H4K20me2 per 53BP1.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

En el moment que es va iniciar aquest projecte, començaven a emergir evidències que relacionaven SirT2 amb la progressió del cicle cel·lular des del punt de vista de la cromatina (Serrano et al., 2013; A Vaquero et al., 2006). D'aquesta manera, la desacetilació d'H4K16Ac per SirT2 durant mitosi tenia conseqüències sobre la metilació d'H4K20 i la progressió per altres fases del cicle cel·lular. En particular, el control d'H4K20me1 dependent de SirT2 havia estat relacionat amb l'activació del *checkpoint* de G2/M en resposta a estrès, tot i que els mecanismes involucrats en l'aturada del cicle cel·lular eren del tot desconeguts.

En conseqüència, l'objectiu principal del treball que aquí es presenta va ser estudiar el paper de SirT2 en la transició G2/M i la seva coordinació amb la maquinària regulatòria del *checkpoint*.

Per tal de duu a terme el propòsit principal, es va dividir la Tesi doctoral en els següents objectius específics:

1. Caracteritzar el possible mecanisme de regulació entre SirT2 i MOF en el control d'H4K16Ac durant G2/M.
2. Confirmar l'impacte de la regulació d'H4K16Ac durant G2/M sobre la metilació d'H4K20.
3. Determinar el paper de SirT2 i MOF en l'entrada a mitosi i la seva implicació en el manteniment de l'estabilitat genòmica.

MATERIALS I MÈTODES

1. Ratolins

Tots els estudis i procediments experimentals amb animals han estat realitzats d'acord amb el Real Decret 53/2013 del govern espanyol (transposició de la directiva 2010/63/UE del Parlament Europeu relativa a la protecció dels animals utilitzats per finalitats científiques) i sota l'aprovació del comitè ètic d'experimentació animal de l'Institut de Recerca Oncològica-IDIBELL.

1.1. Ratolins *knockout* de sirt2

Les ESCs (cèl·lules embrionàries de ratolí, de les sigles en anglès) i els ratolins originals *sirt2*^{-/-} van ser generats pel laboratori del Dr. Alt. No obstant, els ratolins *sirt2*^{-/-} C57BL/6 utilitzats en els nostres experiments provenen del laboratori del Dr. Tong, on van fer servir les ESCs originals per generar-los. Per obtenir les ESCs originals, es va dissenyar un vector dirigit a reemplaçar els exons 5, 6 i part de l'exó 7 del gen de *sirt2* murí per un cassette de resistència a neomicina (neo) flanquejat per seqüències loxP. Aquest constructe va ser electroporat en ESCs TC1 i les cèl·lules que el van recombinar correctament van ser seleccionades i comprovades per *Southern blotting*. Posteriorment, els clons positius, van ser transfectats amb un plàsmid amb la recombinasa Cre per eliminar el gen de neomicina. Les ESC que exitosament van recombinar i eliminar el gen neo, van ser injectades en blastocists C57BL/6 i els mascles quimera resultants, es van creuar amb femelles 129/Sv. Aquests ratolins van ser retrocreuats amb C57BL/6 durant 8 generacions per produir els homozigots *sirt2*^{-/-} amb fons genètic homogeni. Per la genotipació dels ratolins, el DNA va ser extret dels forats de les orelles i posteriorment es va realitzar una PCR estàndard d'acord amb els mètodes descrits més endavant. La genotipació del gen *sirt2* dels ratolins *sirt2*^{+/-} genera dos productes de PCR, un de 538 pb que correspon a l'al·lel WT i un de 700 pb que correspon a l'al·lel KO (Fig. R15).

1.2. Ratolins *knockout* de mof

Els ratolins *knockout* condicionals de mof (*mof*^{lox/lox}/cre) són una concessió del laboratori de la Dra. Voss. Aquest ratolins van ser generats mitjançant el creuament d'un mascle *mof*^{lox/+} (Thomas et al., 2008) amb una femella CAGG-cre-ERTM^{T/+} (Hayashi & McMahon, 2002). Per la genotipació dels ratolins, el DNA va ser extret dels forats de les orelles i posteriorment es va realitzar una PCR estàndard d'acord amb els mètodes descrits més endavant. Els ratolins *mof*^{lox/+} generen dos productes de PCR, un de 422 pb que correspon a l'al·lel WT i un de 509 pb que correspon a l'al·lel amb les seqüències loxP. La genotipació del gen cre dona un producte de PCR d'aproximadament 300 pb.

Els ratolins *mof*^{lox/lox} es van generar per recombinació homòloga. El gen murí de mof es va clonar en el vector pL253. Es va introduir una seqüència loxP entre els exons 1 i 2, i un cassette d'expressió de resistència a neomicina flanquejat per seqüències *frt* i amb un lloc loxP a l'extrem 3', entre els exons 5 i 6. Aquest constructe va ser electroporat en ESCs Bruce 4 i els clons positius van ser seleccionat. Els ratolins quimera fundadors van ser creuats durant al menys 8 generacions per a obtenir una soca 100% C57BL/6.

Els ratolins CAGG-cre-ERTM^{T/+} expressen una proteïna de fusió entre la recombinasa Cre i un receptor d'estrògens mutat (ERTM) en el seu domini d'unió al lligand. Aquesta mutació evita la unió al seu lligand natural (estradiol), però permet el reconeixement del metabòlit actiu del tamoxifè, el 4-OH-Tamoxifè. La fusió de Cre amb ERTM porta al segrest citoplasmàtic de Cre per Hsp90, evitant la seva activitat recombinasa al nucli. En canvi, el tractament amb 4-OH-Tamoxifè porta a la disrupció de la interacció amb Hsp90, permetent l'accés de Cre-ERTM al nucli i iniciant la recombinació de les seqüències loxP.

El tractament amb tamoxifè dels ratolins *mof*^{lox/lox}/cre genera un al·lel de mof mutant per eliminació de la regió compresa entre l'exó 2 i l'exó 5. El *splicing* de l'exó 1 amb el 6 resulta en un trencament de la pauta de lectura que es tradueix en una proteïna que conté els 57 primers aminoàcids de

MATERIALS I MÈTODES

MOF. Degut a que aquesta regió no inclou cap domini funcional de MOF, es considera que aquest al·lel és nul ($mof^{-/-}$). L'administració de tamoxifè als ratolins es va donar oralment durant 7 dies, en dosis de 6mg/40mg pes animal. Els animals van ser sacrificats a les dues setmanes després de finalitzar la última administració. La inducció del *knockout* en cèl·lules es va fer mitjançant l'administració del metabòlit actiu, 4-OH-tamoxifè, cada 24 hores durant 72 hores a una concentració final d'1µM. El medi de cultiu es canviava cada 48 hores. La genotipació per PCR estàndard també permet detectar la pèrdua de *mof*. El producte de l'al·lel delecionat té una mida de 277 pb (Fig. R16).

Solucions: El tamoxifè Sigma T5648 va ser preparat a una concentració de 30mg/ml en oli de blat de moro. Abans de l'administració va ser escalfat a 55°C durant 30 minuts en agitació. El 4-OH-tamoxifè Sigma H7904 es va dissoldre en metanol a una concentració de 26mM.

1.3. Ratolins doble *knockout* de *sirt2* i *mof*

Tant la colònia de ratolins de *sirt2* com la de $mof^{lox/lox}/cre$ tenien fons genètic C57BL/6, així que per generar la colònia doble *knockout* (DKO) vam creuar femelles $sirt2^{-/-}$ amb mascles $mof^{lox/lox}/cre$. Després de 5 retrocreuaments vam considerar que la nova colònia era estable. L'heterogeneïtat genètica obtinguda ($sirt2^{-/-}/mof^{lox/lox}/cre$, $sirt2^{+/-}/mof^{lox/lox}/cre$, $sirt2^{+/+}/mof^{lox/lox}/cre$, $sirt2^{-/-}/mof^{lox/+}/cre$, $sirt2^{+/-}/mof^{lox/+}/cre$, $sirt2^{+/+}/mof^{lox/+}/cre$, $sirt2^{-/-}/mof^{+/+}/cre$, $sirt2^{+/-}/mof^{+/+}/cre$, $sirt2^{+/+}/mof^{+/+}/cre$, $sirt2^{-/-}/mof^{lox/lox}$, $sirt2^{+/-}/mof^{lox/lox}$, $sirt2^{+/+}/mof^{lox/lox}$, $sirt2^{-/-}/mof^{lox/+}$, $sirt2^{+/-}/mof^{lox/+}$, $sirt2^{+/+}/mof^{lox/+}$, $sirt2^{-/-}/mof^{+/+}$, $sirt2^{+/-}/mof^{+/+}$, $sirt2^{+/+}/mof^{+/+}$) i la impossibilitat d'utilitzar femelles *cre* per a criar degut a que abandonaven a les camades, va dificultar el manteniment de la colònia DKO i l'obtenció dels animals per als estudis i experiments planejats. Pels experiments hem fet servir els genotips: $sirt2^{+/+}/mof^{+/+}/cre$, com a WT i control de l'expressió de *cre* després del tractament amb tamoxifè; $sirt2^{-/-}/mof^{lox/lox}/cre$, com a KO de *sirt2* i com a DKO de *sirt2* i *mof* després del tractament

amb tamoxifè; i $sirt2^{+/+}/mof^{lox/lox}/cre$, com a KO de *mof* després del tractament amb tamoxifè.

2. Cultius Cel·lulars

2.1. Fibroblasts embrionaris de ratolí primaris

Els fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) són derivats dels embrions $sirt2^{+/+}/mof^{+/+}/cre$, $sirt2^{+/+}/mof^{lox/lox}/cre$ i $sirt2^{-/-}/mof^{lox/lox}/cre$ del dia de gestació E13.5. El cordó d'embrions va ser extret de la mare i submergit en PBS (GIBCO) amb antibiòtic-antimicòtic (Sigma A5955). Cada sac embrionari va ser individualitzat i tractat com una línia cel·lular independent. Per a la digestió dels embrions es va submergir el cos, descartant el cap i el fetge, en 1ml de tripsina-EDTA 0.125% (GIBCO) i es va incubar durant tota la nit a 4°C. Al dia següent es van vortexar els embrions parcialment digerits i es van plaquejar en plaques de 100 mm. Els MEFs es van créixer i mantenir en Dulbecco's Eagle's Medium (DEMEM-GIBCO) suplementat amb 100 unitats /ml de penicil·lina/estreptomicina, aminoàcids no essencials (Glicina, L-Alanina, L-Asparagina, Àcid L-Aspàrtic, Àcid L-Glutàmic, L-Prolina, L-Serina) (GIBCO), 1mM piruvat sòdic (Sigma S8636) i 10% sèrum fetal boví (FBS). Es van cultivar a 37°C i 5% de CO₂. Els experiments amb MEFs primaris es van fer amb *passes* inferiors a 5. A partir del *passe* 10 es van considerar MEFs immortalitzades.

2.2. Línies cel·lulars

- HeLa: Línia derivada de cèl·lules de càncer de cèrvix.

- NIH 3T3: Fibroblasts embrionaris de ratolí derivats de la línia cel·lular aïllada d'embrions NIH Swiss al 1962 a la New York University School of Medicine Department of Pathology.

Aquestes línies cel·lulars es van cultivar en DMEM (GIBCO) suplementat amb 10% FBS (GIBCO) a 37°C i 5% de CO₂.

MATERIALS I MÈTODES

2.3. Procediments cel·lulars

2.3.1. Transfecció

Les cèl·lules HeLa, NIH3T3 i MEFs immortalitzades es van transfectar amb diferents vectors d'expressió en mamífers utilitzant polietilenimina (PEI) (Polysciences Inc 23966). La mescla de DNA es va fer amb DMEM utilitzant 4µl de PEI 1mg/ml per 1µg de DNA i es va incubar 5 minuts abans d'afegir-la a les cèl·lules en cultiu.

Plàsmids utilitzats en les transfeccions:

pcDNA4/T0-HA
 pcDNA4/T0-SirT2-HA
 pcDNA4/T0-Gal4-SirT2
 pcDNA4/T0-PP2AR1-HA
 pcDNA4/T0-Ub-HA
 (cedit per la Dra. Piwnica-Worms)
 pcDNA4/T0-MOF-HA
 pcDNA4/T0-MOFG326E-HA
 pcDNA4/T0-MOFK113,116,175R-HA
 pcDNA4/T0-MOFS348A-HA
 pcDNA4/T0-MOFΔH-HA
 pcDNA4/T0-MOFΔC-HA
 pcDNA4/T0-MOFHAT-HA
 pCMV4-FLAG

pCMV4-FLAG-SirT2
 pCMV4-FLAG-SirT2H187Y
 pCMV4-FLAG-PRSET7
 pCMV4-FLAG-MOF
 pcDNA3-myc
 pcDNA3-MOF-myc

2.3.1.1. Clonatges i mutagènesi dirigida

MOF-HA va ser subclonat en el plàsmid pcDNA4/T0-HA a partir de la seqüència de MOF continguda en el plàsmid pGEX-MOF-GST, cedit per la Dra. A. Akhtar.

Els mutants de MOF, MOFΔH, MOFΔC, MOFHAT van ser subclonats en el plàsmid pcDNA4/T0-HA a partir de la seqüència de MOF continguda en el plàsmid pcDNA4/T0-MOF-HA.

FLAG-MOF va ser subclonat en el plàsmid pCMV4-FLAG a partir de la seqüència de MOF continguda en el vector pcDNA4/T0-MOF-HA.

MOF-myc va ser subclonat en el plàsmid pcDNA3-myc a partir de la seqüència de MOF del vector pcDNA4/T0-MOF-HA.

Els primers utilitzats pels clonatges i la mutagènesi dirigida de MOF es troben especificats a la taula M1.

CONSTRUCCIÓ	NOM PRIMER	SEQÜÈNCIA PRIMER 5'-3'
pcDNA4/T0-MOF-HA	EcoRVhMOF U	GCCGATATCATGGCGGCACAGGGAGCTGCTGCG
	EcoRVhMOF L	CGGGGATATCGGCTTCTTGGAGAGCTTGACTTGCTTGTG
pcDNA4/T0-MOFΔH-HA	MOF BamHI-F	GCCGGATCCATGGCGGCACAGGGAGCTGCTGCG
	MOF EcoRV-R	CGGGGATATCGCTGTGGTGGGGTCCATCTCTGCG
pcDNA4/T0-MOFΔC-HA	BAMHICHROMOMOF_F	GGATCCCCCGCGGCGAGCCGGAAGTC
	SalI_CHROMO_MOF_R	GTCGACCTTCTCTGAGTTCTTCTGTA
pcDNA4/T0-MOFHAT-HA	BAMHI_HAT_MOF_F	GGATCCCCCAAGGTGAAGTATGTGGACA
	SalI_HAT_MOF_R	GTCGACACGTGCTGGCCCTTCCAGTA
pCMV4-FLAG-MOF	F_KpnI_MOF	CGGGTACCAATGGCGGCACAGGGAGCTGCT
	R_BamHI_MOF	ATGGATCCCGTCACTTCTTGGAGAGCTTGA
pcDNA3-MOF-myc	MOF BamHI-F	GCCGGATCCATGGCGGCACAGGGAGCTGCTGCG
	MOF ECORV-U	CGGGGATATCGGGCTTCTTGGAGAGCTTGACTTGCTTGT
pcDNA4/T0-MOFS348A-HA	MOF S348A F	AGCACAGTCGGCGCCCCGGAAGCC
	MOF S348A R	GGCTTCTCCGGGGCGCCGACTGTGCT
pcDNA4/T0-MOFK113-116R-HA	MOF K116R/K113R F	CGCTGACCCGGACAGTGCGGGATGCTGTACA
	MOF K116R/K113R R	TGTACAGCATCCCGCACTGTCCGGGTCAGCG
pcDNA4/T0-MOFK175R-HA	MOF K175R F	AGGCGATCACCCGGGTGAAGTATGTGGACAA
	MOF K175R R	TTGTCCACATACTTACCCGGGTGATCGCCT
pcDNA4/T0-MOFG326E-HA	MOF_G326_F	CCTACCAACGCCGGAATACGGGAAGTTCCTC
	MOF_G326_R	GAGGAACCTCCCGTATTCGCGGCGTTGGTAGG

Taula M1. Primers utilitzats per clonatges i mutagènesi dirigida

2.3.2. Procediment de sincronització

Les cèl·lules HeLa van ser sincronitzades mitjançant el doble bloqueig de timidina (Sigma T1895): Primer bloqueig amb tractament de 4mM de timidina durant 14 hores, posteriorment es van cultivar les cèl·lules en medi fresc durant 10 hores, i el segon bloqueig es va fer durant 14 hores més amb 4mM de timidina. Finalment el medi va ser reemplaçat per medi fresc i es va comptabilitzar aquest punt, on les cèl·lules es troben aturades a la interfase G1/S, com a temps 0. Les cèl·lules van ser recollides en diferents temps amb la finalitat d'obtenir cèl·lules en fase S, G2/M i fase G1. L'estadi del cicle cel·lular va ser determinat per citometria de flux mitjançant la quantificació del iodur de propidi incorporat. Protocol detallat més endavant.

2.3.3. Tractaments cel·lulars

Tractaments d'estrès oxidatiu: Els MEFs van ser tractats amb H₂O₂ 100µM durant 1 hora.

Tractament amb inhibidors d'HDACs: Tractament amb nicotinamida (Sigma N3376) 2mM dissolta en H₂O durant 24 hores. Transcorregut aquest temps es canvia el medi i es torna a tractar amb nicotinamida i Trichostatin A (TSA) (Sigma T8552) 1µM dissolt en DMSO durant 3 hores.

Tractament amb inhibidor del proteosoma (MG-132 (Sigma 133407826)): Per l'estudi de la degradació proteica a través del proteosoma es van tractar les cèl·lules amb 5µM de MG-132 12 hores després de la transfecció, i van ser incubades amb l'inhibidor durant 12 hores més.

Tractament amb inhibidor de síntesi proteica (ciclohexamida (Sigma 01810)): Les cèl·lules van ser tractades a les 48 hores de la transfecció amb 100µg/ml de ciclohexamida durant 0, 1 i 3 hores.

Per a la detecció dels focus de PR-SET7 per IF, els MEFs van ser prèviament tractats amb MG-132 15µM durant 1 hora.

3. Procediments amb proteïnes

3.1. Extractes proteics i fraccionament cel·lular

- Extracte total per detecció de nivells proteics:

Els pellets cel·lulars van ser directament resuspesos en Buffer Laemmli (2% SDS, 10% glicerol, 60mM Tris pH6.8, 0.01% Blau de bromofenol) mitjançant sonicació durant 20 segons amb sonicador d'agulla.

- Extracte total per co-immunoprecipitació:

Els pellets cel·lulars es van resuspendre en buffer RIPA (50mM Tris pH 7.8, 150mM NaCl, 0.5% àcid deoxicòlic, 0.1% SDS, 1% NP-40) amb 50 unitats de Benzona (Sigma E1014) per cada 5X10⁶ cèl·lules i es van incubar durant 4 hores a 4°C. Posteriorment es van centrifugar els extractes durant 10 minuts a 7000g i es va guardar el sobrenedant com a extracte proteic total.

- Fraccionament cel·lular per a detecció de nivells proteics:

Per a aquesta extracció es va utilitzar una modificació del mètode Dignam (Dignam, Lebovitz, & Roeder, 1983). El pellet cel·lular va ser resuspès en Buffer A (10mM Tris pH7.8, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂) i incubat durant 10 minuts en gel. L'extracte va ser vortexat i centrifugat a màxima velocitat durant 1 minut a 4°C. El sobrenedant es va recollir com a la fracció citoplasmàtica. El pellet va ser resuspès en Buffer C (10mM Tris pH7.8, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 25% glicerol) i incubat durant 20 minuts en gel. Posteriorment es va vortexar i centrifugar l'extracte a màxima velocitat durant 5 minuts a 4°C. Es va recollir el sobrenedant com a fracció soluble nuclear. Per aconseguir l'extracte soluble total, es va mesclar la fracció citoplasmàtica amb la nuclear. Per obtenir la fracció de proteïnes unides fortament a la cromatina (fracció de cromatina) el pellet es va rentar un cop amb BC500 (10mM Tris pH7.8, 0.5mM EDTA, 0.1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10% glicerol, 500mM KCl)+0.05%NP-40 i posteriorment va ser resuspès

MATERIALS I MÈTODES

en Buffer Laemli (2% SDS, 10% glicerol, 60mM Tris pH6.8, 0.01% Blau de bromofenol) mitjançant sonicació amb agulla durant 20 segons.

- Fraccionament cel·lular per co-immunoprecipitació:

Es va seguir el mètode de Dignam modificat mencionat a l'apartat anterior. Un cop obtingut el pellet de cromatina, es va rentar un cop amb BC500mM (10mM Tris pH7.8, 0.5mM EDTA, 0.1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10% glicerol, 500mM KCl)+0.05% NP-40. Posteriorment es va resuspendre en Buffer RIPA (50mM Tris pH 7.8, 150mM NaCl, 0.5% àcid deoxicòlic, 0.1% SDS, 1% NP-40) amb Benzona (Sigma E1014) a raó de 50unitats per cada 5×10^6 cèl·lules i es va incubar 4 hores a 4°C en agitació. L'extracte va ser centrifugat durant 10 minuts a 7000g. Es va obtenir el sobrenedant com a fracció de cromatina.

3.2. Western blot

Les mostres es van carregar en gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat de sodi (SDS-PAGE) de diferents percentatges, dependent de les mides de les proteïnes a separar. Les proteïnes van ser transferides a membrana de nitrocel·lulosa (GE Healthcare). L'electroforesi i la transferència es van realitzar en condicions desnaturants en presència de SDS.

Les membranes es van bloquejar en 5% de llet desnatada en PBS-0.1% Tritó. Els anticossos primari i secundari es van diluir en PBS-0.2% Tween i la incubació es va fer durant 1 hora o 30 minuts a temperatura ambient, respectivament. Els anticossos secundaris (anti-rabbit Sigma A0545; anti-mouse Sigma A9044) utilitzats estaven conjugats amb peroxidasa (Horseradish peroxidase HRP) i el marcatge va ser detectat amb Luminol o *EMD Millipore Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate* (ECL).

Els anàlisis densitomètrics dels *western blots* es van realitzar amb el programa Quantity One de BIO-RAD.

3.3. Tinció de plata i colloidal-coomassie

Per la tinció de plata, després de l'electroforesi, les proteïnes es van fixar al gel, incubant una hora en agitació en una solució de metanol al 50% i àcid acètic glacial al 10% i 30 minuts en una solució al 30% de glutaraldehid 25%. Posteriorment, es van fer rentats durant 2 hores amb aigua destil·lada, amb recanvis freqüents. Tot seguit el gel va ser tenyit durant 30-45 minuts amb la solució de tinció preparada cautelosament (mix1: 10ml H₂O, 2gAgNO₃; mix2: 0.74ml 5M NaOH, 9.6 NH₄OH i 45ml H₂O. Es va afegir gota a gota la mix 1 a la mix

ANTICÒS ANTI-	DILUCIÓ	REFERÈNCIA PRODUCTE
Acetil-Lisina	1/1000 en PBS+0.2%Tween+5%BSA	Cell Signaling 9814
Actina	1/5000 en PBS+0.2%Tween	Sigma A1978
Flag	1/1000 en PBS+0.2%Tween	Sigma 7425
Gal4	1/1000 en PBS+0.2%Tween	Millipore 06.262
GST	1/5000 en PBS+0.2%Tween	Upstate 06.332
HA	1/1000 en PBS+0.2%Tween	Sigma 6908
H3	1/2000 en PBS+0.2%Tween	Cell Signaling 9715S
H4	1/2000 en PBS+0.2%Tween	Cell Signaling 2935
H4K16Ac	1/1000 en PBS+0.2%Tween	Millipore 07.329
MOF	1/1000 en PBS+0.2%Tween+5%BSA	Abcam 200660
Myc	1/1000 en PBS+0.2%Tween	Cell Signaling 2276S
PR-SET7	1/1000 en PBS+0.2%Tween+5%BSA	Millipore 06.1304
SirT2	1/1000 en PBS+0.2%Tween+5%BSA	Sigma S8447

Taula M2. Llistat d'anticossos utilitzats per *western blot*.

2 mentre s'agitava). Es van fer tres rentats de 10 minuts amb aigua destil·lada, per seguidament revelar amb una solució d'àcid cítric al 2.5% i formaldehid al 0.925%. Un cop revelat el gel, la reacció es va aturar amb una solució de metanol al 50% i àcid acètic glacial al 10%.

Tot i que la tinció en plata és més sensible que la tinció amb col·loidal-coomassie, el pas de fixació la fa incompatible amb els protocols per espectrometria de masses. Per aquest motiu, les mostres que han estat analitzades per espectrometria de masses, prèviament s'han separat per electroforesi i el gel s'ha tenyit amb col·loidal-coomassie. El procediment és molt senzill. El gel se summergeix en la solució de tinció (coomassie (G250) en metanol-acètic i sulfat amònic) durant tota la nit i es destenyeix mitjançant varis rentats amb aigua destil·lada.

3.4. Co-immunoprecipitació de proteïnes i pull downs

Les co-immunoprecipitacions es van realitzar amb els extractes totals, amb extractes de la fracció soluble total, o de la fracció de cromatina, obtinguts segons els protocols detallats a l'apartat 3.1 de materials i mètodes, utilitzant les reïnes d'agarosa anti-FLAG (Sigma A2220) o anti-HA (Sigma A2095). El protocol va consistir en co-transfectar els plàsmids específics que expressaven les proteïnes amb diferents tags en cèl·lules HeLa. Els extractes d'aquestes cèl·lules van ser incubats amb les reïnes amb els anticossos específics de cada condició (anti-FLAG o anti-HA) entre 4h i ON (*overnight*). Després de la incubació, la reïna va ser rentada dos cops amb BC100 (10mM Tris pH7.8, 0.5mM EDTA, 0.1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10% glicerol, 100mM KCl) (amb o sense 0.05% NP-40) i 4 cops amb BC500 (10mM Tris pH7.8, 0.5mM EDTA, 0.1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10% glicerol, 500mM KCl) (amb o sense 0.05% NP-40). Les proteïnes es van eluir amb glicina pH2.3 0.2M. L'elució va ser carregada en un gel d'electroforesi per detectar les proteïnes co-eluides.

Pel *pull down in vitro* de MOF i SirT2, la reïna de sefarosa glutatió (Healthcare Bio-Sciences 17075601) va ser preincubada amb GST o MOF-

GST purificat de bacteri. Després de rentar, la mateixa reïna va ser incubada amb FLAG-SirT2 o SirT2 recombinant purificat de bacteri. Després de 2 rentats amb BC100 i 4 rentats amb BC500, les mostres van ser eluides per competència amb glutatió 20mM.

4. Procediments de purificació

4.1. Purificació de nucleosomes i histones del nucleosoma central

La purificació de mononucleosomes i oligonucleosomes de HeLa es va realitzar com ja havia estat descrit (Schnitzler, 2001). Breument, els nuclis van ser extrets amb Buffer RSB (10mM Tris pH 7.5, 10mM NaCl, 3mM MgCl₂, 0.1mM PMSF, 0.1mM DTT) i 1% NP-40. Després, es van diferir amb MNasa a raó de 1 unitat/5x10⁴ cèl·lules a 37°C durant diferents temps dependent de l'eficàcia de la reacció. El resultat de la reacció va ser separat i purificat en un gradient de sacarosa (5-30%). Les fraccions que contenien mononucleosomes i oligonucleosomes van ser dialitzades en N-Buffer (10mM HEPES pH7.5, 1mM EDTA, 10mM KCl, 10% glicerol i 0.2mM PMSF). Una fracció de mononucleosomes es va utilitzar per aconseguir histones del nucleosoma central. Les histones lliures es van purificar mitjançant una columna d'hidoxiapatita (BIO-RAD Bio-Gel HT 130-0151) que allibera les histones del DNA.

4.2. Purificació de MOF, SirT2 i PR-SET7 de cèl·lules de mamífer

Les proteïnes van ser purificades de cèl·lules HeLa transfectades bé amb pcDNA4/T0-MOF-HA, pcDNA4/T0-MOFK113,116,175R-HA, pcDNA4/T0-MOFS348A-HA, pcDNA4/T0-MOFG326E-HA, pcDNA4/T0-SirT2-HA, pCMV4-FLAG-SirT2 o pCMV4-FLAG-PR-SET7. Segons la proteïna expressada, es va seguir un protocol d'extracció diferent. En el cas de SirT2, MOF i els seus mutants, es va seguir el procediment d'extracció de Dignam, explicat anteriorment, per obtenir l'extracte citoplasmàtic. El pellet dels nuclis es va incubar amb

MATERIALS I MÈTODES

Buffer C (10mM Tris pH7.8, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 25% glicerol) amb Benzonasa (Sigma E1014) a raó de 50 unitats per cada 5x10⁶ cèl·lules durant 4 hores a 4°C. Finalment es van ajuntar ambdós extractes per obtenir l'extracte total. En el cas de PR-SET7, l'extracte total, incloent la fracció unida a la cromatina, es va obtenir mitjançant la incubació de la mostra amb Buffer RIPA (50mM Tris pH 7.8, 150mM NaCl, 0.5% àcid deoxicòlic, 0.1% SDS, 1% NP-40) amb Benzonasa (Sigma E1014) a raó de 50 unitats per cada 5x10⁶ cèl·lules durant 4 hores a 4°C.

La mostra final es va incubar amb les reïnes anti-FLAG (Sigma A2220) o anti-HA (Sigma A2095) ON a 4°C. Posteriorment, les reïnes es van rentar 2 cops amb BC100 (10mM Tris pH7,8, 0.5mM EDTA, 0.1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10% glicerol, 100mM KCl) amb 0.05% NP-40 i 8 cops amb BC500 (10mM Tris pH7.8, 0.5mM EDTA, 0.1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10% glicerol, 500mM KCl) amb 0.05% NP-40. Les proteïnes van ser eluïdes amb pèptid FLAG o HA 0.2mg/ml en BC500.

4.3. Purificació de proteïna recombinant

Els vectors d'expressió a procariotes pET30b-SirT2 i pGEX-MOF-GST van ser transformats en bacteris competents *E.coli* BL21. Es van créixer quatre colònies amb 5ml de LB tota la nit. El creixement dels quatre tubs va ser transferit a un Erlenmeyer amb 2L de LB i es va incubar fins que el cultiu va arribar a una absorbància de 0.6. En aquest punt, es va induir l'expressió de la proteïna afegint 1mM de IPTG (Sigma 15502) al cultiu i es va incubar durant 3 hores. Es va acumular el pellet bacterià i es va resuspendre en Buffer NETN (20mM Tris pH7.8, 100mM NaCl, 1mM EDTA i 0.5% NP-40) amb 0.2% sarcosyl, es va sonicar i centrifugar a 15000 rpm a 4°C a la centrífuga Sorval durant 15 minuts. Es va recollir el sobrenedant i el pellet es va tornar a resuspendre en Buffer NETN amb 2% de sarcosyl i es va centrifugar a 15000 rpm, a 4°C a la centrífuga Sorval durant 15 minuts. Els dos sobrenedants es van ajuntar per constituir l'extracte proteic.

- Purificació amb columna d'agarosa-níquel:

Les proteïnes fusionades a cues d'Histidines poden ser purificades mitjançant cromatografia d'afinitat amb reïnes de níquel. El SirT2 de l'extracte dels bacteris transformats amb pET30b-SirT2 va ser purificat mitjançant la incubació amb NiNTA Agarose (Qiagen 30210). Primerament, la reïna va ser equilibrada amb el Buffer NETN. Tot seguit, es va incubar l'extracte amb la reïna en rotació durant 30 minuts a 4°C i després de varis rentats amb Buffer NETN i BC500, la proteïna es va obtenir mitjançant l'elució amb 100mM d'Imidazol (Merck 1047160250) en BC500.

- Purificació amb columna de sefarosa-glutatió:

El MOF de l'extracte de bacteris transformats amb pGEX-MOF-GST (plàsmid cedit per Dra. Akhtar) va ser purificat mitjançant la incubació amb reïna de sefarosa-glutatió (Healthcare Bio-Sciences 17075601). L'extracte es va incubar amb la reïna prèviament equilibrada amb Buffer NETN, durant 30 minuts a 4°C en rotació. Després, es va rentar la reïna dues vegades amb Buffer NETN i una vegada amb Buffer TST (50mM Tris pH7.8, 150mM NaCl i 0.1% Tritó). La proteïna es va obtenir mitjançant la elució amb glutatió reduït 20mM en Buffer TST amb DTT 5mM.

4.4. Purificació de complexos

- Complex SirT2-MOF:

Per a la purificació d'aquest complex es van realitzar tres passos cromatogràfics correlatius. Primerament es va passar l'extracte proteic per la columna d'intercanvi aniònic DEAE nitrocellulose DE52 (Whatman). L'elució es va realitzar mitjançant gradient de concentració afegint BC100 (10mM Tris pH7,8, 0.5mM EDTA, 0.1mM PMSF, 0.1mM DTT, 10% glicerol, 100mM KCl), BC300 (com BC100 però amb 300mM KCl), BC500 (500 KCl) i BC1M (1M KCl). Les elucions es van separar per SDS-PAGE i es van revelar per *western blot*. Amb aquelles fraccions que contenen les proteïnes d'interès es va realitzar una co-IP amb reïna d'agarosa-anti-FLAG (Sigma A2220), d'acord amb

el protocol prèviament detallat a l'apartat 4.2. Les elucions que contenien les proteïnes d'interès es van passar per la columna d'exclusió de mida o filtració en gel, Superose 6, a través del sistema de purificació de proteïnes Äkta (GE Healthcare). La mostra es va eluir mitjançant gradient de concentració (BC100-BC1M). Les fraccions recollides es van separar per SDS-PAGE i van ser analitzades per espectrometria de masses.

- Complex SirT2-MOF-PR-SET7

Per a la purificació d'aquest complex es va passar la mostra per un gradient de glicerol i per una columna d'afinitat. Per generar el gradient de glicerol es van preparar dues solucions de glicerol, una del 12.5% i l'altra del 35% en 20mM Tris pH7.8, 25µM EDTA i 200mM KCl. Mitjançant un productor de gradient, es van mesclar les dues solucions en un tub apte per ultracentrífuga, generant un gradient de glicerol continu. La mostra va ser afegida a la part superior del gradient i tot junt. Per tal de separar la mostra d'acord la seva densitat, es van centrifugar els tubs a la ultracentrífuga a 35000rpm a 4°C durant 24 hores, amb acceleració màxima i aturada sense trencament. Es van recollir fraccions de 150µl des de la part superior del gradient (fraccions més lleugeres) fins a la part inferior (fraccions més pesades). Per determinar en quines fraccions estaven les proteïnes d'interès, es va córrer un SDS-PAGE i es va revelar per *western blot*. Posteriorment, es va realitzar una co-IP amb reïna d'agarosa-anti-FLAG (Sigma A2220) amb les fraccions seleccionades, d'acord amb el protocol detallat a l'apartat 4.2. Les elucions es van separar per SDS-PAGE i el resultat es va revelar per *western blot*.

5. Assajos enzimàtics *in vitro*

5.1. Assaig d'acetilació

L'assaig d'acetilació d'histones es va realitzar amb el MOF-HA i les histones del nucleosoma central purificats de cèl·lules HeLa. Es van incubar les histones amb o sense MOF-HA en buffer d'acetilació (50mM Tris pH8, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 5%

glicerol) amb acetyl-CoA marcat amb ^{14}C durant 1 hora a 30°C. La reacció es va aturar amb Buffer Laemli (2% SDS, 10% glicerol, 60mM Tris pH6.8, 0.01% Blau de bromofenol) i es va separar per SDS-PAGE. Després de la transferència en membrana de PVDF (MERK), el ^{14}C incorporat en les histones es va detectar per autorradiografia, la càrrega d'histones amb tinció de coomassie i la quantitat d'enzim utilitzada en l'assaig, per *western blot*.

L'assaig d'acetilació de PR-SET7 per MOF es va fer de la mateixa manera que l'acetilació d'histones però substituint les histones per FLAG-PR-SET7 purificat de HeLa. Igualment, el ^{14}C incorporat a PR-SET7 es va mesurar per autorradiografia, la càrrega de PR-SET7 amb tinció de coomassie i la quantitat d'enzim utilitzada per *western blot*.

5.2. Assaig de desacetilació de MOF per SirT2

En aquesta reacció es va fer servir la purificació de MOF-HA de cèl·lules HeLa tractades amb nicotinamida per inhibir les sirtuïnes com a substrat de SirT2 HA purificat de HeLa. Els dos van ser incubats en buffer de desacetilació (50mM Tris HCl pH8, 100mM NaCl, 2mM DTT) amb o sense 0.5mM NAD^+ durant 2 hores a 37°C (A Vaquero et al., 2004). La reacció es va aturar dialitzant les mostres en BC100 a 4°C, per posteriorment analitzar els residus desacetilats per espectrometria de masses. En el cas de la comprovació de la desacetilació per *western blot*, les reaccions es van aturar amb Buffer Laemli i es van separar per SDS-PAGE.

5.3. Assaig de metilació de nucleosomes post assaig d'acetilació

Aquesta reacció es va fer en dos passos: Primer es va fer servir PR-SET7 com a substrat de MOF en un assaig d'acetilació i posteriorment, el PR-SET7 pre-incubat amb MOF es va utilitzar com a enzim de la reacció de metilació de nucleosomes. En l'assaig d'acetilació es va incubar FLAG-PR-SET7 amb o sense MOF-HA purificats de cèl·lules HeLa, en buffer d'acetilació (50mM Tris pH8, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 5% glicerol) amb o sense acetyl-CoA

MATERIALS I MÈTODES

20µM durant 1 hora a 30°C. Seguidament la reacció es va aturar per diàlisi en buffer de metilació (50mM Tris HCl pH8.5, 5mM MgCl₂ i 4mM DTT) a 4 °C. Finalment, els mononucleosomes van ser incubats amb el FLAG-PR-SET7 resultant de la reacció anterior i SAM (S-adenosil-metionina) marcat amb ³H. La reacció es va aturar amb Buffer Laemli i es va separar per SDS-PAGE. El ³H incorporat als mononucleosomes es va detectar per fluorografia amb l'esprai EN3HANCE (Perkin Elmer) que converteix les emissions radioactives en llum que pot ser detectada més eficientment pels films. La càrrega d'histones es va revelar per tinció de coomassie i la quantitat d'enzim emprada en la reacció per *western blot*.

6. Anàlisi del cicle cel·lular

Per l'anàlisi del cicle cel·lular 1.5 x 10⁶ cèl·lules van ser tripsinitzades i rentades dues vegades amb PBS+1%FBS. Tot seguit es van fixar amb etanol 70%, afegit gota a gota mentre es vortexava la mostra. Les cèl·lules van ser incubades al menys 4 hores a -20°C.

Per a comprovar la fase del cicle cel·lular en que es trobaven les cèl·lules de l'experiment de sincronització es va utilitzar el marcatge amb iodur de propidi (PI) (Sigma P4170) per determinar la quantitat de DNA. Les cèl·lules prèviament fixades amb etanol al 70% es van rentar dues vegades amb PBS+1% FBS i es van resuspendre en 400 µl de PBS+1% FBS, 35 µl de PI (1mg/ml) i 5 µl de RNasa A (10mg/ml). Es va incubar durant 45 minuts a 37°C i posteriorment es van analitzar amb el citòmetre de flux GALLIOS (Beckman).

Per a l'anàlisi de les poliploidies, les cèl·lules fixades amb etanol al 70% es van rentar dues vegades amb PBS+1%FBS i es van incubar amb 1µg de 7-AAD (BD Pharmigen 559925) en 400µl de PBS+1%FBS durant tota la nit. Les cèl·lules es van passar pel citòmetre GALLIOS (Beckman) i el cicle es va analitzar amb el programa FlowJo.

Per a monitoritzar les mitosis, les cèl·lules fixades amb etanol al 70% es van permeabilitzar i bloquejar amb 0.5%Tritó i 1% FBS. Posteriorment es van incubar en 50µl PBS+1%FBS amb anti-H3S28p-A488 (BD Biosciences 558610) dilució 1/10 durant 1 hora a temperatura ambient i a les fosques. Es van rentar dos cops amb PBS+1%FBS i es van incubar tota la nit amb 1µg de 7-AAD en 400µl de PBS+1%FBS. Les cèl·lules es van passar pel citòmetre FACSCallibur (Beckman) i el cicle cel·lular es va analitzar amb el programa FlowJo.

Per a la quantificació dels nivells de metilació d'H4K20 les cèl·lules fixades amb etanol es van permeabilitzar i bloquejar amb 0.5%Tritó i 1% FBS. Posteriorment es van incubar en 50µl PBS+1%FBS amb anti-H3S28p-A488 (BD Biosciences 558610) dilució 1/10 i anti-H4K20me1 (Novus Biologicals 30091), o anti-H4K20me2 (Millipore 05672), o anti-H4K20me3 (Abcam 78517) durant 1 hora a temperatura ambient i a les fosques. Es va rentar un cop amb PBS+1%FBS i es van incubar amb els anticossos secundaris pertinents conjugats amb A568. Es van rentar dos cops amb PBS+1%FBS i es van incubar tota la nit amb 1µg de 7-AAD en 400µl de PBS+1%FBS. Les cèl·lules es van passar pel citòmetre FACSCallibur (Beckman) i la quantificació dels nivells d'H4K20me1-3 es va fer amb el programa FlowJo.

FLUORÒFOR	ABSORCIÓ nm	EMISSIÓ nm
DAPI	358	461
A488	495	519
PI	535	617
A568	578	603
A647	546	647
7-AAD	546	647

Taula M3. Longituds d'ona d'absorció i emissió dels fluoròfors utilitzats per citometria de flux i microscopia.

7. Tècniques de microscopia

7.1. Immunohistoquímica (IHC)

Els òrgans extrets dels ratolins van ser inclosos en OCT i posteriorment congelats a -80°C . L'OCT és un medi sintètic d'inclusió que afavoreix la realització de talls al criostat a temperatures molt baixes (-23°C). Aquesta característica permet obtenir i emmagatzemar els teixits sense necessitat d'una fixació prèvia, ja que les proteases romanen inactives a aquestes temperatures y permet fer estudis d'immunohistoquímica.

Les IHC es van realitzar en talls de teixit de ronyó de $5\mu\text{m}$ de gruix. Els talls es van fixar amb paraformaldehid al 4% en el cas d'H4K16Ac o amb metanol fred (-20°C) en el cas d'H4K20me1 i me3. Tot seguit es va permeabilitzar amb tritó al 0.2% durant 15 minuts. El bloqueig es va fer amb PBS amb 10% NGS (Normal Goat Serum) (Sigma G9023) i 2% de Caseïna durant 1 hora a temperatura ambient en càmera humida. Posteriorment els teixits van ser incubats amb l'anticòs primari diluït en PBS amb 3% NGS i 2% Caseïna durant tota la nit a 4°C en càmera humida. El dia següent, els portaobjectes es van rentar i incubar amb l'anticòs secundari (purificat de cabra i conjugat a Alexa488, Alexa568 o Alexa647, dependent de l'experiment) diluït 1/1000 en PBS amb 3% NGS i 2% Caseïna durant 1 hora a temperatura ambient dins la càmera humida i a les fosques. Després de tres rentats, els teixits es van incubar amb DAPI $1\mu\text{g}/\text{ml}$ durant 10minuts. Després d'un rentat amb aigua, es va procedir al muntatge en mowiol amb *antifading*.

Anticossos utilitzats: α -H4K16Ac (Millipore 07329) dilució 1/50, α -H4K20me1 (Novus Biologicals 30091) dilució 1/200, α -H4K20me3 (Abcam 9053) dilució 1/50.

7.2. Immunofluorescència (IF)

Per les immunofluorescències generals d'H3S10p-H3S28p, γ -H2AX, o FLAG-SirT2 les cèl·lules es van fixar amb paraformaldehid al 4% durant 7 minuts a temperatura ambient. Llavors, les cèl·lules van ser permeabilitzades amb Buffer B (3% BSA, 0.2% Tritó en PBS) durant 5 minuts i posteriorment bloquejades amb BSA al 3% en PBS durant tota la nit a 4°C . L'anticòs primari es va incubar durant 1 hora a temperatura ambient en Buffer B durant 1 hora en cambra humida. Després de 3 rentats amb BSA al 3% en PBS, els cobreobjectes es van incubar amb l'anticòs secundari (conjugat a Alexa488, Alexa568 o Alexa647, segons l'experiment) dilució 1/1000, durant 30 minuts a temperatura ambient en cambra humida i a les fosques. Després de tres rentats, les cèl·lules es van tenyir amb DAPI $1\mu\text{g}/\text{ml}$ durant 4 minuts. Després d'un rentat amb aigua, es va procedir al muntatge en mowiol amb *antifading*. Les imatges es van adquirir en el microscopi confocal Leica SP5 i es van processar i analitzar mitjançant el programa Fiji.

En el cas de l'estudi dels focus de PR-SET7, el pas de permeabilització precedeix el de fixació. Aquesta diferència és important per a descartar la fracció soluble i només detectar la fracció unida a la cromatina. Després del rentat inicial amb PBS fred, es va procedir a la permeabilització amb Tritó al 0.5% en PBS durant 10 minuts a 4°C . La fixació es va fer en paraformaldehid al 3% en PBS durant 15 minuts. Els següents passos es van realitzar seguint el protocol general per IF citat a dalt. Les imatges adquirides es van processar amb el programa Huygens Deconvoluió (Scientific Volume Imaging). Les reconstruccions tridimensionals i l'anàlisi de les imatges es va fer amb el programa Imaris (Bitplane, A.G.)

Anticossos utilitzats: α -H3S10p (Millipore 06570) dilució 1/100, α -H3S28p (Sigma 9908) dilució 1/200; α - γ H2AX (Abcam 2893) dilució 1/200, α -FLAG (Sigma 7425) dilució 1/200, α -PR-SET7 (Millipore 061304) 1/600.

8. Procediments amb DNA i RNA

8.1. Genotipació

8.1.1. Purificació de DNA

- Mostra provinent d'orelles:

Es va afegir 300µl de Buffer Punch (10mM NaOH, 1mM EDTA) al teixit provinent d'orelles de ratolí. Es va escalfar durant 10 minuts a 99°C. El sobrenedant es va fer servir com a substrat per a la PCR de genotipació.

- Mostra provinent de caps d'embrió o cèl·lules:

Es va resuspendre la mostra en tampó de lisi (10mM Tris pH8, 5mM EDTA, 100mM NaCl), 1% SDS i 100µg/ml i es va incubar a 37°C tota la nit i 1 hora a 55°C per acabar de disgregar el teixit. Es va afegir NaCl 1.5M i es va centrifugar a màxima velocitat 15 minuts. El DNA del sobrenedant es va precipitar amb 0.8 volums d'isopropanol i es va centrifugar a màxima velocitat durant 10 minuts a 4°C. El pellet es va rentar amb etanol al 70% i després d'assecar es va resuspendre en aigua fins obtenir una concentració de 100ng/µl. Posteriorment es va utilitzar com a substrat per a la PCR de genotipació.

8.1.2. PCR

La genotipació de *mof*, *sirt2* i *cre* dels ratolins i la comprovació de la inducció de la deleció de *mof*, tant en cèl·lules com en ratolins, es va fer mitjançant PCR (reacció en cadena de la polimerasa, de les sigles en anglès) convencional, utilitzant els *primers* detallats a la taula M3. Per a la genotipació de *sirt2* i *mof* es van fer servir la GoTaq Green Master Mix (Promega) i per la genotipació de *cre* la KAPA 2G FAST Hotstart ReadyMix (Cultek). El resultat es va separar en un gel d'agarosa del 1.5%.

8.2. Purificació de mRNA i RT-qPCR

La purificació de RNA es va fer amb TRIZol (Sigma) d'acord amb el protocol estàndard.

Breument, es van resuspendre les cèl·lules en TRIZol i es va afegir cloroform. Després de centrifugar a màxima velocitat durant 15 minuts a 4°C, es van obtenir tres fases. Es va recollir la fase superior que contenia el RNA i es va precipitar amb isopropanol. Després de dos rentats amb etanol al 75%, es va assecar el pellet i es va resuspendre en aigua. A partir de 1000ng de RNA es va generar el cDNA mitjançant retro-transcripció amb Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) i utilitzant *primers* hexamèrics aleatoris.

La PCR quantitativa a temps real (RT-qPCR) es va realitzar a partir del mRNA aïllat, utilitzant el Thermal Cycler 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) i SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). L'expressió gènica relativa es va determinar mitjançant el mètode del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001), seguint els següents passos:

1. Normalització: En tots els casos es van fer servir com a valors de referència per a la normalització, els CT (Threshold cycle, cicles fins arribar al llindar fixat) dels gens d'expressió constitutiva o *housekeeping*, *EEF2*, *RPL38* i *HPRT1* de ratolí. Al CT del gen d'estudi de cada mostra se li va sotstreure el CT del gen de referència, donant el valor del ΔCT .
2. Comparació de l'expressió de la mostra amb la mostra control: Un cop obtingut el ΔCT de cada mostra, per obtenir l'expressió relativa es va restar el valor del ΔCT de la mostra control al ΔCT de la mostra d'estudi, obtenint el $\Delta\Delta CT$.
3. Transformar el $\Delta\Delta CT$ en un valor relatiu: Amb aquesta fórmula $E^{-\Delta\Delta CT}$, que té en compte l'eficiència (E) de la RT-PCR, s'obté la relació entre l'expressió del gen d'interès en la mostra d'estudi i en la mostra control. L'eficiència màxima de la Real-Time PCR és 2. Per a poder calcular l'eficiència de cada Real-Time i no sobreestimar-la, es va utilitzar una corba estàndard. La pendent de la corba ens va permetre calcular l'eficiència, segons la fórmula:
 $E=10^{-1/pendent}$.

MATERIALS I MÈTODES

Nom	Primer 5'-3'	Primer 5'-3'
mEEF2	TGTCAGTCATGCCCCATGTG	CATCCTTGCGAGTGTCAAGTGA
mRPL38	AGGATGCCAAGTCTGTCAAGA	TCCTTGTCTGTGATAACCAGG
mHPRT1	AGCTACTGTAATGATCAGTCGACG	AGAGGTCTTTTACCAGCA
Cdc25C	CACGACTCGGCAAACCTAAG	AGTAAGCGGAGAGGCAGACA
Cdca3	CAGCGCACTCCTATTCAGGT	CAGTGAGCACTGAGGGTCTG
CiclinaB2	TGAAACCAGTGCAGATGGAG	CTGCAGAGCTGAGGGTTCTC
MOF Mm	CCCCAGGGAAGGAGATCTAT	GGTCTTGTGGTCCAGGAAAA
Genotipació sirt2	GACTGGAAGTGATCAAAGCTC	CAGGGTCCTCACGAGTCTCATG CAAATCTGGCCAGAACTTATG
Genotipació mof	TATCTGCCTTTCTCTGTCAATGGG	AGGTGAGCCAGGTTAGGACTTGG TGGCACACACCTTTAGATCCACC
Genotipació cre	CTCTAGAGCCTCTGCTAACC	CCTGGCGATCCCTGAACATGTCC

Taula M4. Primers utilitzats per a la RT-PCR i per a la genotipació del ratolins. Pel disseny dels primers per la RT-PCR es va fer servir el mètode de *intron skipping*: La seqüència gènica es va obtenir del Genome Browser, els primers es van dissenyar amb el programa Primer 3 i es va comprovar la seva especificitat mitjançant Primer Blast

RESULTATS

RESULTATS

1. SirT2 regula la dinàmica de MOF a la cromatina durant G2/M

Les dades moleculars que relacionaven MOF amb SirT2 i la regulació d'H4K16Ac eren pràcticament inexistents en el moment en que es va començar aquest projecte al gener del 2013. Per aquest motiu i pel clar paper de SirT2, MOF i la desacetilació d'H4K16Ac en el control de la transició G2/M vam decidir estudiar els mecanismes pels quals aquests dos enzims regulaven l'acetilació d'H4K16 durant la mitosi.

1.1. SirT2 interacciona amb MOF a través del seu domini catalític

Treballs previs del director de la Tesi, Àlex Vaquero, van descriure que SirT2 era translocat al nucli i desacetilava globalment H4K16Ac durant la transició G2/M (Vaquero et al., 2006). Tot i que l'activitat desacetilasa de SirT2 sobre H4K16Ac estava clara, això no exclouia que SirT2 pogués estar modulant els nivells d'H4K16Ac mitjançant altres mecanismes. D'acord amb això, SirT2 també podia estar controlant els nivells d'H4K16Ac a través de la regulació de MOF, l'acetiltransferasa responsable d'aquesta modificació. Recolzant aquesta hipòtesi estan les dades que mostren com l'activitat, la localització i la funció de MOF estan regulades en part, per les proteïnes amb les que interacciona i forma complexes (Cai et al., 2010; Dou et al., 2005; Peng et al., 2012; Smith et al., 2005).

Amb la finalitat d'estudiar si SirT2 modulava els nivells d'acetilació d'H4K16 a través de la regulació de MOF, primer de tot vam fer experiments de co-immunoprecipitació (co-IP) entre SirT2 i MOF en cèl·lules HeLa, així com *pull-downs in vitro* de proteïnes recombinants. D'acord amb el que esperàvem, vam confirmar que SirT2 i MOF interaccionen (Fig. R1A-B). Els experiments de *pull-down* van demostrar que la interacció entre SirT2 i MOF era directe i no requeria cap altre proteïna d'unió, ja que tant SirT2 purificat de cèl·lules de mamífer (FLAG-SirT2) com SirT2 recombinant

purificat de bacteris (rSirT2) eluïen junt amb MOF purificat de bacteris (MOF-GST) (Fig. R1.A). A més, en els assajos de co-IP en cèl·lules HeLa vam observar com FLAG-SirT2 interaccionava amb MOF endogen, indicant que la interacció entre SirT2 i MOF es produïa en un sistema viu i no era un mecanisme forçat de la manipulació *in vitro* (Fig. R1B).

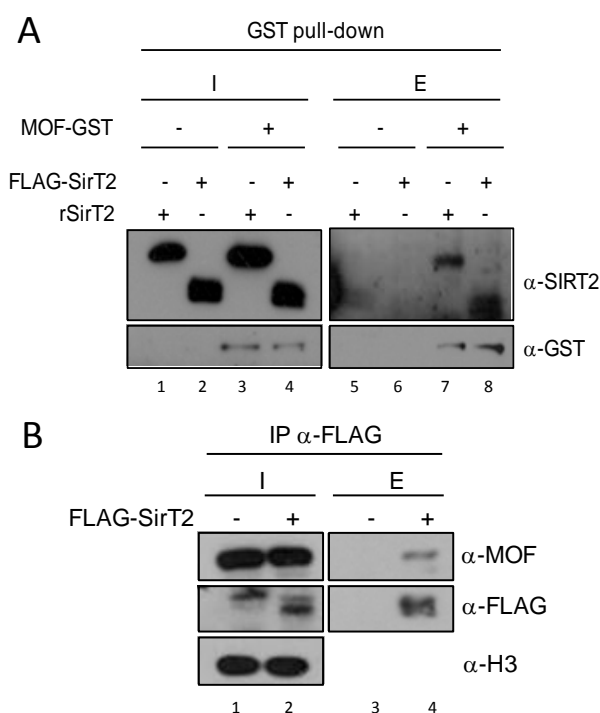


Figura R1. SirT2 i MOF interaccionen *in vitro* i *in vivo*. A, *Pull-down* amb reïna de sefarosa-glutatió. El SirT2 co-eluït amb MOF va ser detectat per *immunoblotting*. B, *Western blot* de la co-IP realitzada amb reïna d'agarosa anti-FLAG. El MOF endogen co-eluït amb SirT2 es va detectar amb anticòs anti-MOF.

MOF, com la resta de proteïnes de la família MYST, conté un domini catalític HAT amb un lloc d'unió a acetil-CoA i un dit de zinc tipus C2HC. Com a particularitat, conté un domini chromo-barrel (CBD), estructuralment similar als dominis chromo però incapaç de reconèixer lisines metilades. Hi ha nombrosos estudis que intenten explicar la funcionalitat de cadascun d'aquests dominis, però no s'ha arribat a un consens. El més acceptat és que l'activitat catalítica de MOF resideix en el domini HAT i que l'autoacetilació de la lisina 274 dins d'aquest domini produeix un canvi conformacional en l'enzim que afavoreix el reconeixement de

RESULTATS

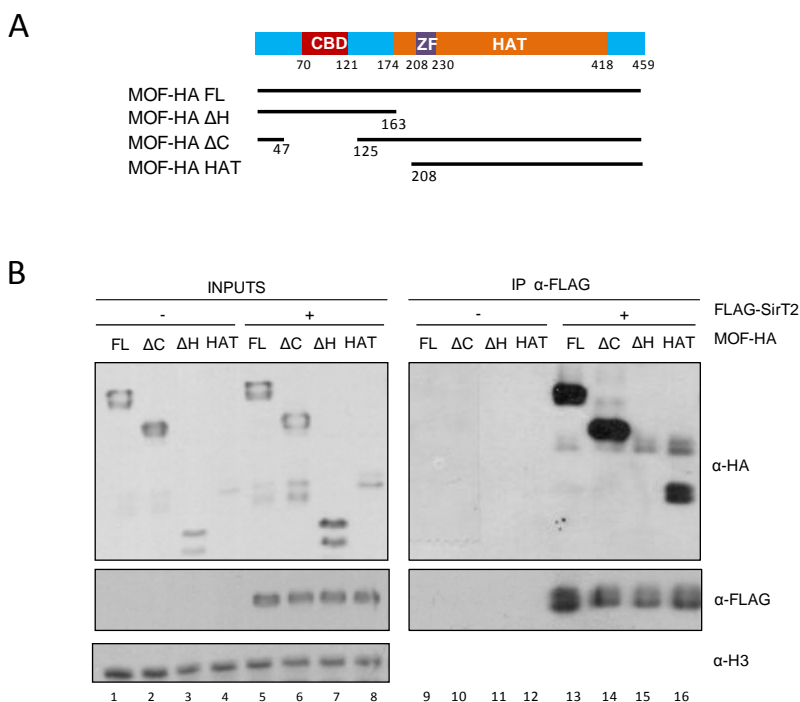


Figura R2. SirT2 interacciona amb el domini catalític de MOF. A, Representació esquemàtica de la seqüència aminoacídica i dominis funcionals de MOF, així com dels diferents mutants truncats de MOF. CBD, domini chromo-barrel, ZF, Zinc finger. B, *Western blot* de la co-IP entre FLAG-SirT2 i les diferents regions de MOF. En el carril 15 s'observa com la regió de MOF que no conté el domini HAT no co-elueix amb SirT2.

substrat i l'activació de MOF (Yuan et al., 2012). Per identificar la regió de MOF implicada en la interacció amb SirT2 vam generar diferents mutants truncats de MOF i posteriorment vam fer assajos de co-IP amb SirT2 (Fig. R2A-B). Com es mostra a la figura R2B, SirT2 interacciona amb MOF-ΔC (residus de l'1 al 47 i del 125 al 459) i amb MOF-HAT (residus del 208 al 459). A MOF-ΔC li falta el domini CBD i conté la resta de la seqüència de l'enzim, mentre que MOF-HAT, només conté el domini HAT de MOF. SirT2 no interacciona amb MOF-ΔH (residus de l'1 al 163), regió que conté el domini CBD i li manca el domini catalític. D'acord amb aquests resultats, SirT2 interacciona amb el domini catalític de MOF.

1.2. SirT2 interacciona amb MOF durant G2/M

L'objectiu principal d'aquest apartat era determinar si SirT2 regulava l'acetilació d'H4K16 durant la transició G2/M a través de MOF. Per aquest motiu el següent pas va ser estudiar la interacció entre SirT2 i

MOF en les diferents fases dels cicle cel·lular. Per aconseguir aquest propòsit vam sincronitzar cèl·lules HeLa mitjançant el doble bloqueig amb timidina (Bostock et al., 1971). Després d'un període de 14 hores de tractament amb timidina, 10 hores amb medi fresc i 14 hores més de tractament, les cèl·lules queden aturades en el límit entre G1 i S. Vam recollir les cèl·lules a les 4, 7, 8, 9, 10 i 14 hores després d'alliberar-les de l'últim bloqueig. Per tal de determinar en quin punt del cicle cel·lular es trobaven les vam marcar amb iodur de propidi (PI) i les vam analitzar per citometria de flux, per posteriorment fer assajos de co-IP (Fig. R3A). Com ja s'ha mencionat anteriorment, la localització de SirT2 durant la major part del cicle cel·lular és citoplasmàtica, en canvi, MOF es troba únicament al nucli. Per aquest motiu, per tal d'evitar la interacció entre SirT2 i MOF *in vitro* i poder estudiar la interacció que es donava dins de la cèl·lula quan cada proteïna ocupava el seu compartiment, el temps d'incubació de les co-IP es va minimitzar i es va fer servir un tampó amb alta concentració de sals i detergent per a l'extracció i la incubació de les proteïnes amb la reïna d'immunoprecipitació.

RESULTATS

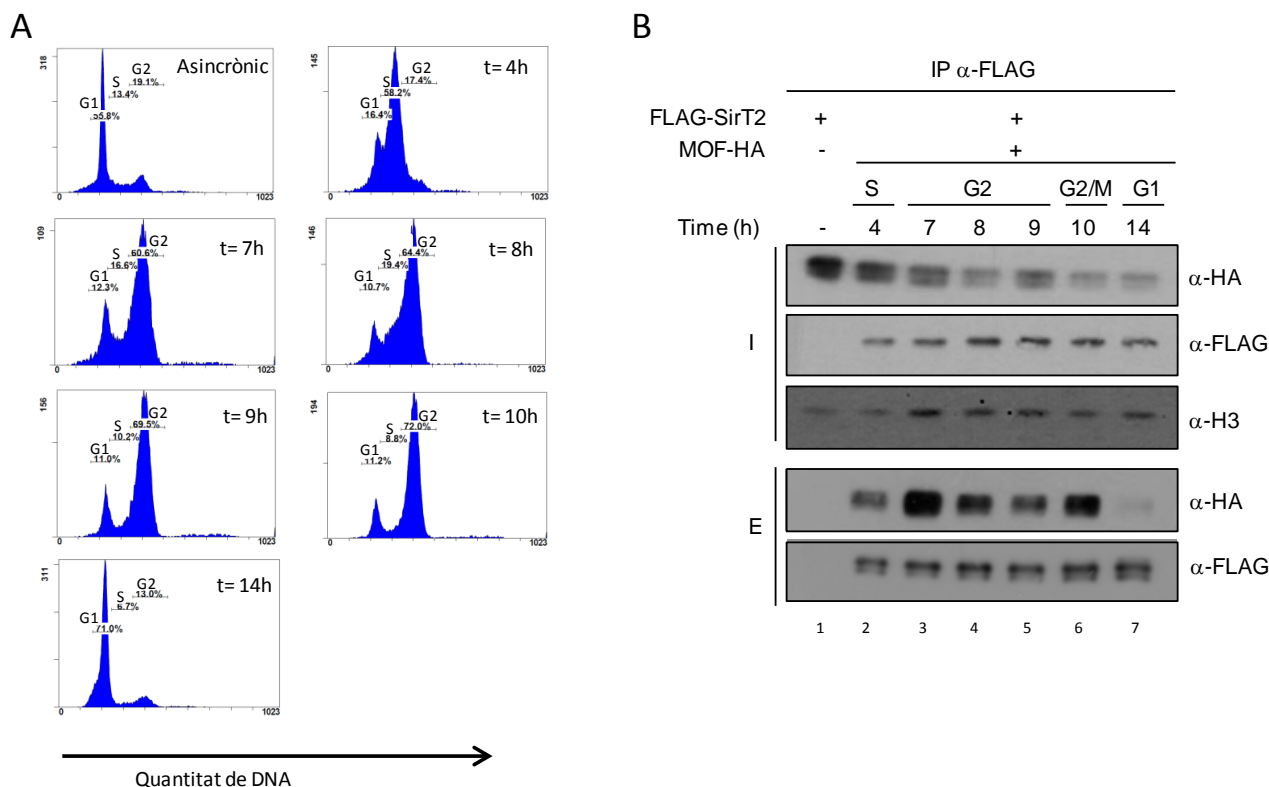


Figura R3. La interacció entre SirT2 i MOF es dona majoritàriament durant la fase G2 primerenca i G2/M. A, Distribució del cicle cel·lular de les cèl·lules HeLa sincronitzades i recollides en els temps indicats. B, IP en diferents punts del cicle cel·lular (distribució mostrada en A) de FLAG-SirT2 amb reina d'agarosa anti-FLAG. El MOF-HA co-eluït amb SirT2 es va detectar per immunoblotting.

Com es mostra en la figura R3B, la interacció entre SirT2 i MOF es dona majoritàriament durant la fase G2 primerenca i durant G2/M.

Seguidament ens vam plantejar si aquesta interacció era un fenomen transitori i làbil dins de la cèl·lula o si contràriament, SirT2 i MOF formaven un complex estable amb altres proteïnes durant aquesta fase del cicle cel·lular. La identificació i caracterització del putatiu complex ens donaria pistes de les implicacions funcionals d'aquestes dues proteïnes durant aquest estadi del cicle cel·lular. Per purificar el possible complex format per SirT2 i MOF durant G2/M, vam sincronitzar cèl·lules HeLa que sobreexpressaven FLAG-SirT2 i MOF-HA en G2/M. Vam obtenir l'extracte de les proteïnes de la cromatina mitjançant la digestió del pellet nuclear amb la nucleasa benzonasa. Aquest extracte va ser sotmès a diferents passos cromatogràfics: columna d'intercanvi aniònic (DE52), columna d'afinitat (α -FLAG) i finalment un pas per una columna d'exclusió de mida o filtració en gel (Superose 6)

(Fig. R4A). Després de l'últim pas de cromatografia, vam fer SDS-PAGE i *western blot* per detectar quines fraccions contenien SirT2 (Fig. R4B). Posteriorment vam carregar aquestes fraccions en un segon gel d'acrilamida i mitjançant tinció de plata vam identificar dos pics on MOF i SirT2 estaven presents (Fig. R4C). Vam analitzar la composició proteica d'aquests dos pics per espectrometria de masses.

De l'anàlisi per espectrometria de masses, fet en col·laboració amb el laboratori del Dr. Marcus Krüger (Univ. Colònia), es van trobar moltes proteïnes que potencialment podien formar part d'aquest complex. Entre elles, es va identificar la subunitat reguladora de PP2A, PP2AR1A. Aquesta fosfatasa, per una banda desfosforila CDC25 i evita que pugui activar CDK1-CiclinaB, impeding la progressió a través de G2/M. Per una altra banda, a través de la desfosforilació de WEE1, la quinasa inhibidora de CDK1-CiclinaB, promou la fosforilació

RESULTATS

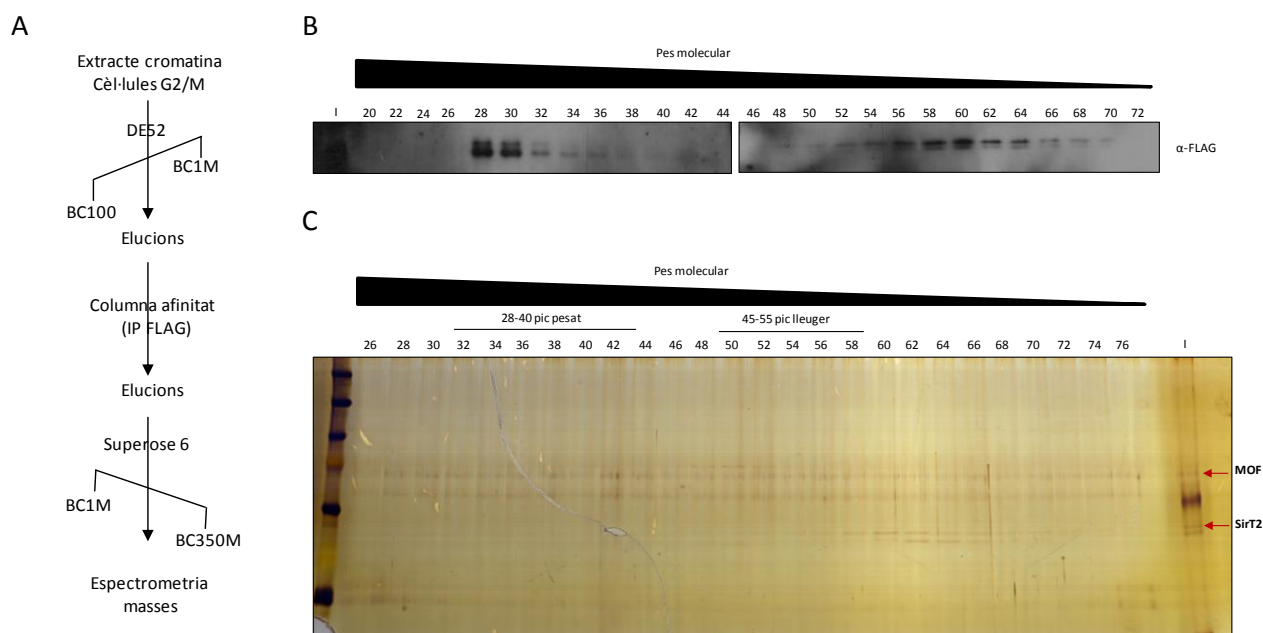


Figura R4. SirT2 i MOF formen un complex durant G2/M. A, Representació esquemàtica dels passos cromatogràfics seguits per a la purificació del complex. B, *Western blot* de les fraccions recollides del pas per la columna *Superose 6*. C, Electroforesi i tinció de plata de les fraccions que contenen SirT2 vistes a l'apartat B.

i inactivació del complex CDK-Ciclina, conduint a l'aturada del cicle en G2/M. Així doncs, PP2A ha de ser inactivat durant G2/M per a que el cicle avanci (Jeong & Yang, 2013). Entre totes les proteïnes que van ser identificades en l'anàlisi per espectrometria de masses, vam decidir corroborar la interacció entre SirT2, MOF i PP2AR1, per la seva importància en la transició G2/M. A la figura R5 es mostra l'experiment de co-immunoprecipitació realitzat amb

les proteïnes sobreexpressades que confirma que SirT2 (Fig. R5, carrils 1 i 5), MOF (Fig. R5, carrils 1 i 2) i PP2R1A formen part del mateix complex durant G2/M, obrint nous horitzons en el paper de SirT2 i MOF en la regulació de l'entrada a mitosi.

1.3. SirT2 regula els nivells de MOF a la cromatina i promou la seva degradació durant G2/M

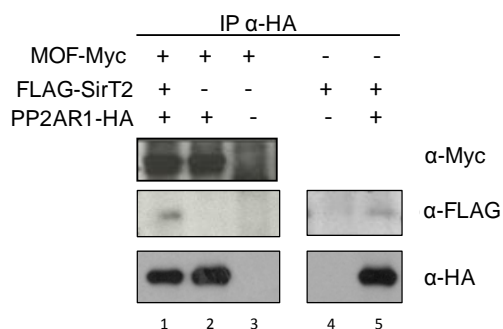


Figura R5. PP2A forma part del complex de SirT2-MOF de G2/M. IP de PP2A-HA amb reïna d'agarosa anti-HA. MOF-Myc i FLAG-SirT2 co-eluits amb PP2AR1 van ser detectats per *immunoblotting*.

Un dels mecanismes més comuns per regular la funció de les proteïnes és el control del recanvi proteic, ja sigui a nivell de síntesi, controlant la transcripció, o a nivell de degradació. D'acord amb això, MOF està regulat per ubiquitinació i degradació dependent de proteosoma a través de SirT1 (Peng et al., 2012). Si SirT2 regulava l'estabilitat de MOF de la mateixa manera es desconeixia fins al moment. Durant el transcurs dels nostres estudis, vam percebre que la sobreexpressió de SirT2 afectava negativament als nivells de MOF. Així doncs, quan sobreexpressàvem SirT2 en cèl·lules 3T3 (línia cel·lular estable de MEFs de ratolí) observàvem una disminució en els nivells endògens totals de MOF (Fig. R6A panell esquerra). Encara que aquest efecte

RESULTATS

no era exclusivament dependent de l'activitat de SirT2, ja que el mutant catalític SirT2H187Y (descriu anteriorment per Finnin i col·laboradors (Finnin et al., 2001)) tenia la mateixa repercussió sobre els nivells de MOF que la proteïna WT (Fig. R6A panell dret). Els nostres resultats mostraven que la interacció entre SirT2 i MOF es donava majoritàriament a la cromatina (Fig. R6B). Amb l'objectiu d'estudiar si SirT2 controlava la unió de MOF a la cromatina, vam sobreexpressar quantitats creixents de SirT2 en cèl·lules 3T3 i vam purificar les proteïnes de l'extracte cromatínic. Com es mostra a la figura R6C, al incrementar SirT2 els nivells de MOF a la cromatina disminueixen. D'acord amb les nostres observacions, SirT2 no només controla el recanvi proteic de MOF, sinó que regula negativament la seva unió a la cromatina (Fig. R6C). Posteriorment vam detectar els nivells de MOF en els MEFs dels nostres ratolins KO de *sirt2* (descrits a materials i mètodes) i com esperàvem, els nivells de MOF estaven incrementats (Fig. R6D).

Tenint en compte que els nivells globals d'H4K16Ac decreixen durant G2/M de manera dependent de SirT2 i que els nostres resultats mostraven que la interacció entre SirT2 i MOF es donava majoritàriament durant G2 i mitosi, vam voler determinar si el control dels nivells de MOF per SirT2 tenia relació amb aquests fets. Amb aquest objectiu, vam sincronitzar cèl·lules HeLa que sobreexpressaven MOF-HA i vam estudiar l'impacte de la sobreexpressió de FLAG-SirT2 sobre els nivells de MOF en les diferents fases del cicle cel·lular. Els nostres resultats mostren que SirT2 té un efecte negatiu en els nivells de MOF durant les fases G2/M i G1 (Fig. R7A). Degut a que SirT2 és citoplasmàtica durant G1, la regulació dels nivells de MOF per SirT2 a la fase G1 podien ser resultat de l'alteració de la localització de SirT2 com a conseqüència de la seva sobreexpressió. Per descartar aquest fet vam analitzar la localització cel·lular de SirT2 en aquestes cèl·lules mitjançant immunofluorescència. A la figura R7B es mostra com SirT2 sobreexpressat

Fig. 6

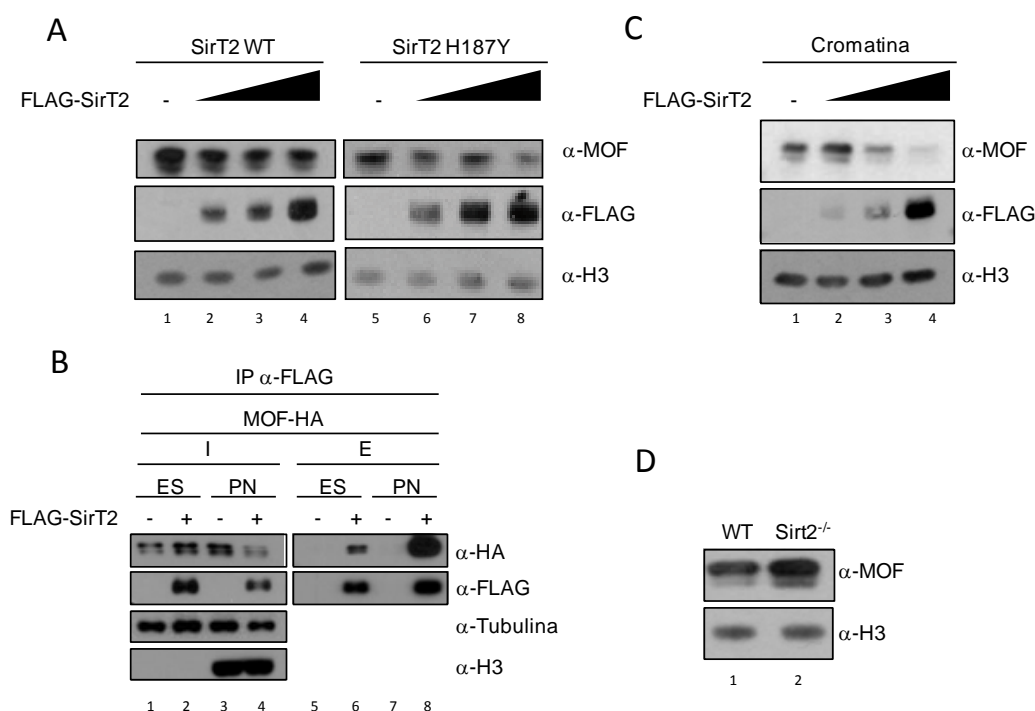


Figura R6. SirT2 controla negativament els nivells de MOF cel·lulars i a la cromatina. A, Extractes cel·lulars totals de cèl·lules 3T3 sobreexpressant quantitats creixents (2, 4 i 8 µg) de FLAG-SirT2 WT o FLAG-SirT2H187Y. El DNA transfectat va ser igualat amb el plàsmid pCMV4-FLAG buit. Els nivells endògens de MOF van ser detectats per *immunoblotting*. B, Co-IP de SirT2 i MOF a la fracció soluble (ES, extracte soluble) i a la cromatina (PN, pellet nuclear). C, Extractes de cromatina de cèl·lules 3T3 en les que es van sobreexpressar quantitats creixents (2, 4 i 8 µg) de FLAG-SirT2. Els nivells endògens de MOF van ser detectats per *western blot*. D, *Western blot* dels nivells totals de MOF en MEFs primàries WT i KO de *sirt2*.

RESULTATS

segueix sent majoritàriament citoplasmàtic, suggerint que no és la deslocalització de SirT2 deguda a la sobreexpressió de la proteïna el que afavoreix que els nivells de MOF decreixin durant G1, sinó el control que exerceix SirT2 sobre MOF durant G2/M, és el que repercuteix en els nivells de l'acetiltransferasa fins la fase G1, fet que concorda amb el manteniment dels nivells d'H4K16Ac baixos durant mitosi.

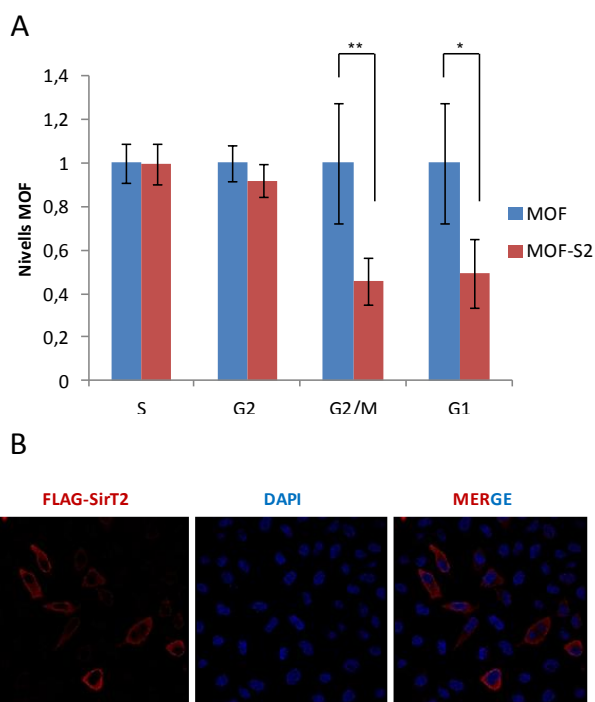


Figura R7. SirT2 regula els nivells de MOF durant les fases G2/M i G1 del cycle cel·lular. A, Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb MOF-HA amb o sense FLAG-SirT2 i recollides en les diferents fases del cycle cel·lular. Els nivells de MOF van ser detectats per *immunoblotting* i quantificats per densitometria amb el programa Quantity One (BIO-RAD). B, IF amb anti-FLAG de cèl·lules HeLa transfectades amb FLAG-SirT2. * $P_{valor} < 0,05$; ** $P_{valor} < 0,01$

Els nostres resultats mostraven la clara existència d'un mecanisme de regulació dels nivells de MOF dependent de SirT2. El següent pas va ser determinar la via per la qual SirT2 controlava el recanvi proteic de MOF. SirT2 ha estat relacionada amb el control de la transcripció a diferents nivells. Per una banda, SirT2 reprimeix la transcripció controlant directament l'estat de la cromatina mitjançant la desacetilació d'H4K16Ac o H3K18Ac als promotors de determinats gens (Eskandarian et al., 2013; Liu et al., 2013). Per una altra banda, la desacetilació de factors de transcripció dependent de SirT2 s'ha vist

que pot activar l'expressió dels seus gens diana, com és el cas de FoxO1 o FoxO3 (Jing et al., 2007; Wang et al., 2007), o reprimir-la com s'ha observat amb p53 (Jin et al., 2008). Tenint en compte aquestes dades i amb la finalitat de determinar si SirT2 controlava l'expressió del gen *mof*, vam procedir a analitzar els nivells de mRNA de *mof* en MEFs WT i KO de *sirt2* per PCR quantitativa. D'acord amb els resultats mostrats a la figura R8, tant les cèl·lules WT com les KO de *sirt2* presentaven nivells similars de mRNA de *mof*, per tant SirT2 no regula els nivells cel·lulars de MOF ni a través del control de l'expressió de *mof* ni de l'estabilitat del seu mRNA. Aquests resultats apuntaven a que SirT2 estava controlant els nivells de MOF mitjançant la regulació de l'estabilitat de la proteïna.

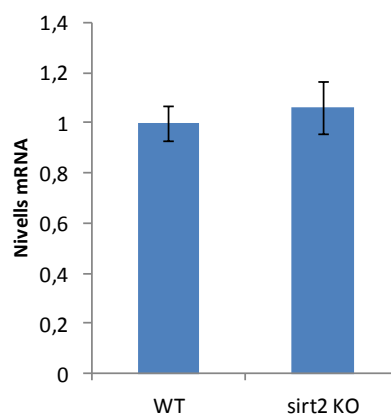


Figura R8. SirT2 no regula els nivells de mRNA de mof. Quantificació del mRNA endogen de *mof* per PCR quantitativa en MEFs WT o KO de *sirt2*.

La velocitat de síntesi i degradació proteica controla la vida mitjana de les proteïnes dins de la cèl·lula. Un cop descartada la implicació de SirT2 en el control de la taxa de síntesi de MOF, vam voler analitzar si SirT2 estava controlant la degradació. Per això vam inhibir la síntesi proteica mitjançant el tractament amb ciclohexamida, que interfereix en l'activitat peptidil transferasa de la subunitat ribosomal 60S i bloqueja l'elongació, fet que ens va permetre estudiar l'efecte de SirT2 en la velocitat de degradació de MOF en cèl·lules HeLa. La sobreexpressió de SirT2 produïa una disminució més ràpida dels nivells de MOF en les cèl·lules tractades amb ciclohexamida, indicant que SirT2 afavoreix la degradació de MOF (Fig. R9).

RESULTATS

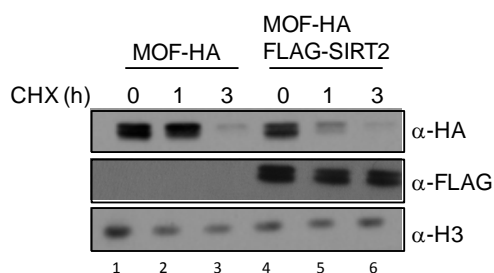


Figura R9. SirT2 promou la degradació de MOF. Cèl·lules HeLa van ser transfectades amb MOF-HA amb o sense FLAG-SirT2, tractades amb cicloheximida i recollides després de 0, 1 o 3 hores. Els nivells de MOF van ser determinats per *western blot*.

El principal sistema de degradació cel·lular compren la via ubiquitina-proteosoma. Mitjançant el tractament amb MG132, un inhibidor de l'activitat del complex 26S del proteosoma, es va estudiar si la presència de SirT2 seguia afectant l'estabilitat de MOF. Vam observar que quan aquesta via estava

inhibida, SirT2 no promovia la degradació de MOF (Fig. R10A-B), indicant que el proteosoma estava implicat en la degradació de MOF dependent de SirT2. Així doncs, la presència de SirT2 havia d'afavorir la ubiquitinació de MOF. Per comprovar-ho vam sobreexpressar FLAG-MOF, Gal4-SirT2 i Ubiquitina-HA en cèl·lules HeLa i vam immunoprecipitar FLAG-MOF. Mitjançant *western blot*, es va detectar la quantitat d'ubiquitina lligada a MOF (Fig. R10C). Com esperàvem, la quantitat de MOF ubiquitinat augmentava en presència de Gal4-SirT2, indicant que SirT2 fomentava la ubiquitinació de MOF i la consegüent degradació pel proteosoma. Amb consonància amb les nostres observacions prèvies, el mutant catalític de SirT2 afavoria de la mateixa manera que SirT2 WT la ubiquitinació de MOF, deslligant l'activitat catalítica de SirT2 amb aquest mecanisme de regulació (Fig. R10C).

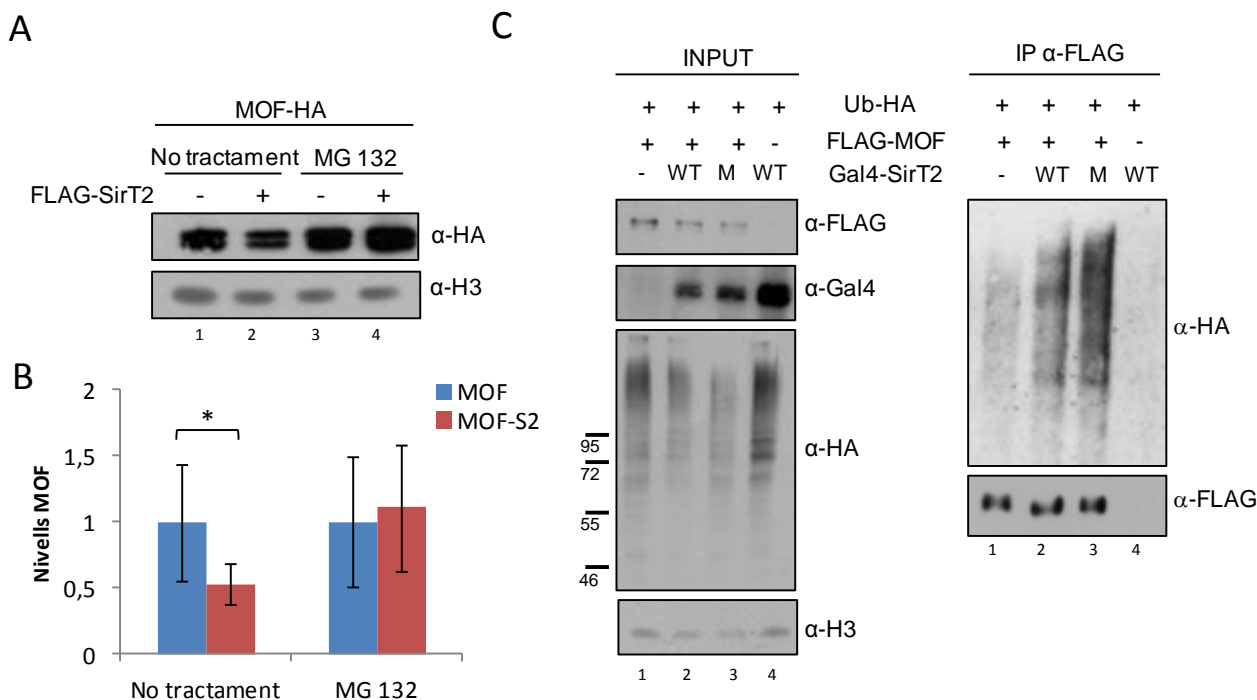


Figura R10. SirT2 promou la degradació de MOF dependent de la via ubiquitina-proteosoma. A, *Western blot* dels nivells de MOF-HA amb o sense sobreexpressió de SirT2 i amb o sense tractament amb MG132 (inhibidor proteosoma). B, Quantificació dels nivells de MOF mostrats en A amb el programa Quantity One de BIO-RAD. Per a l'estudi s'han fet servir 6 duplicats. C, Assaig d'ubiquitinació. Se sobreexpressen FLAG-MOF, Ub-HA (Ubiquitina) i Gal4-SirT2WT o Gal4-SirT2H187Y en cèl·lules HeLa. La immunoprecipitació de MOF i la posterior detecció d'ubiquitina per *western blot*, permet quantificar la ubiquitina lligada a MOF. M, mutant, * $P_{valor} < 0,05$

1.4. SirT2 controla l'activitat catalítica de MOF

1.4.1. SirT2 desacetila i inactiva MOF

En l'estudi fet pel laboratori del Dr. E. Seto al 2012 van trobar que MOF presentava 18 de les lisines de la seva seqüència acetilades quan es tractaven cèl·lules HeLa amb inhibidors d'HDACs. A més, van descriure que la desacetilació de MOF per SirT1 inhibia l'activitat acetiltransferasa i en promovia la ubiquitinació i degradació (Peng et al., 2012). Amb l'objectiu d'esbrinar si SirT2 era capaç de modular l'activitat de MOF d'una manera similar a com ho feia SirT1, vam realitzar un assaig d'acetilació *in vitro*. Es va purificar MOF-HA de cèl·lules HeLa que expressaven MOF-HA sol o amb quantitats creixents de FLAG-SirT2 (Fig. R11 dos requadres superiors). Les elucions es van incubar amb histones del nucleosoma central i amb acetil-CoA marcat amb carboni 14 ($[^{14}\text{C}]\text{-AcCoA}$). Per autorradiografia es va detectar com l'activitat acetiltransferasa de MOF decreixia al incrementar la quantitat de SirT2 co-eluïda amb MOF (Fig. R11 tercer panell), indicant que SirT2 regula negativament l'activitat de MOF.

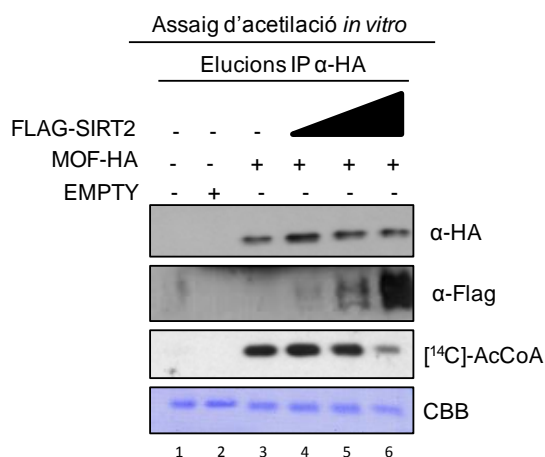


Figura R11. SirT2 impedeix l'activitat catalítica de MOF *in vitro*. Assaig d'acetilació *in vitro* en el que es va fer servir MOF purificat de cèl·lules que sobreexpressaven MOF-HA sol o amb quantitats creixents de SirT2. Les elucions es van incubar amb histones del nucleosoma central i $[^{14}\text{C}]\text{-AcCoA}$. La incorporació de radioactivitat es va detectar per autorradiografia. Dos panells superiors: *western blot* de les elucions utilitzades en l'assaig d'acetilació. Tercer panell: assaig d'acetilació. Panell inferior marcatge amb coomassie-blue de de les histones de de l'assaig d'acetilació.

Tenint en compte que l'estat d'acetilació de MOF és important per la seva activitat catalítica (Peng et al., 2012; Sun et al., 2011; Yuan et al., 2012), vam contemplar la possibilitat de que MOF també fos substrat de SirT2 i que mitjançant la desacetilació, SirT2 controlés l'activitat acetiltransferasa de MOF. Per comprovar aquesta hipòtesi, primer de tot, es van estudiar els nivells d'acetilació de MOF en cèl·lules HeLa que sobreexpressaven SirT2, en les diferents fases del cycle cel·lular. Vam observar que l'acetilació de MOF disminuïa quan se sobreexpressava SirT2, a més hi havia una tendència a que això es produís en major mesura durant G2/M (Fig. R12A). Seguidament, vam realitzar un assaig de desacetilació *in vitro* en el que es va incubar MOF-HA purificat de cèl·lules HeLa tractades amb inhibidors de HDACs (TSA i nicotinamida) amb FLAG-SirT2 amb o sense NAD^+ . Fent servir un anticòs anti-acetil-lisina vam detectar que l'estat d'acetilació de MOF decreixia en presència de SirT2 i NAD^+ , indicant que SirT2 desacetila MOF *in vitro* (Fig. R12B). Posteriorment, les mostres resultants de l'assaig de desacetilació es van analitzar per espectrometria de masses en col·laboració amb el laboratori del Dr. M. Krüger. En l'anàlisi es van trobar tres residus de MOF desacetilats per SirT2, les lisines 113 i 116 al domini CBD i la lisina 175 al domini HAT (Fig. R12C-D). Les nostres dades són consistents i complementàries a la informació aportada pel laboratori del Dr. E. Seto. Les lisines 113, 116 i 175 estaven entre les 18 lisines de MOF que Peng i col·laboradors van identificar com acetilades en cèl·lules tractades amb inhibidors d'HDACs (Peng et al., 2012), tot i que en els seus experiments, no van trobar la desacetilasa a càrrec de la regulació d'aquestes acetilacions. De manera que els nostres resultats han identificat a SirT2 com a una nova sirtuïna capaç de regular l'estat d'acetilació de MOF i la seva activitat catalítica. Per comprovar que la desacetilació de MOF dependent de SirT2 produïa la inactivació de l'enzim, vam mutar les tres lisines a arginina per mimetitzar l'estat desacetilat. Vam comparar l'activitat de MOF WT amb la del triple mutant (MOFK3R) en un assaig d'acetilació *in vitro* com el que s'ha mencionat anteriorment. Cal remarcar que tant MOF WT com MOF3KR es van obtenir de cèl·lules HeLa tractades amb nicotinamida, per tal de potenciar l'estat acetilat del

RESULTATS

MOF WT i assegurar-nos de que l'efecte que veiem era degut a les lisines mutades. En els resultats mostrats en la figura R12E es veu com el triple mutant perd notablement l'activitat catalítica. El conjunt dels resultats mostrats en les figures R11 i R12 demostra com SirT2, a través de la desacetilació de les lisines 113, 116 i 175, inhibeix l'activitat catalítica de MOF.

Adicionalment, en l'anàlisi per MS es va trobar que la serina 348 de MOF passava de l'estat fosforilat al desfosforilat quan l'acetiltransferasa era incubada amb SirT2 i NAD⁺ (Fig. R12D), suggerint que alguna activitat fosfatasa co-eluïa amb SirT2 i que l'activitat desacetilasa de SirT2 era necessària per a desfosforilar MOF.

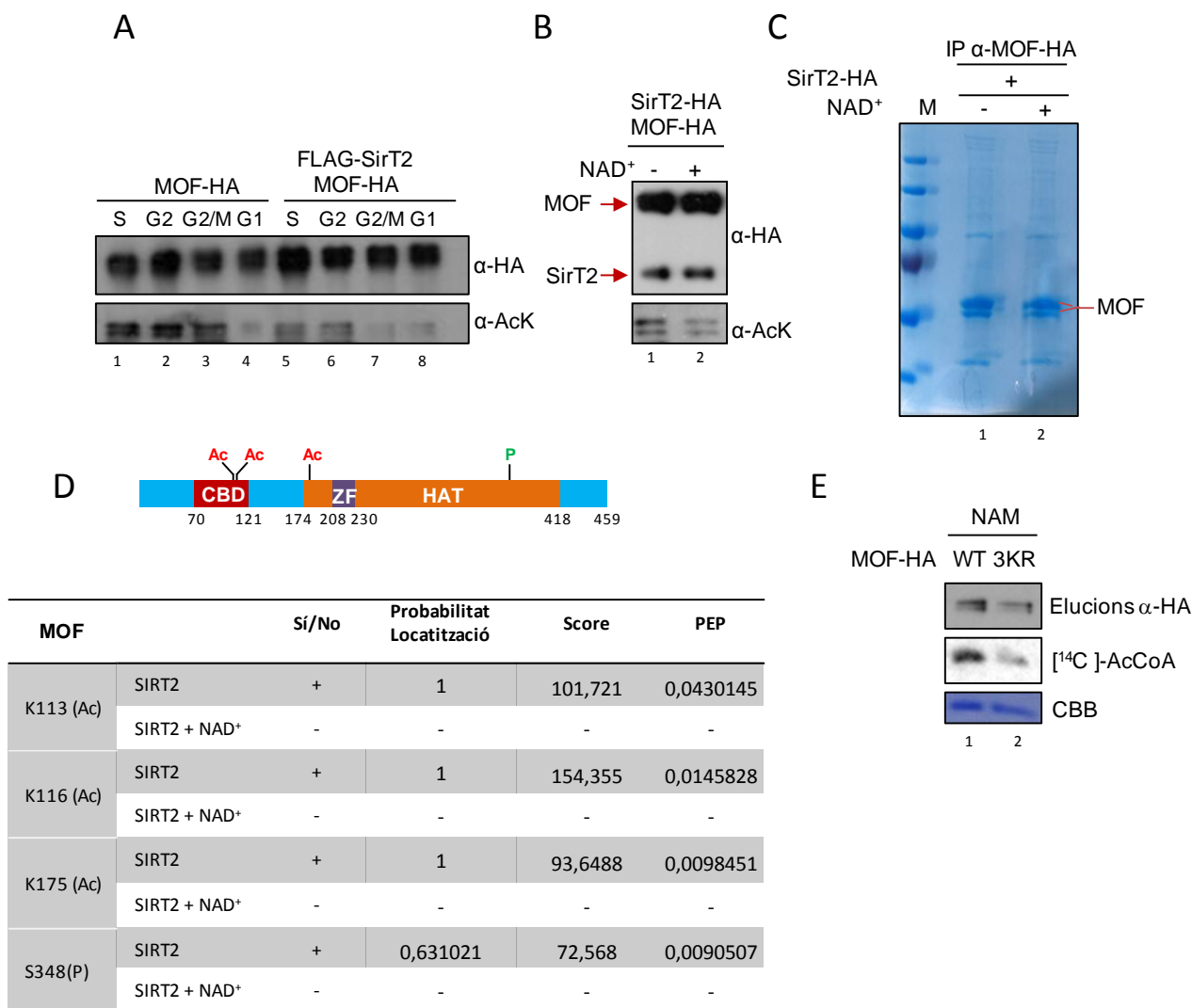


Figura R12. SirT2 desacetila les lisines 113, 116 i 175 de MOF i promou la desfosforilació de la serina 348. A, Efecte de la sobreexpressió de SirT2 sobre el nivells d'acetilació de MOF en cèl·lules HeLa sincronitzades i recollides en les diferents fases del cicle cel·lular. Els nivells d'acetilació es van detectar per *immunoblotting* amb un anticòs anti-acetil-lisina. B, Assaig de desacetilació *in vitro*. MOF-HA i SirT2-HA purificats de cèl·lules HeLa es van incubar amb o sense NAD⁺. C, Les elucions de MOF incubades amb SirT2 amb o sense NAD⁺ mostrades a B van ser carregades en un gel d'electroforesi que es va tenyir amb col·loidal-coomassie. Les bandes corresponents a MOF es van tallar i analitzar per MS. D, Representació esquemàtica de la seqüència de MOF amb els dominis i els residus modificats de MOF trobats en l'anàlisi de MS. A la taula s'indiquen els valors dels paràmetres de l'anàlisi d'espectrometria de masses: Score (puntuació del pèptid), probabilitat de localització i PEP (probabilitat d'error de la identificació posterior). E, Assaig acetilació *in vitro* on es compara l'activitat de MOF WT amb el triple mutant de les lisines MOF3KR. Panell superior: elucions del MOF hiperacetilat utilitzades en l'assaig. Panell del mig: assaig d'acetilació revelat per autorradiografia. Panell inferior: Histones tenyides amb coomassie blue (CBB).

RESULTATS

1.4.2. La fosforilació de la serina 348 de MOF és necessària per la desacetilació per SirT2

Degut a la importància de la fosforilació de les proteïnes en les vies de senyalització i en la regulació de l'activitat enzimàtica, vam contemplar l'opció de que la fosforilació de la S348 fos important per al control de l'activitat i l'estabilitat de MOF a través de SirT2. Per estudiar si la fosforilació d'aquest residu afectava a la desacetilació de MOF mediada per SirT2, vam mutar la serina a alanina, aminoàcid que mimetitzava l'estat desfosforilat. Vam incubar MOFS348A en un assaig de desacetilació *in vitro*

amb NAD^+ i quantitats creixents de SirT2 (Fig. R13A-B). Els nostres resultats mostren clarament que a diferència de l'efecte negatiu observat sobre l'acetilació de MOF WT, SirT2 és incapaç de disminuir els nivells d'acetilació de MOFS348A, suggerint que la fosforilació de la S348 és un requeriment per a la desacetilació de MOF dependent de SirT2. Posteriorment, vam testar l'activitat enzimàtica d'aquest mutant i vam observar que la capacitat d'acetilar H4 era clarament menor que la del MOF WT (Fig. R13C). Tot i que no podem assegurar que el responsable de la pèrdua d'activitat d'aquest mutant sigui l'estat desfosforilat i no el canvi d'aminoàcid, si que podem dir que aquest residu juga un paper important en l'activitat catalítica i la regulació de l'enzim per part de SirT2.

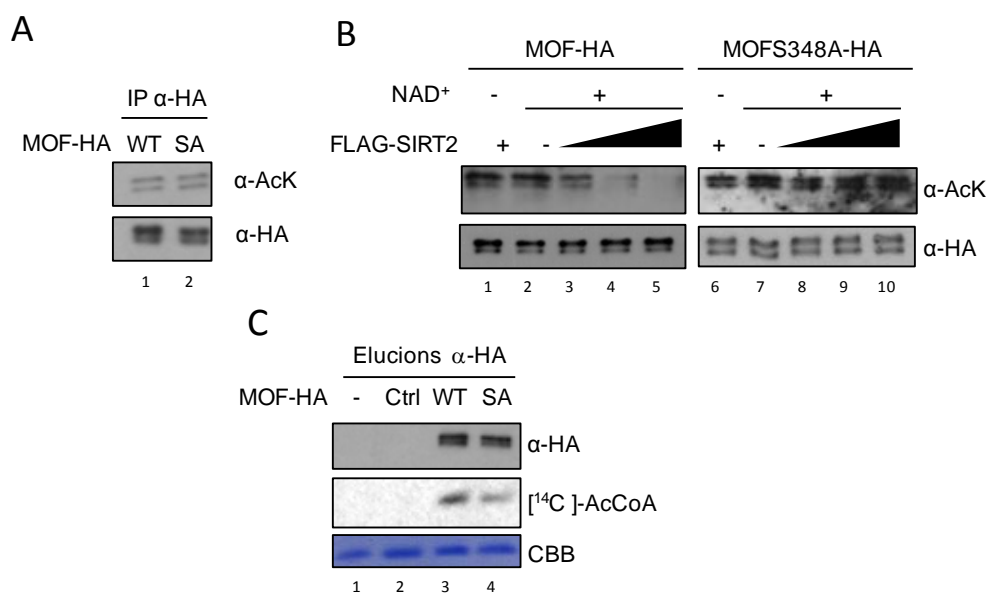


Figura R13. La serina 348 de MOF és important per a la regulació de l'enzim. A, Nivells d'acetilació de MOF WT i MOFS348A en cèl·lules tractades amb nicotinamida. B, Les elucions mostrades en A van ser incubades amb quantitats creixents de SirT2 i NAD^+ en un assaig de desacetilació *in vitro*. Els nivells d'acetilació es van detectar amb l'anticòs anti-acetil-lisina. C, Assaig d'acetilació *in vitro* utilitzant com a substrat histones del nucleosoma central i com enzims les purificacions de MOF-HA, MOFS348A-HA i vector buit (control (ctrl)), provinents de cèl·lules HeLa. Panell superior: elucions de MOF utilitzades en l'assaig. Panell central: Assaig d'acetilació revelat per autorradiografia. Panell inferior: Histones marcades amb Coomassie-Blue.

RESULTATS

1.1.1. La desacetilació de MOF per SirT2 desestabilitza la interacció entre els dos enzims

És ben sabut que l'acetilació de les proteïnes en general, i de MOF en particular, modifica el reconeixement de substrat i la interacció amb altres proteïnes (Peng et al., 2012; Verdin & Ott, 2015; Yuan et al., 2012). Per aquest motiu i per entendre més en profunditat la relació entre SirT2 i MOF, vam testar la interacció entre el triple mutant d'acetilació de MOF (MOF3KR) i SirT2 (Fig. R14A-B). Curiosament, l'estat desacetilat d'aquests residus aboleix completament la interacció entre SirT2 i MOF, suggerint que la desacetilació d'aquestes tres lisines per SirT2 desafavoreix la interacció entre les dues proteïnes. Per corroborar aquesta observació, vam analitzar la interacció entre MOF i el mutant

catalític de SirT2 i vam veure que quan SirT2 no tenia la capacitat de desacetilar MOF, la interacció entre els dos era més forta (Fig. R14C). A més, el mutant MOFS348A, que com ja havíem vist prèviament no podia ser desacetilat per SirT2, mostrava més interacció amb SirT2 que MOF WT (Fig. R14A-B), recolzant que la desacetilació de les lisines 113, 116 i 175 per SirT2 desestabilitza la interacció entre els dos enzims.

En conjunt, els nostres resultats demostren que SirT2 afavoreix la sortida de MOF de la cromatina i en promou la degradació durant G2/M i que mitjançant la desacetilació de MOF inhibeix la seva activitat catalítica específica, suggerint que SirT2, a part de desacetilar H4K16Ac durant G2/M també controla els nivells d'acetilació d'aquest residu histònic per mitjà de la regulació de MOF, l'acetiltransferasa principal d'H4K16.

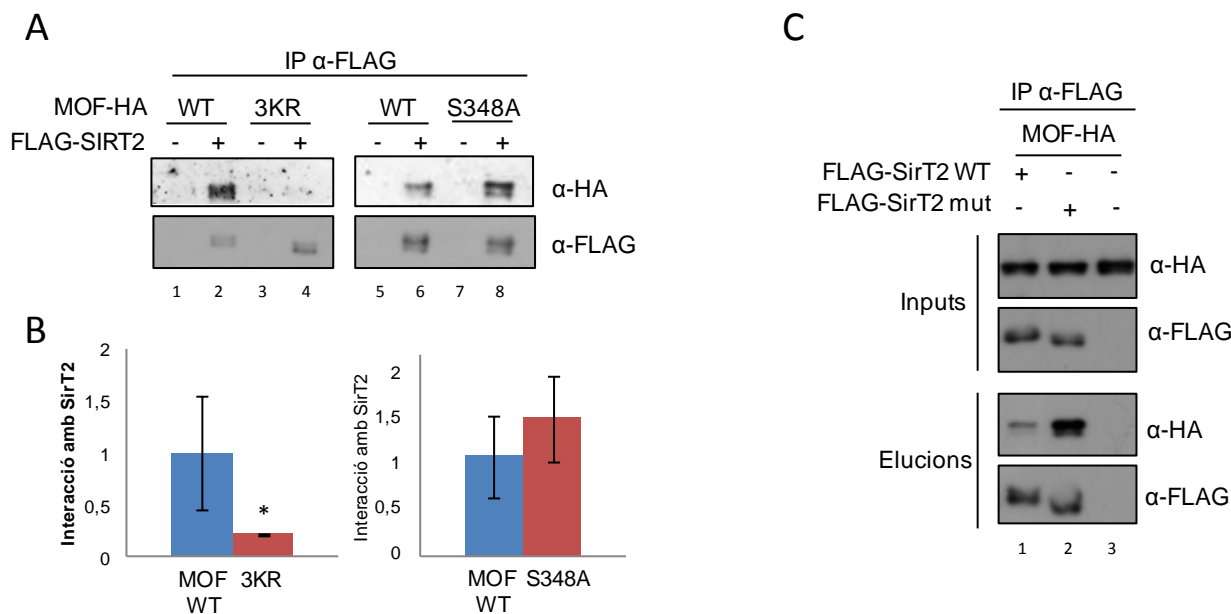


Figura R14. La desacetilació de MOF per SirT2 aboleix la interacció entre les dues proteïnes. A, Co-immunoprecipitació de SirT2 i el mutants d'acetilació de MOF (panells de l'esquerra) o el mutant de fosforilació de MOF (panells de la dreta). B, quantificació de la IP mostrada en A. * $P_{valor} < 0,05$ C, Interacció entre MOF-HA i FLAG-SirT2 WT o mutant catalític. En les elucions dels dos panells inferiors es mostra el MOF co-eluït amb SirT2.

2. MOF i SirT2 són importants pel manteniment de l'estabilitat genòmica

2.1. Generació del ratolí *sirt2^{-/-}/mof^{-/-}*

La importància de SirT2 com a controlador del cicle cel·lular a través de la desacetilació d'H4K16Ac (Vaquero et al., 2006), recolzada pels nostres resultats que demostren la inactivació de MOF dependent de SirT2 durant G2/M, juntament amb el paper de SirT2 en l'activació del *checkpoint* de G2/M en resposta a dany (Serrano et al., 2013), van fer emergir la possibilitat de que SirT2 estigués controlant l'aturada del cicle cel·lular abans d'entrar a mitosi, que experimenten les cèl·lules deficientes en MOF (Li et al., 2010; Sheikh et al., 2015; Smith et al., 2005; Taipale et al., 2005). Amb la finalitat d'estudiar aquesta hipòtesi, vam generar la colònia de ratolins doble *knockout* (DKO) de *sirt2* i *mof*. (*sirt2^{-/-}/mof^{lox/lox}/cre*) seguint el procediment detallat a materials i mètodes (Fig. R15). Degut a que la pèrdua de MOF causa letalitat embrionària, en els nostres estudis vam fer servir un model murí amb pèrdua de *mof* induïble per tractament amb tamoxifè. Els ratolins *mof^{lox/lox}/cre* van ser cedits pel laboratori de la Dra. A. Voss i els ratolins *sirt2^{-/-}*, que ja teniem al laboratori, els vam obtenir originàriament del grup del Dr. Q. Tong.

A continuació, vam extreure i cultivar els fibroblasts embrionaris de ratolí (MEFs) dels embrions del dia de gestació E13.5 dels genotips: *sirt2^{+/+}/mof^{+/+}/cre*, *sirt2^{+/+}/mof^{lox/lox}/cre* i *sirt2^{-/-}/mof^{lox/lox}/cre*. Per induir la deleció de *mof*, els MEFs van ser tractats amb 1µM del metabolit actiu del tamoxifè (4-OH-Tamoxifè) durant 72 hores. Sota aquestes condicions, el locus de *mof* recombinava eficientment i no es detectava mRNA ni proteïna de MOF en les cèl·lules *sirt2^{+/+}/mof^{lox/lox}/cre* o *sirt2^{-/-}/mof^{lox/lox}/cre* (Fig. R16A-C). Coincidint amb la funció enzimàtica de MOF sobre H4K16 (Akhtar & Becker, 2000; Smith et al., 2005; Taipale et al., 2005), els nivells d'H4K16Ac eren notablement més baixos després de

la pèrdua de MOF, i d'acord amb els resultats publicats (Serrano et al., 2013), les cèl·lules deficientes en SIRT2 presentaven hiperacetilació d'H4K16 (Fig.R16D).

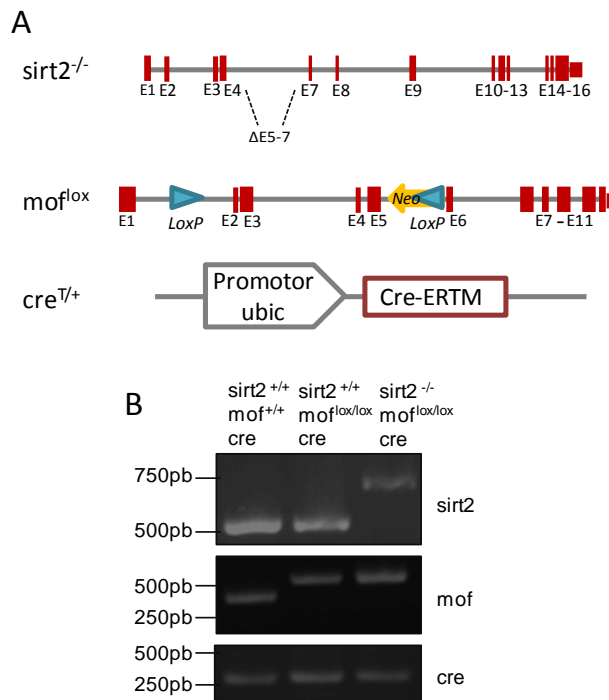


Figura R15. Ratolí doble *knockout* *sirt2/mof*. A, Representació esquemàtica de la generació del DKO *sirt2/mof* deletant els exons 5, 6 i part del 7 de *sirt2* i els exons del 2 al 5 de *mof*. B, Genotipat dels ratolins amb DNA provinent de les orelles. Panell superior: genotipació de *sirt2*. L'al·lel WT genera un producte de PCR de 538 pb i l'al·lel mutant de 700 pb. Panell central: genotipació de *mof*. L'al·lel WT genera un producte de PCR de 422 pb i l'al·lel *lox/lox* de 509 pb. Panell inferior: genotipació de *cre*. El producte de PCR conté aproximadament 300 pb.

Per simplificar, a partir d'ara, s'anomenarà la línia *sirt2^{+/+}/mof^{+/+}/cre* tractada amb tamoxifè, com a WT; la línia *sirt2^{+/+}/mof^{lox/lox}/cre* tractada amb tamoxifè, com a KO de *mof*; i la línia *sirt2^{-/-}/mof^{lox/lox}/cre* sense tractar, com a KO de *sirt2* i tractada amb tamoxifè, com a DKO de *mof* i *sirt2*. Cal remarcar que el tractament amb tamoxifè no modificava el fenotip en cap dels experiments, per aquest motiu i amb la finalitat de facilitar l'anàlisi i reduir el volum de treball, els duplicats dels experiments i els estudis estadístics es van realitzar sense la mostra *sirt2^{+/+}/mof^{+/+}/cre* sense tractar amb tamoxifè.

RESULTATS

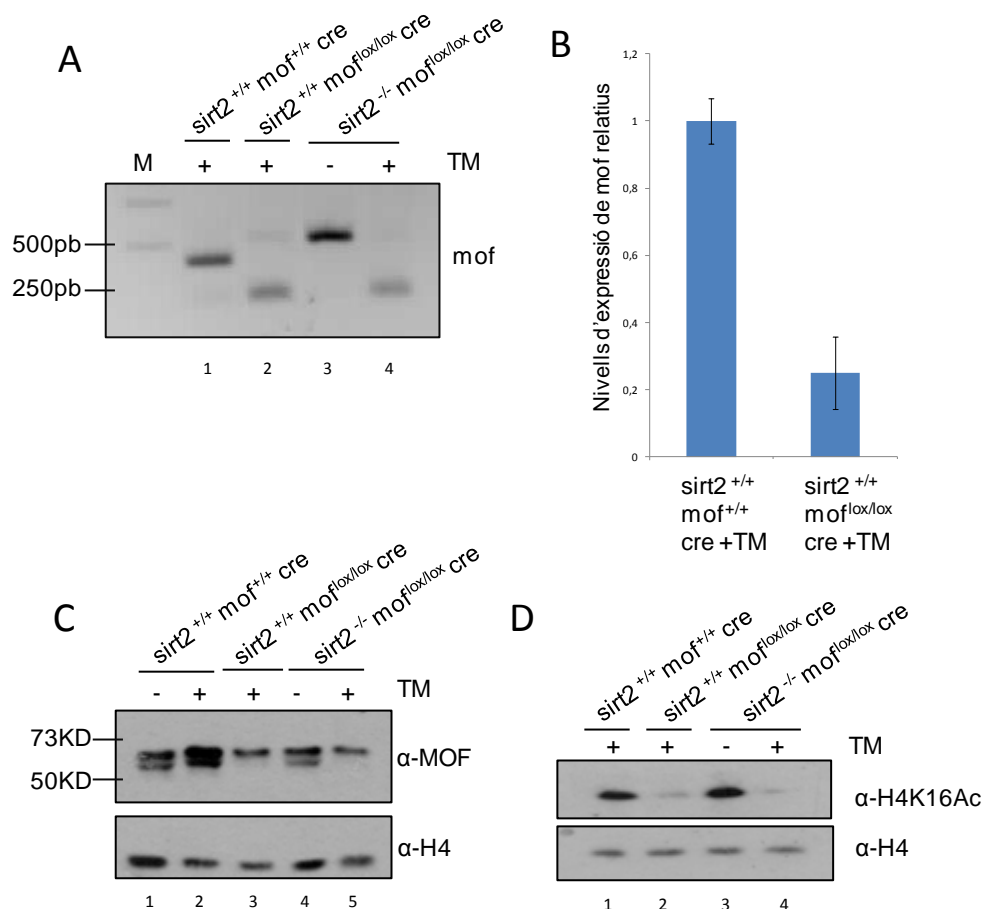


Figura R16. Comprovació de la inducció de la delecció de MOF en MEFs. A, Genotipació per PCR de la delecció del gen *mof*; B, Nivells d'expressió relatius de *mof* analitzats per q-PCR. C, Anàlisi per *western blot* dels nivells proteics de MOF; D, *Western blot* dels nivells d'acetilació de la histona H4K16. La delecció de *mof* correlaciona amb la pèrdua d'H4K16Ac. TM, tamoxifè.

2.2. SirT2 i MOF són essencials per la dinàmica de la cromatina

2.2.1. H4K16Ac determina la deposició d'H4K20me1

Són nombrosos els estudis que relacionen H4K16Ac amb H4K20me1. En la majoria de casos s'ha vist que aquestes dues modificacions són antagonistes, no només funcionalment parlant (Akhtar & Becker, 2000; Braunstein et al., 1993; Carmen et al., 2002; Horikoshi et al., 2013; Imai et al., 2000; Lavender et al., 1994; Li et al., 2012; Oda et al., 2009; Rice et al., 2002; Robinson et al., 2008; Shogren-Knaak et al., 2006; Trojer et al., 2007), sinó estèricament, ja que l'existència d'una sembla impedir la presència de l'altra en determinats casos (Nishioka et al., 2002; Serrano et al., 2013). En termes de cicle cel·lular,

s'ha descrit que la desacetilació d'H4K16Ac per SirT2 durant G2/M és un requisit indispensable per la monometilació d'H4K20 per PR-SET7 (Serrano et al., 2013; Vaquero et al., 2006), permetent la posterior compactació de la cromatina fins a cromosoma metafàsic (Oda et al., 2009; Rice et al., 2002; Robinson et al., 2008; Shogren-Knaak et al., 2006). Amb la finalitat de confirmar l'impacte de la regulació d'H4K16Ac durant G2/M sobre la metilació H4K20 vam analitzar els nivells d'H4K20me en els MEFs deficients en MOF. Mitjançant citometria de flux vam quantificar la intensitat d'H4K20me1 de MEFs WT, *sirt2* KO, *mof* KO i DKO en mitosi. En concordança amb els resultats previs del grup, vam detectar una disminució del 23% en els nivells d'H4K20me1 de les cèl·lules deficients en SirT2 (Fig. R17A-B), fet que correlaciona amb els nivells regulats

RESULTATS

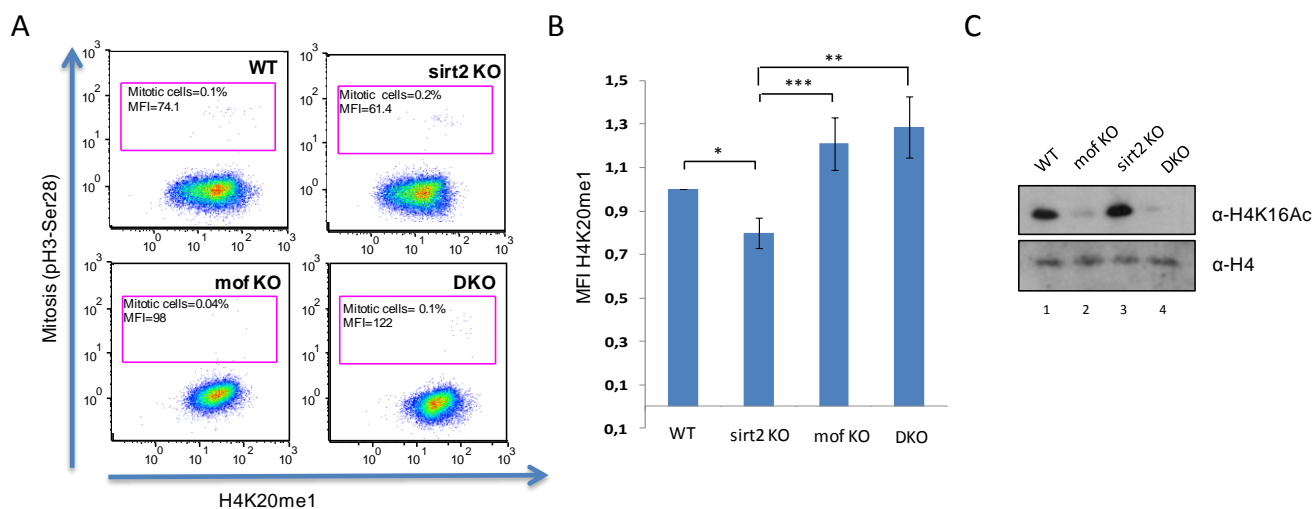


Figura R17. Els nivells d'H4K20me1 correlacionen negativament amb els nivells d'H4K16Ac en MEFs. A, Anàlisi per citometria de flux dels nivells d'H4K20me1 en MEFs en mitosi. Es va mesurar la intensitat mitjana del marcatge d'H4K20me1 de les cèl·lules en mitosi, positives per H3S28p. MFI, *Mean fluorescence intensity*. Les dades representades en aquesta figura estan fetes en col·laboració amb el laboratori del Dr. Tischfield. B, Quantificació de l'experiment mostrat en A de 3 línies diferents de MEFs de cada genotip. * $P_{valor} < 0,05$; ** $P_{valor} < 0,01$; *** $P_{valor} < 0,001$. C, Els nivells d'H4K16Ac dels MEFs WT, mof KO, sirt2 KO i DKO van ser detectats per *western blot* amb l'anticòs anti-H4K16Ac.

a l'alça d'H4K16Ac (Fig. R17C). Com esperàvem, el fet de no discernir entre cèl·lules en mitosi i la resta del cicle cel·lular, va fer que l'augment detectat en els nivells d'H4K16Ac en les cèl·lules sirt2^{-/-} no fos gaire notable, ja que SirT2 regula els nivells globals d'H4K16Ac únicament durant G2/M. En les cèl·lules KO de mof i DKO, els nivells d'H4K20me1 es mostren elevats en un 11 i un 23%, respectivament (Fig. R17A-B), fet que correlaciona negativament amb l'acetilació d'H4K16, que en ambdós casos és pràcticament inexistent (Fig. R17C).

Aquests resultats obtinguts utilitzant línies de MEFs primàries van ser contrastats *in vivo* mitjançant immunohistoquímica (IHC) d'H4K16Ac i H4K20me1, emprant crioseccions de ronyó dels ratolins WT, sirt2 KO, mof KO i DKO. Per l'estudi vam utilitzar 6 seccions de teixit de cada ratolí i els nivells d'H4K16Ac i d'H4K20me1 van ser detectats amb els mateixos anticossos que per l'anàlisi de les MEFs mostrat en la figura R17. A materials i mètodes es troba detallat el protocol que es va seguir

per a la inducció de la deleció de mof en aquests ratolins. Les dades obtingudes d'aquest assaig són preliminars, ja que només va ser fet amb un ratolí de cada genotip. No obstant això, la informació obtinguda confirma els resultats prèviament mostrats en MEFs. Així doncs, les seccions de teixit mostren clarament com els nivells d'H4K16Ac i H4K20me1 presenten una correlació inversa (Fig. R18). En els ratolins sirt2 *knockout* hi ha hiperacetilació d'H4K16 i en contrapartida els nivells d'H4K20me1 són més baixos respecte els WT. En canvi, tant en els ratolins mof *knockout* com en els doble *knockout*, els nivells d'H4K16Ac són baixos i els d'H4K20me1 alts comparats amb els nivells dels WT. Cal remarcar que degut a que la inducció de la deleció de mof no és del 100%, el marcatge positiu que s'observa a les IHC d'H4K16Ac corresponents als mof KO i DKO, possiblement sigui degut a cèl·lules no induïdes. Això no obstant, es pot detectar la disminució de cèl·lules mof KO o DKO marcades amb anti-H4K16Ac en comparació a les WT.

RESULTATS

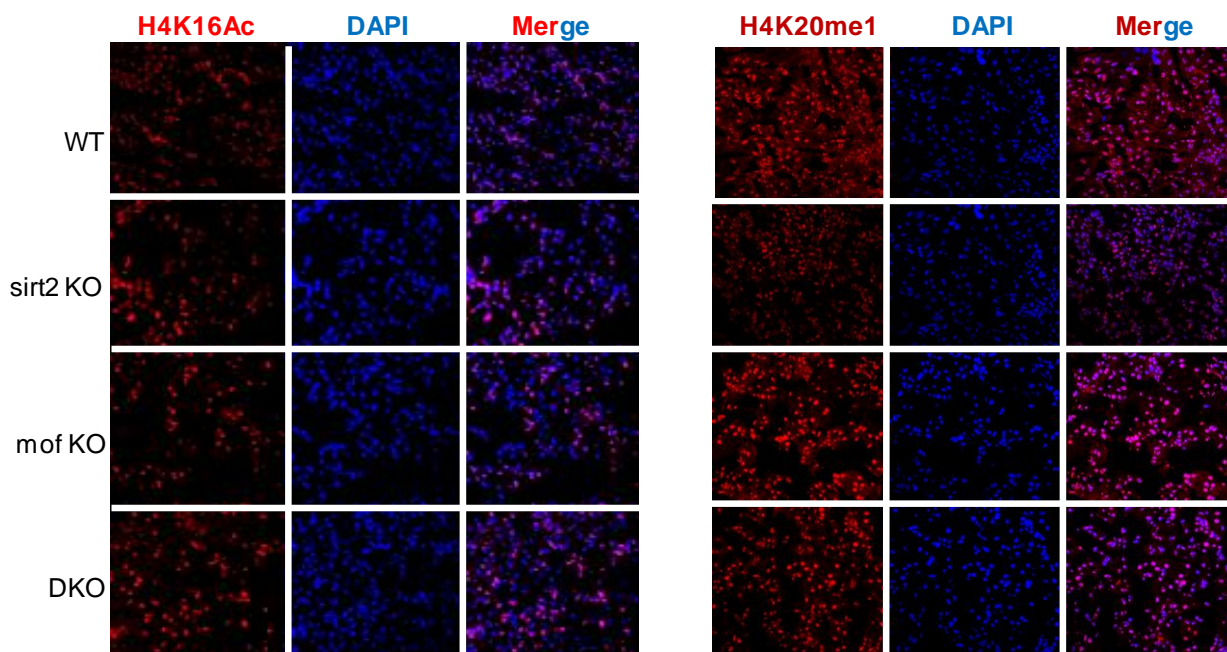


Figura R18. L'absència de SirT2 i MOF afecta els nivells d'H4K20me1 *in vivo*. IHC d'H4K16Ac i d'H4K20me1 de crioseccions de ronyó de ratolins WT, KO de sirt2, KO de mof i DKO. Els nuclis van ser marcats amb DAPI.

2.2.2. MOF controla la localització de PR-SET7 a la cromatina

Com ja s'ha mencionat anteriorment, SirT2 afavoreix la monometilació d'H4K20 durant mitosi mitjançant la desacetilació d'H4K16Ac i regulant l'activitat i desposició a la cromatina de PR-SET7. D'acord amb això, els ratolins KO de sirt2 tenen nivells d'H4K20me1 més alts que els WT (Fig. R17-18). En canvi, els DKO de mof i sirt2, tot i la manca de SirT2, tenen nivells d'H4K20me1 lleugerament més

alts (Fig. R17-18), suggerint per una banda, que la desaparició d'H4K16Ac, deguda a la pèrdua de MOF, dona via lliure a la monometilació d'H4K20, i per una altra banda, que MOF podria estar reprimint d'alguna manera la funció de PR-SET7 a la cromatina. La primera aproximació que vam fer per adreçar aquest punt va ser testar la interacció entre MOF i PR-SET7. Per això vam immunoprecipitar MOF-HA de cèl·lules HeLa i per *immunoblotting* vam detectar que PR-SET7 endogen co-eluïa amb MOF, indicant que aquestes dues proteïnes interaccionen dins de la cèl·lula (Fig. R19).

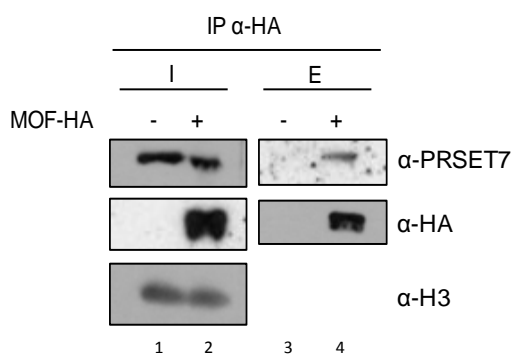


Figura R19. MOF interacciona amb PR-SET7. Immunoprecipitació de MOF-HA sobreexpressat en cèl·lules HeLa. El PR-SET7 endogen co-eluït amb MOF va ser detectat per *western blot* amb l'anticòs anti-PR-SET7.

Degut a l'intricat mecanisme de regulació que semblava haver entre H4K16Ac, H4K20me1, i els enzims responsables del control d'aquestes marques, vam hipotetitzar que aquests tres enzims podien formar part del mateix complex, en el que la regulació entre els tres es donés de manera ràpida i eficient. Mitjançant diferents aproximacions vam tractar d'esbrinar si les tres activitats formaven part del mateix complex en algun punt del cicle cel·lular. Primerament, vam fer un assaig de immunoprecipitació competitiva. Per una banda, vam sobreexpressar quantitats fixes de MOF-myc i FLAG-PR-SET7 amb quantitats creixents de SIRT2-HA. Mitjançant la immunoprecipitació de FLAG-PR-

RESULTATS

SET7 vam analitzar la quantitat de MOF-Myc co-eluïda en funció de la quantitat de SirT2-HA sobreexpressada (Fig. R20A esquerra). Per una altra banda, vam sobreexpressar quantitats fixes de FLAG-PR-SET7 i SirT2-HA i vam anar incrementant la sobreexpressió de MOF-Myc. A la vegada, per mitjà de la immunoprecipitació de FLAG-PR-SET7 vam detectar la quantitat de SirT2-HA co-eluïda al incrementar la sobreexpressió de MOF-Myc (Fig. R20A dreta). Ambdós experiments mostraven un efecte sinèrgic en la interacció quan els tres factors eren presents. Seguidament, vam sobreexpressar MOF-HA i FLAG-PR-SET7 en MEFs WT i KO per *sirt2* (Fig. R20B). La co-immunoprecipitació entre PR-SET7 i MOF-HA va mostrar que en absència de SirT2, aquestes dues proteïnes interaccionaven en menor mesura, recolzant les observacions de l'assaig d'immunoprecipitació competitiva.

Així doncs, tot apuntava a que SirT2, MOF i PR-SET7 formaven un complex, al menys en alguna fase del cicle cel·lular. Per tal d'esclarir aquest punt, vam procedir a la purificació del putatiu complex en cèl·lules HeLa sincronitzades que sobreexpressaven MOF-Myc, SirT2-HA i FLAG-PR-SET7. Amb aquesta finalitat, vam sincronitzar les cèl·lules HeLa i en vam obtenir tres poblacions en diferents fases del cicle cel·lular: S, G2 i G2/M (Fig. R21A). Posteriorment vam córrer els extractes cel·lulars en gradients de glicerol del 12.5% al 35% i vam recollir 60 fraccions de 200µl de cada gradient (Fig. R21B). Es van ajuntar les fraccions que corresponien a un pes molecular major de 150KDa (la suma aproximada de les tres proteïnes) i on els tres components eren presents, i van ser immunoprecipitades contra FLAG-PR-SET7. Per *western blot* vam detectar que durant les fases S i G2/M, PR-SET7 només co-immunoprecipitava SirT2, mentre que durant G2, PR-SET7 va ser capaç de co-eluir tant SirT2 com MOF (Fig. R21C), indicant que en aquesta fase del cicle cel·lular, MOF, SirT2 i PR-SET7 formen part del mateix complex. Aquestes dades, junt amb els resultats anteriors mostrats a la figura R3, on hem vist que SirT2 i MOF interaccionen majoritàriament durant G2 i G2/M, suggereixen que, durant G2, MOF, SirT2 i PR-SET7 formen un complex, mentre que durant la transició G2/M el complex se separa en les parelles SirT2-PR-SET7 i SirT2-MOF. Els nostres resultats però, no permeten distingir si MOF i PR-SET7 interaccionen també com a parella durant G2/M.

SirT2 desacetila H4K16Ac i estabilitza PR-SET7 a la cromatina a través de la desacetilació de la lisina 90. Tot junt afavoreix la deposició d'H4K20me1 i la disseminació al llarg de tot el genoma (Serrano et al., 2013). Igual que SirT2, MOF podria controlar els nivells d'H4K20me1 de manera dependent de l'acetilació d'H4K16, o per una via independent, controlant els nivells, la localització i/o l'activitat de PR-SET7. D'acord amb l'esmentat, vam començar estudiant si MOF controlava els nivells de PR-SET7. Amb aquest propòsit vam analitzar els nivells de PR-SET7 totals en cèl·lules HeLa que sobreexpressaven quantitats creixents de MOF-HA.

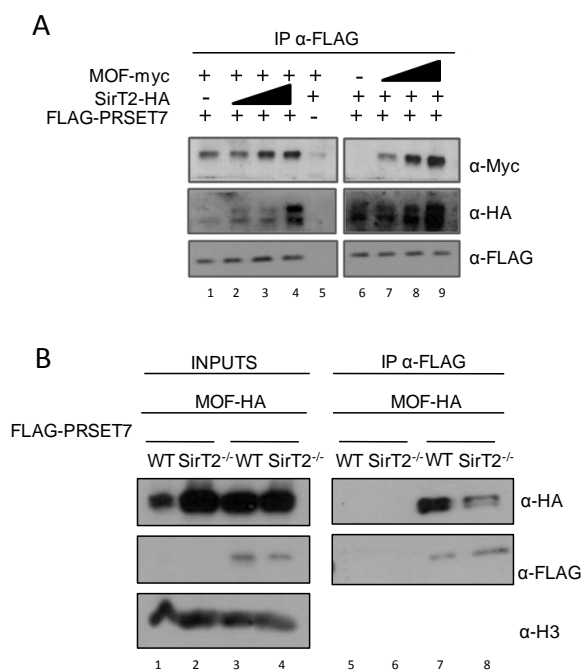


Figura R20. La interacció entre MOF i PR-SET7 es veu afavorida per SirT2. A, *Western blot* de la immunoprecipitació competitiva realitzada amb extractes de cèl·lules HeLa que sobreexpressaven quantitats invariables de MOF-myc i de FLAG-PR-SET7, i quantitats creixents de SirT2-HA (2, 4 i 8 µg) (carrils de 11 al 4), o quantitats fixes de SirT2-HA i FLAG-PR-SET7 i quantitats creixents de MOF-myc (2, 4, 8 µg) (carrils del 6 al 10). B, Immunoprecipitació de FLAG-PR-SET7 de MEFs WT i KO de *sirt2* cotransfectades amb MOF-HA i FLAG-PR-SET7. El MOF co-eluït amb PR-SET7 es va detectar per *immunoblotting* amb anti-HA.

RESULTATS

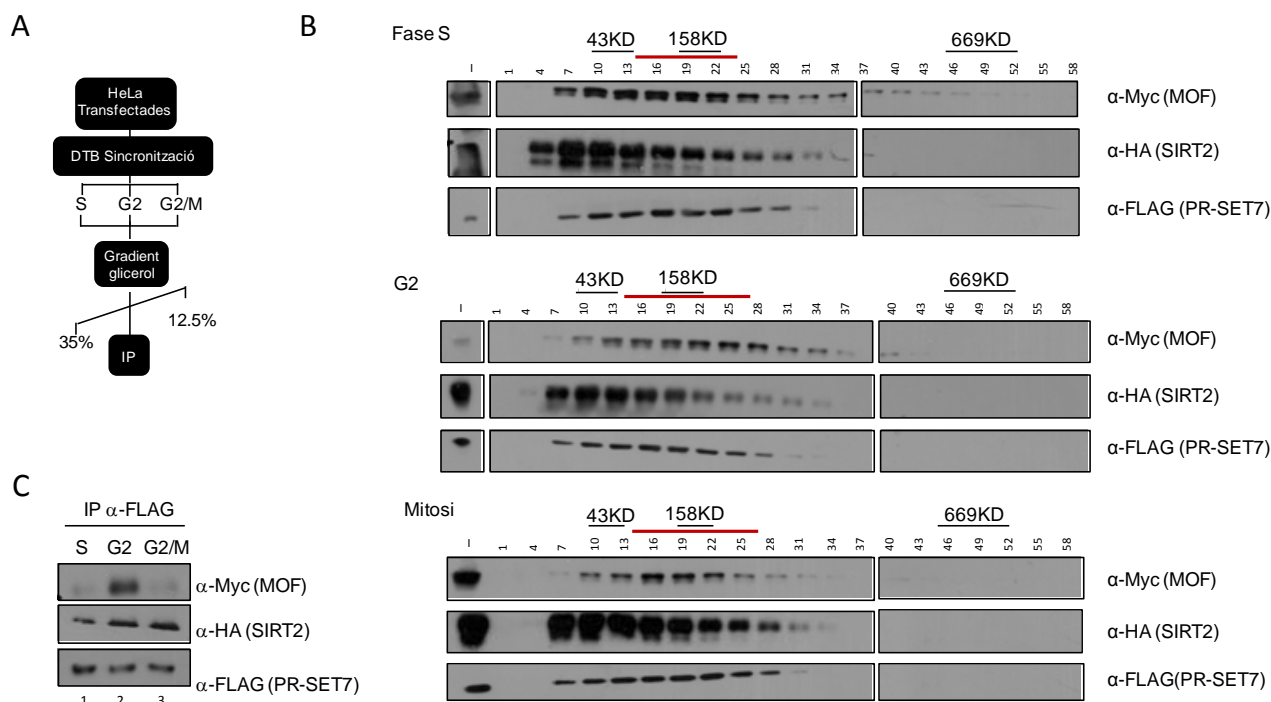


Figura R21. Sirt2, MOF i PR-SET7 formen un complex durant G2. A, Representació esquemàtica dels passos seguits per a la purificació del complex. DTB, doble bloqueig de timidina. B, *Western blot* de les fraccions recollides del gradient de glicerol. La línia vermella indica les fraccions que es van ajuntar per a prosseguir amb el següent pas cromatogràfic. C, Immunoprecipitació de FLAG-PR-SET7 de les fraccions ajuntades del gradient de glicerol mostrat en B.

Com es pot deduir de les imatges de *western blot* (Fig. R22), l'augment en la quantitat de MOF no afecta els nivells totals de PR-SET7. Tampoc existeix una regulació a la inversa, doncs els nivells de MOF totals no es veuen afectats per la sobreexpressió de FLAG-PR-SET7 (Fig. R22).

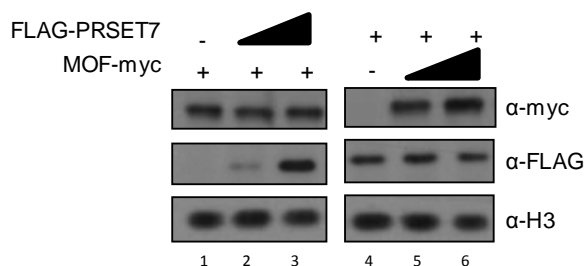


Figura R22. MOF no controla els nivells totals de PR-SET7. *Western blot* d'extractes totals de cèl·lules HeLa que sobreexpressaven FLAG-PR-SET7 sol o amb quantitats creixents de MOF-myc (carrils 1-3), o MOF-myc sol o amb quantitats creixents de FLAG-PRSET7 (carrils 4-6).

Degut a que la funció principal de PR-SET7 es duu a terme a la cromatina, vam analitzar si la pèrdua de MOF en MEFs produïa canvis en la localització de PR-SET7 a la cromatina. Vam utilitzar una tècnica

d'immunofluorescència especial que permet detectar només la fracció unida a la cromatina i que ja havia sigut prèviament utilitzada per detectar focus de PR-SET7 per altres autors (Serrano et al., 2013; Tardat et al., 2007). A diferència amb una immunofluorescència corrent, aquí es permeabilitza la cèl·lula abans de la fixació de manera que es descarta la fracció soluble. Un altre factor que es va tenir en compte va ser l'alta taxa de degradació de PR-SET7. Per aquest motiu, les cèl·lules van ser prèviament tractades amb l'inhibidor del proteosoma MG132 durant 1 hora. Amb aquesta tècnica, feta en col·laboració amb el laboratori del Dr. Tischfield, vam ser capaços d'observar que la pèrdua de MOF produeix un augment en el nombre de focus de PR-SET7 i a més, la mida d'aquests és major, indicant que MOF controla negativament la localització de PR-SET7 a la cromatina (Fig. R23). Aquestes dades junt amb els nostres resultats previs que mostraven que la pèrdua de MOF produeix un augment en la monometilació d'H4K20, permeten dir que, a través de la regulació de la localització de PR-SET7 a la cromatina, MOF controla els nivells d'H4K20me1. Això no descarta la possibilitat de que addicionalment, MOF reguli la

RESULTATS

deposició d'H4K20me1 a través de l'acetilació d'H4K16 o mitjançant la modulació de l'activitat de PR-SET7.

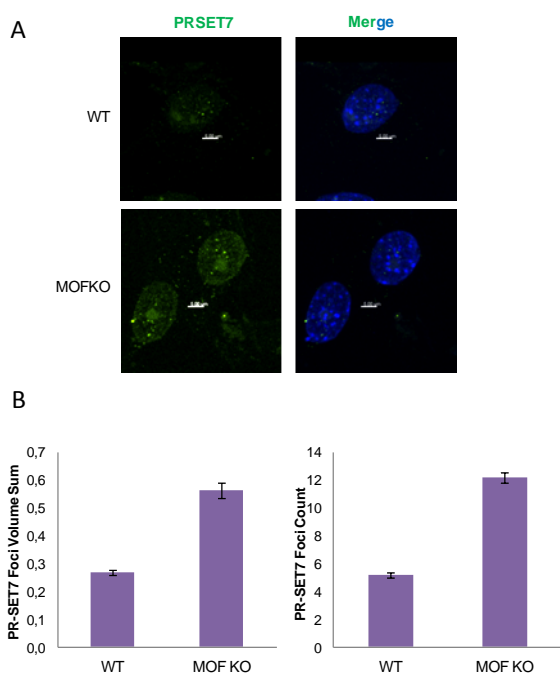


Figura R23. MOF afecta la fracció de PR-SET7 unida a la cromatina. A, Focus de PR-SET7 en MEFs WT i KO de *mof* detectats per IF com va ser descrit prèviament (Tardat et al., 2007) (barres 5µm). B, Quantificació del nombre de focus de PR-SET7 a la cromatina i del volum d'aquests.

S'ha vist en diferents processos cel·lulars que l'estat d'acetilació és fonamental per a la regulació enzimàtica. Per exemple, l'autoacetilació de MOF és un requeriment bàsic per a l'activació de l'enzim (Yuan et al., 2012), la desacetilació de CDK9 per SirT2 activa la seva activitat quinasa (Zhang et al., 2013), o la desacetilació de PR-SET7 a la lisina 90 per SirT2 activa l'activitat metiltransferasa sobre H4K20 (Serrano et al., 2013). El fet de que SirT2 i MOF presentin activitats oposades sobre H4K16, ens va fer contemplar la possibilitat de que MOF estigués regulant l'activitat de PR-SET7 sobre H4K20 a través de l'acetilació del mateix residu que desacetilava SirT2, la lisina 90. Així doncs, vam estudiar l'activitat de PR-SET7 prèviament incubat amb MOF i acetil-CoA, en un assaig de metilació amb nucleosomes *in vitro* (procediment detallat a materials i mètodes). Aquest assaig ens permetia veure si l'activitat acetiltransferasa de MOF sobre PR-SET7 modificava l'activitat metiltransferasa d'aquest sobre els nucleosomes. Per a la pre-

incubació de PR-SET7 amb MOF es va fer servir una purificació de MOF WT i una de MOFG326E (mutant catalític) de cèl·lules HeLa. Ambdues es van incubar amb PR-SET7 amb o sense acetil-CoA.

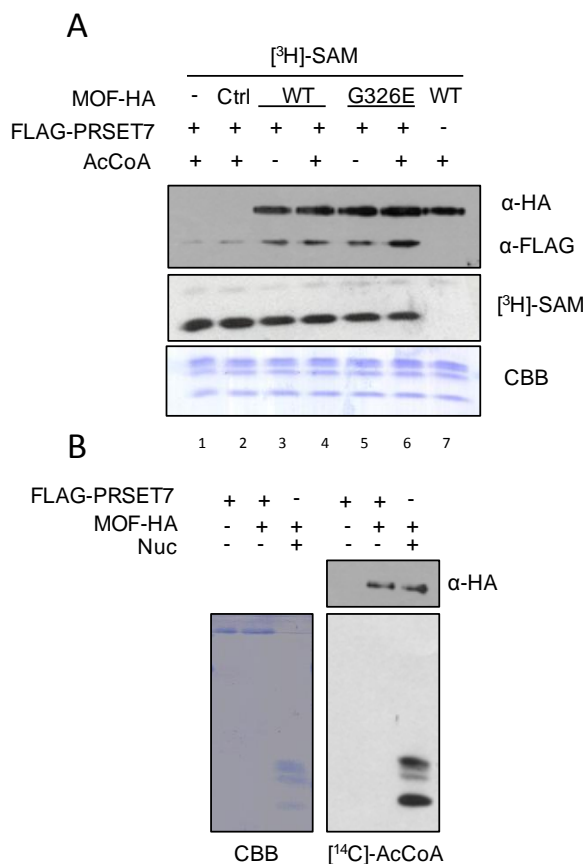


Figura R24. MOF no modifica l'activitat de PR-SET7. A, Efecte de MOF sobre l'activitat de PR-SET7. Activitat metiltransferasa de PR-SET7 purificat de cèl·lules HeLa i incubat amb MOF WT o MOF mutant catalític (G326E) +/- acetil-CoA. L'assaig es va realitzar en dos passos: Primer, el PR-SET7 purificat de HeLa es va incubat amb o sense MOFWT o G326E en presència o absència d'acetil-CoA. Segon, el PR-SET7 resultant d'aquesta pre-incubació va ser dialitzat i posteriorment incubat amb nucleosomes i [³H]-SAM. Panell superior: *Western blot* de les purificacions emprades en l'assaig, panell central: activitat metiltransferasa revelada per autorradiografia, panell inferior: histones tenyides amb coomassie. B, Activitat acetiltransferasa de MOF sobre PR-SET7. MOF purificat de cèl·lules HeLa va ser incubat amb PR-SET7 o histones del nucleosoma central i [¹⁴C]-Acetil-CoA. Panell esquerra: PR-SET7 i histones tenyides amb coomassie, panell dret superior: *western blot* de les purificacions utilitzades en l'assaig, panell dret inferior: activitat acetiltransferasa de MOF detectada per autorradiografia.

Aquestes combinacions ens permetien diferenciar l'efecte sobre PR-SET7 degut a la simple unió de MOF (MOF sense acetil-CoA), degut a l'activitat catalítica de MOF (MOF WT amb acetil-CoA) o degut a alguna activitat acetiltransferasa que co-eluïa

RESULTATS

amb MOF (MOFG226E amb acetil-CoA). Com mostren els resultats de l'assaig de la figura R24A, MOF no modifica l'activitat metiltransferasa de PR-SET7. A més, en una reacció d'acetilació *in vitro* que vam realitzar posteriorment, el PR-SET7 incubat amb MOF-HA i acetil-CoA marcat amb ^{14}C no va incorporar radioactivitat, demostrant que PR-SET7 no és substrat de MOF (Fig. R24B).

2.2.3. *Sirt2 i MOF regulen els nivells d'H4K20me al llarg del cycle cel·lular*

D'acord amb els resultats previs publicats pel grup, la monometilació d'H4K20 durant mitosi dependent de SirT2 afecta a la di- i trimetilació d'H4K20 per Suv420h1 i Suv420h2 del següent cycle cel·lular, respectivament (Serrano et al., 2013). Recolzant aquesta dada està el fet que la deficiència en SirT2 causa un efecte similar sobre la distribució del cycle cel·lular que la deficiència combinada de Suv420h1/2 (Schotta et al., 2008; Vaquero et al., 2006), suggerint que darrera d'aquest fenotip hi ha la disminució dels nivells d'H4K20me2/3. Degut a que Suv420h1/2 necessiten com a substrat H4K20me1 (Schotta et al., 2008) i que els nivells d'aquesta marca estaven augmentats en les nostres MEFs KO de mof i DKO de mof i sirt2, vam voler estudiar si realment, l'alteració en els nivells d'H4K20me1 tenia una conseqüència directa sobre els nivells d'H4K20me2/3. Mitjançant citometria de flux vam quantificar H4K20me2 i me3 de MEFs WT, sirt2 KO, mof KO i DKO durant mitosi i la resta del cycle cel·lular. Coincidint amb els resultats previs del grup, els nivells d'H4K20me2 en els KO de sirt2 estaven disminuïts, mentre que en els KO de mof, tot i haver una tendència a l'increment, no hi havia un canvi significatiu. Igualment, els DKO es comportaven d'una manera similar als WT (Fig. R25A). De manera que, la pèrdua de SirT2 en els DKO no impedeix la dimetilació d'H4K20, probablement per l'efecte dominant de la pèrdua de MOF sobre els nivells d'H4K16Ac i H4K20me1. Així doncs, aquestes dades suggereixen que la pèrdua d'H4K16Ac en els KO de mof i DKO té un efecte positiu sobre els nivells d'H4K20me2, probablement, com a conseqüència de l'augment en H4K20me1. Cal mencionar que aquests resultats són preliminars i

que caldran més duplicats per confirmar les observacions.

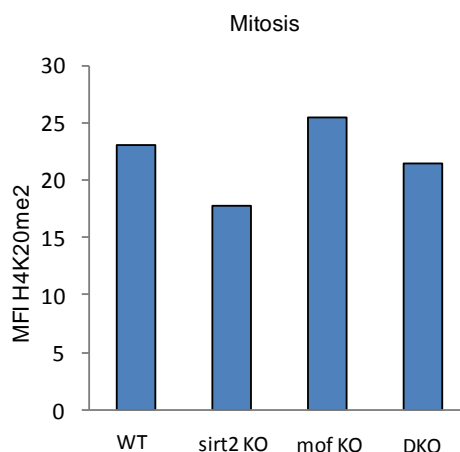


Figura R25. H4K16Ac determina els nivells d'H4K20me2. Quantificació dels nivells d'H4K20me2 de MEFs WT, sirt2 KO, mof KO i DKO en mitosi analitzats per citometria de flux. Les cèl·lules en mitosi van ser detectades amb α -H3S28p. MFI, *Mean fluorescence intensity*. En col·laboració amb la Dra. L. Serrano i la Dra. B. Vázquez.

En el cas d'H4K20me3, hi havia disminució en els nivells dels KO de sirt2, tant en mitosi com en el cycle cel·lular en general (Fig. R26A-B), recolzant el que ja s'havia publicat pel grup (Serrano et al., 2013). En canvi, els nivells d'H4K20me3 incrementaven significativament en el cas dels KO de mof, encara que aquest fenotip només era visible en les cèl·lules en mitosi. Els DKO presentaven nivells similars als WT tot i que amb certa tendència a la baixa, tant en mitosi com en el cycle cel·lular en general, produint-se una compensació respecte els KO individuals de mof i sirt2. Per contrastar aquestes dades vam realitzar IHC de crioseccions de ronyó de ratolins WT, sirt2 KO, mof KO i sirt2/mof DKO (Fig. R26C). Considerant que les cèl·lules del ronyó són cèl·lules diferenciades i que la taxa de divisió cel·lular és baixa, els resultats de les IHC són equiparables a l'estudi dels nivells d'H4K20me3 en la totalitat del cycle cel·lular i no són comparables amb la quantificació feta en les cèl·lules mitòtiques. Coincidint amb els resultats de citometria de flux mostrats en la figura R26B, els nivells d'H4K20me3 són menors en els ratolins sirt2 KO. En canvi, en el cas dels teixits de ratolins mof KO, els nivells d'H4K20me3 es mostren considerablement més elevats i en els DKO més baixos que en els WT, fets

RESULTATS

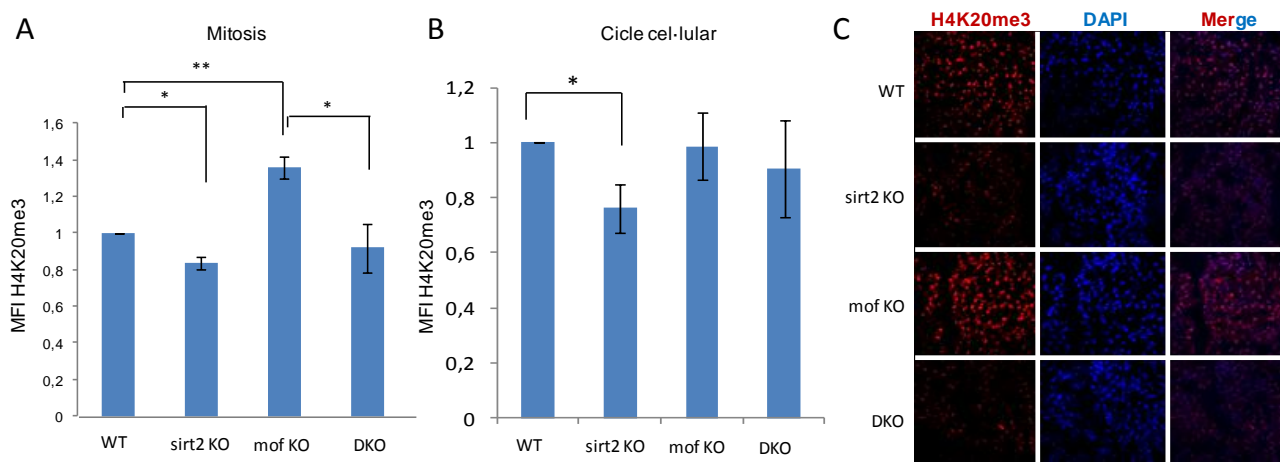


Figura R26. Efecte de MOF i SirT2 sobre els nivells d'H4K20me3. A, Quantificació dels nivells d'H4K20me3 en MEFs WT, sirt2 KO, mof KO i DKO en cèl·lules en mitosi analitzats per citometria de flux. Les cèl·lules mitòtiques es van marcar amb α -H3S28p. B, Quantificació dels nivells d'H4K20me3 de MEFs WT, sirt2 KO, mof KO i DKO en tot el cicle cel·lular analitzats per citometria de flux. * $P_{valor} < 0,05$; ** $P_{valor} < 0,01$. MFI, Mean fluorescence intensity. En col·laboració amb el laboratori de la Dra. L. Serrano. C, IHC d'H4K20me3 de crioseccions de ronyó de ratolins WT, KO de sirt2, KO de mof i DKO. Els nuclis van ser marcats amb DAPI.

que estan en discordança amb les observacions per citometria de flux. Cal mencionar que els resultats d'IHC només s'han pogut fer amb un ratolí de cada genotip i que per a que l'estudi tingui la potència adequada s'hauria d'ampliar el nombre de ratolins emprats.

D'acord amb els nostres resultats, sembla doncs, que hi ha una correlació inversa entre els nivells d'H4K16Ac i els nivells d'H4K20me. En resum, en els KO de sirt2 els nivells d'H4K16Ac estan elevats i els d'H4K20me1-3 baixos. En canvi, la pèrdua d'H4K16Ac tant en els KO de mof com en els DKO, produeix una tendència a la normalització en els nivells d'H4K20me1-3, tot en conjunt, recolzant la hipòtesi de que H4K16Ac impedeix la metilació d'H4K20 durant G2/M (Nishioka et al., 2002; Serrano et al., 2013).

2.3. SirT2 participa en el checkpoint de G2/M activat per la pèrdua de MOF

Diferents estudis han demostrat la dependència de MOF per la progressió del cicle cel·lular, especialment durant la transició G2/M. S'ha vist que l'activitat acetiltransferasa específica de MOF sobre H4K16 és clau en la resposta al dany al DNA (DDR)

i que regula la transcripció de nombrosos gens implicats en la progressió del cicle cel·lular (Li et al., 2010; Sheikh et al., 2015). En conseqüència, la pèrdua de MOF augmenta el dany al DNA i desencadena l'activació del *checkpoint* de G2/M dependent d'ATM (Taipale et al., 2005). Per una altra banda, s'ha relacionat a SirT2 amb el *checkpoint* de G2/M. Concretament, s'ha vist que en resposta al dany al DNA, la desacetilació d'H4K16Ac per SirT2 afavoreix la monometilació d'H4K20 i condueix a l'aturada del cicle cel·lular just abans de l'entrada a mitosi (Serrano et al., 2013). Basant-nos en aquestes observacions va emergir la possibilitat de que SirT2 estigués, d'alguna manera, implicat en l'aturada del cicle cel·lular que pateixen les cèl·lules deficientes en MOF. Per enfilar aquest punt, vam estudiar el cicle cel·lular de les diferents línies de MEFs en condicions normals per citometria de flux. Vam fer servir la fosforilació de la histona H3S28 (H3S28p) com a marcador de les cèl·lules en mitosi i la quantitat de DNA es va mesurar amb l'intercalador de DNA, 7AAD (7-aminoactinomycin D). La detecció combinada d'H3S28p i la quantitat de DNA ens permetia discernir entre les cèl·lules en G2 i mitosi. Els nostres resultats van mostrar clarament que, el percentatge de cèl·lules que avançava cap a mitosi en els KO de mof es veia reduït, quedant aquestes arrestades en la fase G2 (Fig. R27).

RESULTATS

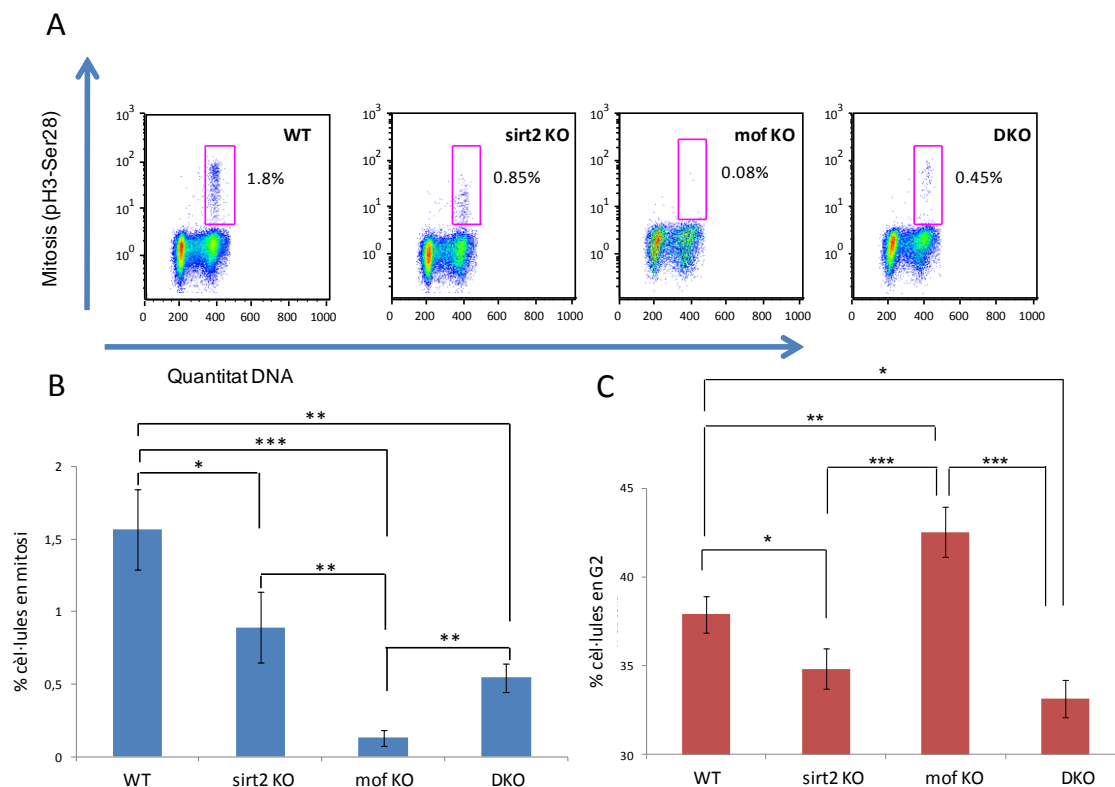


Figura R27. SirT2 està implicat en el checkpoint de G2/M activat per la pèrdua de MOF. A, Anàlisi per citometria de flux del percentatge de cèl·lules en mitosi. A l'eix de les Y, cèl·lules positivament marcades amb H3S28p i l'eix de les X, distribució de cèl·lules segons la quantitat de DNA marcada amb 7AAD. B, Mitjanes del percentatge de cèl·lules en mitosi de tres línies diferents de cada genotip. C, Mitjana del percentatge de cèl·lules en G2 de tres línies diferents de cada genotip. *, $P_{valor} < 0,05$; **, $P_{valor} < 0,01$; *** $P_{valor} < 0,001$. Els anàlisis per citometria de flux d'aquesta figura han estat fets en col·laboració amb la Dra. L. Serrano i la Dra. B. Vázquez.

Aquest resultat, junt amb altres experiments publicats en que es tractaven les cèl·lules deficientes en MOF amb cafeïna o wormantina (inhibidors de la via d'ATM), confirmaven que la pèrdua de MOF conduïa a l'activació del checkpoint de G2/M. També vam veure que, els MEFs KO de sirt2 presentaven menys percentatge de cèl·lules en G2, fet que recolzava, el ja establert requeriment de SirT2 per a l'aturada del cycle cel·lular en el checkpoint de G2/M. El més sorprenent és l'efecte que es va observar en les cèl·lules DKO de sirt2 i mof, en les que, tot i la manca de MOF, avançaven cap a mitosi sense quedar arrestades en G2, suggerint que SirT2 està implicat en l'arrest de G2/M produït per la falta de MOF.

Per confirmar les nostres observacions vam abordar l'estudi del cycle cel·lular mitjançant immunofluorescència (IF). Tot i ser una tècnica poc comú per a l'anàlisi del cycle cel·lular, ens permetia diferenciar les cèl·lules en G2 de les cèl·lules en

mitosi a través de la detecció de les fosforilacions de la histona H3. Durant la fase G2 tardana i fins anafase, H3S10 es troba fosforilada, mentre que H3S28 és fosforilada de profase a anafase. D'aquesta manera, les cèl·lules positives per S10p i negatives per S28p van ser identificades com a fases G2 i les positives per les dues marques com a mitosis. Novament, vam observar com els MEFs KO per mof no experimentaven mitosi i quedaven arrestats a G2, mentre que la pèrdua combinada de SirT2 i MOF permetia la progressió del cycle cel·lular a través de mitosi (Fig. R28). La mitjana del percentatge de cèl·lules en mitosi dels WT era del 5.3%, mentre que decreixia fins a l'1% en el cas dels KO de mof i es mantenia similar als WT en els MEFs DKO per sirt2 i mof. Els experiments de cycle cel·lular, tant els realitzats per citometria de flux com per IF es van fer amb 3 línies de MEFs diferents de cada genotip. En les IF es van comptar més de 2000 cèl·lules per condició.

RESULTATS

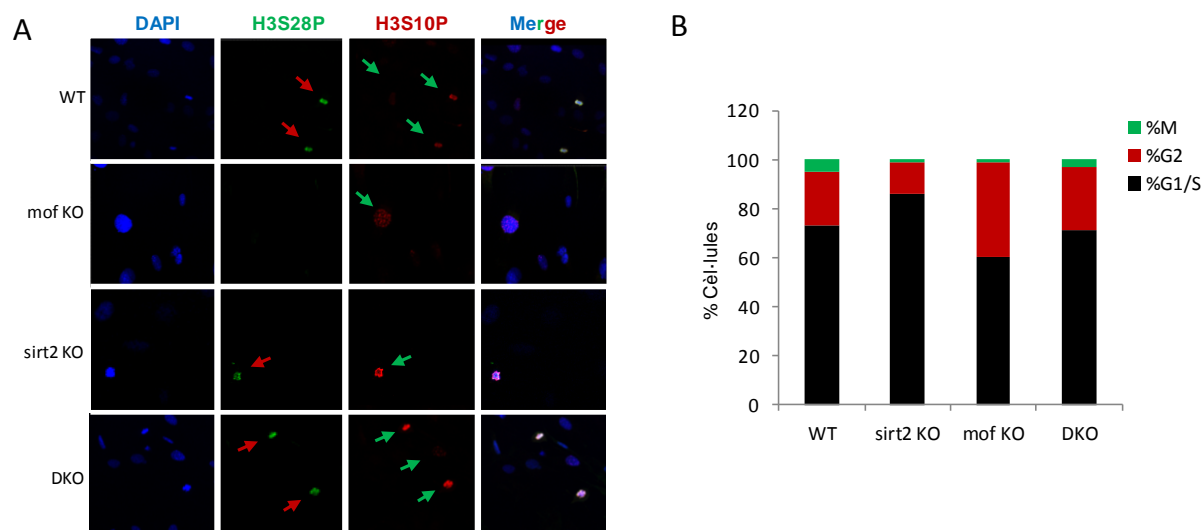


Figura R28. SirT2 està implicat en l'arrest del cicle cel·lular en G2/M activat per la pèrdua de MOF. A, IF de MEFs en cultiu. H3S28p marca cèl·lules en mitosi, mentre que H3S10p marca cèl·lules en fase G2 tardana i mitosi. B, Quantificació de les IF de A amb el programa Fiji. S'ha obtingut el nombre de cèl·lules en G2, mitjançant la resta de cèl·lules positives per S10p menys les cèl·lules positives per S28p.

L'estrès oxidatiu causat pel tractament amb peròxid d'oxigen (H_2O_2) proporciona una eina senzilla per estudiar l'activació del *checkpoint* de G2/M en resposta a dany al DNA. El H_2O_2 induïx la formació de DSBs i activa la DDR i en conseqüència, el cicle cel·lular s'atura en la transició G2/M (Deken et al., 2009; Li et al., 2009). Confirmant el que les dades publicades apuntaven (Serrano et al., 2013), els nostres resultats mostren que, l'activació del *checkpoint* de G2/M en resposta a dany requereix la

presència de SirT2, ja que mentre les línies WT tractades amb peròxid presenten una reducció del percentatge de mitosis d'aproximadament el 55%, la reducció en el cas de les KO de sirt2 només arriba al 35% (Fig. R29). A més, el percentatge de cèl·lules que progressa cap a mitosi en les cèl·lules DKO és similar al de les KO de sirt2, confirmant el requeriment de SirT2 en l'activació del *checkpoint* de G2/M.

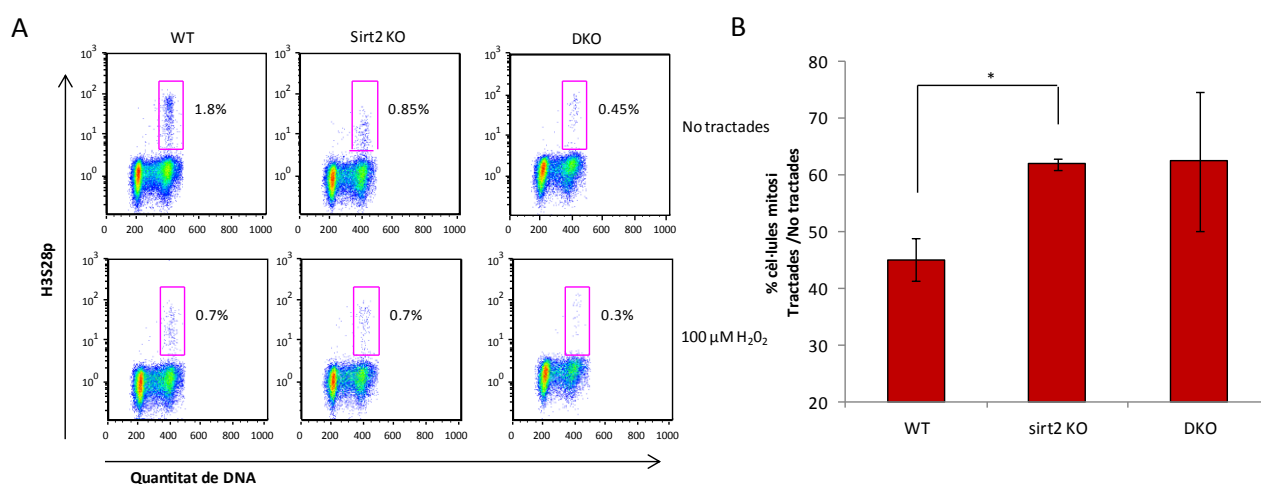


Figura R29. SirT2 participa en el *checkpoint* de G2/M activat per dany al DNA. A, Anàlisi per citometria de flux del percentatge de cèl·lules en mitosi de MEFs WT, sirt KO i DKO tractades o sense tractar durant 1 hora amb H_2O_2 100 μM. B, Quantificació del percentatge de mitosis dels MEFs tractats respecte dels no tractats de les línies WT, sirt2 KO i DKO mostrades a la figura A. S'han fet servir tres línies cel·lulars de cada genotip. * $P_{valor} < 0.05$. Experiments fets en col·laboració amb la Dra. L. Serrano i la Dra. B. Vázquez.

RESULTATS

2.4. El balanç entre SirT2 i MOF controla l'expressió de gens del cycle cel·lular

Hi ha dos mecanismes principals que condueixen a l'aturada del cycle cel·lular en G2/M. El primer, ràpid i temporal, es basa en la regulació postranscripcional de diferents proteïnes implicades en l'entrada a mitosi. El segon, més lent però prolongat, actua a través de la regulació de la transcripció. MOF i SirT2, regulen la transcripció de nombrosos gens controlant per una banda els nivells d'H4K16Ac i per una altra, modulant l'activitat o localització de factors de transcripció (Dou et al., 2005; Jin et al., 2008; Li et al., 2012; Ravens et al., 2014; Sheikh et al., 2015; Taylor et al., 2013; Wang et al., 2007). Aquest fet va obrir la possibilitat de que la regulació de l'expressió gènica estigués darrera de l'arrest en G2/M que observàvem en les cèl·lules deficientes en MOF. En un estudi recent del laboratori de la Dra. A. Akhtar, s'ha vist que MOF activa l'expressió de gens relacionats amb la progressió del cycle cel·lular i que la pèrdua de MOF correlaciona amb la disminució de l'expressió d'aquests gens (Sheikh et al., 2015). Per als nostres estudis vam triar tres dels gens regulats a l'alça per MOF, *cdc25c*, ciclina B2 i *cdca3*, basant-nos en la seva importància per a la progressió a través de G2/M. CDC25C és la fosfatasa que activa el complex CDK1-ciclinaB durant la transició G2/M, procés essencial per a l'entrada a mitosi. Un dels mecanismes que fa servir la cèl·lula per aturar el cycle cel·lular en G2/M és la inactivació de CDC25C (Lukas et al., 2004). La Ciclina B2 activa CDK1 durant la transició G2/M i mitosi. Malgrat que aquesta ciclina s'expressa durant tot el cycle cel·lular excepte durant G1, només activa CDK1 durant G2/M i mitosi, moment en el que és translocada al nucli (Gallant & Nigg, 1992). CDCA3 es necessita per l'entrada a mitosi pel seu paper promotor de la degradació de la quinasa inhibidora de CDK1, WEE1.

Mitjançant PCR (*polymerase chain reaction*) quantitativa, vam analitzar l'expressió d'aquests tres gens en els MEFs WT, *sirt2* KO, *mof* KO i DKO (Fig. R30). Confirmant el que havien vist en el grup de la Dra. A. Akhtar, les nostres dades mostren que

l'expressió de *cdc25c*, ciclina B2 i *cdca3* en les cèl·lules deficientes en MOF està molt reduïda. En el cas de les cèl·lules KO per *sirt2* l'expressió augmenta, mentre que en les línies DKO, hi ha uns nivells d'expressió intermèdia entre els KO de *sirt2* i els KO de *mof*, suggerint la possibilitat de que la recuperació de la progressió del cycle cel·lular observada en aquestes cèl·lules sigui deguda a la recuperació parcial de l'expressió d'aquests gens.

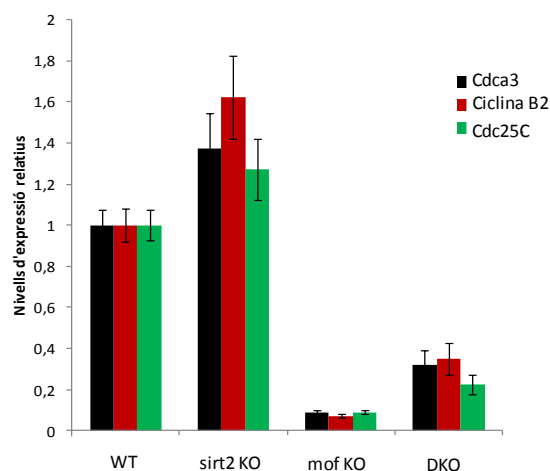


Figura R30. L'expressió dels gens necessaris per la transició G2/M està regulada per SirT2 i MOF. Representació gràfica dels nivells d'expressió relatius dels gens *cdca3*, ciclina B2 i *cdc25c* en MEFs WT, *sirt2* KO, *mof* KO i *sirt2/mof* DKO analitzats per PCR quantitativa.

2.5. La pèrdua de SirT2 i MOF té un efecte compensatori sobre la inestabilitat genòmica

Com ja s'ha mencionat anteriorment, MOF a través de l'acetilació d'H4K16 i per vies independents, és crucial en la DDR i la pèrdua de l'enzim condueix a aberracions cromosòmiques i a l'augment de la inestabilitat genòmica (Gupta et al., 2014; Li et al., 2010; Sharma et al., 2010). L'increment en el dany que experimenten les cèl·lules KO de *mof* porta a l'activació del *checkpoint* de G2/M (Li et al., 2010; Taipale et al., 2005) de manera dependent de SirT2, segons hem vist en els resultats mostrats anteriorment. L'activació del *checkpoint* proporciona temps a la maquinària cel·lular per reparar el dany al DNA. La incapacitat de les cèl·lules DKO d'aturar-se en el *checkpoint* de G2/M ens va fer pensar en la

RESULTATS

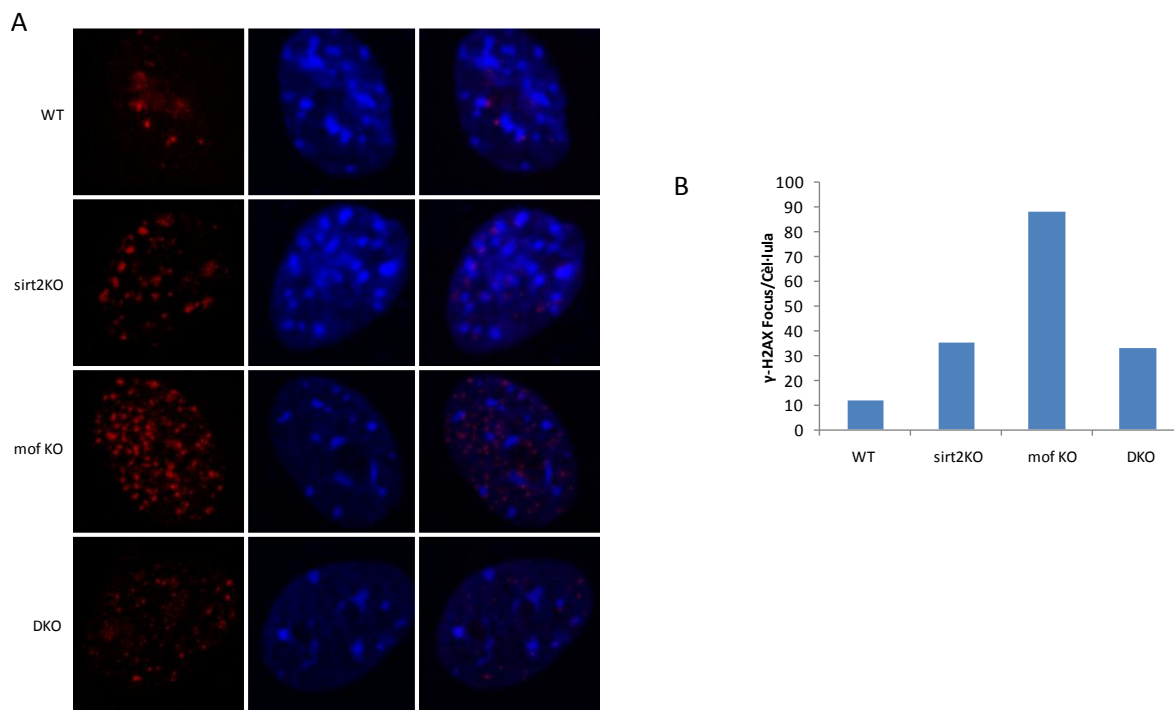


Figura R31. La pèrdua de SirT2 compensa la pèrdua de MOF en els nivells de dany al DNA. A, IF de γ -H2AX en MEFs WT, sirt2 KO, mof KO i DKO. B, Quantificació amb el programa Fiji del nombre de focus de γ -H2AX per cèl·lula. n=20 cèl·lules per genotip.

possibilitat de que aquestes cèl·lules tinguessin acumulació de dany al DNA degut a ambdós factors, als errors en la reparació com a conseqüència de la pèrdua de MOF i a la no activació del *checkpoint* de G2/M.

Un dels mètodes més utilitzats per detectar dany al DNA és la quantificació de γ -H2AX, una de les primeres modificacions en aparèixer als llocs de trencament en la DDR. Aquesta marca histònica és dipositada per ATM en resposta al trencament de doble cadena i facilita el reclutament de les proteïnes de reparació (Rogakou et al., 1998). Un cop s'ha reparat el dany, γ -H2AX és desfosforilada i es restaura l'estat inicial de la cromatina (Chowdhury et al., 2008; Douglas et al., 2010; Macůrek et al., 2010). Mitjançant IF de γ -H2AX, vam detectar el nombre de focus formats per cèl·lula en les nostres línies WT, sirt2^{-/-}, mof^{-/-} i sirt2^{-/-}/mof^{-/-} (Fig. R31). Per a l'anàlisi només es van comptabilitzar aquelles cèl·lules amb 4 o més focus de γ -H2AX.

D'acord amb els resultats mostrats i coincidint amb les dades de la bibliografia, els KO de mof presenten un increment notable en el nombre de focus de

γ -H2AX i en els KO de sirt2, tot i que mostren més focus de γ -H2AX que els WT, l'increment és moderat. El més sorprenent és que contra pronòstic, els DKO presenten nivells de dany similars als KO de sirt2, suggerint que la pèrdua de SirT2 compensa d'alguna manera el dany observat en els KO de mof i contradient la nostra hipòtesi de que la no activació del *checkpoint* generaria més acumulació de dany que la observada en els KO de mof. La compensació en els nivells de dany al DNA observats en les cèl·lules DKO ens va portar a hipotetitzar que aquestes cèl·lules podrien tenir menys inestabilitat genòmica que les KO individuals. El percentatge de poliploïdia és una bona mesura indicativa del grau d'inestabilitat genòmica que pateixen les cèl·lules. Per aquesta raó, vam analitzar la distribució del cicle cel·lular mitjançant citometria de flux (Fig. R32). Tant la pèrdua de SirT2 com la de MOF produeix un augment en el percentatge de cèl·lules poliploides, mentre que els nivells de poliploïdia observats en les DKO són similars als de les WT, indicant que la doble pèrdua de SirT2 i MOF compensa la pèrdua individual de cadascun d'aquests enzims en el manteniment de l'estabilitat genòmica.

RESULTATS

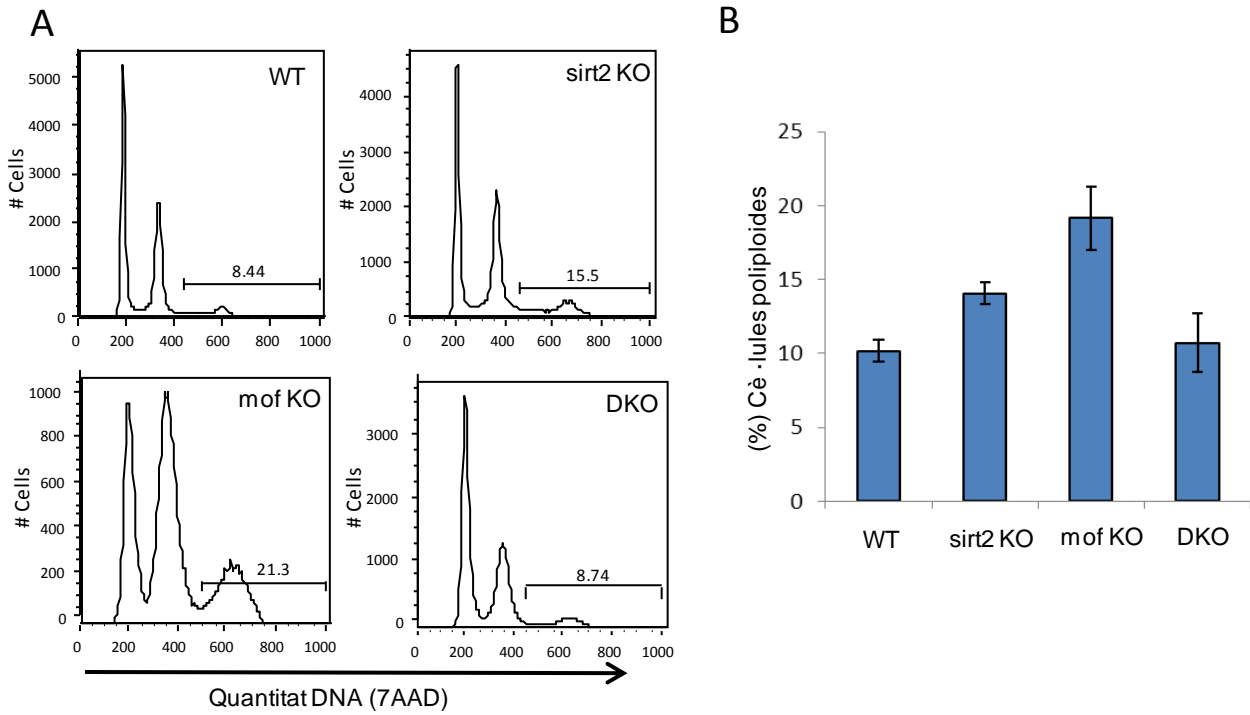


Figura R32. La doble pèrdua de MOF i SirT2 correlaciona amb la recuperació de l'estabilitat genòmica. A, distribució del cicle cel·lular analitzada per citometria de flux. Com a marcador de DNA es va utilitzar 7AAD. B, quantificació dels resultats mostrats en A. Experiments fets en col·laboració amb la Dra. L. Serrano i la Dra. B. Vázquez.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

Durant les últimes dècades, en el camp de l'epigenètica, s'ha intentat descriure com una modificació que no altera la seqüència del DNA, pot ser heretada de cèl·lula mare a filla i com un procés que succeeix en un moment determinat té efectes sobre el següent cicle cel·lular. Quan es va iniciar aquest projecte, tot just acabava de sortir a la llum un nou mecanisme en el que es descrivia com, a través de la regulació dels nivells d'H4K20me1 durant mitosi, SirT2 tenia un efecte sobre processos del següent cicle cel·lular (Serrano et al., 2013). Quedava clara la importància de SirT2 en la regulació d'H4K20me1 a través de la desacetilació d'H4K16Ac i la necessitat d'aquest procés per a la compactació de la cromatina durant mitosi (Nishioka et al., 2002; Robinson et al., 2008; Serrano et al., 2013; Shogren-Knaak et al., 2006; Vaquero et al., 2006). No obstant, tot i el requeriment absolut de MOF per a l'acetilació d'H4K16 (Akhtar & Becker, 2000; Smith et al., 2005; Taipale et al., 2005), es desconeixia qualsevol mecanisme regulatori que lligués MOF al control de la metilació d'H4K20 durant aquesta fase del cicle cel·lular. A més, la importància de MOF per la progressió del cicle cel·lular a través de G2/M (Li et al., 2010; Sheikh et al., 2015; Taipale et al., 2005) i l'aparent funció controladora de SirT2 en aquest punt del cicle cel·lular (Serrano et al., 2013), van generar la necessitat d'investigar la possible relació de SirT2, MOF i H4K16Ac en la regulació de la dinàmica de la cromatina i del cicle cel·lular. Els nostres resultats

van mostrar un paper compensatori entre SirT2 i MOF en quant a la progressió cel·lular, la regulació de la metilació d'H4K20 i el control de l'estabilitat genòmica.

En aquest treball es descriu per primera vegada un mecanisme regulatori entre SirT2 i MOF, en el qual durant G2/M, SirT2 reprimeix MOF, controlant així l'acetilació d'H4K16 i afavorint la monometilació d'H4K20 per PR-SET7, fet que demostra que SirT2 no només controla els nivells d'H4K16Ac a través de la seva desacetilació directa (Serrano et al., 2013; Vaquero et al., 2006). A més, es corrobora el paper de SirT2 com a regulador dels nivells d'H4K16 i H4K20me1 durant mitosi *in vivo* (Serrano et al., 2013) i s'introdueix MOF com un altre element important en la regulació d'aquesta marca epigenètica. Així ho demostra la correlació observada entre la disminució d'H4K16Ac com a conseqüència de la pèrdua de MOF i l'augment en els nivells d'H4K20me1. Un dels resultats més importants derivats del nostre treball recolza el requeriment de SirT2 en l'activació del *checkpoint* de G2/M (Serrano et al., 2013), ja que SirT2 és necessari per l'arrest en G2/M que pateixen les cèl·lules deficientes en MOF. En particular, hem vist que SirT2 i MOF regulen oposadament l'expressió de gens implicats en la progressió cel·lular, suggerint un altre mecanisme a través del qual SirT2 i MOF regulen l'avançament del cicle.

1. SirT2 controla els nivells d'H4K16Ac durant mitosi a través de la regulació de MOF

Està plenament acceptat que els nivells d'H4K16Ac a mamífers estan regulats per l'equilibri entre les activitats acetiltransferasa de MOF i desacetilasa de SirT2, i en menor mesura, de SirT1 i HDAC1-2 (Miller et al., 2010; Taipale et al., 2005; Vaquero et al., 2004, 2006). Mentre SirT1 desacetila H4K16Ac en regions concretes del genoma al llarg de tot el cicle cel·lular (A Vaquero et al., 2004, 2006), SirT2 ho fa de manera globalitzada durant la transició G2/M (Serrano et al., 2013; Vaquero et al., 2006). D'acord amb això, els nostres resultats en MEFs, han mostrat que els nivells d'H4K16Ac són pràcticament nuls en els KO de mof i lleugerament elevats en els KO de sirt2 (Fig. R17C). En el moment que va començar aquest projecte, però, l'únic mecanisme conegut pel qual SirT2 controlava els nivells d'H4K16Ac durant G2/M era la desacetilació directa del residu (Vaquero et al., 2006). No obstant, es desconeixia l'existència de qualsevol procés regulatori entre SirT2 i MOF, similar al demostrat entre SirT1 i MOF, en el que SirT1 controlava l'activitat, l'estabilitat i la unió als nucleosomes de MOF mitjançant la desacetilació del seu domini catalític (Lu et al., 2011; Peng et al., 2012). Els nostres resultats van mostrar que SirT2 interaccionava amb la forma acetilada de MOF majoritàriament durant G2/M, promovent la sortida de MOF de la cromatina i la seva degradació al proteosoma (Fig. R3B, R6C, R10, R14). S'ha vist que l'estabilitat de nombroses proteïnes augmenta després de ser acetilades com a resultat de l'impediment de que la lisina sigui ubiquitinada (Caron et al., 2005). No obstant, la degradació de MOF promoguda per SirT2 és independent de l'activitat desacetilasa de SirT2 (Fig. R6A, R10C), encara que no queda exclosa la possibilitat de que una desacetilasa unida a SirT2 estigui mitjançant aquest procés. D'aquesta manera, SirT2 faria de pont entre aquesta proteïna i MOF, promovent la degradació de MOF en un moment del cicle determinat. Una altra possibilitat seria que SirT2 mediés la interacció, durant G2/M, entre MOF i una lligasa d'ubiquitines,

promovent la ubiquitinació de lisines no acetilades de MOF i conduint-lo a degradació pel proteosoma. Tot i que l'activitat de SirT2 no es requereix per la regulació de l'estabilitat proteica de MOF, hem vist que SirT2 desacetila tres de les 18 lisines acetilades en la seqüència de MOF, les lisines 113 i 116 del CBD i la lisina 175 del domini HAT (Fig. R12). Hem vist que la desacetilació conjunta d'aquests residus inhibeix l'activitat catalítica específica de MOF sobre H4K16 i aboleix la interacció entre SirT2 i MOF (Fig. R13-14). En altres estudis, s'ha vist que el domini CBD de MOF és important per la unió al substrat i per la regulació de l'activitat (Conrad et al., 2012; Nielsen et al., 2005). Per tant, la desacetilació de les lisines 113 i 116, podria modificar l'estructura del domini i d'aquesta manera afectar a l'activitat catalítica de l'enzim. A més, Sun i col·laboradors van descriure com l'acetilació de la lisina 274 dins del domini catalític contribuïa a la creació del lloc d'entrada de l'acetil-CoA i reconeixement de substrat. Quan mutaven aquesta lisina a arginina, per mimetitzar l'estat desacetilat del residu, la cadena lateral de l'aminoàcid modificava l'estructura del centre actiu, impeding el reconeixement de substrat (Sun et al., 2011). En concordança, l'acetilació de la lisina 175 dins del domini catalític podria tenir un efecte similar al de la lisina 274.

Les nostres dades han mostrat que el procés mitjançant el qual, SirT2 manté MOF inactiu i en promou la degradació, es dona durant G2 i mitosi (Fig. R3, R7A, R12A). SirT2 és translocada a nucli durant la transició G2/M i un cop a nucli és fosforilada a la serina 368 per la CDK1-CiclinaB (Dryden et al., 2003; North & Verdin, 2007b; Vaquero et al., 2006). S'ha vist que aquesta fosforilació és important per les funcions de SirT2 en la progressió per mitosi i concretament, la desfosforilació d'aquest residu per CDC14 al final de mitosi, sembla ser un requeriment per la sortida de SirT2 del nucli i per la finalització de mitosi. De fet, les cèl·lules que sobreexpressen el mutant de SirT2 que simula la serina fosforilada, tenen mitosis més llargues i fases G1 més curtes. (Dryden et al., 2003; North & Verdin, 2007b). D'acord amb això, el control que exerceix SirT2 sobre MOF està restringit a mitosi, concordant amb els nivells baixos d'H4K16Ac durant aquesta fase del cicle i amb la

seva recuperació durant la fase G1 del següent cicle cel·lular (Rice et al., 2002; Vaquero et al., 2006). Així doncs la regulació de la localització de SirT2 i el seu estat de fosforilació poden jugar un paper important en el control que SirT2 exerceix sobre MOF i H4K16Ac i en conseqüència, sobre la progressió cel·lular. Els nostres resultats aporten un nou mecanisme de regulació d'H4K16Ac en el que SirT2, mitjançant el control de l'activitat i estabilitat de MOF, regula negativament els nivells d'H4K16Ac durant G2/M, reafirmant la importància de SirT2 en la regulació d'aquesta marca durant G2/M (Fig. D1).

2. SirT2 condueix a una reprogramació epigenètica durant mitosi

S'ha proposat en diverses ocasions que la presència d'H4K16Ac impedeix la d'H4K20me1 i viceversa (Nishioka et al., 2002; Rice et al., 2002; Serrano et al., 2013). D'acord amb això, al 2013, el grup va treure a la llum un nou mecanisme mitjançant el qual, SirT2, a través de la desacetilació d'H4K16Ac i la regulació de PR-SET7 controlava la deposició d'H4K20me1 durant mitosi (Serrano et al., 2013). Els nostres resultats amb cèl·lules KO de *sirt2* han confirmat que els nivells anormalment alts d'H4K16Ac durant mitosi correlacionen amb la disminució d'H4K20me1. A més, les cèl·lules DKO de *sirt2* i *mof*, tot i no tenir SirT2, presenten nivells d'H4K16Ac baixos durant mitosi (similars als dels WT durant aquesta fase del cicle cel·lular) degut a la deficiència de MOF i en conseqüència, recuperen els nivells d'H4K20me1 fins als nivells dels WT i inclòs s'observava certa tendència a l'alça (Fig. R17), corroborant la importància de la desacetilació d'H4K16Ac durant mitosi per a la monometilació d'H4K20. No obstant, per entendre completament com es duu a terme la deposició d'H4K20me1, no només s'ha de contemplar H4K16Ac, sinó que s'ha de tenir en compte l'afinada regulació que pateix PR-SET7 al llarg del cicle cel·lular. Com ja s'ha mencionat anteriorment, els nivells de PR-SET7 es mantenen baixos durant la fase S i comencen a recuperar-se durant G2 (Abbas et al., 2010;

Jørgensen et al., 2011; Oda et al., 2011; Yin et al., 2008). No obstant això, la monometilació d'H4K20 no es dona fins la transició G2/M (Houston et al., 2008). Les nostres dades mostren que, durant G2, MOF interacciona amb PR-SET7, en un complex trimèric en el que també està present SirT2 (Fig. R20-21), restringeix la distribució de PR-SET7 a la cromatina (Fig. R23), i en consonància, impedeix en certa mesura la deposició d'H4K20 (Fig. R17), tot junt suggerint que MOF reprimeix l'activitat de PR-SET7 a la cromatina controlant el seu reclutament i evitant així la compactació prematura de la cromatina (Centore et al., 2011). D'acord amb això, la inhibició de MOF dependent de SirT2 durant G2/M que hem descrit anteriorment, podria ser clau per a que PR-SET7 es distribuís al llarg de la cromatina i exercís la seva activitat (Fig. D1). Les dades publicades mostren que, SirT2 desacetila PR-SET7 a la lisina 90 durant G2/M, estabilitzant-lo a la cromatina i afavorint el seu escampament per tot el genoma, fomentant així la monometilació d'H4K20 global durant mitosi (Serrano et al., 2013). No obstant, els nostres experiments suggereixen que el mecanisme pel qual MOF impedeix la unió de PR-SET7 a la cromatina és independent de l'acetilació d'aquesta lisina, ja que PR-SET7 no és un dels substrats de MOF (Fig. R24B). Totes les dades juntes ens han permès proposar un model de regulació d'H4K16Ac i H4K20me1 coordinat per SirT2 (Figura D2), segons el que MOF, en el complex format per SirT2, MOF i PR-SET7 durant G2, romandria actiu acetilant H4K16Ac i estaria restringint la dispersió de PR-SET7 a la cromatina. Durant la transició G2/M aquest complex s'escindeix i SirT2 interacciona separatament amb MOF i PR-SET7, promovent la sortida de MOF de la cromatina, la seva degradació i inactivació i afavorint la dispersió de PR-SET7 mitjançant la desacetilació de la lisina 90. La desacetilació d'H4K16Ac per SirT2 conduiria a la monometilació d'H4K20 per PR-SET7 i a la disseminació d'aquesta marca epigenètica per tot el genoma. Tenint en compte el paper d'H4K16Ac i H4K20me1 en la compactació de la cromatina (Oda et al., 2009; Rice et al., 2002; Robinson et al., 2008; Shogren-Knaak et al., 2006), aquest procés desencadenaria els primers passos de la condensació cromosòmica. S'ha descrit que SirT2 es manté als

DISCUSSIÓ

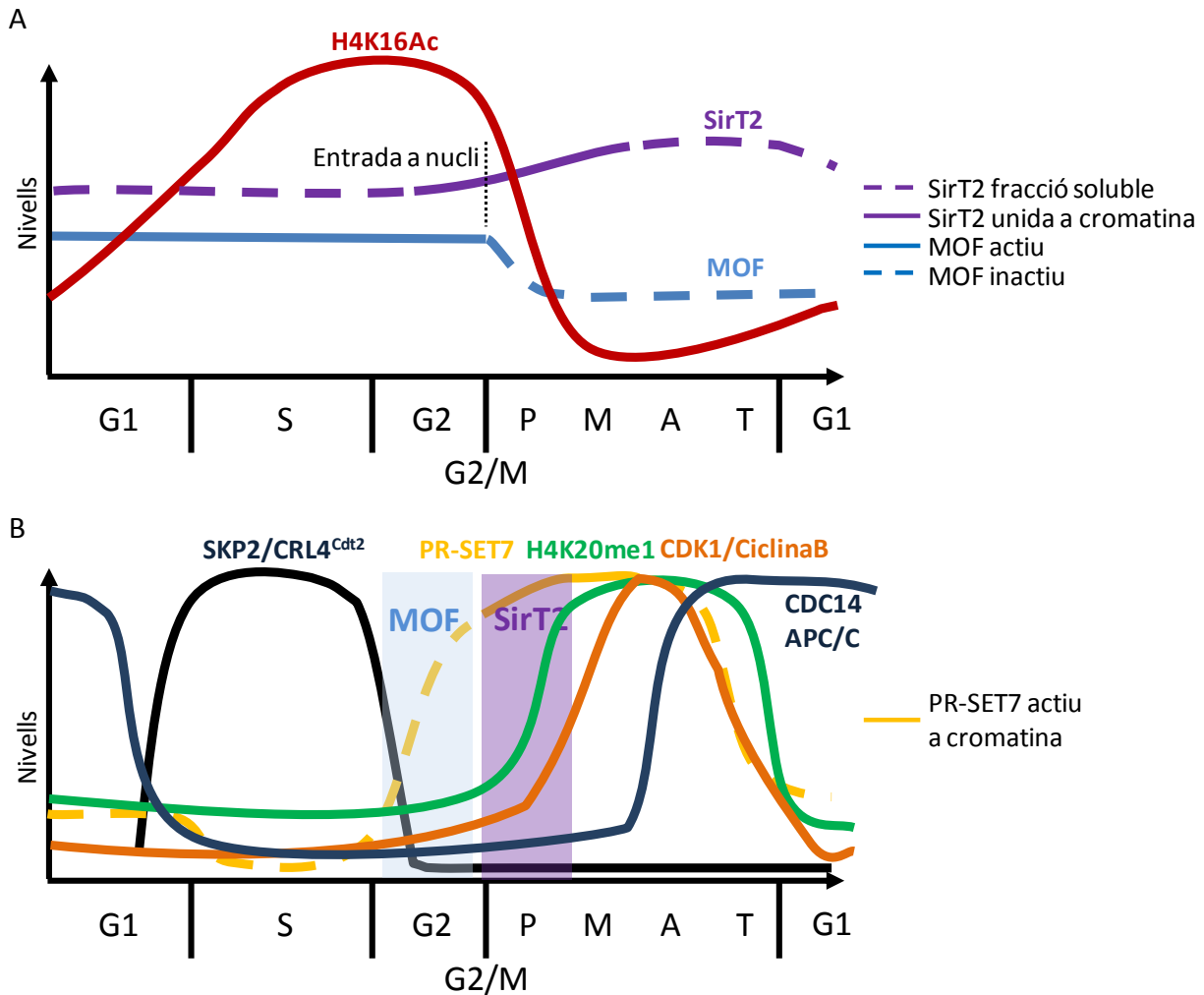


Figura D1. Esquema de la regulació de SirT2, MOF i PR-SET7 durant G2 i mitosi. A. En el eix de les Y es representa l'abundància relativa de cada un dels elements representats. Els nivells de SirT2 incrementen lleugerament durant G2 i a G2/M es produeix l'entrada de SirT2 al nucli, coincidint amb la inactivació i degradació de MOF i la desacetilació d'H4K16Ac. SirT2 roman a la cromatina fins just abans de metafase, mantenint MOF fora de la cromatina i H4K16 desacetilat. Al final de mitosi, SirT2 surt de nucli. B. Els nivells de PR-SET7 estan finament controlats al llarg del cicle cel·lular. Durant la fase S, SKP2 i CRL4^{Cdt2} mantenen baixos els nivells de PR-SET7. Durant G2, coincidint amb la inactivació de SKP2 i CRL4^{Cdt2}, els nivells de PR-SET7 augmenten. En aquesta fase, la interacció de PR-SET7 amb MOF restringiria la distribució de PR-SET7 a la cromatina, fins que durant G2/M, SirT2 inactiva a MOF i en promou la seva degradació. Durant G2/M SirT2 desacetila la lisina 90 de PR-SET7 afavorint la seva activitat sobre H4K20. A partir de metafase, CDK1-Ciclina B fosforila la S29 de PR-SET7 alliberant-lo de la cromatina. Al final de mitosi PR-SET7 és degradat via CDC14-APC/C. P, profase; M, metafase; A, anafase; T, telofase.

cromosomes fins al final de la profase (Dryden et al., 2003; Vaquero et al., 2006), fet que afavoriria el manteniment de MOF fora de la cromatina durant aquest període, assegurant els nivells d'H4K16Ac baixos. A més, PR-SET7 es manté a la cromatina fins metafase (Wu et al., 2010), moment en el que el gran volum d'H4K20me1 ja ha sigut depositat (Rice et al., 2002), llavors PR-SET7 és fosforilat per CDK1-CiclinaB a la lisina 29, promovent l'alliberació de PR-SET7 al nucleoplasma i protegint-lo de la degradació (Wu et al., 2010). D'acord amb les

nostres dades i altres anteriorment publicades (Sheikh et al., 2015), MOF controla l'expressió de la Ciclina B. Concretament, les nostres cèl·lules deficientes en MOF tenen nivells d'expressió de Ciclina B més baixos (Fig. R30) i amb concordança, més focus de PR-SET7 i de major volum a la cromatina (Fig. R23), suggerint un altre mecanisme independent de la interacció, per el qual MOF podria estar controlant la distribució de PR-SET7 a la cromatina. A final de mitosi, CDC14 desfosforila PR-SET7 i en promou la degradació via

DISCUSSIÓ

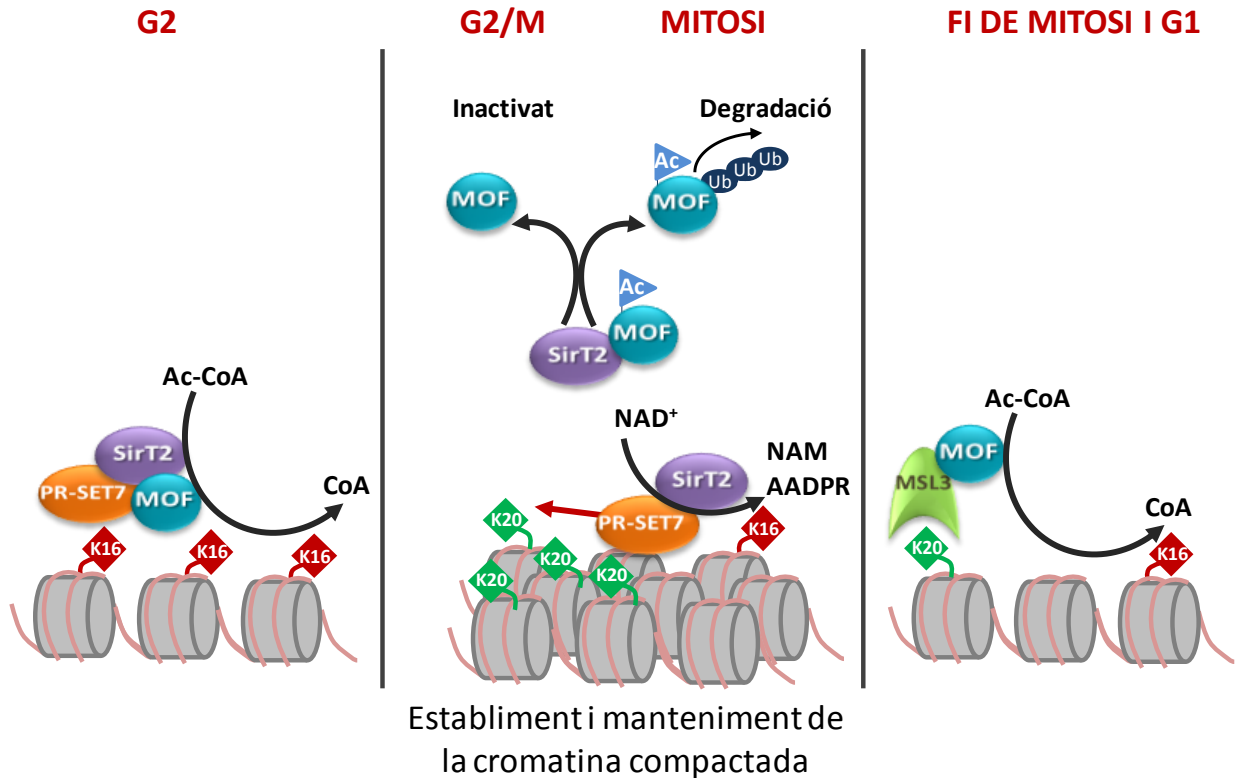


Figura D2. Model proposat per a la regulació d'H4K16Ac i H4K20me1 durant mitosi. Durant G2, MOF està formant un complex trimèric amb SirT2 i MOF evitant la dispersió de PR-SET7 a la cromatina. Durant aquesta fase els nivells globals d'H4K16Ac són alts i encara no ha començat la compactació mitòtica. A la transició G2/M, coincidint amb l'entrada massiva a nucli de SirT2, aquest s'associa a MOF, segregant-lo de la cromatina i promovent la seva degradació, acció que permet la distribució de PR-SET7 a la cromatina. A més, SirT2 desacetila MOF inhibint la seva activitat catalítica sobre H4K16. Per una altra banda, SirT2 és reclutat a la cromatina on desacetila H4K16Ac, promovent la monometilació d'H4K20 per PR-SET7. La desacetilació de la lisina 90 de PR-SET7 per SirT2 estabilitza la proteïna a la cromatina, afavoreix la dispersió d'H4K20me1 per tot el genoma i la compactació de la cromatina. Al final de mitosi, PR-SET7 és degradat pel proteosoma i SirT2 és transportat al citoplasma. MOF tornarà a la cromatina on començarà de nou un cicle d'acetilació. AADPR, O-acetil-ADP-Ribosa; NAM, Nicotinamida.

APC/C-proteosoma (Wu et al., 2010). En aquest punt del cicle cel·lular, la sortida de SirT2 del nucli afavoriria la unió de MOF a la cromatina per començar a restablir els nivells d'H4K16Ac en el nou cicle cel·lular. A més, segons Moore i col·laboradors la unió de MOF a la cromatina a través del complex MSL, que junt amb el complex NSL són els responsables de l'acetilació global d'H4K16Ac al llarg del genoma, es veu afavorida per el reconeixement de la monometilació d'H4K20me1 pel domini CBD de MSL3 (Chelmicki et al., 2014; Moore et al., 2010; Ravens et al., 2014; Smith et al., 2005). D'acord amb això, la monometilació global d'H4K20 del final de mitosi també podria estar influïent en el reclutament de MOF i l'acetilació d'H4K16Ac del següent cicle cel·lular.

Les nostres dades junt amb resultats prèviament publicats mostren que 1) SirT2 desacetila H4K16Ac durant G2/M (Serrano et al., 2013; Vaquero et al., 2006) 2) SirT2 inhibeix MOF durant mitosi, fet que afavoreix la desacetilació d'H4K16Ac (Fig. R7A, 11) 3) SirT2 promou l'activitat metiltransferasa de PR-SET7 afavorint la monometilació d'H4K20 (Serrano et al., 2013) 4) La pèrdua de SirT2 comporta la hiperacetilació d'H4K16 durant mitosi i això correlaciona amb la disminució d'H4K20me1-3 (Fig. R17, 18, 25, 26) 5) La pèrdua de MOF suposa la disminució d'H4K16Ac (Fig. R17C) i l'augment de PR-SET7 a la cromatina (Fig. R23), observacions que correlacionen amb l'increment d'H4K20me1-3 (Fig. R17, 25, 26). En concordança, s'ha proposat que l'H4K20me1 depositada durant mitosi per PR-SET7 determina els nivells d'H4K20me2-3 en les altres fases del cicle cel·lular (Oda et al., 2009;

DISCUSSIÓ

Serrano et al., 2013). Aquest fet està recolzat per l'exclusivitat de PR-SET7 com a metiltransferasa d'H4K20 (Nishioka et al., 2002), pels baixos nivells de PR-SET7 fora de mitosi (Oda et al., 2011), per la dependència que Suv420h1/2 tenen d'H4K20me1 per di- i trimetil·lar aquest residu respectivament (Schotta et al., 2008) i pel fet que, SirT2 tot i tenir efectes sobre els nivells d'H4K20me2-3, no interacciona ni colocalitza amb Suv420h1/2 (Serrano et al., 2013) i a diferència de les DKO de Suv420h1/2 (Schotta et al., 2008), en les cèl·lules KO de sirt2, la disminució en H4K20me2-3 no va acompanyada de l'acumulació d'H4K20me1 (Fig. D3). Totes aquestes evidències juntes ens porten a suggerir que durant mitosi es dona una reprogramació epigenètica dirigida per SirT2 on l'adequada deposició d'H4K20me1 marca la correcta di- i trimetil·lació d'H4K20 en altres fases del cicle cel·lular, tenint efectes sobre les funcions derivades d'aquestes PTM, com la replicació, la reparació o el manteniment de l'estructura de l'heterocromatina. En concordança la distribució del cicle cel·lular observada en les cèl·lules KO de sirt2 és similar a la de les DKO de Suv420h1/2, on l'allargament de la fase G1 pot ser un indicatiu de problemes en el *licensing* i l'escurçament de la fase S a defectes en la replicació. Per tant, aquestes cèl·lules degut a la deficiència en H4K20m2-3 trigarien més en marcar els orígens de replicació, demorant l'entrada a la fase S, però un cop iniciada aquesta fase transcorrien més ràpidament sense aturar-se a reparar adequadament el DNA. Addicionalment, aquestes cèl·lules podrien presentar problemes en la segregació dels cromosomes, ja sigui pel propi paper de SirT2 sobre H4K16Ac i la dinàmica dels microtúbuls, o per la funció d'H4K20me3 en el reclutament dels complexos cohesina durant mitosi. D'acord amb això, les cèl·lules KO de sirt2 presenten més inestabilitat genòmica (Fig. R31, 32).

No obstant les cèl·lules DKO, perden aquesta correlació entre la monometil·lació i la di- i trimetil·lació d'H4K20, mentre H4K20me1 es mostra elevat en un 23%, els nivells d'H4K20m2-3 decreixen al voltant del 10%. Per facilitar la interpretació, a la figura D3 estan representats els percentatges d'augment o de disminució dels diferents graus de metil·lació observats en les nostres cèl·lules.

	% RESPECTE ELS WT		
	me1	me2	me3
sirt2 KO	-23%	-27%	-20%
mof KO	+11%	+6.5%	+15%
DKO	+23%	-9%	-10%

Figura D3. Taula de la influència de la pèrdua de SirT2 i MOF sobre els nivells d'H4K201-3. La pèrdua combinada de SirT2 i MOF té un efecte compensatori en els nivells d'H4K20me2-3, però no en els d'H4K20me1. Dades extretes dels nostres resultats de FACS.

El fenotip observat en els DKO per H4K20me2-3, és doncs, intermedi al dels KOs individuals, suggerint certa compensació entre la pèrdua de SirT2 i la de MOF. Una possible explicació la podem trobar en que en les cèl·lules utilitzades, la pèrdua de MOF ha estat induïda i per tant, algunes histones que havien estat prèviament acetilades poden romandre encara en aquest estat fins que siguin desacetilades o recanviades durant la replicació (Sharma et al., 2010). La diferència entre els KO de mof i els DKO recau en l'activitat desacetilasa de SirT2. Mentre que en els KO de mof, SirT2 desacetila l'H4K16Ac romanent, en els DKO aquesta possibilitat no hi és. S'ha suggerit l'existència d'activitats redundants de SirT2 en la desacetilació d'H4K16Ac, però la funció de SirT2 desacetilant H4K16Ac de regions heterocromàtiques és insubstituïble. En consonància, els nivells d'H4K20me3 en els KO de sirt2 són anormalment baixos i les zones heterocromàtiques es troben desestructurades (Serrano et al., 2013; Vaquero et al., 2006). Així doncs, els DKO, podrien tenir romanents d'H4K16Ac en zones heterocromàtiques i això veure's reflectit en els nivells d'H4K20me3 però no en els d'H4K20me1, degut a la seva distribució global.

Aquesta compensació observada tant en els nivells d'H4K20me2, com en els d'H4K20m3, podria estar darrera de la recuperació de l'estabilitat genòmica que mostren les cèl·lules DKO (Fig. R31, 32), doncs, per una banda, H4K20me2 serveix de plataforma d'unió a 53BP1 en la DDR (Pei et al., 2011; Sanders et al., 2004; Schotta et al., 2008) i per una altra, la trimetil·lació d'H4K20 és essencial per al manteniment de l'estructura de l'heterocromatina

(Schotta et al., 2004) i en conseqüència, per l'estabilitat genòmica. No obstant, els KO de *mof* tenen nivells més alts d'H4K20me₂₋₃, però en canvi, tenen més inestabilitat genòmica que els WT (Fig. D3, R31, 32). La DDR és un procés molt complex que compren diverses vies en les que molts factors estan implicats. La dimetilació d'H4K20 és important per el reclutament de 53BP1 però abans de que això passi hi ha tota una cascada de senyalització que s'ha d'efectuar de manera progressiva i ordenada. MOF, participa en la DDR mitjançant l'acetilació d'H4K16Ac, però també a través d'altres funcions i en molts punts diferents, des dels primers passos de la senyalització fins al moment en que es decideix entre NHEJ o HR. Aquesta diversitat de funcions i la discrepància que hi ha entre els diferents treballs publicats fa difícil mesurar l'impacte que H4K20me té sobre la inestabilitat genòmica observada en les nostres cèl·lules.

Per tal d'arribar a la total comprensió de com MOF i SirT2 controlen la deposició d'H4K20me₁ i quins efectes pot tenir aquesta regulació sobre diferents funcions cel·lulars com la transcripció, la replicació del DNA, l'estructura de la cromatina o el control del cicle cel·lular, actualment estem realitzant experiments de ChIP-seq, en col·laboració amb el laboratori de la Dra. Lourdes Serrano, per determinar la distribució d'H4K20me₁ en cèl·lules WT, *mof*^{-/-}, *sirt2*^{-/-} i *sirt2*^{-/-}/*mof*^{-/-}. Els anàlisis preliminars indiquen que la pèrdua de MOF correlaciona amb la deslocalització d'H4K20me₁ en regions promotores i codificants de gens, el que suggereix que MOF juga un paper important en el control de la localització d'aquesta marca.

3. SirT2 controla el pas per mitosi

Des del 2005 han hagut varis estudis relacionant MOF amb la progressió del cicle cel·lular en cèl·lules proliferativament actives. En tots els casos s'ha vinculat la pèrdua de MOF amb l'aturada del cicle cel·lular en G2/M (Li et al., 2010; Sheikh et al., 2015; Taipale et al., 2005), tot i que segueixen sent matèria d'estudi les causes que condueixen a aquest arrest. Els nostres resultats han corroborat que MOF

és essencial per a la progressió del cicle cel·lular a través de G2/M. D'acord amb això, les cèl·lules deficientes en MOF queden arrestades en la fase G2 i no progressen cap a mitosi (Fig. R27, 28). A més, els nostres experiments amb cèl·lules DKO de *mof* i *sirt2* indiquen que l'aturada en G2/M causada per la pèrdua de MOF és dependent de SirT2. Les nostres dades junt amb evidències prèviament publicades pel grup (Serrano et al., 2013), suggereixen que SirT2 té un paper clar en l'activació del *checkpoint* de G2/M, doncs les cèl·lules deficientes en *sirt2*, a diferència de les WT, no queden aturades en la transició G2/M sota condicions d'estrès (Fig. R29), dada recolzada pel paper que varis autors han assignat a SirT2 en diferents *checkpoints* mitòtics (Inoue et al., 2007; North et al., 2014; Serrano et al., 2013; Zhang et al., 2014).

Fins al 2015, la causa més acceptada de l'aturada del cicle cel·lular en les cèl·lules deficientes en MOF era l'activació del *checkpoint* de G2/M mediada per ATM en resposta al dany al DNA (Li et al., 2010; Taipale et al., 2005). Teoria fortament recolzada per la importància de MOF i H4K16Ac en la DDR (Gupta et al., 2005, 2014; Li et al., 2010; Sharma et al., 2010; Taipale et al., 2005). No obstant, el rol de MOF i SirT2 en la regulació de la transcripció va obrir la possibilitat de que hi haguessin altres causes independents a la DDR que fessin essencials a MOF per a la progressió i a SirT2 per a l'aturada del cicle cel·lular. El grup de la Dra. Akhtar, va fer un estudi d'expressió a gran escala en el que es van identificar nombrosos gens que estaven regulats tant a l'alça com a la baixa per MOF (Sheikh et al., 2015). Molts d'aquests gens estaven relacionats amb la replicació del DNA i la progressió cel·lular. D'acord amb això, els nostres experiments han confirmat que MOF és necessari per l'expressió de certs gens relacionats amb el cicle cel·lular (Fig. R30). Concretament, Cdc25C, Ciclina B2 i Cdca3, tres factors essencials per a la progressió a través de G2/M i amb funcions clau durant mitosi, estan regulats a la baixa en les cèl·lules deficientes en MOF, recolzant la idea de que darrera de les anomalies del cicle cel·lular que experimenten les cèl·lules KO de *mof* està l'alteració en l'expressió gènica. A més hem observat que SirT2 està implicat en el control de l'expressió dels mateixos gens en una direcció oposada. Així ho

DISCUSSIÓ

mostra l'increment de l'expressió d'aquests gens observat en les cèl·lules KO de sirt2 (Fig. R30). Tot junt, suggerint que MOF i SirT2 regulen la progressió del cycle cel·lular en direccions oposades, controlant l'expressió dels mateixos efectors. Coincidint amb aquesta afirmació, els MEFs DKO tenen uns nivells d'expressió intermedis entre els KO de mof i els de sirt2, fet que podria explicar la recuperació parcial del cycle cel·lular que experimenten aquestes cèl·lules respecte a les KO de mof. Recolzant aquest sistema de regulació, hi ha evidències que mostren com HATs i HDACs es troben juntes en regions transcripcionalment actives de gens. Degut a que la funció de les HDACs en gens actius és extreure el grup acetil afegit per les HATs durant la iniciació i elongació de la transcripció per mantenir un estat idoni d'acetilació, que permeti l'elongació, però eviti l'activació de la iniciació promiscua d'aquests gens (Wang et al., 2009), un desequilibri entre HAT i HDAC, conduiria a l'alteració en el patró d'expressió com el que

observem en els nostres experiments. No obstant, desconexim si MOF i SirT2 es troben junts en les regions codificants d'aquests gens. Experiments futurs de ChIP serien importants per clarificar aquest punt. A més, els nostres resultats, no permeten detectar si l'alteració de l'expressió d'aquests gens és deguda a l'activació del *checkpoint* de G2/M o si és un esdeveniment independent, promogut directament per la pèrdua de MOF i/o SirT2. Una bona aproximació seria estudiar l'expressió d'aquests gens en cèl·lules KO de mof tractades o no amb un inhibidor de la via d'ATM/ATR. Si l'activació del *checkpoint* està darrera de la regulació dels gens del cycle, al inhibir la via d'ATM/ATR s'hauria de veure una recuperació en els nivells d'expressió, en canvi, si el causant de la desregulació de l'expressió és directament la falta de MOF, la inhibició de la via d'ATM/ATR no hauria de produir cap canvi en l'expressió d'aquests gens respecte les cèl·lules KO de mof sense tractar.

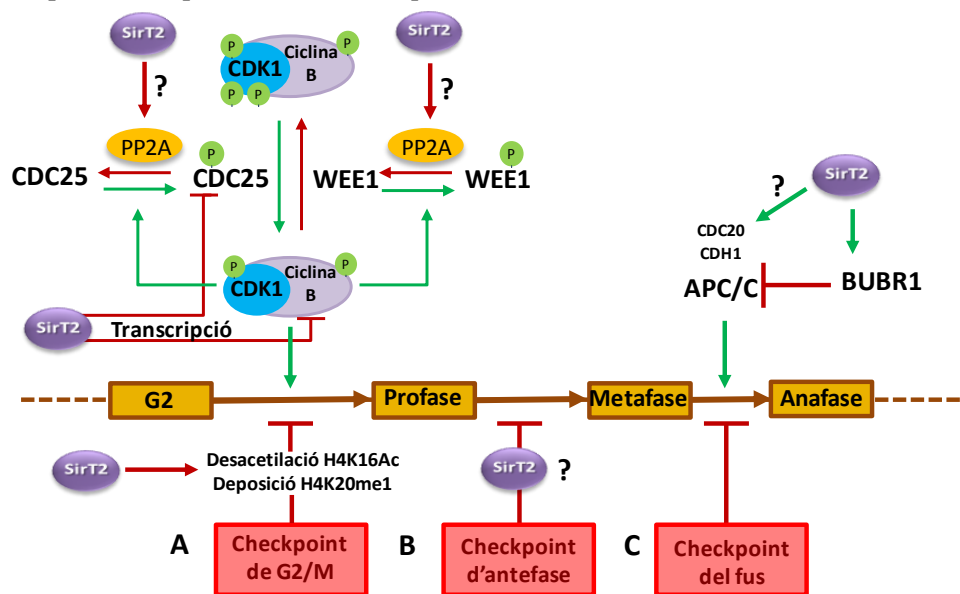


Figura D4. Punts de control de mitosi en els que participa SirT2. Els mecanismes de control del cycle cel·lular inclouen la regulació de la transcripció, cascades de fosforilació i el control de la localització intracel·lular. Els punts de control on participa SirT2 durant mitosi estan representats en aquest esquema. A, L'activació del *checkpoint* de G2/M dependent de SirT2 correlaciona amb l'augment en H4K20me1 (Serrano et al., 2013). SirT2 regula l'entrada a mitosi a través de la repressió de la transcripció de Cdc25, Ciclina B i Cdc3. A més SirT2 podria estar controlant la transició G2/M mitjançant l'activació de PP2A. L'activitat d'aquesta fosfatasa inhibeix CDC25 i activa WEE1 i com a conseqüència impedeix l'activació de CDK1-Ciclina B i la progressió cap a mitosi. B, Altres autors han proposat que SirT2 controla el *checkpoint* d'antefase i que en condicions d'estress mitòtic, evita la condensació cromosòmica impedit que les cèl·lules progressin cap a metafase (Inoue et al., 2007), fet que seria independent de la funció reguladora de SirT2 sobre H4K20me1. El mecanisme per el qual SirT2 intervé en aquest *checkpoint* està per determinar. C, El paper de SirT2 en el control del *checkpoint* del fus és més controvertit, per una banda sembla que SirT2 regula positivament APC/C afavorint la unió amb CDC20 i CDH1 (Kim et al., 2011), però això no correlaciona amb la distribució del cycle cel·lular que nosaltres observem. Per una altra banda, SirT2 sembla participar en l'arrest del cycle cel·lular al *checkpoint* del fus afavorint la funció inhibidora de BUBR1 sobre el complex APC/C (North et al., 2014; Serrano et al., 2013; Suematsu et al., 2014).

DISCUSSIÓ

Independentment de l'alteració en l'expressió observada, les dades publicades junt amb els nostres resultats apunten a que l'aturada del cicle cel·lular experimentada per la deficiència de MOF no només és deguda a l'alteració en el patró d'expressió, sinó que la pèrdua de MOF deriva en l'activació del *checkpoint* de G2/M en resposta a dany al DNA dependent d'ATM. En consonància, les cèl·lules KO de *mof* analitzades en condicions normals, sense induir cap tipus d'estrès, presenten nivells de γ -H2AX molt més elevats que les WT, indicant algun tipus de problema en la reparació del DNA. Normalment, s'estudia la cinètica de γ -H2AX després d'induir dany com una mesura de l'eficiència de reparació. En el nostre cas, hem utilitzat el nombre de focus de γ -H2AX com un indicador del dany basal o residual present en aquestes cèl·lules, ja que la pèrdua de MOF condueix a l'aturada del cicle cel·lular en condicions normals. Els nostres resultats, junt amb els prèviament publicats (Serrano et al., 2013), indiquen que SirT2 participa en l'activació del *checkpoint* en resposta a dany (Fig. R29). Tot i que, de quina manera SirT2 controla la transició G2/M segueix sent matèria d'estudi. Segons els resultats publicats, en condicions d'estrès, l'aturada del cicle cel·lular en G2/M dependent de SirT2 correlaciona amb l'augment en els nivells d'H4K20me1. No obstant, es desconeix si aquest augment és causa o efecte de l'activació del *checkpoint*. Les nostres dades han relacionat SirT2 i MOF amb PP2A, la fosfatasa activadora de WEE1 i inhibidora de CDC25, i en conseqüència, de l'entrada a mitosi. D'acord amb això, en el complex que formen SirT2 i MOF durant G2/M vam identificar la subunitat estructural del complex de PP2A (Fig. R4, 5). Les dades publicades mostren com la pèrdua de PP2A condueix a una entrada a mitosi prematura (Mochida et al., 2009), fet que correlaciona amb la falta de control sobre l'entrada a mitosi observat en les cèl·lules KO de *sirt2* (Fig. R27, 29). En futurs experiments caldrà aprofundir en la relació entre aquestes proteïnes, per tal de determinar si SirT2 activa el *checkpoint* de G2/M mitjançant el control de PP2A (Fig. D4).

Com ja s'ha mencionat anteriorment, les evidències acumulades durant els últims anys suggereixen que SirT2 desenvolupa diversos papers en els diferents

checkpoints mitòtics. Per una banda, s'ha descrit que sota condicions d'estrès mitòtic, SirT2 evita la condensació dels cromosomes durant profase, frenant el pas a metafase, punt de control conegut com *checkpoint* d'antefase (Inoue et al., 2007). Els nostres experiments suggereixen que SirT2, a través de la desacetilació directa d'H4K16Ac i mitjançant la inactivació i degradació de MOF, facilita la deposició d'H4K20me1. D'acord amb el paper que tenen H4K16 i H4K20me1 en la compactació dels cromosomes durant mitosi, el mecanisme de regulació entre SirT2, MOF i PR-SET7 no estaria darrera del control del *checkpoint* d'antefase, sinó que SirT2 regularia aquest punt de la mitosi a través d'altres mecanismes. La seva funció en el *checkpoint* del fus és font de controvèrsia fins al moment. Per una altra banda, s'ha proposat que SirT2 promou el pas de metafase a anafase mitjançant l'activació de l'APC/C (Kim et al., 2011). La progressió cap a anafase està regulada per l'activitat de l'APC/C. APC/C promou la degradació de nombrosos substrats amb funcions durant mitosi, com PLK, Aurora A i B, Securina, Cyclina A i B, Survivina, etc. L'activació d'aquest complex està finament regulada per la maquinària del *checkpoint* del fus (SAC). Només quan els cromosomes estan perfectament units al fus mitòtic, es produeix l'activació de l'APC/C i es desencadena el pas cap a anafase. APC/C reconeix els seus substrats mitjançant dues proteïnes adaptadores, CDC20 i CDH1, les quals serveixen de co-activadors unint substrats específics en les diferents fases de la mitosi. APC^{CDC20} actua des de metafase a anafase i APC^{CDH1} ho fa més al final de mitosi i fins G1 (Pines, 2011). L'activació d'APC^{CDC20} un cop superat el SAC condueix a la degradació de Cyclina B i la conseqüent inactivació de CDK1. En aquest punt, CDK1 deixa de fosforilar CDH1 i aquest pot unir-se a APC/C, dirigint la seva activitat fins la fase G1. Segons Kim i col·laboradors, SirT2 desacetila CDC20 i CDH1 afavorint la seva unió a APC/C i desencadenant la sortida de mitosi (Kim et al., 2011). Aquestes dades però, són discordants amb els nostres resultats i amb altres dades publicades per diferents autors. Al final de mitosi APC^{CDH1} promou la degradació de PR-SET7 (Wu et al., 2010). En dades publicades anteriorment pel grup, es va veure com la pèrdua de SirT2 no afectava als nivells total de PR-SET7 (Serrano et al.,

DISCUSSIÓ

2013), indicant que SirT2 no podia ser un regulador positiu de l'activitat de APC/C. A més North i col·laboradors van descriure que SirT2 afavoria l'estabilitat de BUBR1, proteïna del SAC inhibidora de APC^{CDC20}, fet que bloquejaria la transició cap a anafase. En la mateixa línia, els nostres resultats mostren que la pèrdua de SirT2 no condueix al retràs de la sortida de mitosi, doncs el percentatge de cèl·lules en G2 i mitosi és lleugerament menor que en els WT, indicant que la pèrdua de SirT2 accelera el pas per mitosi, suggerint que SirT2 té un paper alentidor en aquesta fase del cicle cel·lular (Fig. R27). Aquestes dades estan recolzades per diferents treballs en els que la sobreexpressió de SirT2 comporta un retràs en la sortida de mitosi (Dryden et al., 2003; North & Verdin, 2007b) i la pèrdua de SirT2 no implica una demora en el pas de metafase a

anafase (Suematsu et al., 2014). D'acord amb això, semblaria que SirT2 té un paper controlador en la sortida de mitosi, més que no pas promotor (Fig. D5).

4. SirT2 i MOF són importants per l'estabilitat genòmica

Els nostres resultats suggereixen que MOF, SirT2 i H4K16Ac són importants per el manteniment de la integritat del genoma. D'acord amb això, hem vist que tant les cèl·lules KO de mof com les KO de sirt2 presenten un increment notable en el percentatge de les aneuploidies i tenen més focus de γ -H2AX residual a la cromatina (Fig. R31, 32). La inestabilitat genòmica pot venir donada entre altres factors, per alteracions de l'estructura de la cromatina, per

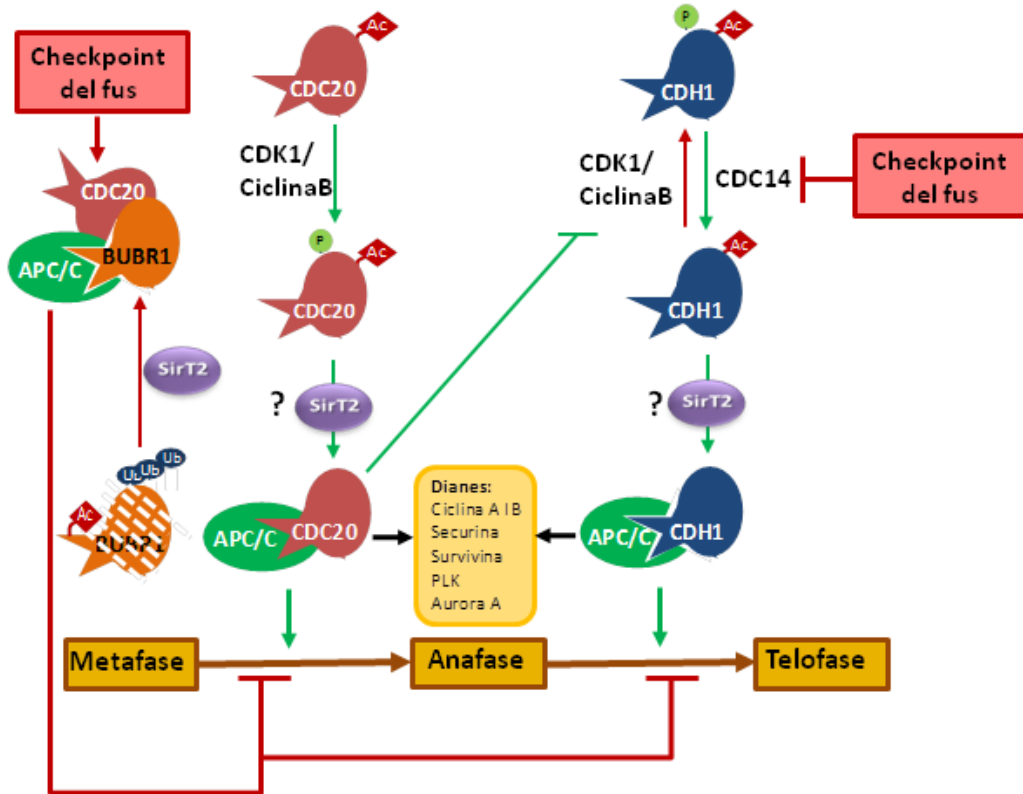


Figura D5. Paper de SirT2 en la regulació del checkpoint del fus. Quan els cromosomes estan degudament ancorats al fus mitòtic, les proteïnes del *checkpoint* del fus alliberen APC^{CDC20}, que alhora promou la degradació de diverses proteïnes, entre elles CiclinaB. Això porta a la inactivació de CDK1, que deixa de fosforilar i inhibir CDH1. APC^{CDH1} continuarà promovent la degradació de diferents substrats fins la fase G1. SirT2 desacetila CDC20 i CDH1 afavorint la seva unió a APC/C (Kim et al., 2011). La unió de CDC20 i CDH1 activa la capacitat d'ubiquitinar d'APC/C i promou la degradació de diferents substrats amb la finalitat de sortir de mitosi. En condicions normals, CDC20 i CDH1 s'uneixen a APC/C promovent la sortida de mitosi. Durant condicions d'estrès, la maquinària del *checkpoint* del fus actua per prevenir que això passi. Un d'aquests mecanismes sembla estar controlat per SirT2, que desacetila BUBR1, estabilitzant-lo. BUBR1 impedeix que CDC20 s'uneixi a APC/C (North et al., 2014).

DISCUSSIÓ

problemes en la reparació del DNA o defectes en l'activació dels *checkpoints*. D'acord amb aquestes premisses, MOF, a través d'H4K16Ac, juga un paper essencial en el manteniment de l'estructura de la cromatina i ha estat relacionat amb la DDR de diferents maneres. En primer lloc, alguns autors proposen que l'estat previ d'acetilació d'H4K16 seria important per la formació dels focus de γ -H2AX en resposta a DSBs (Sharma et al., 2010). Sharma i col·laboradors argumenten que el paper d'H4K16Ac en la DDR seria el de mantenir la cromatina en una conformació oberta per a que es pogués donar la senyalització del dany. Aquesta afirmació està recolzada pel fet que l'acetilació de les cues N-terminal de les histones H3 i H4 correlaciona amb una conformació oberta de la cromatina i més accessible als factors de la DDR. Contràriament, la desacetilació d'aquests histones, comporta la formació d'estructures més compactades (Shogren-Knaak et al., 2006; Vaquero et al., 2003). A més, això coincideix amb que H4K16Ac presenta els seus nivells màxims durant la fase S (Vaquero et al., 2006), punt del cycle cel·lular on la reparació dels DSBs és més eficient. En segon lloc, s'ha relacionat l'acetilació d'H4K16 dependent de MOF amb esdeveniments corrent avall d'ATM i γ -H2AX i s'associa MOF a la reparació tant per NHEJ com per HR (Gupta et al., 2014; Li et al., 2010). Per una banda, Li i col·laboradors van demostrar que l'acetilació d'H4K16 en els llocs de dany era necessària per la unió de MDC1 a γ -H2AX i van proposar que l'acetilació de K16, neutralitzava la càrrega positiva de la cua bàsica d'H4, debilitant la interacció entre l'extrem N-terminal d'H4 i la regió àcida d'H2AX, el que comportava la reducció de la proximitat entre nucleosomes i permetia que MDC1 accedís a la regió del DSB i s'unís a γ -H2AX, desencadenant així la DDR (Li et al., 2010; Luger et al., 1997). Per una altra banda, Gupta i col·laboradors van identificar la fosforilació de la treonina 392 de MOF com una diana d'ATM en la DDR durant S i G2. Els seus resultats mostraven que en resposta a dany, ATM no fosforilava MOF durant la fase G1 i això comportava que MOF retingués 53BP1 a la cromatina afavorint la reparació per NHEJ, en canvi, en les cèl·lules en S i G2, la fosforilació de MOF dependent d'ATM debilitava la unió de 53BP1 als

llocs de trencament i permetia la resecció del DNA, afavorint la HR (Gupta et al., 2014). Les nostres dades mostren que les cèl·lules KO de mof tenen nivells basals de γ -H2AX més elevats que els WT, evidència dels defectes que la pèrdua de MOF causa en la reparació del dany (Fig. R21). Coincidint amb les nostres observacions, Gupta i col·laboradors observaven que després d'irradiar les cèl·lules deficientes en MOF, tot i presentar un nombre de focus de γ -H2AX similars als dels WT, la cinètica d'aquests era més lenta i finalment els nivells d' γ -H2AX residuals eren més elevats (Gupta et al., 2014). Totes aquestes evidències ens condueixen a atribuir l'increment en el percentatge d'aneuploidies observat en les cèl·lules deficientes en MOF al ben establert rol de MOF i H4K16Ac en la DDR i en la reparació del DNA.

Tenint en compte la funció estructural d'H4K16Ac, entenem que és bàsic mantenir uns nivells adequats d'acetilació per a que els factors de la DDR puguin accedir a la cromatina. Confirmant estudis previs, hem vist que les cèl·lules KO de sirt2 tenen nivell d'H4K16Ac més elevats que les WT i això correlaciona amb una elevació del γ -H2AX residual i amb un augment de les aneuploidies (Fig. R31, 32, 17C) (Serrano et al., 2013). S'ha proposat reiteradament que durant la DDR l'acetilació de les histones incrementa per permetre l'accés de les proteïnes reparadores i un cop finalitzada la reparació, els nivells d'acetilació recuperen el seu estat inicial (Gupta et al., 2014; Miller et al., 2010; Vempati et al., 2010). SirT2 desacetila H4K16Ac globalment durant G2/M, i s'ha vist que la manca de SirT2 porta a l'alteració dels nivells d'H4K16Ac durant mitosi (Serrano et al., 2013; Vaquero et al., 2006). No obstant, durant G1, activitats redundants a SirT2 semblen desacetilar H4K16Ac en la major part del genoma, excepte en les regions heterocromàtiques, on s'ha suggerit que l'activitat desacetilasa específica de SirT2 és indispensable (Serrano et al., 2013; Vaquero et al., 2006). El manteniment de l'arquitectura de l'heterocromatina és essencial per la integritat del genoma, de manera que l'augment en la inestabilitat genòmica produït per la pèrdua de Sirt2 pot ser atribuït, entre altres coses, a aquesta funció. No obstant, no creiem que l'únic responsable de la inestabilitat genòmica observada en els KO de sirt2

DISCUSSIÓ

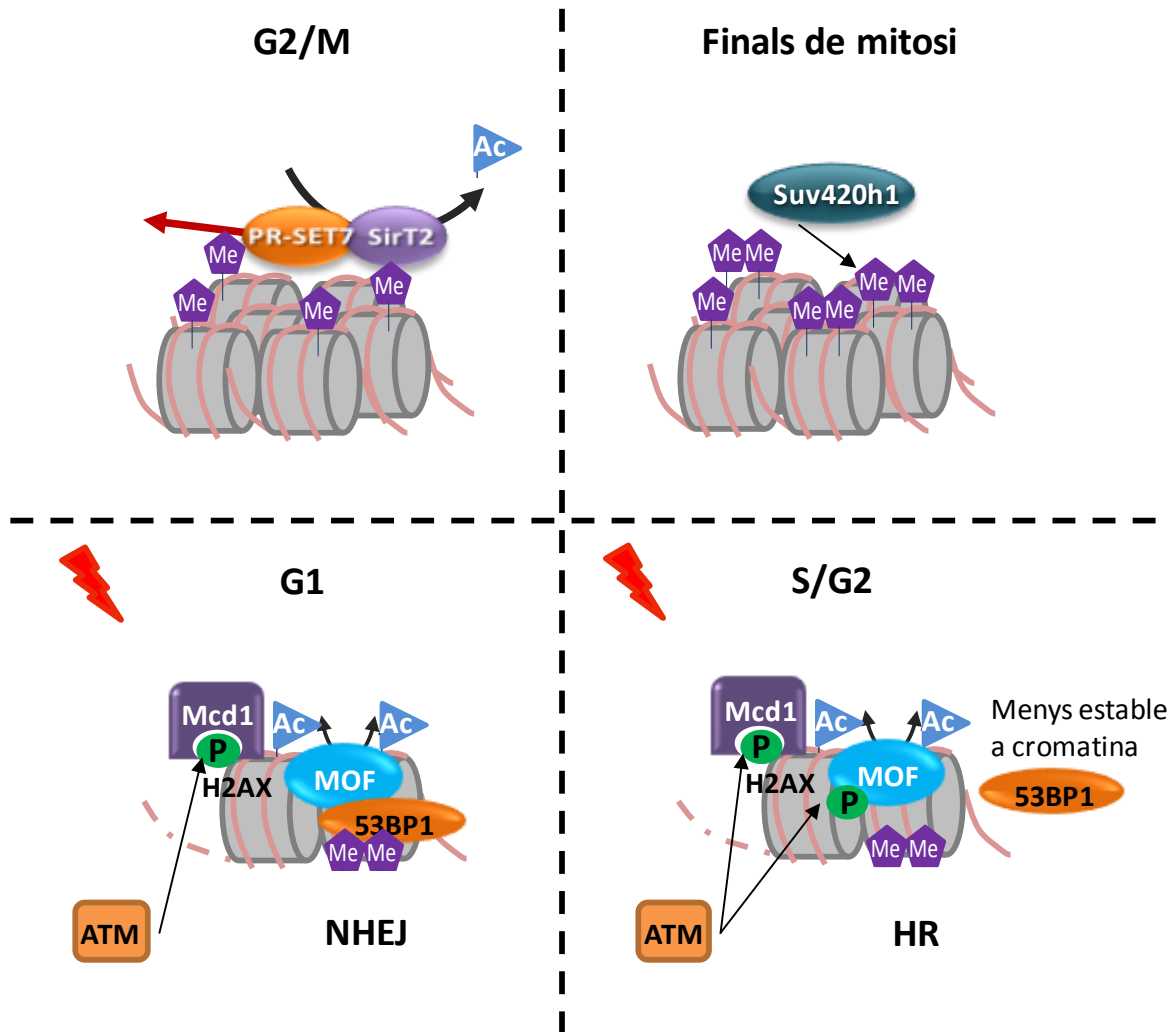


Figura D6. MOF i SirT2 en la resposta al dany al DNA. Els nivells d'H4K20me2 depenen directament de la deposició d'H4K20me1 que té lloc durant G2/M i que està controlada per SirT2 i PR-SET7. Durant la DDR ATM fosforila H2AX, acció facilitada pels nivells previs d'H4K16Ac controlats per MOF. En resposta al dany, MOF hiperacetila H4K16 i facilita la unió de MDC1 a γ -H2AX. 53BP1 és reclutat establement als llocs de trencament de DNA mitjançant múltiples interaccions amb MDC1 i H4K20me2, entre altres. Durant G1, MOF interacciona fortament amb 53BP1, retenint-lo a la cromatina i promovent la reparació per NHEJ. Durant S i G2, ATM fosforila MOF en resposta al trencament del DNA. La forma fosforilada de MOF no reté 53BP1 a la cromatina, permetent la resecció del DNA i conduint a la reparació per recombinació homòloga. NHEJ, nonhomologous end-joining; HR, recombinació homòloga.

sigui el rol d'H4K16 en l'arquitectura de la cromatina, doncs les nostres dades junt amb les prèviament publicades pel grup, demostren que la no desacetilació d'H4K16Ac durant mitosi comporta una disminució en els nivells d'H4K20me1-3 (Fig. R17, 18, 25, 26) (Serrano et al., 2013). És indiscutible que els diferents estats de metilació d'H4K20 estan implicats en processos biològics que assegurin l'estabilitat genòmica (Beck et al., 2012; Pei et al., 2011; Sanders et al., 2004; Schotta et al., 2004, 2008; Serrano et al., 2013; Tardat et al., 2010). D'acord amb això, en els nostres experiments, la pèrdua de SirT2 i la conseqüent disminució d'H4K20me1-3 correlaciona amb

l'augment de la inestabilitat del genoma. Concretament, s'ha atribuït a H4K20me1 la funció de desencadenar la compactació mitòtica dels cromosomes, a través del reclutament de les subunitats CAP-G2 i CAP-D3 del complex condensina II (Liu et al., 2010). A més s'ha proposat que la presència d'H4K20me1 manté lliure d'H4K16Ac la cromatina (Nishioka et al., 2002), afavorint la condensació dels cromosomes. Addicionalment, H4K20me3, a part de ser important en el manteniment de l'heterocromatina pericentromèrica i telomèrica, se l'ha relacionat amb la unió dels complexos cohesina durant mitosi, apuntant a que desenvolupar un rol important en la

DISCUSSIÓ

segregació dels cromosomes (Hahn et al., 2013). En concordança, la deficiència de SirT2 i el conseqüent augment d'H4K16Ac i disminució d'H4K20me_{1,3} portaria a anomalies en la compactació de la cromatina i en la unió de les cromàtides germanes al fus mitòtic, conduint a la mala segregació dels cromosomes i finalment a l'aparició d'aneuploïdies. Damunt, una cromatina més oberta és més propensa a patir trencaments de doble cadena, atribuïts a la fragilitat de la fibra de cromatina. Addicionalment, H4K20me₁₋₃ són crucials per la replicació del DNA, concretament són essencials durant el *licensing* per al reclutament del pre-RC als orígens de replicació i s'ha establert que és necessària una fina regulació dels nivells d'aquestes marques per a que els orígens només siguin marcats un cop per cycle cel·lular i evitar així fenòmens de re-replicació que conduirien a aneuploïdies (Beck et al., 2012; Tardat et al., 2010). La disminució de la metilació d'H4K20 en els KO de sirt2 podria demorar l'inici de la replicació degut a problemes en el reclutament del pre-RC, fet que concorda amb el retràs en l'entrada a la fase S característic de les cèl·lules KO de sirt2 (Fig. R27). Tot i que s'ha proposat, que un cop han entrat a aquesta fase, degut al paper d'H4K20me₁₋₂ en reparació (Pei et al., 2011; Sanders et al., 2004; Schotta et al., 2008) i el de SirT2 en el *checkpoint* d'ATR (Zhang et al., 2016), aquestes cèl·lules tenen una progressió per la fase S més ràpida, sense supervisió ni reparació (Serrano et al., 2013; Vaquero et al., 2006). A més, el fet de que les cèl·lules sirt2 KO tinguin més nivells de γ -H2AX (Fig. R31), i que com prèviament s'havia vist, presentin una disminució en la formació dels focus de 53BP1 després d'induir dany igual que l'observat en el cas de la pèrdua de H4K20me₁₋₂ (Sanders et al., 2004; Schotta et al., 2008; Serrano et al., 2013), confirma que aquestes cèl·lules tenen algun problema de reparació. Finalment, SirT2 desacetila H4K56Ac, marca important en la resposta a dany, tot i que el paper de SirT2 en aquesta funció és encara desconegut (Vempati et al., 2010).

No obstant, la inestabilitat genòmica observada en els MEFs sirt2 KO també pot venir donada per la falta de control sobre el cycle cel·lular que experimenten les cèl·lules KO de sirt2. Com hem vist, SirT2 és essencial per l'activació del *checkpoint* de G2/M en

resposta a dany al DNA (Fig. R27, 28, 29) (Serrano et al., 2013). A més SirT2 sembla tenir un paper en el *checkpoint* d'antefase, en el que sota condicions d'estress mitòtic, evita la condensació dels cromosomes demorant el pas cap a metafase (Inoue et al., 2007; North & Verdin, 2007b; Zhang et al., 2014). En el *checkpoint* del fus, la funció de SirT2 està en discussió, mentre que alguns autors proposen que SirT2 afavoriria la sortida de mitosi activant el complex APC/C (Kim et al., 2011), altres suggereixen que SirT2 mitjançant l'estabilització de BUBR1, proteïna del SAC, mantindria l'APC/C inactiu fins que les condicions fossin favorables (North et al., 2014). Nosaltres hem vist que les cèl·lules KO de sirt2 passen per mitosi lleugerament més ràpid que les WT, suggerint que hi ha una falta de control en algun punt de la mitosi, fet que concorda amb el paper que se li ha atribuït a SirT2 en els diferents *checkpoints* mitòtics. No obstant, aquest observació és discordant amb la funció que s'ha proposat per SirT2 com a promotor de l'activitat de l'APC/C complex durant la transició de metafase anafase (Kim et al., 2011). D'acord amb les funcions que SirT2 desenvolupa en els *checkpoints* mitòtics, la seva absència ha de conduir a la progressió del cycle tot i haver dany al DNA, condensació cromosòmica alterada o mal alineament i ancoratge dels cromosomes al fus. Quan la cèl·lula és incapaç de romandre aturada fins que l'entorn sigui favorable i escapa de mitosi, es parla de lliscament mitòtic. Durant el lliscament mitòtic, les cèl·lules, que no han experimentat la citocinesi, comencen a re-replicar el DNA, fet que condueix a la mort mitòtica, l'augment de les aneuploïdies i l'aparició d'inestabilitat genòmica en general, coincidint amb el fenotip observat per la pèrdua de SirT2 (Fig. R32) (Inoue et al., 2007; Kim et al., 2011; Serrano et al., 2013).

Contra tot pronòstic, en el cas de les cèl·lules DKO de sirt2 i mof, tant els nivells residuals de γ -H2AX com el percentatge de poliploïdies es compensen per la pèrdua dels dos enzims reguladors d'H4K16Ac (Fig. R31, 32). Ja s'ha mencionat amb anterioritat la importància d'H4K16Ac en la senyalització del dany i en l'accessibilitat de la cromatina per a la maquinària de reparació. La pèrdua combinada de mof i sirt2 i la conseqüent recuperació parcial dels nivells d'H4K16Ac per la no desacetilació de

l'H4K16Ac residual durant mitosi, podria explicar la recuperació en els nivells de γ -H2AX. Aquesta dada està recolzada per les observacions del laboratori del Dr. Pandita, on veien que la depleció de mof en els KO de *sirt2* comportava una recuperació en la cinètica de γ -H2AX (Sharma et al., 2010). Tot i que en els nostres experiments de *western blot* no veiem aquesta recuperació en els nivells d'H4K16Ac dels DKO, en les IHC realitzades en ronyons d'aquest ratolins, s'aprecien tres intensitats de marcatge diferents (Fig. R18). Per una banda, cèl·lules sense cap tipus de senyal, que correspondrien a cèl·lules en les que la pèrdua de mof havia estat induïda efectivament i possiblement fossin cèl·lules molt proliferatives, que havien passat diferents cicles cel·lulars des de la delecio de mof, havent-se produït el recanvi d'histones modificades per histones lliures d'H4K16Ac. Per una altra banda, s'observen cèl·lules amb un marcatge d'H4K16Ac poc intens, aquestes correspondrien a cèl·lules sense MOF i probablement menys proliferatives, en les que encara hi havia l'H4K16Ac a la cromatina que havia estat dipositat per MOF en moments previs a la delecio. Finalment, es detecten cèl·lules amb un marcatge intens d'H4K16Ac, similar al dels KO de *sirt2*. Aquestes cèl·lules pertanyerien al grup on la pèrdua de mof no hauria estat induïda, i per tant la no desacetilació d'H4K16Ac per SirT2 conduiria al discret augment observat. En experiments futurs caldrà correlacionar els nivells d'H4K16Ac d'aquestes cèl·lules amb els de γ -H2AX, per comprovar si realment, la disminució en els nivells de γ -H2AX es deu a la recuperació d'H4K16Ac.

Altres processos aberrants com la re-replicació poden generar inestabilitat genòmica. Els DKO mostren una compensació en els nivells de metilació d'H4K20 (Fig. D3), fet que podria tenir un efecte positiu en el control de la replicació en general i del *licensing* en particular. En futurs experiments, s'haurà d'estudiar si la re-replicació en aquestes cèl·lules és menor que l'experimentada en les KO de *sirt2* (Serrano et al., 2013). A més, la compensació en els nivells d'H4K20me2 podria estar afavorint el reclutament de 53BP1 en la resposta al dany, millorant així, l'eficiència de la reparació respecte els KOs individuals, en els que s'ha demostrat que els focus de 53BP1 a la cromatina després d'irradiació estan

disminuïts respecte dels seus controls WT (Li et al., 2010; Serrano et al., 2013).

Tot i que la compensació en la inestabilitat genòmica observada en els doble *knockout* és clara, actualment encara no compremem els mecanismes mitjançant els quals es duu a terme aquesta neutralització. Les funcions de MOF en la DDR van més enllà de la regulació de l'acetilació d'H4K16 i el paper de SirT2 en els diferents *checkpoints* de mitosi i en la resposta al dany a través d'ATR, en alguns casos també és independent d'H4K16Ac. Així doncs, serà important seguir aquesta línia d'investigació per entendre els mecanismes moleculars en els que SirT2 i MOF intervenen de manera antagònica per mantenir la integritat del genoma.

5. MOF, SirT2 i càncer

SirT2 ha estat proposat en diverses ocasions com a gen supressor tumoral. De fet, algunes de les característiques descrites aquí i en altres estudis, degudes a la pèrdua de SirT2, estan associades a tumorigènesi. Aquest és el cas de l'amplificació centromèrica, l'augment en les aneuploidies, l'alteració de l'heterocromatina, l'increment del dany al DNA o la re-replicació del DNA.

Kim i col·laboradors van observar que les cèl·lules deficientes en SirT2 tenien més centrosomes que les WT (Kim et al., 2011). Degut a que la majoria de càncers, tant sòlids com hematològics, presenten amplificació centromèrica, es considera aquest tret com una marca distintiva del càncer (Anderhub et al., 2012). Similarment a les cèl·lules canceroses, les cèl·lules deficientes en SirT2, a part de presentar més nombre de centrosomes, també són aneuploids. Addicionalment, l'alteració en l'estructura de l'heterocromatina pot incrementar la susceptibilitat al desenvolupament de càncer (Hahn et al., 2013). De fet, nivells molt reduïts d'H4K20me3 s'han establert com a marca distintiva del càncer (Broeck et al., 2008; Fraga et al., 2005). Els nostres resultats, junt amb previs publicats, mostren que les cèl·lules deficientes en SirT2 tenen nivells reduïts d'H4K20me3 i això correlaciona amb anomalies en l'heterocromatina, com indica la reducció en

H3K9me3 (Serrano et al., 2013). A més, els nostres estudis mostren que les cèl·lules deficientes en SirT2 presenten nivells d'H4K20me2 reduïts. Considerant el paper d'H4K20me2 en el reclutament de 53BP1 (Jørgensen et al., 2013) i d'acord amb els resultats prèviament publicats pel grup (Serrano et al., 2013), els KO de sirt2 presenten anomalies en el reclutament de 53BP1 en la DDR. Per tant aquesta alteració podria conduir a l'augment de la inestabilitat genòmica i al desenvolupament tumorigènic. Finalment, la pèrdua de SirT2 correlaciona amb l'increment de la re-replicació del DNA, possiblement per la seva influència en la metilació d'H4K20 (Serrano et al., 2013) o pel seu paper en els checkpoints mitòtics (Inoue et al., 2007; North et al., 2014). Una ronda addicional, completa o parcial, de replicació del DNA, sense la corresponent divisió cel·lular, condueix a l'aparició d'aneuploidies i com a conseqüència pot derivar en un procés tumorigènic.

Tot i que el nostre treball se centra en el paper de SirT2 en la regulació de la cromatina i del cicle cel·lular, aquesta sirtuina també té competències en l'activació de la mort cel·lular a través de FoxO3a (Wang et al., 2007), processés directament relacionat amb el desenvolupament tumoral.

Tot això justifica la regulació a la baixa de SirT2 en gliomes, neuroblastoma, melanoma, càncer gàstric, carcinoma hepatocel·lular i càncer de mama (Hiratsuka et al., 2003; Kim et al., 2011; Lennerz et al., 2005; Serrano et al., 2013). No obstant, SirT2 també s'ha trobat regulat a l'alça en càncer pancreàtic i neuroblastoma amb MYC alterat (Liu et al., 2013), suggerint que en determinades ocasions, SirT2 pot actuar com un oncogen. Fet recolzat pel paper inhibidor de SirT2 sobre la mort programada dependent de p53. De fet, el tractament amb inhibidors de SirT1 i SirT2 en línies cel·lulars de càncer de mama porta a l'augment de l'apoptosi activada per p53 (Peck et al., 2010). A més, considerant el paper inhibidor de SirT2 sobre l'autofàgia i tenint en compte que aquesta via està lligada a l'activitat de supressió tumoral (Gal et al., 2012; Zhao et al., 2010), es podria contemplar la inhibició de SirT2 en cèl·lules canceroses com una nova estratègia terapèutica contra el càncer.

El paper de MOF en càncer és més controvertit. Per una banda hi ha suficients evidències que suggereixen que MOF actua com un supressor tumoral. Les nostres dades junt amb estudis previs d'altres autors mostren que la pèrdua de MOF condueix a l'augment al del dany al DNA, l'increment de les aberracions cromosòmiques, l'aparició d'aneuploidies i la lobulació nuclear (Gupta et al., 2014; Li et al., 2010; Sharma et al., 2010; Taipale et al., 2005), trets característics de les cèl·lules canceroses. Addicionalment, s'ha descrit que MOF promou l'activació de l'apoptosi dependent de p53 en condicions d'estrès (Li et al., 2009), recolzant el paper repressor tumoral de MOF. D'acord amb això, MOF s'ha trobat regulat a la baixa en càncer de pit, medul·loblastoma, carcinoma de cèl·lula renal i càncer d'ovari, on s'ha proposat com a biomarcador per al diagnòstic (Liu et al., 2013; Pfister et al., 2008; Wang et al., 2013).

Per una altra banda, la dependència de MOF en la proliferació cel·lular, suggereix que MOF podria estar actuant com un oncogen. De fet, les nostres dades, junt amb estudis publicats per altres laboratoris, mostren que la funció transcripcional de MOF activa l'expressió de gens necessaris per a la proliferació cel·lular i com a conseqüència, la pèrdua de MOF condueix a l'alentiment de la progressió cel·lular i finalment a l'aturada del cicle (Sheikh et al., 2015). El fet que la sobreexpressió de MOF en ratolins correlacioni amb l'aparició i desenvolupament tumoral (Gupta et al., 2008) i que estigui regulat a l'alça en NSCLC (Chen et al., 2014) recolza la seva funció oncogènica.

Considerant que la pèrdua combinada de SirT2 i MOF compensa la pèrdua individual d'aquests enzims en la progressió del cicle cel·lular, els nivells d'H4K20me2-3 i el percentatge d'aneuploidies, seria interessant aprofitar l'antagonisme funcional entre aquests dos enzims com a futures estratègies terapèutiques contra el càncer.

DISCUSSIÓ

En resum, per una banda l'augment d'H4K16Ac durant mitosi en els KO de sirt2 genera una disminució en els nivells d'H4K20me1-3 que es tradueix en alteracions en la compactació de la cromatina, en l'estructura de l'heterocromatina i en la replicació i reparació del DNA. Per una altra banda, els KO de mof, mostren un fenotip més sever. La desaparició d'H4K16Ac més enllà de les alteracions que pugui causar sobre la metilació d'H4K20, produeix la compactació generalitzada de la cromatina, fet que condueix a la repressió de

nombrosos gens implicats en la progressió del cicle cel·lular i dificulta l'accés a la cromatina de les proteïnes de reparació, desencadenant l'activació del *checkpoint* de G2/M. La pèrdua combinada de SirT2 i MOF compensa la pèrdua individual de cada un dels enzims tant en la progressió del cicle cel·lular com en l'estabilitat genòmica, fenotips que caldrà seguir explorant per a la total comprensió dels mecanismes moleculars involucrats i les possibles implicacions en càncer.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. SirT2 i MOF formen un complex durant G2/M.
2. SirT2 controla els nivells d'acetilació d'H4K16 durant mitosi a través de dues funcions complementàries: la desacetilació d'H4K16Ac i la regulació de MOF.
3. SirT2 s'uneix a MOF a través del seu domini HAT, el retira de la cromatina i en promou la ubiquitinació i degradació dependent del proteosoma durant mitosi.
4. SirT2 desacetila les lisines K113, K116 i K175 de MOF, inhibint la seva activitat catalítica sobre H4K16.
5. L'activitat de SirT2 promou la desfosforilació de la serina 348 de MOF, residu important per la seva activitat acetiltransferasa i per la desacetilació de MOF dependent de SirT2.
6. MOF, SirT2 i PR-SET7 formen un complex durant G2.
7. Els nostres resultats suggereixen que MOF controla negativament la deposició d'H4K20me1 a través de dos mecanismes suplementaris: l'acetilació d'H4K16 i la regulació dels focus de PR-SET7 a la cromatina.
8. La desacetilació d'H4K16 durant mitosi determina la deposició d'H4K20me1 i té efectes sobre els nivells d'H4K20me2-3. Tot i que la dependència d'H4K20me1 en la regulació d'H4K20me3 haurà de ser estudiada en més detall en el futur.
9. SirT2 participa en el *checkpoint* de G2/M activat per la pèrdua de MOF. Un dels mecanismes implicats en aquest arrest del cicle cel·lular sembla ser la regulació de l'expressió gènica.
10. La deficiència tant de SirT2 com de MOF condueix a l'augment de la inestabilitat genòmica. No obstant, la doble pèrdua de SirT2 i MOF compensa la pèrdua individual de cadascun dels enzims en el manteniment de l'estabilitat del genoma.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Aasland, R., Stewart, A. F., & Gibson, T. (1996). The SANT domain: A putative DNA binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(3), 87–8.
- Abbas, T., Shibata, E., Park, J., Jha, S., Karnani, N., & Dutta, A. (2010). CRL4Cdt2 regulates cell proliferation and histone gene expression by targeting PR-Set7/Set8 for degradation. *Molecular Cell*, 40(1), 9–21.
- Afshar, G., & Murnane, J. P. (1999). Characterization of a human gene with sequence homology to *Saccharomyces cerevisiae* SIR2. *Gene*, 234, 161–8.
- Ahel, D., Ho, Z., Wiechens, N., Polo, S. E., Garcia-wilson, E., Ahel, I., Boulton, S. J. (2009). Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science*, 1240–4.
- Akhtar, A., & Becker, P. B. (2000). Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 5(2), 367–75.
- Akhtar, A., & Becker, P. B. (2001). The histone H4 acetyltransferase MOF uses a C2HC zinc finger for substrate recognition, 2(2), 113–8.
- Akhtar, A., Zink, D., & Becker, P. B. (2000). Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature*, 407(6802), 405–9.
- Allahverdi, A., Yang, R., Korolev, N., Fan, Y., Davey, C. A., Liu, C. F., & Nordenskiöld, L. (2011). The effects of histone H4 tail acetylations on cation-induced chromatin folding and self-association. *Nucleic Acids Research*, 39(5), 1680–91.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., & Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 315(1938), 786–94.
- Allis, C. D., Berger, S. L., Cote, J., Dent, S., Jenuwein, T., Kouzarides, T., ... Zhang, Y. (2007). New Nomenclature for Chromatin-Modifying Enzymes. *Cell*, 131(4), 633–6.
- Allis, C. D., Caparros, M. L., Jenuwein, T., & Reinberg, D. (2015). *Epigenetics*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Anderhub, S. J., Krämer, A., & Maier, B. (2012). Centrosome amplification in tumorigenesis. *Cancer Letters*, 322(1), 8–17.
- Augui, S., Nora, E. P., & Heard, E. (2011). Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nature Publishing Group*, 12(6), 429–42.
- Ausió, J. (2006). Histone variants-the structure behind the function. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 3, 228–43.
- Bajpe, P. K., Prahallad, A., Horlings, H., Nagtegaal, I., Beijersbergen, R., & Bernards, R. (2014). A chromatin modifier genetic screen identifies SIRT2 as a modulator of response to targeted therapies through the regulation of MEK kinase activity. *Oncoge*, 34(4), 531–6.
- Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421, 499–506.
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–95.
- Barber, M. F., Michishita-kioi, E., Xi, Y., Tasselli, L., Kioi, M., & Moqtaderi, Z. (2012). SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature*, 487(7405), 114–8.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T., Schones, D. E., & Wang, Z. (2007). Resource high-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129, 823–37.
- Bartek, J., Lukas, C., & Lukas, J. (2004). CHECKING ON DNA DAMAGE IN S PHASE. *Nature Reviews*, 5, 792–804.
- Bartek, J., & Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 738–47.
- Bartek, J., & Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 3, 421–9.

BIBLIOGRAFIA

- Bartke, T., Vermeulen, M., Xhemalce, B., Robson, S. C., Mann, M., & Kouzarides, T. (2010). Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell*, *143*(3), 470–84.
- Beck, D. B., Burton, A., Oda, H., Ziegler-Birling, C., Torres-Padilla, M. E., & Reinberg, D. (2012). The role of PR-Set7 in replication licensing depends on Suv4-20h. *Genes and Development*, *26*(23), 2580–9.
- Beckmann, K., Grskovic, M., Gebauer, F., & Hentze, M. W. (2005). A dual inhibitory mechanism restricts msl-2 mRNA translation for dosage compensation in *Drosophila*. *Cell*, *122*, 529–40.
- Berndsen, C. E., Albaugh, B. N., Tan, S., & Denu, J. M. (2007). Catalytic mechanism of a MYST family histone acetyltransferase. *Biochemistry*, *46*(3), 623–9.
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., ... Lander, E. S. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, *125*, 315–26.
- Black, J. C., Mosley, A., Kitada, T., Washburn, M., & Carey, M. (2008). The SIRT2 deacetylase regulates autoacetylation of p300. *Molecular Cell*, *32*(3), 449–55.
- Blagosklonny, M. V. (2007). Mitotic arrest and cell fate: why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell Cycle*, *6*(1), 70–4.
- Bobrowska, A., Donmez, G., Weiss, A., Guarente, L., & Bates, G. (2012). SIRT2 ablation has no effect on tubulin acetylation in brain, cholesterol biosynthesis or the progression of Huntington's disease phenotypes in vivo. *PLoS ONE*, *7*(4).
- Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J. S., & Kornberg, R. D. (2003). Nucleosomes unfold completely at a transcriptionally active promoter. *Molecular Cell*, *11*(6), 1587–98.
- Boros, J., Arnoult, N., Stroobant, V., Collet, J.-F., & Decottignies, A. (2014). Polycomb repressive complex 2 and H3K27me3 cooperate with H3K9 methylation to maintain heterochromatin protein 1 α at chromatin. *Molecular and Cellular Biology*, *34*(19), 3662–74.
- Borun, T. W., Pearson, D., & Paik, W. K. (1972). Studies of histone methylation during the HeLa S-3 cell cycle. *J. Biol. Chem.*, *247*, 4288–4298.
- Bostock, C. J., Prescott, D. M., & Kirkpatrick, J. B. (1971). An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G1-S border. *Experimental Cell Research*, *68*(1), 163–8.
- Botuyan, M. V., Lee, J., Ward, I. M., Kim, J. E., Thompson, J. R., Chen, J., & Mer, G. (2006). Structural Basis for the Methylation State-Specific Recognition of Histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA Repair. *Cell*, *127*(7), 1361–73.
- Bouazoune, K., Mitterweger, A., Längst, G., Imhof, A., Akhtar, A., Becker, P. B., & Brehm, A. (2002). The dMi-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization. *EMBO Journal*, *21*(10), 2430–40.
- Braunstein, M., Rose, B., Scott, G. H., Allis, C. D., & Broach, J. R. (1993). Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes*, *7*, 592–604.
- Brent, M. M., & Marmorstein, R. (2008). Ankyrin for methylated lysines. *Nature Structural & Molecular Biology*, *15*(3), 221–2.
- Broeck, A. Van Den, Brambilla, E., Moro-sibilot, D., Lantuejoul, S., Brambilla, C., Eymin, B., ... Gazzeri, S. (2008). Human cancer biology loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non small cell lung cancer. *Human Cancer Biology*, *14*(22), 7237–46.
- Brown, E. J. (2003). The ATR-independent DNA replication checkpoint. *Cell Cycle*, *2*(3), 188–9.
- Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., & Allis, C. D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homologue to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, *84*(6), 843–851.
- Bulavin, D. V., Higashimoto, Y., Popoff, I. J., Gaarde, W. A., Basrur, V., Potapova, O., ... Fornace, A. J. (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature*, *411*, 102–7.

BIBLIOGRAFIA

- Byun, T. S., Pacek, M., Yee, M. C., Walter, J., & Cimprich, K. A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Casper, Genes & Development*, *19*, 1040–52.
- Byvoet, P., Shepherd, G. R., Hardin, J. M., & Noland, J. B. (1972). The distribution and turnover of labelled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, *148*, 558–67.
- Cai, Y., Jin, J., Swanson, S. K., Cole, M. D., Choi, S. H., Florens, L., Conaway, R. C. (2010). Subunit composition and substrate specificity of a acetyltransferase distinct from the male-specific lethal (MSL), *285*(7), 4268–72.
- Cao, R., Tsukada, Y., & Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2Aubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell*, *20*, 845–54.
- Carmen, A. A., Milne, L., & Grunstein, M. (2002). Acetylation of the yeast histone H4 N terminus regulates its binding to heterochromatin protein SIR3. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(7), 4778–81.
- Caron, C., Boyault, C., & Khochbin, S. (2005). Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *BioEssays*, *27*, 408–15.
- Cayrou, C., Coulombe, P., Vigneron, A., Stanojic, S., Ganier, O., Peiffer, I., Me, M. (2011). Genome-scale analysis of metazoan replication origins reveals their organization in specific but flexible sites defined by conserved features. *Genome Research*, *21*, 1438–49.
- Centore, R. C., Havens, C. G., Manning, A. L., Li, J., Litman, R., Tse, A., Walter, J. C. (2011). CRL4 cdt2-mediated destruction of the histone methyltransferase Set8 prevents premature chromatin compaction in S phase. *Molecular Cell*, *40*(1), 22–33.
- Cesarini, E., D'Alfonso, A., & Camilloni, G. (2012). H4K16 acetylation affects recombination and ncRNA transcription at rDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(14), 2770–81.
- Chan, C. S., Rastelli, L., & Pirrotta, V. (1994). A Polycomb response element in the Ubx gene that determines an epigenetically inherited state of repression. *EMBO J.*, *13*, 2553–64.
- Chelmicki, T., Dündar, F., Turley, M. J., Aktas, T., Ramírez, F., Gendrel, A., Heard, E. (2014). MOF-associated complexes ensure stem cell identity and Xist repression, *4*, 1–31.
- Chen, A., Kleiman, F. E., Manley, J. L., Ouchi, T., & Pan, Z. Q. (2002). Autoubiquitination of the BRCA1- BARD1 RING ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem*, *277*, 22085–22092.
- Chen, Z., Ye, X., Tang, N., & Shen, S. (2014). The histone acetyltransferase hMOF acetylates Nrf2 and regulates anti-drug responses in human non-small cell lung cancer. *British Journal of Pharmacology*, *171*, 3196–211.
- Chin, C. F., & Yeong, F. M. (2010). Safeguarding entry into mitosis: the antephasal checkpoint. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(1), 22–32.
- Chowdhury, D., Xu, X., Zhong, X., Ahmed, F., Zhong, J., Liao, J., Lieberman, J. (2008). A PP4-phosphatase complex dephosphorylates g-H2AX generated during DNA replication. *Molecular Cell*, *31*(1), 33–46.
- Chuang, L. S. H., Ian, H. I., Koh, T. W., Ng, H. H., Xu, G. L., & Li, B. F. L. (1997). Human DNA (cytosine-5) methyltransferase PCNA complex as a target for p21(WAF1). *Science*, *277*, 1996–2000.
- Congdon, L. M., Houston, S. I., Veerappan, C. S., Spektor, T. M., & Rice, J. C. (2010). PR-Set7-mediated monomethylation of histone H4 lysine 20 at specific genomic regions induces transcriptional repression. *Journal of Cellular Biochemistry*, *110*(3), 609–19.
- Conrad, T., Cavalli, F. M. G., Holz, H., Hallacli, E., Kind, J., Ilik, I., Akhtar, A. (2012). The MOF chromobarrel domain controls genome-wide H4K16 acetylation and spreading of the MSL complex. *Developmental Cell*, *22*(3), 610–24.
- Costanzo, V., Robertson, K., Ying, C. Y., Kim, E., Avvedimento, E., Gottesman, M., Spermentale, M. (2000). Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage. *Molecular Cell*, *6*, 649–59.
- Costanzo, V., Shechter, D., Lupardus, P. J., Cimprich, K. A., Gottesman, M., & Gautier, J. (2003). An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage check- point that inhibits initiation of DNA replication. *Molecular Cell*, *11*, 203–13.

BIBLIOGRAFIA

- Cottarel, J., Frit, P., Bombarde, O., Salles, B., Negrel, A., Bernard, S., ... Calsou, P. (2013). A noncatalytic function of the ligation complex during nonhomologous end joining. *Journal of Cell Biology*, 200, 173–86.
- Daniels, M. J., Marson, A., & Venkitaraman, A. R. (2004). PML bodies control the nuclear dynamics and function of the CHFR mitotic checkpoint protein. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, 1114–21.
- Das, C., Lucia, M. S., Hansen, K. C., & Tyler, J. K. (2009). CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature*, 459(7243), 113–7.
- De La Cruz, X., Lois, S., Sánchez-Molina, S., & Martínez-Balbás, M. A. (2005). Do protein motifs read the histone code? *BioEssays*, 27(2), 164–75.
- Deken, X. De, Sande, J. Van, & Dumont, J. (2009). Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocrine-Related Cancer*, 16, 845–56.
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., & Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, 399(6735), 491–6.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., & Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Research*, 11(5), 1475–89.
- Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485(7398), 376–80.
- Doil, C., Mailand, N., Bekker-jensen, S., Menard, P., Larsen, D. H., Pepperkok, R., ... Lukas, C. (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell*, 136, 435–46.
- Donzelli, M., & Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO*, 4(9), 671–7.
- Dorigo, B., Schalch, T., Bystricky, K., & Richmond, T. J. (2003). Chromatin fiber folding: Requirement for the histone H4 N-terminal tail. *Journal of Molecular Biology*, 327(1), 85–96.
- Dou, Y., Milne, T. A., Tackett, A. J., Smith, E. R., Fukuda, A., Wysocka, J., ... Roeder, R. G. (2005). Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell*, 121, 873–85.
- Douglas, P., Zhong, J., Ye, R., Moorhead, G. B. G., Xu, X., & Lees-Miller, S. P. (2010). Protein Phosphatase 6 Interacts with the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit and Dephosphorylates -H2AX. *Molecular and Cellular Biology*, 30(6), 1368–81.
- Downs, J. a, Lowndes, N. F., & Jackson, S. P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature*, 408(6815), 1001–4.
- Dryden, S. C., Nahhas, F. A., Nowak, J. E., Goustin, A.-S., & Tainsky, M. A. (2003). Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 23(9), 3173–85.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J., Homo, J., Lepault, J., McDowell, A., & Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys*, 21(2), 129–228.
- Ekwall, K. (2005). Genome-wide analysis of HDAC function. *Trends in Cell Biology*, 21(11), 608–15.
- Eltsov, M., Maclellan, K. M., Maeshima, K., Frangakis, A. S., & Dubochet, J. (2008). Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), 19732–7.
- Eskandarian, H. A., Impens, F., Nahori, M., Soubigou, G., Coppée, J., Cossart, P., & Hamon, M. A. (2013). A role for SIRT2-dependent histone H3K18 deacetylation in bacterial infection. *Science*, 341, 525–41.
- Fahie, K., Hu, P., Swatkoski, S., Cotter, R. J., Zhang, Y., & Wolberger, C. (2009). Side chain specificity of ADP-ribosylation by a sirtuin. *FEBS Journal*, 276(23), 7159–76.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R. G., Bartek, J., & Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*, 410, 842–7.

BIBLIOGRAFIA

- Fan, W., & Luo, J. (2010). SIRT1 regulates UV-induced DNA repair through deacetylating XPA. *Molecular Cell*, 39(2), 247–58.
- Farrell, J. A., Shermoen, A. W., Yuan, K., & Farrell, P. H. O. (2012). Embryonic onset of late replication requires Cdc25 down-regulation. *Genes & Development*, 26, 714–25.
- Fatoba, S. T., & Okorokov, A. L. (2011). Human SIRT1 associates with mitotic chromatin and contributes to chromosomal condensation. *Cell Cycle*, 10(14), 2317–22.
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H. H., Erdjument-bromage, H., Tempst, P., Struhl, K., ... Carolina, N. (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Current Biology*, 12(02), 1052–8.
- Ferreira, H., Flaus, A., & Owen-hughes, T. (2007). Histone modifications influence the action of Snf2 family remodelling enzymes by different mechanisms. *Journal of Molecular Biology*, 374(3), 563–79.
- Finch, J. T., & Klug, a. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(6), 1897–901.
- Finnin, M. S., Donigian, J. R., & Pavletich, N. P. (2001). Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nature Structural Biology*, 8(7), 621–5.
- Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Allis, C. D. (2005). Regulation of HP1–chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, 438, 1116–22.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S. A., Kim, Y., Allis, C. D., & Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by polycomb and HP1 chromodomains. *Genes and Development*, 17(15), 1870–81.
- Fonseca, P., Steffen, P. A., Mu, S., Seiser, C., & Ringrose, L. (2012). In vivo Polycomb kinetics and mitotic chromatin binding distinguish stem cells from differentiated cells. *Genes and Development*, 26, 857–71.
- Forrest, A., & Gabrielli, B. (2001). Cdc25B activity is regulated by 14-3-3. *Oncogene*, 20, 4393–401.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-garea, A., Boix-chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics*, 37(4), 391–400.
- Frye, R. A. (2000). Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273, 793–798.
- Fu, H., Maunakea, A. K., Martin, M. M., Huang, L., Zhang, Y., Ryan, M., Aladjem, M. I. (2013). Methylation of histone H3 on lysine 79 associates with a group of replication origins and helps limit DNA replication once per cell cycle. *Plos Genetics*, 9(6), 1–14.
- Gal, J., Bang, Y., & Jin, H. (2012). Neurochemistry International SIRT2 interferes with autophagy-mediated degradation of protein aggregates in neuronal cells under proteasome inhibition. *Neurochemistry International*, 61(7), 992–1000.
- Galanty, Y., Belotserkovskaya, R., Coates, J., Polo, S., Miller, K. M., & Jackson, S. P. (2009). Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. *Nature*, 462(7275), 935–9.
- Gallant, P., & Nigg, E. A. (1992). Cyclin B2 Undergoes Cell Cycle-dependent Nuclear Translocation and, when Expressed as a Non-Destructible Mutant, Causes Mitotic Arrest in HeLa Cells. *The Journal of Cell Biology*, 117(1), 213–24.
- Gehani, S. S., Agrawal-singh, S., Dietrich, N., Christophersen, N. S., & Helin, K. (2010). Polycomb group protein displacement and gene activation through MSK-dependent. *Molecular Cell*, 39(6), 886–900.
- Gerchman, S. E., & Ramakrishnan, V. (1987). Chromatin higher-order structure studied by neutron scattering and scanning transmission electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84(22), 7802–6.
- Giet, R., & Glover, D. M. (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. *The Journal of Cell Biology*, 152(4), 669–81.

BIBLIOGRAFIA

- Goldknopf, I. L., Taylor, C. W., Baum, R. M., Yeoman, L. C., Olson, M. O., Prestayko, J. W., & Busch, H. (1975). Isolation and Characterization of Protein A24, a "Histone-like" Non-Histone Chromosomal Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, (18), 7182–7.
- Görisch, S. M., Wachsmuth, M., Tóth, K. F., Lichter, P., & Rippe, K. (2005). Histone acetylation increases chromatin accessibility. *Journal of Cell Science*, 118(24), 5825–34.
- Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Inagaki, M. (1999). Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(36), 25543–9.
- Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E. A., & Inagaki, M. (2002). Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes to Cells*, 7, 11–7.
- Gottlieb, T. M., & Jackson, S. P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement of DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*, 72, 131–42.
- Gottschalk, A. J., Timinszky, G., Kong, S. E., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S. K., ... Conaway, R. C. (2009). Poly(ADP-ribosyl)ation directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(33), 13770–4.
- Goutte-Gattat, D., Shuaib, M., Ouararhni, K., Gautier, T., & Skou, D. A. (2013). Phosphorylation of the CENP-A amino-terminus in mitotic centromeric chromatin is required for kinetochore function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(21), 8579–84.
- Greer, E. L., & Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews. Genetics*, 13(5), 343–57.
- Groth, A., Corpet, A., Cook, A. J. L., Roche, D., Bartek, J., Lukas, J., & Almouzni, G. (2007). Regulation of replication fork supply and demand. *Science*, 318, 1928–31.
- Gu, W., Szauter, P., & Lucchesi, J. C. (1998). Targeting of MOF, a putative histone acetyl transferase, to the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Dev Genet.*, 22(1), 56–64.
- Guarente, L. (1999). Diverse and dynamic functions of the Sir silencing complex. *Nature Genetics*, 23, 281–5.
- Günesdogan, U., Jäckle, H., & Herzig, A. (2014). Histone supply regulates S phase timing and cell cycle progression. *eLife*, 1–19.
- Gupta, A., Guerin-Peyrou, T. G., Sharma, G. G., Park, C., Agarwal, M., Ganju, R. K., Pandita, T. K. (2008). The mammalian ortholog of *Drosophila* MOF that acetylates histone H4 lysine 16 is essential for embryogenesis and oncogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 28(1), 397–409.
- Gupta, A., Hunt, C. R., Hegde, M. L., Chakraborty, S., Udayakumar, D., Horikoshi, N., Tyler, J. K. (2014). MOF phosphorylation by ATM regulates 53BP1-mediated double-strand break repair pathway choice. *Cell Reports*, 8(1), 177–89.
- Gupta, A., Sharma, G. G., Young, C. S. H., Agarwal, M., Smith, E. R., Paull, T. T., Pandita, T. K. (2005). Involvement of human MOF in ATM function. *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), 5292–305.
- Gurvich, N., Perna, F., Farina, A., Voza, F., Menendez, S., Hurwitz, J., & Nimer, S. D. (2010). L3MBTL1 polycomb protein, a candidate tumor suppressor in del(20q12) myeloid disorders, is essential for genome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(52), 22552–7.
- Haempel, K., Lange, H. W., & Birkofer, L. (1968). ε-N-trimethyllysine, a new amino acid in histones. *Die Naturwissenschaften*, 55,(37).
- Hagstrom, K. A., & Meyer, B. J. (2003). Condensin and cohesin: more than chromosome compactor and glue. *Nature Reviews Genetics*, 4, 520–34.
- Hahn, M., Dambacher, S., Dulev, S., Kuznetsova, A. Y., Eck, S., Wörz, S., Schotta, G. (2013). Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin. *Genes and Development*, 27(8), 859–72.
- Han, Y., Jin, Y., Kim, Y., Kang, B., Choi, H., Kim, D., Lee, K. (2008). Acetylation of Sirt2 by p300 attenuates its deacetylase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375, 576–80.

BIBLIOGRAFIA

- Hansen, R. S., Thomas, S., Sandstrom, R., Can, T. K., Thurman, R. E., & Weaver, M. (2010). Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(1), 139–44.
- Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M., & Hottiger, M. O. (2006). Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(3), 789–829.
- Hassan, A. H., Awad, S., Al-Natour, Z., Othman, S., Mustafa, F., & Rizvi, T. A. (2007). Selective recognition of acetylated histones by bromodomains in transcriptional co-activators. *The Biochemical Journal*, *402*(1), 125–33.
- Hassan, A. H., Neely, K. E., & Workman, J. L. (2001). Histone acetyltransferase complexes stabilize SWI/SNF binding to promoter nucleosomes. *Cell*, *104*(6), 817–27.
- Hayashi, M. T., Takahashi, T. S., Nakagawa, T., Nakayama, J., & Masukata, H. (2009). The heterochromatin protein Swi6 / HP1 activates replication origins at the pericentromeric region and silent mating-type locus. *Nature Cell Biology*, *11*(3), 357–62.
- Hayashi, S., & McMahon, A. P. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: A tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental Biology*, *244*, 305–18.
- He, H., Yu, F., Sun, C., & Luo, Y. (2011). CBP / p300 and SIRT1 are involved in transcriptional regulation of S-Phase specific histone genes. *PLoS ONE*, *6*(7).
- He, W., Newman, J. C., Wang, M. Z., Ho, L., & Verdin, E. (2012). Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *23*(9), 467–76.
- Hecker, C. M., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P., & Dikic, I. (2006). Specification of SUMO1 and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem*, *281*(23), 16117–27.
- Heitz, E. (1928). Das heterochromatin der moose. *I. Jahrb Wiss Botanik*, *69*, 762–818.
- Hendriks, I. A., D'Souza, R. C. J., Yang, B., Verlaan-de Vries, M., Mann, M., & Vertegaal, A. C. O. (2014). Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nature Structural & Molecular Biology*, *21*(10), 927–36.
- Henzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, *106*(6), 348–60.
- Hentsche, C. C., & Birnstiel, M. L. (1981). The organization and expression of histone gene families. *Cell*, *25*(2), 301–13.
- Hermann, A., Goyal, R., & Jeltsch, A. (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(46), 48350–9.
- Hilfiker, A., Hilfiker-Kleiner, D., Pannuti, A., & Lucchesi, J. C. (1997). mof, a putative acetyl transferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in *Drosophila*. *EMBO Journal*, *16*(8), 2054–60.
- Hirano, T. (2005). Condensins: organizing and segregating the genome. *Current Biology*, *15*, R265–75.
- Hiratsuka, M., Inoue, T., & Toda, T. et al. (2003). Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, *309*, 558–66.
- Hirota, T., Lipp, J. J., Toh, B., & Peters, J. (2005). Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*, *438*, 1176–80.
- Holliday, R. (2006). Epigenetics: A historical overview. *Epigenetics*, *1*(2), 76–80.
- Horikoshi, N., Kumar, P., Sharma, G. G., Chen, M., Hunt, C. R., Westover, K., Pandita, T. K. (2013). Genome-wide distribution of histone H4 Lysine 16 acetylation sites and their relationship to gene expression. *Genome Integrity*, *4*(1).

BIBLIOGRAFIA

- Horn, P. J., & Peterson, C. L. (2001). The bromodomain: a regulator of ATP-dependent chromatin remodeling? *Front Biosci.*, 6, 1019–23.
- Houston, S., McManus, K. J., Adams, M. M., Sims, J. K., Carpenter, P. B., Hendzel, M. J., & Rice, J. C. (2008). Catalytic function of the PR-Set7 histone H4 lysine 20 monomethyltransferase is essential for mitotic entry and genomic stability. *Journal of Biological Chemistry*, 283(28), 19478–88.
- Hsiao, K., & Mizzen, C. A. (2013). Histone H 4 deacetylation facilitates 53 BP 1 DNA damage signaling and double-strand break repair. *Journal of Molecular Cell Biology*, 5, 157–65.
- Hsu, J. Y., Sun, Z. W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D. K., Allis, C. D. (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, 102(3), 279–91.
- Huang, H., Sabari, B. R., Garcia, B. A., David Allis, C., & Zhao, Y. (2014). SnapShot: Histone modifications. *Cell*, 159(2), 458
- Huang, J., Huen, M. S. Y., Kim, H., Chung, C., Leung, Y., Glover, J. N. M., Chen, J. (2009). RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair. *Nature Cell Biology*, 11(5), 592–603.
- Hunt, C. R., Ramnarain, D., Horikoshi, N., Iyengar, P., Pandita, R. K., Shay, J. W., & Pandita, T. K. (2013). Histone modifications and DNA double-strand break repair after exposure to ionizing radiations. *Radiation Research*, 179(4), 383–92.
- Huyen, Y., Zgheib, O., Ditullio, R. A. J., Gorgoukis, V. G., Zacharatos, P., Petty, T. J., Halazonetis, T. S. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature*, 432, 406–11.
- Iizuka, M., Matsui, T., Takisawa, H., & Smith, M. M. (2006). Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Molecular and Cellular Biology*, 26(3), 1098–108.
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaerberlein, M., & Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403(6771), 795–800.
- Inoue, T., Hiratsuka, M., Osaki, M., Yamada, H., Kishimoto, I., Yamaguchi, S., Oshimura, M. (2007). SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene*, 26, 945–57.
- Ito, S., Fujiyama-nakamura, S., Kimura, S., Lim, J., Kamoshida, Y., Shiozaki-sato, Y., Kato, S. (2012). Epigenetic silencing of core histone genes by HERS in Drosophila. *Molecular Cell*, 45(4), 494–504.
- Jacobs, S. A., Taverna, S. D., Zhang, Y., Briggs, S. D., Li, J., Eissenberg, J. C., Khorasanizadeh, S. (2001). Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO Journal*, 20(18), 5232–41.
- Jasencakova, Z., Meister, A., Walter, J., Turner, B. M., & Schubert, I. (2000). Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. *The Plant Cell*, 12(11), 2087–100.
- Jeanmougin, F., Wurtz, J. M., Le Douarin, B., Chambon, P., & Losson, R. (1997). The bromodomain revisited. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(97), 151–3.
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293(5532), 1074–80.
- Jeong, A. L., & Yang, Y. (2013). PP2A function toward mitotic kinases and substrates during the cell cycle. *Biochemistry and Molecular Biology*, 46(6), 289–94.
- Jeppesen, P., & Turner, B. M. (1993). The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, 74(2), 281–89.
- Jha, M. N., Bamberg, J. R., & Bedford, J. S. (1994). Cell cycle arrest by colcemid differs in human normal and tumor cells. *Cancer Research*, 54, 5011–5.
- Jiang, W., Wang, S., Xiao, M., Lin, Y., Zhou, L., Lei, Q., Zhao, S. (2011). Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase. *Molecular Cell*, 43(1), 33–44.

BIBLIOGRAFIA

- Jin, B., Li, Y., & Robertson, K. D. (2011). DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes & Cancer*, 2(6), 607–17.
- Jin, J., Xie, X., Chen, C., Park, J. G., Stark, C., James, D. A., ... Pawson, T. (2009). Eukaryotic protein domains as functional units of cellular evolution. *Science Signaling*, 76.
- Jin, Y., Kim, Y., Kim, D., Baek, K., Yun, B., Yeo, C., & Lee, K. (2008). Sirt2 interacts with 14-3-3 b/c and down-regulates the activity of p53. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368, 690–5.
- Jing, E., Gesta, S., & Kahn, C. R. (2007). SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation. *Cell Metabolism*, 6(2), 105–14.
- Jørgensen, S., Eskildsen, M., Fugger, K., Hansen, L., Larsen, M. S. Y., Kousholt, A. N., Sørensen, C. S. (2011). SET8 is degraded via PCNA-coupled CRL4(CDT2) ubiquitylation in S phase and after UV irradiation. *Journal of Cell Biology*, 192(1), 43–54.
- Jørgensen, S., Schotta, G., & Sørensen, C. S. (2013). Histone H4 Lysine 20 methylation: Key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Research*, 41(5), 2797–806.
- Jungmichel, S., & Stucki, M. (2010). MDC1: The art of keeping things in focus. *Chromosoma*, 119, 337–49.
- Kakarougkas, A., & Jeggo, P. A. (2014). DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *Br J Radiol*, 87, 1–8.
- Kang, D., Chen, J., Wong, J., & Fang, G. (2002). The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition. *Journal of Cell Biology*, 156, 249–59.
- Kapoor-Vazirani, P., Kagey, J. D., & Vertino, P. M. (2011). SUV420H2-mediated H4K20 trimethylation enforces RNA polymerase II promoter-proximal pausing by blocking hMOF-dependent H4K16 acetylation. *Molecular and Cellular Biology*, 31(8), 1594–609.
- Karachentsev, D., Sarma, K., Reinberg, D., & Steward, R. (2005). PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis service PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes & Development*, 31(3), 431–5.
- Karin, M., & Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, 3, 221–7.
- Keller, C. I., & Akhtar, A. (2015). The MSL complex: juggling RNA-protein interactions for dosage compensation and beyond. *Current Opinion in Genetics & Development*, 31, 1–11.
- Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y., & Shkedy, D. (1999). Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26), 14973–77.
- Kim, H. S., Vassilopoulos, A., Wang, R. H., Lahusen, T., Xiao, Z., Xu, X., ... Deng, C. X. (2011). SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. *Cancer Cell*, 20(4), 487–99.
- Kim, J., Hake, S. B., & Roeder, R. G. (2005). The human homolog of yeast BRE1 functions as a transcriptional coactivator through direct activator interactions. *Mol Cell*, 20, 759–70.
- Kim, S. C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Zhao, Y. (2006). Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Molecular Cell*, 23(4), 607–18.
- Kim, S., Xu, B., & Kastan, M. B. (2002). Involvement of the cohesin protein, Smc1, in Atm-dependent and independent responses to DNA damage. *Genes & Development*, 16, 560–70.
- Kimura, A., Umehara, T., & Horikoshi, M. (2002). Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing. *Nat Genet*, 32(3), 370–7.
- Kind, J., Pagie, L., De Vries, S. S., Nahidiazar, L., Dey, S. S., Bienko, M., Van Steensel, B. (2015). Genome-wide maps of nuclear lamina interactions in single human cells. *Cell*, 163(1), 134–47.
- Kirmizis, A. et al. (2007). Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature*, 449, 928–32

BIBLIOGRAFIA

- Kohli, R. M., & Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, *502*(7472), 472–9.
- Kohlmaier, A., Savarese, F., Lachner, M., Martens, J., Jenuwein, T., & Wutz, A. (2004). A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation. *PLoS Biology*, *2*(7).
- Kornberg, R. D., & Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, *98*(3), 285–94.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, *128*(4), 693–705.
- Krishnan, V., Chow, M. Z. Y., Wang, Z., Zhang, L., Liu, B., Liu, X., & Zhou, Z. (2011). Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(30), 12325–30.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H. Y., & Dunphy, W. G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell*, *124*, 943–55.
- 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*, 116–20.
- Lam, K. C., Mühlfordt, F., Vaquerizas, J. M., Raja, S. J., Holz, H., Luscombe, N. M., & Akhtar, A. (2012). The NSL complex regulates housekeeping genes in Drosophila. *Plos Genetics*, *8*(6).
- Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., & Sternglanz, R. (2000). The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(11), 5807–11.
- Langmore, J. P., & Paulson, J. R. (1983). Low angle x-ray diffraction studies of chromatin structure in vivo and in isolated nuclei and metaphase chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, *96*(4), 1120–31.
- Larschan, E., Alekseyenko, A. A., Gortchakov, A. A., Peng, S., Li, B., Yang, P., Kuroda, M. I. (2007). MSL complex is attracted to genes marked by H3K36 trimethylation using a sequence-independent mechanism. *Molecular Cell*, *28*(1), 121–33.
- Lavender, J. S., Birley, A. J., Palmer, M. J., Kuroda, M. I., & Turner, B. M. (1994). Histone H4 acetylated at lysine 16 and proteins of the Drosophila dosage compensation pathway co-localize on the male X chromosome through mitosis. *Chromosome Research*, *2*(5), 398–404.
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A. A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Peters, A. H. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Current Biology*, *13*, 1192–200.
- Lennerz, V., Fatho, M., Gentilini, C., Frye, R. A., Lifke, A., Ferel, D., Wölfel, T. (2005). The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc Natl Acad Sci*, *102*(44).
- Li, J., Lin, Q., Wang, W., Wade, P., & Wong, J. (2002). Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression. *Genes & Development*, *16*, 687–92.
- Li, M., Zhao, L. I., Liu, J. U. N., Liu, A., Zeng, W., Luo, S., & Bai, X. (2009). Hydrogen Peroxide Induces G 2 Cell Cycle Arrest and Inhibits Cell Proliferation in Osteoblasts. *The Anatomical Record*, *1113*, 1107–13.
- Li, X., Corsa, C. A. S., Pan, P. W., Wu, L., Ferguson, D., Yu, X., ... Dou, Y. (2010). MOF and H4 K16 acetylation play important roles in DNA damage repair by modulating recruitment of DNA damage repair protein Mdc1. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(22), 5335–47.
- Li, X., Li, L., Pandey, R., Byun, J. S., Gardner, K., Qin, Z., & Dou, Y. (2012). The histone acetyltransferase MOF is a key regulator of the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell Stem Cell*, *11*(2), 163–78.
- Li, X., Wu, L., Corsa, C. A. S., Kunkel, S., & Dou, Y. (2009). Two mammalian MOF complexes regulate transcription activation by distinct mechanisms. *Mol Cell*, *36*(2), 290–301.
- Liang, F., & Jasin, M. (1996). Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. *Journal of Biological Chemistry*, *271*, 14405–11.

BIBLIOGRAFIA

- Lipmann, F. et al. (1947). Coenzyme for acetylation, a pantothenic acid derivative. *J. Biol. Chem.*, *167*, 869.
- Lipmann, F., & Kaplan, N. O. (1946). Report on a coenzyme for acetylation. *Fed. Proc.*, *5*, 145.
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, *462*(7271), 315–22.
- Liu, N., Zhang, R. U. I., Zhao, X., Su, J., Bian, X., Ni, J., Jin, J. (2013). A potential diagnostic marker for ovarian cancer: Involvement of the histone acetyltransferase, human males absent on the first. *Oncology Letters*, *6*, 393–400.
- Liu, P. Y., Xu, N., Malyukova, A., Scarlett, C. J., Sun, Y. T., Zhang, X. D., Koach, J. (2013). The histone deacetylase SIRT2 stabilizes Myc oncoproteins. *Cell Death and Differentiation*, *20*, 503–14.
- Liu, S., Shiotani, B., Lahiri, M., Maréchal, A., Tse, A., Leung, C. C., Zou, L. (2011). ATR autophosphorylation as a molecular switch for checkpoint activation. *Molecular Cell*, *43*, 192–202.
- Liu, W., Tanasa, B., Tyurina, O. V., Zhou, T. Y., Gassmann, R., Liu, W. T., Rosenfeld, M. G. (2010). PHF8 mediates histone H4 lysine 20 demethylation events involved in cell cycle progression. *Nature*, *466*(7305), 508–12.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2-DeltaDeltaCT method. *Methods*, *25*, 402–8.
- Lu, L., Li, L., Lv, X., Wu, X.S., Liu, D.P., & Liang, C.C. (2011). Modulations of hMOF autoacetylation by SIRT1 regulate hMOF recruitment and activities on the chromatin. *Cell Research*, *21*(8), 1182–95.
- Lubelsky, Y., Prinz, J. A., Denapoli, L., Li, Y., Belsky, J. A., & Macalpine, D. M. (2014). DNA replication and transcription programs respond to the same chromatin cues. *Genome Research*, *24*, 1102–14.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, *389*(6648), 251–60.
- Lukas, J., Lukas, C., & Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair*, *3*, 997–1007.
- Lukas, J., Lukas, C., & Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nature Publishing Group*, *13*(10), 1161–9.
- Lv, W. W., Wei, H. M., Wang, D. L., Ni, J. Q., & Sun, F. L. (2012). Depletion of histone deacetylase 3 antagonizes PI3K-mediated overgrowth through the acetylation of histone H4 at lysine 16. *Journal of Cell Science*, *125*(22), 5369–78.
- Ma, T., Van, Tine, B. A., Wei, Y., Garrett, M. D., Nelson, D., Harper, J. W. (2000). Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. *Genes & Development*, *14*(18), 2298–313.
- Ma, Y., Kanakousaki, K., & Buttitta, L. (2015). How the cell cycle impacts chromatin architecture and influences cell fate, *6*(19), 1–18.
- MacAlpine, H. K., Gordân, R., Powell, S. K., Hartemink, A. J., Macalpine, H. K., Gorda, R., & Macalpine, D. M. (2010). Drosophila ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading. *Genome Research*, *20*, 201–11.
- Macûrek, L., Lindqvist, a, Voets, O., Kool, J., Vos, H. R., & Medema, R. H. (2010). Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene*, *29*(15), 2281–2291.
- Maeshima, K., Imai, R., Tamura, S., & Nozaki, T. (2014). Chromatin as dynamic 10-nm fibers. *Chromosoma*, *123*(3), 225–37.
- Mailand, M., Podtelejnikov, A. V, Groth, A., Mann, M., Bartek, J., & Lukas, J. (2002). Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *EMBO Journal*, *21*, 5911–20.
- Martens, J. H. A., Sullivan, R. J. O., Braunschweig, U., Opravil, S., Radolf, M., Steinlein, P., & Jenuwein, T. (2005). The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *The EMBO Journal*, *24*(4), 800–12.

BIBLIOGRAFIA

- Martin, C., & Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature Rev.*, 6(11), 838–49.
- Matsusaka, T., & Pines, J. (2004). Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 166(4), 507–16.
- Mcglynn, L. M., Zino, S., Macdonald, A. I., Curle, J., Reilly, J. E., Mohammed, Z. M. A., Shiels, P. G. (2013). SIRT2: Tumour suppressor or tumour promoter in operable breast cancer? *European Journal of Cancer*, 50(2014), 290–301.
- Méchali, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nature Publishing Group*, 11, 728–38.
- Megee, P. C., Morgan, B. A., Mittman, B. A., & Smith, M. M. (1990). Genetic analysis of histone H4: essential role of lysines subject to reversible acetylation. *Science*, 247(4944), 841–5.
- Megee, P. C., Morgan, B. A., & Smith, M. M. (1995). Histone H4 and the maintenance of genome integrity. *Genes and Development*, 9(14), 1716–27.
- Meller, V. H., Gordadze, P. R., Park, Y., Chu, X., Stuckenholz, C., Kelley, R. L., & Kuroda, M. I. (2000). Ordered assembly of roX RNAs into MSL complexes on the dosage-compensated X chromosome in *Drosophila*. *Current Biology*, 10(3), 136–43.
- Mendjan, S., Taipale, M., Kind, J., Holz, H., Gebhardt, P., Schelder, M., ... Akhtar, A. (2006). Nuclear pore components are involved in the transcriptional regulation of dosage compensation in *Drosophila*. *Mol Cell*, 21, 811–23.
- Messner, S., Altmeyer, M., Zhao, H., Pozivil, A., Roschitzki, B., Gehrig, P., Hottiger, M. O. (2010). PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. *Nucleic Acids Research*, 38(19), 6350–62.
- Messner, S., & Hottiger, M. O. (2011). Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends in Cell Biology*, 21(9), 534–42.
- Michishita, E., Mccord, R. A., Barber, E., Kioi, M., Padilla-nash, H., Damian, M., Chua, K. F. (2008). SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*, 452, 492–7.
- Michishita, E., McCord, R. A., Boxer, L. D., Barber, M. F., Hong, T., Gozani, O., & Chua, K. F. (2009). Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6. *Cell Cycle* 8(16):2664–2666. *Cell Cycle*, 8(16), 2664–6.
- Mikhailov, A., Shinohara, M., & Rieder, C. L. (2004). Topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors delay the G2/M transition by triggering the p38 MAPK checkpoint pathway. *Journal of Cell Biology*, 166, 517–26.
- Millar, C. B., & Grunstein, M. (2006). Genome-wide patterns of histone modifications in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 7, 657–66.
- Miller, K. M., Tjeertes, J. V., Coates, J., Legube, G., Polo, S. E., Britton, S., & Jackson, S. P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(9), 1144–51.
- Min, J., Landry, J., Sternglanz, R., Xu, R., Brook, S., & York, N. (2001). Crystal structure of a SIR2 homolog – NAD complex. *Cell*, 105, 269–79.
- Ming, M., Shea, C. R., Guo, X., Li, X., Soltani, K., Han, W., & He, Y. (2010). Regulation of global genome nucleotide excision repair by SIRT1 through xeroderma pigmentosum C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(52), 22623–8.
- Minsky, N., Shema, E., Field, Y., Schuster, M., Segal, E., & Oren, M. (2008). Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nat. Cell Biol*, 10, 483–8.
- Miotto, B., & Struhl, K. (2008). HBO1 histone acetylase is a coactivator of the replication licensing factor Cdt1. *Genes & Development*, 22, 2633–8.
- Miotto, B., & Struhl, K. (2010). Article HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by geminin. *Molecular Cell*, 37, 57–66.
- Mochida, S., Ieko, S., Gannon, J., & Hunt, T. (2009). Regulated activity of PP2A-B55 delta is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts. *EMBO Journal*, 28, 2777–85.
- Moore, S. A., Ferhatoglu, Y., Jia, Y., Al-Jiab, R. A., & Scott, M. J. (2010). Structural and biochemical

BIBLIOGRAFIA

- studies on the chromo-barrel domain of male specific lethal 3 (MSL3) reveal a binding preference for mono- or dimethyllysine 20 on histone H4. *Journal of Biological Chemistry*, 285(52), 40879–90.
- Mordes, D. A., Glick, G. G., Zhao, R., & Cortez, D. (2008). TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain. *Genes & Development*, 22, 1478–89.
- Morgan, D. O. (1997). Cyclin-dependent kinases: Engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review Cell Developmental Biology*, 13, 261–91.
- Morris, J. R., Boutell, C., Keppler, M., Densham, R., Weekes, D., Alamshah, A., Solomon, E. (2009). The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. *Nature*, 462(7275), 886–90.
- Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., Alt, F. W. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, 124, 315–29.
- Murray, K. (1964). The occurrence of ϵ -N-methyl lysine in histones. *Biochemistry*, 3, 10–5.
- Musacchio, A., & Salmon, E. D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 379–93.
- Musselman, C. a., & Kutateladze, T. G. (2009). PHD fingers: epigenetic effectors and potential drug targets. *Molecular Interventions*, 9(6), 314–23.
- Nacerddine, K., Lehenbre, F., Bhaumik, M., Artus, J., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Dejean, A. (2005). The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev Cell*, 9(6), 769–79.
- Nahas, F., Dryden, S.C., Abrams, J., & Tainsky, M. A. (2007). Mutations in SIRT2 deacetylase which regulate enzymatic activity but not its interaction with HDAC6 and tubulin. *Molecular Cell Biochemistry*, 303, 221–30.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., & Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393(6683), 386–9.
- Neal, K.C., Pannuti, A., Smith, E.R., & Lucchesi, J.C. (2000). A new human member of the MYST family of histone acetyl transferases with high sequence similarity to Drosophila MOF. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1490(1-2), 170–4.
- Nielsen, P. R., Nietlispach, D., Buscaino, A., Warner, R. J., Akhtar, A., Murzin, A. G., Laue, E. D. (2005). Structure of the chromo barrel domain from the MOF acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(37), 32326–31.
- Nishioka, K., Rice, J.C., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Werner, J., Wang, Y., Reinberg, D. (2002). PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Molecular Cell*, 9(6), 1201–13.
- Noma, K., Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Zofall, M., Jia, S., Grewal, S.I.S. (2004). RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. *Nature Genetics*, 36(11), 1174–80.
- North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., Verdin, E., & Francisco, S. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Molecular Cell*, 11, 437–44.
- North, B.J., Rosenberg, M.A., Jeganathan, K.D., Hafner, A.V, Michan, S., Dai, J., Sinclair, D.A. (2014). SIRT 2 induces the checkpoint kinase BubR1 to increase lifespan. *The EMBO Journal*, 33(13), 1438–53.
- North, B.J., & Verdin, E. (2007a). Interphase Nucleo-Cytoplasmic Shuttling and Localization of SIRT2 during Mitosis. *PLoS ONE*, 2(8), 1–8.
- North, B.J., & Verdin, E. (2007b). Mitotic regulation of SIRT2 by cyclin-dependent kinase 1-dependent phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 19546–55.
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., & Weinert, T.A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA Damage and Replication Checkpoints. *Annual Review Genetics*, 36, 617–56.
- Oda, H., Hübner, M.R., Beck, D.B., Vermeulen, M., Spector, D.L., & Reinberg, D. (2011). Regulation of the histone H4 monomethylase PR-Set7 by CRL4Cdt2 mediated PCNA dependent degradation during DNA damage. *Molecular Cell*, 40(3), 364–76.

BIBLIOGRAFIA

- Oda, H., Okamoto, I., Murphy, N., Chu, J., Price, S.M., Shen, M.M., Reinberg, D. (2009). Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Molecular and Cellular Biology*, 29(8), 2278–95.
- Oh, Y.M., Kwon, Y.E., Kim, J.M., Bae, S.J., Lee, B.K., Yoo, S.J., Sehol, H.J. (2009). Chfr is linked to tumour metastasis through the downregulation of HDAC1. *Nature Cell Biology*, 11, 295–302.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247–57.
- Olins, A.L., Senior, M.B., & Olins, D.E. (1976). Ultrastructural features of chromatin nu bodies. *Journal of Cell Biology*, 68(3), 787–93.
- Ono, T., Fang, Y., Spector, D.L., & Hirano, T. (2004). Spatial and temporal regulation of condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 3296–308.
- Outeiro, T.F., Kontopoulos, E., Altmann, S.M., Kufareva, I., Strathearn, K.E., Amore, A.M., Kazantsev, A.G. (2007). Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5837), 516–9.
- Paik, W.K., & Kim, S. (1971). Protein methylation. *Science*, 174(4005), 114–9.
- Patel, D.J., & Wang, Z. (2013). Readout of Epigenetic Modifications, 82, 81–118.
- Peck, B., Chen, C., Ho, K., Fruscia, P. Di, Myatt, S. S., Coombes, R. C., Lam, E. W. (2010). SIRT inhibitors induce cell death and p53 acetylation through targeting both SIRT1 and SIRT2. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4, 844–56.
- Pei, H., Zhang, L., Luo, K., Qin, Y., Chesi, M., Fei, F., Lou, Z. (2011). MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature*, 470(7332), 124–8.
- Peixoto, P., Castronovo, V., Matheus, N., Polese, C., Peulen, O., Gonzalez, A., Dequiedt, F. (2012). HDAC5 is required for maintenance of pericentric heterochromatin, and controls cell-cycle progression and survival of human cancer cells. *Cell Death and Differentiation*, 19(7), 1239–52.
- Pellegrini, L., Yu, D. S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T. L., & Venkitaraman, A. R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51 – BRCA2 complex. *Nature*, 420, 287–93.
- Peng, L., Ling, H., Yuan, Z., Fang, B., Bloom, G., Fukasawa, K., Seto, E. (2012). SIRT1 negatively regulates the activities, functions, and protein levels of hMOF and TIP60. *Molecular and Cellular Biology*, 32(14), 2823–36.
- Perrod, S., Cockell, M. M., Laroche, T., Renauld, H., Ducrest, A., Bonnard, C., & Gasser, S. M. (2001). A cytosolic NAD-dependent deacetylase, Hst2p, can modulate nucleolar and telomeric silencing in yeast. *The EMBO Journal*, 20(1), 197–209.
- Pesavento, J. J., Yang, H., Kelleher, N. L., & Mizzen, C. A. (2008). Certain and progressive methylation of histone H4 at lysine 20 during the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 28(1), 468–86.
- Pfister, S., Rea, S., Taipale, M., Mendrzyk, F., Straub, B., Itrich, C., Lichter, P. (2008). The histone acetyltransferase hMOF is frequently downregulated in primary breast carcinoma and medulloblastoma and constitutes a biomarker for clinical outcome in medulloblastoma. *International Journal of Cancer*, 1207–13.
- Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle : the many faces of the APC/C. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 427–38.
- Pokholok, D. K., Harbison, C. T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N. M., Tong, I. L., Young, R. A. (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, 122(4), 517–27.
- Polevoda, B., & Sherman, F. (2002). The diversity of acetylated proteins. *Genome Biology*, 3.
- Polo, S. E., & Jackson, S. P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes and Development*, 25, 409–33.
- Qi, H. H., Sarkissian, M., Hu, G., Wang, Z., Bhattacharjee, A., Gordon, D. B., Shi, Y. (2010). Histone H4K20/H3K9 demethylase PHF8 regulates zebrafish brain and craniofacial development. *Nature*, 466(7305), 503–7.
- Raja, S. J., Charapitsa, I., Conrad, T., Vaquerizas, J.

BIBLIOGRAFIA

- M., Gebhardt, P., Holz, H., Akhtar, A. (2010). The nonspecific lethal complex is a transcriptional regulator in *Drosophila*. *Molecular Cell*, 38(6), 827–41.
- Ramer, M. D., Suman, E. S., & Duncke, B. P. (2013). Dbf4 and Cdc7 Proteins promote DNA replication through interactions with distinct Mcm2–7 protein subunits. *Journal of Biological Chemistry*.
- Ravens, S., Fournier, M., Ye, T., Stierle, M., Dembele, D., Chavant, V., & Tora, L. (2014). Mof-associated complexes have overlapping and unique roles in regulating pluripotency in embryonic stem cells and during differentiation. *eLife*, 3, 1–23.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O’Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z.-W., Schmid, M., ... Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406, 593–9.
- Régnier, V., Vagnarelli, P., Fukagawa, T., Zerjal, T., Burns, E., Trouche, D., ... Brown, W. (2005). CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Molecular and Cellular Biology*, 25(10), 3967–81.
- Reinhardt, H. C., & B, Y. M. (2013). Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 563–80.
- Rice, J. C., Nishioka, K., Sarma, K., Steward, R., Reinberg, D., & Allis, C. D. (2002). Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes & Development*, 2225–30.
- Rieder, C. L., & Salmon, E. D. (1998). The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends in Cell Biology*, 8(8), 310–8.
- Rizkallah, R., Alexander, K. E., & Hurt, M. M. (2011). Global mitotic phosphorylation of C2H2 zinc finger protein linker peptides. *Cell Cycle*, 10, 3327–36.
- Robinson, P. J. J., An, W., Routh, A., Martino, F., Chapman, L., Roeder, R. G., & Rhodes, D. (2008). ‘30nm’ chromatin fibre decompaction requires both H4-K16 acetylation and linker histone eviction Philip. *Journal of Molecular Biology*, 381(4).
- Robinson, P.J.J., Fairall, L., Huynh, V.A.T., & Rhodes, D. (2006). EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), 6506–11.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5858–68.
- Rothgiesser, K. M., Erener, S., Waibel, S., Lüscher, B., & Hottiger, M. O. (2010). SIRT2 regulates NF-κB-dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *Journal of Cell Science*, 123, 4251–8.
- Ruijter, A.J.M., Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., & Kuilenburg, A.B.P. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemistry Journal*, 370, 737–49.
- Sancar, A., Lindsey-boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K., & Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 39–85.
- Sanders, S. L., Portoso, M., Mata, J., Allshire, R. C., & Kouzarides, T. (2004). Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell*, 119, 603–14.
- Sapountzi, V., & Côté, J. (2011). MYST-family histone acetyltransferases: Beyond chromatin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(7), 1147–56.
- Sauve, A.A., & Schramm, V.L. (2003). Sir2 regulation by nicotinamide results from switching between base exchange and deacetylation chemistry. *Biochemistry Journal*, 42(31), 9249–56.
- Schindler, U., Beckmann, H., & Cashmore, A.R. (1993). HAT3.1, a novel Arabidopsis homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*.
- Schnitzler, G. R. (2001). Isolation of histones and nucleosomes cores from mammalian cells. In *Current protocols Molecular Biology* (p. Chapter 21: Unit 215).
- Schones, D. E., Cui, K. R., Cuddapah, S., Roh, T. Y., Barski, A., Wang, Z. B., Zhao, K. J. (2008).

BIBLIOGRAFIA

- Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell*, 132(5), 887–98.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes & Development*, 18, 1251–62.
- Schotta, G., Sengupta, R., Kubicek, S., Malin, S., Kauer, M., Callén, E., Jenuwein, T. (2008). A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes and Development*, 22(15), 2048–61.
- Schwaiger, M., Kohler, H., Oakeley, E.J., Stadler, M.B., & Schu, D. (2010). Heterochromatin protein 1 (HP1) modulates replication timing of the Drosophila genome. *Genome Research*, 20, 771–80.
- Schwaiger, M., Stadler, M. B., Bell, O., Kohler, H., Oakeley, E. J., & Schu, D. (2009). Chromatin state marks cell-type- and gender-specific replication of the Drosophila genome. *Genes & Development*, 23, 589–601.
- Schwer, B., Bunkenborg, J., Verdin, R.O., Andersen, J.S., & Verdin, E. (2006). Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10224–9.
- Scroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W.M., Petrini, J. H., Lichten, M. (2004). Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Current Biology*, 14, 1703–11.
- Serrano, L., Martínez-Redondo, P., Marazuela-Duque, A., Vazquez, B.N., Dooley, S.J., Voigt, P., Vaquero, A. (2013). The tumor suppressor SirT2 regulates cell cycle progression and genome stability by modulating the mitotic deposition of H4K20 methylation. *Genes and Development*, 27(6), 639–53.
- Shanbhag, N. M., Rafalska-Metcalf, I. U., Balane-Bolivar, C., Janicki, S. M., & Greenberg, R. A. (2010). ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell*, 141, 970–81.
- Shao, G., Lilli, D. R., Patterson-fortin, J., Coleman, K. A., Morrissey, D. E., & Greenberg, R. A. (2009). The Rap80-BRCC36 de-ubiquitinating enzyme complex antagonizes RNF8-Ubc13-dependent ubiquitination events at DNA double strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(9), 3166–71.
- Sharma, G. G., So, S., Gupta, A., Kumar, R., Cayrou, C., Avvakumov, N., Pandita, T. K. (2010). MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology*, 30(14), 3582–95.
- Sheikh, B. N., Bechtel-Walz, W., Lucci, J., Karpiuk, O., Hild, I., Hartleben, B., Akhtar, A. (2015). MOF maintains transcriptional programs regulating cellular stress response. *Oncogene*, 1–13.
- Sherr, C.J., & Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors : positive and negative regulators of G 1 -phase progression. *Genes & Development*, 13, 1501–12.
- Sherr, C.J., & Roberts, J.M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes & Development*, 2699–711.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstone, J.R., Cole, P.A., Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119, 941–53.
- Shiio, Y., & Eisenman, R.N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13225–30.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M. J., Davie, J. R., & Peterson, C. L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, 311(5762), 844–7.
- Sima, N., Bosch-presegué, L., & Vaquero, A. (2015). Sirtuins as a double-edged sword in cancer : from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Stress Response Pathways in cancer*, 75-106
- Smith, E.R., Cayrou, C., Huang, R., Lane, W. S., Côté, J., & Lucchesi, J.C. (2005). A human protein complex homologous to the Drosophila MSL complex is responsible for the majority of histone H4 acetylation at lysine 16. *Molecular and Cellular Biology*, 25(21), 9175–88.
- Smith, E.R., Pannuti, A., Gu, W., Steurnagel, A., Cook, R.G., Allis, C.D., & Lucchesi, J.C. (2000).

BIBLIOGRAFIA

- The drosophila MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation. *Molecular and Cellular Biology*, 20(1), 312–8.
- Sørensen, C. S., Syljua, R. G., Falck, J., Schroeder, T., & Ro, L. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell*, 3, 247–58.
- Starai, V. J., Celic, I., Cole, R. N., Boeke, J. D., & Escalante-Semerena, J. C. (2002). Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. *Science*, 298, 2390–92.
- Stewart, G. S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A. K., Kolas, N. K., Miller, E. S., Durocher, D. (2009). The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell*, 136, 420–34.
- Sudakin, V., Chan, G. K., & Yen, T. J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *Journal of Cell Biology*, 154, 925–36.
- Suematsu, T., Li, Y., Kojima, H., Nakajima, K., & Oshimura, M. (2014). Deacetylation of the mitotic checkpoint protein BubR1 at lysine 250 by SIRT2 and subsequent effects on BubR1 degradation during the prometaphase/anaphase transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(3), 588–94.
- Suka, N., Luo, K., & Grunstein, M. (2002). Sir2p and Sas2p opposingly regulate acetylation of yeast histone H4 lysine16 and spreading of heterochromatin. *Nat Genet*, 32(3), 378–83.
- Sun, B., Guo, S., Tang, Q., Li, C., Zeng, R., Xiong, Z., Ding, J. (2011). Regulation of the histone acetyltransferase activity of hMOF via autoacetylation of Lys274. *Cell Research*, 21(8), 1262–6.
- Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrapetov, M. K., Moreau, L. A., Whetstine, J. R., & Price, B. D. (2009). Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nature Cell Biology*, 11(11), 1376–83.
- Suzuki, K., & Koike, T. (2007). Mammalian Sir2-related protein (SIRT) 2-mediated modulation of resistance to axonal defeneration in slow wallerian degeneration mice: a crucial role of tubulin deacetylation. *Neuroscience*, 147, 599–612.
- Symington, L. S., & Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Review Genetics*, 45, 247–71.
- Taipale, M., Rea, S., Richter, K., Vilar, A., Lichter, P., Imhof, A., & Akhtar, A. (2005). hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 25(15), 6798–810.
- Tajul-Arifin, K., Teasdale, R., Ravasi, T., Hume, D. A., Arakawa, T., Carninci, P., Mattick, J. S. (2003). Identification and analysis of chromodomain-containing proteins encoded in the mouse transcriptome. *Genome Research*, 13(6 B), 1416–29.
- Talasz, H., Lindner, H. H., Sarg, B., & Helliger, W. (2005). Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38814–22.
- Tardat, M., Brustel, J., Kirsh, O., Lefebvre, C., Callanan, M., Sardet, C., & Julien, E. (2010). The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nature Cell Biology*, 12(11), 1086–93.
- Tardat, M., Murr, R., Herceg, Z., Sardet, C., & Julien, E. (2007). PR-Set7-dependent lysine methylation ensures genome replication and stability through S phase. *Journal of Cell Biology*, 179(7), 1413–1426.
- Tasselli, L., Xi, Y., Zheng, W., Tennen, R. I., Odrowaz, Z., Simeoni, F., Chua, K. F. (2016). SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18.
- Taylor, G.C.A., Eskeland, R., Pradeepa, M. M., & Bickmore, W. A. (2013). H4K16 acetylation marks active genes and enhancers of embryonic stem cells , but does not alter chromatin compaction. *Genome Research*, 2053–2065.
- Taylor, G., Eskeland, R., & Hekimoglu-balkan, B. (2013). H4K16 acetylation marks active genes and enhancers of embryonic stem cells , but does not alter chromatin compaction. *Genome Research*, 23, 2053–65.

BIBLIOGRAFIA

- Taylor, W. R., & Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20, 1803–15.
- Thomas, J. O., & Kornberg, R. D. (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(7), 2626–30.
- Thomas, T., Dixon, M. P., Kueh, A. J., & Voss, A. K. (2008). Mof (MYST1 or KAT8) is essential for progression of embryonic development past the blastocyst stage and required for normal chromatin architecture. *Molecular and Cellular Biology*, 28(16), 5093–105.
- Tillib, S., Petruk, S., Sedkov, Y., Kuzin, A., Fujioka, M., Goto, T., Mazo, A. (1999). Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrathorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 5189–202.
- Trojer, P., Li, G., Sims, R.J., Vaquero, A., Kalakonda, N., Boccuni, P., Reinberg, D. (2007). L3MBTL1, a Histone-Methylation-Dependent Chromatin Lock. *Cell*, 129(5), 915–28.
- Tsai, M.C., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J.K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., Chang, H.Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*, 329, 689–93.
- Tsang, A. W., & Escalante-semerena, J. C. (1998). CobB, a new member of the SIR2 family of eucaryotic regulatory proteins, is required to compensate for the lack of nicotinate mononucleotide: 5, 6-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase activity in cobT mutants during cobalamin biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(48), 31788–94.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A.P., & Hansen, J.C. (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Molecular and Cellular Biology*, 18(8), 4629–38.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P., & Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, 439, 811–6.
- Turner, B. M., Birley, A. J., & Lavender, J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell*, 69(2), 375–84.
- Turner, B. M., Neill, P. O., & Munks, J. L. (1998). Histone H4 acetylation Frequency of acetylation in *Drosophila* with site- at different sites defined by immunolabelling specific antibodies. *FEBS Letters*, 253(1), 141–45.
- Vakoc, C. R., Sachdeva, M. M., Wang, H., & Blobel, G. A. (2006). Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), 9185–95.
- Vaquero, A., Loyola, A., & Reinberg, D. (2003). The constantly changing face of chromatin. *Science of Aging Knowledge Environment: SAGE KE*, 14 RE4.
- Vaquero, A., & Reinberg, D. (2008). Sirtuins in biology and disease. In *Epigenetics in biology and medicine* (pp. 74–97).
- Vaquero, A., Scher, M. B., Dong, H. L., Sutton, A., Cheng, H. L., Alt, F. W., Reinberg, D. (2006). SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes and Development*, 20(10), 1256–61.
- Vaquero, A., Scher, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Serrano, L., & Reinberg, D. (2007). SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature*, 450(7168), 440–44.
- Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Reinberg, D. (2004). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Molecular Cell*, 16(1), 93–105.
- Vaquero, A., Sternglanz, R., & Reinberg, D. (2007). NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene*, 26(37), 5505–20.
- Vempati, R. K., Jayani, R. S., Notani, S., Sengupta, A., Galande, S., & Haldar, D. (2010). p300-mediated acetylation of Histone H3 Lysine 56 functions in DNA Damage response in mammals. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(37), 28553–64.

BIBLIOGRAFIA

- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S. I., & Moazed, D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, *303*, 672–6.
- Verdin, E., & Ott, M. (2015). 50 Years of Protein Acetylation: From Gene Regulation To Epigenetics, Metabolism and Beyond. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *16*(4), 258–64.
- Vermeulen, M., Eberl, H. C., Matarese, F., Marks, H., Denissov, S., Butter, F., Mann, M. (2010). Quantitative Interaction Proteomics and Genome-wide Profiling of Epigenetic Histone Marks and Their Readers. *Cell*, *142*(6), 967–80.
- Vidali, G., Gershey, E. L., & Allfrey, V. G. (1968). Chemical studies of histone acetylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *243*(19), 6361–66.
- Viré, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Fuks, F. (2005). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, *439*(7078), 871–4.
- Wang, B., Matsuoka, S., Carpenter, P. B., & Elledge, S. J. (2002). 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint. *Science*, *298*, 1435–38.
- Wang, F., Nguyen, M., Qin, F.X.F., & Tong, Q. (2007). SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell*, *6*(4), 505–14.
- Wang, J., Telese, F., Tan, Y., Li, W., Jin, C., He, X., Rosenfeld, M. G. (2015). LSD1n is an H4K20 demethylase regulating memory formation via transcriptional elongation control. *Nature Neuroscience*, *18*(9), 1256–64.
- Wang, W. K., Tereshko, V., Boccuni, P., MacGrogan, D., Nimer, S. D., & Patel, D. J. (2003). Malignant brain tumor repeats: A three-leaved propeller architecture with ligand/peptide binding pockets. *Structure*, *11*(7), 775–89.
- Wang, Y., Zhang, R., Wu, D., Lu, Z., Sun, W., Cai, Y., Jin, J. (2013). Epigenetic change in kidney tumor: downregulation of histone acetyltransferase MYST1 in human renal cell carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *32*(8), 1–8.
- Wang, Z., Zang, C., Cui, K., Schones, D. E., Barski, A., Peng, W., & Zhao, K. (2009). Resource genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell*, *138*(5), 1019–31.
- Watanabe, K., Iwabuchi, K., Sun, J., Tsuji, Y., Tani, T., Tokunaga, K., Tateishi, S. (2009). RAD18 promotes DNA double-strand break repair during G1 phase through chromatin retention of 53BP1. *Nucleic Acids Research*, *37*(7), 2176–93.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M. a., & Allis, C. D. (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, *97*, 99–109.
- West, M. H., & Bonner, W. M. (1880). Histone 2B can be modified by the attachment of ubiquitin. *Nucleic Acids Res.*, *8*, 4671–80.
- Wilkins, B. J., Rall, N. A., Ostwal, Y., Kruitwagen, T., Hiragami-Hamada, K., Winkler, M., Neumann, H. (2014). A cascade of histone modifications induces chromatin condensation in mitosis. *Science (New York, N.Y.)*, *343*(6166), 77–80.
- Wong, S., & Weber, J. D. (2007). Deacetylation of the retinoblastoma tumour suppressor protein by SIRT1. *Biochemistry Journal*, *407*(3), 451–60.
- Woodcock, C. L. F., Frado, L. L. Y., & Rattner, J. B. (1984). The higher-order structure of chromatin: Evidence for a helical ribbon arrangement. *Journal of Cell Biology*, *99*(1 I), 42–52.
- Woodcock, C. L., Grigoryev, S. A., Horowitz, R. A., & Whitaker, N. (1993). A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(19), 9021–9025.
- Wu, J. I. (2012). Diverse functions of ATP-dependent chromatin remodeling complexes in development and cancer. *Acta Biochim Biophys Sin*, *44*, 54–69.
- Wu, S., Wang, W., Kong, X., Congdon, L. M., Yokomori, K., Kirschner, M. W., & Rice, J. C. (2010). Dynamic regulation of the PR-Set7 histone methyltransferase is required for normal cell cycle progression, 2531–42.

BIBLIOGRAFIA

- Xiao, A., Li, H., Shechter, D., Ahn, S. H., Fabrizio, L. A., Erdjument-bromage, H., Allis, C. D. (2008). WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature*, *457*, 57–64.
- Xiao, Z., Chen, Z., Gunasekera, A. H., Sowin, T. J., Rosenberg, S. H., Fesik, S., & Zhang, H. (2003). Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *Journal of Biological Chemistry*, *278*, 21767–73.
- Xu, B., Kim, S., & Kastan, M. B. (2001). Involvement of Brca1 in S-phase and G(2)-phase checkpoints after ionizing irradiation. *Molecular and Cellular Biology*, *21*, 3445–50.
- Xu, Y., & Price, B. D. (2011). Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle*, *10*, 261–67.
- Xu, Y., Sun, Y., Jiang, X., Ayrapetov, M. K., Moskwa, P., Yang, S., Price, B. D. (2010). The p400 ATPase regulates nucleosome stability and chromatin ubiquitination during DNA repair. *Journal of Cell Biology*, *191*(1), 31–43.
- Yamagishi, Y., Sakuno, T., Shimura, M., & Watanabe, Y. (2008). Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature*, *455*, 251–6.
- Yan, Q., Dutt, S., Xu, R., Graves, K., Juszczynski, P., Manis, J. P., & Shipp, M. A. (2009). BBAP monoubiquitylates histone H4 at lysine 91 and selectively modulates the DNA damage response. *Molecular Cell*, *36*(1), 110–20.
- Yazdi, P. T., Wang, Y., Zhao, S., Patel, N., Lee, E. Y. P., & Qin, J. (2002). SMC1 is a downstream effector in the ATM / NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes & Development*, *16*, 571–82.
- Yeong, F. M., Hombauer, H., Wendt, K. S., Hirota, T., Mudrak, I., Mechtler, K., Ogris, E. (2003). Identification of a subunit of a novel Kleisin-B/SMC complex as a potential substrate of protein phosphatase 2A. *Current Biology*, *13*, 2058–64.
- Yin, Y., Yu, V. C., Zhu, G., & Chang, D. C. (2008). SET8 plays a role in controlling G1/S transition by blocking lysine acetylation in histone through binding to H4 N-terminal tail. *Cell Cycle*, *7*(10), 1423–32.
- Yu, F., Dai, R., Goh, S., Zheng, L., & Luo, Y. (2009). Logic of a mammalian metabolic cycle. *Cell Cycle*, *8*(5), 773–9.
- Yu, X., Minter-Dykhouse, K Malureanu, L., Zhao, W. M., Zhang, D., Merkle, C. J., Ward, I. M., Chen, J. (2005). Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation. *Nature Genetics*, *37*, 401–6.
- Yuan, H., Rossetto, D., Mellert, H., Dang, W., Srinivasan, M., Johnson, J., Marmorstein, R. (2012). MYST protein acetyltransferase activity requires active site lysine autoacetylation. *The EMBO Journal*, *31*(1), 58–70.
- Yuan, J., Pu, Mintie, Zhang, Z., & Lou, Z. (2009). Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals. *Cell Cycle*, *8*(11), 1747–53.
- Zachariae, W., & Nasmyth, K. (1999). Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes & Development*, *13*(16), 2039–58.
- Zee, B. M., Levin, R. S., Xu, B., LeRoy, G., Wingreen, N. S., & Garcia, B. A. (2010). In vivo residue-specific histone methylation dynamics. *J Biol Chem*, *285*(5).
- Zegerman, P., & Diffley, J.F.X. (2007). Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature*, *445*, 281–5.
- Zhang, H., Head, P. E., Daddacha, W., Park, S.-H., Li, X., Pan, Y., Yu, D.S. (2016). ATRIP Deacetylation by SIRT2 Drives ATR Checkpoint Activation by Promoting Binding to RPA-ssDNA. *Cell Reports*, *14*(6), 1435–1447.
- Zhang, H., Park, S., Pantazides, B. G., Karpiuk, O., Warren, M. D., Hardy, C. W., Johnsen, S. A. (2013). SIRT2 directs the replication stress response through CDK9 deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(33).
- Zhang, L., Hou, X., Ma, R., Moley, K., Schedl, T., & Wang, Q. (2014). Sirt2 functions in spindle organization and chromosome alignment in mouse oocyte meiosis. *The FASEB Journal*, *28*, 1435–45.

BIBLIOGRAFIA

- Zhao, Y., Yang, J., Liao, W., Liu, X., Zhang, H., Wang, S., Feng, J. (2010). Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. *Nature Cell Biology*, 12(7), 665–75.
- Zheng, C., Lu, X., Hansen, J. C., & Hayes, J. J. (2005). Salt-dependent intra- and internucleosomal interactions of the H3 tail domain in a model oligonucleosomal array. *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33552–7.
- Zhou, J., Yao, J., & Joshi, H. C. (2002). Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint. *Journal of Cell Science*, 115(18), 3547–55.
- Zhou, W., Zhu, P., Wang, J., Pascual, G., Ohgi, K. A., Lozach, J., Rosenfeld, M. G. (2008). Histone represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Mol Cell*, (29), 69–80.
- Zhou, Y., Schmitz, K., Mayer, C., Yuan, X., Akhtar, A., & Grummt, I. (2009). Reversible acetylation of the chromatin remodelling complex NoRC is required for non-coding RNA- dependent silencing. *Nature Cell Biology*, 11(8), 1010–6.
- Zhu, Pao, G. M., Huynh, A. M., Suh, H., Tonnu, N., Nederlof, P. M., Verma, I. M. (2011). BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature*, 477, 179–84.
- Zhu, B., Zheng, Y., Pham, A. D., Mandal, S. S., Erdjument-Bromage, H Tempst, P., & Reinberg, D. (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol Cell*, 20, 601–11.
- Zimmermann, M., & de Lange, T. (2013). 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends in Cell Biology*.
- Zippo, A., Serafini, R., Rocchigiani, M., Pennacchini, S., Krepelova, A., & Oliviero, S. (2009). Histone Crosstalk between H3S10ph and H4K16ac Generates a Histone Code that Mediates Transcription Elongation. *Cell*, 138(6), 1122–36.
- Zou, L., & Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 300, 1542–48.