

II Mecanismos de acción epigenética en mamíferos

Los mecanismos epigenéticos conocidos hasta el momento consisten en la metilación de ADN y la modificación post-traducciona de proteínas de la cromatina. Estos mecanismos son los principales responsables de los patrones de expresión genética, por lo tanto, así como las mutaciones alteran la secuencia de ADN, las *epimutaciones* modifican la metilación de ADN o los patrones de la cromatina e inducen el desarrollo de algunas enfermedades. Esta sección se enfocará básicamente en los dos tipos de modificación con mayor respaldo bibliográfico: la metilación de ADN y la modificación de histonas.

2.1 Metilación de ADN

En vertebrados, las modificaciones en el ADN consisten en la metilación post-sintética de citosina en la posición 5' del anillo pirimidina, catalizada por una ADN-metiltransferasa (DNMT) (Fig. 7).

Las citosinas 5-metiladas están presentes en el ADN de todos los vertebrados y plantas con flores; además, se encuentran en algunos hongos, invertebrados, protistas y bacterias. Este tipo de metilación es más común en eucariotas con genomas largos que en cortos. Las citosinas metiladas se ubican casi exclusivamente en *islas CpG*, fragmentos de secuencias ricas en citosina y guanina (CG, ≥ 500 pb) que sirven como promotores para los genes asociados a éstas [Lu et al. 2006] (Fig. 8). Aproximadamente el 70% de los dinucleótidos CG en el genoma humano está constitutivamente metilado; sin embargo, las islas CpG generalmente no lo están [Lu et al. 2006]. Tal es la importancia reguladora de estas zonas, que un estudio realizado en 1993 determinó que alrededor de la mitad de los genes en mamíferos contienen islas CpG [Antequera & Bird 1993] y que el 76% de los genes humanos tiene este tipo de promotor [Marino-Ramirez et al. 2004; Davuluri et al. 2001] (Fig 8). Ahora se sabe que la metilación de citosinas en plantas y animales se concentra principalmente en elementos repetitivos. Gran parte de esta metilación se da en transposones, los cuales constituyen más del 45% del genoma humano [Smit & Rigs 1996].

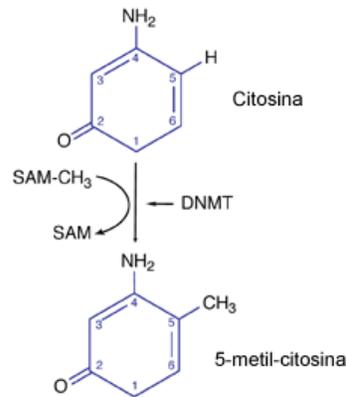


Figura 7. Mecanismo de metilación del ADN.

SAM= S-adenosil-metionina; CH₃=grupo metilo; DNMT = ADN metil transferasa [Adaptado de Strathdee et al. 2002].

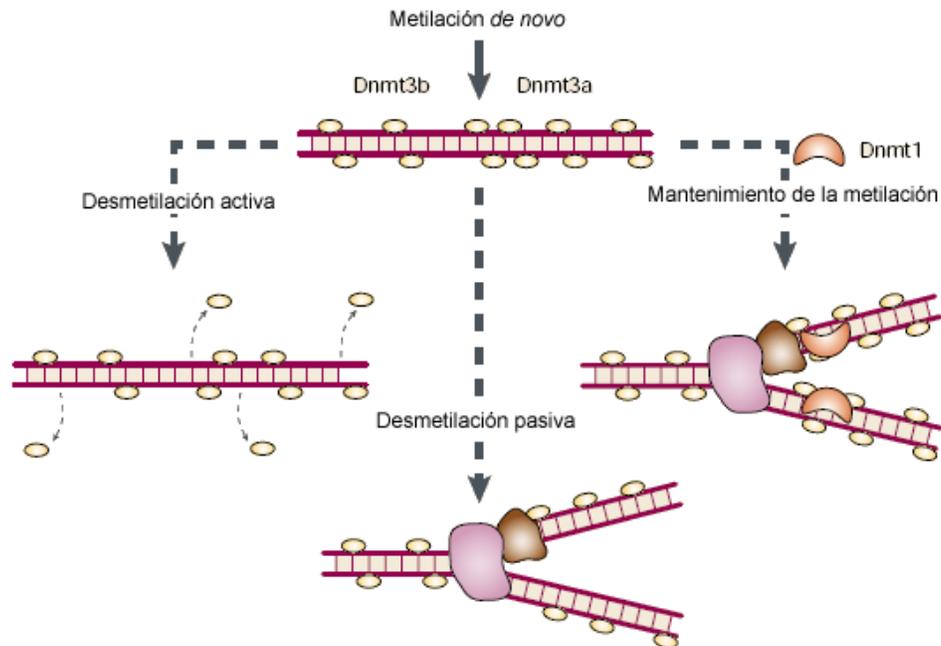


Figura 8. Metilación de ADN en dinucleótidos CpG en mamíferos.

Los grupos metilo pueden ser introducidos al ADN no-metilado por las enzimas de metilación *de novo* DNMT3a y DNMT3b. Cuando el ADN se replica, el grupo metilo de la hebra guía es reconocido y se introduce uno nuevo en la hebra hija por medio de la actividad DNMT1, la cual puede estar asociada a la maquinaria de replicación. En presencia de DNMT1, el ADN hemimetilado se metila y así los patrones de metilación se mantienen. La desmetilación puede ocurrir en ausencia de DNMT1 en rondas continuas de replicación de ADN (desmetilación pasiva) y de forma activa (sin replicación de ADN) [Adaptado de Reik & Walter 2001].

Las islas CpG están asociadas a genes específicos de tejido y de mantenimiento. En su estado normal están desmetiladas o variablemente metiladas. La función más reconocida de la metilación de ADN es la supresión (silenciación) de la actividad de genes asociados, al promover la agrupación de proteínas de unión a CpG, como MeCP2 y MBD2, que atraen complejos de inactivación de la cromatina que contienen desacetilasas (HDACs) e histona-metiltransferasas (HMT). Así, se favorece una condensación local de la cromatina y una configuración transcripcionalmente inactiva. La metilación de ADN también está asociada a la interferencia en la unión de algunos factores de transcripción [Lu et al. 2006] como el gen supresor de tumor Rb y E2F [Robertson 2001; Fuks et al. 2000, Robertson et al. 2000a; Luo et al. 1998; Magnaghi-Jaulin et al. 1998; Brehm et al. 1999].

La metilación de citosinas es requerida en plantas y mamíferos para la expresión monoalélica de *genes de impronta*, de los cuales uno de los dos alelos (de un mismo gen) se expresa de acuerdo al sexo del padre que lo aportó. Errores en los patrones de metilación de citosinas en células somáticas pueden causar la expresión bialélica de genes de impronta. Además, las mutaciones naturales en genes involucrados en los patrones de metilación del ADN, incluyendo las ADN-metiltransferasas, resulta en síndromes como el de Rett, Retardo Mental/ α -talasemia Ligado al cromosoma X (ATRX), X frágil, y el de ICF (Insuficiencia, Inestabilidad Centromérica y Anormalidad Facial) [Robertson & Wolffe 2000]. Además, otros estudios han revelado que existen cambios en los patrones de metilación en etapas tempranas de la tumorigénesis y que estos contribuyen directamente en la transformación de las células [Robertson 2001].

La metilación del ADN es la principal vía de silenciamiento transcripcional y una de las bases de las modificaciones en la estructura de la cromatina [Robertson 2002]. Por ejemplo, estudios han demostrado que la metilación de residuos de lisina¹ 9 de histonas H3 (H3K9) es un paso que precede a la metilación del ADN [Tamaru & Selker 2001; Jackson et al. 2002; Lehnertz et al. 2003; Xin et al. 2003], ya que las proteínas HP1 pueden reclutar las DNMT por interacciones proteína-proteína [Lehnertz et al. 2003]. Además, se ha observado que el complejo EZH2 interactúa con las DNMT y que la HKMT (histona lisina-metiltransferasa) específica para lisina 27 de histona H3, contenida en el complejo EZH2, es requerida para la metilación de ADB en los promotores blanco EZH2 [Viré et al. 2006]. De manera similar, una HKMT específica para lisina 9 de histona H3, SETDB1, se asocia físicamente con la DNMT3a [Li et al. 2006].

¹ Lisina es abreviada por la letra K.

2.1.1 ADN-metiltransferasas (DNMT)

En mamíferos se han encontrado cuatro tipos principales enzimas ADN-metiltransferasas (DNMT): DNMT1, DNMT2, DNMT3a y DNMT3b [Kalebic 2003] con actividades diferentes. DNMT1 tiene mayor afinidad por zonas genómicas hemimetiladas, mientras que DNMT3a y DNMT3b participan en la metilación *de novo*. Las DNMT tienen dos dominios [Siedlecki & Zielenkiewicz 2006]: el amino-terminal regulador y el carboxi-terminal catalítico. La región amino terminal varía según las subfamilias de DNMTs y contiene varios sitios de interacción, como la *región de unión a ADN* (PBD) y la *región de señalamiento de localización nuclear* (NLS). DNMT2 sólo tiene el dominio catalítico. Las DNMT tienen diez motivos característicos conservados, de los cuales seis están presentes en casi todas las DNMT de organismos desde bacterias hasta plantas y animales [Santi et al. 1983; Posfai et al. 1989] (Fig. 9). Los motivos generalmente son descritos por su función [Lauster et al. 1989]: los motivos del I al III conforman el bolsillo de unión a cofactor; el motivo IV contiene un dipéptido prolina-cisteína que forma el tiolato iniciador de la reacción de transferencia del grupo metilo; los motivos VI, VIII y X forman el bolsillo de unión de citosina (sustrato); y los motivos V y VII son responsables del pliegue conservado en el dominio de reconocimiento de sustrato. Las enzimas DNMT3a y DNMT3b son proteínas muy relacionadas entre sí que tienen una cola N-terminal con un dominio PWWP, además de una región rica en cisteína de unión a iones zinc y algunos dominios de unión a grupos metilo (MBD) de DNMT1 [Xie et al. 1999].

2.1.1.1 DNMT1

La DNMT1 contiene la región amino-terminal más larga de todas las DNMT en mamíferos, la cual está encargada de regular la actividad del dominio catalítico carboxi-terminal, la localización nuclear, la unión a zinc y de las interacciones proteína-proteína [Bestor 2000; Robertson 2001]. La terminal amino de DNMT1 tiene regiones con varias funciones. Por ejemplo, algunas secuencias han mostrado afinidad con DNMAP1 (proteína asociada a ADN-metiltransferasa 1) [Rountree et al. 2000], aunque aún no se ha determinado su función. El gen que sintetiza la DNMT1 humana se encuentra en el cromosoma 19p13.2 [Yen et al. 1992].

Este subtipo enzimático es el principal responsable de mantener el patrón de metilación y muestra una afinidad preferente por el ADN hemimetilado [Robertson 2002], ya que se ha probado la metilación en este sustrato tiene una velocidad inicial 5 a 30 veces mayor que en la determinada en el no metilado [Yoder et al. 1997]. En la fase G1 y G2 del ciclo celular, DNMT1 muestra una distribución nuclear difusa. No obstante, en la fase S se asocia con el foci de replicación [Leonhardt et al. 1992; Liu et al. 1998]. Por lo tanto, se piensa que la DNMT1 es requerida para mantener los patrones de metilación genómicos (información

epigenética). Sin embargo, parece que DNMT1 no está relacionada únicamente con el proceso de replicación, ya que la expresión de esta no ha mostrado ser necesariamente proporcional al estado de proliferación celular. Varios análisis ‘Northern blot’ han mostrado que DNMT1 está altamente expresada en placenta y en tejidos de baja proliferación como corazón y cerebro [Robertson et al. 1999; Yen et al. 1992].

La función biológica de DNMT1 se ha intentado dilucidar con varios estudios. Se ha observado que la pérdida simple de la función de los alelos *Dnmt1* produce diversos fenotipos [Li et al. 1992; Biniszkiewicz et al. 2002]:

- En células homocigotas de alelos nulos de *Dnmt1*, embrionarias o de ratones, se observa un genoma severamente desmetilado con una persistencia de sólo un ~5% con respecto a la encontrada en ratones normales [Lei et al. 1996].
- Se encuentra una expresión bialélica de la mayoría de los genes de impronta, como *H19* y *Kcnq1ot1*, en embriones homocigotos [Li et al. 1993]; aunque hay algunos que no se expresan por parte de ninguno de los dos alelos, como *Igf2* y *Kcnq1*.
- Se observa una inactivación de todos los cromosomas X en embriones mutantes homocigotos por la desmetilación y activación de *Xist* [Panning & Jaenisch 1996].
- En células madre embrionarias que no tienen *Dnmt1* existe un incremento ligero (<10 veces) en las tasas de mutación en genes marcadores exógenos; además experimentan un aumento en las tasas de pérdida de heterocigosidad por recombinación mitótica [Chen et al. 1998b].
- Se ha observado que en las células madre embrionarias con *Dnmt1* ausente se desarrollan normalmente en un estado no-diferenciado pero mueren por apoptosis cuando se induce la diferenciación *in vivo* o *in vitro* [Li et al. 1992]. Otra causa de muerte en embriones deficientes de *Dnmt1* es la apoptosis celular autónoma [Goll & Bestor 2005].
- La pérdida de *Dnmt1* provoca la desmetilación y la expresión alta de transposones de la clase partícula intracisternal A (IAP), los cuales son retrotransposones LTR (repeticiones terminales largas) [Walsh & Bestor 1999]. Cabe mencionar que el gen *Dnmt1* es el único requerido, del que se tenga conocimiento, para la represión de transposones en células somáticas de mamíferos [Goll & Bestor 2005].

Se han realizado estudios genéticos que vinculan DNMT1 con la metilación de citosinas y el desarrollo de tumorigénesis [Goll & Bestor 2005]. Por ejemplo, se ha observado que las mutaciones heterocigotas en DNMT1 o el tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza-CdR), redujo el número de pólipos en colon de ratones heterocigotos *Apc^{min}*, una mutación que predispone a neoplasia colónica

[Laird et al. 1995]. Existe una pérdida neta de citosinas metiladas en varios genomas tumorales, lo cual es inconsistente con los niveles de DNMT1. Hasta el momento no se ha reportado mutación o amplificación del gen *Dnmt1* en cáncer, por lo que no hay evidencia de que sea un oncogen. No hay información genética que implique a alguna ADN-metiltransferasa o factor relacionado en carcinogénesis [Baylin & Bestor 2002].

Nuevas investigaciones sugieren que el ajuste alternativo produce varias isoformas de DNMT1 para satisfacer los diferentes patrones correspondientes al metabolismo de metilación de ADN.

La enzima DNMT1b es una variante de DNMT1 que contiene 48 pb adicionales entre los exones 5 y 6 para producir una enzima con 16 aminoácidos más que DNMT1 [Hsu et al. 1999]. Se ha probado que, *in vitro*, DNMT1b tiene características similares a DNMT1 ya que la expresión de su ARNm es ubicua [Bonfils et al. 2000]. Un grupo de investigación describió que la expresión de DNMT1b se encuentra en un nivel 40-70% con respecto al DNMT1 [Hsu et al. 1999]. La función específica de esta variante aún no ha sido dilucidada.

El ajuste alternativo de exones 5' sexo-específicos produce al menos dos variantes ARNm de DNMT1 denominados *DNMT1o* y *DNMT1p*. La isoforma DNMT1o es la única encontrada, de las DNMT1, en oocitos y en embriones pre-implantados. Además, se ha observado que DNMT1o experimenta una translocación dependiente del desarrollo: inicialmente se encuentra en el citoplasma y después, durante la etapa octacelular, se transporta al núcleo [Robertson 2002]. Se piensa que este cambio de posición está relacionado con el establecimiento de patrones normales de metilación en regiones de impronta [Cardoso & Leonhardt 1999; Doherty et al. 2002]

2.1.1.2 DNMT2

La enzima DNMT2 es sintetizada a partir de un gen ubicado en el locus 10p15.1 [Yoder and Bestor 1998] y es la más conservada de todas las citosina-metiltransferasas. Se ha encontrado que el ARNm de DNMT2 se encuentra de forma ubicua a pequeñas concentraciones [Okano et al. 1998a; Yoder and Bestor 1998]. Esta es la DNMT más distribuida, ya que sus homólogos están presentes aún en especies que aparentemente no metilan su ADN (p.e. *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*). No obstante, hasta el momento no se ha reportado actividad metiltransferasa *in vitro* en DNMT2 [Dong et al. 2001; Okano et al. 1998a; Yoder and Bestor 1998]; aunque sí forma complejos proteicos estables *in vitro* [Dong et al. 2001]. Por lo tanto, DNMT2 podría ser una subunidad catalítica de un complejo ADN-metilasa que está inactiva cuando se encuentra sin ciertos cofactores (aún no determinados). Por otro lado, también podría tener un campo de reconocimiento que actúa más allá de los dinucleótidos CpG. Otra función sugerida para DNMT2 es

que podría intervenir en alguna función centromérica, ya que la estructura y función del centrómero está conservada a través de las especies que tienen un homólogo DNMT2, característica que es diferente en organismos que no tienen esta enzima [Bestor 2000; Hermann et al. 2004].

2.1.1.3 DNMT3a

El gen DNMT3a tiene una homología significativa con DNMT1 y está localizado en el cromosoma 2p33 [Robertson et al. 1999]. La porción C-terminal de DNMT3 tiene los mismos motivos catalíticos conservados en todas las ADN-metiltransferasas y se ha demostrado su actividad *in vitro* e *in vivo* [Aoki et al. 2001; Gowher and Jeltsch 2002; Hsieh 1999; Lyko et al. 1999; Okano et al. 1998a; Yokochi and Robertson 2002]. Los miembros de la familia DNMT3 generalmente tienen un dominio rico en cisteína en la región amino-terminal denominado PHD ó dominio tipo-ATRX, por su homología con la región PHD del gen ATRX (miembro de la familia de enzimas remodeladoras de cromatina ATP-dependientes SNF/SWI2). Por lo tanto, se piensa que DNMT3 posiblemente está asociada a cambios estructurales de la cromatina por medio de interacciones proteína-proteína en la región amino-terminal.

Se ha reportado DNMT3 se expresa en tejidos adultos, en la mayoría de células tumorales, embriones tempranos y células madre embrionarias [Okano et al. 1998a; Robertson et al. 1999; Xie et al. 1999]. Estudios de Northern blot han mostrado una actividad más alta de DNMT3a en el día 10.5 del embrión [Okano et al. 1998a]. Además, en contraste con DNMT1, la expresión de DNMT3a aparentemente no está regulada de manera ciclo-dependiente, ya que su transcripción no se ve afectada en células con el ciclo celular detenido en G0/G1 (células quiescentes) [Robertson et al. 2000b]. Otra diferencia de DNMT3a con respecto a DNMT1 es que fue encontrada, durante el ciclo celular, en un *focus* nuclear discreto que no está asociado a la síntesis de ADN. Sin embargo, durante la fase S tardía y la replicación de regiones heterocromáticas del genoma, algunos foci con DNMT3a parecen entrecruzarse con los foci de replicación [Bachman et al. 2001]

2.1.1.4 DNMT3b

El gen DNMT3b humano está localizado en el cromosoma 20q.11.2 [Robertson et al. 1999; Xie et al. 1999]. El dominio catalítico C-terminal es similar al de la DNMT3a (más de 80% de identidad), mientras que su dominio amino-terminal se ha conservado con menos de un 30% de identidad. La DNMT3b ha mostrado actividad ADN-metiltransferasa *in vivo* e *in vitro* [Aoki et al. 2001; Hsieh 1999; Okano et al. 1998a; Qiu et al. 2002]. A comparación de DNMT3a, la expresión de DNMT3b es baja en la mayoría de los tejidos estudiados. No obstante, en los testículos existe un nivel alto de DNMT3b y parece estar relacionada con la espermatogénesis [Okano et al. 1998a; Robertson et al. 1999; Xie et al. 1999].

La ubicación predominante de DNMT3 es en zonas pericentroméricas de la heterocromatina y parece que es la principal encargada para crear y mantener los patrones de metilación de repeticiones de satélites menores. El ajuste alternativo produce 5 isoformas humanas, y 9 en ratón, de DNMT3b. Las isoformas principales son DNMT3b1, 3b2 y 2b3, y parecen expresarse de manera específica de acuerdo al tipo de tejido [Okano et al. 1998a]; las otras variantes de ajuste codifican proteínas más pequeñas. Las DNMT3b1 y 3b2 han demostrado actividad catalítica, mientras que la DNMT3b3 no lo ha hecho. Se ha demostrado una expresión predominante de DNMT3b4 y 5 en testículos [Robertson et al. 1999] (Fig. 10). Las funciones de las variantes de ajuste DNMT3b4 y 5 podrían estar codificadas por la región N-terminal y al parecer no incluyen actividad catalítica. Sin embargo, se ha propuesto que tal vez actúen como inhibidores de DNMT3b1 y 2 al interactuar con el mismo complejo de metilación.

El gen DNMT3L (*DNMT3-like*) está ubicado en el cromosoma humano 21q22.3 [Aapola et al. 2000]. La enzima sintetizada no contiene los motivos catalíticos básicos encontrados en otras ADN-metiltransferasas como la secuencia FGG con motivo conservado I, el sitio activo catalítico PC en el motivo IV y la secuencia ENV en el motivo VI relacionado con la unión de cofactores. La DNMT3L es altamente expresada en testículos y embriones de ratón [Aapola et al. 2001] y es probable que participe en la definición de improntas genómicas durante la gametogénesis [Bourc'his et al. 2001]. Por lo tanto, DNMT3L parece no tener actividad citosina-metiltransferasa y funciona como un factor regulador en células germinales [Goll & Bestor 2005].

2.1.1.5 Proteínas asociadas a cromatina que interactúan con DNMT

Estudios *in vitro* sobre DNMT señalan que tienen poca especificidad de secuencias, ya que no va más allá de elegir los dinucleótidos CpG. Además, estudios 'knock-out' muestran que la metilación de ADN no es aleatoria y que cada subtipo DNMT tiene diferentes funciones: se cree que las proteínas que interactúan con DNMT en etapas específicas del desarrollo y diferenciación son mediadoras de la funcionalidad de cada DNMT.

Proteína de retinoblastoma, Rb. La Rb hipofosforilada interactúa con los miembros de la familia E2F e inhibe su función de transactivación. Cuando las células se preparan para dividirse, Rb se fosforila y se disocia de E2F para permitirle reclutar coactivadores y estimular la transcripción de genes involucrados en la progresión del ciclo celular [Dyson 1998]. La proteína Rb ha mostrado su capacidad de reprimir la transcripción en promotores E2F-responsivos al reclutar HDAC y HMT y la unión subsecuente de proteínas de unión a lisina metilada de la proteína-heterocromatina 1 [Brehm et al. 1998; Luo et al. 1998; Nielsen et al. 2001].

Existe evidencia que sugiere que la región amino-terminal de DNMT1 podría interactuar con la región bolsillo A/B [Robertson et al. 2002a] y la B/C [Pradhan & Kim 2002] de la proteína Rb, provocando un efecto general al reprimir la transcripción *in vivo* de genes por medio de promotores E2F-responsivos que no dependen directamente de la actividad catalítica de DNMT1 [Robertson et al. 2000a]. La unión de Rb a DNMT1 inhibe la capacidad *in vitro* de DNMT1 para unirse al ADN y así también impide su actividad catalítica: la sobre-expresión de Rb en células resultó en una reducción significativa de niveles de 5-metil-citosina genómica [Pradhan & Kim 2002]. Además, Rb y DNMT1 coinciden en los foci de replicación de fase S perinuclear [Kennedy et al. 2000], aunque la función de Rb en esa localización no se ha elucidado. Por lo tanto, la función de la unión entre Rb y DNMT1 más aceptada es que DNMT1 se une a Rb de promotores con E2F con el fin de apartar DNMT1 del genoma y prevenir una metilación exagerada de ADN.

Histona-desacetilasa 1 y 2, HDAC1 y HDAC2. Las histona desacetilasas pueden remover grupos acetilos de las colas de histona, en su terminal amino. Varios estudios han demostrado que DNMT1, DNMT3a y DNMT3b se asocian con HDAC1 y HDAC2 *in vivo* e *in vitro* [Bachman et al. 2001; Fuks et al. 2000, 2001; Robertson et al. 2000a]. La DNMT1 se une a HDAC1 en una región de represión transcripcional diferente al dominio de homología HRX [Fuks et al. 2000].

También se ha demostrado una interacción directa entre la zona amino-terminal y HDAC2 [Rountree et al. 2000] con la misma consecuencia funcional provocada por la unión con HDAC1. La variante DNMT3s también interactúa con HDAC1 por medio de regiones ATRX-homólogas⁹/PHD [Bachman et al. 2001; Fuks et al. 2001], las cuales no están presentes en DNMT1. Es probable que la capacidad de represión de DNMT1 y DNMT3 es el resultado de interacciones proteína-proteína, aunque la actividad histona-desacetilasa parece estar involucrada en ambas enzimas.

No se sabe con certeza la función de DNMTs con HDACs, sin embargo una hipótesis es que las HDAC son reclutadas, junto con otras proteínas, para apoyar la silenciación a largo plazo de esa región. Si es así, la región es desacetilada y con acceso libre a las DNMT y esa región es metilada (silenciada) de manera estable y hereditaria. Otra teoría se apoya en que las secuencias heterocromáticas, hipermetiladas, en histonas hipoacetiladas se replican en la fase S tardía del ciclo celular. El reclutamiento de HDAC2 en el focus de replicación por DNMT1 podría ayudar a coordinar la re-metilación de ADN recién sintetizado y la desacetilación de nuevas histonas en la fase S, lo que significa que el reclutamiento de DNMTs y la metilación de una región genómica atrae a HDACs para desacetilar las histonas centrales de las regiones recién metiladas y así permitir la compresión de la cromatina y el silenciamiento transcripcional [Robertson 2002].

Proteína asociada a DNMT1, DNMAP 1. Funciona como represor de DNMT1 y se co-localiza con DNMT1 en el focus de replicación en la fase S y puede afectar la actividad catalítica o la dirección de DNMT1 [Rountree et al. 2000].

Proteína con dominio de unión a metilo 1 y 2, MBD2 y MBD3. Se han reportado interacciones entre estas proteínas de unión a CpG metilados y DNMT1: la enzima DNMT1 posiblemente forma complejos con MBD2 y MBD3, ya que se han aislado en forma co-inmunoprecipitada [Tatematsu et al. 2000]. Así mismo, se probó que el complejo MBD2-MBD3 tiene una afinidad por el ADN hemimetilado y el totalmente metilado, con una acción silenciadora de transcripción. Además, un estudio concluyó que MBD2 y MBD3 son componentes del complejo represor MeCP1, el cual es capaz de unirse preferencialmente, remodelar y desacetilar nucleosomas con ADN metilado *in vitro* [Feng & Zhang 2001]. Entonces, aparentemente, estas proteínas forman parte de un complejo de silenciación que contiene una unidad de modificación de ADN (DNMT), un módulo de reconocimiento de citosinas metiladas (MBD2/MBD3) y una subunidad modificadora de histonas (HDAC). Este complejo entonces podría funcionar al dirigir la DNMT1 a secuencias hemi-metiladas posteriores a replicación, silenciar genes durante la fase S ó al desacetilar las nuevas histonas de nucleosomas.

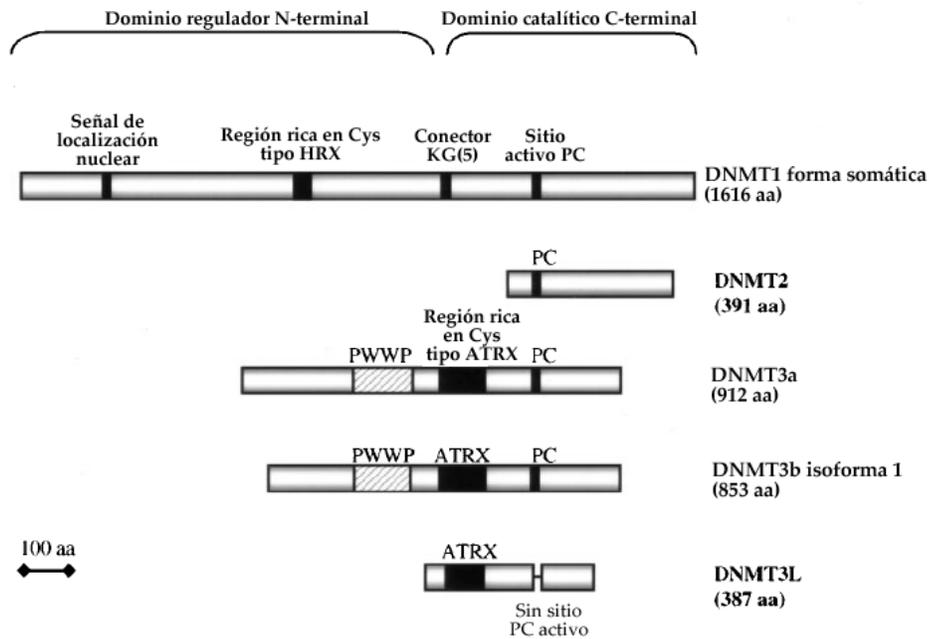


Figura 9. ADN-metiltransferasas de mamíferos y proteínas tipo DNMT.
 Se indican los motivos específicos relacionados con localización, catálisis o función desconocida (tipo HRX, tipo ATRX y PWWP) [Adaptado de Robertson 2002].

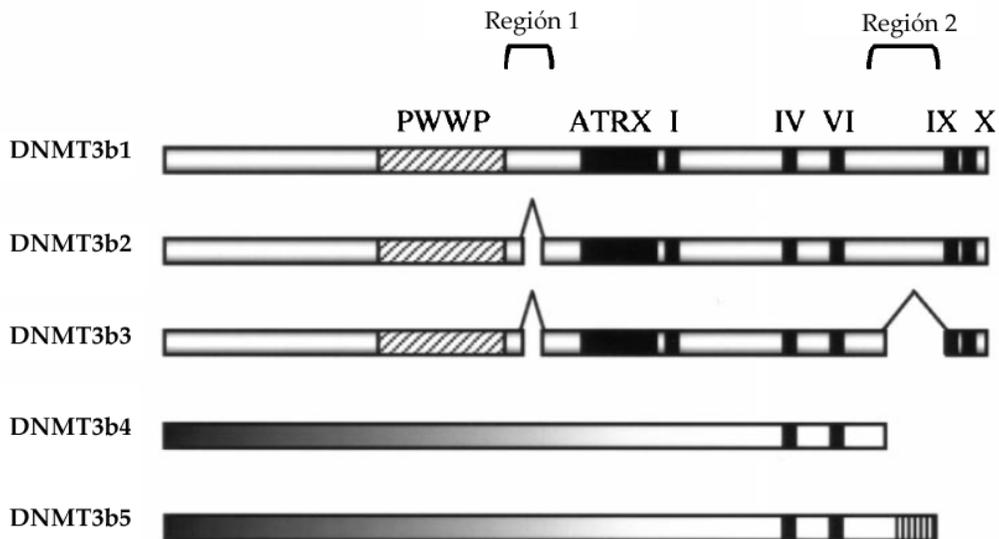


Figura 10. Isoformas de ajuste alternativo de la proteína DNMT3b humana.
 Los motivos I, IV, VI, IX y X corresponden a los motivos metiltransferasa conservados involucrados en la catálisis. El sombreado de las regiones amino-terminal de DNMT3b4 y DNMT3b5 indica que la estructura exacta de ajuste en la región 1 no ha sido determinada. Las marcas extendidas en el extremo C-terminal denotan un cambio en el marco de lectura después del ajuste [Adaptado de Robertson 2002].

Proteína de fusión gen pro-mielocítico de leucemia-receptor de ácido retinoico (PML-RAR). La leucemia pro-mielocítica aguda (APL) es causada por una translocación recíproca del gen RAR α del cromosoma 17 a alguna otra locación. Para formar PML-RAR, el gen RAR α se fusiona con PML en el cromosoma 15. Un estudio en el 2002 mostró que DNMT1 y DNMT3a pueden interactuar con la proteína de fusión PML-RAR, y estudios de inmunofluorescencia mostraron co-localización de PML-RAR con DNMT1 y DNMT3a cuando estaban sobre-expresados. Los tratamientos con un inhibidor de la metilación de ADN (p.e. 5-aza-dC) o un inhibidor de HDAC (p.e. TSA) reveló que la represión transcripcional y el paro en la diferenciación celular mediada por PML-RAR se debía a un reclutamiento temporal de histonas-desacetilasas (inicialmente) y de ADN-metiltransferasas (posteriormente) [Di Croce et al. 2002]. La función de la interacción de DNMT1 y DNMT3 con PML en células normales no está clara, pero se piensa que las DNMT pueden tener funciones críticas en los dominios PML-oncogénicos (PODs). Los PODs están compuestos por proteínas que pueden estar involucrados en la activación transcripcional replicación y apoptosis como Sp100, Sp140, SUMO-1 y Daxx [Li et al. 2000; Muller et al. 2001; Zhong et al.2000a,b]. Las proteínas PML-RAR interfieren con los PODs y, posiblemente, con la diferenciación de los pro-mielocitos [Di Croce et al. 2002; Zhong et al. 2000a]. Otra proteína POD, Daxx, también ha demostrado capacidad de unión a DNMT1.

Proteína RP58. Es una proteína tipo dedo de zinc de unión secuencia-específica a ADN que actúa como represor transcripcional asociado con la heterocromatina [Aoki et al. 1998; Meng et al. 2000]. La proteína RP58 tiene un dominio POZ y varios dedos de zinc tipo Kruppel, comunes en represores transcripcionales [Ryan et al. 1999]. Estudios han mostrado que la DNMT3a y DNMT3b interactúan directamente con RP58 a través del dominio tipo-ATRX [Fuks et al. 2001]. Entonces se piensa que DNMT3a, co-localizado con proteínas de unión a CpG metilado (p.e. HP1 α) y proteínas asociadas con heterocromatina (p.e. MeCP2) [Bachman et al. 2001], actúa como un componente estructural (más que como una unidad catalítica) en la represión transcripcional. Por lo tanto, estas coincidencias en la ubicación sugieren que DNMT3 puede ser un componente importante de heterocromatina pericentromérica hipermetilada [Robertson et al. 2000b]. Posiblemente RP58 se encarga de dirigir las DNMT3a hacia secuencias específicas de ADN destinadas a la metilación *de novo*. Existen factores que pueden influenciar la función del complejo RP58-DNMT3a, como modificaciones post-traduccionales y cofactores específicos de tejido.

2.2 Modificación de histonas

Las histonas tienen dominios amino-terminales ricos en residuos ricos en cargas positivas, lo que las hace susceptibles a algunas modificaciones post-traduccionales dentro del núcleo como la metilación,

fosforilación, ubiquitinación, poli(ADP)-ribosilación, sumoilación y, la más conocida, acetilación (Fig. 11). Las enzimas que inducen estas alteraciones, denominadas *remodeladoras de la cromatina*, son altamente específicas para determinadas posiciones de aminoácidos [Strahl & Allis 2000; Turner 2000]. La modificación de histonas, como un mecanismo más de tipo epigenético, está involucrada en la configuración de la cromatina y en procesos como transcripción, reparación de ADN y replicación [Carruthers & Hansen 2000]. Este principio está sustentado en la hipótesis del *código de histonas* [Strahl & Allis 2000; Turner 2000; Jenuwein & Allis 2001], el cual argumenta que las histonas participan en la señalización para obtener respuestas nucleares apropiadas, en forma de activación o represión transcripcional, dependientes del estado de modificación de estas proteínas. En este apartado se tratarán modificaciones epigenéticas experimentadas en histonas, así como algunas encontradas en otras proteínas nucleares (Tabla 2).

2.2.1 Acetilación

Después de la metilación de ADN, la acetilación y la metilación de histonas son las marcas epigenéticas de las que se tienen mayor conocimiento hasta el momento. Hace más de cuarenta años, Vincent Allfrey propuso que la acetilación de histonas está asociada con la actividad transcripcional de las células eucariotas [Allfrey et al. 1964; Pogo et al. 1966]. Tiempo después, se observó que las histonas centrales acetiladas se asocian de forma preferencial con la cromatina transcripcionalmente activa [Sealy & Chalkley 1978; Vidali et al. 1978; Hebbes et al. 1988].

En la actualidad se sabe que la acetilación de las histonas es una modificación post-traducciona l ubicua encontrada en células de todas las especies animales y vegetales examinadas hasta el momento.

La acetilación ocurre en grupos ϵ -amino de residuos específicos de lisina de los dominios N-terminal de las histonas centrales del nucleosoma [Hong et al. 1993]. Es importante aclarar que también se ha reportado una acetilación de los grupos α -amino de residuos de serina N-terminales durante la síntesis de histonas H2A, H4 y otras proteínas; no obstante, este cambio es irreversible y no se le ha asignado alguna función en la estructura de la cromatina [Turner 2001].

Se ha encontrado que el estado basal de acetilación y las tasas de transferencia de grupos acetato varían en los diferentes tipos celulares. La acetilación de residuos de lisina neutraliza la carga positiva de las colas N-terminales de histonas y disminuye su afinidad por al ADN [Hong et al. 1993]. Como consecuencia, se piensa que esta modificación altera la estructura de los nucleosomas y así se incrementa la exposición de zonas moduladoras de la expresión a proteínas reguladoras [Norton et al. 1989].

ADN-metiltransferasa	Proteína con la que interacciona	Función de la proteína de interacción	Función conjunta
DNMT1	HDAC1/2	Histona desacetilasa	Modificación de la cromatina por desacetilación de histonas
	pRb	Supresor de tumoración, regulación del ciclo celular	Secuestrar DNMT1 en célula en estado no-división, modular la actividad DNMT en foci de replicación
	DMAP1	Correpresor	Reclutando otros represores, represión transcripcional
	PML-RAR	Factor de transcripción oncogénico	Unión a ADN e interacción con otros co-reguladores transcripcionales, dirigir metilación
	MBD2/3	Proteínas de unión a CpG metilado	Represión transcripcional en regiones metiladas, posiblemente dirige DNMT1 hacia ADN hemimetilado en el foci de replicación
DNMT3a	HDAC1	Histona desacetilasa	Modificación de cromatina por desacetilación de histonas
	RP58	Factor de transcripción	Unión secuencia-específica a ADN, dirigir represión
	PML-RAR	Factor de transcripción oncogénico	Unión a ADN e interacción con otros co-reguladores transcripcionales, dirigir metilación
DNMT3b	HDAC1	Histona desacetilasa	Modificación de cromatina por desacetilación de histonas
	SUMO-1/Ubc9	Sumo ligasa	Modificación de proteínas por sumoilación, posible ubicación o actividad

Tabla 2. Proteínas asociadas a ADN-metiltransferasa en represión transcripcional y modificación de cromatina [Adaptado de Robertson 2002].

Z

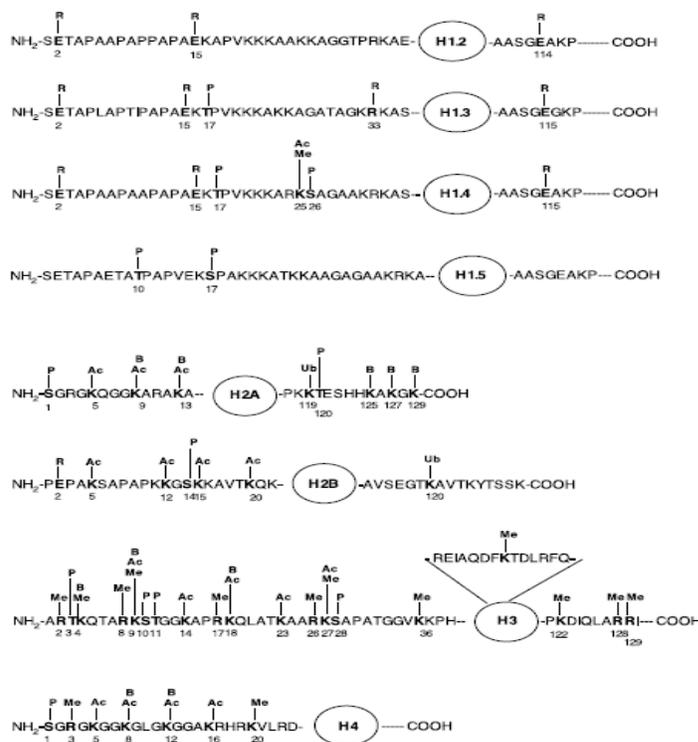


Figura 11. Modificaciones conocidas en histonas humanas.

Metilación (Me) de residuos de arginina o lisina, acetilación (Ac) de residuos de lisina, fosforilación (P) en serina y treonina; ubiquitinación (Ub), biotilación (B) y sumoilación (no indicada) en residuos de lisina; mono-ADP-ribosilación (R) en residuos de arginina y glutamato [Adaptado de Hassa et al. 2006].

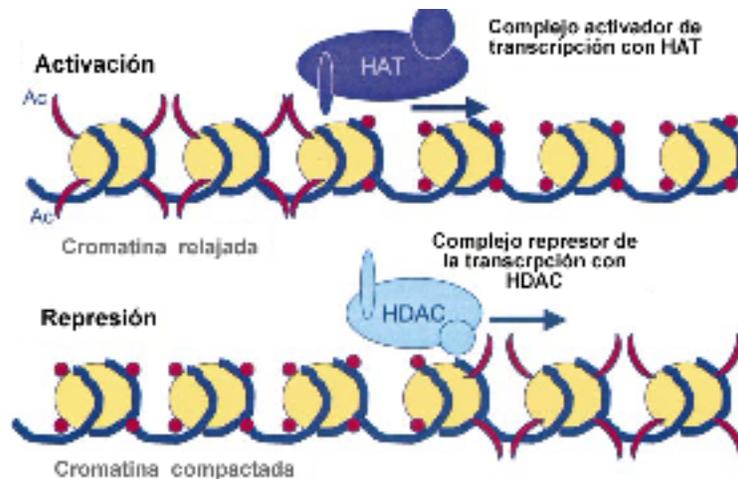


Figura 12. Activación y represión transcripcional en cromatina.

Las esferas amarillas representan octámeros de histonas. En la parte superior, las colas de histonas acetiladas (rojo) sobresalen del octámero; el ADN está mostrado en azul y la flecha representa el movimiento del complejo. Las HATs (activación transcripcional) y las HDACs (represión) requieren cofactores para su actividad [Adaptado de Ruijter et al. 2003].

Grupo funcional	Proteína	HDAC implicado
Proteína estructural	α -tubulina	HDAC6
Proteína chaperona	Hsp90	HDAC6
Receptores nucleares de unión a ADN	Receptor de andrógenos	HDAC1
	Receptor glucocorticoide	HDAC2
	Receptor de estrógeno α	ND
Factores de transcripción de unión a ADN	SHP	HDAC1, HDAC3, HDAC6
	p53	HDAC1
	p73	ND
	MEF2D	HDAC3
	GCMa	HDAC1, HDAC3, HDAC4, HDAC5
	YY1	HDAC1, HDAC2, HDAC3
	GATA-1	HDAC3, HDAC4, HDAC5
	GATA-2	HDAC3, HDAC5
	GATA-3	ND
	MyoD	HDAC1
	E2F-1	HDAC1
	E2F-2	ND
	E2F-3	ND
	RelA (in NF- κ B)	HDAC3
	PLAG1, PLAG2	HDAC7
Bcl-6	HDAC2	
Coreguladores de transcripción	c-Myc	ND
	EKLF	ND
	HIF-1 α	ND
	Rb	ND
Remodelación de cromatina	PGC-1 α	Class III
	DEK	ND
	HMG-A1	ND
	HMG-B1	ND
	HMG-B2	ND
Mediadores de señalamiento	HMG-N2	ND
	HMG1(Y)	ND
	SRY	HDAC3
	Stat3	HDAC1, HDAC2, HDAC3
Enzimas de reparación de ADN	Smad7	HDAC1, HDAC3, HDAC2, HDAC5, HDAC6
	IRS-1	ND
	β -catenina	ND
Importación nuclear	Ku70	ND
	WRN	ND
	Importina- α 7	ND

Tabla 3. Lista parcial de sustratos proteicos de las histona desacetilasas (HDACs).

ND=no determinada; HMG=grupo de alta movilidad [Adaptado de Dokmanovic et al. 2007].

La identificación de proteínas con actividad histona acetilasa y desacetilasa ha sido importante para entender la relación entre el grado de acetilación de histonas y la expresión genética [Brownell et al. 1996; Grunstein 1997; Pazin & Kadonaga 1997; Wade et al. 1997]. La transferencia de grupos acetato de acetil-CoA a las histonas es catalizada por *histona-acetiltransferasas* (HAT), mientras que su remoción está mediada por las *histona-desacetilasas* (HDAC) (Fig. 12). El grado de acetilación de histonas en sitios genómicos específicos es el resultado neto de un equilibrio entre estos dos tipos de enzima. Ambas proteínas, las HDACs y las HATs, no se unen directamente al ADN, sino que actúan sobre él a través de complejos multiproteicos que incluyen coactivadores y correpresores de transcripción [Sengupta & Seto 2004; Turner 2001]. Por lo tanto, estas proteínas *per se* no se unen al ADN de manera secuencia-específica, no son factores de transcripción; pero se pueden asociar más o menos específicamente con proteínas de unión secuencia-específica al ADN [Turner 2001].

Los correpresores requeridos para el funcionamiento de las HDACs están agrupados en diferentes clases funcionales; algunos correpresores aparecen en más de una clase por su función dual (Tabla 4). La presencia de estos componentes depende del tipo celular y los requerimientos particulares de transcripción. Para algunos HDACs no se han identificado aún correpresores, y se espera que en los próximos años se obtenga mayor información al respecto [Ruijter et al. 2003].

Los receptores nucleares hormonales, como el de estrógeno (ER), el glucocorticoide (GR), el de hormona tiroidea (TR) y el de ácido retinóico (RAR), funcionan como activadores transcripcionales, ya se unen a su respectivo elemento de respuesta cuando el ligando está presente. Sin embargo, el mediador de RAR y de TR, y el correpresor de receptor nuclear (N-CoR) no tienen ligando y funcionan como represores transcripcionales [Ruijter et al. 2003].

Las proteínas reclutadoras se unen a ADN de manera secuencia-específica, metilación-específica, o son intermediarios entre el ADN y el complejo HDAC. Del grupo de reclutadores, generalmente sólo un miembro está presente en cada interacción [Ruijter et al. 2003].

2.2.1.1 Histona-acetiltransferasas (HATs)

Las proteínas con actividad histona-acetiltransferasas (HATs) catalizan la formación de un enlace amida con el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina N-terminal de una histona nucleosomal [Turner 2001] (Tabla 3). La acetilación de histonas está asociada con el incremento de la expresión genética al funcionar como coactivadores transcripcionales [Yang 2004; Santo-Rosa & Caldas 2005]. Además, se ha determinado que algunas proteínas HATs pueden acetilar otras proteínas diferentes a las histonas [Yang 2004; Santo-Rosa & Caldas 2005] y en ocasiones se les denomina *lisina-acetiltransferasas* (LATs). Las HAT

existen en la naturaleza dentro de grandes complejos proteicos de 20 o más componentes y con pesos moleculares arriba de 2 MDa [Turner 2001].

Las HATs se separan en dos grupos de acuerdo a su ubicación subcelular y función (Tabla 5) [Bottomley 2004]. Las HAT tipo A se localizan en el núcleo y tienen funciones en la regulación de la expresión genética al funcionar como coactivadores transcripcionales; mientras que las tipo B están en el citoplasma y están involucradas en la síntesis y ensamblaje de cromatina. Sin embargo, se han identificado algunas características estructurales del dominio catalítico en las proteínas HAT [Marmorstein 2001]. El dominio base de los HATs está compuesto por tres pliegues- β seguidos por una α -hélice y un motivo hebra-asa- β [Bottomley 2004], con capacidad de unirse al cofactor acetil-CoA. Esta región tiene regiones adyacentes variables que se unen a histonas dependiendo de su secuencia. Estas regiones vecinas no contienen una porción asa- α -hélice N-terminal o un motivo asa- α -hélice C-terminal [Bottomley 2004].

Las diferentes subunidades catalíticas HAT pueden tener otras funciones además de la acetilación. Es posible que cada HAT tenga una especificidad particular y así actúe sobre diferentes histonas u otras proteínas, generando patrones de acetilación variados que podrían ser necesarios para la modulación óptima de cada gen. También es probable que un mismo gen requiera diferentes HATs para su activación dependiendo del estado de desarrollo celular [Turner 2001].

Cabe mencionar que las regiones con residuos de lisina acetiladas de las histonas son sitios específicos para los bromodominios de varias HATs. Los bromodominios también pueden unirse a otras proteínas acetiladas, como el factor de transcripción p53 y la proteína VIH-1 Tat [Bottomley 2004]. Los bromodominios adoptan una conformación de un aglomerado tetra-helical con dos asas terminales que forman un bolsillo hidrofóbico con afinidad a lisina, el cual selecciona preferentemente acetil-lisina con respecto a lisina no-modificada [Owen et al. 2000]. Los bromodominios de las proteínas HAT podrían promover la velocidad de acción del dominio catalítico, y así acentuar la actividad HAT en la cromatina y elevar el grado de acetilación local. Mientras que la acetilación de residuos de lisina mediada por HAT activa la unión de bromodominios, los residuos adjuntos a la modificación epigenética determinan la especificidad de esta unión [Bottomley 2004]. Un estudio determinó que los residuos clave para el reconocimiento del bromodominio pueden estar en cualquier dirección con respecto a la lisina acetilada [Mujtaba et al. 2002].

La clasificación en familias de las HATs más utilizada es la basada en las similitudes de sus secuencias: (1) Gcn5/PCAF, (2) p300/CBP (3) MYST y (4) Superfamilia GNAT [Yang 2004].

Adicionalmente, se ha determinado que un componente basal del complejo de iniciación de transcripción, TAF_{II}145 en levaduras y TAF_{II}250 en humanos, tiene actividad HAT [Turner 2001]. Sin embargo, aún no se ha determinado la función específica de TAF_{II} dentro de la modulación transcripcional, aunque puede estar relacionada con estudios que reportan la acetilación *in vivo* de otros componentes del complejo de transcripción [Turner 2001].

Familia Gcn5/PCAF. Nombrada de acuerdo a sus compuestos representativos: la proteína Gcn5 (control general no-derrepreisible 5) y la PCAF (factor asociado a CBP/p300) [Yang 2004]. La proteína Gcn5, encontrada en levaduras, cuenta con un dominio HAT y un bromodominio [Yang 2004]. Gcn5 presenta una gran homología a la porción C-terminal de las proteínas humanas PCAF y Gcn5L [Yang et al. 1996; Georgakopoulos & Thireos 1999; Wang et al. 1997; Smith et al. 1998a; Xu et al. 1998], las cuales también tienen dominios N-terminales PCAF-específicos [Roth et al. 2001]. Estas HATs han demostrado ser coactivadores transcripcionales [Roth et al. 2001; Carrozza et al. 2003; Nakatani 2001], además de acetiladores potenciales de otras proteínas diferentes a las histonas [Sternier & Berger 2000; Kouzarides 2000].

La proteína Gcn5L forma, al menos, dos complejos de subunidades distintos [Brand et al. 1999; Martinez et al. 2001; Yanagisawa et al. 2002]. Gcn5 es la subunidad catalítica de cuatro complejos [Carrozza et al. 2003; Grant et al. 1997; Grant et al. 1998; Saleh et al. 1998; Allard et al. 1999; Sternier et al. 2002; Pray-Grant et al. 2002]. Además, se ha determinado que la enzima desubiquitinadora Ubp8 está presente en dos de los complejos Gcn5, lo que la involucra en la modulación de la desubiquitinación de la histona H2B y la metilación de la histona H3 [Henry et al. 2003; Daniel et al. 2004; Zhang 2003].

La estructura de tGCN5 (Fig. 13), el homólogo de GCN5 en *Tetrahymena*, se percibe como un complejo de esta proteína con acetil-CoA y una histona H3 fosforilada en el residuo serina 10 (H3S10p). En este complejo, el cofactor se encuentra en un bolsillo de la superficie del centro HAT, cerca del sustrato H3K14 [Clements et al. 2003]. Se piensa que un glutamato (E) proximal de tGCN5, E122, se encarga de catalizar la transferencia del acetilo al residuo K14, vinculado a la activación transcripcional [Cheung et al. 2000a]. Aunque este residuo de glutamato es conservado en la familia GCN5, no está presente en todas las HATs, por lo que el plegamiento podría ser un factor importante en los mecanismos catalíticos.

Familia CBP/p300. Las proteínas CBP (de unión a CREB) y p300 (asociada a E1A de 300 kDa) forman parte de esta familia extensamente estudiada. Ambas funcionan como coactivadores transcripcionales capaces de acetilar los cuatro tipos de histonas conocidos en mamíferos, así como otras proteínas diferentes (Fig. 14). CBP/p300 es complejo grande, compuesto por más de 2,400 aminoácidos, lo que le permite ser multifuncional e interactuar con otras proteínas. Los dominios N- y

C-terminales de CBP/p300 son capaces de unirse al complejo de iniciación de transcripción por medio de la proteína de unión a la caja TATA (TBP), aunque la naturaleza de la influencia de esta unión en la activación transcripcional aún no ha sido dilucidada [Turner 2001] (Fig. 15).

Adicionalmente, las proteínas PCAF y SRC-I han demostrado unión con CBP/p300 y también cuentan con actividad HAT. La función de la presencia de las proteínas HAT en un mismo complejo aún no se conoce, aunque sí se sabe que cada HAT requiere diferentes activadores.

Por ejemplo, la activación de la proteína CREB requiere actividad HAT de CBP; al igual que RAR requiere a PCAF. Aunque la actividad HAT de la proteína CBP no es requerida directamente para la activación mediada por RAR, lo es indirectamente al ser necesaria para el ensamble apropiado del complejo coactivador.

Como algunas otras HATs, CBP/p300 puede reclutar a pp90^{rsk}. Esta proteína-cinasa es requerida para la activación de genes de respuesta a Ras, una proteína de unión a GTP con funciones de señalamiento de la membrana celular al núcleo. Se ha determinado que la actividad HAT de CBP/p300 puede ser alterada al variar su estado de fosforilación, y se espera que otras proteínas con esta actividad puedan reaccionar de manera similar.

Actividad HDAC	HDAC1 and HDAC2			
* SMRT no interactúa directamente con HDAC1	Complejo Sin3	Complejo NuRD	Complejo Co-REST	HDAC3
Unión de histonas	RbAp48	RbAp48		RbAp48
Reclutadores	llizos	MBD3		HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDRP, YY1, Rb, GATA-2, HDAC9, HDRP, HDAC10
Unión de receptor nuclear hormonal	YY1, RBP-1, Sp1, BRCA1, Rb, HDRP, proteína de heterocromatina-1, NF-κB, MeCP2, HDAC10			SMRT, N-CoR
Remodelación (miembros de familia helicasa/ATPasa)		Mi-2		
Moduladores necesarios de actividad HDAC		MTA2, p70, p32,	Co-REST	SMRT/N-CoR
Desconocidos	RbAp46, SAP18, SAP30	RbAp46		TBL1
Asociado como intermediario	Mad/Max, Mxi/Max, MeCP-1, ER, GR, TR, RPX	proteínas de homeodominio, c-Ski, Sno, Aiolos, p53, NY-F, REST, Suv39H1, PML-RARα, DNMT		CRM1, HDAC3
Actividad HDAC	HDAC4	HDAC5	HDAC7	HDAC9
Unión de histonas				
Reclutadores	MEF2	MEF2, GATA-2	MEF2	MEF2
Unión de receptor nuclear hormonal	SMRT, N-CoR	SMRT, N-CoR	SMRT, N-CoR	SMRT, N-CoR
Remodelación (miembros de familia helicasa/ATPasa)				
Moduladores necesarios de actividad HDAC	SMRT/N-CoR, HDAC3	SMRT/N-CoR, HDAC3	SMRT/N-CoR, HDAC3	
Desconocidos				
Asociado como intermediario	ERK1/2, CtBP, HDAC10	CtBP, HDAC10	CRM1, CtBP, HDAC10	HDAC1, HDAC3, SMRT, N-CoR

Tabla 4. Correproresores de las histona desacetilasas (HDACs).

Abreviaturas: RBP= proteína de unión a Rb; BRCA= proteína de susceptibilidad asociada al cáncer de seno; NF-κb= factor nuclear Kb; MeCP= proteína de unión a CpG metilado; MTA= proteína asociada a metástasis; SAP= proteína asociada a Sin3; TBL= proteína tipo-transducina b; M3D3= proteína 3 contenedora de dominio de unión a CpG metilado; PML= leucemia promielocítica; DNMT= ADN metiltransferasa; ERK= cinasa de regulación por señales extracelulares; CtBP= proteína de unión C-terminal. [Adaptado de Ruijter et al. 2003].

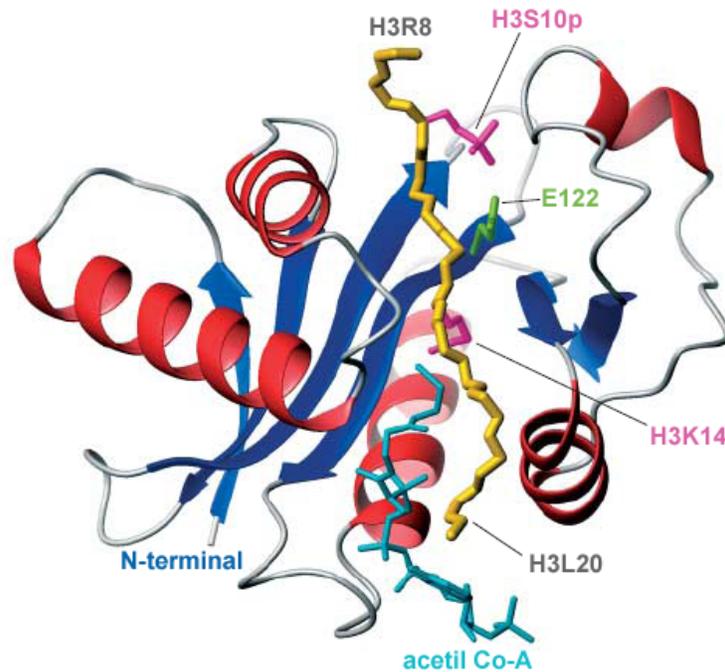


Figura 13. Modificación y reconocimiento de acetil-lisina.

El dominio HAT de tGCN5 con un acetil-CoA (turquesa) y una histona H3 que abarca desde R8 hasta L20 (mostrado en dorado). También se muestran las cadenas laterales del residuo E22, la H3S10p y el K14 blanco (morado) [Adaptado de Bottomley 2004].

Familia	LAT	Organismos	Sustrato	Complejo estequiométrico	Funciones establecidas
HAT1	Hat1	<i>S. cerevisiae</i> a mamíferos	H4	Hat B	Deposición de histonas, ensamblaje de cromatina, silenciamiento genético
Gcn5/PCAF	Gcn5	<i>S. cerevisiae</i>	H4/H2B	SAHA, ADA, HAT-A2, SLIK/SALSA	Coactivador transcripcional
	PCAF	Mamíferos	H3/H4, TFs, E1A, TAT	PCAF	
	GCN5L	gusanosa mamíferos	H3/H4, TFs	SAGA, TFIC	
CBP/p300	CBP	<i>C. elegans</i> a mamíferos	Histonas, TFs, E1A		Coactivador transcripcional y ligasa E4 ubiquitina p53
	p300	Mamíferos	Histonas, TFs, E1A, TAT		
MYST	Sas2	<i>S. cerevisiae</i>	H H4 K16 ^b	SAS	Silenciamiento genético
	Sas3	<i>S. cerevisiae</i>	H3	NuA3	Elongación transcripcional
	ESA1	<i>S. cerevisiae</i>	H4/H2A	NuA4, piccolo NuA4	Coactivador transcripcional y modulador ciclo celular
	Mof	<i>Drosophila</i>	H4K16	MSL	Compensación de dosis génica
	Chameau	<i>Drosophila</i>			Silenciamiento genético PcG-dependiente
	Enok	<i>Drosophila</i>			Proliferación de neuroblastos
	TIP60	Mamíferos	H3/H4, receptor de andrógenos	TIP60	Co-regulador transcripcional, reparación de ADN y apoptosis
	MOF	Mamíferos	H4	MAF2	Coactivador transcripcional
	HBO1	Mamíferos	H3/H4 ^b		Replicación de ADN, correpressor transcripcional
	MOZ	Mamíferos	H3/H4		Coactivador transcripcional
MORF	Mamíferos	H3/H4			
P160	SRC-1	Mamíferos	H3/H4		Coactivador transcripcional
	ACTR	Mamíferos	H3/H4		
CIITA	CIITA	Mamíferos	H4		
ATF2	ATF2	Mamíferos	H4/H2B		Activador transcripcional
TAF _{II} 250	TAF _{II} 230	<i>Drosophila</i>	H3/H4	TFIID	Iniciación de transcripción
	TAF _{II} 250	Mamíferos	H3/H4	TFIID	Iniciación de transcripción, cinasa y ubiquitina-ligasa
TFIIIC	Subunidad des TFIIIC	<i>S. cerevisiae</i> a mamíferos	H3/H4		Iniciación de la transcripción
Nut1	Nut1	<i>S. cerevisiae</i>	H3/H4	Mediador	
Elp3	Elp3	<i>S. cerevisiae</i> a mamíferos	Histonas	Elongador	Elongación de transcripción, lisina desmetilasa(?)
CDY	CDY	Humanos	H4		Transición histona-a-protamina durante la espermatogénesis
	CDYL	Mamíferos	H4		
Hpa2	Hpa2	<i>S. cerevisiae</i>	H3/H4		
	Hpa3	<i>S. cerevisiae</i>			
TFIIB	TFIIB	<i>S. cerevisiae</i> a mamíferos	TFIIB		Iniciación de transcripción
MCM3AP	MCM3A P	Mamíferos	MCM3		Iniciación de la replicación de ADN
Eco1	Eco1	Mamíferos	Subunidades de cohesina		Cohesión de cromátidas hermanas
ARD1	ARD1	Mamíferos	HIF1a		Asociación pVHL, ubiquitinación y degradación

Tabla 5. Clasificación de histona acetiltransferasas (HATs) conocidas.

TF = Factor de transcripción; ^bLas enzimas recombinantes presentan actividad débil, pero son mucho más activas cuando están con sus complejos respectivos [Adaptado de Yang et al. 2004].

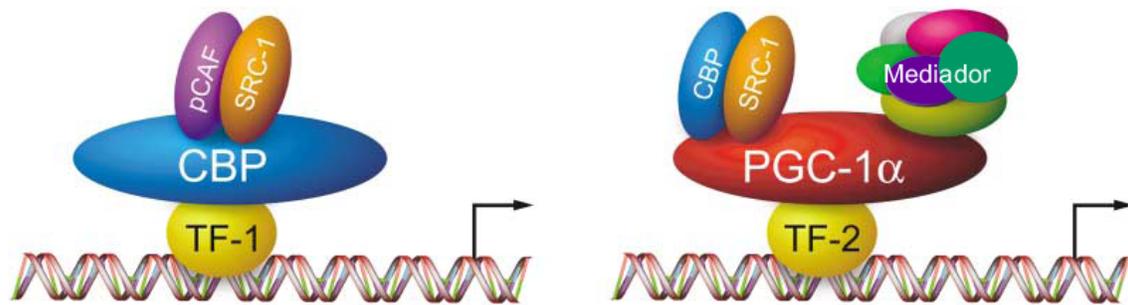


Figura 14. Proteínas coactivadoras de transcripción.

Ciertas proteínas coactivadoras, como CBP, tienen actividad HAT y se unen directamente a factores de transcripción (TF) y reclutan otras HATs como SRC-1 y PCAF. Además de funcionar como coactivador primario (imagen izquierda), CBP también puede funcionar como una proteína accesoria de un coactivador secundario, como PGC-1a (imagen derecha). PGC-1a se une a factores de transcripción y depende de CBP, SRC-1 y otras proteínas para activar algunas modificaciones enzimáticas de la cromatina [Adaptado de Spiegelman & Heinrich 2004].

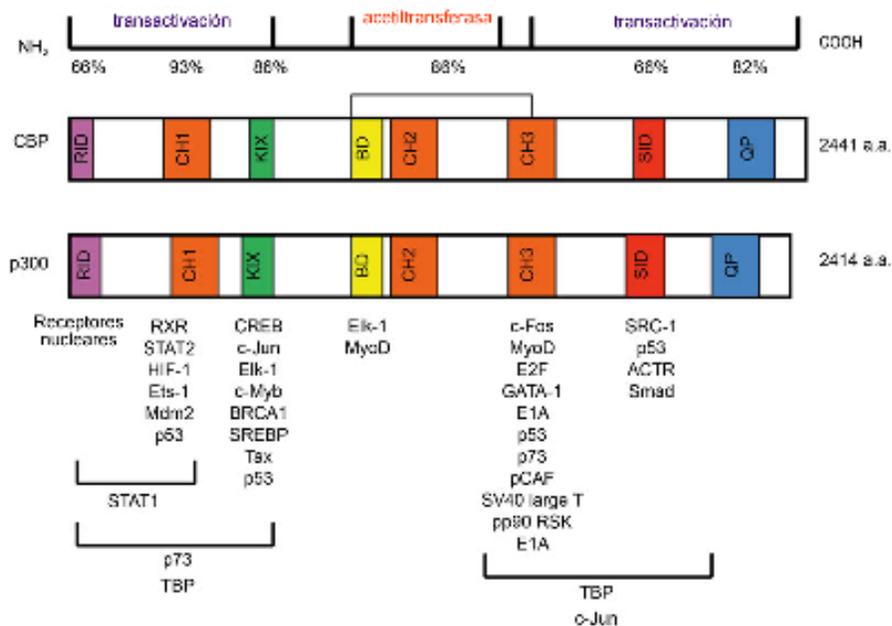


Figura 15. Regiones y dominios funcionales homólogos de CBP y p300.

Representación esquemática con una lista de proteínas que se unen a partes específicas de CBP/p300 (parte inferior de la imagen). Abreviaturas: CH1-3=regiones ricas en cisterna e histidina; KIX=sitio de unión para CREB; QP=dominio rico en glutamina y prolina; RID=dominio de interacción con receptor; SID=dominio de interacción con el coactivador-1 de receptor esteroideo [Adaptado de Karamouzis et al. 2002].

Familia MYST. El nombre de esta familia proviene de las iniciales de sus primeros cuatro miembros identificados: *MOZ* humana (proteína dedo de zinc de leucemia monocítica) [Borrow et al. 1996], *Ybf2* de levadura [Reifsnyder et al. 1996; Takechi & Nakayama 1999], *Sas2* de levadura [Reifsnyder et al. 1996], y *TIP60* de mamíferos (proteína VIH de interacción-Tat de 60 KDa) [Kamime et al. 1996; Yamamoto & Horikoshi 1997; Ran & Pereira-Smith 2000]. Comparada con los grupos Gcn5/PCAF y p300/CBP, la familia MYST es la más grande y diversa; no obstante, es la menos caracterizada.

Las proteínas MYST, generalmente relacionadas con la silenciación transcripcional, tienen dominios similares, aunque parecen actuar a diferentes niveles de procesos celulares. Los miembros de esta familia poseen una región acetiltransferasa conservada de ~370 residuos, el dominio MYST, altamente homólogos entre sí (identidad, 36-77%; similitud, 54-84%) y que contiene un dedo de zinc atípico. En mamíferos se han identificado cinco proteínas MYST divididas en tres subgrupos: (1) Moz [Champagne et al. 1999] y Qkf, (2) MOF y TIP60 y (3) HBO1 [Iizuka & Stillman 1999] (Fig. 16).

Moz y Qkf son dos proteínas con varios dominios altamente relacionados. La porción N-terminal de ~200 aminoácidos se encuentra conservada en Moz y Qkf de varias especies animales. Este dominio está ausente en otras proteínas, pero tiene fragmentos con ligera homología a las histonas H1 y H5. Además, Moz y Qkf presentan dos dedos de zinc tipo-PHD, lo que les permite unirse a residuos trimetilados de lisina 4 en histona H3 (H3K4me3) [Li et al. 2006b; Wysocka et al. 2006; Shi et al. 2006]. Estas proteínas tienen un dominio MYST muy conservado, con más del 95% de similitud [Thomas et al. 2000]. La porción central de Moz/Okf es ácida [Thomas & Voss 2007]. El dominio C-terminal es único en Moz y Qkf, ya que tiene un dominio rico en serina y otro rico en metionina. La conservación de la secuencia entre estas dos proteínas es alto, por lo que su principal diferencia bioquímica es el espacio entre los dominios: Moz contiene una secuencia de 58 residuos, exclusivamente prolina y glutamina, entre el dominio rico en serina y el rico en metionina; mientras que este espaciado está ausente en la proteína Qkf [Thomas & Voss 2007].

Las proteínas TIP60 y Mof se parecen a la proteína Esa1p, la cual es esencial para el crecimiento de *S. cerevisiae* [Smith et al. 1998b]. El grupo TIP60 se caracteriza por un cromodominio conservado y el dominio MYST. El cromodominio se puede encontrar en proteínas involucradas en el silenciamiento transcripcional, como Hp1, y tiene la capacidad de unirse a colas N-terminales de histonas [Nielsen et al. 2002; Jacobs & Khorasanizadeh 2002]. Sin embargo, el cromodominio de Mof en *Drosophila* puede interactuar con ARNnc también [Akhtar et al. 2000].

La proteína HBO1 es el único miembro de las MYST en mamíferos que no tiene una molécula homóloga con la misma estructura de dominios [Thomas & Voss 2007]. HBO1 tiene un dominio histona

acetiltransferasa MYST y un dominio N-terminal rico en serina. Además, HBO1 tiene un dominio de dedo de zinc tipo C2HC [Thomas & Voss 2007].

Superfamilia GNAT, N-acetil-transferasa relacionada a Gcn5. En este grupo se encuentran las proteínas HAT1 (histona acetiltransferasa-1), Nut1, Elp3, Hpa2/Hpa3, MCM3AP, Eco1 y ARD1 [Roth et al. 2001; Carrozza et al. 2003; Ivanov et al. 2002; Jeong et al. 2003; Neuwald & Landsman 1997]. **La familia se caracteriza porque sus miembros comparten tres o cuatro motivos similares con algunas N-acetiltransferasas. Uno de los motivos es el sitio de unión acetil-CoA clásico, solo presente en la familia MYST y en ATF2** [Carrozza et al. 2003; Kawasaki et al. 2000; Borrow et al. 1996; Reifsnyder et al. 1996].

2.2.1.1 Histona-desacetilasas (HDACs)

Las histona-desacetilasas (HDACs) catalizan la remoción del grupo acetilo de la α -acetil-lisina [Xu et al. 2007], por lo tanto, las HDACs disminuyen el grado de acetilación (Fig. 17). La hipoacetilación produce una disminución del espacio existente entre el centro del nucleosoma y el ADN que está a su alrededor: ya que el ADN está envolviendo con mayor firmeza la estructura del nucleosoma, disminuye el acceso a factores de transcripción y así induce una represión transcripcional [Wade 2001; Strahl & Allis 2000; Yoshida et al. 2001].

El dominio catalítico de las HDACs está formado por una secuencia conservada de ~390 aminoácidos con una forma de bolsillo tubular ligeramente curvado y un fondo amplio [Finnin et al. 1999]. La remoción del grupo acetilo está mediado por un sistema regulador de carga que consiste en dos residuos de histidina, dos residuos de ácido aspártico (separados entre sí por ~6 residuos localizados a ~30 aminoácidos de distancia de las histidinas), una tirosina ubicada a ~123 aminoácidos río abajo de los residuos de ácido aspártico y un ión Zn^{2+} en el fondo del "bolsillo" [Ruijter et al. 2003].

La modulación de la actividad HDAC ocurre por medio de interacciones proteína-proteína, modificaciones post-traduccionales (sumoilación, fosforilación y proteólisis), ubicación/translocación subcelular y por disponibilidad de cofactores metabólicos [Sengupta & Seto 2004]. Las HDACs de clase I y II encuentran en el núcleo sus sustratos proteicos predominantes, por lo que necesitan estar ahí para realizar su función. La definición de la localización de las HDAC ocurre a través de una *señal de localización nuclear* (NLS) o por co-localización con otras proteínas [Ruijter et al. 2003].

Hasta el momento se han identificado dieciocho enzimas con actividad histona-desacetilasa en seres humanos y se clasifican, según su homología con proteínas de levaduras, en cuatro clases [Dokmanovic et al. 2007] (Tabla 6):

Clase I: HDACs homólogas a RPD3: HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8. Estas enzimas son expresadas de manera ubicua y han mostrado tener influencia en la supervivencia y proliferación celular. Tienen un tamaño aproximado de 50 kDa y se localizan predominantemente en el núcleo, con la posible excepción de HDAC3 [Yang et al. 2002b].

Las células HDAC1-*knockout* (HDAC1-KO) muestran un defecto general en la proliferación y en la supervivencia, aunque exista una mayor actividad de HDAC2 y HDAC3 [Lagger et al. 2002]. Además, se ha comprobado que las HDAC1 y HDAC3 promueven la estabilidad del factor hipoxia-inducible-1 α por su interacción directa con el factor de transcripción [Kim et al. 2007]. Otro efecto en la proliferación y supervivencia celular se observó con HDAC2, ya que ha comprobado tener actividad transcripcional a través de su influjo en la actividad de unión de p53 al ADN [Harms & Chen 2007].

También se ha notado cierta influencia de las HDAC de este grupo en la diferenciación y definición de características tisulares. Organismos HDAC2-KO, HDAC5-KO y HDAC8-KO, individualmente, han mostrado defectos cardíacos [Trivedi et al. 2007; Zhang CL et al. 2002]. En otro estudio, los ratones HDAC4-KO presentaron defectos en la diferenciación de condrocitos [Vega et al. 2004].

Las células HDAC7-KO mostraron defectos en el mantenimiento de la integridad vascular. Esta enzima es un ejemplo de proteína con localización dependiente de alguna modificación: la ubicación subcelular de HDAC7 depende de su estado de fosforilación, ya que cuando está desfosforilada se encuentra en el núcleo [Dokmanovic et al. 2007].

Características generales de los HDAC

Clase I							
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8			
Localización	Núcleo	Núcleo	Núcleo	Núcleo			
Tamaño (aminoácidos)	483	488	428	377			
Localización cromosomal	1p34.1	6q21	5q31	Xq13			
Sitios catalíticos	1	1	1	1			
Distribución en tejidos	Ubicuo	Ubicuo	Ubicuo	Ubicuo (?), liso diferenciación muscular			
Sustratos (lista parcial)	Receptor androgeno, SHP, p53, MyoD, E2F-1, Stat3	Receptor glucocorticoide, YY-1, Bel-6, Stat3	SHP, YY-1 GATA-1, RelA, Stat3, MEF2D				
Compuestos de unión (lista parcial)			CDK9, SP1, PP4c	EST1B			
Fenotipo knockout	EL con acetilación de histona incrementada, Defecto cardiaco incrementada en p21 y p27						

Clase IIa				Clase IIb		Clase IV	
	HDAC4	HDAC5	HDAC7	HDAC9	HDAC6	HDAC10	HDAC11
Localización	Núcleo/citoplasma	Núcleo/citoplasma	Núcleo/citoplasma	Núcleo/citoplasma	Citoplasma generalmente	Citoplasma generalmente	Citoplasma generalmente
Tamaño (aminoácidos)	1,084	1,122	855	1,011	1,215	669	347
Localización cromosomal	2q37.2	17q21	12q13	7p21-p15	Xp11.22-23	22q13.31-q13.33	3p25.2
Sitios catalíticos	1	1	1	1	2	1	2
Distribución en tejidos	H, SM, B	H, SM, B	H, PL, PA, SM	B, SM	H, L, K, PA	L, S, K	B, H, SM, K
Sustratos (lista parcial)	GCMa, GATA-1, HP-1	GCMa, Smad7, HP-1	PLAG1, PLAG2		α -tubulina, Hsp90		
Compuestos de unión (lista parcial)	ANKRA, RFXANK	CAMP1A, REA, receptor de estrógeno	FOX3P, HIF-1 α , Bel-6, receptor endotelina, α -actinina 1, α -actinina 4, receptor androgeno, Tip60	FOX3P	SHP, Smad7	Runx2	
Fenotipo knockout	Defectos en diferenciación de condrocitos	Defecto cardiaco	Mantenimiento de la integridad vascular, incrementa en MMP10	Defecto cardiaco			

Tabla 6. Características de las histona desacetilasas (HDACs).

Abreviaturas: H=corazón; SM=músculo esquelético; B=cerebro; PL=placenta; PA=páncreas; L=hígado; K=riñón; S=médula; EL=embrión letal; Stat3= transductores de señales y activadores de transcripción 3; CDK9=cinasa ciclina-dependiente 9; MMP10=matriz metaloproteinasas 10; Hsp90=proteína de shock de calor 90; HIF-1 α = factor hipoxia-inducible-1 α [Adaptado de Dokmanovic et al. 2007].

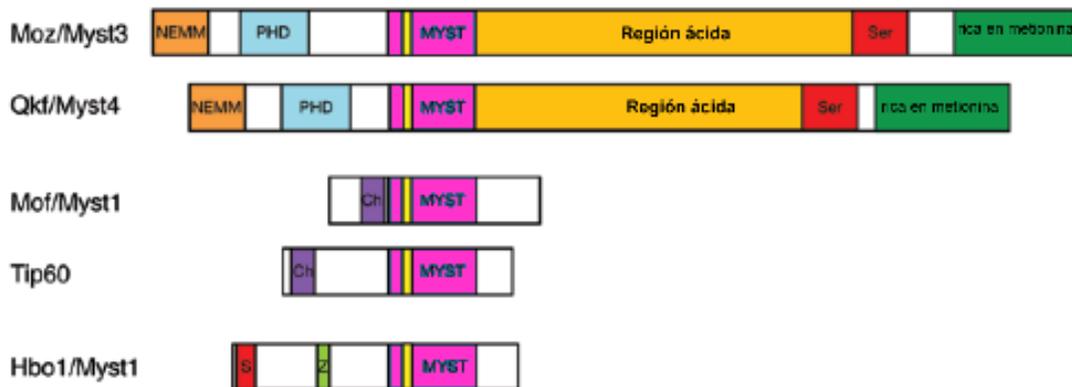


Figura 16. Comparación de los miembros de la familia MYST y sus dominios proteicos.

El dominio MYST histona acetiltransferasa (rosa) es el catalítico e incluye un dominio de unión a acetil-CoA. Los otros dominios están representados de la siguiente forma: Dedo de zinc tipo C2HC (zona amarilla dentro del dominio MYST); dominio de homología N-terminal Enok, Myst3, Myst4 (NEMM, naranja); Homeodominio de planta dedo de zinc tipo-C4HC3 (PHD, azul claro); región ácida central (ámbar); dominio rico en serina (Ser, rojo); dominio rico en metionina (verde); cromodominio (Ch, morado); dedo de zinc tipo C2HC (Z, verde brillante) [Adaptado de Thomas & Voss 2007].

La localización de HDAC1 y HDAC2 es exclusivamente nuclear, lo que explica la ausencia de una *señal de exportación nuclear* (NES) en ellos [Johnstone 2002]. La proteína HDAC3 tiene una *señal de importación nuclear* (NIS) y una NES, lo que sugiere que se puede encontrar tanto en el núcleo como en el citoplasma, aunque generalmente se ha detectado en el núcleo reclutado por HDAC4, HDAC5 y HDAC7 por su unión al ADN por medio de correpresores [Fischle et al. 2002; Fischle et al. 2001; Yanget al. 2002b]. Posiblemente existe una dominancia específica del tipo celular de una señal sobre la otra [Yang WM et al. 2002b]. HDAC8 se ha encontrado solamente en el núcleo [Wyngaert et al. 2002].

Clase II: HDACs homólogas con HDAC1: HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9, HDAC6 y HDAC10. Las HDACs de clase IIa comprenden a las HDAC4, HDAC5, HDAC7 y HDAC9. Estas proteínas, de ~120-150 kDa, cuentan con una extensión N-terminal que contiene dos sitios de fosforilación por *proteína-quinasas calcio/calmodulina-dependientes* (CaMK) [McKinsey et al. 2002a]. Estas enzimas tienen la capacidad de translocarse del núcleo al citoplasma, y viceversa: cuando los sitios CaMK se fosforilan, las proteínas 14-3-3 pueden unirse, favorecer la exportación nuclear de la HDAC y de-reprimir la expresión de los genes vulnerables a la actividad HDAC [McKinsey et al. 2000b; Grozinger & Schreiber 2000]. La HDAC9 puede estar en el núcleo o en el citoplasma, según su variante de ajuste alternativo [Ruijter et al. 2003]. La HDAC11 se encuentra generalmente en el núcleo, pero se ha encontrado que también co-precipita con la HDAC6 citoplasmática [Gao et al. 2002; Bertos 2001]. La ubicación de HDAC4, HDAC5 y HDAC7 se ha estudiado extensivamente en tejido muscular y se ha obtenido el siguiente modelo [Fischle et al. 2002; Fischle et al. 2001; Pflum et al. 2002].

- HDAC4 es fosforilada por inducción de una señal de diferenciación – por una CaMK. Esto resulta en la exportación de HDAC4 junto con CRM1, un factor de exportación nuclear para proteínas con un NES rico en leucina. Posteriormente, la proteína 14-3-3 (ancla citoplásmica) se une a HDAC4 y hace que permanezcan en el citoplasma. Cuando termina la fusión de las células musculares, después de su diferenciación terminal, HDAC4 se separa de 14-3-3 por un incremento de su estado de fosforilación y así HDAC4 regresa al núcleo [Ruijter et al. 2003].
- HDAC5 se encuentra en el núcleo durante la proliferación (etapa de pre-diferenciación) de células musculares y es activada para su transportación al citoplasma durante la diferenciación. Se cree que CaMK participa también en este caso como mediador del cambio de compartimiento, ya que el dominio consenso de unión 14-3-3 está presente. No obstante, como HDAC5 también cuenta con un dominio NES, no se ha podido confirmar que CaMK sea el único responsable del transporte de HDAC5 fuera del núcleo. Las HDAC4 y HDAC5 están inicialmente en el mismo compartimiento

celular pero al final uno termina en el citoplasma y el otro en el núcleo, respectivamente [Ruijter et al. 2003].

- La HDAC7 tiene un alto grado de similitud, en cuanto a su secuencia, con HDAC5; sin embargo, HDAC7 no tiene un dominio NES en su estructura. El transporte del núcleo al citoplasma es posible en HDAC7 durante la diferenciación de miocitos, lo que indica que la señalización vía calcio (unión a proteína 14-3-3) está involucrada en esta proteína también [Ruijter et al. 2003].

Las HDACs clase IIb, HDAC6 y HDAC10, cuentan con dos sitios catalíticos y generalmente se encuentran en el citoplasma [Dokmanovic et al. 2007; Hubbert et al. 2002; Bertos et al. 2001; Fischer et al. 2002; Kao et al. 2002].

Mientras las HDACs de clase I parecen tener funciones en la proliferación y supervivencia celular, las HDACs de clase II muestran funciones tejido-específicas [Dokmanovic et al. 2007]. Estas proteínas se expresan con gran magnitud en músculo estriado y cerebro.

Clase III: HDACs homólogas a Sir2 de levadura: SIRT1 y posiblemente SIRT7. Las HDACs clase III son capaces de catalizar una desacetilación que consume una molécula NAD^+ por grupo acetilo removido de un residuo de lisina. Las SIRTs rompen el enlace glicosídico entre la nicotinamida y la porción ADP-ribosa de NAD^+ . Subsecuentemente, el grupo acetilo removido del sustrato puede ser transferido a la molécula de ADP-ribosa para formar 2'-O-AADP-ribosa y la 3'-O-AADP-ribosa [Hassa et al. 2006].

También denominada la familia Sir2, las sirtuínas constituyen una clase de proteínas altamente conservadas de las cuales se han encontrado siete miembros en seres humanos (Tabla 7): SIRT1-7 [Michan & Sinclair]. Entre estas proteínas; SIRT1, SIRT2 y SIRT5 tienen un dominio desacetilasa NAD^+ -dependiente. Las sirtuínas no muestran similitudes de secuencia con otras clases de HDAC [Blander & Guarente 2004] y el ión zinc, característico de otras familias de HDACs, no se encuentra en estas enzimas, por lo que no son inhibidas por compuestos que interactúen con éste, como el butirato, tricostatina A o el valproato [Dokmanovic et al. 2007; Xu et al. 2007]. Los miembros de la familia sirtuína tienen ubicaciones subcelulares bien definidas: SIRT1, SIRT6 y SIRT7 se localizan en el núcleo; SIRT2 en el citoplasma; mientras que SIRT3, SIRT4 y SIRT5 están en mitocondrias [Mariadson 2008].

Las HDACs clase III han sido implicadas en varios procesos biológicos como la extensión de la supervivencia bajo condiciones de restricción calórica [Lamming et al. 2005; Vijg & Suh 2006], desacetilación de histonas de regiones cromosómicas silenciadas [Brachmann et al. 1995; Freeman-Cook et al. 2005; Perrod et al. 2001], y en la regulación de otras proteínas relacionadas con la supervivencia celular como p53, p33 y tubulina [North & Verdin 2004].

A continuación se mencionarán las características de las sirtuínas nucleares hasta ahora identificadas con acción proteína-desacetilasa.

SIRT1

La sirtuína SIRT1 es la que más se ha estudiado y se le ha conocido como una proteína guardiana contra el estrés oxidativo y el daño al ADN. Se han identificado varios sustratos de desacetilación para esta proteína, entre los que se encuentran p53, Ku70, NF- κ B y las proteínas *forkhead* [Luo et al. 2001; Vaziri et al. 2001; Brunet et al. 2004; Cohen et al. 2004; Motta et al. 2004; Yeung et al. 2004], mostrando un efecto modulador de la resistencia celular al estrés. La SIRT1 también ha mostrado regular la actividad de los receptores nucleares PPAR γ y PGC-1 α , para así influenciar en la diferenciación de miocitos, la adipogénesis, almacenamiento de grasa en tejido adiposo blanco, metabolismo hepático; lo que infiere que esta sirtuína está relacionada con la complejidad y la longevidad de los individuos [Fulco et al. 2003; Picard et al. 2004; Rodgers et al. 2005]. Los animales de una camada endogámica SIRT1-KO mueren después de nacer; mientras que los animales producidos por xenogamia SIRT-KO pueden sobrevivir hasta la edad adulta pero con un tamaño pequeño, mineralización de los huesos retardada, cierre esquelético defectuoso, apertura de párpados demorada y esterilidad [Cheng et al. 2003; McBurney et al. 2003; Lemieux et al. 2005].

SIRT7

La proteína SIRT7 se ha encontrado en nucléolos de células humanas [Michishita et al. 2005; Ford et al. 2006] y su expresión se ha correlacionado con el crecimiento [Ford et al. 2006]: la SIRT7 es abundante en tejidos con alto grado de proliferación, como el hígado, médula espinal y testículos. En contraste, la expresión de SIRT7 es mínima o nula en tejidos no proliferativos como el del corazón, cerebro y músculo [Haigis & Guarente 2006]. Se ha observado que SIRT7 se asocia, en el nucléolo, con ADN r e interactúa con la ARN polimerasa I. Entonces, esta sirtuína parece activar la transcripción de la ARN polimerasa I [Ford et al. 2006].

No se ha identificado actividad desacetilasa NAD $^{+}$ -dependiente en SIRT7 [North et al. 2003], pero los residuos de aminoácidos de unión a NAD $^{+}$ en el dominio central conservado de sirtuína son requeridos para la actividad de SIRT7 [Ford et al. 2006]. Esto sugiere que SIRT7 puede ser un modulador del crecimiento celular y el metabolismo NAD-dependiente [Haigis & Guarente 2006], pero aún se requiere mayor investigación para llegar a una conclusión más definitiva.

Clase IV: HDAC con sitio catalítico compuesto residuos conservados encontrados en HDACs de clase I y II: HDAC11. La HDAC11 es el miembro más recientemente identificado de la familia HDACs [Gao et al. 2002]. Esta proteína tiene una mezcla de los residuos característicos de las HDACs de clase I y II, sin embargo, no se pudo clasificar dentro de alguno de estos grupos porque la identidad de

su secuencia, en relación con otras HDACs, aún es limitada. Sin embargo, estudios filogenéticos indican que HDAC11 está relacionada con HDAC3 y HDAC8, lo que infiere que esta proteína tiene mayor similitud con las HDAC de clase I.

La proteína HDAC11 tiene un dominio catalítico situado en la zona N-terminal con actividad HDAC probada y limitada por trapoxina. Además, se ubica generalmente en el núcleo; no obstante, se ha observado que esta proteína co-precipita con HDAC6 en el citoplasma [Gao et al. 2002; Bertos 2001]. Esta proteína no ha sido encontrada en complejos HDAC conocidos (Sir3,N-CoR/SMRT, etc), por lo que es probable que esta HDAC tenga una función bioquímica diferente a las demás [Gao et al. 2002].

2.2.2 Metilación

Algunas modificaciones, como la acetilación y la fosforilación, son reversibles y dinámicas y generalmente están asociadas con regulación inducida de genes individuales. Desde 1967 se tienen registros de actividad metiltransferasas en histonas [Paik & Kim 1967]; sin embargo, ahora se sabe que esta transformación parece ser una alteración más estable que las otras, y aparentemente participa como mecanismo de memoria celular en el estado transcripcional al fijar la organización de la cromatina en una forma hereditaria [Volkel & Angrand 2007]. Los blancos de metilación en histonas son los residuos de lisina y arginina de las histonas H3 y H4, por tres enzimas de familias diferentes: PMRT [Zhang & Reinberg 2001; Bedford & Richard 2005], que metila residuos arginina; los metiladores de lisina que son las proteínas con dominios SET [Lachner et al. 2003; Kouzarides 2002] y las enzimas Dot1/DOT1L [Volkel & Angard 2007]. Cada residuo de lisina puede ser metilado hasta tres veces, mientras que en el caso de arginina se puede encontrar hasta dimetilada [Bannister et al. 2002].

Otra diferencia importante es que, mientras que la metilación de arginina está ligada principalmente a activación transcripcional, la misma modificación en lisina puede estar asociada a activación y represión de expresión, dependiendo del sitio modificado y el grado de metilación de cada residuo. Por lo tanto, la variable principal, desde el punto de vista de metilación de histonas, es el estado de la lisina. Las marcas de activación transcripcional mostraron en la histona H3, metilación en lisina 4 (H3K4), lisina 36 (H3K36) y lisina 79 (H3K79). En contraste, las marcas de un estado silenciado son: en histona H3, metilación en lisina 9 (H3K9) y lisina 27 (H3K27); mientras que en histona H4, metilación de lisina 20 (H4K20) [Cao et al. 2002; Peters et al. 2003; Rice et al. 2003; Schotta et al. 2004; Hadorn 1978; Ringrose & Paro 2004]. Las *histona lisina metiltransferasas* (HKMTs) son muy específicas, de acuerdo a la ubicación de la lisina blanco, pero a veces son muy redundantes [Volkel & Angrand 2007].

En el año 2006 se publicó un estudio [Zinner et al. 2006] que analizó el arreglo tridimensional de sitios específicos de metilación de lisina (H3K4me3, H3K9me1, H3K9me3, H3K27me3, H4K20me1) en varias líneas celulares humanas y describió la proximidad espacial de regiones metiladas a centrómeros o ARN recién sintetizado. Así mismo, se demostró que los patrones de metilación están organizados en distintas capas nucleares con cierto traslape dependiendo del tipo de modificación epigenética [Zinner et al. 2007; Skalniková et al. 2007]. Además, se reportó un coeficiente de co-localización del 38% para los marcadores H4K20me1 y H3K4me3 activos de cromatina; además de cierta co-localización de marcadores de heterocromatina, como H3K9me3 y H3K27me3. Estos resultados infieren un traslape de modificaciones de histonas asociadas con heterocromatina en la periferia nuclear, donde los procesos como la transcripción son poco comunes [Zink et al. 2004; Williams et al. 2006]. Los resultados anteriores también documentan la existencia de diferentes capas nucleares con modificaciones específicas de histonas, lo que complementa el modelo de compartimentación de la interfase de la cromatina [Cremer & Cremer 2001; Lanctôt et al. 2007].

2.2.2.1 Proteína arginina-metiltransferasas (PRMTs)

La metilación de residuos de arginina es una modificación post-traducciona común en organismos eucariotas. Las enzimas PRMT, distribuidas en una amplia gama de organismos, están clasificadas en dos tipos: ambos tipos producen residuos de arginina mono-metilados, pero el tipo I (PRMT1, PRMT2, PRMT3, PRMT4, PRMT6, PRMT8 [Bedford & Richard 2005; Lee et al. 2005a]) también puede transformar los residuos en di-metilados asimétricos, mientras que el tipo II (PRMT5 [Branscombe et al. 2001], PRMT7 [Lee et al. 2005a], PRMT9 [Cook et al. 2006]) crea di-metilaciones simétricas. Hasta el momento, se han reportado en la literatura nueve PRMTs, de las cuales seis han mostrado actividad: PRMT1, PRMT3, CARM1/PRMT4, JBP1/PRMT5, PRMT6 y PRMT7 [Gary & Clarke 1998; McBride & Silver 2001; Pei et al. 2007] (Fig. 18). Estas enzimas se expresan de forma ubicua en las células y pueden alcanzar un grado de especificidad de tejido por ajuste alternativo.

El tamaño de estas proteínas generalmente varía, encontrándose aquellas con 348 hasta ~692 residuos de PRMT7 [Bedford & Richard 2005]. La actividad metiltransferasa reside en una región central, altamente conservada, de ~310 aminoácidos. Según las estructuras modeladas hasta el momento, la región catalítica de PRMT consiste en dos dominios acoplados en una estructura integral. La mitad N-terminal del centro funciona como dominio de unión a S-adenosil metionina (SAM) y consiste en un pliegue Rossmann junto con dos α -hélices [Zhang et al. 2000]. La otra mitad C-terminal, menos conservada, del centro forma una estructura con forma de barril que se dobla en sentido contrario a la porción N-terminal [Lee et al. 2005]. El estudio tridimensional de la estructura reveló que las PRMTs contienen un

brazo de dimerización, que podría ser útil para mantener los residuos en una posición propia para su interacción con SAM.

Este dímero PRMT conservado también podría servir para sustentar un modelo de producción: un dímero en forma de anillo podría permitir la entrada del primer producto de metilación, mono-metil-arginina, al sitio activo de la segunda molécula del dímero sin liberar al sustrato del anillo [Zhang & Cheng 2003]. Además, las PRMTs tienen una región N-terminal que varía ampliamente en longitud. No obstante, aunque exista un alto grado de conservación del dominio metiltransferasa, existe relativamente poco traslape en la especificidad del sustrato entre PRMTs.

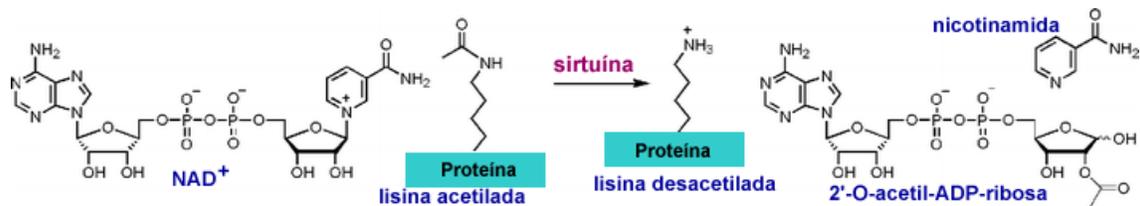


Figura 17. Desacetilación de residuos de lisina por medio de sirtuínas, un tipo de histona desacetilasa.

Sirtuína	Actividad	Ubicación	Sustratos	Función biológica
SIRT1	Desacetilasa	Núcleo	FOXO, PGC-1a	Supervivencia celular, metabolismo
SIRT2	Desacetilasa	Citoplasma	Tubulina, histona H4	Ciclo celular
SIRT3	Desacetilasa	Mitocondria	AceCS2	Termogénesis, metabolismo
SIRT4	ADP-ribosiltransferasa	Mitocondria	GDH	Secreción de insulina, metabolismo
SIRT5	Desacetilasa	Mitocondria	?	?
SIRT6	ADP-ribosiltransferasa	Núcleo	ADN-polimerasa-b	Reparación de ADN
SIRT7	?	Nucleolo	ARN-polimerasa I	Transcripción de ADNr

Tabla 7. Características de las sirtuínas identificadas en mamíferos.

Abreviaturas: FOXO = Proteínas *forkhead box* clase O; AceCS2=Acetil-CoA sintetasa 2; GDH = glutamato-deshidrogenasa; ADNr = Ácido desoxirribonucleico recombinante [Adaptado de Haigis & Guarente 2006].

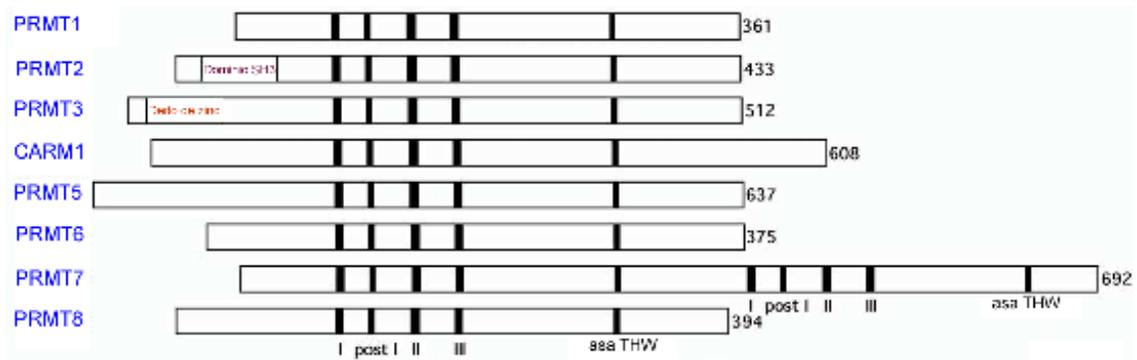


Figura 18. Estructura de los primeros ocho miembros de la familia PRMT en mamíferos.

Contienen los motivos característicos I, post-I, post-II y post-III; y el asa conservada THW. PRMT7 tiene duplicados estos motivos. PRMT2 tiene un dominio SH3, mientras que PRMT3 contiene un dedo de zinc, posiblemente para un mejor reconocimiento de sustrato. El número de residuos está indicado en la C-terminal de cada PRMT. No se incluye el PRMT de reciente identificación y caracterización, PRMT9 [Adaptado de Bedford & Richard 2005].

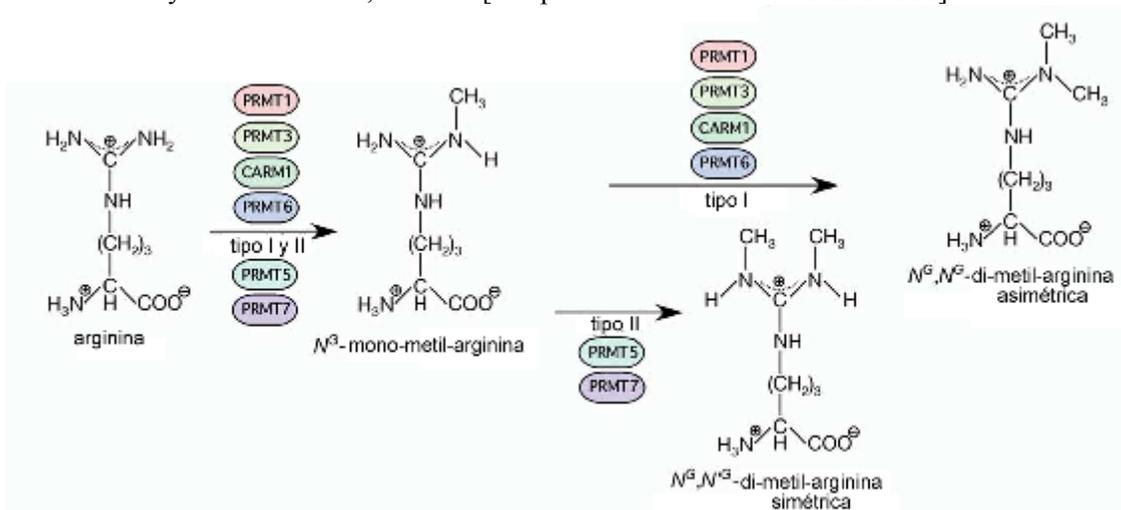


Figura 19. Mecanismo de acción de las proteínas arginina-metiltransferasas [Adaptado de Bedford & Richard 2005].

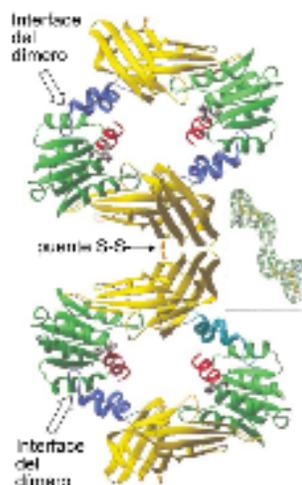


Figura 20. Formación del dímero de PRMT1. Dos dímeros tipo anillo están conectados por un puente disulfuro. El dímero está formado por el brazo (azul) y el dominio externo de unión a SAM (verde) [Adaptado de Zhang & Cheng 2003].

Básicamente, su mecanismo de acción consiste en transferir un grupo metilo de S-adenosilmetionina (SAM) a un nitrógeno guanidino de arginina, resultando en la formación de S-adenosilhomocisteína y metil-arginina (Fig. 19). No se ha observado actividad en PRMT2 y PRMT8. Hasta el momento, se sabe que los residuos de arginina en las histonas pueden ser metiladas por PRMT1, CARM1 y PRMT5 [McBride & Silver 2001; Pal et al. 2004].

PRMT1. La enzima PRMT1 (Fig. 20) ha demostrado que puede metilar específicamente a residuos de arginina 3 de la histona H4 (H4R3) *in vivo* e *in vitro* [Chen et al. 1999; Strahl et al. 2001; Wang et al. 2001].

CARM1/PRMT4. La variante CARM1 metila residuos de arginina 2, 17 y 26 de la histona H3 (H3R2, H3R17, H3R26) [Schurter et al. 2001]. Según estudios de inmunoprecipitación de cromatina, la proteína CARM1, por sí misma, y la metilación de H3R17 están asociados con los promotores hormona-inducibles de genes reporteros y endógenos de una forma hormona-dependiente [Ma et al. 2001; Bauer et al. 2001]. Por lo tanto, el reclutamiento de CARM1 y la metilación de arginina en la histona H3 son parte del proceso de activación transcripcional [Lee et al. 2005a].

PRMT5. Ha mostrado actividad metiladora de residuos de arginina 8 histona H3 (H3R8) [Pal et al. 2004] y modula la expresión, de forma silenciadora, de algunos genes supresores de tumor: ST7 y NM23. Existen varios factores de transcripción, como p53 [An et al. 2004], YY1 [Rezai-Zadeh et al. 2003] y NF-κB [Covic et al. 2004], que contribuyen al reclutamiento de PRMTs por los promotores [Lee et al. 2004]. Se piensa en la actualidad que la metilación de arginina podría regular las etapas de iniciación y elongación de la transcripción al sincronizarse con el empaquetamiento y exportación de RNPM. Esto se basa en que, además de las histonas, las PRMT han mostrado actividad sobre coactivadores como CBP/p300 [Chevallard-Briet et al. 2002; Xu et al. 2001], y factores de elongación transcripcional como SPT5 [Kwak et al. 2003], HIV Tat [Boulanger et al. 2005], y RNPhn para promover el empaquetamiento de RNPM [Xu & Henry 2004; Yu et al. 2004].

Una subfamilia del grupo de proteínas de alta movilidad (HMG), las HMGA, contienen tres motivos con carga positivas denominados *ganchos AT*, los cuales pueden unirse a ADN y a otros factores de transcripción. Los ganchos AT tienen diferentes patrones de metilación entre líneas celulares [Edberg et al. 2004; Sgarra et al. 2003]. Dado que estas proteínas están relacionadas con la modulación de la estructura de la cromatina y la transcripción, posiblemente el grado de metilación podría regular interacciones proteína-ADN y proteína-proteína.

2.2.2.2 *Histona-lisina-metiltransferasas (HKMTs)*

Las HKMTs se clasifican en diferentes familias basándose en similitudes de la secuencia SET y otras características estructurales como la presencia de dominios proteicos definidos [Kouzarides 2002;

Baumbusch et al. 2001; Schneider et al. 2002; Cheng et al. 2005] (Tabla 8). El dominio SET contiene alrededor de 130 aminoácidos y ha sido encontrado en tres proteínas de *Drosophila* involucradas en procesos epigenéticos.

La metilación de residuos de lisina, en contraste con la acetilación, no altera la carga de las lisinas, lo que excluye a esta modificación de participar en el doblamiento de la cromatina por un efecto electrostático. Sin embargo, esta modificación ha mostrado ser punto de unión con proteínas específicas que median efectos río-abajo y la organización de la cromatina [Strahl & Allis 2000; Turner 2000; Jenuwein & Allis 2001]. Los dominios de proteína conocidos hasta el momento con potencial para reconocer sitios lisina-metilo son: El cromodominio [Fischle et al. 2003b; Min et al. 2003a; Bannister et al. 2001; Lachner et al. 2001; Pray-Grant et al. 2005; Kim et al. 2006], la repetición WD40 [Wysocka et al. 2005; Han et al. 2006], el dominio Tudor [Huyen et al. 2004; Sanders et al. 2004; Kim et al. 2006], el dominio MBT [Kim et al. 2006; Klymenko et al. 2006] y el dedo PHD [Wysocka et al. 2006; Li et al. 2006b; Shi et al. 2006; Peña et al. 2006] (Fig. 21).

Familia SET1. Esta familia se caracteriza por un dominio SET C-terminal seguida por una región Post-SET compuesta por tres residuos de cisteína conservados, esenciales para la actividad HKMT [Zhang et al. 2002b]. El dominio SET está compuesto a partir de las proteínas SET1 y SET1L, las cuales son análogas a la proteína Set1 de levadura. La familia SET1 también incluye dominios MLL (también denominado HRX) y MLL4; además de las proteínas relacionadas MLL2 y MLL3 (ALR y tipo ALR).

Las SET1 tienen la capacidad para metilar específicamente residuos de lisina 4 de la histona H3 (H3K4) para dejar una marca epigenética en eucromatina activa. Sin embargo, es posible que funcionen también como coactivadores de transcripción [Ringrose & Paro 2004; Cavalli & Paro 1998; Smith et al. 2004; Milne et al. 2002; Sedkov et al. 2003; Milne et al. 2005] y puedan interactuar con otras moléculas de este tipo como CREBBP [Ernst et al. 2001; Petruk et al. 2002] o con la ARN polimerasa II [Krogan et al. 2003; Smith et al. 2004; Ng et al. 2003a; Guenther et al. 2005].

Familia SUV39. En esta familia el dominio SET se localiza en la región C-terminal y está limitado por zonas Pre-SET y Post-SET que participan en la actividad metiltransferasa. El dominio Pre-SET se encarga de coordinar tres iones zinc para formar un complejo triangular equilateral [Zhang et al. 2002b; Zhang et al. 2003b; Min et al. 2002]. Este último dominio tiene nueve residuos cisteína conservados divididos en dos grupos, uno de cuatro y otro de cinco cisteínas, separados por un número variable de aminoácidos.

Los HKMTs de la familia SUV39 metilan específicamente residuos de lisina 9 de histona 3 (H3K9) [Rea et al. 2000; O'Carroll et al. 2000; Tachibana et al. 2001; Yang et al. 2002a], pero EHMT2 (G9a/BAT8) metila lisinas 27 de la histona H3 (H3K27) [Tachibana et al. 2001]. Sin embargo, algunos miembros de esta familia tienen dominios proteicos que reconocen otras marcas epigenéticas. Por ejemplo, SUV39H1 y SUV39H2 contienen un

cromodominio [Fischle et al. 2003b] capaz de reconocer otros residuos lisina metilados en histonas, mientras que SETDB1 y SETDB2 contienen un dominio MBD con potencial para interactuar con ADN metilado [Ng & Bird 1999].

El integrante SETMAR/Metnasa posee atributos únicos dentro de la familia SUV39, ya que su dominio SET no se localiza en la región C-terminal y tiene diferente especificidad de sustrato. Esta enzima metila específicamente lisina 36 de la histona H3 (H3K36) y, en menor medida, a lisina 4 de histona H3 (H3K4) [Lee et al. 2005b].

Familia SET2. Las proteínas de la familia SET2 contienen varios dominios y son relativamente grandes, susceptibles a funcionar como cofactores de transcripción. La enzima SETD2/HYPB se asocia con la ARN polimerasa II cuando está hiperfosforilada y está activa [Sun et al. 2005]; la NSD1 interactúa con receptores nucleares de hormonas y tiene dominios de activación y represión [Huang et al. 1998]; y la proteína ASH1 tiene un bromo-dominio capaz de interactuar con CREBBP [Bantignies et al. 2000].

Las enzimas de esta familia están compuestas por proteínas relacionadas entre sí – NSD1, NDS2, NSD3 [Angrand et al. 2001]; la proteína ASH1L [Nakamura et al. 2000] con la función aparente de mantener el estado de transcripción; la proteína de interacción huntigina SETD2/HYP2B, capaz de metilar específicamente lisina 36 de histona H3 (H3K36); y otra proteína SET2L aún no caracterizada, Q6ZW69 [Volkel & Angrand 2007]. Así mismo, los integrantes de la familia tienen un dominio SET ubicado entre los motivos AWS y Post-SET en la región central de la proteína. El dominio AWS se compone por 7-9 residuos cisteína y puede funcionar de forma similar a la región Pre-SET de la familia SUV39.

En algunos casos, la actividad histona lisina-metiltransferasa de SETD2/HYPB no se limita a un solo residuo, sino que también puede llegar a metilar el residuo de lisina 36 de histona H3 (H3K36) y lisina 20 de histona H4 (H4K20) [Raysam et al. 2003]. Además, ASH1 puede metilar lisina 4 y lisina 9 de histona H3 (H3K4 y H3K9), al igual que la lisina 20 de histona H4 (H4K20) [Beisel et al. 2002].

Familia EZH. Las enzimas miembro de esta familia no tienen motivo Post-SET, pero tienen una región de ~15 residuos cisteína, en la región amino-terminal del dominio SET, que podría tener un rol similar que los dominios Pre-Set o AWS de las familias SUV39 o SET2, respectivamente [Volkel & Angrand 2007].

La familia EZH contiene dos miembros relacionados y que muestran homología a la proteína PcG promotora de zeste, E(Z). Junto con ESC y SU(Z)12, E(Z) forma parte del complejo represor policomb 2 (PRC2), capaz de metilar residuos de lisina 9 y 27 de histona H3 (H3K9 y H3K27) [Czermin et al. 2002; Müller et al. 2002]. El EZH2 humano puede metilar lisina 26 de histona H1 (H1K26) y promover la represión transcripcional [Kuzmichev et al. 2004].

Familia SMYD. Esta familia agrupa a cinco enzimas relacionadas que contienen un dedo de zinc tipo MYND [Spadaccini et al. 2006], encargado de unirse directamente a secuencias de ADN [Hamamoto et al. 2004]. El dominio SET de SMYD3 metila específicamente lisina 4 de histona H3 (H3K4). Ya que la SMYD3 también interactúa con la ARN polimerasa II, este dominio podría modular la transcripción por medio de dos mecanismos independientes: modificación de la estructura cromatina vía la metilación de lisina; y durante la elongación transcripcional por el reclutamiento de la ARN polimerasa II. Este último mecanismo se puede observar también en algunos miembros de SET1 y SET2 [Volkel & Angrand 2007].

Familia PRDM. Esta familia se compone de enzimas relativamente homogéneas que contienen un dominio PR, considerado como una subclase de dominio SET por compartir un 20-30% de su identidad [Huang 2002; Derunes et al. 2005]. Además, las enzimas de la familia PRDM (con excepción de PRDM11) contienen dedos de zinc tipo Kruppel (C2H2) con la capacidad aparente de unirse a secuencias específicas de ADN.

La actividad intrínseca HKMT de esta familia aún está bajo discusión, ya que no se ha demostrado en varios miembros de esta familia [Davis et al. 2006]. Las únicas dos enzimas con dominio PR/SET con actividad catalítica más sustentada son: PRDM2/RIZ1 que metila específicamente lisina 9 de histona H3 (H3K9) [Kim et al. 2003a]; y Meisetz que tri-metila lisina 4 de histona H3 (H3K4) [Hayashi et al. 2005]. Otras enzimas de esta familia, como PRDM1/BLIMP1 y PRDM6/PRISM, han mostrado interacción con la lisina-metiltransferasa EHMT2/G9a, específica para lisina 9 de histona H3 (H3K9) [Davis et al. 2006; Gyory et al. 2004]. El dominio PR/SET de la familia PRDM se ha asociado con la represión genética, supresión de tumoración y carcinogénesis [Kim & Huang 2003; Deng & Huang 2004; Steele-Perkins et al. 2001; Fears et al. 1996].

Otras proteínas con dominio SET. Algunos HKMTs tienen un dominio SET que no es precedido por una región rica en cisteína y que no tienen un dominio Post-SET. Esta familia incluye proteínas como [Jacobs et al. 2002; Kwon et al. 2003; Wilson et al. 2002; Xiao et al. 2003a].

- SUV420H1 y SUV420H2. Di- y tri-metilan lisina 20 de histona H3 (H3K20me₂, H3K20me₃).
- SET7/9 metila residuos de lisina 4 de histona H3 (H3K4).
- SET8/PR-SET7 metila lisina 20 de histona H4 (H4K20).
- MLL5 y dos proteínas no caracterizadas, FLJ10707 y FLJ21148, en las cuales la actividad HKMT no se ha definido.

HKMT sin dominio SET. La proteína DOT1L, análoga a Dot1 de *S. cerevisiae*, tiene la capacidad de metilar lisina 79 de histona H3 (H3K79) por parte de su dominio central [Feng et al. 2002; Lacoste et al. 2002; Ng et al. 2002b; Leuwen et al. 2002]. A diferencia de otras HKMT, Dot1/DOT1L no posee un dominio SET y actúa

específicamente en las histonas que forman nucleosomas. Aparentemente, la región C-terminal tiene cierta carga positiva que es básica para la unión del nucleosoma y la actividad enzimática [Min et al. 2003b].

2.2.2.3 Silenciación a través de metilación de histonas

Las principales formas de metilación que se relacionan con la represión transcripcional se dan en residuos de lisina 9 y lisina 27 de histona H3 (H3K9, H3K27), y en lisina 20 de histona H4 (H4K20).

Heterocromatina constitutiva. Enzimas de la familia SUV39 se encargan de di-metilar y tri-metilar el residuo lisina 9 de la histona H3 (H3K9me2, H3K9me3), lo que favorece la unión selectiva de proteínas HP1 a esas marcas epigenéticas. Lo anterior promueve una tri-metilación de lisina 20 de histona H4 (H4K20) por medio de dos dominios SET que se localizan en la heterocromatina pericéntrica: SUV420H1 y SUV420H2 [Schotta et al. 2004; Lachner et al. 2001; Lehnertz et al. 2003]. Por lo tanto, la familia SUV39 ha mostrado ser una enzima importante para la formación de la heterocromatina constitutiva (Fig. 22) [Allshire et al. 1995; Peters et al. 2001].

En la actualidad se piensa que la heterocromatina se forma en regiones específicas como resultado de una transcripción bidireccional, por parte de ARN polimerasa II, de secuencias repetidas de ADN. Esta idea surgió a partir de observaciones en *Schizosaccharomyces pombe* (Fig. 23): los ARNs se convierten en ARNs_i por la enzima *DICER* y después se acopla al complejo RITS (iniciación de silenciación transcripcional inducida por ARN) formado por las proteínas Chp1, Ago1 y Tas3. Los ARNs_i ayudan a ubicar al complejo RITS en sitios específicos por interacciones entre bases entre ARNs_i y los transcritos nuevos asociados a las secuencias repetitivas de ADN [Hall et al. 2002]. El complejo RITS ya acomodado entonces recluta Clr4 y la metilación de lisina 9 en histona H3 (H3K9) sucede e induce el reclutamiento de Swi6. La proteína Chp1, del complejo RITS, también interactúa con H3K9 metilado, lo que provoca la estabilización del complejo RITS en la heterocromatina metilada [Volkel & Angrand 2007]. Además, el complejo RITS favorece el reclutamiento del complejo *ARN polimerasa ARN-dependiente* (RDRC), y así promueve la producción adicional de ARNs [Motamedi et al. 2004].

La contribución de la vía ARNi en la heterocromatina de mamíferos aún no ha sido confirmada, pero un mecanismo similar es el que podría funcionar para reprimir las repeticiones satélite y la metilación represiva de histonas [Volkel & Angrand 2007].

Silenciación transcripcional y represión PcG. La metilación de lisina 27 de histona H3 (H3K27) también está asociada con la silenciación transcripcional. Las proteínas PcG se encuentran en el punto de metilación H3K27, las cuales median la memoria del estado reprimido epigenético [Volkel & Angrand 2007] (Fig. 24).

Sustrato	Histona lisina-metiltransferasas
H3K4	SET9, SET1, MLL, ASH1L, SMYD3, PRDM9, SETMAR
H3K9	SUV39H1, SUV39H2, EHMT1, EHMT2, SETDB1, PRDM2, ASH1L
H3K27	EZH2, EHMT2
H3K36	NSD1, SETD2/HYPB, SETMAR
H3K79	DOT1L
H4K20	SET8, SUV420H1, SUV420H2, NSD1, ASH1L

Tabla 8. Histona lisina-metiltransferasas (HKMTs) y su sitio de acción en histonas [Adaptado de Volkel & Angrand 2007].

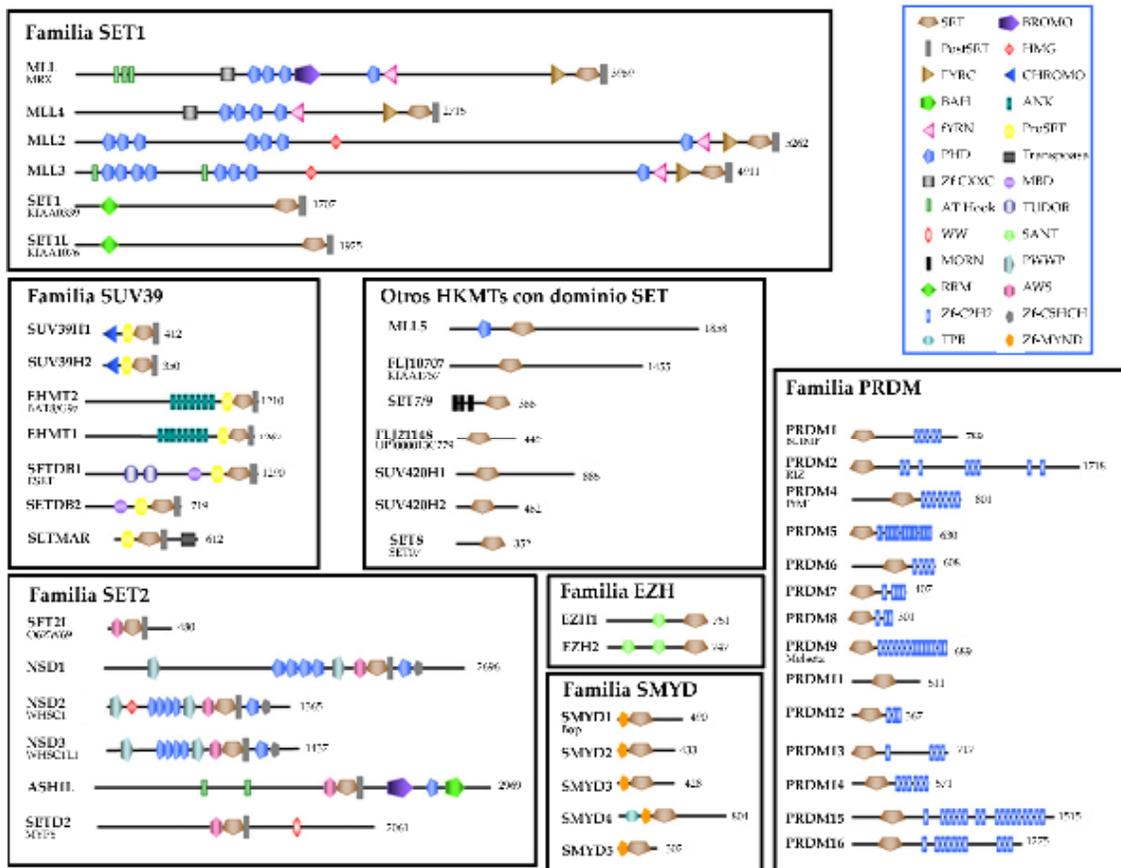


Figura 21. Características estructurales de las histona lisina-metiltransferasas.

(1) Familia SET1 – un dominio SET seguido de un motivo Post-SET la porción carboxi-terminal. (2) Familia SUV39 – HKMTs con un dominio SET limitado por motivos Pre-SET y Post-SET. (3) Familia SET2 – dominio SET limitado por motivos AWS y Post-SET. (4) Familia EZH – enzimas con dominios SET en la zona carboxi-terminal de la proteína, junto con motivos SANT. (5) Familia SMYD – enzimas con dedos de zinc tipo MYND que preceden al dominio SET. (6) Proteínas de la familia PRDM tiene variaciones importantes de aminoácidos en el motivo NHSCxPN, altamente conservado (x=residuo no conservado), dentro del dominio SET. La mayoría de los miembros tienen dedos de zinc tipo C2H2. (7) Algunas proteínas no entran en ninguna categoría. Los dominios de proteína fueron identificados utilizando el programa SMART [Adaptado de Volkel & Angrand 2007].

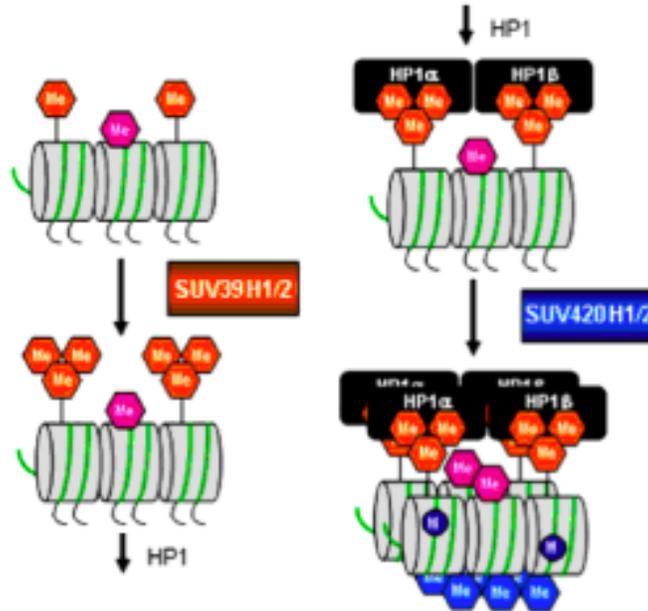


Figura 22. Formación de la heterocromatina.

Modelo para la metilación H3K9me3 y H4K20me3 en la cromatina constitutiva de mamíferos [Adaptado de Volkel & Angrand 2007]

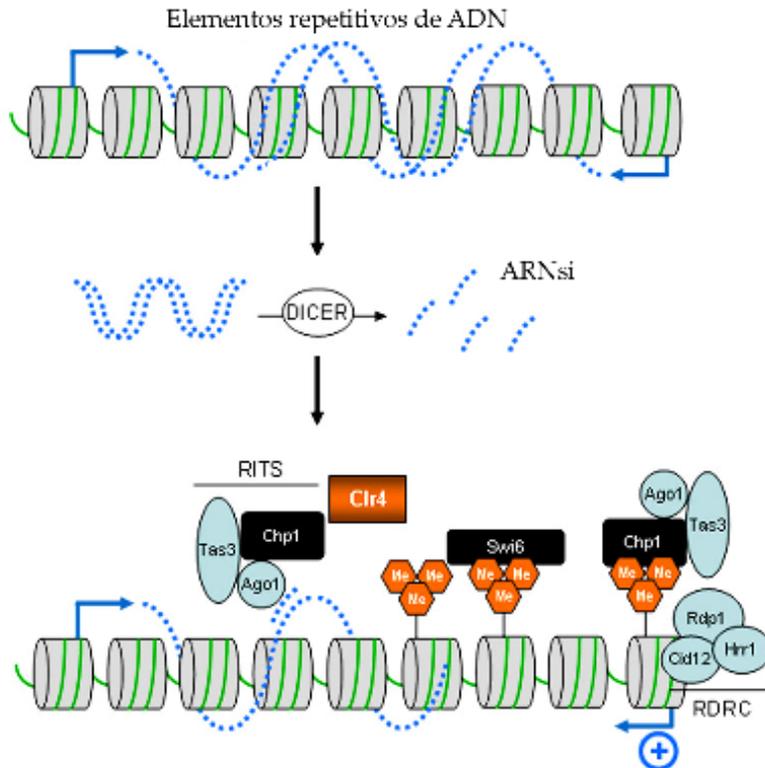


Figura 23. Formación de heterocromatina y maquinaria de formación de ARNsi de *Schizosaccharomyces pombe* [Adaptado de Volkel & Angrand 2007].

Algunos estudios sobre el gen *Ubx* son la base del modelo de silenciamiento que involucra el reclutamiento de proteínas PcG [Wang et al. 2004a]. En este sistema, la proteína de unión a ADN *pleiohomeótica* (*Pho*) y la *tipo-pleiohomeótica* (*PhoL*) se unen a secuencias específicas de ADN denominadas *elementos de respuesta policomb* (PRE) localizadas río-arriba del gen *Ubx*. Entonces, esto hace posible que el complejo PRC2 se dirija hacia el complejo PRE y así se marquen los residuos de lisina 27 de histona H3 que sirven como sitios de unión de la proteína policomb (Pc) con algún cromodominio. La Pc es parte del complejo de represión policomb 1 (PRC1), junto con otras proteínas centrales como la polihomeótica (PH), *sex-combs* posteriores (PSC) y dRING (ligasa E3). El complejo PRC1 es el principal responsable de la actividad represiva [Volkel & Angrand 2007].

En mamíferos, las proteínas PcG tienen funciones importantes en desarrollo, proliferación celular y tumorigénesis [Jacobs & van Lohuizen 2002]. No está claro cómo el homólogo de PRC2 en mamíferos, el complejo proteico EZH2, es dirigido a regiones genómicas, ya que no se han identificado elementos PRE en vertebrados, pero se han identificado algunos sitios blanco como el grupo de genes *Hox* [Hanson et al. 1999]. En el silenciamiento mediado por genes *Hox* de mamíferos, la metilación de lisina 27 histona H3 (H3K27) recluta una ligasa E3 que ubiquitina al residuo lisina 119 de histona H2 (H2K119ub1) [Cao et al. 2005]. La ubiquitinación posiblemente permite la unión de otras proteínas que previenen la expresión genética.

Impronta genómica

Alrededor de 80 genes se han denominado como genómicamente improntados [Morison et al. 2005]. La *impronta* es un tipo de regulación genética del desarrollo caracterizado por silenciamiento monoalélico, ya sea de los genes heredados por la madre o el padre. Este mecanismo está involucrado con unidades transcripcionales relacionadas con crecimiento fetal, metabolismo, comportamiento e interacciones sociales. Los genes improntados se encuentran agrupados y su expresión alélica está bajo el control de regiones específicas de ADN denominadas regiones improntados de control (ICR) (Figs. 25 y 26). Las HKMTs contribuyen a la impronta genómica al metilar, de manera alelo-específica, genes improntados al tener patrones de metilación diferentes entre los dos alelos durante la oogénesis o espermatogénesis [Delaval & Fiel 2004]. Los genes de impronta reprimidos tienen marcas de metilación en los residuos de lisina 9 y lisina 27 de la histona H3 (H3K9me2 y H3K27me3).

Inactivación de cromosoma X

La inactivación del cromosoma X es otro caso donde las proteínas PcG están involucradas. Este proceso del cromosoma X puede ser dividido en dos diferentes tipos: inactivación de impronta y la inactivación aleatoria [Volkel & Angard 2007].

Un ARN no-codificador, Xist, se expresa a partir del cromosoma X que estará silenciado (Xi) y lo cubre por completo, coincidiendo con la hipometilación de H3K4. Después, el complejo proteico EZH2 se une a esta zona y ocurre una hipermetilación H3K9me2 y H3K27me3 junto con la ubiquitinación de H2AK119 [Volkel & Angard 2007].

En etapas tempranas del desarrollo, la inactivación de impronta del cromosoma X ocurre y así el cromosoma X paterno se silencia en todas las células del embrión [Mak et al. 2004; Okamoto et al. 2004]. Sin embargo, esta silenciación permanece en las células de tejidos extra-embriónicos, pero la inactivación puede ser revertida en células que forman el embrión. Por lo tanto, la inactivación del cromosoma X se reestablece aleatoriamente ya sea en el heredado por la madre o el padre.

En ambos tipos de inactivación, el reclutamiento del complejo EZH2 (que metila a H3K27) y del complejo tipo PRC1 que ubiquitina H2AK119 es transitorio y sólo es requerido durante la etapa inicial del proceso de inactivación [de Napoles et al. 2004; Plath et al. 2003; Silva et al. 2003; Kohlmaier et al. 2004]. En etapas tardías, los niveles de H3K27me3 se reducen, se incorpora una variante de H2A a los nucleosomas de Xi, y la metilación ocurre en los promotores de los genes del cromosoma Xi (Fig. 27).

Últimamente se ha señalado que transcripción mediada por PRE es requerida para revertir algunos casos de silenciación del gen HOX mediada por proteínas PcG en *Drosophila*, por lo que ARNnc podría tener una función general sobre las proteínas PcG [Volkel & Angard 2007].

2.2.2.5 Activación transcripcional a través de metilación de histonas

Los sitios principales de metilación para causar la activación de la expresión genética son los residuos de lisina 4, 36 y 79 de la histona H3 (H3K4, H3K36, H3K79) (Fig. 28), ya que parecen estar directamente relacionados con el proceso de transcripción. Además, las enzimas responsables para la metilación de H3K4 y H3K36 se asocian físicamente con la ARN polimerasa II durante la etapa de elongación [Krogan et al. 2003a; Ng et al. 2003b; Xiao et al. 2003a; Li et al. 2003; Schaft et al. 2003]. Por otro lado, la ubiquitinación de H2B en la lisina 123 (H2BK123ub1) por medio del sistema enzimático Rad6/Bre1, se requiere para la metilación a nivel de H3K4 y H3K79, pero no para H3K36 [Sun & Allis 2002; Dover et al. 2002; Nget al. 2002a].

El modelo actual de activación por este mecanismo fue deducido a partir de estudios en *S. cerevisiae* y predica que la metilación en los residuos de lisina 4 de histona H3 (H3K4) es una marca de actividad temprana de transcripción, mientras que la metilación de lisina 36 histona H3 infiere una elongación eficiente. Inicialmente, algunos activadores específicos del gen reclutan un complejo de ubiquitinación, compuesto por Rad6 y Bre1, hacia el promotor [Henry et al. 2003; Daniel et al. 2004; Kao et al. 2004; Xiao et al. 2005]. Posteriormente, este complejo se aloja en la ARN polimerasa II y subsecuentemente se transporta por la región transcrita del gen [Xiao et al. 2005].

Así, la ubiquitinación creada en H2BK123 facilita la metilación de H3K4 por Set1 (una HKMT) al abrir la estructura del nucleosoma [Henry & Berger 2002]. Además, el reclutamiento de Set1 involucra el complejo de elongación Paf1 y coincide con la fosforilación en serina 5 del dominio carboxi-terminal de ARN polimerasa II. De igual manera, la HKMT Dot1, que se encarga de metilar H3K79, también puede ser reclutada por las regiones transcritas por la ARN polimerasa II en elongación [Krogan et al. 2003b]. En algún momento de la elongación, el dominio C-terminal de ARN polimerasa II se fosforila en serina 2. Al mismo tiempo, Set1 se disocia de ARN polimerasa II y ocurre una metilación mediada por Set2 en lisina 36 de histona H3 (H3K36) [Volkel & Angard 2007].

En el mismo momento en el que se lleva a cabo la elongación, se recluta al complejo SAGA de histona acetiltransferasa (HAT) a través de interacciones específicas entre su subunidad cromodominio, Chd1, y las marcas de H3K4me. La acetilación de histonas, por principio, lleva a la activación transcripcional por lo que H3K4me3 podría tener una función en la memoria de la actividad transcripcional previa de esa zona [Nget et al. 2002a]. El complejo SAGA también contiene un factor desubiquitinador denominado Ubp8 que se encarga de remover la marca H2BK123ub1 [Henry et al. 2003] y así posiblemente inducir la activación de genes regulados por el complejo SAGA.

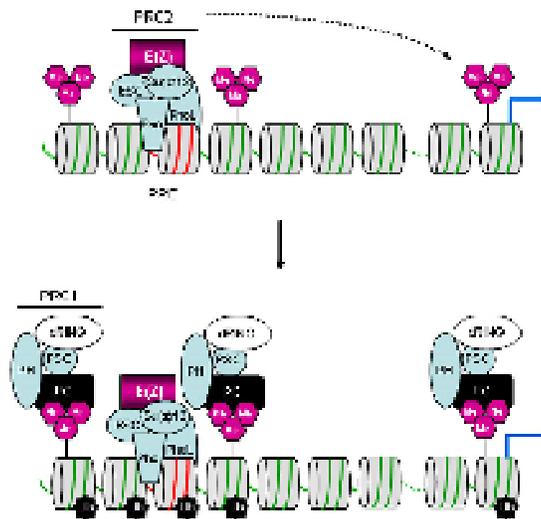


Figura 24. Metilación de H3K27 y silenciamiento mediado por policomb en *Drosophila*. Los hexágonos en lisina representan metilaciones que promueven la ubiquitinación según el código de color: morado = H3K27; negro = H2K119 [Adaptado de Volkel & Angard 2007].

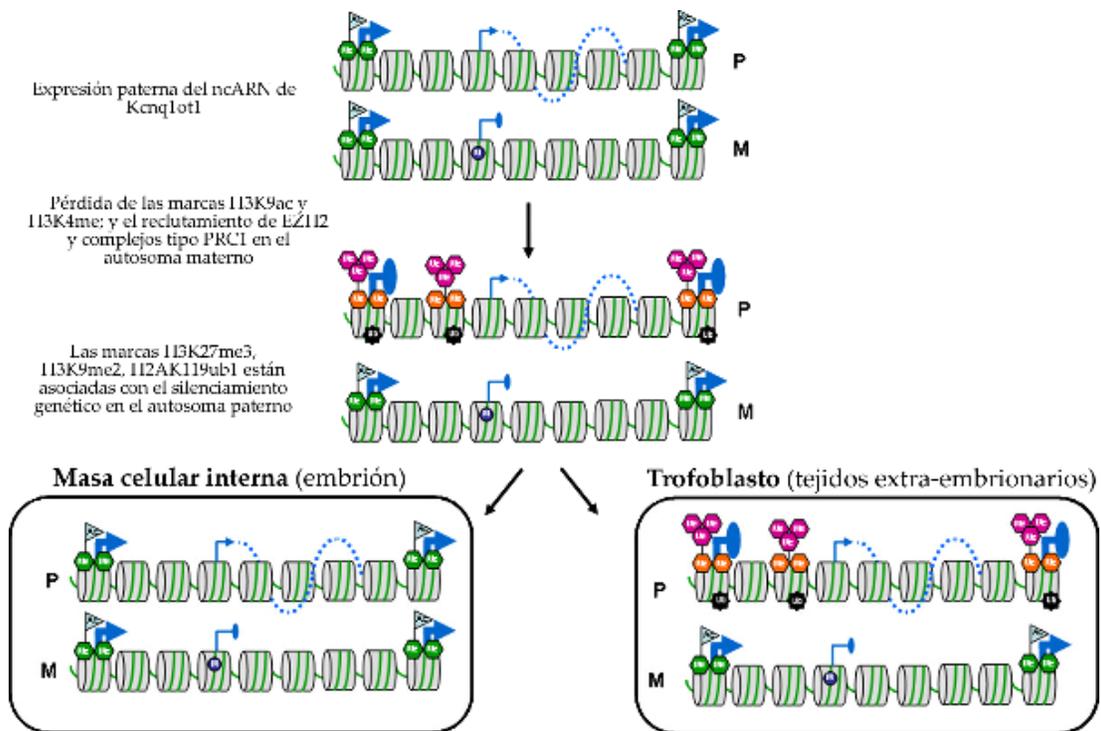


Figura 25. Modelo de impronta genómica en el cromosoma 7 distal de ratón.

En etapas cigóticas tempranas, el ARNnc [línea azul punteada] es expresado a partir el autosoma paterno mientras su equivalente materno no está siendo expresado por la metilación de esta copia en la línea germinal [círculo azul oscuro]. El gen *Kcnq1ot1* se requiere para dirigir el complejo EZH2 y la metilación subsecuente de H3K27me3 y H3K9me2 en la región improntada. El direccionamiento del complejo proteico tipo PRC1 a H3K27me3 lleva a la ubiquitinación de H2AK119ub1 que podría causar el silenciamiento del gen paterno a través de un mecanismo aún no dilucidado. Posteriormente, la impronta genómica se mantiene en la placenta pero se pierde en tejido embrionario. Los hexágonos representan estados de metilación de lisina: naranja= H3K9; morado= H3K27; verde= H3K4. La acetilación y la ubiquitinación H2AK119ub1 también se muestran en la imagen [Adaptado de Volkel & Angrand 2007].

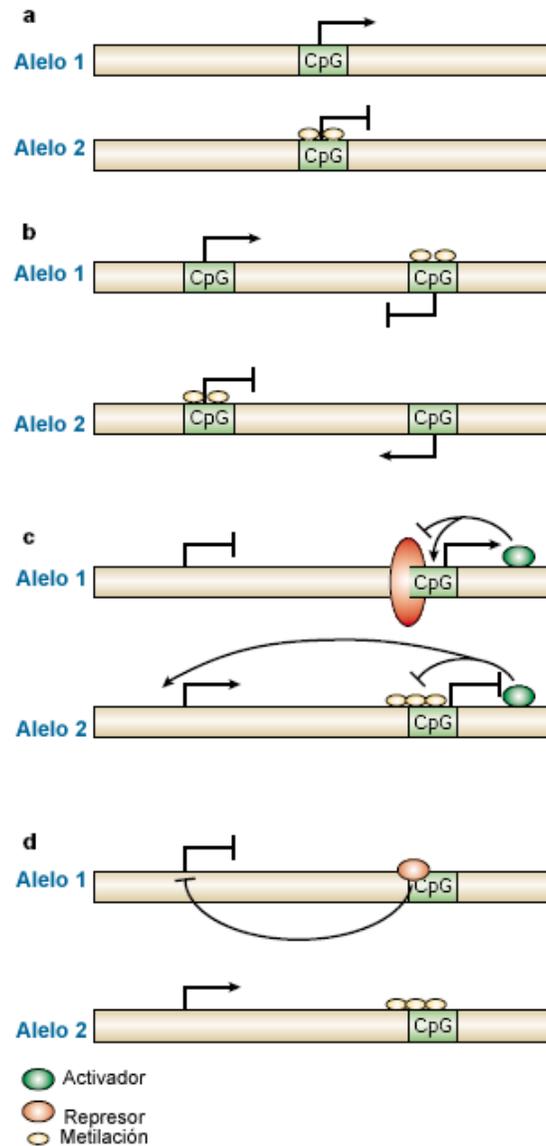


Figura 26. Mecanismos de lectura en genes de impronta.

(a) Silenciación diferencial por metilación de islas CpGs o de promotor. (b) Regulación por transcripción antisentido con metilación de isla CpG o promotor. (c) Regulación alelo-específica de genes adyacentes por metilación diferencial de elementos dentro de islas CpG. Proteínas como el factor de unión a CCCTC (CTCF, círculo rojo) se unen al alelo no-metilado y bloquean el acceso de promotores río arriba a un potenciador río-abajo (verde); resultando en una represión transcripcional del gen ubicado río-arriba. (d) La metilación diferencial resulta en unión variable de factores de silenciamiento (rojo, en este caso sensible a la metilación) que reprimen al promotor en *cis* [Adaptado de Reik & Walter 2001].

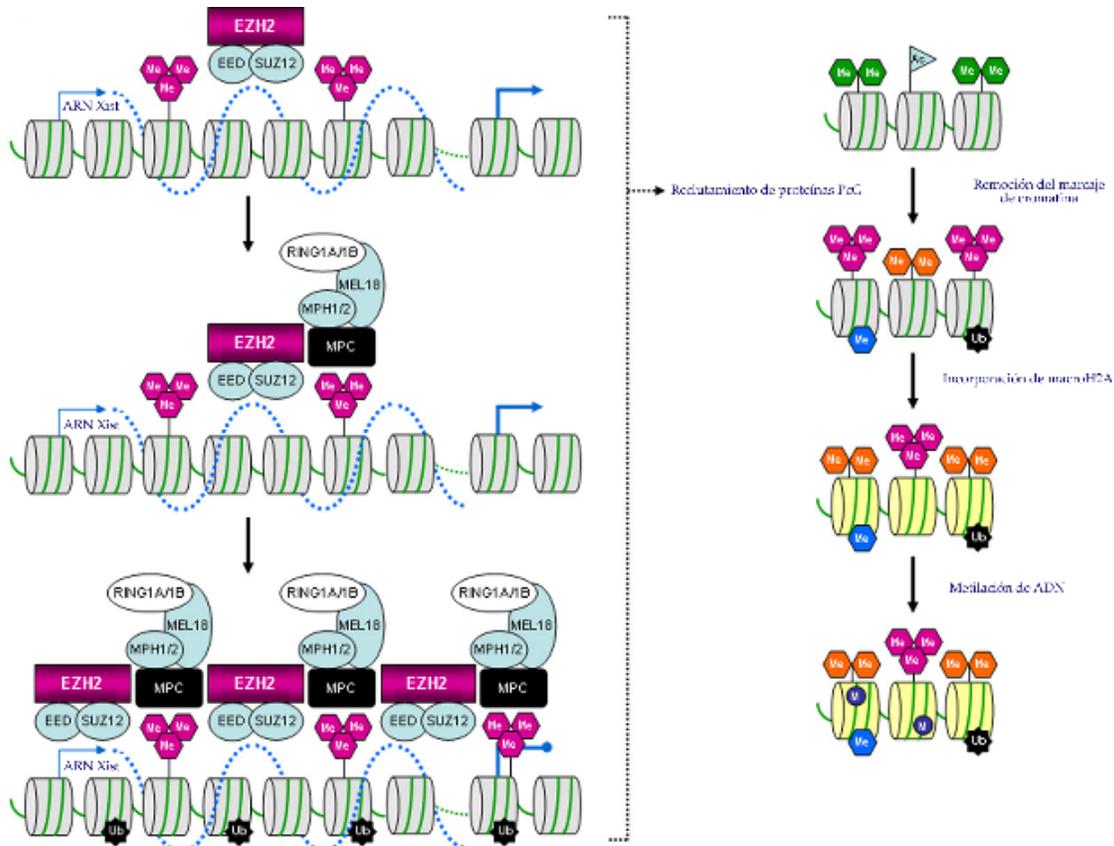


Figura 27. Metilación de H3K27 y etapa inicial de la inactivación del cromosoma X. (IZQUIERDA) El ARN Xist [línea punteada azul] se transcribe en el centro de inactivación X y continúa hacia los extremos cubriendo a este cromosoma. El ARN Xist recluta al complejo EZH2 y su metiltransferasa (H3K27). Las marcas H3K27me3 recién formadas son puntos de unión para las proteínas con cromodominios, asociadas con RING1A/1B (ligasa E3), dentro de complejos proteicos tipo PRC1. Posteriormente H2AK119 se ubiquitina. (DERECHA) La inactivación del cromosoma X está asociado a modificaciones varias en la cromatina. En la etapa temprana, posterior a la inactivación con ARN Xist, es la pérdida de las marcas de eucromatina en histonas. Al mismo tiempo, varias modificaciones de histona ocurren: El complejo EZH2 produce la tri-metilación de H3K27, mientras el complejo tipo PRC1 hace marcas tipo H2K119ub1. En etapas posteriores del desarrollo, los últimos complejos mencionados se liberan de Xi y los niveles de metilación de H3K27 se reducen. Se incorpora MacroH2A a los nucleosomas y ocurre la metilación a nivel de ADN en los promotores genéticos de Xi [Adaptado de Volkel & Angrand 2007].

En eucariotas superiores se han encontrado comportamientos similares a los observados en el modelo de *S. cerevisiae*. De manera análoga al HKMT Set1 de la levadura, el dominio SET de MLL tiene una metiltransferasa específica para H3K4 [Milne et al. 2002; Nakamura et al. 2002]. Se han aislado y caracterizado complejos asociados a MLL y MLL4 que tienen similitudes con el complejo proteico Set1 [Dou et al. 2005; Yokoyama et al. 2004] y además, este complejo de eucariotas superiores está asociado con residuos de serina fosforilada de ARN polimerasa II reclutada en *Hoxc6* y *Hoxc8*. Sin embargo, aún no se sabe mucho sobre la metilación de residuos de lisina 36 en histonas H3 mediada por SET2 en mamíferos [Volkel & Angard 2007].

3.2.2.6 Desmetilación de histonas (histona desmetilasas, HDMS)

En ciertas situaciones, contrario a lo que se pensaba, la metilación de histonas es reversible y altamente dinámica. Durante el proceso de investigación de esta transformación se han propuesto dos mecanismos. Inicialmente Allis *et al.* (1980) propusieron que un corte en las porciones terminales en las histonas era el responsable de la desmetilación; pero varios años después, Ahmad y Henikoff (2002) sostuvieron que se llevaba a cabo reemplazo de histonas metiladas con otras proteínas de este tipo pero variantes.

Desiminasa peptidil-arginina 4 (PADI4/PAD4). Fue la primera enzima en la que se observó una desmetilación en histonas (Fig. 29). La PADI4 convierte el mono-metil-arginina de histonas H3 y H4 en citrulina por una desmetil-iminación [Cuthbert et al. 2004; Wang et al. 2004b].

Desmetilasa lisina-específica 1 (LSD1, BHC110/AOF2). Esta es una enzima flavino-dependiente capaz de desmetilar específicamente lisinas mono- y di-metiladas [Hakimi et al. 2002]. Cataliza la reducción del cofactor flavina y la oxidación de amina por medio de la lisis oxidativa de un enlace α -CH del sustrato para formar un intermediario imina. Posteriormente, la imina intermediaria se hidroliza a través de un proceso no-enzimático y se produce una carbinol-amina inestable. Finalmente, esta última se degrada formando formaldehído y se regenera el residuo no-metilado de lisina [Shi et al. 2004] (Fig. 30).

Ya que la formación de la imina intermediaria requiere una lisina protonada, las tri-metil-lisinas no pueden funcionar como sustratos para las amino-oxidasas tipo LSD1 [Volkel & Angard 2007]. La LSD1 es capaz de desmetilar específicamente residuos de lisina 4 de histonas H3 mono- y di-metilados (H3K4me1, H3K4me2) [Shi et al. 2004]. Se ha demostrado que el elemento co-represor de silenciamiento transcripcional (CoREST) y BHC80 son requeridos para la actividad en histonas nucleosomales H3 *in vivo* dentro de promotores definidos [Shi et al. 2005; Lee et al. 2005c].

Por otro lado, LSD1 ha mostrado capacidad de asociación con el receptor andrógeno. Esto significa que esta enzima puede dirigirse de manera ligando-dependiente y que se puede alterar su especificidad de sustrato para que también pueda desmetilar residuos de lisina 9 mono- y di-metilados (H3K9me1, H3K9me2) [Metzger et al. 2005].

Dominios JmjC. El genoma humano contiene alrededor de 30 proteínas con dominios JmJC que podrían estar organizadas en varias familias según la homología de los dominios y la organización de los dominios en la proteína. Las HDM con dominios JmjC se organizan, en la actualidad, de la siguiente forma:

- Familia JHDM1: Está formada por dos proteínas relacionadas, JHDM1B/FBXL10 y JHDM1A/FBXL11, que han mostrado actividad HDM específica para residuos de lisina 36 de histona H3 mono- y di-metiladas (H3K36me1, H3K36me2) [Yamane et al. 2006].
- Familia JHDM2: Comprende tres proteínas: JMJD1A/JHDM2A, JMJD1B/JHDM2B y JMJD1C/JHDM2C/TRIP8. Hasta el momento, JMJD1A/JHDM2A ha mostrado actividad HDM específica. Además, esta última también puede asociarse con el receptor andrógeno de una manera dependiente al ligando [Yamane et al. 2006], mientras que JMJD1C/JHDM2C/TRIP8 también es capaz de interactuar con el receptor tiroideo y RAR α de una manera dependiente de ligando [Lee et al. 1995]. De acuerdo a estudios de homología de dominio, se ha propuesto de la proteína *human hairless* (HR) pertenece a esta familia HDM con dominios JmjC, y que además, puede interactuar como co-represor transcripcional del receptor tiroideo [Potter et al. 2001].

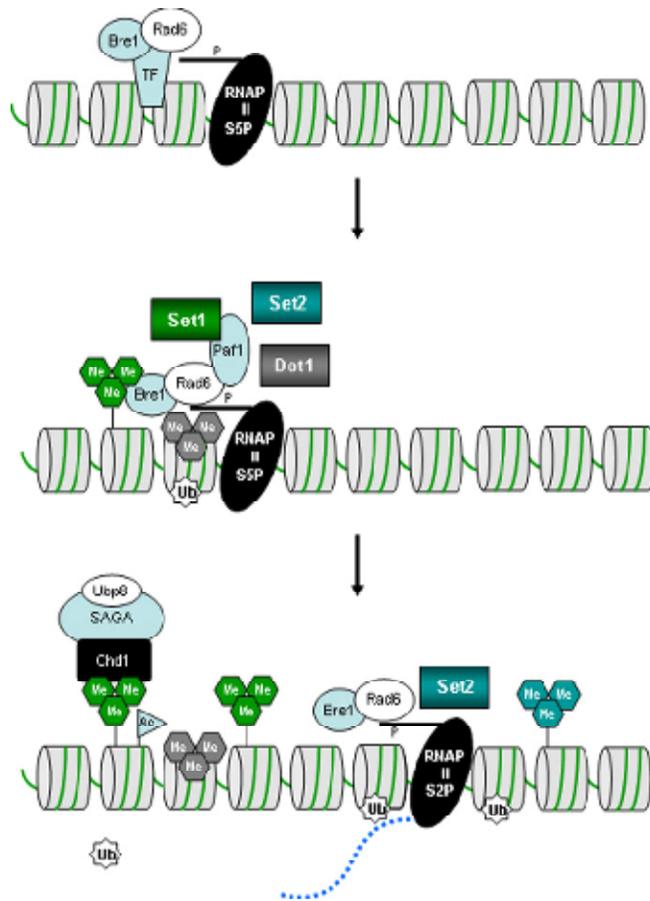


Figura 28. Metilación de H3K4, H3K36, H3K79 y transcripción activa según el modelo de *S. cerevisiae*. Abreviaturas: TF=factores de transcripción; RNPII=ARN polimerasa II; CTD=dominio C-terminal; Ub=ubiquitinación; . Las metilaciones de lisina siguen el código de color: verde=H3K4; H3K36=gris; H3K79=azul [Adaptado de Volkel & Angrand 2007].

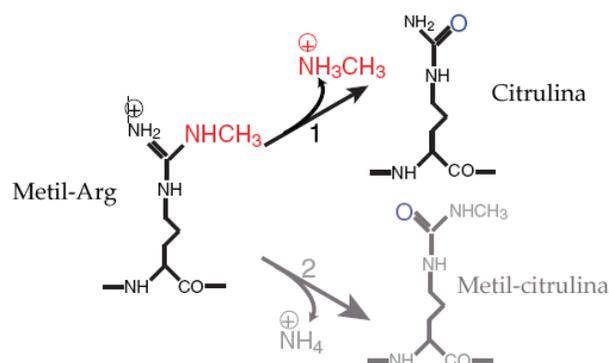


Figura 29. PAD4 desmetila histonas H3 y H4 con dos mecanismos diferentes. PAD4 puede remover el grupo metil-imina de metil-arginina (metil-arg) ya sea produciendo citrulina y liberando metil-amina [vía 1]; o removiendo el grupo imina con PAD4 para producir metil-citrulina (metil-cit) y liberar amonio [vía 2] [Adaptado de Wang et al. 2004].

- Familia JHMD3: Se compone de cuatro proteínas relacionadas: JMJD2A/JHDM3A, JMJD2B, JMJD2C/GASC1 y JMJD2D. El miembro JMJD2A/JHDM3A ha mostrado actividad como represor transcripcional; reclutador de HDACs y del co-represor N-CoR [Gray et al. 2005; Zhang et al. 2005]; y como HDM al desmetilar específicamente residuos di- y tri-metilados de lisina 9 y 36 de histona H3 (H3K9me2, H3K9me3, H3K36me2, H3K36me3) [Whetstine et al. 2006; Klose et al. 2006]. Otros miembros de la familia JMJD2 han mostrado actividad HDM con especificidades ligeramente diferentes *in vitro*: la proteína JMJD2B actúa solamente sobre lisina tri-metilada de histona H3 (H3K9me3); la proteína JMJD2C/GASC1 desmetila lisinas tri-metiladas 9 y 36 de histona H3 (H3K9me3 y H3K36me3); y JMJD2D tiene actividad en residuos di- y tri-metilados de lisina 9 de histona H3 (H3K9me2, H3K9me3) [Whetstine et al. 2006; Fodor et al. 2006].
- Familia JARID: Contiene hasta el momento cinco proteínas: JARID1A/RBP2, JARID1B/tipo-RBP2, JARID1C/SMCX, JARID1D /SMCY y JARID2/JUMONJI (la más distante en homología). Ningún miembro de esta familia ha mostrado actividad HDM, pero tienen dominios de unión a ADN y dominios asociados a la cromatina. La proteína JARID1A/RBP2 actúa como co-activador de transcripción mediada por receptores nucleares [Chan&Hong 2001]; mientras que JARID1B/PLU-1 [Tan et al. 2003] y JARID2/JUMONJI [Kimet al. 2003b; Kimet al. 2004b] actúan como represores transcripcionales.
- Familia PHF: Está formada por dos proteínas, PHF2 y PHF8, que contienen un dedo PHD, por lo que podrían actuar a nivel de cromatina [Volkkel & Angrand 2007].
- Familia UT: En este grupo se encuentran dos proteínas similares: UTX y UTY. Ambas contienen repeticiones de tetratricopéptidos (TPR), un motivo que media interacciones proteína-proteína y varias señales de localización. Además, estas proteínas parecen participar en represión transcripcional [Grbavec et al. 1999].

Las proteínas con dominios JmjC podrían funcionar como dioxigenasas 2-oxo-glutarato-Fe(II)-dependientes y remover grupos metilo de residuos lisina. Esto podría suceder con un mecanismo similar a la desmetilasa de reparación de ADN (AlkB): se hidroxilan grupos metilo de ciertas formas de errores de metilación de ADN. El primer dominio JmjC con actividad histona desmetilasa (HDM) fue descrita por Tsukada y colaboradores (2006): JHDM1A/FBXL11. La región JHDM1 desmetila específicamente, utilizando α -cetoglutarato y Fe(II) como cofactores, residuos de lisina 36 de histona H3 mono- y di-metilados (H3K36me1, H3K36me2).

Posteriormente se identificaron y caracterizaron otros dominios JmjC que funcionan como HDM: JHDM2A (JMJD1A) que desmetila específicamente residuos de lisina 9 de histona H3 hasta dos veces metilados (H3K9me1, H3K9me2) [Yamane et al. 2006]; y la familia proteica JMJD2 (JMJD2-A, -B y -C) que

actúan específicamente en lisinas 9 y 36 de histonas H3 di- y tri-metiladas (H3K9me₂, H3K9me₃, H3K36me₂, H3K36me₃) [Whetstone et al. 2006].

Las HDM con dominios JmjC conocidas hasta el momento muestran una alta especificidad de sustrato: residuos y grado de metilación. Se piensa que las HKMTs con dominios SET y las HDM con dominios JmjC pueden actuar en conjunto para regular el grado de metilación de histonas en cada célula. Prueba de esta idea es la asociación de dos HDM con dominios JmjC, Lid2 y Ecm5, con la histona metiltransferasa Set1 en complejos proteicos de *S. pombe* [Roguev et al. 2003]. Además, JMJD2A/JHDM3A que tiene especificidad de sustrato para H3K9me_{2/3} y H3K36me_{2/3}, posee también dos dominios Tudor que reconocen marcas H3K4me y H3K20me_{2/3} [Kim et al. 2006; Huang et al. 2006]. Por lo tanto, tal vez JMJD2A es dirigida a regiones de cromatina ricas en ciertos tipos de metilación de histonas.

2.2.3 Ubiquitinación

La *ubiquitina* es una proteína altamente conservada, formada por 76 aminoácidos y que está distribuida de manera ubicua entre los organismos eucariotas [Zhang 2003]. Sus cuatro residuos C-terminales se acomodan en forma de espiral y varían en composición; mientras que su porción N-terminal, con 72 aminoácidos, forman una estructura globular plegada [Vijay-Kumar et al. 1987]. La adición de ubiquitina, la *ubiquitinación*, se considera una forma de señalización y la información transmitida por esta “etiqueta” depende de la naturaleza de la modificación [Di Fiore et al. 2003]. La ubiquitina se une a una proteína blanco por medio de un enlace isopéptido entre su glicina (G) C-terminal y un grupo ε-amino de un residuo de lisina en la proteína aceptora [Zhang 2003c] (Figs. 31 y 32). Además, al menos cuatro residuos de lisina (K11, K29, K48 y K63) de la ubiquitina pueden servir como sitios de unión para otras moléculas de ubiquitina y así formar cadenas poliméricas de esta proteína [Pickart 2001].

La histona H2A, específicamente en el residuo K119, fue la primera proteína identificada como blanco de ubiquitinación [Goldknopf et al. 1975; Nickel & Davie 1989]. Se ha reportado que un 5-15% de las histonas H2A eucariotas están ubiquitinadas y que la mayoría de éstas solo tiene añadida una molécula de ubiquitina. Sin embargo, también se han encontrado histonas H2A poli-ubiquitinadas en varios tipos celulares [Nickel et al. 1989].

Las histonas H2B también pueden contener un módulo de ubiquitina [West & Bonner 1980], aunque esta transformación (1-2%) es menos frecuente que en la histona H2A (5-15%). No obstante, esta variante también está ampliamente distribuida entre los eucariotas. El sitio de ubiquitinación en histonas H2B humanas es en K120, mientras que en su análogo de levaduras es en K123 [Thorne et al. 1987]. Hasta el

momento, sólo se ha reportado la existencia de histonas H2B en forma mono-ubiquitinadas. Las histonas H2B ubiquitinadas, y en menor medida las H2A, se han asociado con el mantenimiento (más que con la activación) de la transcripción.

Se ha reportado la ubiquitinación de histonas H1 y H3 [Chen et al. 1998a; Pham & Sauer 2000], pero esta transformación no ha demostrado una prevalencia comparable a la encontrada en H2A y H2B. Las histonas ubiquitinadas se han detectado en espermátides en elongación. El sitio de ubiquitinación de las histonas H1 y H3 no se han determinado [Zhang 2003].

2.2.3.1 Enzimas ubiquitinadoras: E1, E2 y E3

La ubiquitinación es una modificación reversible y el grado de este tipo de alteración en las histonas está determinado por la disponibilidad de la ubiquitina libre y la actividad enzimática involucrada en añadirla y removerla de las proteínas receptoras. La adición de ubiquitina a un residuo de lisina es un proceso complejo donde participan dos o tres tipos de acción enzimática: E1 activadora, E2 conjugadora y E3 ligasa [Pickart 2001]. El proceso de ubiquitinación se lleva a cabo en una serie de pasos:

1. *Activación de la ubiquitina* a través de una reacción de dos etapas por una enzima activadora de ubiquitina (E1), utilizando ATP como fuente de energía [Haas et al. 1982]. Primero se produce un intermediario ubiquitina-adenilato para que, posteriormente, se transfiera la ubiquitina al sitio activo con liberación de AMP. Esto se traduce en la formación de un enlace tioéster entre el grupo carboxilo C-terminal de la ubiquitina con el grupo sulfhidrilo de la cisteína E1.
2. Transferencia de la ubiquitina de E1 al sitio activo de la enzima ubiquitina-conjugadora E2. Se realiza por medio de una reacción de trans-tio-esterificación.
3. Acción de reconocimiento de sustrato por parte de las ubiquitina-proteína-ligasas (E3) [Peters 1998; Scheffner et al. 1995; Reiss et al. 1989]. Las enzimas funcionan como módulos capaces de interactuar con E2 y E3. Las enzimas E3 contienen uno de dos dominios posibles: HECT (homólogo de la terminal E6-AP carboxilo) ó el RING. La enzima puede actuar de dos formas: (1) Transferencia directa de E2, catalizada por el dominio RING de E3; y (2) formación de un intermediario covalente E3-ubiquitina antes de la transferencia de ubiquitina a la proteína sustrato, por medio del dominio HECT de la enzima E3.

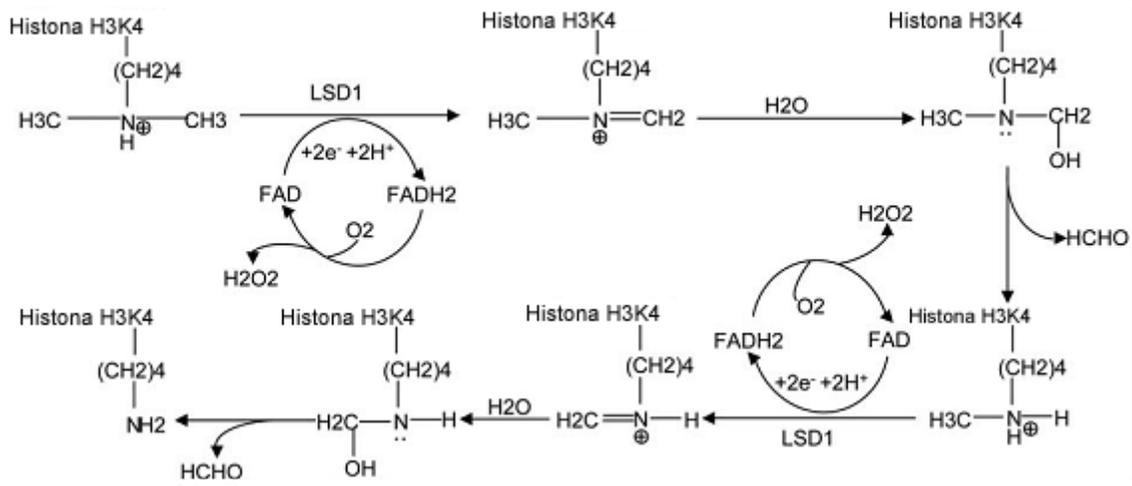


Figura 30. Posibles reacciones químicas involucradas en la desmetilación catalizadas por LSD1.

Se muestra solamente H3K4me₂, pero las reacciones propuestas también son compatibles con lisinas mono-metiladas o argininas metiladas [Adaptado de Shi et al. 2004].

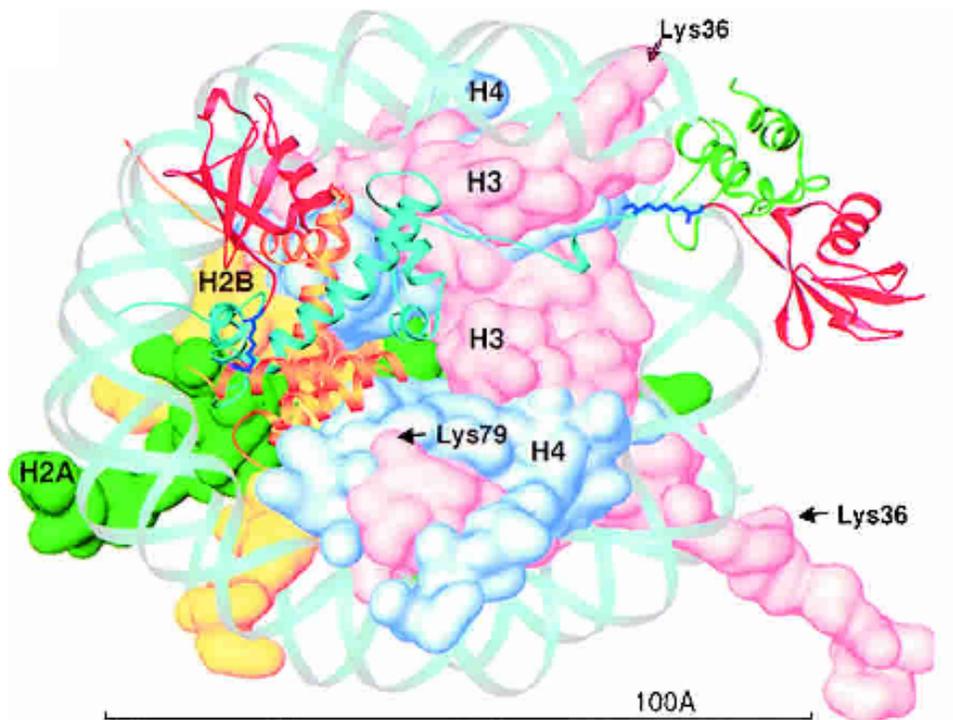


Figura 31. Estructura propuesta del nucleosoma con histonas ubiquitinadas. Las moléculas modeladas de ubiquitina (rojo) se unen covalentemente a Lys 119 de la histona H2A (púrpura) y Lys 120 de la histona H2B (dorado) y están representadas con diagramas de listón. En esta imagen, solo se muestra una histona H2A y una H2B de forma detallada. El enlace isopéptido entre los residuos de Lys aceptores y G76 de la ubiquitina se muestran en un modelo molecular (azul). El dominio globular de histona H1 está mostrado en un diagrama verde de listón [Adaptado de Zhang 2003].

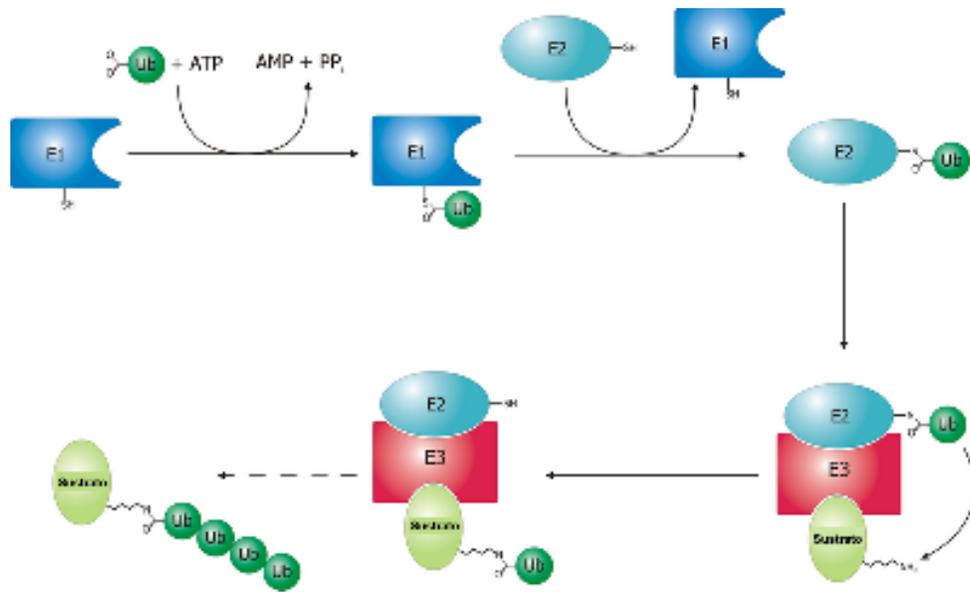


Figura 32. Mecanismo de ubiquitinación [Adaptado de Wikipedia 2008].

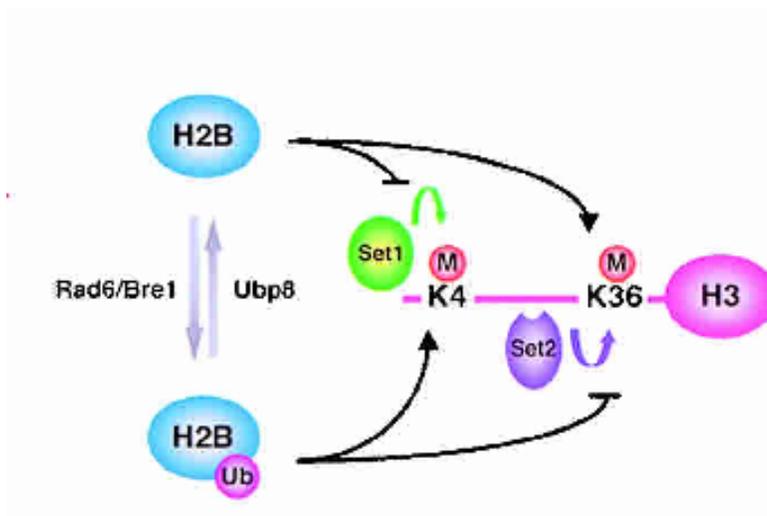


Figura 33. Efectos de la ubiquitinación y desubiquitinación de la histona H2B en la metilación de H3K4 y H3K36.

Las enzimas que participan en esta interacción están indicadas: Rad6/Bre1, Ubp8, Set1, Set2 [Adaptado de Zhang 2003].

Una cadena ramificada de poli-ubiquitina se puede formar en la proteína a través de la ligación sucesiva de monómeros adicionales de ubiquitina a la cadena del residuo de lisina [Haas & Siepmann 1997].

En levaduras sólo se necesitan las enzimas Rad6 y Cdc34 *in vitro* [Jentsch et al. 1987; Goebel et al. 1988] (y solamente Rad6 *in vivo* [Robzyk et al. 2000]) para la ubiquitinación de la histona H2B, lo que significa que no necesitan de la enzima E3. Para explicarlo, algunos estudios sugieren que Bre1, una proteína con dedo tipo anillo asociada a Rad6, podría presentar actividad ligasa correspondiente a la E3. Las enzimas HR6A y HR6B son los homólogos de la Rad6 encontrada en mamíferos [Koken et al. 1991]. Se han identificado también dos homólogos putativos de Bre1 en humanos [Hwang et al. 2003].

En comparación con las necesidades enzimáticas para la ubiquitinación de la histona H2B, en la histona H2A aparentemente es necesaria la actividad tipo E2 y E3 para ubiquitinarla ya que no se ha identificado su presencia en este proceso. Estudios *in vitro* señalan que Rad6 purificada puede ubiquitinar las histonas H2A y H2B con una cinética similar [Haas et al. 1991]; no obstante, no está claro aún si estas dos histonas comparten el mismo E2 *in vivo*.

Con respecto a la histona H1, aparentemente TAF_{II}250 (un componente del factor de transcripción general TFIID) tiene actividad ubiquitina-activadora E1/conjugadora E2 de este tipo de histona *in vitro* [Pham & Sauer 2000]. Es importante mencionar que las mutaciones puntuales en TAF_{II}250 no causan defectos en la transcripción general, por lo que se infiere que la ubiquitinación de la histona H1 podría participar solamente en la regulación de un grupo de genes, como los aquellos controlados por el factor de transcripción Dorsal [Pham and Sauer 2000].

Existen tres posibles mecanismos de cómo la ubiquitinación de histonas afecta a la transcripción:

1. *Podría afectar el plegamiento de alto orden de la cromatina y así alterar el acceso a la maquinaria de transcripción de ADN.* Ya que la molécula ubiquitina tiene la mitad del tamaño de las histonas centrales, inicialmente se creyó que la incorporación de las histonas ubiquitinadas en los nucleosomas podría tener un impacto en esta estructura básica y así alterar la estructura de la cromatina. Esta idea es compatible con las observaciones realizadas sobre los niveles de ubiquitinación de las histonas H2A y H2B durante el ciclo celular: en estados condensados de la cromatina (transición de la fase G2 a la M) no se reporta ubiquitinación, mientras que cuando se descondensa (transición de la fase M a la G1) reaparece [Wu et al. 1981]. Sin embargo, estudios posteriores no pudieron demostrar que este tipo de modificación epigenética tiene un efecto importante en la estructura del nucleosoma y el plegamiento de la cromatina [Davies & Lindsey 1994; Jason et al. 2001; Moore et al. 2002].

2. Podría funcionar como una señal de reclutamiento de moléculas moduladoras y así afectar la transcripción [Zhang 2003].
3. Podría tener un impacto en otras modificaciones de histonas y así alterar el estado de transcripción [Zhang 2003]. Se ha reportado un posible vínculo entre la ubiquitinación y la acetilación: la murina histona-desacetilasa 6 (mHDAC6) se asocia con dos proteínas implicadas en la ubiquitinación, y que el dominio dedo de zinc en la porción C-terminal de HDAC6 puede enlazarse directamente con ubiquitina [Seigneurin-Berny et al. 2001]. Otras publicaciones han relacionado también a la metilación con la ubiquitinación de histonas: aparentemente la metilación de H3K4 mediada por Set1 requiere un Rad6 funcional y un H3K123 intacto [Sun & Allis 2002]. Sin embargo, la delección del gen SET1 no afecta la ubiquitinación de H2BK123, lo que sugiere una vía unidireccional reguladora, donde la ubiquitinación de H2B se da río arriba con respecto a la metilación H3K4 [Sun & Allis 2002]. Posteriormente se determinó que la metilación de H3K79 también depende de la ubiquitinación de H2BK123 mediada por Rad6. Sin embargo, la metilación de H3K36 parece ser independiente a medidas de ubiquitinación [Briggs et al. 2002; Ng et al. 2002a] (Fig. 33).

El mecanismo que tiene más apoyo en la actualidad es el tercero, aunque los otros dos no han sido descartados. Los efectos negativos y positivos pueden ser explicados principalmente por un impacto en la metilación de histonas.

2.2.3.2 Activación transcripcional a través de ubiquitinación de histonas

La ubiquitina tiene un papel importante en la regulación de la transcripción, ya sea a través de mecanismos dependientes de la destrucción mediada por proteosomas de factores de transcripción u otras vías independientes a ésta [Conaway et al. 2002]. Ya que la transcripción ocurre en un ambiente de nucleosomas, se piensa que la ubiquitinación de histonas podría participar en la activación genética. La evidencia que apoya esta idea está en algunas conclusiones publicadas en los últimos 25 años:

- Los genes de choque térmico (Hsp-70) activos contienen hasta el 50% de histonas H2A ubiquitinadas, mientras que los nucleosomas con ADN satélite no-transcrito contienen solo una histona H2A ubiquitinada por cada 25 nucleosomas [Levinger & Varshavsky 1982].
- La histona H2A di-ubiquitinada está preferencialmente enriquecida alrededor del primer exón del gen dihidrofolato reductasa (DHFR) cuando presenta una transcripción activa en ratones [Barsoum & Vashavsky 1985].

- Las histonas H2A y H2B ubiquitinadas se encontraron enriquecidas alrededor de secuencias transcripcionalmente activas en timo bovino, eritrocitos de pollo y el macronúcleo de *Tetrahymena* [Nickel et al. 1989].
- La inhibición de la síntesis de ARNr no cambia significativamente el grado de ubiquitinación de histonas, mientras que la inhibición de la síntesis de ARNhn detuvo casi por completo la ubiquitinación de la histona H2B [Ericsson et al. 1986; Davie & Murphy 1990]. Esto significa que el mantenimiento del grado de ubiquitinación de H2B es dependiente del nivel de transcripción, especialmente el de ARNhn.

Generalmente, la ubiquitinación de la histona H2B mediada por Rad6 está vinculada con la silenciación transcripcional. Sin embargo, se ha demostrado que esta modificación también podría representar un marcador de activación en algunos genes específicos. Por ejemplo, se ha observado que la activación de los genes GAL1, SUG2 y PHO5, regulados por el complejo SAGA, es parcialmente dependiente de la ubiquitinación de H2BK123 [Henry et al. 2003]: la ubiquitinación de H2B incrementa en el promotor GAL1 durante la activación y posteriormente disminuye, al mismo tiempo que el ARNm se acumula. Este estado dinámico en el grado de histonas H2B ubiquitinadas puede ser explicado por afinidad diferencial de Rad6 y Ubp8, enzimas involucradas en la ubiquitinación y desubiquitinación de H2B respectivamente, con el promotor GAL1. Ante la disociación de Rad6 del promotor, Ubp8 remueve la porción ubiquitina de la histona H2B: aunque Ubp8 y Rad6 están involucradas en reacciones enzimáticas opuestas, ambas se requieren para la activación óptima del gen GAL1 por razones aún no completamente comprendidas [Zhang 2003].

Contrario a lo que se da en la heterocromatina, la ubiquitinación de las histonas H2B parecen activar a los genes localizados en las regiones eucromáticas [Zhang 2003]. La metilasa Set1 se asocia con la ARN polimerasa II a través de la interacción con el complejo de elongación Paf1 [Krogan et al. 2003b; Ng et al. 2003a], por lo que la ubiquitinación de H2B podría participar en la activación transcripcional al facilitar la metilación de H3K4 y la elongación transcripcional.

2.2.3.3 Silenciación transcripcional a través de ubiquitinación de histonas

Aunque la ubiquitinación generalmente se ha encontrado relacionada con un estado de transcripción activo, también se ha reportado el efecto contrario [Huang et al. 1986; Parlow et al. 1990; Dawson et al. 1991]. Se han encontrado histonas ubiquitinadas en compartimentos transcripcionalmente inactivos, como en el micronúcleo de *Tetrahymena* [Nickel et al. 1989] o el cuerpo sexual de las espermátides de ratón [Baarends et al.

1999]. Por lo tanto, la ubiquitinación de histonas modula la transcripción genética de una manera dependiente a la ubicación del gen.

Estudios han sugerido que la ubiquitinación de la histona H2B mediada por Rad6 está involucrada en el silenciamiento genético [Huang et al. 1997]. Con relación a esta hipótesis, también existe evidencia que indica que el silenciamiento del gen ARG1 (de eucromatina) requiere un Rad6 funcional capaz de ubiquitinar la histona H2B [Turner et al. 2002]. Además, la metilación de H3K4 y H3K79 se requiere para silenciación telomérica y ha demostrado ser dependiente a la ubiquitinación de la histona H2B, mediada por Rad6 [Briggs et al. 2002; Dover et al. 2002; Nget al. 2002a; Sun & Allis 2002].

La mayoría de los efectos negativos de la ubiquitinación en la transcripción se observan en las regiones heterocromáticas como en telómeros, el locus MAT (tipo sexual) y el locus ADN_r [Zhang 2003]. Las proteínas Sir intervienen en el silenciamiento genético de estas regiones. Ya que la ubiquitinación de histonas facilita la metilación de H3K4 y H3K79, localizadas preferencialmente en las regiones de eucromatina [Ng et al. 2003b], se ha sugerido que estos residuos de lisina metilados evitan que las proteínas Sir se asocien con regiones eucromáticas activas [Leuwen et al. 2002].

2.2.3.4 Desubiquitinación de histonas

La remoción de ubiquitina se puede lograr gracias a las isopeptidasas [Wilkinson 2000]. Esto se lleva a cabo por una hidrólisis de la unión peptídica en G76 de la molécula de ubiquitina. Se sabe de por lo menos 19 proteínas en levaduras que son capaces de catalizar este proceso [D'Andrea & Pellman 1998]. Las *enzimas desubiquitinadoras* (DUB) se dividen en dos grupos básicos: las *hidrolasas ubiquitina C-terminales* (UCH) y las *proteasas procesadoras ubiquitina-específicas* (UBP). En general, las UCH son tiol-proteasas tipo papaína con un centro catalítico compuesto de ~230 aminoácidos; mientras que las UBPs tienen el dominio catalítico de ~350 residuos [D'Andrea & Pellman 1998].

Se piensa que las extensiones N-terminales variables entre las UBPs contribuyen a la especificidad de sustrato [D'Andrea & Pellman 1998]. La proteína Ubp3 se asocia con una proteína involucrada en la silenciación de la heterocromatina, Sir4, aunque el sustrato de esa ubiquitina-proteasa aún no es conocido [Moazed & Johnson 1996]. Otra proteína de este grupo, Ubp8 (componente del complejo SAGA) [Grant et al. 1997], demostró ser la enzima responsable de la desubiquitinación específica y reversible de H2B en levaduras en proceso de gemación. Existen homólogos potenciales de Ubp8 en una variedad de plantas y mamíferos; sin embargo, aún falta determinar su participación en la desubiquitinación de la histona H2A [Zhang 2003].

Desubiquitinación y metilación de histonas. Mientras la ubiquitinación de la histona H2B facilita la metilación de H3K4 [Dover et al. 2002; Sun & Allis 2002], al mismo tiempo disminuye la tasa de metilación de H3K36 [Henry et al. 2003]. Por lo tanto, al mismo tiempo que la desubiquitinación de H2B reduce la metilación de H3K4, se incrementa de manera importante la metilación de H3K36 [Henry et al. 2003].

Aunque la metilación de los complejos de metilación Set1 y Set2 participan en la transcripción por su asociación con el complejo de elongación Paf1 [Krogan et al. 2003a; Krogan et al. 2003b; Li J et al. 2002b; Li et al. 2003; Ng et al. 2003a; Xiao et al. 2003b], parecen ser esenciales y actúan en diferentes etapas del ciclo de elongación transcripcional: la metilación de H3K4 mediada por Set1 podría ocurrir durante la etapa temprana; mientras que la metilación de H3K36 por Set2 ocurriría de forma tardía. No obstante, aún no hay evidencia experimental que apoye la función anteriormente planteada de Set1 [Zhang 2003]. Por lo tanto, es probable que la variación en los grados de ubiquitinación de H2B es esencial para el establecimiento de niveles adecuados de Set1 y Set2 en genes [Zhang 2003].

Al parecer, Set1 y Set2 son reclutados por la ARN polimerasa II vía el complejo de elongación Paf1 [Henry et al. 2003]. Se ha propuesto que los niveles de ubiquitina H2B podrían facilitar preferencialmente la asociación de Set1 o Set2 al complejo Paf1. Sin embargo, el efecto de la ubiquitinación de H2B en la modulación de la ocupación de Set1 y Set2 en los genes se desconoce [Zhang 2003]. Tal vez se requiere una desubiquitinación para la liberación de Set1 de genes en proceso de transcripción. Además, Set1 podría asociarse por tiempos más largos a los genes activos, induciendo la hipermetilación de las histonas [Zhang 2003].

Mientras que la metilación de histonas se considera una modificación epigenética estable, la ubiquitinación parece no serlo tanto [Zhang 2003]. Se ha observado que la desubiquitinación activa ocurre durante la activación genética, lo que puede ayudar a explicar por qué las histonas metiladas son más abundantes que las ubiquitinadas [Zhang 2003]. Niveles transitorios de ubiquitinación de la histona H2B son importantes para la determinación de patrones normales de metilación de histonas, a través del control de la asociación de Set1 y Set2 con la ARN polimerasa II [Zhang 2003]. La localización preferencial de Set1 en la terminal 5' del gen crea al mismo tiempo un dominio de hipermetilación de H3K4. Por otra parte, Set2 se ubica a través del ORF durante su transcripción y su reclutamiento depende tanto de Paf1 como de Ctk1, una cinasa del residuo S2 C-terminal de la ARN polimerasa II [Zhang 2003]. Esta última interacción puede traducirse como una asociación de Set2 con regiones de transcripción activa por asociación con la ARN polimerasa II en elongación.

2.2.4 Sumoilación

La molécula SUMO, denominada por las siglas de su nombre en inglés '*small ubiquitin-related protein*' (proteína pequeña relacionada a la ubiquitina), es una proteína de ~11 kDa con la capacidad de unirse a residuos de lisina de proteínas blanco. Se han identificado tres tipos de proteínas SUMO en mamíferos: SUMO-1/Smt3C, SUMO-2/Smt3A y SUMO-3/Smt3B [Melchior 2000; Muller et al. 2001]. Estudios han determinado que SUMO-1 es 18% idéntico a la ubiquitina y que tiene un plegamiento similar a ésta [Bayer et al. 1998] (Fig. 34). No obstante, SUMO tiene una distribución de cargas y una extensión N-terminal no encontrada en la ubiquitina. La proteína SUMO-4, encontrada principalmente en riñón, tiene un patrón de expresión restringido. Posiblemente, la modificación epigenética con cada subtipo de SUMO podría implicar consecuencias funcionales diferentes [Sayitoh & Hinchey 2000; Tatham et al. 2001], aunque estos aún no han sido dilucidados en la actualidad [Gill 2004].

Comparativamente, las actividades de SUMO y ubiquitina en el núcleo muestran diferencias en su funcionamiento, pero además se observan similitudes en cuanto a sus mecanismos [Gill 2004]. Por ejemplo, la modificación de proteínas nucleares por ubiquitina generalmente está relacionada con una expresión genética incrementada, mientras que la sumoilación está asociada con el efecto contrario. Además, es interesante saber que SUMO y la ubiquitina compiten por los residuos de lisina a modificar, lo que podría significar un mecanismo de equilibrio de expresión. No obstante, aunque las consecuencias funcionales son diferentes, actualmente se cree que SUMO promueve interacciones entre proteínas que tienen poca o nula afinidad por el sustrato no-modificado, al igual que el planteamiento actual utilizado para la ubiquitina [Gill 2004].

Al igual que la ubiquitina, la proteína SUMO se une covalentemente a un sustrato proteico por medio de un enlace isopéptido entre una glicina C-terminal de SUMO y un residuo de lisina de la proteína aceptora [Gill 2004]. Las enzimas E1 y E2, activadora y conjugadora, de la sumoilación están relacionadas con las que participan en la ubiquitinación. La activación de SUMO se realiza de manera ATP-dependiente por medio de un heterodímero SAE1 (AOS1)-SAE2 (UBA2) [Verger et al. 2003] (Fig. 35). Sólo se ha encontrado una proteína conjugadora de SUMO E2, Ubc9. Generalmente el residuo de lisina elegido para la sumoilación está en una secuencia consenso ψ -K-X-E (donde ψ es un aminoácido grande hidrofóbico, como isoleucina o valina; y X es un residuo cualquiera) [Verger et al. 2003]. Los elementos necesarios para la sumoilación *in vitro* ATP-dependiente son la secuencia consenso de reconocimiento para el sitio activo de Ubc9; enzimas recombinantes E1 y E2; y SUMO [Bernier-Villamor et al. 2002]. Las SUMO-E3 denominadas como ligasas, aunque más bien funcionan como adaptadoras, sirven para promover la transferencia de SUMO de E2 al sustrato específico; por lo que, aunque no sean

esenciales en la modificación *in vitro*, podrían ser importantes para la selección del sustrato *in vivo* [Gill 2004]. Las SUMO E3-ligasas identificadas son proteínas no relacionadas entre sí: RanBP2, las proteínas PIAS y la proteína del grupo policomb Pc2 [Johnson & Gupta 2001; Kahyo et al. 2001; Takahashi et al. 2001; Pichler et al. 2002]. Las SUMO E3-ligasas están ubicadas de forma diferente dentro del núcleo: RanBP2 está en el complejo de poro nuclear; las proteínas PIAS están en el nucleoplasma y en cuerpos nucleares; y Pc2 está en el cuerpo policomb [Sachdev et al. 2001; Kotaja et al. 2002; Pichler et al. 2002; Kagey et al. 2003]. Las diferencias en la localización de E3 pueden estar ligadas a su especificidad funcional *in vivo*. Además, RanBP2 es especialmente interesante por su especificidad, ya que solo estimula la sumoilación de algunos sustratos, como las proteínas RanGAP1 y Sp100, pero no de otros como la p53 [Pichler et al. 2002].

La sumoilación, como la ubiquitinación, es un proceso reversible y participa en un proceso dinámico de conjugación/desconjugación [Gill 2004]. Existen proteasas SUMO-específicas que participan en el procesamiento de SUMO inmaduro y la remoción de esta molécula de los sustratos. Una de las dos proteasas presentes en levaduras, Ulp1, ha demostrado ser necesaria para la proliferación celular. Las proteasas SUMO-específicas que han sido identificadas en mamíferos hasta el momento son: SENP1, en nucleoplasma y cuerpos nucleares; SENP2, en los poros nucleares; SENP3, en el nucleolo; y SENP6 en el citoplasma [Gong et al. 2000; Kim et al. 2000; Nishida et al. 2000; Bailey & O'Hare 2002; Hang & Dasso 2002]. Estudios realizados sobre levaduras y mamíferos han mostrado que la localización subcelular diferencial contribuye a la selectividad de sustrato de las SUMO-proteasas *in vivo* [Gong et al. 2000; Hang & Dasso 2002; Li & Hochstrasser 2003].

La proteína SUMO generalmente se considera como monomérica, sin embargo, de manera similar a la ubiquitina, las tres isoformas de SUMO en mamíferos se han observado de forma polimérica *in vitro*. Aún no se ha determinado el significado funcional de estas cadenas *in vivo* [Sayitoh & Hinchee 2000; Tatham et al. 2001; Johnson & Gupta 2001; Pichler et al. 2002].

Los blancos de la modificación de SUMO generalmente son proteínas nucleares importantes en la regulación de la transcripción, estructura de la cromatina y reparación de ADN [Gill 2004]. La histona H4 ha mostrado ser susceptible a la sumoilación [Shiio & Eisenman 2003], aunque el sitio preciso de la modificación dentro de la cola N-terminal no se ha identificado. Como en otras modificaciones, no se sabe si la sumoilación afecta directamente la estructura o el empaquetamiento nucleosomal. Tampoco existe información experimental que responda si esta modificación promueve o inhibe la interacción con proteínas alternas a las histonas. Sin embargo, la idea más aceptada en la actualidad es que la sumoilación promueve la actividad transcripcional; prueba de esto es que la sumoilación de la histona H4 incrementa su asociación con HDAC1 y HP1 [Gill 2004], dos correpresores transcripcionales. Además,

la unión de Ubc9 (enzima conjugadora E2) a ADN mostró un incremento en los niveles de SUMO en zonas promotoras y una represión de la transcripción [Shiio & Eisenman 2003].

Como ya se mencionó con anterioridad en este apartado, el efecto de la sumoilación generalmente se relaciona con la represión de la actividad transcripcional de activadores [Gill 2003; Verger et al. 2003]. Por lo tanto, contrario a lo observado en la ubiquitinación, la sumoilación podría funcionar reprimiendo la activación genética mediada por factores de transcripción [Gill 2004]. Últimamente, se ha apoyado la idea de que, en varios casos, la sumoilación inhibe la actividad de factores de transcripción al promover interacciones con proteínas que reprimen la transcripción. Entonces, los factores de transcripción sumoilados podrían unirse en el promotor y participar activamente en la represión transcripcional [Kim et al. 2002a; Ross et al. 2002; Holmstrom et al. 2003; Yang et al. 2003]. Además, la proteína SUMO puede actuar como “secuestrador” de factores de transcripción al causarles una relocalización hacia un dominio sub-nuclear donde no tengan actividad.

Otras investigaciones sugieren que la sumoilación de factores de transcripción no se traduce en un solo resultado (activación/desactivación), sino que participa en un sistema de modulación más sutil y relativo al contexto celular. Por ejemplo, se ha sugerido que la sumoilación puede interferir específicamente con la habilidad de algunos factores de transcripción para funcionar sinérgicamente cuando se unen a múltiples sitios en un promotor, dejando la probabilidad de resultar en una activación transcripcional. Por ejemplo, la sobre-expresión de SUMO-1 ha mostrado incrementar la actividad de algunos promotores dirigidos al receptor glucocorticoide, pero no de otros [Le Dren et al. 2002].

Los estudios sobre mecanismos con los que la sumoilación regula la actividad de factores de transcripción son complicados porque en muchos de los casos además se modifican coactivadores asociados y/o correpresores [Gill 2004].

2.2.5 Fosforilación

Las proteínas pueden ser fosforiladas *in vivo* por dos mecanismos diferentes [Turner 2001] (Fig. 36):

1. *Formación de un enlace O-fosfato* al sustituir un fosfato por un grupo hidroxilo en residuos de serina, treonina y –con menor frecuencia– tirosina, y la
2. *Formación de un enlace N-fosfato* en lisina, histidina y arginina.

Estos mecanismos se llevan a cabo por enzimas proteína-cinasas específicas que obtienen grupos fosfatos a partir de moléculas donadoras, como ATP, GTP o AMP. La fosforilación de histonas y otras proteínas nucleares tiene efectos importantes sobre la transcripción, reparación de ADN, apoptosis y condensación cromosómica [Cheung et al. 2000b].

Las proteína-cinasas son componentes integrales del complejo de iniciación de la ARN polimerasa II, por lo que contribuyen a su funcionalidad [Turner 2001]. Por ejemplo, la fosforilación del dominio C-terminal de una subunidad catalítica de ARN polimerasa II se requiere para el inicio y la progresión de la transcripción. Sin embargo, aunque varios estudios *in vitro* han demostrado que diferentes proteínas-cinasas son capaces de fosforilar varios aminoácidos, este tipo de modificación epigenética en las histonas *in vivo* sólo se ha reportado en residuos específicos de serina (S) y treonina (T): cinco residuos de S y tres de T de las porciones N- y C-terminales pueden ser fosforilados. El grado más alto de fosforilación se ha encontrado en las células mitóticas y se le ha atribuido parcialmente a la acción de las cinasas dependientes de ciclinas, asociadas con el crecimiento.

El efecto de la fosforilación de la histona H1 no ha sido elucidado, aunque se piensa que, por su habilidad para interactuar con el ADN central y conector, podría contribuir en la formación de estructuras de cromatina de alto orden [Turner 2001]. La remoción del grupo fosfato es mediado por enzimas proteína-fosfatasas.

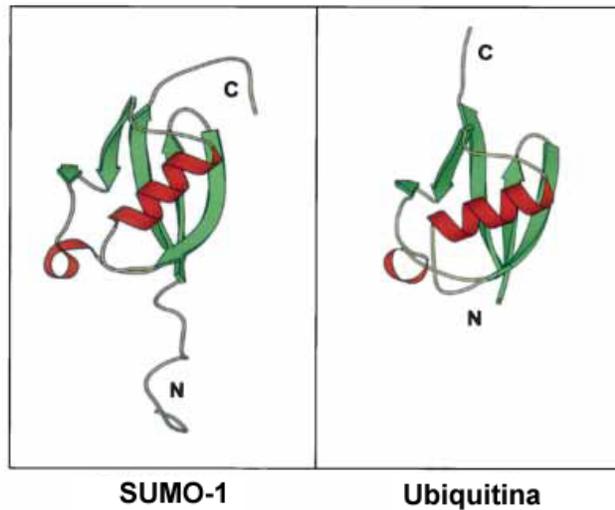


Figura 34. Similitud de la estructura tridimensional de SUMO-1 y ubiquitina.
 Con diagramas de listón se indican elementos de estructura secundaria: pliegues-beta = verde; alfa-hélices = rojo. SUMO tiene una extensión N-terminal no presente en ubiquitina [Adaptado de Gill 2004].

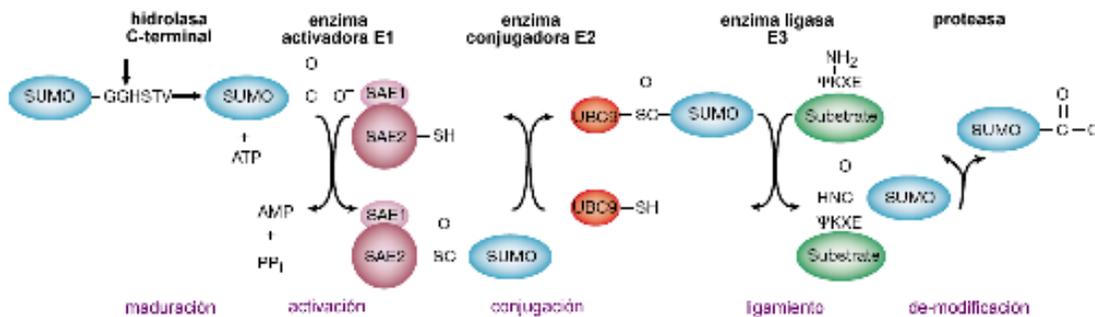


Figura 35. Sumoilación.

La proteína SUMO se sintetiza como precursor y es procesado por hidrolasas para hacer que el motivo doble-glicina C-terminal esté disponible para la conjugación. Posteriormente es conjugado a proteínas por medio de la enzima E1 activadora [SAE1(AOS1)/SAE2(UBA)]; la E2-conjugadora (Ubc9) y las enzimas E3-ligasas (PIAS, RanBP2, etc). Las proteínas tipo E3 pueden servir para incrementar la afinidad entre Ubc9 (E2) y los sustratos al colocarlo en una orientación catalíticamente favorable. La formación del enlace isopéptido es estable y su destrucción requiere una enzima de-sumoiladora [Adaptado de Verger et al. 2003].

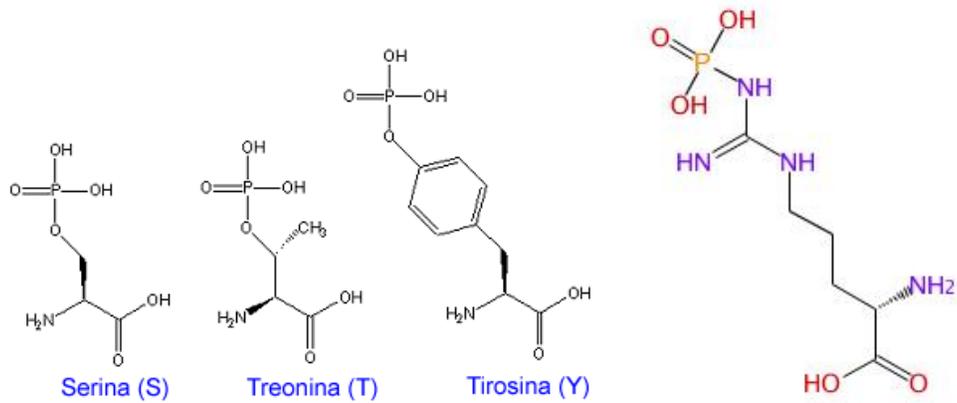


Figura 36. Residuos de serina (S), treonina (T), tirosina (Y) y arginina fosforilados.

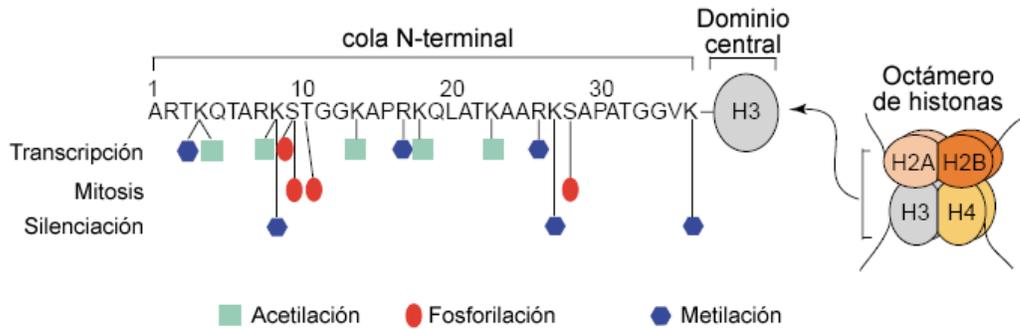


Figura 37. Modificaciones del dominio N-terminal de la histona H3.

La cola N-terminal está en la parte exterior del nucleosoma, lo que la hace susceptible a modificaciones covalentes. Los residuos que pueden ser modificados están indicados, junto con los procesos celulares asociados (a la izquierda de cada modificación) [Adaptado de Nowak & Corces 2004].

La fosforilación de la histona H2A se ha vinculado con la condensación de cromatina [Cheung et al. 2000b]. Se ha observado que la mutación de H2AS10 en histonas de *Tetrahymena* causa condensación de cromatina anormal y una separación defectuosa del cromosoma durante la anafase [Grant 2001].

En la histona H3 sólo se ha documentado la fosforilación exclusiva del residuo S10. La cinasa responsable de esta modificación no se ha identificado. Existe una fosforilación altamente conservada y distribuida de H3S10 cuando la célula empieza la mitosis [Hendzel et al. 1997; Hsu et al. 2000]. Además, esta misma fosforilación se estimula, aunque con menor intensidad, en los genes *tempranos-inmediatos* cuando la célula recibe el estímulo de factores de crecimiento [Thomson et al. 1999]. Sin embargo, esta modificación presenta un efecto modulador no muy claro: la fosforilación de H3S10 se asocia con la condensación de cromatina y la supresión genética cuando la célula entra a mitosis; mientras que también se asocia con la activación de genes específicos. Para explicar esto, experimentos han determinado que, en células estimuladas con factores de crecimiento, los residuos H3S10 se asocian con cromatina altamente acetilada [Cheung et al. 2000b; Lo et al. 2000], y que en las células mitóticas no es así. Entonces, la acetilación podría predisponer a la cromatina a una fosforilación subsecuente al cambiar la configuración local del sustrato para la cinasa correspondiente [Turner 2001]. La fosforilación de H3S10 también está relacionada con una inducción de la transcripción por una respuesta de choque térmico en *Drosophila* [Nowak & Corces 2000] (Fig. 37).

Es posible que diferentes cinasas catalicen las reacciones de fosforilación durante la mitosis y las mediadas por factores de crecimiento. Anteriormente se propuso que la proteína Rsk2 podría ser la responsable de la fosforilación asociada al crecimiento, ya que esta cinasa no está presente en pacientes con el síndrome genético de Coffin-Lowry [Turner 2001; Sassone-Corsi et al. 1999]. Los que padecen esta enfermedad son capaces de fosforilar residuos H3S10 en la mitosis, pero no por estimulación con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) [Sassone-Corsi et al. 1999]. Al tratar fibroblastos inactivos con EGF se observó una rápida fosforilación de H3S10, coincidiendo con la inducción de genes de respuesta temprana como *c-fos* y *c-jun*. No obstante, también se consideró que posiblemente Rsk2 no es la encargada de fosforilar a la porción H3S10, sino a la cinasa responsable de hacerlo para activarla [Turner 2001]. En la actualidad, se apoya más la idea que las cinasas mitógenas y de respuesta a estrés (MSK1 y MSK2) son las responsables de esta modificación, gracias a un estudio posterior que comparó las susceptibilidades relativas de RSKs y MSKs a inhibidores de cinasa [Strelkov & Davie 2002; Soloaga et al. 2003]. Por otro lado, la fosforilación específica de H3S10 relacionada con mitosis se le atribuye a la Ip11/aurora-cinasa en nemátodos y levaduras, y a la NIMA-cinasa en *Aspergillus nidulans* [Souza et al. 2000; Hsu et al. 2000].

La fosforilación de la histona H3 ocurre también después de la activación de señalamientos de daño al ADN. Por ejemplo, el motivo ASQE (alanina-serina-glutamina-glutamato) que se encuentra en la porción C-terminal de la histona H2A de la levadura, y en la variante H2A.X de mamíferos, se fosforila después de exposición a agentes genotóxicos [Downs et al. 2000; Rogakou et al. 1999]. En levaduras se ha identificado al residuo S139 como el punto de fosforilación específico de respuesta a daño a ADN, mediada por una fosfatidil-inositol-3-OH cinasa: Mec1 [Grant 2001]. Así, parece que la fosforilación media cambios en la estructura de cromatina, lo que puede facilitar su reparación.

La fosforilación de las colas de histonas neutraliza su carga positiva y se piensa que reduce su afinidad por el ADN, lo que podría explicar en parte la activación transcripcional inducida por esta modificación [Grant 2001].

2.2.6 ADP-ribosilación

Las histonas y otras proteínas nucleares son susceptibles a la adición de moléculas de ADP-ribosa a sus estructuras. Este tipo de modificación postraducciona está vinculado con el señalamiento celular y el control de procesos como la reparación de ADN y proliferación celular [Boulikas 1991; Kreimeyer et al. 1984].

2.2.6.1 Mono-ADP-ribosilación

La mono-ADP-ribosilación es una modificación reversible [Okazaki et al. 1995; Smith et al. 1985] y covalente donde la molécula ADP-ribosa, proveniente de NAD^+ , se transfiere a un aminoácido específico en una proteína aceptora con la liberación simultánea de nicotinamida [Hassa et al. 2006]. La enzima que cataliza la mono-ADP-ribosilación es la *mono-ADP-ribosiltransferasa* (MART) [Corda & Di Girolamo 2003; Glowacki et al. 2002; Okazaki & Moss 1996, 1999]. Las e-MARTs (e-MART-1 al -5/6) son la versión mamífera de las MARTs [Corda & Di Girolamo 2003; Koch-Nolte & Haag 1997; Okazaki & Moss 1999; Seman et al. 2004].

El grado de este tipo de modificación en proteínas también depende de la actividad de *mono-ADP-ribosa-proteína hidrolasas* (MARH) que revierten la reacción al hidrolizar los enlaces proteína-ADP-ribosa [Corda & Di Girolamo 2003; Koch-Nolte & Haag 1997; Okazaki & Moss 1996, 1999]. Las enzimas encargadas de la mono-ADP-ribosilación son específicas para diferentes residuos de aminoácidos. En células eucariotas, se ha detectado la mono-ADP-ribosilación de arginina, glutamato, cisteína, aspartato y asparagina [Ord & Stocken 1977; Smith & Stocken 1975; Corda & Di Girolamo 2003; Corda & Di Girolamo 2002; Okazaki & Moss 1996, 1999; Seman et al. 2004]. Específicamente en el núcleo celular, se ha identificado esta modificación en residuos de arginina y glutamato [Turner 2005; Wang et al. 2002]. En mamíferos existen por lo menos dos familias distintas de MARTs intracelulares putativas: (1) enzimas tipo-PARP, las P1-MARTs (PI-MART-1 a -11) [Ame et al. 2004; Glowacki

et al. 2002; Otto et al. 2005]; y (2) la familia SIRT con actividad histona desacetilasa NAD⁺-dependiente y ADP-ribosiltransferasa (SIRT1-7) [Frye 1999; Garcia-Salcedo et al. 2003; Liszt et al. 2005; Tanny et al. 1999].

Enzimas tipo-PARP, P1-MARTs. Aunque todas las P1-MARTs tienen un motivo PARP-característico conservado en sus dominios catalíticos [Ame et al. 2004; Glowacki et al. 2002], los miembros de la familia P1-MART son estructuralmente diferentes de las proteínas PARPs. Esta familia tiene varios dominios adaptadores y motivos adicionales, como los dominios WWE, los tipo-macroH2; y los motivos de unión-a-ubiquitina y los de unión-a-ARN; lo que podría indicar que la familia P1-MART podría participar en varias funciones biológicas en donde la familia PARP. Esta familia enzimática se divide en subgrupos de acuerdo a su composición de dominios [Hassa et al. 2006].

- *Subgrupo I:* No se conoce la función enzimática de estos miembros. Está compuesto por: P1-MART-1 (también conocida como PARP-6, P1-MART-2, P1-MART-2b (PARP-8 y P1-MART3 (PARP-16 [Ame et al. 2004]).
- *Subgrupo II:* El único miembro, P1-MART4 (PARP-10), es una proteína que interactúa con Myc y que inhibe la transformación celular [Yu et al. 2005].
- *Subgrupo III:* Proteínas caracterizadas por tener dedos de zinc tipo C3H1 y/o un dominio WWE. Los miembros de este grupo son: P1-MART-5 (PARP-11 [Ame et al. 2004]), P1-MART6 (TiPARP, PARP-7 [Ma et al. 2001b]), P1-MART-7 (ZC3HDC1, PARP-12) y P1-MART-8.
- *Subgrupo IV:* Proteínas con dominios macroH2A y/o WWE. Está compuesto por: P1-MART-9 (PARP-9), P1-MART-19 (PARP-14) y P1-MART-11 (PARP-15). Inicialmente fueron descritas como proteínas de alto riesgo en linfomas difusos de células B (BAL-1, BAL-2, BAL-3) [Hassa et al. 2006].

Sin embargo, no hay evidencia bioquímica de actividad de mono-ADP-ribosilación por las proteínas P1-MART y existen varias clasificaciones diferentes para este grupo. Una vez que sus actividades enzimáticas sean caracterizadas, será necesario hacer una clasificación universal de estas enzimas [Hassa et al. 2006].

Enzimas reguladoras silenciosas de información tipo-Sir2, SIRTs. Esta familia regula una amplia gama de procesos celulares como el desarrollo, metabolismo, diferenciación celular y apoptosis; formación de heterocromatina; segregación cromosómica; y la transcripción, reparación y recombinación de ADN [Blander & Guarente 2004; Denu 2005; Grubisha et al. 2005]. Varios reportes experimentales han sugerido que las SIRT1, SIRT2 y SIRT6 de mamíferos podrían presentar actividad intrínseca mono-ADP-ribosiltransferasa [Frye 1999; Liszt et al. 2005; Mostoslavsky et al. 2006; Tanny et al. 1999]. Además, los siete SIRTs

humanos caracterizados hasta el momento tienen un residuo de histidina conservado, el cual podría ser importante para la actividad mono-ADP-ribosiltransferasa. Aún resta por determinar si la desacetilación de proteínas, la acetilación de ADP-ribosa o la mono-ADP-ribosilación de proteínas ocurren simultáneamente, o depende de las condiciones celulares y del tipo de SIRT involucrada en el proceso [Hassa et al. 2006].

La proteína SIRT6, altamente expresada en células de ratón, ha demostrado una actividad auto-ADP-ribosiltransferasa considerable [Liszt et al. 2005; Michishita et al. 2005]. Los ratones SIRT6-KO muestran síntomas de envejecimiento prematuro, como pérdida de grasa subcutánea y densidad ósea disminuida, y mueren a las cuatro semanas de edad. Estos animales SIRT6-KO son deficientes en la reparación de escisión de bases (BER) del ADN [Mostoslavsky et al. 2006]. Los fibroblastos embrionarios de ratón SIRT6-KO muestran una proliferación impedida, mayor sensibilidad a agentes genotóxicos, traslocaciones cromosómicas, fragmentos, espacios y centrómeros desprendidos; defectos potencialmente reversibles con la ADN polimerasa- β involucrada en BER. Sin embargo, los mismos fibroblastos embrionarios SIRT6-KO muestran algunas condiciones normales como los puntos de control de ciclo celular y la reparación de rupturas del doble enlace [Haigis & Guarente 2006]. Además, los ratones SIRT6-KO tienen particularidades fenotípicas; por ejemplo, los niveles de IGF-1 circulante son inferiores a los valores normales y la hipoglicemia empeora con respecto a la edad [Mostoslavsky et al. 2006].

Implicaciones epigenéticas de la mono-ADP-ribosilación. En organismos eucariotas, la mono-ADP-ribosilación de residuos de arginina ocurre en proteínas extracelulares, citoplásmicas y nucleares. Cuando ocurre en residuos de cisteína, se observan efectos en las proteínas extracelulares, citoplásmicas y mitocondriales; en la asparagina solamente afecta a proteínas citoplásmicas; y en el grupo fosfato del residuo de fosfoserina parece modificar exclusivamente a proteínas nucleares. Se piensa que las histonas se mono-ADP-ribosilan en respuesta a agentes genotóxicos y con respecto a diferentes etapas del ciclo celular, actividad proliferativa, y grado de diferenciación [Adamietz & Rudolph 1984; Golderer et al. 1991; Kreimeyer et al. 1984; Kreimeyer et al. 1985; Smith & Stocken 1975; Stocken 1978; Tanuma et al. 1986; Wielckens et al. 1982]. Por ejemplo, se ha demostrado experimentalmente que:

- Cuando las células están expuestas a radicales hidroxilo o agentes alquilantes, el nivel de mono-ADP-ribosilación de las histonas se incrementó de dos a doce veces, aunque los niveles de histona H1 mono-ADP-ribosilada se incrementó más de treinta veces [Adamietz & Rudolph 1984; Kreimeyer et al. 1984, 1985].
- La mono-ADP-ribosilación de la histona H4 ocurre preferencialmente cuando esta proteína está hiperacetilada [Bohm et al. 1997; Golderer & Grobner 1991].

- La mono-ADP-ribosilación de H3R33 podría reducir la fosforilación AMPc-dependiente de H3S36 [Ushiroyama et al. 1985].
- Los residuos susceptibles a mono-ADP-ribosilación en residuos de ácido glutámico en histonas H2A; residuos de arginina de histonas H2A, H2B, H3 y H4; y en el grupo fosfato del residuo fosfoserina en histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 [Golderer & Grobner 1991; Ord & Stocken 1977; Smith & Stocken 1975; Tanigawa et al. 1984].

Además, se piensa que la mono-ADP-ribosilación, en conjunto con otras modificaciones epigenéticas, podría regular la respuesta a agentes genotóxicos de manera que podría señalar el tipo de daño al ADN y favorecer el reclutamiento de la maquinaria de reparación apropiada [Hassa & Hottiger 2005]. Estudios recientes indican que existen macro-dominios que reconocen específicamente diferentes tipos de ADP-ribosa libre, por lo que pueden servir como módulos de unión a esta molécula [Karras et al. 2005; Kustatscher et al. 2005]. Las proteínas que contienen estos macro-dominios aún no han sido identificadas [Hassa et al. 2006].

2.2.6.2 Poli-ADP-ribosilación

La poli-ADP-ribosa es un homopolímero de unidades de ADP-ribosa unidas por enlaces glicosídicos – ribosa 1'-2' ribosa – sintetizados por la familia de enzimas *poli-ADP-ribosa polimerasas* (PARP) [Ame et al. 2004; D'Amours et al. 1999; Hassa & Hottiger 2002]. La longitud de las cadenas es heterogénea y pueden alcanzar hasta las 400 unidades *in vivo* e *in vitro* [Alvarez-Gonzalez & Jacobson 1987; Juarez-Salinas et al. 1982, 1983]. Las moléculas grandes se ramifican de una forma irregular, aunque generalmente se puede encontrar una ramificación por cada 20-50 unidades de ADP-ribosa. Además, se ha postulado que algunas estructuras de poli-ADP-ribosa podrían tener una forma helicoidal similar a la del ARN y ADN [Minaga & Kun 1983]. La implicación funcional de la diversidad estructural de las moléculas poli-ADP-ribosa no se conoce, pero podría ser una señal del resultado esperado por la modificación *in vivo*, como indicar el grado de genotoxicidad adquirida y así decidir la supervivencia o muerte celular [Hassa et al. 2006]. Esta síntesis también requiere NAD^+ como precursor y un sustrato intermediario para la reacción. Las concentraciones constitutivas de poli-ADP-ribosa generalmente es baja en células no estimuladas [D'Amours et al. 1999]; pero en células en condiciones de estrés genotóxico o estímulo mitógeno, la actividad PARP aumenta de 10 a 500 veces. No obstante, la mayoría de los polímeros de poli-ADP-ribosa libres o asociados a proteína tienen una vida media muy corta cuando se producen por inducción [Alvarez-Gonzalez & Althaus 1989; Jacobson et al. 1983; Wielckens et al. 1982]: el 85% de los polímeros sintetizados por estrés genotóxico tienen una vida media menor a 40 segundos, mientras que los residuos se catabolizan en un tiempo

medio de 6 minutos. En contraste, las moléculas de poli-ADP-ribosa constitutivas tienen una vida media mayor, de ~7.7 horas [Alvarez-Gonzalez & Althaus 1989].

Poli-ADP-ribosa polimerasas (PARPs). Se han descrito al menos cuatro acciones enzimáticas básicas para la síntesis de cadenas (lineales y ramificadas) de poli-ADP-ribosa por PARP: (1) *iniciación*, unión covalente de una molécula mono-ADP-ribosa a una enzima PARP; (2) *elongación del polímero*, donde la molécula de mono-ADP-ribosa inicial sirve como unidad inicial; (3) *ramificación del polímero*; y (4) *liberación de la molécula de poli-ADP-ribosa* a través de alguna hidrolasa [Hassa et al. 2006].

Los seis miembros de la familia PARP *bona fide* pueden dividirse en al menos tres grupos de acuerdo a su dominio catalítico y su actividad enzimática [Hassa et al. 2006] (Fig. 38):

- Subgrupo I: PARP-1, PARP-1b, PARP-2 y PARP-3. La enzima PARP-1b es resultado de una transcripción alterativa del gen *Parp1* [Sallmann et al. 2000]. Datos experimentales sugieren que PARP-1 y PARP2 son esenciales en las vías de respuesta a estrés [Ame et al. 2004; Hassa & Hottiger 2002].
- Subgrupo II: PARP-4. Esta proteína es la más grande de la familia y forma parte del *complejo bóveda*, un aglomerado ribonucleoproteico de función desconocida asociada con el ARN no traducido y con dos proteínas altamente conservadas: la *proteína bóveda principal* y la *proteína asociada a telomerasa-1* [Kickhoefer et al. 1999].
- Subgrupo III: PARP-5 y PARP6a/b [Ame et al. 2004; Kaminker et al. 2001; Smith et al. 1998c]. Las proteínas PARP-5 y PARP6a/b también son conocidas como tankirasa-1 y tankirasa-2a, respectivamente. Ambas enzimas pertenecen al complejo telomérico [Kaminker et al. 2001; Smith et al. 1998c].

Todos los miembros PARP *bona fide* muestran actividad de auto-ADP-ribosilación [Ame et al. 1999b; Augustin et al. 2003; Kaminker et al. 2001; Kickhoefer et al. 1999; Sallmann et al. 2000; Smith et al. 1998c]. La auto-modificación se lleva a cabo en los dominios de unión a ADN de PARP-1 y PART-1, en el denominado sitio de auto-modificación de PARP-1 [Desmarais et al. 1991; Schreiber et al. 2002].

Además, se ha planteado que PARP-1 y PARP-2 se pueden ADP-ribosilar entre sí en varios dominios, aunque no está claro aún si esta modificación es covalente o no covalente [Schreiber et al. 2002; Hassa et al. 2006]. Hasta el momento, la proteína PARP-1 es la que ha mostrado la actividad de auto-modificación más fuerte *in vitro*. Aún se requieren más estudios para saber si PARP-2 y PARP-3, del grupo I, tienen la misma capacidad de mediar la producción de polímeros ramificados o lineales. Además, estudios posteriores podrán verificar si las PARPs se pueden dividir por tipos de actividad enzimática:

- (1) Sintetizadoras de polímeros ramificados (PARP-1, PARP-2 y PARP3);
- (2) las sintetizadoras de polímeros lineales (PARP-4?); y

(3) las productoras de oligómeros lineales (PARP-5 y PARP-6) [Rippmann et al. 2002].

Hace alrededor de dos décadas se demostró que la cromatina poli-ADP-ribosilada adopta una estructura más relajada que si no estuviera modificada de esta manera [Aubin et al. 1983; Murcia et al. 1986; Frechette et al. 1985; Leduc et al. 1986; Poirier et al. 1982].

Poli-ADP-ribosa-ribosa glicohidrolasas (PARGs). Son las principales responsables de la glicohidrólisis observada en polímeros de poli-ADP-ribosa. La PARG identificada en mamíferos tiene actividad endo- y exo-glicosidasa [Ame et al. 1999a; Braun et al. 1994; Brochu et al. 1994], por lo que son responsables de la hidrólisis de enlaces ribosa-ribosa internos y en los extremos del polímero de poli-ADP-ribosa.

Los productos de las rupturas catalizadas por estas enzimas podrían ser importantes para el señalamiento de procesos celulares, como la muerte o el crecimiento celular. Además, los polímeros de poli-ADP-ribosa cortos y ramificados son degradados con menor rapidez que los largos y lineales [Ame et al. 1999a; Braun et al. 1994; Brochu et al. 1994], lo que podría ayudar a explicar por qué los polímeros inducidos son menos estables que los constitutivos.

El gen *Parg* encontrado en mamíferos codifica al menos cuatro isoformas identificadas. En humanos y ratones se han identificado las isoformas PARG-110/111, PARG-102, PARG-99 y PARG-59/60 [Brochu et al. 1994; Di Meglio et al. 2003; Meyer-Ficca et al. 2004] (Fig. 39). La proteína PARG-110/111 se ha encontrado en células humanas, de rata y ratón; mientras que PARG-102 y PARG-99 se han determinado solamente en las primeras. La ubicación citoplásmica predominante de las isoformas PARG en mamíferos es extraña, ya que las PARPs conocidas tienen una localización nuclear. No obstante, un estudio probó que la isoforma PARG-102, marcada con fluorescencia, se transloca del citoplasma al núcleo; mientras que la proteína nuclear PARG-110 se relocaliza en el citoplasma bajo condiciones de daño al ADN [Haince et al. 2006]. Aún no se ha definido si el ajuste alternativo y la transportación de las PARGs están modulados de forma célula-específica o por estímulos provenientes del medio [Bonicalzi et al. 2005; Haince et al. 2006].

Se ha encontrado que la ADP-ribosilación múltiple puede ser revertida con enzimas de tipo *glicohidrolasa y fosfodiesterasa* [D'Amours et al. 1999].

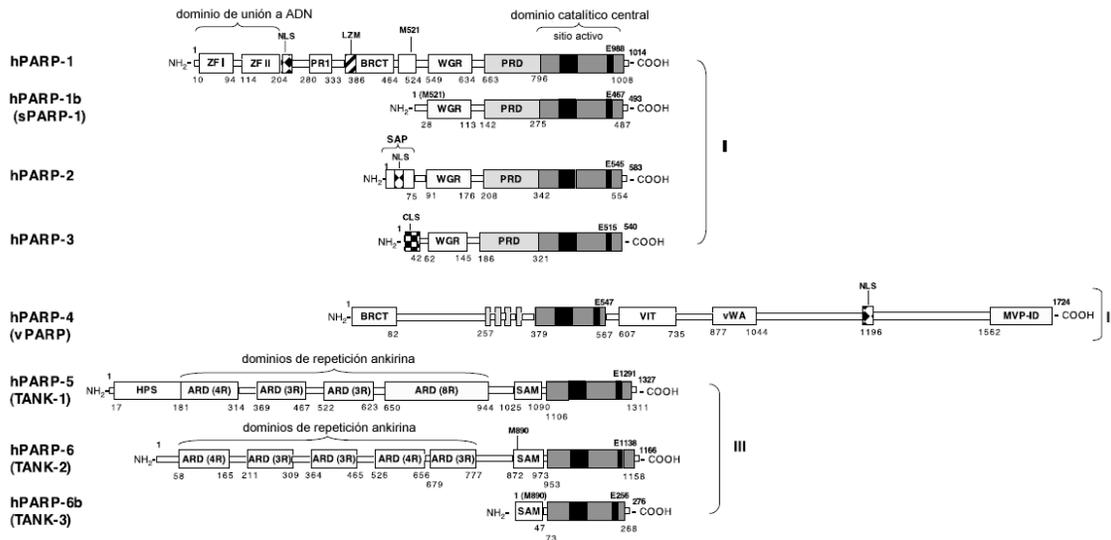


Figura 38. Estructura de los dominios de la familia de PARP humano.

El dominio PRD (*dominio regulador de PARP*) posiblemente está involucrado en la regulación de la actividad ramificadora de la enzima. El dominio WGR es nombrado tras el motivo más conservado del dominio (*W/G/R*), encontrado en varias poli(A) polimerasas y otras proteínas de función desconocida. El dominio BRCT se encuentra dentro de varias proteínas de reparación de ADN; además, permite la interacción de módulos de BRCT para formar multímeros homo- o hetero-BRCT. El motivo SAM (*motivo estéril alfa*) es un dominio muy distribuido en proteínas nucleares y de señalamiento. Los dominios de *repetición de ankirina* (ARD) median interacciones proteína-proteína en varias familias de proteínas. La proteína *bóveda inter-alfa-tripsina* (VIT) y los dominios tipo *von Willebrand tipo A* (Vwa) son dominios conservados que están en los inhibidores inter-alfa-tripsina (ITI). Aunque las funciones exactas de estos dominios permanecen desconocidas, aparentemente median interacciones proteína-proteína. Los dominios de zinc ZF-I, ZF-II y tipo-PARP-1 pueden actuar como dominios de unión a ADN y sensores del estado del ácido nucleico. Otras abreviaturas: SAP= SAF/Acino/ dominio de unión-PIAS-ADN; LNM=motivo putativo de leucina tipo zipper; MVP-ID=dominio de interacción de partícula principal de bóveda; NLS=señal de localización nuclear; CLS=señal de localización de centriolo; HPS=región histidina-prolina-serina [Adaptado de Hassa et al. 2006 p.804].

Implicaciones epigenéticas de la poli-ADP-ribosilación. Por el gran tamaño de los polímeros de ADP-ribosa y porque no se ha podido confirmar este tipo de modificación en histonas, es poco probable que tengan alguna función en el código de histonas. Sin embargo, las moléculas de poli-ADP-ribosa podrían estar asociadas a otras proteínas y así contribuir en el código de histonas.

La enzima *poli-ADP-ribosa polimerasa* tiene un dominio de unión a ADN compuesto de dos dedos de zinc, lo que le otorga la capacidad de unirse a rupturas de cadena simple o doble. Por lo tanto, teóricamente, las histonas modificadas se localizan en sitios de reparación de ADN.

Las porciones N-terminales de las histonas H3 y H4 tienen una gran afinidad por poli-ADP-ribosa, por lo que la presencia de este polímero en la histona H2B (u otras proteínas) podría contribuir a la disociación de histonas H3/H4 del ADN. Los polímeros podrían actuar también como chaperones al proteger las colas N-terminales de las histonas, mientras que sus dominios hidrofóbicos globulares centrales se vuelven a asociar y organizan al ADN en un nuevo nucleosoma [Turner 2001].

Se ha observado que la histona H1 no modificada, así como la forma poli-ADP-ribosilada, se asocia con la presencia de eucromatina [Frechette et al. 1985; Poirier et al. 1982]. Entonces, la cromatina con esta modificación es más susceptible a digestión por nucleasas [Murcia et al. 1986; Kim et al. 2004a; Perez-Lamigueiro & Alvarez-Gonzalez 2004]. Es probable que la carga negativa de la poli-ADP-ribosa previene la interacción de proteínas modificadas con otras moléculas con cargas negativas [Ferro & Olivera 1982; Zahrádka & Ebisuzaki 1982]. Este efecto podría ser importante al considerar que la mayoría de las proteínas de unión a ADN interactúan con la columna de fosfatos de este ácido nucleico, cargada negativamente, a través de residuos con carga positiva por medio de interacciones electrostáticas [Hassa et al. 2006]. Además, se ha propuesto que la acción dual de PARPs y PARGs en la cromatina resultan en una relajación reversible *in vivo*.

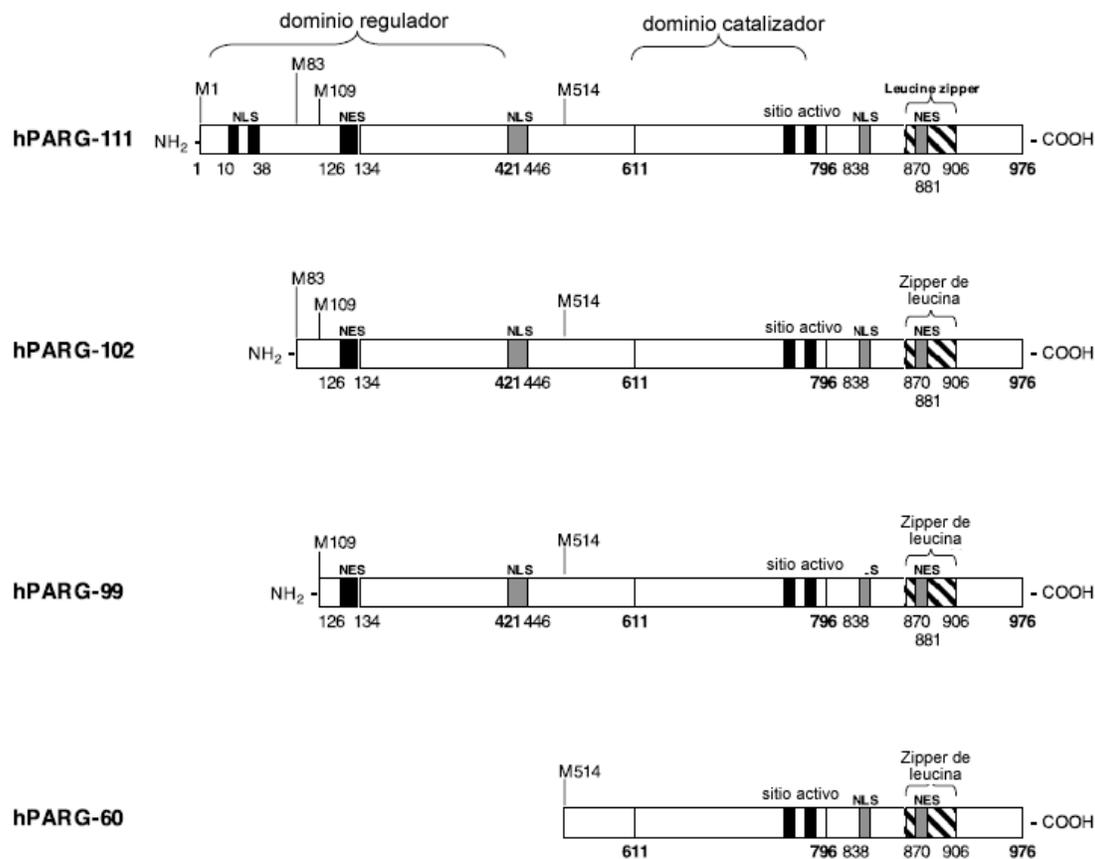


Figura 39. Estructuras de los dominios de las isoformas PARG humanas. Abreviaturas: NES=señales de exportación nuclear. Sitios activos: E728, E738, E756, E757 y T995 [Adaptado de Hassa et al. 2006 p.804].

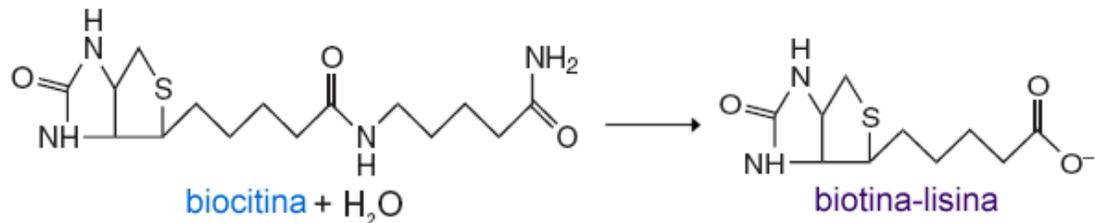


Figura 40. Reacción de biotilación [Adaptado de Brenner 2002].

2.2.7 Biotinilación

La biotina es una vitamina hidrosoluble requerida para un metabolismo y crecimiento celular normal [Wolf 2001]. Este cofactor es sintetizado por microorganismos, levaduras y plantas [Streit & Entcheva 2003], y está disponible como nutriente en carne y otros productos animales. Aunque la biotina es mejor conocida como cofactor de las carboxilasas, se ha determinado que esta molécula actúa también como modulador de la expresión genética: las histonas son proteínas susceptibles tener enlaces covalentes con biotina [Kothapalli et al. 2005JNB].

Existe evidencia de que la biotinilación de estas proteínas tiene efectos sobre la proliferación celular [Stanley et al. 2001], respuesta a un estado genotóxico [Kothapalli et al. 2005a], condensación mitótica de la cromatina [Kothapalli & Zempleni 2005], estructura de la heterocromatina y silenciamiento genético [Chew et al. 2007; Zempleni 2005].

El precursor de esta transformación, la biocitina, se genera a partir de la ruptura de carboxilasas biotina-dependientes, las cuales contienen biotina unida al grupo ϵ -amino de un residuo de lisina [Kothapalli et al. 2005a] (Fig. 40). La reacción inicia con la ruptura de biocitina (biocitina- ϵ -lisina) por la enzima *biotinidasa* [Hymes et al. 1995; Hymes & Wolf 1999], lo que induce la formación de un intermediario biotinil-tioéster (biotina-cisteína) en una zona próxima al sitio activo de la biotinidasa [Zempleni 2005]. Posteriormente, la molécula biotinil se transfiere del tioéster al grupo ϵ -amino de residuos de lisina en histonas. No obstante, la biotinidasa puede no ser la única responsable para este tipo de modificación epigenética. Existe evidencia que indica que la biotinilación de histonas incrementa en respuesta a la proliferación celular, mientras que la actividad biotinidasa es similar entre células proliferativas y quiescentes [Stanley et al. 2001]. La holocarboxilasa sintetasa es otra enzima que podría catalizar la biotinilación de histonas [Narang et al. 2004].

Los residuos de lisina [Kobza et al. 2005; Camporeale et al. 2004; Chew et al. 2006a] en los que se ha observado biotinilación en histonas humanas son K9, K13, K129 de la histona H2A [Chew et al. 2006]; K4, K9 y K18 en histona H3 [Kobza et al. 2005]; K8 y K12 en histona H4 [Camporeale et al. 2004].

El efecto de la disponibilidad de biotina celular en la biotinilación de histonas se ha estudiado en varias líneas celulares [Manthey et al. 2002; Scheerger & Zempleni 2003; Crisp et al. 2004] y parece que las concentraciones de biotina en medios de cultivo solo ha tenido un impacto moderado sobre el grado de biotinilación en histonas. En contraste, la biotinilación de carboxilasas se ha encontrado muy relacionada con la concentración de biotina en medios de cultivo [Manthey et al. 2002; Scheerger & Zempleni 2003; Crisp et al. 2004].

La biotinylación de histonas es una modificación epigenética que se ha descubierto recientemente, por lo que se requiere mayor investigación en esta área para determinar su rol en procesos celulares. Sin embargo, parece participar en:

- La preparación de la proliferación celular en linfocitos humanos [Stanley et al. 2001]. El grado de biotinylación de histonas aumenta en la fase G1 del ciclo celular y permanece aproximadamente cuatro veces más elevada durante las fases posteriores (S, G2 y M) que las células quiescentes control. Además, estudios más recientes sugieren que se biotinylan distintos residuos de H4K en cada fase del ciclo celular [Kothapalli & Zemleni 2005].
- La silenciación de la cromatina, ya que en eritrocitos de pollo se encuentra un gran número de histonas biotinyladas en zonas reprimidas transcripcionalmente [Peters et al. 2002].
- La respuesta celular a daño del ADN. Las histonas biotinyladas aumentan cuando se forman dímeros de timina por exposición de células linfoides a luz UV. Además, si hay rupturas del doble enlace de ADN en células linfoides y de coriocarcinoma por exposición a etopósidos, la biotinylación de H4K12 disminuye rápidamente [Kothapalli & Zemleni 2004]. Entonces, aparentemente cada efecto genotóxico provoca cambios específicos en la biotinylación de histonas. Aún no se sabe si la biotinylación induce la reparación de ADN o apoptosis [Kothapalli et al. 2005b].

2.2.7.1 Biotinyladasa y holocarboxiladasa

La biotinyladasa es uno de los componentes de la superfamilia enzimática nitriladasa, compuesta de 12 familias de amidadasas, N-aciltransferadasas y nitriladasas [Brenner 2002]. El sitio activo de esta enzima consiste en una región de ~62 aminoácidos altamente conservada en mamíferos y *Drosophila* [Swango & Wolf 2001].

La biotinyladasa está presente de manera ubicua en células de mamíferos y se ha determinado que el 26% de la actividad biotinyladasa se da en el núcleo [Fischle et al. 2003a; Pispas 1965]. Estudios han determinado histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 biotinyladasas en linfocitos humanos *in vivo* [Stanley et al. 2001]. También se han observado histonas biotinyladasas en células de linfoma humano [Manthey et al. 2002], carcinoma microcítico de pulmón [Scheerger & Zemleni 2003], coriocarcinoma [Crisp et al. 2004], y eritrocitos de pollo [Peters et al. 2002].

La mayor parte de la enzima *holocarboxiladasa sintetasas* (HCS) celular se encuentra en el núcleo y se asocia con la cromatina y la lámina nuclear, distribuyéndose en estructuras tipo-anillo durante la mitosis. En la biotinylación de carboxiladasas, la adición de biotina ocurre a través de un intermediario biotina-5'-AMPy se piensa que así es para la biotinylación de histonas también. Sin embargo, las

histonas no tienen un sitio de unión conservado requerido, AMKM, por lo que el mecanismo para su biotilación por estas enzimas sigue siendo un enigma [Narang et al. 2004].

La deficiencia de HCS alteró la expresión de ~800 y 400 genes en células humanas y *D. melanogaster*, respectivamente [Camporeale et al. 2005, 2006]. El impacto de la disponibilidad de biotina en la expresión de genes como el de glucocinasa, 6-fosfofructocinasa, acetil-CoA carboxilasa, propionil-CoA carboxilasa y HCS muestra que la biotina tiene efectos nucleares y que podría modular la actividad HCS [Narang et al. 2004].

Aún no se ha determinado si el epigenotipo/fenotipo está influenciado por el grado de biotilación en histonas, de carboxilasas o de ambos. Aunque el impacto biológico de esta modificación en histonas sigue siendo desconocido [Narang et al. 2004], se sabe que la deficiencia de biotina en ratas está asociada con menor contenido de ARN, ADN e histonas en células hepáticas, además de una interacción histona-ADN disminuida [Petrelli et al. 1976]. Además, parece que la biotilación afecta el grado de fosforilación, acetilación y metilación de histonas [Petrelli et al. 1978]. Estos efectos son revertidos a los pocos días de administrar dosis normales de biotina [Narang et al. 2004].

La desbiotilación de histonas es una transformación que posiblemente cambia la estructura de la cromatina en respuesta a cambios en el entorno celular [Chew et al. 2007]. Por ejemplo, en células de coriocarcinoma JAR, el residuo H4K12 se desbiotila rápidamente cuando se presenta una ruptura de la doble cadena de ADN [Kothapalli et al. 2005b]. Se desconoce el mecanismo por el cual las histonas se desbiotilan, pero estudios han sugerido que la biotinidasa podría ser el responsable de la biotilación y desbiotilación de histonas [Ballard et al. 2002]. Entonces, el microambiente de la cromatina, las modificaciones postraduccionales, la disponibilidad de sustrato [Stockert et al. 1992] y el ajuste alternativo de la biotinidasa podría determinar si esta enzima actúa agregando o removiendo el grupo biotil [Zempleni 2005].