

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS ENZIMÁTICOS
HISTONA ACETILTRANSFERASA EN SACCHAROMYCES
CEREVISIAE MEDIANTE EL USO DE MUTANTES EN
GENES IMPLICADOS EN LA ACETILACIÓN DE HISTONAS

ANA BELÉN RUIZ GARCÍA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 13 de Abril de 1999 davant un tribunal format per:

- D. Luis Franco Vera
- D. Pere Suau León
- D. Enrique Palacian Gil
- D^a. Elena I. Georgieva
- D. Benjamín Piña Capo

Va ser dirigida per:
D. Ramón Sendra Pérez

©Copyright: Servei de Publicacions
Ana Belén Ruiz García

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6504-6

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

CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS ENZIMÁTICOS
HISTONA ACETILTRANSFERASA EN
SACCHAROMYCES CEREVISIAE MEDIANTE EL USO DE
MUTANTES EN GENES IMPLICADOS EN LA
ACETILACIÓN DE HISTONAS



Javier J. González Calvo

A mis padres

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo. En primer lugar doy las gracias a todos los miembros de mi grupo. A Ramón, mi director de tesis, con quien considero un privilegio haber trabajado, y por supuesto a Titín y a Mercè, por su constante apoyo personal y científico. También tengo muchas cosas que agradecerle a Jose Enrique, que a efectos de mi tesis siempre ha formado parte del grupo, a Elena y a Susana. Nada hubiera sido igual sin toda la gente que me ha rodeado durante estos años y que, además de ayudarme en el trabajo, ha contribuido a crear un buen ambiente, algo que yo valoro mucho. Por ello le doy las gracias a “las niñas”, Pepa, Mar, Tere y Maite, gente maravillosa con la que es inevitable sonreír, a Paco por su paciencia inagotable con mi ignorancia informática, a Esteban, que siempre ha hecho una fiesta de todo, incluidas las recogidas de sangre, y en general a todos los becarios, a los que siempre recordaré con mucho cariño. No puedo olvidarme de mis amigos, Ana, Mónica y Oscar, que además me ha ayudado con la portada de la tesis, y por supuesto Hermi, mi compañera de tesis y mi mejor amiga. A mucha gente que no he nombrado le agradezco la ayuda que me ha prestado en algún momento.

Por último, tengo que agradecer todo el apoyo que he recibido de las personas más cercanas a mí, Jose y mi familia. Mis padres siempre han puesto los intereses de sus hijos por encima de los propios. A ellos se lo debo todo.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Acetilación de histonas	1
1.2. La acetilación de histonas y el ensamblaje de la cromatina	3
1.3. Acetilación de histonas y heterocromatina	6
1.4. La acetilación y la regulación de la transcripción	10
1.5. Actividades HAT en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2. Materiales y Métodos	23
2.1. Material biológico	23
2.2. Medios de cultivo	25
2.2.1. Medios de cultivo para levadura	25
2.2.2. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	26
2.3. Manipulación del material biológico	26
2.3.1. Transformación de levadura	26
2.3.2. Transformación de <i>E. coli</i>	27
2.3.3. Aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i>	28
2.4. Obtención de sustratos	29
2.4.1. Aislamiento de núcleos de eritrocito de pollo	29
2.4.2. Obtención de histonas de eritrocito de pollo	29
2.4.3. Obtención de oligonucleosomas de eritrocito de pollo	30
2.5. Obtención de extractos crudos con actividad enzimática HAT	31
2.5.1. Extractos totales	31
2.5.2. Extractos nucleares	32
2.5.3. Extractos citoplásmaticos	33
2.6. Fraccionamiento de las actividades HAT presentes en levadura	34
2.6.1. Cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharosa	34
2.6.2. Cromatografía de afinidad en Ni ²⁺ -Sepharosa	35
2.7. Ensayo de actividad HAT	35
2.7.1. Ensayos en medio líquido	35
2.7.2. Ensayos en gel	37
2.8. Estimación de masas moleculares de los complejos con actividad HAT	38
2.9. Métodos analíticos	39
2.9.1. Electroforesis de proteínas	39
2.9.2. Electroforesis de DNA	39
2.9.3. Técnicas espectrofotométricas	40

3. Resultados y Discusión	41
3.1. Actividades HAT en levadura	41
3.2. Actividad HAT dependiente de <i>GCN5</i>	45
3.2.1. Análisis de cepas de levadura mutantes en <i>GCN5</i>	45
3.2.2. Caracterización del complejo HAT A2	49
3.2.2.1. Estimación de la masa molecular del complejo HAT A2	49
3.2.2.2. Análisis de cepas de levadura mutantes en <i>ADA2</i> y <i>ADA3</i>	51
3.3. Complejos con actividad HAT dependientes de <i>HAT1</i>	60
3.3.1. Análisis de cepas de levadura mutantes en <i>HAT1</i>	60
3.3.2. Caracterización de los complejos con actividad HAT dependientes de Hat1p	65
3.3.2.1. Análisis de cepas de levadura mutantes en HAT2	65
3.3.2.2. Localización subcelular de los complejos HAT A3 y HAT B	67
3.3.2.3. Especificidad de los complejos HAT A3 y HAT B	69
3.3.2.4. Masa molecular de los complejos HAT A3 y HAT B	72
3.3.2.5. Actividad del complejo HAT A3 frente a nucleosomas	74
3.4. Identificación de una nueva actividad HAT en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
3.5. Análisis de cepas de levadura mutantes en <i>TAF130</i> y <i>ESAI</i>	82
4. Conclusiones	89
5. Bibliografía	91

Abreviaturas

BSA	seroalbúmina bovina
CoA	coenzima A
E64	trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidinio)butano
EDTA	ácido etilendiamino-tetraacético
HAT	histona acetiltransferasa
HD	histona desacetilasa
MOPS	ácido 4-morfolin-propanosulfónico
PCA	ácido perclórico
PMSF	fenilmetil-sulfonilfluoruro
RNasa	ribonucleasa
SDS	dodecilsulfato sódico
TCA	ácido tricloroacético
Tris	tris(hidroximetil)aminometano

1. Introducción

1.1. Acetilación de histonas

El genoma de los organismos eucariotas se encuentra organizado en forma de cromatina, una estructura nucleoproteica cuya unidad básica es el nucleosoma. Un nucleosoma contiene aproximadamente 200 pb de DNA ensamblados alrededor de un octámero de proteínas, formado por dos moléculas de cada una de las histonas internas, H2A, H2B, H3 y H4. El nucleosoma se completa con una molécula de la histona H1 que queda en el exterior de la estructura. La sucesión de nucleosomas, conectados por el DNA espaciador, origina el denominado nucleofilamento, cuya estructura recuerda a las cuentas de un collar. El plegamiento posterior del nucleofilamento conduce a estructuras de orden superior de la cromatina.

Las cuatro histonas internas son proteínas pequeñas (11 a 16 kDa) de carácter básico, altamente conservadas a lo largo de la evolución. Su estructura se divide claramente en dos dominios, una región N-terminal no estructurada y un dominio C-terminal que presenta un plegamiento característico. Este plegamiento se basa en la presencia de un motivo de estructura terciaria, denominado plegamiento de histona o "*histone fold*", que se repite en las cuatro histonas internas, a pesar de la ausencia de similitud de secuencia entre ellas. La conservación evolutiva del dominio C-terminal de las histonas parece lógica, ya que el "*histone fold*" está implicado en la organización del nucleosoma, a través de interacciones histona-histona e histona-DNA. Sin embargo, también están muy conservados los extremos N-terminales de las histonas, sobre todo en las histonas H3 y H4. Estas regiones no estructuradas contienen la mayoría de los sitios de modificación postraduccional y su papel en la señalización y regulación de diferentes procesos celulares ha sido objeto de estudio durante muchos años.

Una de las modificaciones postraduccionales que sufren las histonas es la acetilación reversible de residuos de lisina, descubierta por Allfrey *et al.* en 1964. Esta modificación afecta a determinados residuos de lisina de los extremos N-terminales de las cuatro histonas internas. En concreto, se ha encontrado esta modificación *in vivo* en las lisinas 5, 8, 12 y 16 de la histona H4; lisinas 9, 14, 18, 23 y 27 de la histona H3; lisinas 12, 15, 20 y 24 de la histona H2B y por último en las lisinas 5 y 9 de la histona H2A (van Holde, 1988; Kuo *et al.*, 1996). Durante los últimos años numerosos estudios han indicado la importancia de esta modificación en la regulación de diferentes procesos celulares. Así, el estado de acetilación de las histonas ha sido implicado en procesos de ensamblaje y maduración de la cromatina (Smith y Stillman, 1991; Verreault *et al.*, 1996). La acetilación de histonas también se ha relacionado con la regulación de la transcripción. Se ha demostrado que las zonas transcripcionalmente activas generalmente contienen histonas hiperacetiladas mientras que las regiones inactivas presentan niveles reducidos de acetilación (Turner *et al.*, 1992; Braunstein *et al.*, 1993). Mutaciones en residuos susceptibles de acetilación en las histonas H3 y H4 alteran la expresión de determinados genes (Durrin *et al.*, 1991; Mann y Grunstein, 1992) y la progresión normal del ciclo celular (Megee *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998). Además, la acetilación favorece la unión de determinados factores de transcripción a moldes nucleosomales (Vettese-Dadey *et al.*, 1996; Ng *et al.*, 1997; Nightingale *et al.*, 1998). Por último, los residuos acetilables de las histonas han sido implicados en el silenciamiento transcripcional y el mantenimiento de la heterocromatina (Thompson *et al.*, 1994; Braunstein *et al.*, 1996) a través de interacciones con factores *trans* moduladas por el estado de acetilación (Hecht *et al.*, 1995).

El papel de la acetilación de histonas en la regulación de la expresión génica ha cobrado importancia por los recientes descubrimientos de que proteínas con actividad histona acetiltransferasa (HAT) e histona

desacetilasa (HD) habían sido previamente identificadas como reguladores transcripcionales (revisado en Grunstein, 1997; Struhl, 1998).

Las histonas sufren otras modificaciones postraduccionales como son la fosforilación, la metilación, la ADP-ribosilación y la ubiquitinación (van Holde, 1988). A su vez el DNA también es susceptible de metilaciones, una modificación que ha sido relacionada recientemente con la acetilación de histonas, al encontrarse actividades HD asociadas a una proteína que reconoce secuencias de DNA metiladas (Nan *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1998). Todas estas modificaciones de la cromatina, y sus implicaciones en el metabolismo de la célula, hacen cada vez más evidente que la cromatina no es simplemente una estructura que sirve para compactar el DNA en el núcleo, sino que supone un sustrato activo para la maquinaria celular y una fuente importante de regulación de los procesos biológicos.

1.2. La acetilación de histonas y el ensamblaje de la cromatina

El ensamblaje de nucleosomas durante la replicación del DNA es un proceso que ocurre en dos etapas. En una primera etapa se depositan las histonas H3 y H4 recién sintetizadas (Worcel *et al.*, 1978; Smith y Stillman, 1991), completándose la estructura nucleosomal por la adición, a este intermediario tetramérico, de dímeros de histonas H2A y H2B (Jackson, 1990).

El nexo de unión entre la acetilación de residuos de lisina en los extremos N-terminales de las histonas y el ensamblaje de la cromatina se estableció con la purificación y caracterización, en células humanas, de un factor de ensamblaje de cromatina llamado CAF-I ("chromatin assembly factor I"). Este factor es un complejo multiproteico formado por tres proteínas (p50, p60 y p150), y fue aislado por su capacidad de promover el ensamblaje de nucleosomas sobre DNA en replicación *in vitro* (Stillman,

1986; Smith y Stillman, 1989). Los mismos autores demostraron la incapacidad de CAF-I de ensamblar histonas aisladas de núcleos (Smith y Stillman, 1991) y la atribuyeron a modificaciones postraduccionales que establecen diferencias entre histonas cromosomales y las histonas recién sintetizadas.

Estudios posteriores han llevado a la identificación de complejos de ensamblaje de cromatina ("chromatin assembly complex"), tanto en células humanas (Verreault et al., 1996) como en *Saccharomyces cerevisiae* (Kaufman et al., 1997), que contienen el factor de ensamblaje CAF-I y moléculas de las histonas H3 y H4 con patrones de acetilación específicos. La histona H3 presente en el complejo es una mezcla de dos isoformas, no acetilada y monoacetilada. En el caso de la histona H4, se han encontrado poblaciones de moléculas que comprenden desde formas no acetiladas hasta formas triacetiladas, siendo las posiciones 5, 8 y 12 los residuos de lisina modificados. Estos resultados son consistentes con el patrón de acetilación que presentan las histonas inmediatamente después de su síntesis. La histona H4 recién sintetizada se encuentra acetilada principalmente en las posiciones 5 y 12, mientras que la histona H3 presenta acetilación en la posición 9 (Sobel et al., 1995; Kuo et al., 1996). Por otro lado, se ha demostrado que la función de estos residuos en el ensamblaje de la cromatina es redundante. Según los estudios realizados por Ling et al. (1996), la delección de cualquiera de los extremos N-terminales de H3 o H4 no afecta al ensamblaje, siendo incluso estos dominios intercambiables entre las dos histonas. Sólo la delección simultánea del extremo N-terminal de ambas histonas, o la mutación de las tres posiciones de H4 acetiladas en el complejo de ensamblaje (lisinas 5, 8 y 12), y en ausencia del extremo N-terminal de H3, bloquea el ensamblaje de nucleosomas durante la replicación del DNA y, por tanto, la viabilidad celular (Ling et al., 1996; Ma et al., 1998).

Otra prueba de la relación existente entre la acetilación de histonas y su ensamblaje en la cromatina es el hecho de que p48, el homólogo en levadura de la subunidad p50 del complejo CAF-I (Verreault *et al.*, 1996; Kaufman *et al.*, 1997), forma parte de una familia de proteínas entre las que se encuentran otras dos directamente relacionadas con la acetilación de histonas. Una de ellas es la subunidad Hat2p de una histona acetiltransferasa de levadura. Este enzima, cuya subunidad catalítica es la proteína Hat1, constituye la principal actividad HAT citoplásmica en *Saccharomyces* (Parthun *et al.*, 1996). La otra proteína relacionada con p48 copurifica con HDAC1, la primera actividad histona desacetilasa aislada de células humanas (Taunton *et al.*, 1996).

Con todos estos datos se ha sugerido que CAF-I funciona como una carabina molecular encargada de dirigir las histonas recién sintetizadas a las horquillas de replicación, actuando la acetilación de histonas como una señal en este proceso (Kaufman *et al.*, 1995). Sin embargo, hay resultados experimentales que demuestran que CAF-I también está implicado en el reensamblaje de nucleosomas necesario después de algunos procesos de reparación del DNA (Gaillard *et al.*, 1996), consistente con la sensibilidad a luz ultravioleta que provoca la mutación de algunas subunidades del complejo (Kaufman *et al.*, 1997). También se ha propuesto para CAF-I un papel en el mantenimiento de la estructura heterocromatínica en levadura (Enomoto *et al.*, 1997; Kaufman *et al.*, 1997; Enomoto y Berman, 1998), un proceso que también está íntimamente relacionado con la acetilación de histonas.

1.3. Acetilación de histonas y heterocromatina

La heterocromatina, definida citológicamente como las regiones del genoma que permanecen condensadas a lo largo del ciclo celular, se encuentra localizada en los telómeros y centrómeros de los eucariotas superiores, a menudo asociada con la periferia nuclear. Esta región del genoma se replica de forma tardía en la fase S del ciclo celular, y los genes situados en ella presentan un fenómeno de represión transcripcional epigenética, ya que el silenciamiento es específico de posición y no de secuencia. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, aunque no es posible la detección citológica de heterocromatina, se ha demostrado, mediante estudios genéticos, la existencia de regiones de tipo heterocromatínico, donde los genes se encuentran reprimidos (Thompson *et al.*, 1993). Estas regiones están situadas en las proximidades de los telómeros y en los *loci HML* y *HMR*, que contienen genes relacionados con la conjugación. Diversos experimentos con anticuerpos frente a histonas acetiladas han puesto de manifiesto diferencias en el estado de acetilación de las histonas en las regiones silenciadas y en las zonas transcripcionalmente activas. En *Drosophila* se encuentra un mayor nivel de acetilación en la lisina 16 de la histona H4 en el cromosoma X de machos, transcripcionalmente activo, mientras que en las regiones heterocromatínicas esta posición está hipoacetilada (Turner *et al.*, 1992). Estudios similares en levadura han demostrado la presencia de histonas hipoacetiladas en las regiones silenciadas (Braunstein *et al.*, 1993). Desde que se estableció esta relación entre la modificación de las histonas y el silenciamiento, se han llevado a cabo numerosos estudios bioquímicos y genéticos con el fin de esclarecer el papel de la acetilación en esta represión transcripcional.

En levadura, el silenciamiento transcripcional, tanto en los telómeros como en los *loci HM*, depende de una serie de factores proteicos entre los que se encuentran las proteínas Rap1, Sir2, Sir3, Sir4 y las histonas H3 y H4

(Aparicio *et al.*, 1991; Kurtz y Shore, 1991; Kyrion *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1994; revisado por Lustig, 1998). El primer nexo entre el silenciamiento y la estructura de la cromatina se estableció con el descubrimiento de que ciertas mutaciones en las histonas H3 y H4 provocaban la desrepresión de los *loci HM* y de genes situados en los telómeros (Kayne *et al.*, 1988; Johnson *et al.*, 1990, 1992; Megee *et al.*, 1990; Park y Szostak, 1990; Aparicio *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1994). Estos resultados sugerían que el silenciamiento venía determinado por la formación de una estructura reprimida de la cromatina, similar a la heterocromatina de eucariotas superiores. La implicación de las histonas H3 y H4 en esta represión parecía ser específica, ya que la delección de los extremos N-terminales de las histonas H2A y H2B no afectaba al silenciamiento (Kayne *et al.*, 1988; Thompson *et al.*, 1994). Un punto de apoyo muy importante para esta hipótesis fueron los resultados obtenidos por Hecht *et al.* (1995) que demostraron una interacción física entre los factores de silenciamiento Sir3p y Sir4p y las histonas H3 y H4. De nuevo, la especificidad de este fenómeno está demostrada por la ausencia de interacción entre estos factores y las histonas H2A y H2B.

Diversos experimentos de mutagénesis en los residuos acetilables de las histonas H3 y H4 han demostrado el papel de éstos en el silenciamiento transcripcional. La sustitución de la lisina 16 de la histona H4 por un residuo de glutamina, imitando el estado acetilado, provoca una fuerte desrepresión del gen *URA3* en el telómero y de los *loci HM* (Aparicio *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1994; Hecht *et al.*, 1995). Por otra parte, la mutación simultánea a arginina (imitando el estado no acetilado) de los residuos 5, 8 y 12 suprime parcialmente la desrepresión causada en los *loci HM* por la sustitución de la lisina 16 a glutamina, lo que establece una redundancia en la función de estos residuos en el silenciamiento (Hecht *et al.*, 1995). De hecho, sólo la combinación de la sustitución de la lisina 16

con la delección de los residuos 4-14 de la histona H4, impiden la interacción *in vitro* de la histona con la proteína Sir3.

Experimentos similares con H3 han demostrado el requerimiento de los residuos acetilables de esta histona para el silenciamiento (Thompson *et al.*, 1994). Sin embargo la redundancia entre las lisinas de H3 es mayor que para el caso de H4, ya que sólo la mutación simultánea de 3 ó 4 de los residuos 9, 14, 18 y 23 provoca desrepresión, aunque en cualquier caso menor a la observada cuando se muta H4. Estos mismos autores han demostrado la existencia de un sinergismo en la desrepresión entre las histonas H3 y H4, al mutar simultáneamente los residuos acetilables de ambas histonas. Todos estos resultados, y los obtenidos por Braunstein *et al.* (1996), establecen el requerimiento para el silenciamiento de un patrón específico de acetilación de las histonas (lisina 16 desacetilada y lisina 12 acetilada en la histona H4; hipoacetilación en la histona H3), capaz de modular la interacción de éstas con los factores de silenciamiento.

Existen datos adicionales que relacionan la acetilación de histonas con el silenciamiento transcripcional en regiones heterocromáticas. Así, en levadura, se ha demostrado el papel de las proteínas Hda1 y Rpd3, dos actividades HD, en el silenciamiento (Rundlett *et al.*, 1996; De Rubertis *et al.*, 1996; Vannier *et al.*, 1996). Generalmente se ha correlacionado la hipoacetilación de histonas con la represión transcripcional y, por tanto, se esperaría que la mutación de genes codificantes de proteínas con actividad HD aumentara el estado de acetilación de las histonas, provocando así desrepresión en las zonas silenciadas. En efecto, la delección tanto de *HDA1* como de *RPD3* produce un aumento en el nivel de acetilación de las histonas H3 y H4 *in vivo*. Sin embargo, en ambos casos, la mutación provoca un aumento de represión en genes situados en el telómero y en los *loci HM* (Rundlett *et al.*, 1996; Vannier *et al.*, 1996). Resultados similares se han encontrado analizando el efecto de la mutación del gen *RPD3* en

Drosophila sobre la expresión de un gen en el centrómero (De Rubertis *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que, más que un bajo nivel de acetilación, sería un patrón específico de acetilación el que estaría implicado en la formación de la heterocromatina. Esta idea parece estar apoyada por el hecho de que la delección de *RPD3* en levadura aumenta los niveles de acetilación de la histona H4 específicamente en las posiciones 5 y 12 (Rundlett *et al.*, 1996). No se descarta, sin embargo, un efecto indirecto a través de la expresión alterada de factores de silenciamiento, como las proteínas Sir.

El establecimiento de un patrón de acetilación específico en la heterocromatina requeriría la existencia de enzimas histona acetiltransferasa que generasen y mantuvieran dicho patrón. Se ha demostrado que Hat1p, la subunidad catalítica de la principal actividad HAT citoplásmica de levadura, tiene capacidad para acetilar las lisinas 5 y 12 de la histona H4, aunque la actividad citoplásmica aislada de extractos de levadura, acetila principalmente la posición 12 (Kleff *et al.*, 1995; Parthun *et al.*, 1996). Aunque este enzima sería un buen candidato para esta función, no se ha demostrado su implicación en el silenciamiento transcripcional. Otras proteínas, que presentan similitud con histona acetiltransferasas, se han relacionado con el silenciamiento, las proteínas Sas2 y Sas3 (Reifsnnyder *et al.*, 1996; Ehrenhofer-Murray *et al.*, 1997). Sin embargo, a pesar de su similitud de secuencia, no se ha demostrado que estas proteínas posean actividad HAT.

Un punto importante de regulación en la formación de estructuras heterocromatínicas sería el ensamblaje selectivo de histonas acetiladas específicamente en posiciones particulares. Un candidato para esta maquinaria de reconocimiento y ensamblaje de histonas acetiladas específicamente es CAF-I. Este factor de ensamblaje también ha sido implicado en el fenómeno de silenciamiento (Enomoto *et al.*, 1997;

Kaufman *et al.*, 1997; Enomoto y Berman, 1998; Kaufman *et al.*, 1998; Quián *et al.*, 1998), ya que mutaciones en las subunidades que lo componen producen desrepresión, tanto en los telómeros como en los *loci HM*.

1.4. La acetilación y la regulación de la transcripción

Durante los últimos años, numerosos estudios han establecido una fuerte correlación entre la acetilación de histonas y la actividad transcripcional. Por una parte, experimentos de inmunoprecipitación de cromatina, con anticuerpos que reconocen histonas acetiladas, han demostrado la presencia de histonas hiperacetiladas en regiones de la cromatina transcripcionalmente activas (Hebbes *et al.*, 1988; 1994). Por otra parte, diversos experimentos han demostrado un efecto directo de la acetilación sobre la expresión de determinados genes, bien estudiando la hiperacetilación producida por el tratamiento con inhibidores de histona desacetilasa (Yoshida *et al.*, 1995; Bartsch *et al.*, 1996), o mediante mutagénesis de los residuos de lisina susceptibles de acetilación de las histonas H3 y H4 (Durrin *et al.*, 1991; Mann y Grunstein, 1992). El papel de la acetilación en la regulación de la transcripción se ha visto reforzado con los recientes descubrimientos de que proteínas con actividad HAT y HD habían sido previamente descritas como reguladores transcripcionales.

La proteína p55 de *Tetrahymena* fue la primera actividad HAT nuclear aislada (Brownell y Allis, 1995). El descubrimiento de esta proteína llevó a la identificación, por similitud de secuencia, del gen *GCN5* de levadura, cuyo producto posee también actividad HAT (Brownell *et al.*, 1996). *GCN5* había sido previamente descrito como un regulador transcripcional requerido para la expresión de diversos genes (Georgakopoulos y Thireos, 1992). De hecho, resultados recientes han puesto de manifiesto que la actividad HAT de Gcn5p se requiere para su función reguladora de la transcripción y para la progresión normal del ciclo

celular (Candau *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Kuo *et al.*, 1998).

Otra actividad HAT identificada y relacionada con la transcripción es la proteína TAF_{II}130 (Mizzen *et al.*, 1996) en levadura y sus homólogos en *Drosophila* (TAF_{II}230) y humanos (TAF_{II}250). Esta proteína es una subunidad del factor de transcripción TFIID, implicado en el reconocimiento y la unión a la caja TATA en el ensamblaje del complejo de iniciación de la transcripción.

En mamíferos se han encontrado varias proteínas con actividad HAT, cuya función en la regulación de la transcripción está demostrada. Una actividad HAT humana, p/CAF, fue aislada por similitud de secuencia con *GCN5* (Yang *et al.*, 1996), a pesar de lo cual no es el homólogo estructural de *GCN5* en humanos (Candau *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997). Esta proteína está implicada en la regulación del ciclo celular.

p300 y CBP son dos proteínas de mamíferos, estrechamente relacionadas, descritas como coactivadores transcripcionales que funcionan como adaptadores para muchos factores de transcripción (Janknecht y Hunter, 1996). Tanto p300 como CBP poseen actividad HAT (Bannister y Kouzarides, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996). En el caso de CBP se ha demostrado una relación directa entre su actividad enzimática y la activación transcripcional (Martínez-Balbás *et al.*, 1998).

Otros dos coactivadores humanos han sido identificados como histona acetiltransferasas, las proteínas ACTR y SRC-1 (Chen *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1997), requeridas para la activación transcripcional inducida por receptores nucleares de hormonas. p300/CBP (Yang *et al.*, 1996) y también los coactivadores ACTR y SRC-1 (Chen *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1997) interactúan con p/CAF, lo que indica la existencia de grandes complejos reguladores de la transcripción con múltiples actividades HAT.

Por último, se ha demostrado la actividad HAT del supresor de tumores *BRCA2*. Esta proteína está implicada en el control de la transcripción, en mecanismos de reparación del DNA y en la apoptosis celular (Siddique *et al.*, 1998).

En la Tabla 1 se enumeran, en forma resumida, las distintas proteínas con actividad HAT que se conocen hasta el momento.

HAT	Organismo	Función	Referencias
HAT1	levadura	desconocida	Kleff <i>et al.</i> , 1995
GCN5	levadura	coactivador transcripcional	Brownell <i>et al.</i> , 1996
TAF _{II} 130 (TAF _{II} 230, TAF _{II} 250)	levadura (<i>Drosophila</i> , humanos)	componente TFIID	Mizzen <i>et al.</i> , 1996
p300/CBP	mamíferos	coactivadores transcripcionales	Bannister y Kouzarides, 1997 Ogryzco <i>et al.</i> , 1996
p/CAF	humanos	regulador transcripcional (interacciona con p300/CBP)	Yang <i>et al.</i> , 1996
ACTR y SRC-1	humanos	coactivadores transcripcionales	Chen <i>et al.</i> , 1997 Spencer <i>et al.</i> , 1997
ESA1	levadura	desconocida	Smith <i>et al.</i> , 1998
BRCA2	humanos	supresor de tumores	Siddique <i>et al.</i> , 1998

Tabla 1. Proteínas con actividad HAT identificadas.

HDAC1 fue la primera histona desacetilasa identificada, aislada de células humanas (Taunton *et al.*, 1996). El homólogo en levadura de esta proteína es el producto del gen *RPD3*, que ya había sido identificado como

un regulador transcripcional (Vidal y Gaber, 1991). Otra actividad HD aislada en mamíferos es HDAC2 (Yang *et al.*, 1996). Esta proteína, que presenta similitud con HDAC1 y con Rpd3p, se aisló por su capacidad para interactuar con el factor de transcripción YY1. Estas tres actividades HD han sido implicadas en la represión transcripcional mediada por la proteína de levadura Sin3 y sus homólogos en mamíferos, mSin3A y mSin3B (Nagy *et al.*, 1997; Hassig *et al.*, 1997; Laherty *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Kadosh y Struhl, 1997; Alland *et al.*, 1997; Heinzel *et al.*, 1997; revisado en Pazin y Kadonaga, 1997). Sin3p había sido previamente identificado como un represor global de la transcripción (Nasmyth *et al.*, 1987; Sternberg *et al.*, 1987). Así, aunque Sin3p no es una proteína de unión a DNA, puede reprimir la transcripción cuando es dirigida a promotores a través de un dominio de unión a DNA heterólogo. En los complejos recientemente descritos, que contienen Sin3p y Rpd3p, existen proteínas de unión a DNA como Ume6p y heterodímeros Mad-Max (revisado en Pazin y Kadonaga, 1997). Por lo tanto, se piensa que a través de interacciones con Sin3p estos factores transcripcionales dirigen las actividades HD a los promotores, reprimiendo éstas la transcripción. Estos resultados establecen un papel importante de la desacetilación de histonas en la represión transcripcional. Sin embargo, deben existir mecanismos alternativos que operan en estos complejos con actividad HD, ya que proteínas mutantes Rpd3, deficientes en actividad HD, son capaces de interactuar con Sin3p y producir *in vivo* cierto grado de represión transcripcional en levadura (Kadosh y Struhl, 1998a).

Recientemente se ha demostrado que la represión transcripcional en los promotores regulados por *UME6* implica desacetilación de las lisinas 5 y 12 de la histona H4, mediada por Rpd3p (Kadosh y Struhl, 1998b; Rundlett *et al.*, 1998). La modificación se produce en una zona concreta del promotor, fuera de la caja TATA, y afecta sólo a uno o dos nucleosomas.

Aunque todos estos datos establecen un papel importante de la acetilación de histonas en la regulación de la transcripción, se desconocen los mecanismos por los cuales esta modificación de histonas interviene en dicha regulación. La estructura del nucleosoma no sufre cambios importantes como consecuencia de la acetilación de las histonas (Bauer *et al.*, 1994; García-Ramírez *et al.*, 1995). Algunos autores han propuesto que la acetilación produce una disminución en el grado de superenrollamiento del DNA, provocando una mayor exposición de las secuencias reguladoras a los factores transcripcionales (Norton *et al.*, 1989; 1990). Sin embargo, en condiciones fisiológicas, parece que la acetilación no afecta de forma importante a la topología del DNA (Lutter *et al.*, 1992; Nightingale *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha visto que los extremos N-terminales de las histonas interaccionan con factores reguladores, y que estas interacciones pueden ser moduladas por su estado de acetilación (Hech *et al.*, 1995; Edmondson *et al.*, 1996). En este sentido, se han llevado a cabo numerosos estudios sobre el efecto de la acetilación de histonas en la accesibilidad de factores transcripcionales a moldes nucleosomales. Mientras que para algunos de los factores estudiados se ha encontrado que la acetilación favorece el acceso al DNA (Vettese-Dadey *et al.*, 1996; Ng *et al.*, 1997; Nightingale *et al.*, 1998), para otros factores los resultados obtenidos por distintos grupos son contradictorios (Lee *et al.*, 1993; Imbalzano *et al.*, 1994; Godde *et al.*, 1995; Howe y Ausió, 1998). Por último, también ha sido propuesto que la acetilación provocaría una desestabilización de estructuras de orden superior de la cromatina, facilitando el acceso a los factores de transcripción (Juan *et al.*, 1994; García-Ramírez *et al.*, 1995; Mutskov *et al.*, 1998; Tse *et al.*, 1998a). Algunos de estos autores han propuesto un mecanismo de desestabilización indirecto a través de una afinidad reducida de la histona H1 por los nucleosomas acetilados (Juan *et al.*, 1994). Sin embargo, estudios recientes no han encontrado diferencias en la interacción

de la histona H1 con nucleosomas, dependientes de la acetilación (Ura *et al.*, 1997; Krajewski y Becker, 1998). La estructura del nucleosoma resuelta recientemente por cristalización y difracción de rayos X a 2.8 Å de resolución (Luger *et al.*, 1997), apoya un papel para la acetilación en la modulación de interacciones de los extremos N-terminales de las histonas con nucleosomas adyacentes, lo que podría tener consecuencias en la estabilidad de estructuras de orden superior de la cromatina.

Estudios recientes demuestran la influencia de la acetilación de histonas en la actividad de SWI/SNF, un complejo multiproteico que remodela la cromatina (Logie *et al.*, 1999). Aunque el complejo es capaz de remodelar nucleosomas reconstituidos con histonas hiperacetiladas y tripsinizadas, la presencia de estas histonas limita la capacidad del complejo para disociarse de la cromatina y llevar a cabo múltiples rondas de remodelado. Los autores proponen que la presencia de patrones específicos de acetilación podría regular la actividad de SWI/SNF.

Algunas de las actividades HAT identificadas son capaces de acetilar, no sólo histonas, sino también otras proteínas que forman parte de la maquinaria transcripcional de la célula. Las dos subunidades del factor de transcripción TFIIF son acetiladas por p/CAF y p300/CBP, y la subunidad β del factor TFIIE es acetilada por p/CAF, p300/CBP y TAF_{II}250 (Imhof *et al.*, 1997). Además p300 acetila *in vitro* a la proteína supresora de tumores p53. El sitio de acetilación se encuentra en el dominio de unión a DNA de este factor transcripcional, y la modificación estimula su unión al DNA (Gu y Roeder, 1997). Estos resultados sugieren que la acetilación podría ser un mecanismo general en la regulación de la transcripción y que la función de las histona acetiltransferasas en este proceso podría suponer no sólo la modificación de la cromatina sino también de la maquinaria transcripcional de la célula.

1.5. Actividades HAT en *Saccharomyces cerevisiae*

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado hasta el momento los genes de cuatro proteínas con actividad HAT. Dos de estas proteínas, Gcn5p y TAF_{II}130, eran funciones ya conocidas, relacionadas con la transcripción génica. Los otros dos genes, *HAT1* y *ESAI*, eran desconocidos hasta el momento de su identificación como histona acetiltransferasas.

El producto del gen *HAT1* fue la primera proteína con actividad HAT identificada en levadura (Kleff *et al.*, 1995). *HAT1* se aisló analizando la acetilación de un péptido, correspondiente a los aminoácidos 1 a 28 de la histona H4, en una serie de mutantes de levadura. Posteriormente se demostró que Hat1p es la subunidad catalítica de la principal actividad HAT citoplásmica en levadura (Parthun *et al.*, 1996), un complejo enzimático en el que también se encuentra la proteína Hat2. Hat2p forma parte de una familia de proteínas (Neer *et al.*, 1994) entre las que se encuentran una subunidad del factor de ensamblaje de cromatina, CAF-I (Verreault *et al.*, 1996) y las proteínas RbAp46 y RbAp48, que se asocian con dos actividades HD humanas (Taunton *et al.*, 1996; Hassig *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997). Hat2p estimula la actividad de Hat1p, probablemente aumentando su afinidad por la histona H4 (Parthun *et al.*, 1996). Los estudios de especificidad realizados con Hat1p en levadura demuestran que el enzima acetila principalmente la lisina 12 de la histona H4 libre (Kleff *et al.*, 1995; Parthun *et al.*, 1996), aunque la proteína recombinante expresada en bacterias es capaz de acetilar las lisinas 5 y 12 de la histona H4 y probablemente la lisina 5 de H2A (Parthun *et al.*, 1996). Los homólogos de Hat1p, tanto en humanos como en maíz, muestran una especificidad similar (Verreault *et al.*, 1997; Kolle *et al.*, 1998). Recientemente se ha resuelto la estructura cristalina de gran parte de la proteína Hat1 de levadura formando un complejo con acetil coenzima A (Dutnall *et al.*, 1998).

Basándose en la especificidad de este enzima y en su localización subcelular, se han propuesto para esta actividad HAT funciones relacionadas con el ensamblaje de la cromatina tras la replicación del DNA (Kleff *et al.*, 1995; Eberharter *et al.*, 1996; Dutnall *et al.*, 1998) y con la generación del patrón de acetilación observado en la heterocromatina (Grunstein, 1997). Así, Hat1p acetilaría a la histona H4 en el citoplasma, previamente a su transporte al núcleo y su ensamblaje a la cromatina. Sin embargo, se ha demostrado la presencia de Hat1p en núcleos de células humanas (Verreault *et al.*, 1997), lo que sugiere funciones adicionales para este enzima. Por otro lado, el hecho de que las deleciones de los genes *HAT1* y *HAT2* en levadura no tengan consecuencias para la viabilidad de la célula (Kleff *et al.*, 1995; Parthun *et al.*, 1996), hace suponer la existencia de otras actividades HAT con funciones redundantes.

GCN5 (“general control nonrepressed”), clonado como un coactivador transcripcional (Georgakopoulos y Thireos, 1992), fue identificado como histona acetiltransferasa por su similitud con la proteína p55, una actividad HAT nuclear de *Tetrahymena* (Brownell y Allis, 1995; Brownell *et al.*, 1996). Estudios genéticos sobre *GCN5* habían puesto de manifiesto su función en la regulación transcripcional de algunos genes. Gcn5p, con las proteínas Ada2 y Ada3, parece funcionar como un adaptador entre algunos activadores de unión a DNA y la maquinaria basal de transcripción (Marcus *et al.*, 1994; Horiuchi *et al.*, 1995; Candau y Berger, 1996). Por lo tanto, el descubrimiento de la capacidad de acetilar histonas de esta proteína ha supuesto un nexo importante entre la acetilación de histonas y la regulación transcripcional. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que la actividad HAT de Gcn5p se requiere para su función activadora de la transcripción, y que las histonas son el sustrato fisiológico de este enzima (Candau *et al.*, 1997; Kuo *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Además, se ha demostrado que el defecto de

crecimiento que produce la delección de este gen en levadura está asociado a una alteración en la regulación del ciclo celular (Zhang *et al.*, 1998), encontrándose una mayor proporción de células en la fase G2.

Los estudios de especificidad realizados con la proteína Gcn5p recombinante la definían como un enzima específico por los residuos de lisina 14 de la histona H3 y 8 y 16 de la histona H4 (Kuo *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha demostrado que *GCN5* se requiere para la acetilación *in vivo* de las lisinas 9, 14 y 18 de la histona H3 (Zhang *et al.*, 1998). Además, los primeros estudios sobre la proteína recombinante mostraban una incapacidad del enzima para acetilar sustratos nucleosomales (Kuo *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Esta discrepancia entre la especificidad de la proteína recombinante y la del enzima nativo ha sido atribuida a la asociación del enzima con otros factores proteicos, ya que Gcn5p se ha encontrado en levadura formando parte de diferentes complejos multiproteicos denominados ADA y SAGA (Grant *et al.*, 1997). Ambos complejos contienen, además de Gcn5p, a las proteínas Ada2 y Ada3, pero SAGA incluye también proteínas Spt relacionadas con el factor de transcripción basal TBP ("TATA-binding protein"), así como algunos de los factores asociados a TBP (TAF_{II}S), distintos de TAF_{II}130 (Grant *et al.*, 1998). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que, en condiciones adecuadas de ensayo, Gcn5p recombinante acetila *in vitro* las lisinas 9, 14 y 18 de la histona H3 (Tse *et al.*, 1998b). Además el enzima recombinante también es capaz de modificar la histona H3 en sustratos nucleosomales, en ausencia de otras proteínas (Tse *et al.*, 1998b). También se ha demostrado la capacidad de acetilar sustratos nucleosomales del homólogo de Gcn5p en ratón (Xu *et al.*, 1998).

GCN5 está relacionado funcionalmente con un complejo que remodela la cromatina, el complejo SWI/SNF (Pollard y Peterson, 1997; Roberts y Winston, 1997). Aunque no hay interacción física entre Gcn5p y

el complejo SWI/SNF, los datos obtenidos sugieren que funcionan de una manera sinérgica en la activación transcripcional de ciertos genes. De hecho, algunas mutaciones en el complejo SAGA, en el que se encuentra Gcn5p como subunidad catalítica, son letales en combinación con mutaciones en el complejo SWI/SNF (Roberts y Winston, 1997). El complejo SWI/SNF podría facilitar el acceso de Gcn5p a los promotores, alcanzándose así el máximo de actividad transcripcional.

El gen *ESAI* ("essential SAS2-related acetyltransferase") fue identificado por su alta similitud con *mof* y Tip60 (Hilfiker *et al.*, 1997), dos miembros de la familia MYST de proteínas. Este grupo de proteínas, implicadas en el control de la transcripción, se encuentra dentro de la superfamilia GNAT, N-acetiltransferasas relacionadas con *GCN5* (Neuwald y Landsman, 1997). *mof* ("males-absent on the first") es una posible histona acetiltransferasa implicada en el fenómeno de compensación de dosis génica en *Drosophila* (Hilfiker *et al.*, 1997). Aunque la mutación de este gen provoca una disminución en la acetilación de la histona H4, su actividad HAT no ha sido demostrada. Por el contrario, ha sido demostrada la actividad HAT de un dominio de la proteína Tip60 ("HIV-1-Tat interactive protein"), el dominio que se encuentra conservado dentro de la familia MYST y de la superfamilia GNAT (Yamamoto y Horikoshi, 1997).

Esa1p acetila principalmente las histonas H4, H3 y, en menor medida, H2A, en forma libre y es incapaz de acetilar sustratos nucleosomales (Smith *et al.*, 1998). Los estudios realizados sobre la especificidad de sitio muestran acetilación en todas las posiciones acetilables *in vivo* de la histona H4, aunque con preferencia por la lisina 4 de *Tetrahymena* (posición equivalente a la lisina 5 de levadura). El enzima acetila también cuatro posiciones en H2A, y sólo la lisina 14 de la histona H3. Este gen de levadura no ha sido relacionado con ningún proceso biológico y, aunque su delección resulta letal para la célula, no hay

evidencias de que la esencialidad de esta función esté relacionada con su actividad HAT (Smith *et al.*, 1998).

TAF_{II}130 ("TBP-associated factor"), un gen esencial en levadura, es uno de los factores asociados a la proteína TBP que forman parte del factor de iniciación de la transcripción TFIID. Este factor de transcripción está implicado en el reconocimiento de la caja TATA en los promotores eucariotas y, por tanto, es un componente clave de la maquinaria de transcripción de la RNAPol II (Burley y Roeder, 1996). TAF_{II}130 ha sido identificada como una histona acetiltransferasa específica por las histonas H3 y H4, en concreto en la histona H3 se ha demostrado su capacidad de modificar sólo la lisina 14 (Mizzen *et al.*, 1996). Estudios preliminares han establecido un papel importante de los extremos N-terminales de las histonas en el acceso a los promotores de la proteína TBP (Imbalzano *et al.*, 1994; Godde *et al.*, 1995), que algunos autores asocian a la acetilación de histonas (Imbalzano *et al.*, 1994). El hecho de que esta proteína muestre actividad HAT, apoya un papel para la acetilación de histonas en facilitar el acceso del factor de iniciación TFIID a los promotores y, por tanto, promover el inicio de la transcripción.

Mediante análisis bioquímicos, en nuestro departamento, ha sido previamente descrita la presencia en *Saccharomyces cerevisiae* de al menos cuatro actividades HAT diferentes (López-Rodas *et al.*, 1989). Tres de estas actividades corresponden a HATs tipo A, enzimas nucleares capaces de modificar sustratos nucleosomales, y se han denominado HAT A1, HAT A2 y HAT A3. El cuarto enzima es una actividad HAT tipo B, citoplásmica (López-Rodas *et al.*, 1991). Estos enzimas difieren, no sólo en su localización subcelular, sino también en su especificidad sobre las histonas. El enzima HAT A1 acetila la histona H2A en nucleosomas de eritrocito de pollo, aunque es específico por H2B libre de levadura. HAT A2 acetila exclusivamente la histona H3, tanto en forma libre como en nucleosomas. El

enzima HAT A3 acetila tanto la histona H3 como H4, sobre sustratos nucleosomales e histonas libres. Por último, la actividad citoplásmica HAT B presenta una alta especificidad por la histona H4, pero no es capaz de acetilar nucleosomas.

Resulta cada vez más evidente que en las células eucariotas existen múltiples enzimas histona acetiltransferasa, seguramente en mayor número del que inicialmente se sospechaba. Es también cada vez más claro que estos enzimas son complejos multiproteicos de elevada masa molecular, que contienen proteínas con diferentes funcionalidades. Esta complejidad en actividades HAT debe responder a la diversidad de funciones fisiológicas con las que la acetilación de histonas ha sido relacionada. En el trabajo que se presenta a continuación se ha analizado el contenido de actividad HAT de diferentes cepas de levadura, mutantes en las funciones génicas recientemente identificadas como histona acetiltransferasas, así como en genes relacionados con esas HATs. De este modo se ha pretendido identificar las subunidades catalíticas de los enzimas descritos previamente por métodos bioquímicos. Así mismo, al disponer de cepas mutantes en diversos genes relacionados con la acetilación de histonas, se ha pretendido una mejor caracterización de dichas actividades histona acetiltransferasa.

2. Materiales y métodos

2.1. Material biológico

Las cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo y sus genotipos se describen a continuación:

PSY316: *MAT α* , *ade2-101*, *leu2-3,112*, *his3 Δ 200*, *lys2-801*, *ura3-52*

GMY27: PSY316 más *gcn5::HisG*

Ambas cepas fueron cedidas por el Dr. N. Silverman (M. I. T., Cambridge, Massachusetts, USA).

PSY316 trp1: *MAT α* , *ade2-101*, *leu2-3,112*, *his3 Δ 200*, *lys2-801*, *ura3-52*, *trp1*

PSY316 trp1 Δ ada2: PRS316 trp1 más *ada2::TRP1*

PSY316 trp1 Δ ada3: PRS316 trp1 más *ada3::TRP1*

PSY316 trp1 Δ ada2 Δ ada3: PRS316 trp1 más *ada2::TRP1* y *ada3::URA3*

Todos los derivados trp1 de la cepa PSY316 fueron cedidos por la Dra. S. L. Berger (Wistar Institute, Philadelphia, Pennsylvania, USA).

BMA64-1a: *MAT α* , *ura3-1*, *trp1 Δ 2*, *leu2-3,112*, *his3-11*, *ade2-1*, *can1-101*

BQS176: BMA64-1a más *hat1::KanMX3*. La disrupción del gen *HAT1* se llevó a cabo según el método de Wach *et al.* (1994). Para ello se amplificó por PCR un fragmento del plásmido pFA6-KanMX3 linearizado, utilizando los oligonucleótidos HAT1S1 (5'GTCTTTGGTCTACTGCATCGCCTCAA AAGGTTATAGCATCCTCTCTGCTGCCATG3') y HAT1S2 (5'TTAA CCTTGAGATTTATTTATCGACTCTATAATACTCCGGCAAAGACGC GAGCGA3'). El producto de PCR se utilizó para transformar la cepa de levadura BMA64-1a.

BQS177: diploide obtenido al cruzar las cepas haploides BMA64-1a y GMY27

BQS177-3d: *MAT α* , *hat1::KanMX3*, *gcn5::HisG*, *his3*, *leu2-3,112*, *ura3*, *ade2-1*. Esta cepa se obtuvo por esporulación del diploide BQS177.

YPH250: *MAT α* , *ura3-52*, *lys2-801*, *ade2-101*, *trp1 Δ 1*, *his3 Δ 200*, *leu2 Δ 1*

UCC623: YPH250 más *hat2::TRP1*

Las cepas YPH250 y UCC623 fueron cedidas por el Dr. D. Gottschling (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, USA).

BQS241: UCC623 más *hat1::KanMX3*. El método utilizado en la disrupción del gen *HAT1* es idéntico al descrito para la cepa BQS176.

YSW93: *MAT α* , *ura3-52*, *lys2-801*, *ade2-101*, *trp1 Δ 1*, *his3 Δ 200*, *leu2 Δ 1*, *taf130::LEU2*, pSW104 (plásmido centromérico que contiene un alelo mutante termosensible de la proteína TAF_{II}130, bajo el control de su propio promotor)

YSW94: *MAT α* , *ura3-52*, *lys2-801*, *ade2-101*, *trp1 Δ 1*, *his3 Δ 200*, *leu2 Δ 1*, *taf130::LEU2*, *trp3::pSW111 (GAL1p-HA-TAF130-CYC_THIS3)*

Las cepas YSW93 e YSW94 fueron cedidas por el Dr. M. R. Green (University of Massachusetts Medical Center, Massachusetts, USA).

FY1679: *MAT α / α* , *ura3-52/ura3-52*, *his3 Δ 200/HIS3*, *trp1 Δ 63/TRP1*, *leu2 Δ 3/LEU2*

BQS287: *MAT α* , *ura3-52*, *his3 Δ 200*, *trp1 Δ 63*, *leu2 Δ 3*, *tetO₂ (ESA1)::KanMX4*

BQS265: *MAT α* , *ura3-52*, *HIS3*, *trp1 Δ 63*, *leu2 Δ 3*, *CMVp (tetR'-SSN6)::LEU2*, *tetO₂ (TAF130)::KanMX4*

Las cepas BQS176, BQS177, BQS177-3d, BQS241, BQS287 y BQS265 fueron obtenidas por el grupo del Dr. J. E. Pérez Ortín (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València).

FY73: *MAT α* , *his3 Δ 200*, *ura3-52*

ESA1G/E: FY73 más *esa1-G315E*

Ambas cepas fueron cedidas por el Dr. C. D. Allis (University of Rochester, Rochester, NY, USA).

La cepa de levadura UCC623 se transformó con el plásmido pPK90. Este plásmido centromérico contiene el gen *HAT2*, en un fragmento de 4 Kb procedente de un clon genómico, clonado en pRS416 (Sikorski and Boeke, 1991). A este plásmido se ha insertado, en el extremo 3' del gen *HAT2*, una secuencia que codifica para el epítipo de hemaglutinina, seguido de seis residuos de histidina (Gavin *et al.*, 1995), como se describe en Parthun *et al.* (1996). El plásmido pPK90 fue cedido por el Dr. D. Gottschling (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, USA).

La cepa de *Escherichia coli* utilizada fue DH5 α (Hanahan, 1983).

2.2. Medios de cultivo

2.2.1. Medios de cultivo para levadura

Para el cultivo de cepas en las que no se requería ningún tipo de selección se utilizó el medio complejo YPD [1% (p/v) extracto de levadura (Pronadisa), 2% (p/v) peptona bacteriológica (Pronadisa) y 2% (p/v) glucosa (Panreac)]. Para la sobreexpresión de proteínas bajo el control del promotor *GAL*, se sustituyó la glucosa por galactosa, utilizándose a la

misma concentración. Para reprimir la expresión de proteínas bajo el control del promotor *tetO*, se añadió al medio de cultivo 1 µg/mL doxiciclina (Sigma).

Las cepas de levadura transformadas con plásmidos se cultivaron en medio mínimo sintético (SD). Este medio contiene 0.7% (p/v) “Yeast Nitrogen Base w/o amino acids” (Difco), 2% (p/v) glucosa y 50 mM succínico-Tris, pH 5.5. Al medio se suplementan los requerimientos nutricionales necesarios en cada caso: adenina, uracilo e histidina a 30 µg/mL y leucina, lisina y triptófano a 100 µg/mL.

2.2.2. Medios de cultivo para *Escherichia coli*

El cultivo de *E. coli* se llevó a cabo en medio LB [1% (p/v) bactotripton (Difco), 0.5% (p/v) extracto de levadura y 1% (p/v) NaCl]. Para seleccionar el crecimiento de bacterias que contenían plásmidos se suplementó el medio con 50 µg/mL Ampicilina (Sigma).

Todos los medios de cultivo utilizados se esterilizan autoclavando durante 20 min a 120°C. También se utilizaron medios sólidos de la misma composición añadiendo 2% (p/v) agar bacteriológico (Pronadisa).

2.3. Manipulación del material biológico

2.3.1. Transformación de levadura

Las transformaciones de levadura se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Ito *et al.* (1983), con algunas modificaciones. Se parte de un cultivo de 200 mL en fase exponencial de crecimiento, en medio YPD, de la cepa a transformar. Las células se recogen por centrifugación a $1000 \times g$ durante 5 min y, una vez lavadas con agua estéril, se resuspenden en 1-1.5 mL de disolución de litio (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.1 M acetato

de litio, 1 mM EDTA), de forma que quedan concentradas unas cien veces. Después de incubar durante 15 min a 30°C, se añade a la suspensión celular DNA de esperma de salmón (Sigma) sonificado. La suspensión celular se alícuota (alícuotas de unos 50 μ L) y las alícuotas se almacenan a -80°C hasta el momento de la transformación.

A una de estas alícuotas se añade el DNA con el que se desea transformar la cepa, en un volumen máximo de 10 μ L, y 300 μ L de disolución de litio conteniendo 40% (p/v) polietilenglicol (PEG-4000, Sigma). Después de dos incubaciones sucesivas de 20 min, una a 30°C y la otra a 42°C, se recogen las células por centrifugación y, una vez resuspendidas en 50-100 μ L de 1M sorbitol, se extienden sobre una placa Petri con medio selectivo (medio mínimo al que se han suplementado los requerimientos nutricionales de la cepa excepto el correspondiente al gen marcador del plásmido). Las placas se incuban a 30°C de tres a cinco días hasta la aparición de transformantes.

2.3.2. Transformación de *E. coli*

El procedimiento utilizado para transformar *E. coli* fue el descrito por Hanahan (1983), con algunas modificaciones. Las células procedentes de un cultivo de 100 mL en medio LB ($A_{600} = 0.5$) se recogen centrifugando a $1500 \times g$ durante 10 min, después de haber sido enfriadas en hielo. Después de un lavado con 30 mL de disolución TF1 [0.1 M RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM acetato potásico, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) glicerol, pH 5.8], las células se resuspenden en 4 mL de disolución TF2 [10 mM MOPS pH 7, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂ y 15 % (v/v) glicerol]. En este punto la células, competentes para la transformación, se almacenan en alícuotas de 200 μ L a -80°C.

Para cada transformación se utiliza una de estas alícuotas de células competentes. Una vez añadido el DNA a transformar y tras una incubación en hielo durante 20 min, la suspensión celular se somete a un choque térmico de 2 min a 37 °C. Las células, enfriadas de nuevo, se incuban durante 1 h a 37°C diluidas con 200 µL de medio LB. Transcurrido este tiempo se siembran 200 µL de la suspensión, y de diferentes diluciones de ésta, en placas Petri con medio LB suplementado con ampicilina (50 µg/mL). Las placas se incuban a 37°C hasta la aparición de transformantes.

2.3.3. Aislamiento de plásmidos de *E. coli*

Se aislaron plásmidos de *E. coli* a pequeña escala mediante el procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989). Se parte de cultivos de 4 mL en medio LB suplementado con ampicilina incubados a 37°C durante una noche. Una vez recogidas las células por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga, se resuspenden en 100 µL de disolución GTE (25 mM Tris-HCl pH 8, 50mM glucosa, 10 mM EDTA). Se añaden 200 µL de disolución NaOH-SDS [0.2 M NaOH, 1 % (p/v) SDS] y la suspensión se agita por inversión hasta quedar translúcida. Al lisado se añaden 150 µL de 5 M acetato potásico pH 4.8 y, después de una incubación de 5 min en hielo, se elimina el precipitado obtenido al centrifugar la suspensión a $12000 \times g$ durante 15 min. Al sobrenadante se le añade un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y, después de agitar vigorosamente, se centrifuga a $12000 \times g$ durante 3 min. El DNA plasmídico, presente en la fase acuosa, se recupera por precipitación con dos volúmenes de etanol. Tras lavar el DNA con etanol 70 % (v/v) y secarlo a vacío, se resuspende en 20 µL de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) conteniendo 20 µg/mL de RNasa (Merck).

2.4. Obtención de sustratos

2.4.1. Aislamiento de núcleos de eritrocito de pollo

Los núcleos de eritrocito de pollo se obtuvieron según el procedimiento descrito por Weintraub *et al.* (1975). Se recoge sangre de pollos recién sacrificados sobre un volumen de tampón isotónico (10 mM Tris-HCl pH 7.1, 25 mM citrato sódico, 0.14 M NaCl) en un baño de hielo. La sangre diluida se centrifuga a $500 \times g$ durante 10 min para recoger las células sanguíneas, y éstas se lavan dos veces con el mismo tampón. El sedimento final se resuspende en cuatro volúmenes de tampón de lisis celular [10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.5% (v/v) Triton X-100] y se agita suavemente durante 90 min a 4°C. Los núcleos se recogen por centrifugación a $1000 \times g$ durante 10 min y se lavan con tampón de lisis hasta conseguir un sobrenadante claro.

2.4.2. Obtención de histonas de eritrocito de pollo

A partir de los núcleos de eritrocito de pollo se obtuvieron tanto histonas internas como histonas totales (histonas internas más H1 y H5). Para obtener histonas totales, los núcleos se resuspenden en 0.25 M HCl y se agitan energicamente durante 12 h a 4°C. Tras recuperar el sobrenadante por centrifugación a $20000 \times g$ durante 15 min, el sedimento se reextrae de igual forma con 0.25 M HCl durante 4 h más. Se reúnen los dos sobrenadantes y, una vez filtrados a través de una placa de vidrio poroso del n°4, se precipitan las histonas por adición de ocho volúmenes de acetona, dejando la mezcla a -20°C durante una noche. Las histonas se recogen por centrifugación a $20000 \times g$ durante 15 min y, después de dos lavados con acetona anhidra, se secan a vacío. La calidad de las histonas se analizó por

electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, como se describe posteriormente.

Para la obtención de las histonas internas (H2A, H2B, H3 y H4) se eliminaron previamente las histonas H1 y H5 mediante extracción con ácido perclórico (PCA). Los núcleos de eritrocito de pollo se resuspenden en cuatro volúmenes de tampón de lavado [1 mM EDTA pH 7, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonato (PMSF)] y tras 1 h de agitación suave a 4°C se recogen por centrifugación a $10000 \times g$ durante 15 min. Tras un lavado en el mismo medio, el sedimento se resuspende en cuatro volúmenes de PCA 0.74 M y la suspensión se agita enérgicamente durante 30 min. Se deshecha el sobrenadante, donde se encuentran las histonas H1 y H5, y el sedimento se reextrae en las mismas condiciones con dos volúmenes de PCA 0.74 M. Para recuperar las histonas internas el sedimento final se somete a extracción con 0.25 M HCl, como se ha descrito anteriormente para las histonas totales.

2.4.3. Obtención de oligonucleosomas de eritrocito de pollo

Los nucleosomas se prepararon por digestión de núcleos de eritrocito de pollo con nucleasa de micrococo. Los núcleos aislados se resuspenden en tampón de digestión [15 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10% (v/v) glicerol, 0.25 M sacarosa, 1 mM PMSF, 2 μM E64] a una concentración aproximada de 100 unidades de A_{260} por mL. La suspensión se incuba a 37°C en presencia de 300U/mL de nucleasa de micrococo (Boehringer). Transcurridos 25 min, se detiene la reacción por adición de EDTA hasta una concentración final de 10 mM y la mezcla se dializa frente a un tampón de baja fuerza iónica (15 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.25 mM EDTA). Tras centrifugar a $17000 \times g$ durante 20 min, se recuperan los nucleosomas solubles en el sobrenadante. El tamaño de los

oligonucleosomas obtenidos se determinó por electroforesis en gel de agarosa del 1.8%.

Para obtener oligonucleosomas sin H1 y H5 se utilizó el procedimiento descrito por García-Ramírez *et al.* (1992), con algunas modificaciones, partiendo de los oligonucleosomas obtenidos como se acaba de describir. A la solución nucleosomal, después de aumentar la concentración de NaCl hasta 150 mM, se añade CM-Sephadex C-25 (Pharmacia) a razón de 20 mg/mg de cromatina, determinado por A_{260} . La suspensión se incuba a 4°C durante 3 h con agitación, recuperándose los nucleosomas sin H1/H5 del sobrenadante después de eliminar la resina por centrifugación a baja velocidad.

2.5. Obtención de extractos crudos con actividad enzimática HAT

2.5.1. Extractos totales

Para analizar el contenido total de actividad HAT de las distintas cepas de levadura utilizadas se prepararon extractos totales según el siguiente método. Se parte de cultivos de levadura en medio líquido en fase exponencial de crecimiento. Las células se recogen por centrifugación a $1500 \times g$ durante 5 min y, tras lavarlas dos veces con H₂O destilada, se resuspenden en medio de pretratamiento (100 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 75 mM 2-mercaptoetanol) a razón de 10 mL/g de células (peso húmedo). Tras una incubación en este medio durante 30 min a 4°C, las células se lavan con medio de incubación (25 mM NaH₂PO₃ pH 6.5, 1.1 M D-sorbitol) y se resuspenden en 5 mL/g de células de este mismo medio conteniendo 1 mg/g de células de Zimoliasa 20T (20000 U/g, Seikagaku). La suspensión celular se incuba de 30 a 45 minutos a 37°C, siguiéndose la

formación de protoplastos por la disminución de la A_{600} de pequeñas alícuotas de la suspensión tratadas con 1% (p/v) SDS. Los protoplastos se recogen por centrifugación a $1500 \times g$ durante 5 min y, después de tres lavados con medio de incubación, se lisan en un medio hipotónico [75 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.25 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoetanol, 0.05% (v/v) Tween-20, 1 mM PMSF, 2 μ M E64, 5 μ g/mL quimostatina]. Al lisado se le añade NaCl sólido hasta una concentración final de 0.5 M y, tras 30 min de agitación a 4°C, se somete a ultracentrifugación a $100000 \times g$ durante 1 h. El sobrenadante se dializa frente a tampón B [15 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.25 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoetanol, 0.05% (v/v) Tween-20, 10% (v/v) glicerol, 10 mM NaCl] en una membrana de diálisis (Servapor) con un límite de exclusión de 10-14 kDa.

2.5.2. Extractos nucleares

Con objeto de estudiar la localización subcelular de las actividades HAT presentes en levadura se llevaron a cabo extracciones enzimáticas de núcleos aislados de levadura.

Las células de levadura en fase exponencial de crecimiento se recogen por centrifugación a $1500 \times g$ durante 5 min y, una vez lavadas con H₂O destilada, se resuspenden en 1 mL/g de células de tampón de digestión (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 M D-sorbitol, 60 mM 2-mercaptoetanol). Tras una incubación de 15 min a temperatura ambiente, el sedimento de células se resuspende en el mismo medio (3 mL/g de células) pero conteniendo 5 mM 2-mercaptoetanol. Tras la adición de Zimoliasa 20T (2 mg/g de células), la suspensión se incuba a 37°C durante 45 min, siguiéndose la formación de protoplastos como se ha descrito anteriormente.

El aislamiento de los núcleos de levadura se llevó a cabo según el método descrito por Amati y Gasser (1988). Los protoplastos se lavan tres veces en tampón de digestión (2 mL/g de células), se resuspenden en el

mismo tampón a razón de 0.5 mL/g de células y se pipetea gota a gota sobre tampón de lisis [18 % (p/v) Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech), 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 2 μM E64, 5 μg/mL quimostatina] con una proporción de 20 mL/g de células. El lisado se centrifuga dos veces a 3000 × g durante 5 min para eliminar restos celulares y protoplastos no lisados. El sedimento nuclear, obtenido por centrifugación a 20000 × g durante 20 min, se resuspende en tampón de purificación [10 mL/g de células de 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 0.1 M EDTA, 10%(v/v) glicerol, 5 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 2 μM E64, 1 μg/mL quimostatina]. Tras añadir un volumen del mismo tampón pero conteniendo 66% (v/v) de Percoll (Amersham Pharmacia Biotech) la suspensión se centrifuga a 30000 × g durante 35 min, obteniéndose una banda nítida en la parte superior del gradiente que corresponde a los núcleos purificados. Se recupera esta banda y se diluye con tres volúmenes de tampón de lavado (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM acetato potásico, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 2μM E64, 1 μg/mL quimostatina). Tras centrifugar a 20000 × g durante 20 min, el sobrenadante se elimina por aspiración y los núcleos se lavan con el mismo medio, recuperándose por centrifugación a 15000 × g durante 15 min. Una vez obtenidos los núcleos se extrae la actividad enzimática de la misma forma descrita para los extractos totales.

2.5.3. Extractos citoplasmáticos

Para analizar el contenido citoplasmático de actividades HAT se obtuvieron extractos de citoplasma según el método descrito por Parthun *et al.* (1996). Los protoplastos, obtenidos por el mismo procedimiento descrito para los extractos nucleares, se lisan resuspendiéndolos en tampón de lisis [10 mM cacodilato sódico pH 6.0, 18% Ficoll (p/v), 5 mM 2-

mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 2 μ M E64, 5 μ g/mL quimostatina] a razón de 10 mL/g de células. Después de diluir la suspensión con dos volúmenes de tampón de extracción (10 mM cacodilato sódico pH 6.0, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) se eliminan los núcleos y restos celulares por centrifugación a 1500 \times g durante 10 min. El sobrenadante se dializa frente a tampón B.

2.6. Fraccionamiento de las actividades HAT presentes en levadura

2.6.1. Cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharosa

Las diferentes actividades HAT presentes en los extractos crudos de levadura se separaron mediante cromatografía de intercambio iónico, según el método descrito por López-Rodas *et al.* (1985), con algunas modificaciones. Para ello se utilizaron columnas de 7 \times 1 cm de Q-Sepharosa FF (Pharmacia) equilibradas en tampón B conteniendo una concentración de NaCl que varía de 10 a 80 mM. A los extractos cromatografiados empleando concentraciones iniciales de sal diferentes a 10 mM se les añadió sal sólida, hasta una concentración final igual a la del tampón de equilibrado y se centrifugaron durante 15 min a 27000 \times g, previamente a la aplicación.

Tras lavar la columna con 10 volúmenes del tampón de equilibrado las proteínas retenidas se eluyen utilizando 20 volúmenes de columna de un gradiente continuo de NaCl en tampón B. El rango de concentración de sal utilizado en los gradientes de elución varía de 10 a 500 mM NaCl, de 50 a 400 mM NaCl o de 80 a 380 mM NaCl. El eluido se fracciona mediante un colector de fracciones, a las que se determina la A₂₈₀ y su actividad HAT, como se describe más adelante.

2.6.2. Cromatografía de afinidad en Ni²⁺-Sepharosa

Este tipo de cromatografía se utilizó con el objeto de aislar complejos con actividad HAT en los que se encontrara la proteína Hat2p. Para ello se partió de células de levadura que contienen un plásmido con la secuencia de DNA correspondiente al gen *HAT2* fusionado a la secuencia codificante para el epítipo de hemaglutinina y seis residuos de histidina. Extractos totales de estas levaduras son cromatografiados en Q-Sepharosa, tal y como se ha descrito anteriormente, excepto que los tampones no contenían EDTA.

A una alícuota de 250 μ L de las fracciones cromatográficas se le añaden 25 μ L de gel quelante (Chelating Sepharose FF, Pharmacia) previamente saturado con NiCl₂ y equilibrado en tampón B conteniendo 100 mM NaCl y 40 mM imidazol. Después de agitar la suspensión durante 1 h a 4°C, se recoge la resina por centrifugación a baja velocidad y, después de lavarla con el tampón de equilibrado, se procede a la elución de las proteínas retenidas, utilizando para ello una concentración de 50 mM EDTA en tampón B. La actividad HAT del eluido se ensaya tal y como se describe a continuación.

2.7. Ensayo de la actividad HAT

2.7.1. Ensayos en medio líquido

Los ensayos de actividad HAT en medio líquido se llevaron a cabo según el método descrito por López-Rodas *et al.* (1985). Para ello a 100 μ L de fracción enzimática se añaden 80 μ g de histonas (totales o internas) de eritrocito de pollo y 0.01 μ Ci de [1-¹⁴C]acetil CoA (55mCi/mmol, Amersham). La mezcla de reacción se incubó durante 20 min a 37°C y se

deposita sobre filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/F). Después de secar al aire durante 5 min, los filtros se sumergen durante 20 min en un baño de ácido tricloroacético (TCA) 25% (p/v) frío. El exceso de radiactividad se elimina lavando los filtros dos veces en 25% TCA durante 15 min. Posteriormente se realizan tres lavados de 10 min con etanol, etanol:éter dietílico (1:1) y éter dietílico a temperatura ambiente, secando los filtros finalmente en una estufa a 70°C durante 10 min. La radiactividad presente en los filtros se detecta en un contador de centelleo líquido (Wallac 1409). Para ello, los filtros se depositan en viales conteniendo 5 mL de cocktail de centelleo (Biogreen 101, Scharlau).

Para detectar la radiactividad incorporada en cada una de las histonas, se realizaron ensayos en medio líquido similares a los descritos, pero añadiendo 0.04 μCi de [$1\text{-}^{14}\text{C}$]acetil CoA, en lugar de 0.01 μCi . Después de incubar la mezcla de reacción durante 20 min a 37°C, se añade TCA 100% (p/v) frío hasta una concentración final del 25% (p/v). Las muestras se incuban durante 2 h sobre hielo y las proteínas precipitadas se recogen por centrifugación a $10000 \times g$ durante 15 min en una microcentrífuga. El precipitado se lava con 1 mL de acetona:HCl (140:1), posteriormente con 1 mL de acetona, y finalmente se seca a vacío.

Las histonas precipitadas se resuspenden en disolvente de muestras a 1 mg/mL y se resuelven por electroforesis en gel del 15% de poliacrilamida en presencia de SDS (Laemmli, 1970), tal y como se describe posteriormente. El gel se tiñe con 0.1% (p/v) azul Coomassie R-250 y, una vez eliminado el exceso de colorante y fotografiado, se incuba durante 30 min con Amplify (Amersham) y se seca en un secador de geles sobre papel de filtro (Whatman 3MM). La marca radiactiva se visualiza alternativamente por exposición de una película fotográfica o en un sistema de autoradiografía electrónica (Instantimager, Packard). La radiactividad

incorporada en cada una de las histonas se cuantifica densitometrando las fluorografías en un densitómetro Ultrosan 2202 (LKB).

En los ensayos de actividad con oligonucleosomas se utilizó el mismo procedimiento descrito para histonas libres, con algunas modificaciones. Las fracciones cromatográficas se dializan frente a tampón B conteniendo una concentración de NaCl de 20 a 50 mM. Se añade a la mezcla de reacción suficiente sustrato nucleosomal para obtener una concentración final de histonas similar a la utilizada en los ensayos con histonas libres. La reacción se detiene añadiendo HCl hasta una concentración final de 0.25 M, enfriándose las muestras en hielo. Tras una incubación sobre hielo de 1-2 h se elimina el precipitado por centrifugación a $10000 \times g$ durante 10 min, recuperándose las histonas del sobrenadante por precipitación con TCA, tal y como se ha descrito anteriormente.

2.7.2. Ensayos en gel

Se llevaron a cabo ensayos de actividad HAT en gel, según el método descrito por Brownell y Allis (1995), con algunas modificaciones. En este tipo de ensayo las proteínas se resuelven por electroforesis, en presencia de SDS, en un gel de poliacrilamida polimerizado en presencia de histonas. Después de la electroforesis y tras eliminar el agente desnaturizante, es posible ensayar la actividad HAT de las proteínas resueltas incubando el gel en presencia de acetil CoA marcado radiactivamente. Las fracciones enzimáticas que se desea ensayar se someten a electroforesis en presencia de SDS en un gel del 10% de poliacrilamida que contiene una concentración de 1 mg/mL de histonas de eritrocito de pollo. La concentración de SDS en el gel de resolución se aumentó hasta un 0.25% (p/v) para facilitar la solubilidad de las histonas. Tras la electroforesis se incubó el gel durante 1 h a temperatura ambiente en tampón de tratamiento (25 mM Tris-HCl pH 8, 0.05 mM EDTA)

conteniendo 20% (v/v) isopropanol. Después de lavar el gel durante 30 min a temperatura ambiente con medio de tratamiento, se realizan dos lavados con el mismo medio pero conteniendo 8 M urea (ultrapura, ICN). Para eliminar la urea, se lava el gel durante 1 h a 4°C con medio de tratamiento conteniendo 0.04% (v/v) Tween-40. Este lavado se repite dos veces, una vez durante toda la noche y otra vez durante 1 h. El gel se equilibra en tampón de ensayo (25 mM Tris-HCl pH 8, 0.05 mM EDTA, 10% (v/v) glicerol, 50 mM NaCl) y se incuba durante 1 h a 37°C en este mismo tampón conteniendo 0.4 µCi/mL de [1-¹⁴C]acetil CoA. Después de la incubación las proteínas se fijan con un lavado de TCA 5% (p/v). El gel se lava con agua destilada, se tiñe con azul Coomassie, se seca y se detecta la radiactividad como se ha descrito anteriormente.

2.8. Estimación de masas moleculares de los complejos con actividad HAT

Las masas moleculares de algunos de los complejos con actividad HAT detectados en los extractos de levadura, se determinaron por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Se utilizaron gradientes lineales del 7 al 18% de sacarosa en tampón 15 mM Tris- HCl pH 7.9, 0.25 mM EDTA, 20 mM NaCl. Las fracciones cromatográficas con actividad HAT se concentran por ultrafiltración utilizando membranas YM30 (Amicon) de 30 kDa de límite de exclusión. Se deposita una alícuota de 250 µL del concentrado en la parte superior de un gradiente de 11 mL. Después de la ultracentrifugación en un rotor Beckman SW 41 a 40000 rpm durante 20 h, se recoge el gradiente en fracciones de 0.7 mL, a las que se determina su A₂₈₀ y actividad HAT. Para identificar las actividades HAT dentro del gradiente se realizan ensayos de especificidad de histona como se ha descrito anteriormente. De forma paralela se calibra el gradiente, utilizando

como marcadores una mezcla de las siguientes proteínas: catalasa (240 kDa), aldolasa (158 kDa), BSA (68 kDa) y citocromo *c* (12.5 kDa).

2.9. Métodos analíticos

2.9.1. Electroforesis de proteínas

La resolución de proteínas por electroforesis se ha llevado a cabo utilizando geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Laemmli, 1970). Para ello las proteínas se disuelven en disolvente de muestras [85 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.2% (p/v) SDS, 10%(v/v) glicerol, 0.01% (p/v) azul de bromofenol, 66 mM 2-mercaptoetanol] y se hierven durante 2-3 min antes de su aplicación.

Las histonas utilizadas como sustrato en ensayos de actividad HAT se resuelven en geles de acrilamida del 15 % (p/v). En el caso de los ensayos de actividad HAT en gel se utilizaron geles del 10 % (p/v) acrilamida. En todos los casos el porcentaje de acrilamida del gel superior fue del 5 % (p/v).

2.9.2. Electroforesis de DNA

La separación de fragmentos de DNA se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa en tampón TBE (44.5 mM Tris, 44.5 mM ácido bórico, 1.25 mM EDTA). Se utilizaron concentraciones de agarosa del 1 % al 1.8 % (p/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. Para visualizar el DNA se añade 0.5 µg/mL bromuro de etidio a los geles, que son iluminados con luz ultravioleta una vez finalizada la electroforesis.

2.9.3. Técnicas espectrofotométricas

Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A. Se utilizaron cubetas de plástico, para medidas en el espectro visible, y de cuarzo en el caso de medidas a longitudes de onda del espectro ultravioleta.

3. Resultados y Discusión

3.1. Actividades HAT en levadura

En el trabajo cuyos resultados se describen a continuación se ha analizado el contenido en actividades HAT de diferentes cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello se han preparado extractos proteicos crudos, a partir de protoplastos de levadura, obtenidos por digestión de la pared de células en fase exponencial de crecimiento. Una vez lisados los protoplastos en un medio hipotónico, se incrementa la fuerza iónica del extracto con el objeto de favorecer la disociación de proteínas que puedan estar unidas a la cromatina. La fracción soluble obtenida tras ultracentrifugar este lisado constituye el extracto crudo cuyo contenido en actividades HAT se analiza.

El extracto crudo se somete a cromatografía de intercambio iónico, eluyéndose las proteínas retenidas mediante un gradiente lineal de fuerza iónica (López-Rodas *et al.*, 1989). Mediante esta cromatografía, en la que queda retenida la mayor parte de la actividad HAT presente en levadura, se consigue eliminar otras proteínas y ácidos nucleicos presentes en el extracto crudo, así como purificar parcialmente los diferentes enzimas histona acetiltransferasa. En la figura 1A se muestra el perfil de elución obtenido de una cromatografía de intercambio iónico en Q-Sepharosa de un extracto total preparado de una cepa de levadura tipo silvestre (cepa BMA64-1a). Tras la aplicación del extracto crudo y lavado de la columna, las proteínas retenidas se eluyen utilizando un gradiente lineal de 10 a 500 mM en NaCl. La actividad HAT total obtenida, al ensayar las fracciones cromatográficas con histonas de eritrocito de pollo y acetil coenzima A marcado radiactivamente, se recoge principalmente en dos picos (figura 1A). Para estudiar la especificidad de histona de cada uno de estos picos, las histonas marcadas por incubación con las fracciones cromatográficas en presencia de

[1-¹⁴C]acetil CoA, se resuelven mediante electroforesis (figura 1B). La posterior fluorografía del gel permite analizar la radiactividad incorporada en cada una de las histonas (figura 1C). Mediante este análisis es posible detectar picos de acetilación sobre histonas individuales que identifican la presencia de proteínas o complejos multiproteicos con actividad HAT.

En la figura 1A se ha señalado la posición, en el gradiente de elución, de cada una de las cuatro actividades HAT descritas hasta el momento en levadura (López-Rodas *et al.*, 1989; 1991). La posición e identificación de cada uno de estos enzimas se ha determinado tras el análisis de la fluorografía mostrada en la figura 1C, y según la especificidad de histona de cada uno de los picos detectados. El enzima A1 acetila principalmente las histonas H4 y H2A; la actividad HAT A2 acetila la histona H3; por último los enzimas HAT A3 y HAT B acetilan principalmente la histona H4.

En este trabajo se han utilizado diferentes cepas de levadura y, a pesar de las diferencias en su fondo genético, en todas ellas se ha observado un contenido en actividades HAT similar al mostrado en la figura 1. Sin embargo, en ocasiones se han encontrado pequeñas diferencias, de una cepa a otra, en los niveles relativos de actividad de cada uno de los picos. Estas diferencias podrían deberse a una variación en la eficiencia de extracción de los enzimas relacionada con el fondo genético. En cualquier caso, cualitativamente, siempre se han observado los picos con actividad HAT descritos en este apartado.

Este tipo de análisis se ha aplicado a cepas de levadura mutantes en genes que codifican para las proteínas con actividad HAT identificadas hasta el momento. La estrategia del presente estudio se basa en el hecho de que la eliminación de estas proteínas provocará la ausencia de aquellos

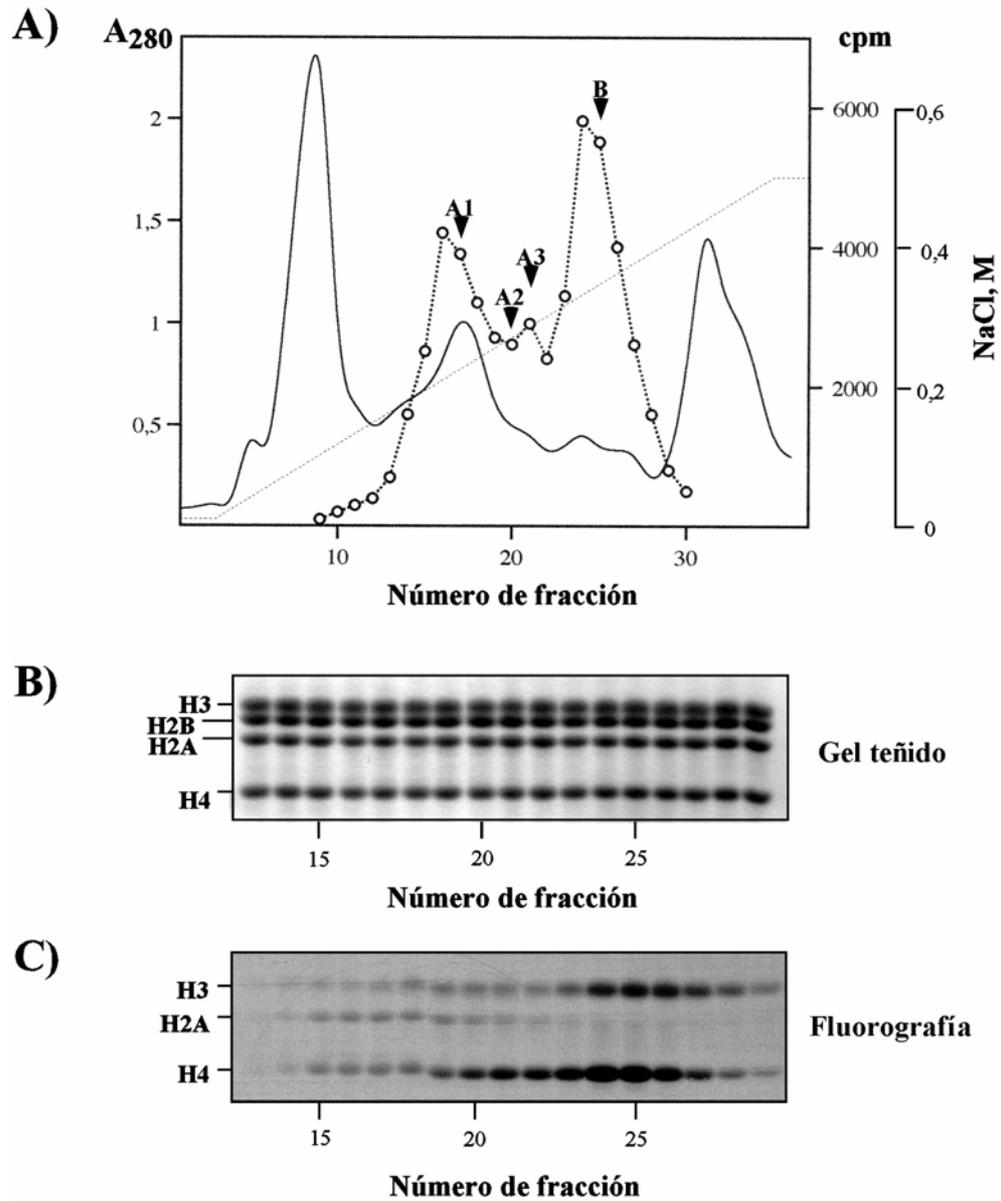


Figura 1. Actividades HAT en extractos totales de levadura. A) Fraccionamiento en Q-Sepharosa FF del extracto total de una cepa de levadura tipo silvestre (BMA64-1a). Las proteínas retenidas se eluyeron mediante un gradiente lineal de 10 a 500 mM NaCl. La línea continua representa la A₂₈₀ de las fracciones recogidas durante la elución. Se representa la actividad HAT en cpm (○) de las fracciones tras ensayarlas con histonas libres de eritrocito de pollo y [1-¹⁴C]acetil CoA. Las flechas indican la posición en el gradiente de elución de los enzimas HAT A1, A2, A3 y B. **B)** Tinción con azul Coomassie de las histonas tras el ensayo y su separación por electroforesis en un gel del 15% de poliacrilamida en presencia de SDS. Se indican las posiciones de las cuatro histonas internas. **C)** Fluorografía de la electroforesis mostrada en B. Se indican las posiciones de las histonas H3, H2A y H4.

picos de actividad HAT en los que se encuentren implicadas, lo que permite identificar a los complejos de los que dichas proteínas formen parte.

3.2. Actividad HAT dependiente de *GCN5*

3.2.1. Análisis de cepas de levadura mutantes en *GCN5*

La proteína Gcn5, clonada como un coactivador transcripcional (Georgakopoulos y Thireos, 1992), es el homólogo en levadura de la primera histona acetiltransferasa nuclear que fue identificada en *Tetrahymena* (Brownell *et al.*, 1996). La delección de este gen en levadura provoca un defecto de crecimiento, así como una expresión reducida de determinados genes.

Con el objeto de identificar las actividades HAT de levadura en las que está implicada la proteína Gcn5, se ha analizado el contenido de actividad HAT en mutantes *gcn5* (cepa PSY316), comparándolo con el obtenido en una cepa tipo silvestre (GMY27). Para ello se han fraccionado, mediante cromatografía de intercambio iónico, extractos enzimáticos de ambos tipos de cepas. Los extractos crudos de las dos cepas, conteniendo cantidades similares de proteína, se cromatografiaron sobre columnas idénticas de Q-Sepharosa y las proteínas retenidas se eluyeron utilizando un gradiente lineal de 10 a 500 mM de NaCl. En la figura 2 se muestra la actividad HAT presente en cada una de estas cepas tras su fraccionamiento, empleando histonas totales de eritrocito de pollo como sustrato. Tanto los perfiles de proteína, como los perfiles de actividad HAT (figura 2A) son muy similares en ambos casos. Sin embargo, cuando se determina la incorporación de grupos acetilos en cada una de las histonas, mediante electroforesis, fluorografía (figura 2B) y análisis densitométrico de ésta (figura 2C), se detecta la presencia en la cepa silvestre de un pico de acetilación sobre la histona H3 (fracciones 16 a 21) que no se encuentra en el mutante *gcn5*. La radiactividad incorporada en el resto de las histonas es muy similar en ambos perfiles.

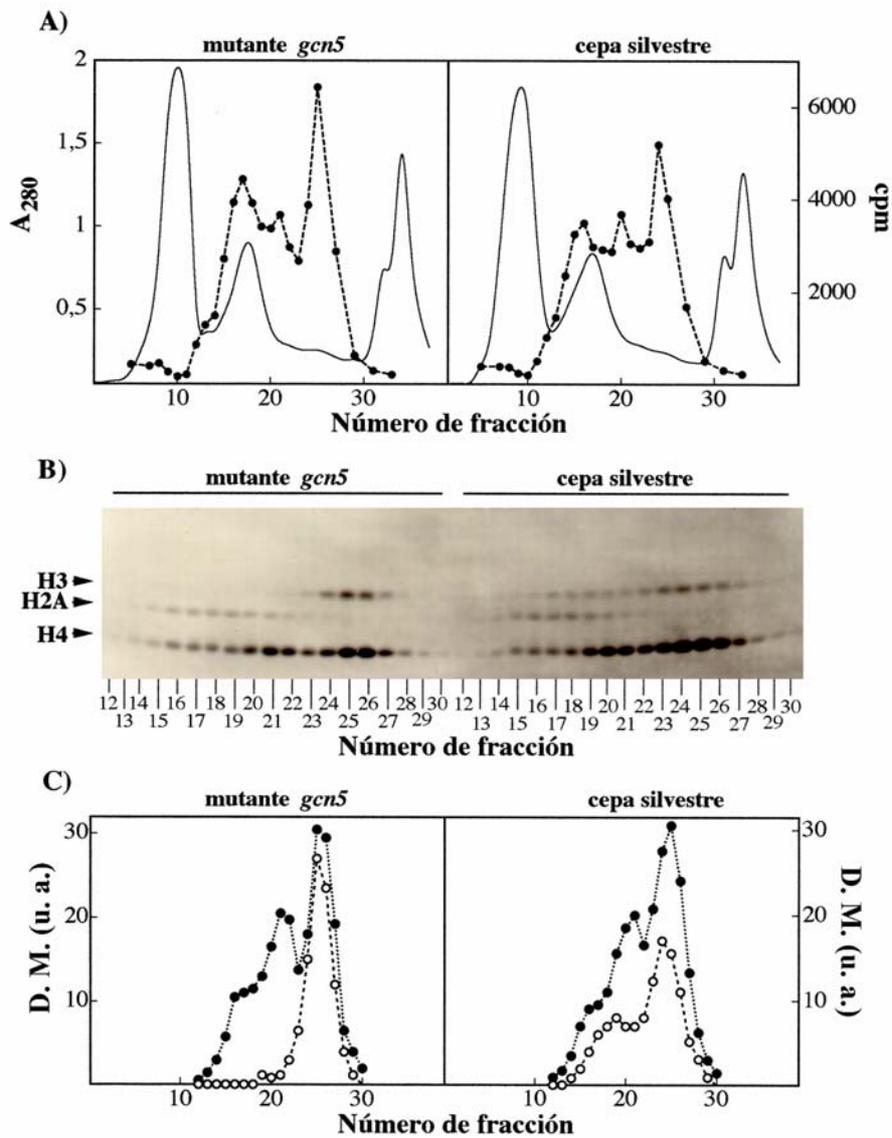


Figura 2. Análisis de las actividades HAT en cepas de levadura mutantes en *GCN5* y tipo silvestre. **A)** Perfiles cromatográficos obtenidos tras fraccionar, en columnas idénticas de Q-Sepharosa FF (7×1 cm), extractos totales de las cepas GMY27 (mutante *gcn5*) y PSY316 (tipo silvestre). Las proteínas retenidas se eluyeron mediante un gradiente lineal de NaCl (10-500 mM). La actividad HAT de las fracciones, ensayadas con histonas totales de eritrocito de pollo y [1-¹⁴C]acetil CoA, se expresa en cpm (●). La línea continua representa la A_{280} de las fracciones. **B)** Análisis de especificidad de histona de las actividades HAT presentes en las fracciones cromatográficas. Las histonas marcadas en el ensayo de actividad se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, tras lo cual se obtuvo una fluorografía del gel. Se indican las posiciones de las histonas H3, H2A y H4. **C)** Análisis densitométrico de las fluorografías mostradas en B. Se representa la densidad de marca (D.M.) en unidades arbitrarias (u.a.), para las histonas H3 (○) y H4 × 0.5 (●) frente al número de fracción.

Estos resultados indican que Gcn5p representa sólo una pequeña parte de la actividad HAT de levadura, en concreto está implicada en uno de los dos picos de actividad que se detectan sobre la histona H3 en estos perfiles de elución. Esta especificidad de sustrato está de acuerdo con los resultados previos obtenidos con la proteína recombinante (Kuo *et al.*, 1996), según los cuales Gcn5p es una histona acetiltransferasa que modifica la histona H3, y en menor medida la histona H4. En el experimento mostrado no es posible determinar si el pico de actividad acetila también la histona H4, ya que en esta zona del gradiente de elución existe un nivel importante de actividad sobre dicha histona, debida a otros enzimas no dependientes de Gcn5p.

Cuando se ensaya la actividad HAT presente en estas dos cepas, utilizando oligonucleosomas de eritrocito de pollo como sustrato (figura 3), de nuevo la actividad total presente en extractos de mutantes *gcn5* es muy similar a la detectada en cepas control (figura 3A), aunque el pico de actividad HAT observado en el mutante es ligeramente más estrecho que en la cepa silvestre. Sin embargo, cuando se analiza la radioactividad incorporada en cada una de las histonas, mediante electroforesis y fluorografía (figura 3B, C), se observa acetilación sobre la histona H3 en la cepa silvestre, que no se detecta en el mutante *gcn5*. Estos resultados demuestran que Gcn5p está implicada en la acetilación de la histona H3 en nucleosomas, contrariamente a los resultados obtenidos con la proteína recombinante (Kuo *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996), que habían indicado su incapacidad para modificar nucleosomas.

El comportamiento cromatográfico y, especialmente, su especificidad sobre la histona H3, tanto libre como formando parte de nucleosomas, indican que la actividad HAT dependiente de Gcn5p se trata del enzima denominado HAT A2, previamente descrito (López- Rodas *et*

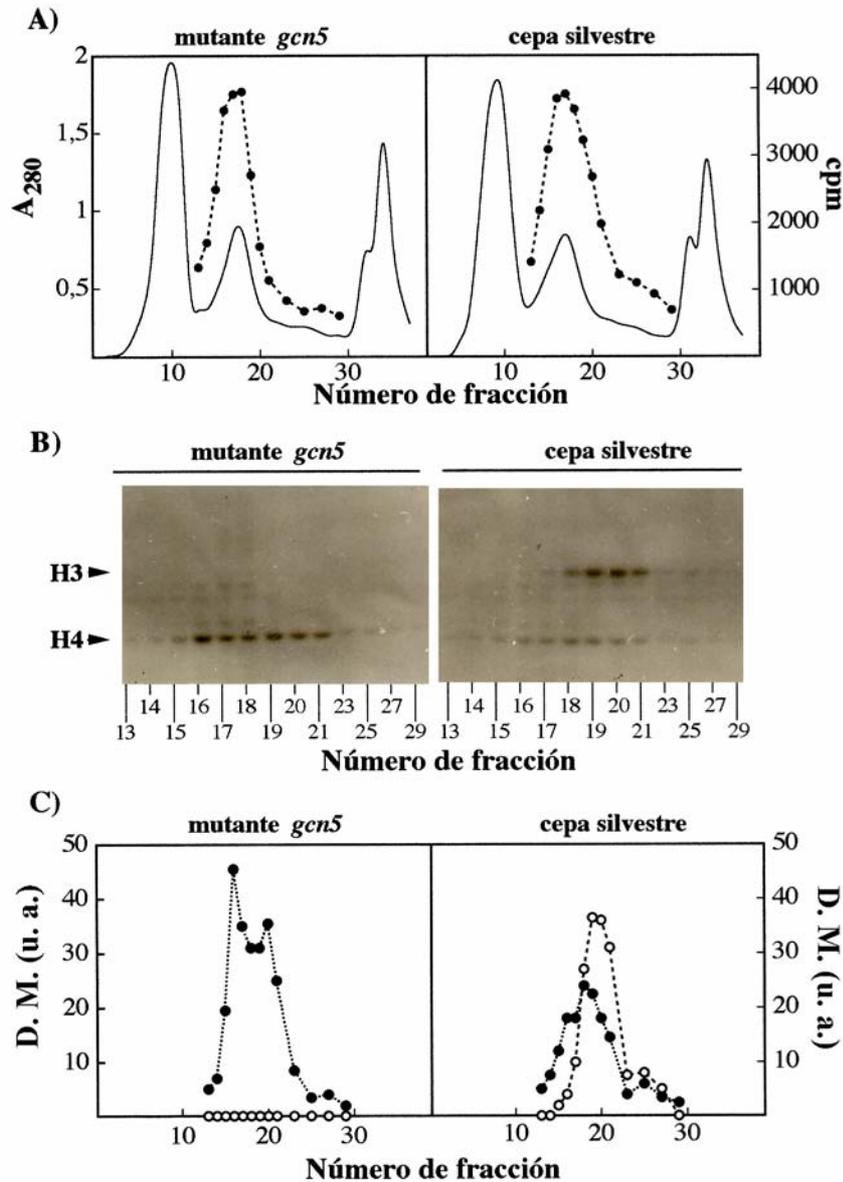


Figura 3. Actividades HAT sobre nucleosomas en cepas de levadura *gcn5* y tipo silvestre. **A)** Perfiles de actividad HAT sobre nucleosomas obtenidos con las mismas fracciones cromatográficas representadas en la figura 2. Se ensayó la actividad HAT de las fracciones, una vez dializadas, utilizando oligonucleosomas de eritrocito de pollo como sustrato. La actividad HAT se expresa en cpm (●) y la A₂₈₀ de las fracciones se representa con una línea continua. **B)** Especificidad de histona de las actividades detectadas en A. Se muestran las fluorografías obtenidas tras resolver mediante electroforesis las histonas marcadas en el ensayo con nucleosomas. Están indicadas las posiciones de las histonas H3 y H4. **C)** Análisis densitométrico de la incorporación de radiactividad sobre histonas individuales. Representación gráfica de la densidad de marca (D.M.) para las histonas H3 (○) y H4 (●) en unidades arbitrarias (u.a.).

al., 1991). Gcn5p debe ser, por tanto, la subunidad catalítica del enzima HAT A2 (ver figura 1A).

3.2.2. Caracterización del complejo HAT A2

3.2.2.1. Estimación de la masa molecular del complejo HAT A2

Diversos estudios genéticos han puesto de manifiesto que *GCN5* funciona como un regulador transcripcional en asociación con las proteínas Ada2 y Ada3 (Marcus *et al.*, 1994; Horiuchi *et al.*, 1995; Candau y Berger, 1996). Por lo tanto, la actividad HAT asociada a *GCN5*, detectada en nuestros gradientes, podría deberse a la existencia de un complejo en el cual Gcn5p, como subunidad catalítica, fuera acompañado por otras subunidades proteicas. Como primera aproximación a esta hipótesis, se determinó la masa molecular del complejo HAT A2, mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

Para ello, fracciones con actividad HAT asociada a Gcn5p (fracciones 18 a 21, figura 3), se reunieron, concentraron por ultrafiltración, y se aplicaron sobre un gradiente lineal de sacarosa. Tras la ultracentrifugación y el fraccionamiento del gradiente, se ensayó la actividad HAT de las fracciones utilizando como sustrato tanto histonas libres, como oligonucleosomas de eritrocito de pollo (figura 4A). Con ambos sustratos la actividad total se recogió en un único pico. La posición del complejo dependiente de Gcn5p dentro del gradiente se determinó en base a su especificidad de sustrato, tras analizar la incorporación de grupos acetilo sobre la histona H3 libre (figura 4B) y sobre la misma histona formando parte de nucleosomas (figura 4C). De forma paralela se realizó un calibrado del gradiente utilizando proteínas de masa molecular conocida,

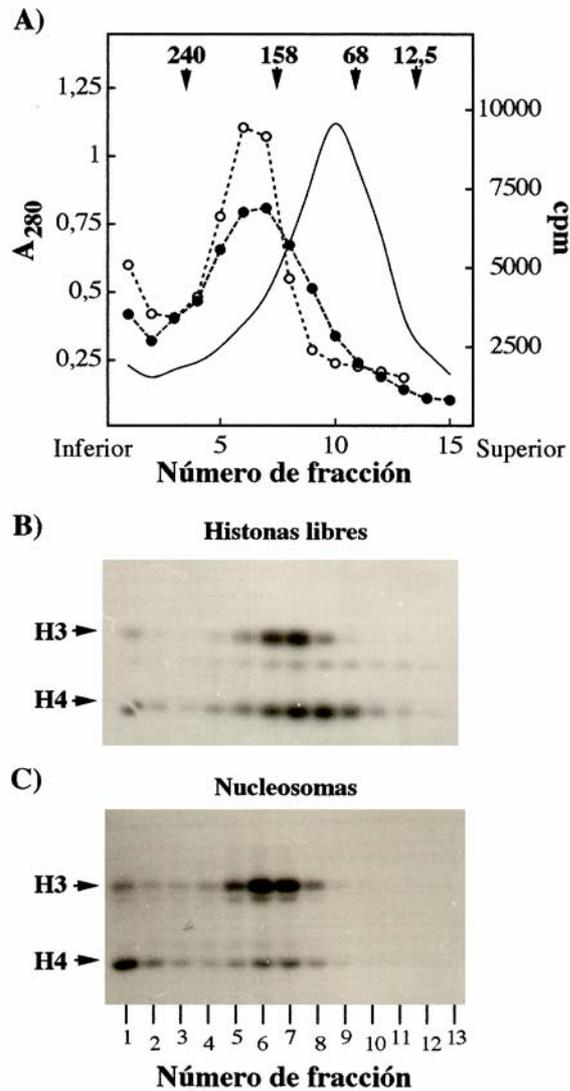


Figura 4. Estimación de la masa molecular del complejo HAT A2. **A)** Las fracciones de Q-Sepharosa FF con actividad asociada a *GCN5* (fracciones 18 a 21, figura 3) se concentraron y se aplicaron en un gradiente de sacarosa del 7 al 18%. Tras la ultracentrifugación (40000 rpm durante 20 h, rotor Beckman SW41) y el fraccionamiento del gradiente, se ensayó la actividad HAT. Los valores de actividad obtenidos sobre histonas libres (●) y sobre nucleosomas (○), se expresan en cpm. La línea continua corresponde a los valores de A_{280} de las fracciones del gradiente. Las flechas indican la posición en el gradiente de los patrones utilizados para el calibrado: catalasa, 240 kDa; aldolasa, 158 kDa; BSA, 68 kDa y citocromo *c*, 12.5 kDa. La posición en el gradiente de HAT A2 se determinó según su capacidad de acetilar la histona H3, utilizando tanto histonas libres (fluorografía mostrada en **B**) como oligonucleosomas (fluorografía mostrada en **C**).

cuyas posiciones se indican en la figura 4A. De acuerdo con el calibrado del gradiente se obtuvo una masa molecular para HAT A2 de aproximadamente 170 kDa, mucho mayor que la masa de 50.5 kDa propuesta para Gcn5p (Brownell *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que Gcn5p forma parte de un complejo multiproteico con actividad HAT, el complejo HAT A2 anteriormente mencionado. El tamaño de este enzima podría estar de acuerdo con un complejo formado por las proteínas Gcn5, Ada2 y Ada3, cuya masa molecular sería de unos 180 kDa.

3.2.2.2. Análisis de cepas de levadura mutantes en *ADA2* y *ADA3*

Para corroborar la hipótesis de que las proteínas Ada2 y Ada3 forman parte del complejo HAT A2, se determinó la presencia de este complejo en cepas de levadura mutantes en los genes *ADA2* y *ADA3*.

Previamente, y al objeto de facilitar el análisis del contenido en actividades HAT en la levadura, se intentó mejorar la resolución de los diferentes enzimas en la cromatografía de intercambio iónico. Ya que todos los complejos HAT que se detectan eluyen en la cromatografía sobre Q-Sepharosa a una concentración de NaCl comprendida entre 100 y 350 mM (obsérvese por ejemplo la elución mostrada en la figura 1), se decidió, sin variar el volumen total del gradiente, emplear un rango de concentraciones de NaCl comprendido entre 80 y 380 mM. De este modo, al disminuir la pendiente del gradiente de elución, debe aumentar la resolución de la cromatografía. En la figura 5, y a modo de ejemplo, se muestra el perfil de elución de Q-Sepharosa de un extracto total de una cepa de levadura tipo silvestre (BMA64-1a), utilizando estas nuevas condiciones.

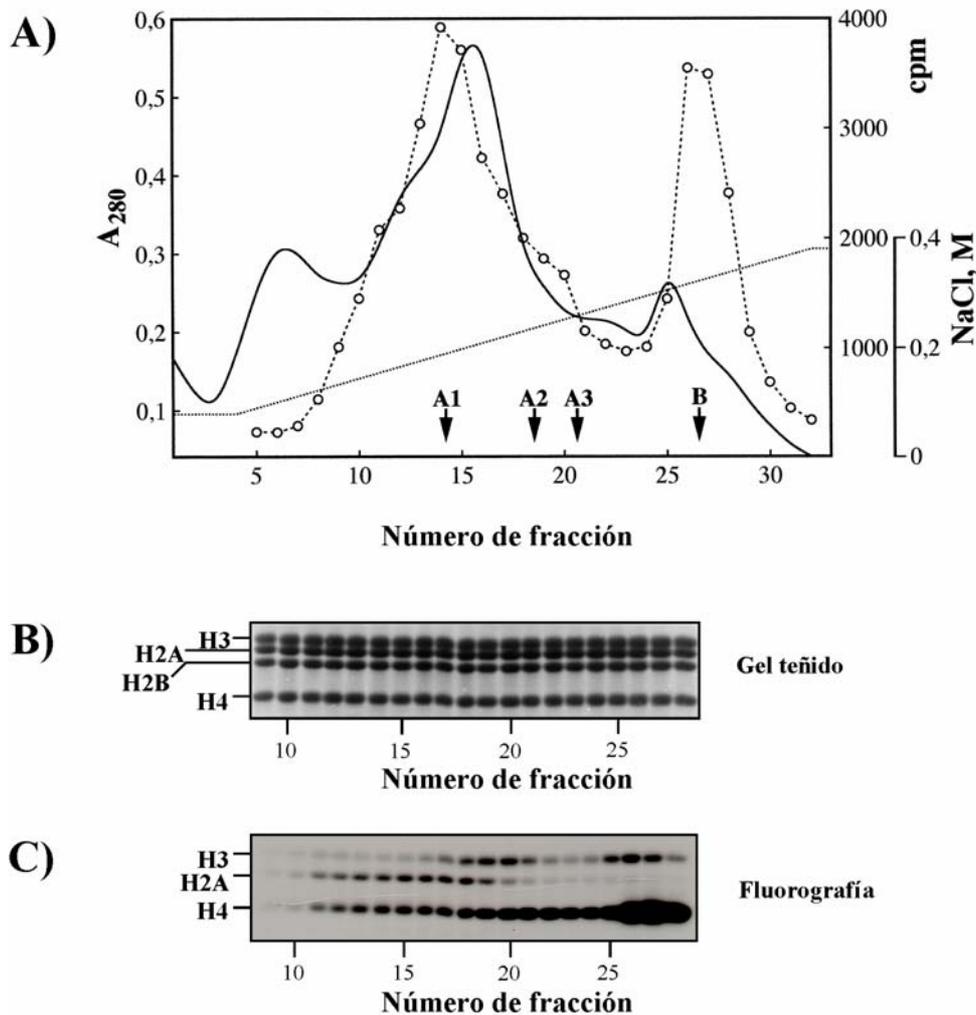


Figura 5. Perfil de elución en Q-Sepharosa utilizando un gradiente de concentración de NaCl de 80 a 380 mM. **A)** Un extracto total obtenido de una cepa de genotipo silvestre (BMA64-1a) fue aplicado en una columna de Q-Sepharosa FF. Las proteínas retenidas se eluyeron mediante un gradiente de NaCl (80-380 mM). La actividad HAT obtenida, tras ensayar las fracciones de la cromatografía con histonas totales de eritrocito de pollo y [^{14}C]acetil CoA, se expresa en cpm (\circ). Los valores de A_{280} para cada fracción vienen representados por la línea continua. Se señala con flechas la posición dentro del gradiente de elución de cada una de las cuatro actividades HAT presentes, A1, A2, A3 y B. **B)** Tinción con azul Coomassie de las histonas marcadas durante el ensayo, tras su separación electroforética en un gel de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS. Se indican las posiciones de las histonas H3, H2B, H2A y H4 en la electroforesis. **C)** Fluorografía del gel mostrado en B. Las posiciones de las histonas H3, H2A y H4 están indicadas.

El tamaño de la columna, la cepa de origen y el volúmen, tanto del extracto aplicado como del gradiente de elución empleado, son idénticos a los utilizados en la cromatografía mostrada en la figura 1. Como se puede observar, la actividad HAT detectada utilizando un gradiente de NaCl de 80 a 380 mM (figura 5) es similar a la detectada con gradientes de 10 a 500 mM (figura 1). Sin embargo, con este nuevo gradiente de elución, mejora la separación de los enzimas, como revela el análisis de especificidad de histona (figura 5B, C) y, no menos importante, reduce el contenido en proteína de las fracciones (compárense los perfiles de proteínas, determinados por A_{280} , de las eluciones de las figuras 1 y 5). Por todo ello, se utilizó un gradiente de elución de 80 a 380 mM NaCl en las cromatografías sobre Q-Sepharosa realizadas posteriormente.

Para comparar el contenido en actividades HAT en cepas de levadura mutantes en los genes *ADA2* y *ADA3*, se prepararon extractos enzimáticos totales de las cepas BMA64-1a (cepa silvestre), PSY316 *trp1* Δ *ada2* (mutante *ada2*), PSY316 *trp1* Δ *ada3* (mutante *ada3*) y PSY316 *trp1* Δ *ada2* Δ *ada3* (doble mutante *ada2 ada3*). Los extractos fueron cromatografiados en Q-Sepharosa, utilizando un gradiente de 80 a 380 mM de NaCl para eluir las proteínas retenidas. En la figura 6 se muestra la comparación de los picos de actividad sobre histonas libres en cepas de levadura mutantes *ada2*, mutantes *ada3* y tipo silvestre. El pico de acetilación sobre la histona H3, detectado entre las fracciones 17 y 21 del gradiente en la cepa silvestre, no se encuentra en ninguno de estos mutantes. La acetilación de la histona H3 correspondiente al enzima HAT A2, también desaparece en los dobles mutantes *ada2 ada3*, como se puede observar en la figura 7. La acetilación sobre el resto de las histonas es muy similar en las cuatro cepas.

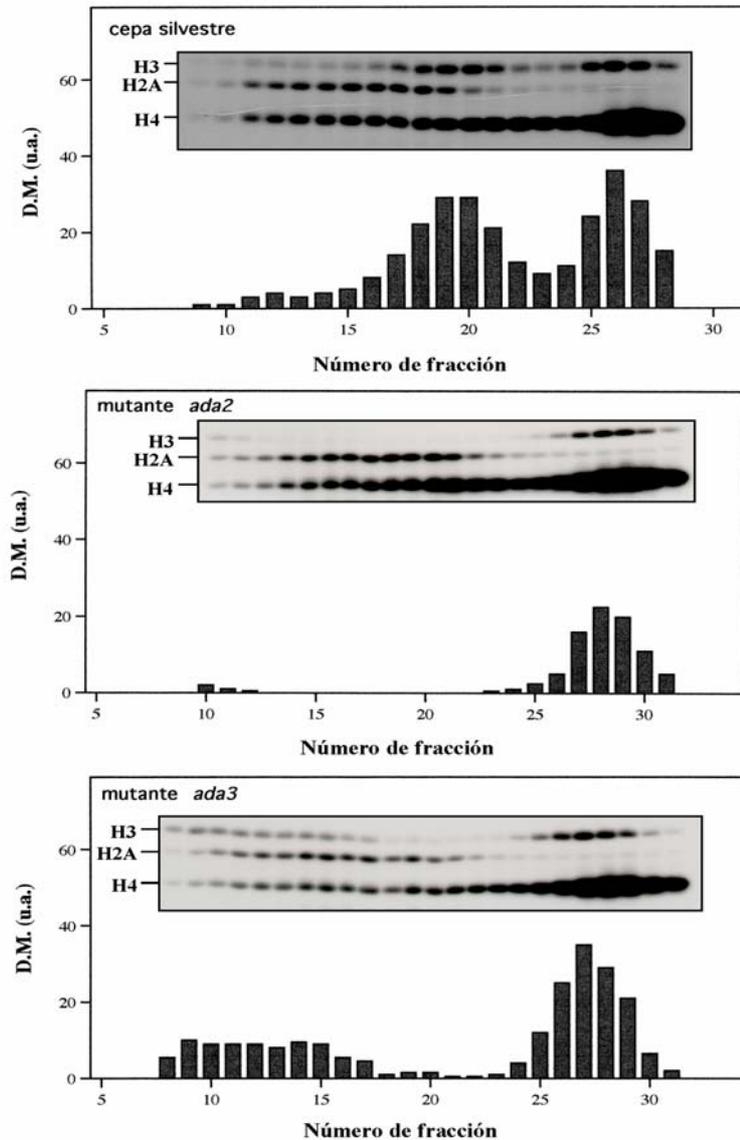


Figura 6. Actividades HAT en cepas de levadura mutantes en genes *ADA*. Se fraccionaron extractos totales de las cepas de levadura BMA64-1a (tipo silvestre), PSY316 *trp1 Δada2* (mutante *ada2*) y PSY316 *trp1 Δada3* (mutante *ada3*), mediante cromatografía en Q-Sepharosa FF, eluyéndose las proteínas mediante un gradiente de NaCl de 80 a 380 mM. Las fracciones cromatográficas se ensayaron utilizando como sustrato histonas totales de eritrocito de pollo. Se muestran las fluorografías obtenidas tras la separación de las histonas, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, y el densitometrado de la marca radiactiva detectada en la histona H3 (histograma). Las posiciones en el gel de las histonas H3, H2A y H4 están indicadas.

Aunque en ninguna de estas cepas se obtuvo acetilación sobre la histona H3 en la posición del enzima HAT A2, en los tres mutantes se observó un pequeño nivel de acetilación sobre la histona H3 al principio del gradiente, mayor en el caso del mutante *ada3*. Esta acetilación sobre la histona H3 podría deberse a la presencia de la proteína Gcn5 libre, en el caso de los mutantes *ada2* y dobles mutantes *ada2 ada3*, y a un subcomplejo Gcn5p-Ada2p, en el mutante *ada3*. Esta hipótesis estaría de acuerdo con resultados previos que demuestran que Gcn5p interacciona directamente con la proteína Ada2, pero indirectamente con la proteína Ada3 (Marcus *et al.*, 1994; Horiuchi *et al.*, 1995).

En conclusión, estos resultados indican que las proteínas Ada2 y Ada3 forman parte del complejo HAT A2. No sólo la integridad del complejo depende de las funciones *ADA*, sino que la masa molecular estimada para el complejo está de acuerdo con la presencia de estas proteínas. En levadura se han descrito complejos que contienen Gcn5p y otras proteínas, entre las que se encuentran las proteínas Ada (Grant *et al.*, 1997), los complejos denominados ADA y SAGA, con masas moleculares de 0.8 y 1.8 MDa, respectivamente. Aunque estos complejos tienen masas moleculares mucho mayores que la que se ha determinado para el complejo HAT A2, se ha demostrado la existencia de otros complejos ADA en levadura que tienen masas moleculares similares al aquí descrito (Pollard y Peterson, 1997; Saleh *et al.*, 1997). Por otro lado, la masa molecular del complejo HAT A2 coincide también con la de la actividad HAT aislada por Brownell y Allis (1995) de extractos nucleares de *Tetrahymena*. Esta actividad HAT contiene como subunidad catalítica la proteína p55, el homólogo de Gcn5p en *Tetrahymena*.

Los primeros estudios realizados con la proteína Gcn5 recombinante demostraban su incapacidad para acetilar sustratos nucleosomales (Kuo *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Los autores defendían el requerimiento de

otras proteínas auxiliares que confirieran a Gcn5p esta capacidad (Kuo *et al.*, 1996). De hecho, no sólo el complejo HAT A2 acetila H3 en nucleosomas, sino que también los complejos descritos por otros autores, en los que se encuentra Gcn5p, los complejos ADA y SAGA anteriormente

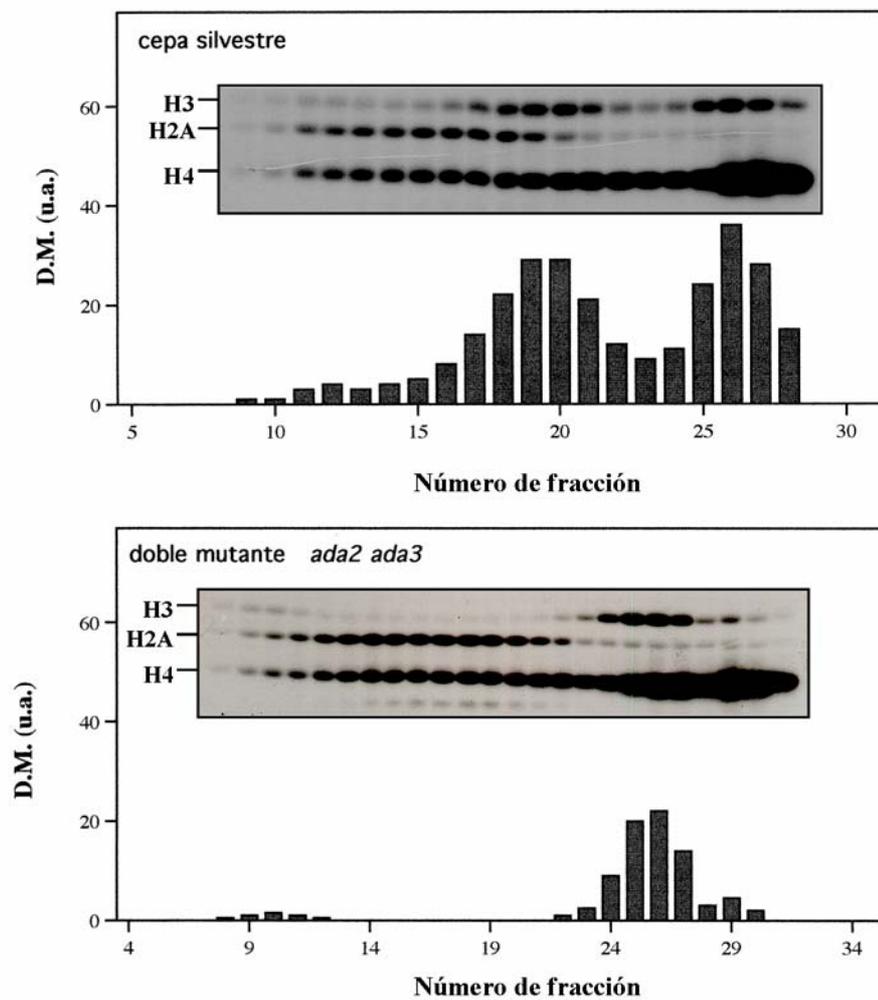


Figura 7. Actividades HAT presentes en cepas de levadura mutantes en los genes *ADA2* y *ADA3*. Extractos totales obtenidos de las cepas BMA64-1a (tipo silvestre) y PSY316 *trp1 Δada2 Δada3* (doble mutante *ada2 ada3*) se cromatografiaron sobre Q-Sepharosa FF. Se muestran las fluorografías obtenidas tras ensayar las fracciones frente a histonas libres de eritrocito de pollo. Las posiciones de las histonas H3, H2A y H4 están indicadas. El diagrama de barras representa la densidad de marca detectada sobre la histona H3.

mencionados, son capaces de modificar sustratos nucleosomales (Grant *et al.*, 1997). Estos mismos autores demuestran el requerimiento de las proteínas Ada para la presencia en extractos de levadura de dichos complejos histona acetiltransferasa en los que Gcn5p es capaz de acetilar nucleosomas.

En este trabajo se ha estudiado la acetilación de la histona H3 en mutantes *ada*, utilizando nucleosomas como sustrato. En la figura 8 se muestra la comparación de las actividades HAT sobre oligonucleosomas de eritrocito de pollo en el mutante *ada2*, el mutante *ada3* y el control tipo silvestre. En ninguno de los mutantes *ada* se obtuvo acetilación sobre la histona H3 en la zona del gradiente correspondiente al enzima HAT A2, que se observa en la cepa silvestre. Tampoco acetilan nucleosomas los picos de actividad presentes al principio del gradiente en los mutantes. Estos resultados demuestran el requerimiento de las proteínas Ada2 y Ada3 para la integridad y la capacidad de modificar sustratos nucleosomales del enzima HAT A2.

Recientemente se ha demostrado la capacidad de Gcn5p libre, en ausencia de otras proteínas, de acetilar sustratos nucleosomales (Tse *et al.*, 1998b). Sin embargo, no todas las posiciones acetilables sobre la histona H3 libre, son acetiladas cuando ésta forma parte de nucleosomas. Además, la capacidad de Gcn5p de acetilar nucleosomas es dependiente del estado conformacional del sustrato. Por lo tanto es posible que para una acetilación eficiente *in vivo* se requieran proteínas adicionales que, más que conferir nuevas propiedades a la actividad de Gcn5p, faciliten su acceso a sustratos nucleosomales. En conclusión, Gcn5p debe ser modulada por proteínas adicionales presentes en los complejos nativos. Esto está de acuerdo con el hecho de que los mutantes *ada2*, *ada3* y *gcn5* compartan fenotipos, en cuanto al defecto de crecimiento y de expresión de genes (Marcus *et al.*,

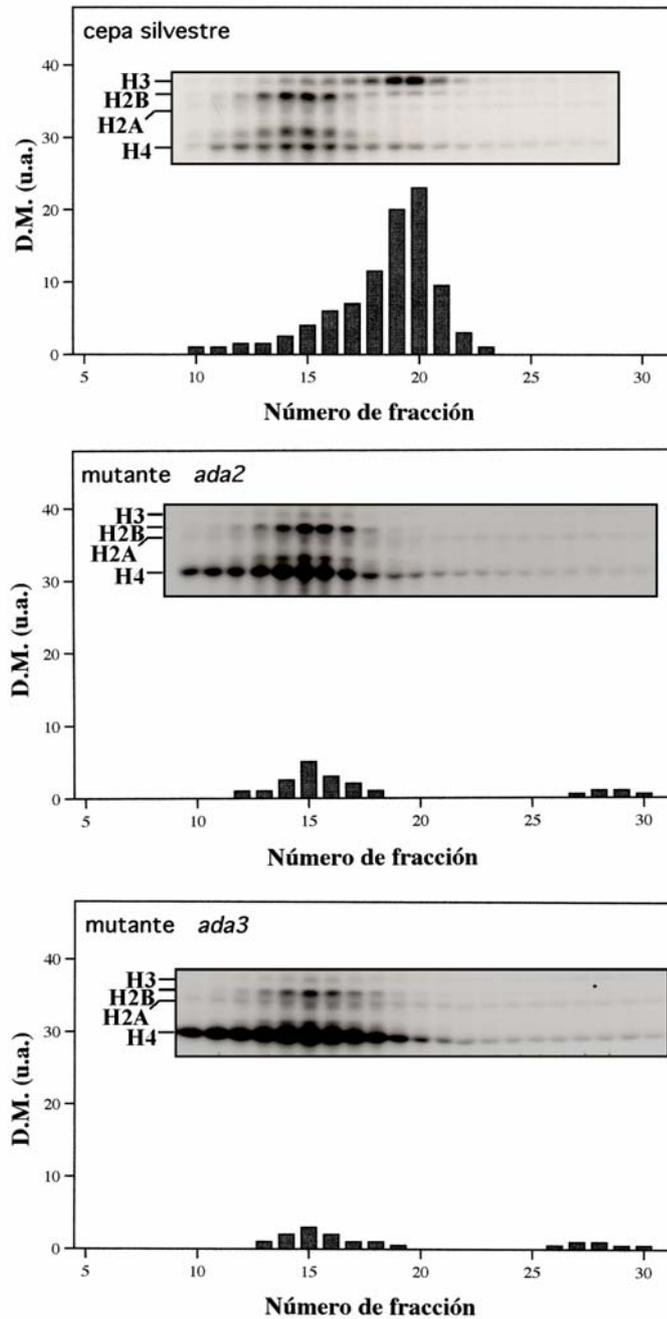


Figura 8. Análisis del contenido en actividad HAT sobre nucleosomas de cepas de levadura mutantes en los genes *ADA*. Las mismas fracciones cromatográficas mostradas en la figura 6, y que corresponden a cepa silvestre (BMA64-1a), mutantes *ada2* (PSY316 *trp1* Δ *ada2*) y mutantes *ada3* (PSY316 *trp1* Δ *ada3*), fueron dializadas y ensayadas con oligonucleosomas de eritrocito. Se muestran las fluorografías obtenidas tras la separación electroforética de las histonas, indicándose la posición de las cuatro histonas internas. El resultado del densitometrado para la histona H3, como densidad de marca (D. M.), se representa frente al número de fracción.

1994). Por otro lado, ciertas proteínas Gcn5 mutantes, parcialmente deficientes en actividad HAT, sólo son capaces de acetilar nucleosomas cuando se expresan en cepas tipo silvestre y no en mutantes *ada2* (Syntichaki y Thireos, 1998).

3.3. Complejos con actividad HAT dependientes de *HAT1*

3.3.1. Análisis de cepas de levadura mutantes en *HAT1*

El producto del gen *HAT1*, la primera proteína con actividad HAT clonada en levadura (Kleff *et al.*, 1995), ha sido identificado como la subunidad catalítica del principal enzima histona acetiltransferasa citoplásmico en *Saccharomyces*, que acetila específicamente la histona H4 (Parthun *et al.*, 1996). Con el objeto de identificar las actividades HAT dependientes de Hat1p presentes en nuestro fraccionamiento, se analizaron cepas de levadura mutantes en el gen *HAT1*.

Cuando se compara la actividad HAT sobre histonas libres obtenida tras el fraccionamiento en Q-Sepharosa de extractos de levadura de mutantes *hat1* (cepa BQS176) con una cepa silvestre (BMA64-1a), se observa una reducción importante en el perfil de actividad del mutante (figura 9). El pico de actividad que se detecta al final del gradiente de elución en la cepa silvestre (fracciones 24 a 29), se reduce considerablemente en el mutante. En esta posición del gradiente se encuentra el enzima denominado HAT B (ver figuras 1 y 5), una actividad HAT que había sido previamente descrita como un enzima citoplásmico (López-Rodas *et al.*, 1991). Por lo tanto estos resultados corroboran la presencia de Hat1p en levadura como la subunidad catalítica de la principal actividad HAT citoplásmica (Parthun *et al.*, 1996).

Cuando se analiza la actividad HAT de cada una de estas cepas sobre histonas individuales (figura 10), se observa que la disminución de actividad en el mutante *hat1* se debe a una reducción en la acetilación de la histona H4, de acuerdo con los resultados obtenidos previamente sobre la especificidad de esta histona acetiltransferasa (Kleff *et al.*, 1995; Parthun *et*

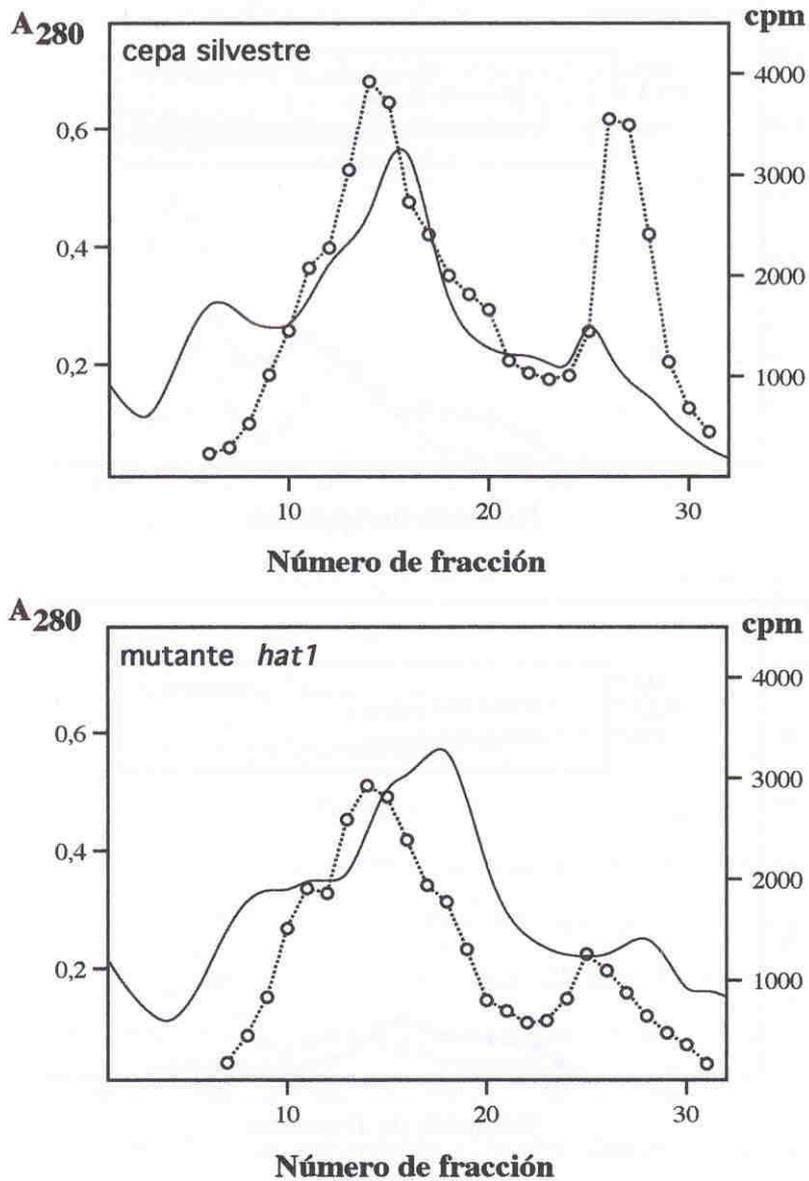


Figura 9. Perfiles de actividad HAT presente en extractos de cepas de levadura mutantes en *HAT1*. Cantidades similares de extractos enzimáticos de las cepas de levadura BMA64-1a (cepa silvestre) y BQS176 (mutante *hat1*) se fraccionaron en Q-Sepharosa FF, utilizando un gradiente de elución de 80 a 380 mM NaCl. Las fracciones recogidas durante la elución se ensayaron frente a histonas libres de eritrocito de pollo. La actividad HAT obtenida se expresa en cpm (○). La línea continua representa la A₂₈₀ de las fracciones.

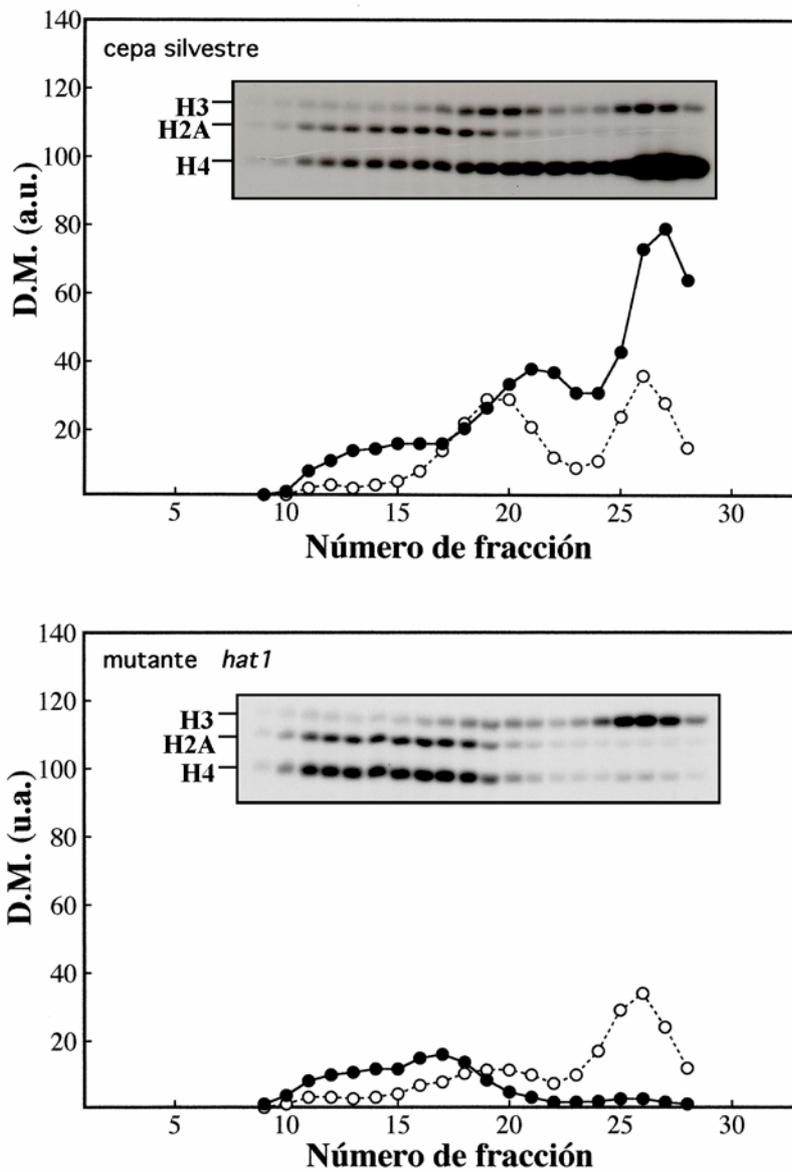


Figura 10. Actividades HAT asociadas al gen *HAT1* de levadura. Especificidad de histona de las actividades HAT obtenidas al fraccionar extractos totales de las cepas BMA64-1a (silvestre), y BQS176 (mutante *hat1*). Las fracciones de la cromatografía sobre Q-Sepharosa se ensayaron frente a histonas libres. Se muestran las fluorografías, obtenidas con cada una de estas cepas, indicándose la posición de las histonas H3, H2A y H4. Los densitometrados corresponden a la densidad de marca (D. M.) en unidades arbitrarias (u. a.) sobre las histonas H3 (○) y H4 × 0.5 (●).

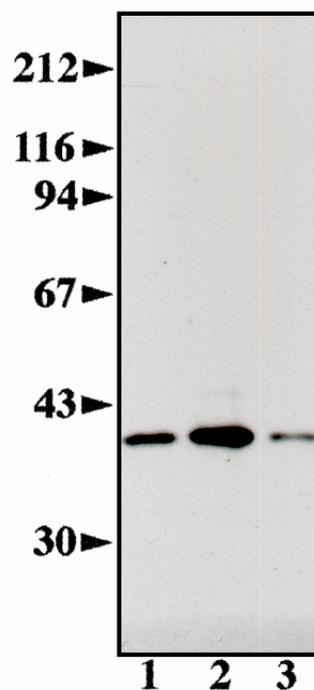
al., 1996). La reducción de acetilación sobre la histona H4 ocurre principalmente sobre un pico de actividad al final del gradiente (fracciones 24 a 29), correspondiente como se ha mencionado al enzima B. Sin embargo, cuando se analiza con detalle la incorporación de radiactividad en la histona H4, se observa también, en la cepa silvestre, la presencia de un segundo pico, aunque menos intenso, sobre la histona H4 (fracciones 20 a 23), que no se detecta en el mutante. Esta acetilación de la histona H4 había sido previamente atribuida a un actividad HAT nuclear, denominada HAT A3, capaz de modificar a las histonas H3 y H4 (López-Rodas *et al.*, 1991). Estos resultados sugieren que una misma subunidad catalítica, Hat1p, forma parte de dos complejos con actividad HAT en levadura, los enzimas HAT A3 y HAT B.

Con la idea de demostrar que en la misma proteína, Hat1p, reside la actividad catalítica de ambos complejos, se llevó a cabo la determinación de la masa molecular de las subunidades catalíticas de dichos complejos, mediante un ensayo de actividad HAT en gel (Brownell y Allis, 1995). En este tipo de ensayo es posible detectar la actividad HAT de un polipéptido, tras su separación por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. La electroforesis de las proteínas presentes en las fracciones cromatográficas se realiza en un gel de poliacrilamida, conteniendo SDS, que ha sido polimerizado en presencia de histonas. De este modo las histonas, que servirán como sustrato, quedan unidas covalentemente al soporte electroforético. Tras la electroforesis, el gel es sometido a un tratamiento que elimina el agente desnaturizante y permite la renaturalización de las proteínas resueltas. Posteriormente, el gel es incubado en presencia de acetil CoA marcado radiactivamente, lo que producirá acetilación de las histonas unidas a la poliacrilamida allí donde una proteína con actividad HAT haya quedado localizada. La fluorografía

del gel permite visualizar la banda correspondiente a la proteína con actividad HAT.

En la figura 11 se muestran los resultados de un ensayo en gel en el que se analizaron distintas fracciones con actividad HAT correspondientes a los enzimas HAT A3 y HAT B. Las carreras 1 y 3 corresponden a fracciones de HAT A3, procedentes del fraccionamiento en Q-Sepharosa de extractos totales (carrera 1) y extractos nucleares (carrera 3). La carrera 2 corresponde al enzima HAT B procedente del fraccionamiento de un extracto citoplásmico (ver más adelante). La proteína correspondiente a la banda detectada posee una masa molecular idéntica, en el enzima A3 y en el enzima B, y corresponde a los 42 kDa esperados para la proteína Hat1. Estos resultados demuestran que la misma subunidad catalítica, Hat1p, forma parte de dos complejos con actividad HAT en levadura.

Figura 11. Determinación de la masa molecular de las subunidades catalíticas de los complejos HAT A3 y HAT B. Las proteínas presentes en las fracciones correspondientes a los enzimas HAT A3 y HAT B se resolvieron por electroforesis, en presencia de SDS, en un gel del 10% de poliacrilamida polimerizado en presencia de histonas de eritrocito de pollo a 1 mg/mL. Se muestra la fluorografía de la incorporación, sobre las histonas unidas al gel, de grupos acetilo marcados con ^{14}C . Carrera 1: HAT A3 obtenido del extracto total de una cepa mutante *gcn5* (fracción 21 de la figura 17). Carrera 2: HAT B procedente del extracto citoplásmico de una cepa silvestre (fracción 26 de la figura 13A). Carrera 3: HAT A3 obtenido del extracto nuclear de una cepa silvestre (fracción 20 de la figura 13B). Se indican las posiciones y masas moleculares de las proteínas patrón empleadas como marcadores.



3.3.2. Caracterización de los complejos con actividad HAT dependientes de Hat1p

3.3.2.1. Análisis de cepas de levadura mutantes en *HAT2*

La actividad HAT citoplásmica descrita por Parthun *et al.* (1996), está formada por dos subunidades proteicas, los productos de los genes *HAT1* y *HAT2*. La proteína Hat1 es la subunidad catalítica del complejo, mientras que Hat2p, que no posee actividad, se cree que estimula la actividad de Hat1p, probablemente aumentando su afinidad por la histona H4. Por lo tanto, parece probable que el enzima B, detectado en nuestros gradientes, esté formado por estas dos proteínas, y que Hat1p, como subunidad catalítica, se encuentre asociado a otros factores constituyendo el enzima HAT A3, con otras funciones diferentes a las del complejo B. Para estudiar esta posibilidad, se analizaron las actividades HAT presentes en extractos de cepas de levadura mutantes en *HAT2*.

En la figura 12 se muestran los perfiles de actividad HAT obtenidos en mutantes *hat2* (cepa UCC623), dobles mutantes *hat1 hat2* (cepa BQS241) y en el correspondiente control tipo silvestre (cepa YPH250), utilizando histonas libres como sustrato. Como se puede observar, los resultados son muy similares a los mostrados con mutantes *hat1*. De nuevo se detecta en ambos mutantes una deficiencia en las actividades enzimáticas identificadas previamente como HAT A3 y HAT B. Estos resultados demuestran que tanto Hat1p como Hat2p se encuentran presentes en dos enzimas histona acetiltransferasa diferentes, posiblemente llevando a cabo diferentes funciones.

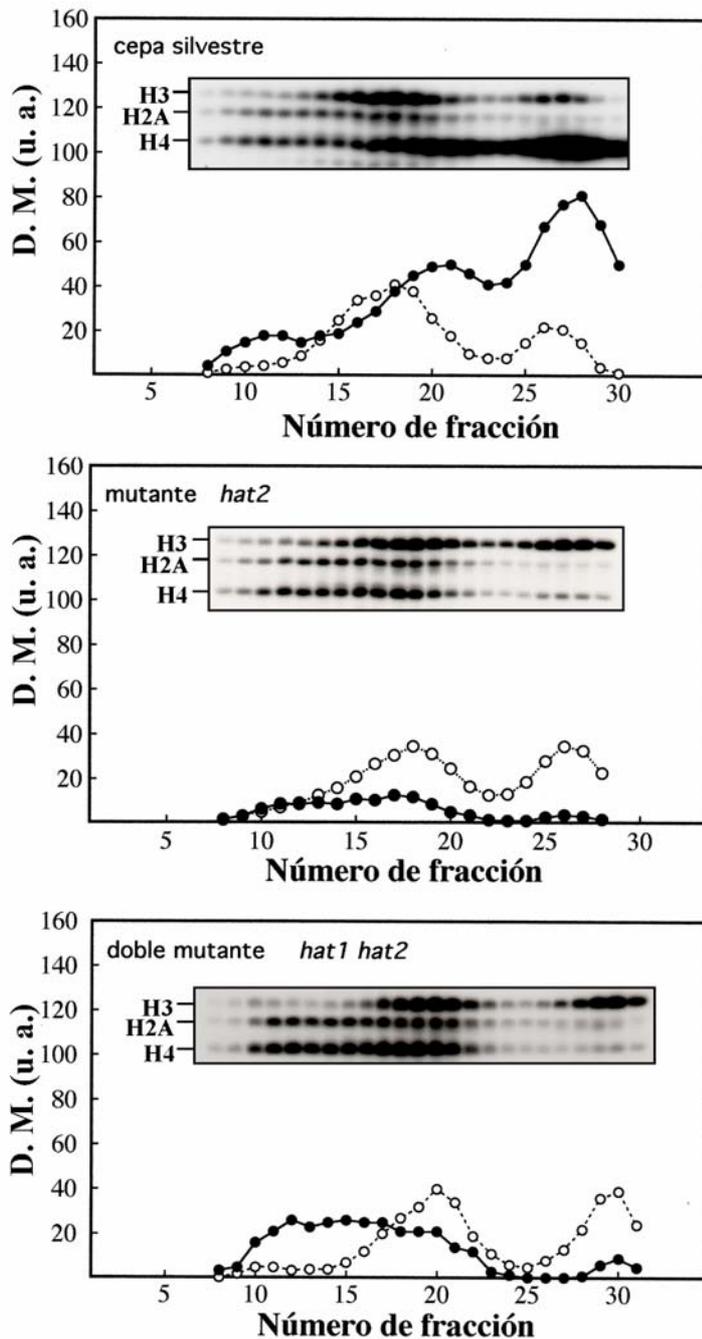


Figura 12. Análisis de las actividades HAT presentes en cepas de levadura mutantes en *HAT2*. Se ensayó la actividad HAT de extractos de las cepas de levadura YPH250 (cepa silvestre), UCC623 (mutante *hat2*) y BQS241 (doble mutante *hat1 hat2*), después de su fraccionamiento en Q-Sepharosa FF. En las fluorografías obtenidas para las tres cepas se han indicado las posiciones de las histonas H3, H2A y H4. Se representa, frente al número de fracción, la densidad de marca (D. M.) en unidades arbitrarias (u. a.) para las histonas H3 (○) y H4 (●).

3.3.2.2. Localización subcelular de los complejos HAT A3 y HAT B

El enzima HAT A3 fue descrito como una actividad HAT nuclear (López-Rodas *et al.*, 1991). Para corroborar la localización subcelular de los dos complejos de los que forman parte las proteínas Hat1 y Hat2, se analizó el contenido en actividades HAT de extractos nucleares y citoplásmicos de cepas tipo silvestre y de extractos nucleares obtenidos de mutantes *hat1*.

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos tras el fraccionamiento en Q-Sepharosa de extractos enzimáticos de citoplasma y de núcleos aislados de una cepa silvestre (cepa BMA64-1a), así como el fraccionamiento del extracto nuclear procedente de mutantes *hat1* (cepa BQS176). En el extracto de citoplasma de la cepa silvestre (figura 13A) se detecta un pico de acetilación sobre la histona H4 libre, correspondiente al enzima B (fracciones 25 a 30), mientras que no se detecta la presencia de la actividad HAT A3. Por el contrario, en la fracción nuclear de la misma cepa (figura 13B), se observa un pico de acetilación sobre H4 (fracciones 19 a 22) correspondiente al enzima A3, mientras que no se detecta el enzima B. Como se muestra en la figura 13C, el pico de actividad correspondiente a HAT A3 desaparece en un extracto nuclear obtenido de la cepa mutante *hat1*. Por lo tanto los complejos HAT A3 y HAT B tienen diferente localización subcelular. De acuerdo con lo descrito hasta el momento, el complejo HAT A3, es una actividad nuclear, mientras que el complejo B se encuentra en el citoplasma de la célula. El hecho de que estos dos complejos enzimáticos posean una diferente localización en la célula hace difícil la posibilidad de que el enzima A3 sea un subcomplejo del enzima citoplasmático B, mucho más abundante, generado durante el proceso de extracción y fraccionamiento.

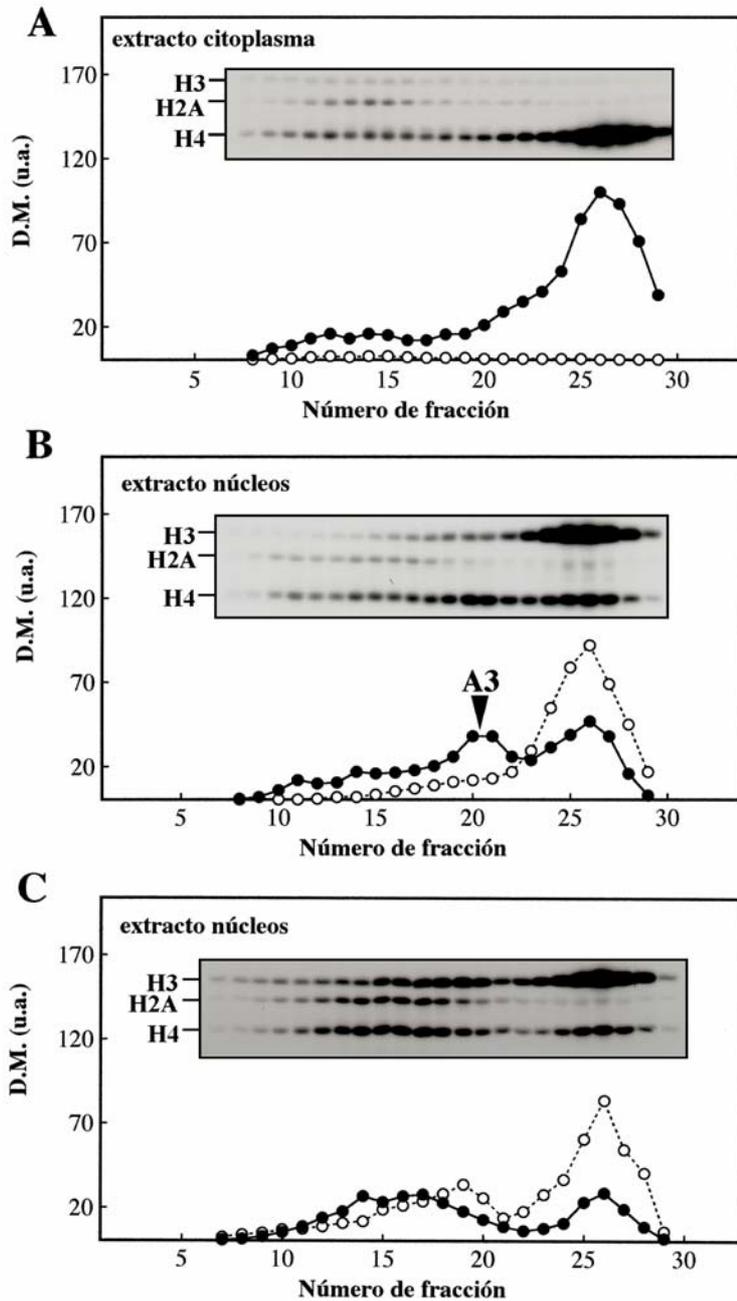


Figura 13. Localización subcelular de los complejos HAT A3 y HAT B. Se obtuvieron extractos, tanto citoplásmicos (A) como nucleares (B) de la cepa de levadura BMA64-1a (silvestre), así como extractos nucleares (C) de mutantes *hat1* (cepa BQS176). Se muestran las fluorografías obtenidas en cada caso, tras el fraccionamiento de estos extractos en Q-Sepharosa. En todas las fluorografías se incluye la posición de las histonas H3, H2A y H4, así como la representación de los densitometrados correspondientes a las histonas H3 (○) y H4 (●) frente al número de fracción. En el densitometrado correspondiente al extracto nuclear de la cepa silvestre (B) se ha señalado con una flecha la posición de la actividad HAT A3.

Podemos concluir que la proteína Hat1p se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma de levadura, formando parte de dos complejos distintos con actividad HAT. En este sentido, resultados recientes demuestran la presencia del homólogo humano de Hat1p en núcleos de células en fase S (Verreault *et al.*, 1997).

Cabe señalar que en la fracción nuclear de la cepa silvestre (figura 13B) también se detecta acetilación sobre la histona H4, coincidiendo con la posición del enzima B. Sin embargo, esta acetilación no se debe a la actividad de Hat1p, ya que también se detecta en la fracción nuclear del mutante *hat1* (figura 13C). La actividad responsable de esta acetilación constituye una nueva actividad HAT no descrita hasta el momento, como se discutirá más adelante.

3.3.2.3. Especificidad de los complejos HAT A3 y HAT B

Dado que los enzimas HAT A3 y HAT B constituyen dos complejos con actividad HAT diferentes, podría esperarse alguna diferencia entre estos complejos en cuanto a su especificidad. Con el objeto de estudiar la especificidad de sustrato de estos enzimas y, por otro lado demostrar la interacción física entre las proteínas Hat1 y Hat2, se analizó el contenido en actividad HAT de una cepa de levadura en la que la expresión de la proteína Hat2 ha sido sustituida por la expresión de una proteína de fusión que corresponde a la secuencia de la proteína Hat2 seguida del epítipo de hemaglutinina y seis residuos de histidina (Parthun *et al.*, 1996). Esta cepa se obtuvo transformando un mutante *hat2* (cepa UCC623) con el plásmido pPK90, en el que se encuentra esta secuencia bajo el control del promotor nativo del gen *HAT2*, tal y como se describe en materiales y métodos. Tras fraccionar un extracto total de esta cepa transformante en Q-Sepharosa, las fracciones se sometieron a cromatografía de afinidad en Ni²⁺-Sepharosa.

Este soporte cromatográfico, en las condiciones utilizadas, retiene específicamente a la proteína Hat2p recombinante, a través de la cola de polihistidina, y con ella a las proteínas que lleve unidas, Hat1p como cabe esperar.

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 14. Si se observa el perfil de elución del extracto total de esta cepa, se ve que el mutante *hat2* transformado recupera el fenotipo silvestre en cuanto a la actividad HAT. El perfil de actividad de esta cepa transformante es muy similar al de la cepa silvestre (ver figura 12), lo que indica que la proteína de fusión expresada es capaz de sustituir completamente a la proteína nativa en la formación de complejos HAT. Cuando sometemos estas fracciones a cromatografía de afinidad en Ni²⁺-Sepharaosa, vemos que la actividad no retenida corresponde a un perfil similar al obtenido para un mutante *hat2* o un mutante *hat1* (ver figuras 10 y 12), y que sólo quedan retenidos en este tipo de soporte cromatográfico los complejos HAT A3 y HAT B. El ensayo de actividad con histonas libres, correspondiente a la fracción retenida, pone de manifiesto la especificidad de sustrato de estos dos complejos, sin ambigüedades debidas al solapamiento con otros enzimas presentes en la elución cromatográfica sobre Q-Sepharaosa. Tanto el enzima HAT A3 como el enzima HAT B acetilan exclusivamente la histona H4.

Por otra parte, este experimento corrobora la presencia de las proteínas Hat1 y Hat2, y su asociación física, en ambos complejos, ya que Hat1p, cuya actividad detectamos en este ensayo, coeluye con la proteína de fusión, lo que indica una interacción estable en los complejos. En conclusión, estos resultados demuestran que tanto Hat1p como Hat2p forman parte de dos complejos con actividad HAT específicos por la histona H4.

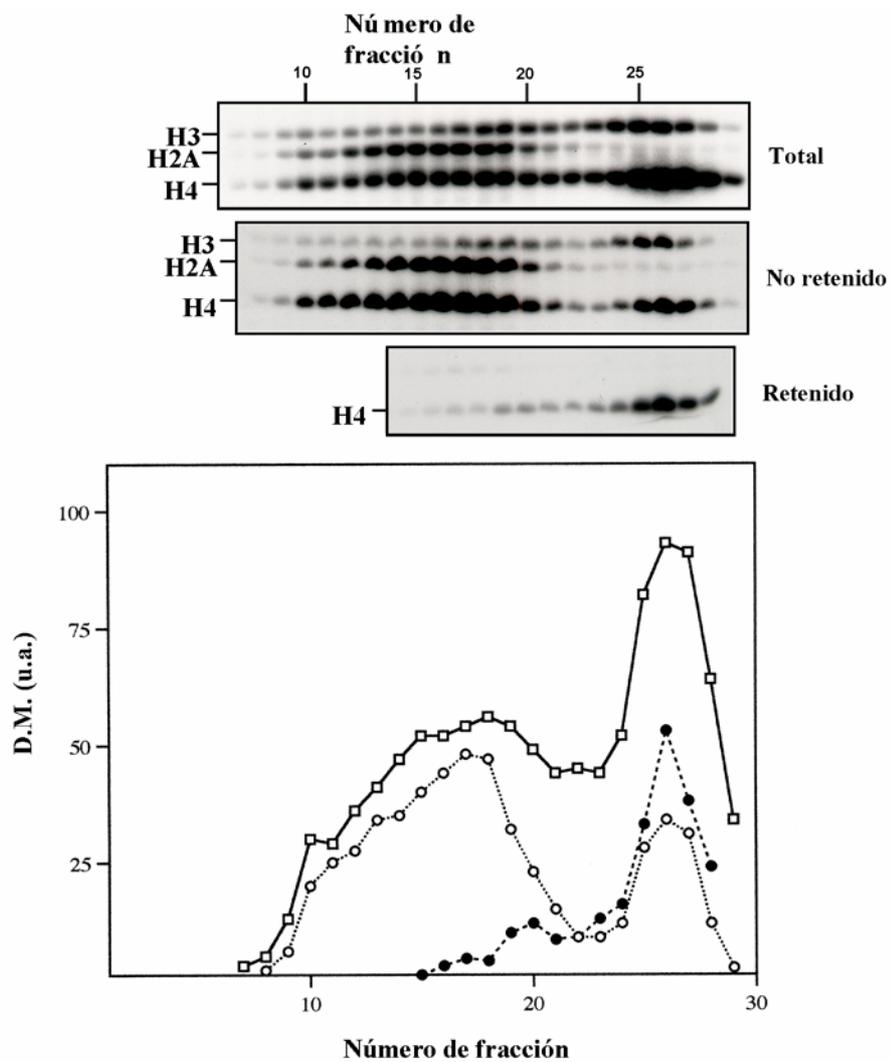


Figura 14. Especificidad de sustrato de los complejos HAT A3 y HAT B. Un extracto total obtenido de la cepa UCC623 (mutante *hat2*) transformada con el plásmido pPK90, que contiene la secuencia codificante para Hat2p-HA-(His)₆, se cromatografió sobre Q-Sepharosa y las fracciones eluidas se ensayaron para determinar la actividad HAT (panel total). Estas mismas fracciones se cromatografiaron sobre Ni²⁺-Sepharosa, eluyéndose las proteínas retenidas con 50 mM EDTA. Se determinó la actividad HAT en el no retenido (panel no retenido) y en el eluido (panel retenido). Se muestran las fluorografías y el densitometrado de la marca incorporada a la histona H4 en las fracciones de Q-Sepharosa (□), y del no retenido (○) y retenido (●) en la cromatografía de afinidad sobre Ni²⁺-Sepharosa.

3.3.2.4. Masa molecular de los complejos HAT A3 y HAT B

Aunque queda demostrado que Hat1p se encuentra en el núcleo de *Saccharomyces cerevisiae*, los complejos HAT A3 y HAT B podrían tratarse de un único enzima que tuviera diferentes localizaciones subcelulares a lo largo del ciclo de la levadura. Sin embargo, esta hipótesis no está de acuerdo con el hecho de que estos dos complejos se comporten de forma diferente en la cromatografía de intercambio iónico. Con objeto de estudiar las posibles diferencias existentes entre estos dos complejos, se estimó la masa molecular de cada uno de ellos mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Para ello se reunieron y concentraron por ultrafiltración fracciones procedentes de Q-Sepharosa conteniendo a los enzimas HAT A3 y HAT B (fracciones 25 a 28 para el enzima B, figura 13A; fracciones 19 a 22 para el enzima A3, figura 13B), y se aplicaron sobre un gradiente de sacarosa. Tras la ultracentrifugación, los gradientes fueron fraccionados y ensayados para determinar la actividad HAT. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 15. En ambos casos, la actividad HAT obtenida se detecta en un único pico (figura 15A). La identificación de los complejos HAT A3 y HAT B en el gradiente se determinó por su especificidad por la histona H4, tal y como se muestra en la figura 15C. Según el calibrado del gradiente (figura 15B) se obtuvo una masa molecular de 150 kDa para el complejo HAT B, menor que los 200 kDa obtenidos por Parthun *et al.* (1996) para el enzima citoplásmico y ligeramente mayor que el descrito por López-Rodas *et al.* (1985) de 130 kDa para el enzima B de levadura. En el caso del enzima HAT A3, la estimación es de unos 110 kDa. Por lo tanto, podemos concluir que los enzimas HAT A3 y B constituyen complejos proteicos con actividad HAT entre los que se encuentran, al menos, las proteínas Hat1 y Hat2. La diferencia de masa molecular entre estos complejos podría deberse a la

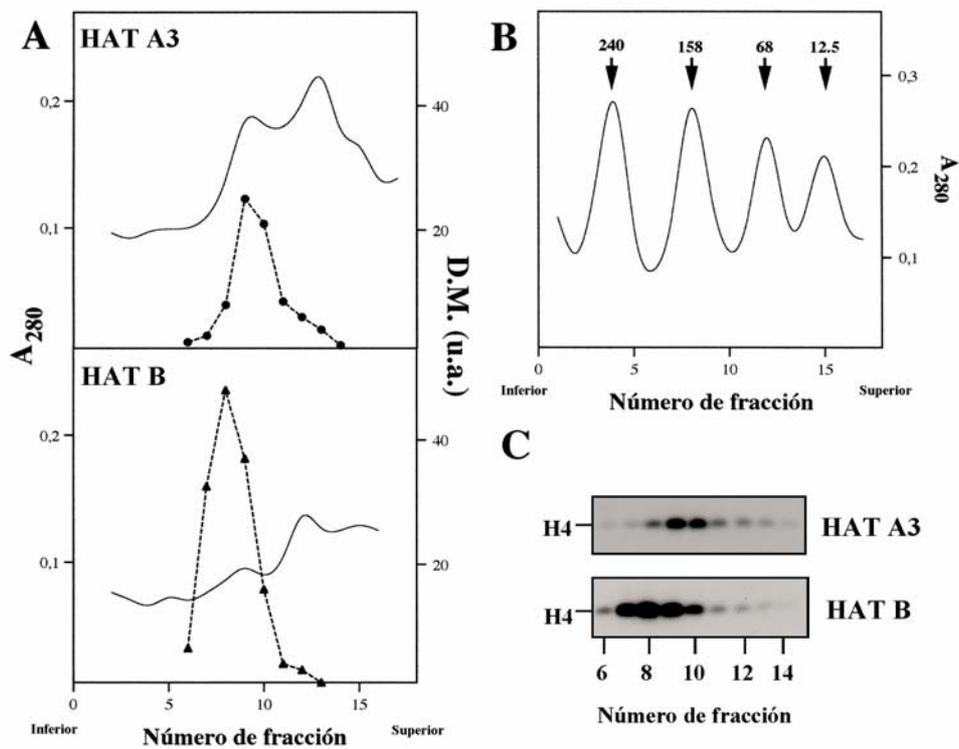


Figura 15. Determinación de las masas moleculares de los complejos HAT A3 y HAT B. **A)** Fracciones de Q-sepharose con actividad HAT, correspondientes a los complejos HAT A3 y HAT B, fueron concentradas y aplicadas en un gradiente de sacarosa del 7 al 18%. Tras la ultracentrifugación los gradientes fueron fraccionados y las fracciones ensayadas para determinar la actividad HAT. La línea discontinua representa la densidad de marca sobre la histona H4 determinada por densitometría de la fluorografía obtenida (mostrada en C). La línea continua representa la A_{280} de las fracciones recogidas. **B)** Posición de los patrones utilizados para el calibrado del gradiente: catalasa, 240 kDa; aldolasa, 158 kDa; BSA, 68 kDa; y citocromo c, 12.5 kDa.

presencia en el complejo B de alguna proteína adicional, o bien a una modificación de alguna de las proteínas del complejo que alterase su conformación, afectando a sus propiedades de sedimentación. Estas dos posibilidades explicarían también el diferente comportamiento de ambos complejos en la cromatografía de intercambio iónico.

Estos resultados además apoyan la idea de que los dos complejos, A3 y B, constituyen enzimas histona acetiltransferasa diferentes que, posiblemente, desempeñen diferentes funciones en el metabolismo de la célula.

3.3.2.5. Actividad del complejo HAT A3 frente a nucleosomas

El hecho de que HAT A3 sea una actividad nuclear, sugiere la posibilidad de que pueda actuar en el núcleo modificando la histona H4 incorporada a la cromatina. De hecho, HAT A3 se había descrito como una actividad nuclear capaz de modificar sustratos nucleosomales (López-Rodas *et al.*, 1991). Con el objeto de estudiar la capacidad de HAT A3 de modificar histonas nucleosomales, se ha ensayado la actividad HAT obtenida en extractos nucleares de cepas mutantes *hat1* y cepas silvestres, utilizando oligonucleosomas de eritrocito de pollo como sustrato. En la figura 16 se muestran los resultados de este estudio. Como se puede observar, no hay diferencias significativas entre la acetilación detectada para cada una de estas cepas. Al contrario que los estudios previos, los resultados presentados indican que el complejo A3 no es capaz de acetilar sustratos nucleosomales *in vitro*. La discrepancia entre estos resultados podría deberse al solapamiento, en estudios previos, de este enzima con otra actividad HAT que si tuviese capacidad de modificar nucleosomas. En el fraccionamiento

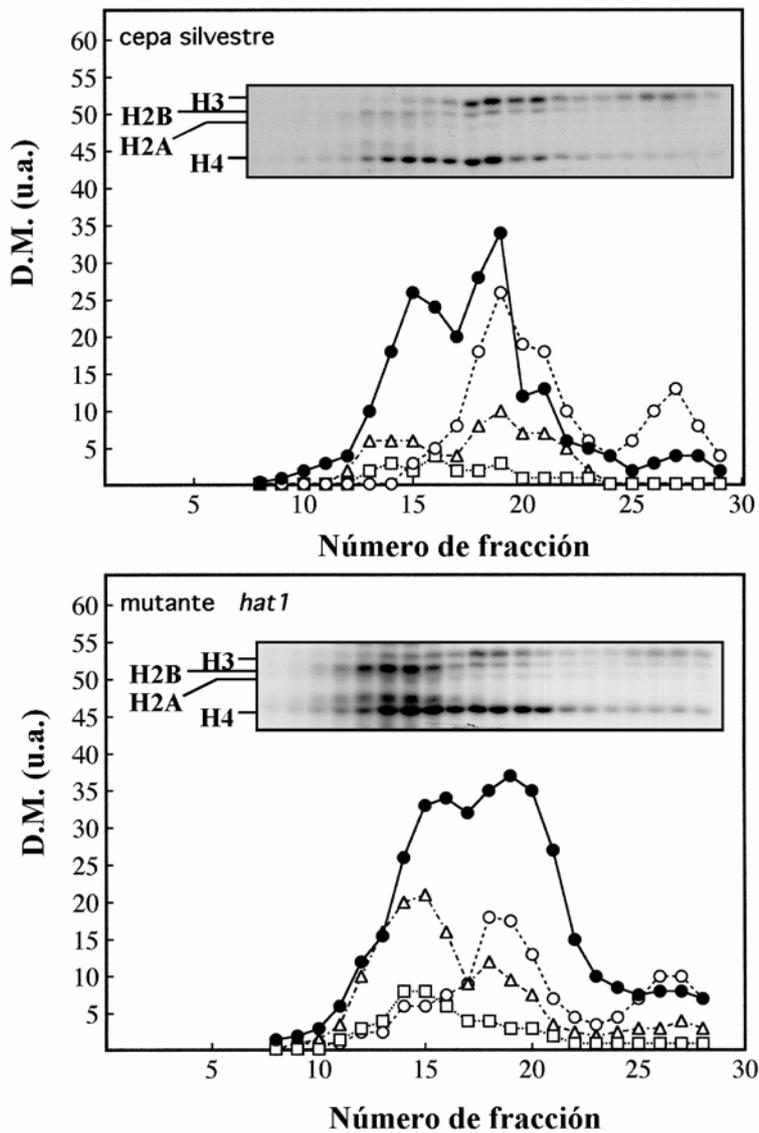


Figura 16. Actividades nucleares que acetilan nucleosomas en cepas de levadura tipo silvestre y *hat1*. Se prepararon extractos nucleares obtenidos de las cepas silvestre (BMA64-1a) y mutante en *HAT1* (BQS176) y se fraccionaron en Q-sepharose. Las fracciones eluidas fueron dializadas y ensayadas utilizando oligonucleosomas de eritrocito de pollo como sustrato. Se muestra la fluorografía obtenida tras la separación electroforética de las histonas. Se representa frente al número de fracción la densidad de marca detectada en las histonas H3 (○), H2B (Δ), H2A (□) y H4 (●). La posición de las cuatro histonas internas está indicada en las fluorografías.

realizado en este trabajo, se ha mejorado la resolución de los enzimas, mediante el gradiente de NaCl utilizado en la elución, como se ha comentado anteriormente. Por otro lado, el uso de mutantes de levadura en genes que codifican para subunidades catalíticas facilita considerablemente la identificación de los enzimas y el estudio de especificidad de sustrato de los picos de actividad.

Algunos autores han propuesto para el enzima HAT B, basándose en su especificidad de sustrato y en su localización citoplásmica, funciones relacionadas con el ensamblaje de la cromatina tras la replicación del DNA (Kleff *et al.*, 1995; Eberharter *et al.*, 1996; Dutnall *et al.*, 1998) y con la generación del patrón de acetilación observado en la heterocromatina previo a su ensamblaje (Grunstein, 1997). Aunque existe la posibilidad de que HAT A3 sea capaz de modificar la cromatina *in vivo*, la función de este enzima en la célula podría ser la de acetilar histonas libres en el núcleo. Hay que tener en cuenta que la estructura de la cromatina, y su estado de acetilación, está sujeta a cambios como consecuencia de procesos celulares que son independientes de la fase de replicación de la cromatina, como por ejemplo la pérdida de nucleosomas en regiones reguladoras o durante procesos de reparación. La función del enzima HAT A3 en el núcleo podría ser, por tanto, la acetilación de histonas libres relacionada con el mantenimiento del patrón de acetilación necesario en procesos de re-ensamblaje de la cromatina.

3.4. Identificación de una nueva actividad HAT en *Saccaromyces cerevisiae*

El análisis del contenido en actividades HAT tanto de mutantes *hat1* como de mutantes *hat2*, ha permitido identificar en nuestro sistema de fraccionamiento, un nuevo enzima histona acetiltransferasa en levadura que no había sido descrito. En las figuras 10 y 12, donde se muestran las actividades HAT presentes en mutantes *hat1*, *hat2* y dobles mutantes *hat1 hat2*, se observa una acetilación sobre las histonas H3 y H4 (fracciones 24 a 28, mutante *hat1*, figura 10; fracciones 24 a 28, mutante *hat2*, figura 12; fracciones 27 a 31, doble mutante *hat1 hat2*, figura 12), coincidiendo con las fracciones en las que cabría esperar el complejo HAT B. La ausencia de HAT B permite detectar este nuevo enzima que acetila a la histona H3 y también la histona H4, aunque en menor medida. Esta nueva actividad HAT tiene una localización nuclear, como se puede observar en los perfiles de actividad obtenidos de extractos nucleares, tanto de cepas mutantes en *HAT1* como de cepas tipo silvestre (fracciones 24 a 29, figura 13B, C). En base a su localización nuclear se ha denominado a este enzima HAT A4.

En la figura 17, se muestra el perfil de actividad obtenido con una cepa de levadura doble mutante *gcn5 hat1* (cepa BQS177-3d), y el obtenido para una cepa mutante *gcn5* (cepa GMY27), como control. En este doble mutante no se encuentran ninguno de los complejos histona acetiltransferasa dependientes de *GCN5* y de *HAT1*, los complejos HAT A2, HAT A3 y HAT B. Los únicos enzimas presentes en esta cepa son el complejo previamente descrito como HAT A1, y la nueva actividad HAT A4. Por otro lado, los resultados obtenidos con este doble mutante *gcn5 hat1* muestran que el fenotipo de esta cepa no es más que la suma de los fenotipos de los mutantes sencillos, en cuanto a actividades HAT se refiere. Tampoco se ha

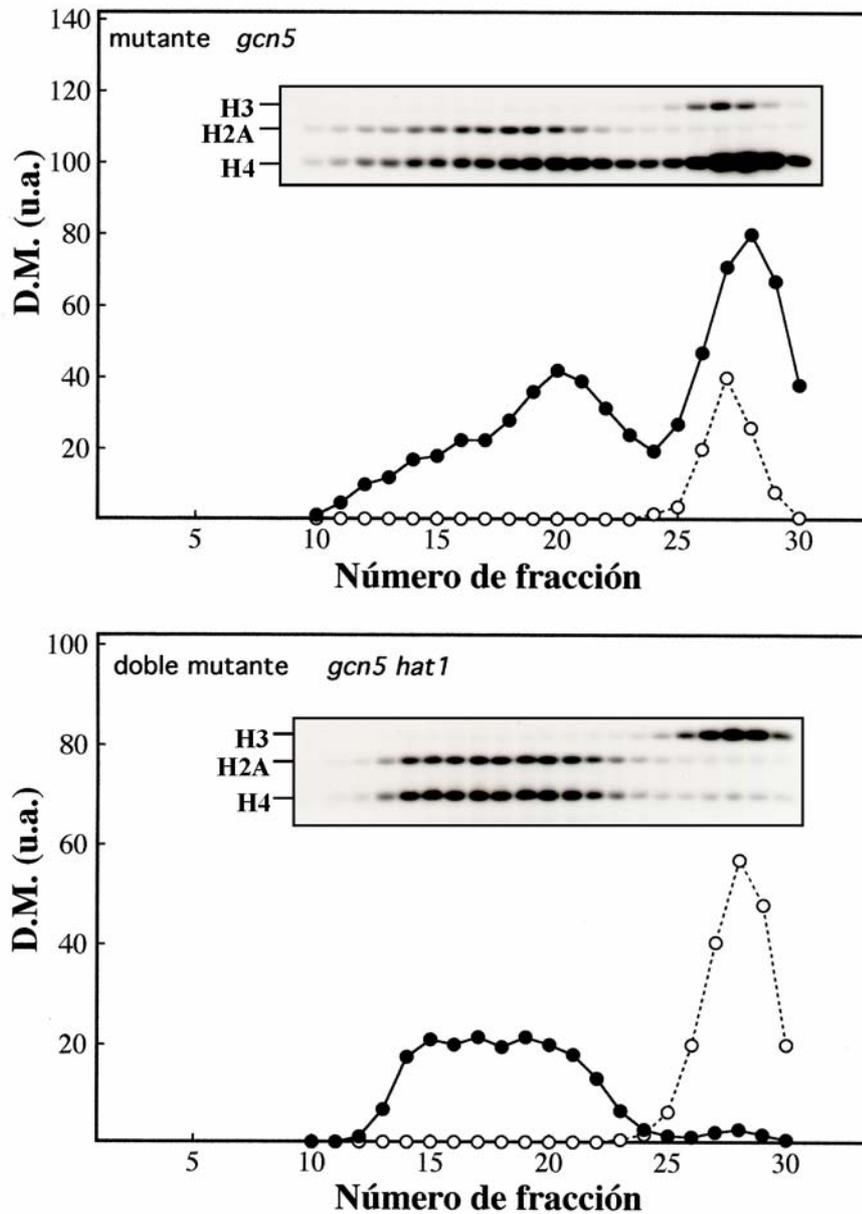


Figura 17. Análisis del contenido en actividad HAT en cepas de levadura mutantes en *HAT1* y *GCN5*. Extractos totales de las cepas de levadura GMY27 (mutante *gcn5*) y BQS177-3d (doble mutante *gcn5 hat1*) fueron cromatografiados en Q-Sepharosa. Se muestran las fluorografías obtenidas tras ensayar las fracciones eluidas con histonas totales de eritrocito de pollo. En las gráficas se representa la densidad de marca incorporada a las histonas H3 (○) y H4 (●) $\times 0.5$. Las posiciones de las histonas H3, H2A y H4 se indican en las fluorografías.

encontrado otro fenotipo en esta cepa que no sea el defecto de crecimiento que provoca la delección del gen *GCN5*. Por lo tanto, no hay ningún tipo de sinergismo entre estos dos enzimas HAT. Esto se debe probablemente a una ausencia de relación funcional entre las dos histona acetiltransferasas.

El enzima HAT A4 es capaz de acetilar las histonas H3 y H4, no sólo en su forma libre sino también en nucleosomas, como se puede observar en la figura 16. En los dos perfiles de elución mostrados en esta figura, se observa acetilación sobre las histonas H3 y H4 en las fracciones correspondientes al enzima HAT A4 (fracciones 25 a 29), aunque el nivel de acetilación es bajo en comparación con el obtenido, sobre estas mismas histonas, cuando se utilizan histonas libres como sustrato (compárese, por ejemplo, la marca radiactiva sobre H3 en las figuras 13B y C con la figura 16). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las propiedades enzimáticas de este nuevo enzima HAT A4 no se conocen, y así, las condiciones óptimas de ensayo con distintos sustratos están por determinar. Además, el estado conformacional y de compactación de los oligonucleosomas es fuertemente dependiente de las condiciones del medio, particularmente de las concentraciones de cationes mono- y divalentes (Hansen, 1997). Así, la accesibilidad de las histonas nucleosomales, para servir como sustrato de los enzimas HAT, podría depender también de las condiciones de ensayo. En un intento de mostrar más claramente la capacidad del enzima HAT A4 de acetilar nucleosomas, se modificó la concentración de NaCl en el ensayo con oligonucleosomas. En la figura 18 se muestra la actividad HAT de las fracciones cromatográficas correspondientes a una cepa tipo silvestre (YPH250) ensayada con histonas libres en presencia de 150 mM NaCl (panel A) y con oligonucleosomas de eritrocito de pollo, a dos concentraciones distintas de NaCl (10 mM NaCl, panel B y 150 mM NaCl, panel C). Como se puede observar la actividad de HAT A4 frente a

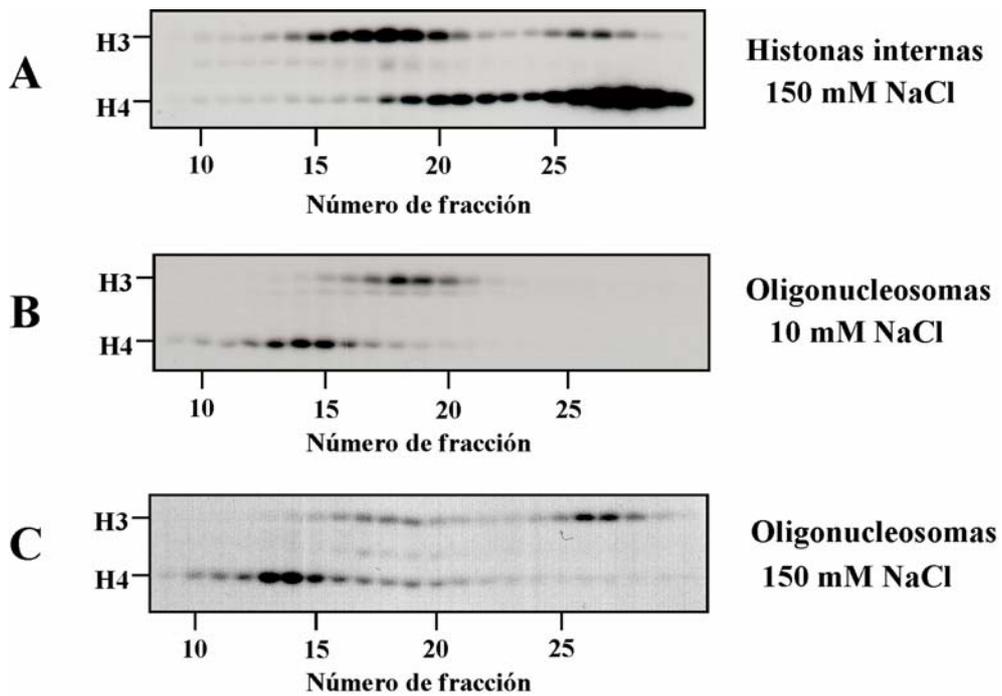


Figura 18. Actividad del enzima HAT A4 sobre nucleosomas. Se ensayó la actividad HAT de las fracciones cromatográficas obtenidas tras el fraccionamiento del extracto total de una cepa silvestre (YPH250) en diferentes condiciones: **A)** Después de la cromatografía y tras la diálisis frente a tampón B 150 mM NaCl, utilizando histonas internas de eritrocito de pollo como sustrato; **B)** tras una diálisis frente a tampón B 10 mM NaCl y utilizando oligonucleosomas como sustrato; **C)** tras una diálisis frente a tampón B 150 mM NaCl y utilizando oligonucleosomas como sustrato. Se muestran las fluorografías obtenidas en los tres casos en las que se han indicado las posiciones de las histonas H3 y H4.

nucleosomas es muy baja cuando se ensaya en condiciones de baja fuerza iónica (10 mM NaCl, figura 18B y figura 16). Sin embargo, cuando se aumenta la concentración de NaCl (150 mM) en el medio de ensayo, la incorporación de radiactividad sobre la histona H3 en nucleosomas, debida al enzima HAT A4, es mucho mayor. El nivel de acetilación sobre la histona H3 en nucleosomas en estas condiciones (figura 18C) es similar al obtenido con histonas libres (figura 18A).

Finalmente, en la figura 18 se puede observar que ninguno de los enzimas HAT A3 y HAT B modifica a las histonas en nucleosomas, bajo las condiciones de fuerza iónica empleadas, confirmando los resultados discutidos anteriormente.

En conclusión HAT A4, una actividad HAT no descrita hasta el momento, es un enzima nuclear que acetila las histonas H3 y H4, tanto en forma libre como en nucleosomas.

3.5. Análisis de cepas de levadura mutantes en *TAF130* y *ESA1*

Los resultados obtenidos con los diferentes mutantes de levadura que se han analizado en este trabajo permiten establecer la presencia, en nuestros perfiles cromatográficos, de cinco actividades HAT. Uno de estos complejos enzimáticos es dependiente de *GCN5* y otros dos lo son de *HAT1*, de acuerdo con los resultados expuestos. Así, cuando se emplean cepas dobles mutantes *gcn5 hat1* (ver figura 17), se observa en los perfiles de elución cromatográfica la presencia de sólo otras dos actividades HAT, el enzima HAT A1, previamente descrito, y la actividad HAT A4 identificada en este trabajo. El enzima HAT A1 acetila principalmente las histonas H4 y H2A, cuando se ensaya con histonas libres, y las cuatro histonas internas, aunque con distinta extensión, cuando se ensaya con nucleosomas (López-Rodas *et al.*, 1991; ver también figura 16). El enzima HAT A4 acetila las histonas H3 y H4, tanto en forma libre como formando parte de nucleosomas.

Por otro lado, en levadura se han descrito otras dos proteínas con actividad HAT, una de ellas es un componente del factor de transcripción TFIID, la proteína TAF_{II}130 (Mizzen *et al.*, 1996), y la otra es la proteína Esa1 (Smith *et al.*, 1998), desconocida hasta el momento de su identificación como histona acetiltransferasa. Los estudios de especificidad realizados con estas proteínas aisladas, demuestran que ambas acetilan a las histonas H3 y H4, pero además Esa1p modifica también la histona H2A. Los genes que codifican para estas dos proteínas de levadura son esenciales para la viabilidad celular. Al objeto de intentar identificar los complejos de los que estas proteínas constituyen la subunidad catalítica se analizaron diferentes tipos de mutantes en estos dos genes, como se describe a continuación.

Dado que los genes que codifican para estas dos proteínas son esenciales no pueden obtenerse mutantes nulos, lo que impide realizar un estudio similar al descrito para los genes *GCN5* y *HAT1*. Por lo tanto, para estudiar la posible presencia de las proteínas TAF_{II}130 y Esa1 en los complejos enzimáticos, se emplearon diferentes tipos de mutantes condicionales. Estos mutantes de levadura se cultivan en condiciones no restrictivas, que permiten obtener una masa celular adecuada, tras lo cual son transferidos a condiciones restrictivas. Dos horas después de la parada del crecimiento, como consecuencia de la pérdida de la función esencial, se recogen las células y se analiza su contenido en actividad HAT.

En la figura 19 se muestran los resultados obtenidos con diferentes mutantes condicionales en *TAF130*. En el apartado A de esta figura se muestran los perfiles de elución de Q-Sepharosa obtenidos con una cepa de levadura en la que se ha sustituido el promotor del gen que codifica para esta proteína por el promotor *tetO*, regulable por tetraciclina y sus análogos como la doxiciclina (Garí *et al.*, 1997), de manera que la expresión del gen se reprime cuando la levadura se cultiva en presencia de antibiótico. Como se puede observar, el perfil de actividad obtenido para este mutante es muy similar al de la cepa silvestre, detectándose sólo pequeñas diferencias cuantitativas.

Un segundo mutante condicional de *TAF130* empleado es la cepa termosensible YSW93 descrita por Walker *et al.* (1996). Esta cepa de levadura es incapaz de crecer a temperatura restrictiva (37°C), como consecuencia de la termosensibilidad de la proteína TAF_{II}130. Tras dos horas de incubación a esta temperatura, la proteína desaparece de la célula, como han demostrado los autores mediante el uso de anticuerpos. El análisis del contenido en actividades HAT de este mutante termosensible se muestra en la figura 19. El perfil de actividad HAT es similar en extractos obtenidos

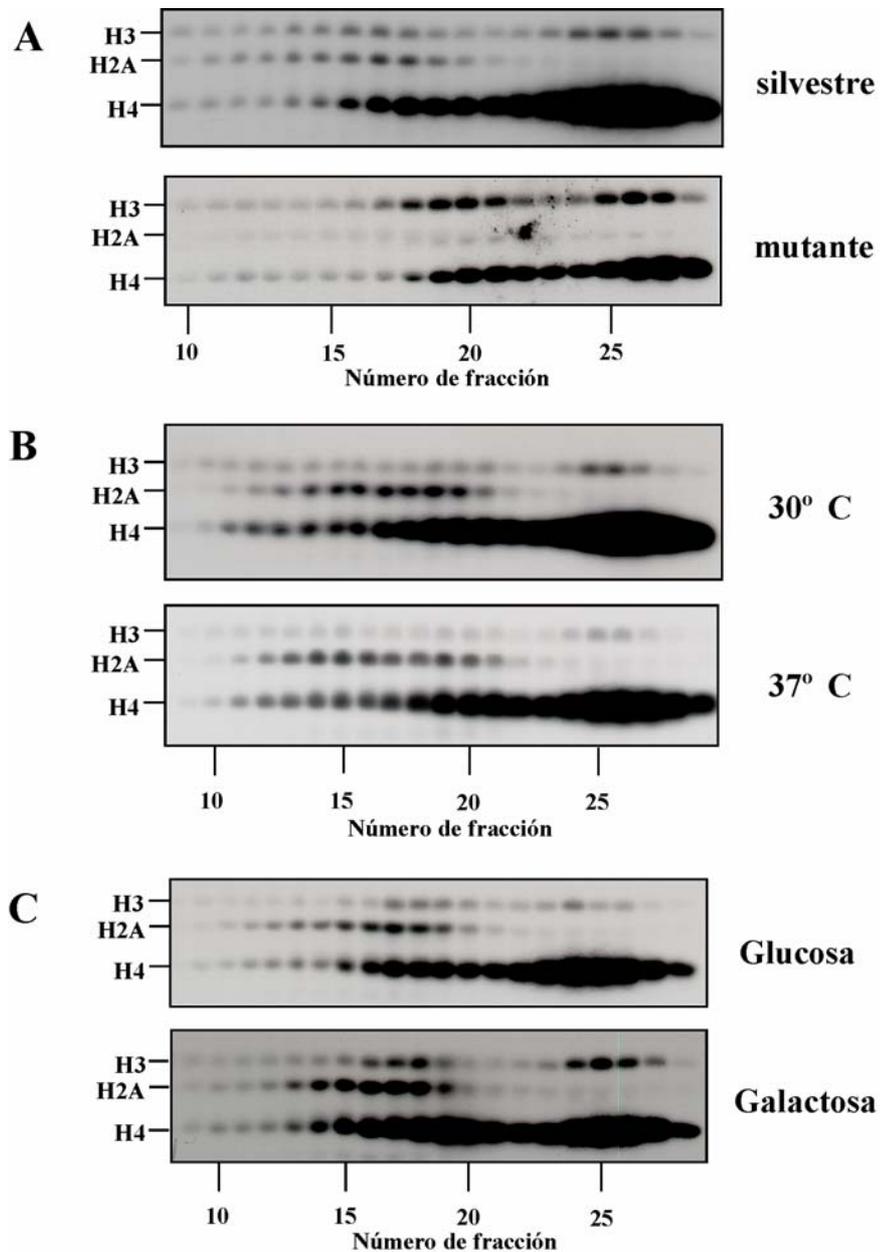


Figura 19. Actividades HAT en diferentes cepas de levadura mutantes en *TAF130*. **A)** Fluorografías obtenidas tras fraccionar en Q-sepharosa extractos totales de las cepas de levadura FY1679 (cepa silvestre) y BQS265 (mutante *taf130* reprimible por doxiciclina) cultivadas en presencia de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxiciclina durante 12h. **B)** Fluorografías correspondientes a las fracciones eluidas de Q-sepharose de extractos totales de la cepa de levadura YSW93 (mutante *taf130* termosensible) cultivada a 30 °C y a 37°C. **C)** Fluorografías obtenidas tras cromatografiar en Q-sepharose extractos totales de la cepa YSW94 (mutante *taf130* reprimible por glucosa) cultivada en presencia de glucosa y en presencia de galactosa. En todos los casos las fracciones cromatográficas se ensayaron utilizando histonas libres como sustrato. Se indica la posición de las histonas H3, H2A y H4 en las fluorografías.

de cultivos crecidos a temperatura permisiva (30°C) y de aquellos preparados tras cuatro horas de incubación a temperatura restrictiva (37°C).

Para confirmar los resultados obtenidos con los mutantes condicionales anteriores, se utilizó un tercer mutante para *TAF130*. En este caso se analizó el contenido en actividades HAT de un mutante condicional *TAF130* en el que el promotor del gen ha sido sustituido por el promotor *GAL* (Walker *et al.*, 1996). En este mutante se produce una sobreexpresión del gen cuando se cultiva la levadura en presencia de galactosa como fuente de carbono, mientras que la expresión de la proteína se detiene en presencia de glucosa. También en este caso la proteína desaparece después de cuatro horas de incubación en un medio con glucosa, como lo demuestran los autores mediante inmunodetección. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 19C. De nuevo la actividad HAT obtenida en un medio con galactosa (condiciones no restrictivas) es muy similar a la obtenida cuando la cepa se cultiva durante seis horas en presencia de glucosa (condiciones restrictivas).

Por lo tanto, los resultados obtenidos con los distintos mutantes condicionales indican que la proteína TAF_{II}130 no se encuentra en ninguno de los complejos con actividad HAT detectados en nuestros gradientes. El hecho de que no se detecte la actividad HAT de TAF_{II}130 en nuestros gradientes podría deberse a que el complejo, del que esta proteína forma parte, no se obtuviera con el procedimiento de extracción y fraccionamiento utilizado. Se ha ensayado la actividad HAT en la fracción no retenida en Q-Sepharosa, así como en las fracciones que eluyen de la columna a alta fuerza iónica (1M NaCl) y, aunque en ningún caso se ha detectado actividad HAT, el elevado contenido en proteínas y ácidos nucleicos de estas fracciones podría interferir en el ensayo de actividad. Otra posibilidad es que la actividad HAT de la proteína TAF_{II}130 sea minoritaria con respecto a los complejos aislados, o que presentara una particular inestabilidad *in vitro*,

lo que dificultaría su identificación mediante el protocolo utilizado en este trabajo.

Con la intención de identificar el complejo con actividad HAT del que forma parte la proteína Esa1, se analizaron dos tipos de mutantes en *ESAI*. Uno de ellos es un mutante condicional en el que el promotor del gen *ESAI* ha sido sustituido por el promotor *tetO*, regulable por tetraciclina, similar al descrito para TAF_{II}130. En la figura 20B se muestra el perfil de actividad del fraccionamiento en Q-Sepharosa de un extracto de esta cepa (BQS287) obtenido después de cultivar la levadura en presencia de antibiótico. Como se puede observar el perfil de actividad HAT es muy similar al obtenido con la cepa silvestre (figura 20A).

El otro mutante analizado es una cepa de levadura (ESA1G/E) en la que el gen *ESAI* ha sido sustituido por una secuencia codificante para la proteína Esa1 con una sustitución aminoacídica. Esta mutación puntual afecta severamente a la actividad HAT de Esa1p cuando se ensaya *in vitro*, aunque no tiene consecuencias para la viabilidad celular (Smith *et al.*, 1998). Los autores sugieren que, o bien la esencialidad de esta proteína no depende de su actividad HAT, o bien *in vivo* la proteína posee actividad HAT como consecuencia de una mayor estabilidad. El análisis del contenido en actividades HAT de este mutante (figura 20C) no revela ninguna diferencia con respecto a la cepa silvestre (figura 20A). Por lo tanto, se puede concluir, de los resultados obtenidos con los dos mutantes del gen *ESAI*, que la proteína Esa1, igual que la proteína TAF_{II}130, no forma parte de ninguno de los complejos con actividad HAT detectables en nuestros gradientes. Los motivos por los que no se detecta esta proteína con nuestro protocolo de fraccionamiento, podrían ser los mismos que para la proteína TAF_{II}130.

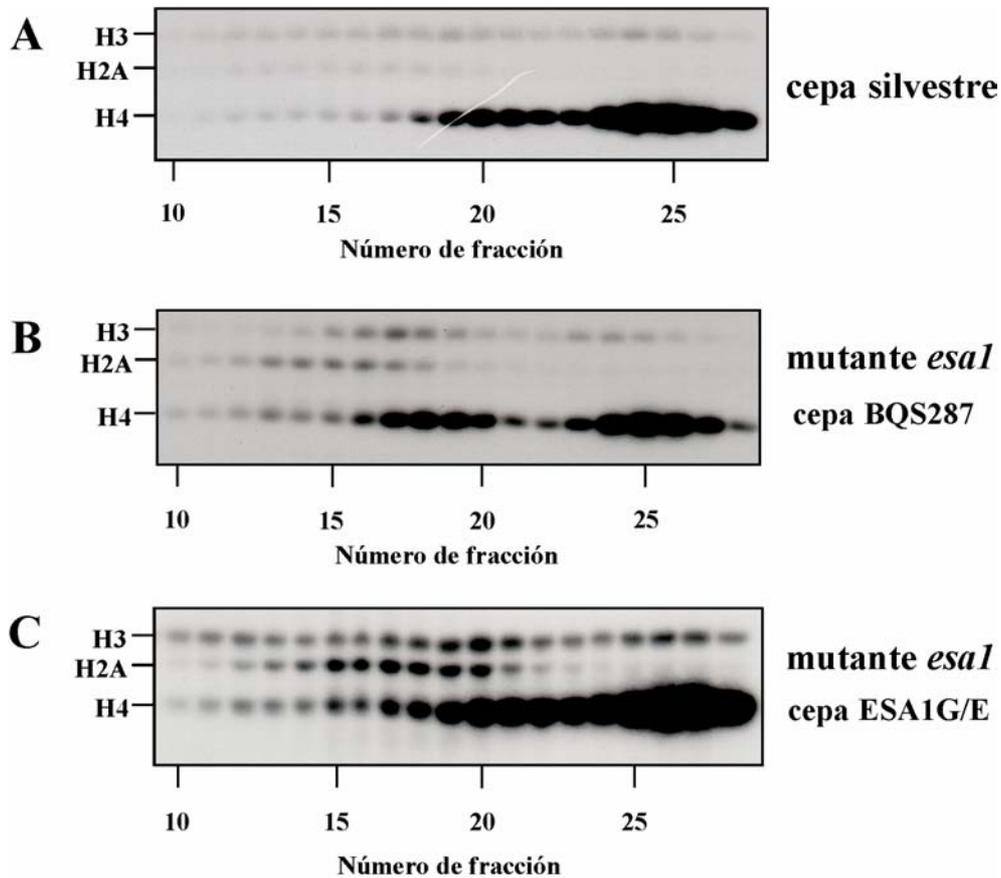


Figura 20. Contenido en actividad HAT de cepas de levadura mutantes en *ESAI*. **A)** Fluorografía correspondiente a la cepa de levadura tipo silvestre FY1679. **B)** Fluorografía obtenida tras cromatografiar en Q-sepharose un extracto total de la cepa BQS287 (mutante *esal* reprimible por doxiciclina) cultivada en presencia de 1 μ g/mL doxiciclina, durante 6h. Las fracciones cromatográficas fueron ensayadas con histonas libres. **C)** Un extracto total de la cepa ESA1G/E (mutante *esal*) se fraccionó en Q-sepharose. Se muestra la fluorografía obtenida tras ensayar las fracciones cromatográficas con histonas libres de eritrocito. En todas las fluorografías se indica la posición de las histonas H3, H2A y H4.

Otros autores han identificado en levadura otros dos complejos multiproteicos con actividad HAT, denominados NuA3 y NuA4 (Grant *et al.*, 1997), cuyas subunidades catalíticas no han sido identificadas. El enzima NuA3 acetila principalmente la histona H3, mientras que NuA4 es capaz de acetilar la histona H4 y en menor grado la histona H2A. Ambas actividades son capaces de modificar nucleosomas. La especificidad de estos enzimas coincide parcialmente con los complejos HAT A1 y HAT A4 detectados en nuestros gradientes. HAT A1 acetila las histonas H4 y H2A libres, aunque también es capaz de acetilar débilmente las histonas H2B y H3 sobre nucleosomas. El enzima HAT A4 acetila la histona H3 y, en menor medida, la histona H4, tanto en su forma libre como en nucleosomas. Aunque hay similitudes en cuanto a la especificidad de histona de estos enzimas no es posible una comparación directa, debido a las diferencias existentes en el protocolo de extracción y purificación.

Todos estos datos apuntan a una gran multiplicidad de enzimas histona acetiltransferasa. Esta multiplicidad viene determinada no sólo por la presencia de varias subunidades catalíticas, sino también por la asociación de estas proteínas con distintos factores en la formación de diferentes complejos multiproteicos. Al igual que se ha descrito en este trabajo para Hat1p, Gcn5p se ha encontrado en diferentes complejos de levadura en los que acetila nucleosomas, como ADA, SAGA y HAT A2. La existencia de diferentes complejos podría tener significado fisiológico, ya que se han encontrado diferencias en cuanto a los requerimientos de los complejos ADA y SAGA para acetilar nucleosomas (Sterner *et al.*, 1999). De esta forma, la asociación de una misma subunidad catalítica con diferentes factores determinaría la existencia de complejos con diferentes propiedades, capaces de llevar a cabo diferentes funciones en el metabolismo de la célula.

4. Conclusiones

En el trabajo presentado se ha analizado el contenido en actividad HAT de diversas cepas de levadura mutantes en genes relacionados con la acetilación de histonas. Los resultados obtenidos mediante el análisis de estos mutantes se resumen en las siguientes conclusiones:

Gcn5p es la subunidad catalítica del complejo HAT A2, una actividad HAT de levadura previamente descrita por métodos bioquímicos. Gcn5p, formando parte de este complejo, es capaz de acetilar la histona H3 tanto en su forma libre como en nucleosomas. El complejo HAT A2 contiene además las proteínas Ada2 y Ada3, cuya interacción con Gcn5p está ampliamente demostrada. Las proteínas Ada se requieren para la acetilación eficiente de nucleosomas por parte de la proteína Gcn5.

Las proteínas Hat1, como subunidad catalítica, y Hat2 forman parte de dos complejos histona acetiltransferasa en levadura, los complejos HAT A3 y HAT B previamente descritos. HAT B es un enzima citoplásmico específico por la histona H4 libre, de acuerdo con resultados anteriores. HAT A3 es una actividad nuclear que presenta la misma especificidad de sustrato. Por lo tanto, estos dos complejos histona acetiltransferasa con diferentes localizaciones subcelulares y, presumiblemente diferentes funciones, comparten subunidades proteicas. HAT A3 y HAT B, aunque presentan una misma especificidad de sustrato, difieren en su masa molecular, su localización subcelular y su comportamiento cromatográfico.

HAT A4, un nuevo enzima identificado en este trabajo, es una actividad histona acetiltransferasa nuclear, capaz de acetilar las histonas H3 y, en menor medida, H4 tanto en forma libre como en nucleosomas.

Las proteínas con actividad histona acetiltransferasa de levadura, Esa1p y TAF_{II}130, no forman parte de ninguno de los complejos con actividad HAT que se detectan con el método utilizado en este trabajo. Por

lo tanto, quedan aún por identificar las subunidades catalíticas de los otros dos complejos que se detectan en nuestros gradientes, el enzima HAT A1 previamente descrito y el enzima HAT A4 identificado en este trabajo.

Los resultados obtenidos en este trabajo, junto con resultados de otros autores, apoyan la existencia en levadura de múltiples actividades histona acetiltransferasa. Esta multiplicidad de enzimas se debe tanto a la diversidad de subunidades catalíticas como a la presencia de estas proteínas en diferentes complejos, asociadas con distintos factores proteicos. La función de estos enzimas vendría determinada, por tanto, no sólo por la subunidad catalítica, sino también por el resto de factores asociados a ella.

5. Bibliografía

Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R. A. (1997) Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* **387**, 49-55

Allfrey, V., Faulkner, R. M., and Mirsky, A. E. (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 786-794

Amati, B. B., and Gasser, S. M. (1988) Chromosomal ARS and CEN elements bind specifically to the yeast nuclear scaffold. *Cell* **54**, 967-978

Aparicio, O. M., Billington, B., and Gottschling, D. E. (1991) Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **66**, 1279-1287

Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384**, 641-643

Bartsch, J., Truss, M., Bode, J., and Beato, M. (1996) Moderate increase in histone acetylation activates the mouse mammary tumor virus promoter and remodels its nucleosome structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 10741-10746

Bauer, W. R., Hayes, J. J., White, J. H., and Wolffe, A. P. (1994) Nucleosome structural changes due to acetylation. *J. Mol. Biol.* **236**, 685-690

Berger, S. L., Piña, B., Silverman, N., Marcus, G. A., Agapite, J., Regier, J. L., Triezenberg, S. J., and Guarente, L. (1992) Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell* **70**, 251-265

Braunstein, M., Rose, A. B., Holmes, S. G., Allis, C. D., and Broach, J. R. (1993) Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev.* **7**, 592-604

Braunstein, M., Sobel, R. E., Allis, C. D., Turner, B. M., and Broach, J. R. (1996) Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol. Cell Biol.* **16**, 4349-4356

Brownell, J. E., and Allis, C. D. (1995) An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6364-6368

Brownell, J. E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., and Allis, C. D. (1996) *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p. Linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**, 843-851

Burley, S. K., and Roeder, R. G. (1996) Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 769-799

Candau, R., and Berger, S. L. (1996) Structural analysis of yeast putative adaptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 5237-5245

Candau, R., Moore, P. A., Wang, L., Barlev, N., Ying, C. Y., Rosen, C. A., and Berger, S. L. (1996) Identification of humans proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 593-602

Candau, R., Zhou, J., Allis, C. D., and Berger, S. L. (1997) Histone acetyltransferase activity and interaction with ADA2 are critical for GCN5 function *in vivo*. *EMBO J.* **16**, 555-565

Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L., Nakatani, Y., and Evans, R. M. (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* **90**, 569-580

De Rubertis, F., Kadosh, D., Henchoz, S., Pauli, D., Reuter, G., Struhl, K., and Spierer, P. (1996) The histone deacetylase RPD3 counteracts genomic silencing in *Drosophila* and yeast. *Nature* **384**, 589-591

Durrin, L. K., Mann, R. K., Kayne, P. S., and Grunstein, M. (1991) Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation *in vivo*. *Cell* **65**, 1023-1031

Dutnall, R. N., Tafrov, S. T., Sternglanz, R., and Ramakrishnan, V. (1998) Structure of the histone acetyltransferase Hat1: a paradigm for the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily. *Cell* **94**, 427-438

- Eberharter, A., Lechner, T., Goralik-Schramel, M., and Loidl, P. (1996) Purification and characterization of the cytoplasmic histone acetyltransferase B of maize embryos. *FEBS Letters* **386**, 75-81
- Edmondson, D. G., Smith, M. M., and Roth, S. Y. (1996) Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev.* **10**, 1247-1259
- Ehrenhofer-Murray, A. E., Rivier, D. H., and Rine, J. (1997) The role of Sas2, an acetyltransferase homologue of *Saccharomyces cerevisiae*, in silencing and ORF function. *Genetics* **145**, 923-934
- Enomoto, S., McCune-Zierath, P. D., Gerami-Nejad, M., Sanders, M. A., and Berman, J. (1997) RFL2, a subunit of yeast chromatin assembly factor-I, is required for telomeric chromatin function *in vivo*. *Genes Dev.* **11**, 358-370
- Enomoto, S., and Berman, J. (1998) Chromatin assembly factor I contributes to the maintenance, but not the re-establishment, of silencing at the yeast silent mating loci. *Genes Dev.* **12**, 219-232
- Gaillard, P.-H. L., Martini, E. M.-D., Kaufman, P. D., Stillman, B., Moustacchi, E., and Almouzni, G. (1996) Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor-I. *Cell* **86**, 887-896
- García-Ramírez, M., Dong, F., and Ausio, J. (1992) Role of histone "tails" in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1. *J. Biol. Chem.* **267**, 19587-19595
- García-Ramírez, M., Rocchini, C., and Ausio, J. (1995) Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J. Biol. Chem.* **270**, 17923-17928
- Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 837-848
- Gavin, K. A., Hidaka, M., and Stillman, B. (1995) Conserved initiator proteins in eukaryotes. *Science* **270**, 1667-1671
- Georgakopoulos, T., and Thireos, G. (1992) Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J.* **11**, 4145-4152

- Godde, J. S., Nakatani, Y., and Wolffe, A. P. (1995) The amino-terminal tails of the core histones and the translational position of the TATA box determine TBP/TFIIA association with nucleosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4557-4564
- Grant, P. A., Duggan, L., Côté, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F., Berger, S. L., and Workman, J. L. (1997) Yeast Gen5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* **11**, 1640-1650
- Grant, P. A., Schieltz, D., Pray-Grant, M. G., Steger, D. J., Reese, J. C., Yates, J. R., and Workman, J. L. (1998) A subset of TAF_{II}s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* **94**, 45-53
- Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352
- Gu, W., and Roeder, R. G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595-606
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Hansen, J. C. (1997) The core histone amino-termini: combinatorial interaction domains that link chromatin structure with function. *Chemtracts Biochem. Mol. Biol.* **10**, 56-59
- Hassig, C. A., Fleischer, T. C., Billin, A. N., Schreiber, S. L., and Ayer, D. E. (1997) Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* **89**, 341-347
- Hebbes, T. R., Thorne, A. W., and Crane-Robinson, C. (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* **7**, 1395-1402
- Hebbes, T. R., Clayton, A. L., Thorne, A. W., and Crane-Robinson, C. (1994) Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken β -globin chromosomal domain. *EMBO J.* **13**, 1823-1830

Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M., and Grunstein, M. (1995) Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**, 583-592

Heinzel, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T.-M., Söderström, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W.-M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., Seto, E., Eisenman, R. N., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1997) A complex containing N-CoR, msin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* **387**, 43-48

Hilfiker, A., Hilfiker-Kleiner, D., Pannuti, A., and Lucchesi, J. C. (1997) *mof*, a putative acetyltransferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in *Drosophila*. *EMBO J.* **16**, 2054-2060

Horiuchi, J., Silverman, N., Marcus, G. A., and Guarente, L. (1995) ADA3, a putative transcriptional adaptor, consists of two separable domains and interacts with ADA2 and GCN5 in a trimeric complex. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1203-1209

Howe, L., and Ausio, J. (1998) Nucleosome translational position, not histone acetylation, determines TFIIIA binding to nucleosomal *Xenopus laevis* 5S rRNA Genes. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1156-1162

Imbalzano, A. N., Kwon, H., Green, M. R., and Kingston, R. E. (1994) Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* **370**, 481-485

Imhof, A., Yang, X.-J., Ogryzko, V. V., Nakatani, Y., Wolffe, A. P., and Ge, H. (1997) Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr. Biol.* **7**, 689-692

Ito, H., Fukuda, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168

Jackson, V. (1990) *In vivo* studies of the dynamics of histone-DNA interaction: evidence for nucleosome dissolution during replication and transcription and a low level of dissolution independent of both. *Biochemistry* **29**, 719-731

Janknecht, R., and Hunter, T. (1996) A growing coactivator network. *Nature* **383**, 22-23

- Johnson, L. M., Kayne, P. S., Kahn, E. S., and Grunstein, M. (1990) Genetic evidence for an interaction between SIR3 and histone H4 in the repression of the silent mating loci in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6286-6290
- Johnson, L. M., Fisher-Adams, G., and Grunstein, M. (1992) Identification of a non-basic domain in the histone H4 N-terminus required for repression of the yeast silent mating loci. *EMBO J.* **11**, 2201-2209
- Jones, P. L., Veenstra, G. J. C., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A. P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genet.* **19**, 187-191
- Juan, L.-J., Utley, R. T., Adams, C. C., Vettese-Dadey, M., and Workman, J. L. (1994) Differential repression of transcription factor binding by histone H1 is regulated by the core histone amino termini. *EMBO J.* **13**, 6031-6040
- Kadosh, D., and Struhl, K. (1997) Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* **89**, 365-371
- Kadosh, D., and Struhl, K. (1998a) Histone deacetylase activity of Rpd3 is important for transcriptional repression in vivo. *Genes Dev.* **12**, 797-805
- Kadosh, D., and Struhl, K. (1998b) Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5121-5127
- Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Kessler, N., and Stillman, B. (1995) The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell* **81**, 1105-1114
- Kaufman, P. D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1997) Ultraviolet radiation sensitivity and reduction of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking chromatin assembly factor-I. *Genes Dev.* **11**, 345-357
- Kaufman, P. D., Cohen, J. L., and Osley, M. A. (1998) Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chromatin assembly factor I. *Mol. Cell Biol.* **18**, 4793-4806

- Kayne, P. S., Kim, U. J., Han, M., Mullen, J. R., Yoshizaki, F., and Grunstein, M. (1988) Extremely conserved histone H4 N-terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* **55**, 27-39
- Kleff, S., Andrulis, E. D., Anderson, C. W., and Sternglanz, R. (1995) Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **270**, 24674-24677
- Krajewski, W. A., and Becker, P. B. (1998) Reconstitution of hyperacetylated, DNase I-sensitive chromatin characterized by high conformational flexibility of nucleosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 1540-1545
- Kolle, D., Sarg, B., Lindner, H., and Loidl, P. (1998) Substrate and site specificity of cytoplasmic histone acetyltransferases of maize and rat liver. *FEBS Letters* **421**, 109-114
- Kuo, M.-H., Brownell, J. E., Sobel, R. E., Ranalli, T. A., Cook, R. G., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., and Allis, C. D. (1996) Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* **383**, 269-272
- Kuo, M.-H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M. E. A., and Allis, C. D. (1998) Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev.* **12**, 627-639
- Kurtz, S., and Shore, D. (1991) RAP1 protein activates and silences transcription of mating-type genes in yeast. *Genes Dev.* **5**, 616-628
- Kyrion, G., Liu, K., Liu, C., and Lustig, A. J. (1993) RAP1 and telomere structure regulate telomere position effects in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* **7**, 1146-1159
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Laherty, C. D., Yang, W.-M., Sun, J.-M., Davie, J. R., Seto, E., and Eisenman, R. N. (1997) Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate Mad transcriptional repression *Cell* **89**, 349-356

- Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D., and Wolffe, A. P. (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**, 73-84
- Ling, X., Harkness, T. A. A., Schultz, M. C., Fisher-Adams, G., and Grunstein, M. (1996) Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly *in vivo* and *in vitro*: redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes Dev.* **10**, 689-699
- Liu, C., Mao, X., and Lustig, A. J. (1994) Mutational analysis defines a C-terminal tail domain of RAP1 essential for telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **138**, 1025-1040
- Logie, C., Tse, C., Hansen, J. C., and Peterson, C. L. (1999) The core histone N-terminal domains are required for multiple rounds of catalytic chromatin remodeling by the SWI/SNF and RSC complexes. *Biochemistry* (en prensa).
- López-Rodas, G., Pérez-Ortín, J. E., Tordera, V., Salvador, M. L., and Franco, L. (1985) Partial purification and properties of two histone acetyltransferases from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **239**, 184-190
- López-Rodas, G., Tordera, V., Sánchez del Pino, M. M., and Franco, L. (1989) Yeast contains multiple forms of histone acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **264**, 19028-19033
- López-Rodas, G., Tordera, V., Sánchez del Pino, M. M., and Franco, L. (1991) Subcellular localization and nucleosome specificity of yeast histone acetyltransferases. *Biochemistry* **30**, 3728-3732
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260
- Lustig, A. J. (1998) Mechanisms of silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 140-146
- Lutter, L. C., Judis, L., and Paretto, R. F. (1992) Effects of histone acetylation on chromatin topology *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5004-5014

- Ma, X.-J., Wu, J., Altherr, B. A., Schultz, M. C., and Grunstein, M. (1998) Deposition-related sites K5/K12 in histone H4 are not required for nucleosome deposition in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6693-6698
- Mann, R. K., and Grunstein, M. (1992) Histone H3 N-terminal mutations allow hyperactivation of the yeast GAL1 gene *in vivo*. *EMBO J.* **11**, 3297-3306
- Marcus, G. A., Silverman, N., Berger, S. L., Horiuchi, J., and Guarente, L. (1994) Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *EMBO J.* **13**, 4807-4815
- Martínez-Balbás, M. A., Bannister, A. J., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M., and Kouzarides, T. (1998) The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *EMBO J.* **17**, 2886-2893
- Megee, P. C., Morgan, B. A., and Smith, M. M. (1995) Histone H4 and the maintenance of genome integrity. *Genes Dev.* **9**, 1716-1727
- Mizzen, C. A., Yang, X.-J., Kokubo, T., Brownell, J. E., Bannister, A. J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S. L., Kouzarides, T., Nakatani, Y., and Allis, C. D. (1996) The TAF_{II}250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**, 1261-1270
- Mumberg, D., Müller, R., and Funk, M. (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5767-5768
- Mutskov, V., Gerber, D., Angelov, D., Ausio, J., Workman, J., and Dimitrov, S. (1998) Persistent interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6293-6304
- Nagy, L., Kao, H.-Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L., and Evans, R. M. (1997) Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**, 373-380
- Nan, X., Ng, H.-H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., and Bird, A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-389

- Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., and Smith, T. F. (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297-300
- Neuwald, A. F., and Landsman, D. (1997) GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *TIBS* **22**, 154-155
- Ng, K. W., Ridgway, P., Cohen, D. R., and Tremethick, D. J. (1997) The binding of a Fos/Jun heterodimer can completely disrupt the structure of a nucleosome. *EMBO J.* **16**, 2072-2085
- Nightingale, K. P., Wellinger, R. E., Sogo, J. M., and Becker, P. B. (1998) Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the *Drosophila hsp26* gene in chromatin. *EMBO J.* **17**, 2865-2876
- Norton, V. G., Imai, B. S., Yau, P., and Bradbury, E. M. (1989) Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell* **57**, 449-457
- Nortorn, V. G., Marvin, K. W., Yau, P., and Bardbury, M. (1990) Nucleosome linking number change controlled by acetylation of histones H3 and H4. *J. Biol. Chem.* **265**, 19848-19852
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 y CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**, 953-959
- Park, E. C., and Szostak, J. W. (1990) Point mutations in the yeast histone H4 gene prevent silencing of the silent mating type locus HML. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4932-4934
- Parthun, M. R., Widom, J., and Gottschling, D. E. (1996) The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **87**, 85-94
- Pazin, M. J., and Kadonaga, J. T. (1997) What's up and down with histone deacetylation and transcription?. *Cell* **89**, 325-328
- Pollard, K. J., and Peterson, C. L. (1997) Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6212-6222

- Qian, Z., Huang, H., Hong, J. Y., Burck, C. L., Johnston, S. D., Berman, J., Carol, A., and Liebman, S. (1998) Yeast Ty1 retrotransposition is stimulated by a synergistic interaction between mutations in Chromatin assembly factor I and histone regulatory proteins. *Mol. Cell Biol.* **18**, 4783-4792
- Reifsnyder, C., Lowell, J., Clarke, A., and Pillus, L. (1996) Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases. *Nat. Genet.* **14**, 42-49
- Roberts, S. M., and Winston, F. (1997) Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes. *Genetics* **147**, 451-465
- Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B. M., and Grunstein, M. (1996) HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14503-14508
- Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Suka, N., Turner, B. M., and Grunstein, M. (1998) Transcriptional repression by UME6 involves deacetylation of lysine 5 of histone H4 by RPD3. *Nature* **392**, 831-835
- Saleh, A., Lang, V., Cook, R., and Brandl, C. J. (1997) Identification of native complexes containing the yeast coactivator/repressor proteins NGG1/ADA3 and ADA2. *J. Biol. Chem.* **272**, 5571-5578
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbour Lab. New York
- Siddique, H., Zou, J.-P., Rao, V. N., and Reddy, E. S. P. (1998) The BRCA2 is a histone acetyltransferase. *Oncogene* **16**, 2283-2285
- Sikorski, R. S., and Boeke, J. D. (1991) *In vitro* mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Meth. Enzymol.* **194**, 306-311
- Smith, E. R., Eisen, A., Gu, W., Sattah, M., Pannuti, A., Zhou, J., Cook, R. G., Lucchesi, J. C., and Allis, C. D. (1998) ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3561-3565

- Smith, S., and Stillman, B. (1989) Purification and characterization of CAF-1, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication. *Cell* **58**, 15-25
- Smith, S., and Stillman, B. (1991) Stepwise assembly of chromatin during DNA replication *in vitro*. *EMBO J.* **10**, 971-980
- Sobel, R. E., Cook, R. G., Perry, C. A., Annunziato, A. T., and Allis, C. D. (1995) Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1237-1241
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M.-J., and O'Malley, B. W. (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**, 194-198
- Sterner, D. E., Grant, P. A., Roberts, S. M., Duggan, L. J., Belotserkovskaya, R., Pacella, L. A., Winston, F., Workman, J. L., and Berger, S. L. (1999) Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-Binding Protein interaction. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 86-98
- Stillman, B. (1986) Chromatin assembly during SV40 DNA replication *in vitro*. *Cell* **45**, 555-565
- Struhl, K. (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* **12**, 599-606
- Syntichaki, P., and Thireos, G. (1998) The Gcn5·Ada complex potentiates the histone acetyltransferase activity of Gcn5. *J. Biol. Chem.* **273**, 24414-24419
- Taunton, J., Hassig, C. A., Schreiber, S. L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3. *Science* **272**, 408-411
- Thompson, J. S., Hecht, A., and Grunstein, M. (1993) Histones and the regulation of heterochromatin in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**, 247-256
- Thompson, J. S., Ling, X., and Grunstein, M. (1994) Histone H3 amino terminus is required for telomeric and silent mating locus repression in yeast. *Nature* **369**, 245-247

- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A. P., and Hansen, J. (1998a) Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4629-4638
- Tse, C., Georgieva, E. I., Ruiz-García, A. B., Sendra, R., and Hansen, J. C. (1998b) Gcn5p, a transcription-related histone acetyltransferase, acetylates nucleosomes and folded nucleosomal arrays in the absence of other protein subunits. *J. Biol. Chem.* **273**, 32388-32392
- Turner, B. M., Birley, A. J., and Lavender, J. (1992) Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* **69**, 375-384
- Ura, K., Kurumizaka, H., Dimitrov, S., Almouzni, G., and Wolffe, A. P. (1997) Histone acetylation: influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression. *EMBO J.* **16**, 2096-2107
- van Holde, K. E. (1988) Chromatin. Springer-Verlag, New York
- Vannier, D., Balderes, D., and Shore, D. (1996) Evidence that the transcriptional regulators SIN3 and RPD3, and a novel gene (SDS3) with similar functions, are involved in transcriptional silencing in *S. cerevisiae*. *Genetics* **144**, 1343-1353
- Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1996) Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* **87**, 95-104
- Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1997) Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr. Biol.* **8**, 96-108
- Vettese-Dadey, M., Grant, P. A., Hebbes, T. R., Crane-Robinson, C., Allis, C. D., and Workman, J. L. (1996) Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA *in vitro*. *EMBO J.* **15**, 2508-2518
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**, 1793-1808

- Walker, S. S., Reese, J. C., Apone, L. M., and Green, M. R. (1996) Transcription activation in cells lacking TAF_{II}s. *Nature* **383**, 185-188
- Wang, L., Mizzen, C., Ying, C., Candau, R., Barlev, N., Brownell, J., Allis, C. D., and Berger, S. L. (1997) Histone acetyltransferase activity is conserved between yeast and human GCN5 and is required for complementation of growth and transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 519-527
- Wang, L., Liu, L., and Berger, S. L. (1998) Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function in vivo. *Genes Dev.* **12**, 640-653
- Weintraub, H., Palter, K., and van Lente, F. (1975) Histones H2A, H2B, H3 and H4 form a tetrameric complex in solutions of high salt. *Cell* **6**, 85-110
- Worcel, A., Han, S., and Wong, M. L. (1978) Assembly of newly replicated chromatin. *Cell* **15**, 969-977
- Xu, W., Edmondson, D. G., and Roth, S. Y. (1998) Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5659-5669
- Yang, W.-M., Inouye, C., Zeng, Y., Bearss, D., and Seto, E. (1996) Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12845-12850
- Yang, X.-J., Ogryzco, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* **382**, 319-324
- Yamamoto, T., and Horikoshi, M. (1997) Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60. *J. Biol. Chem.* **272**, 30595-30598
- Yoshida, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1995) Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *BioEssays* **17**, 423-430
- Zhang, W., Bone, J. R., Edmondson, D. G., Turner, B. M., and Roth, S. Y. (1998) Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by

Bibliografia

mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *EMBO J.* **17**, 3155-3167

Zhang, Y., Iratni, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (1997) Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* **89**, 357-364