

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΣΥΝΤΥΧΑΚΗ**

***ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ  
ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ  
ΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ***

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2000**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η εργασία αυτή αφιερώνεται στους γονείς μου, Στέλλα και Βαγγέλη, που με ώθησαν να αρχίσω αυτό το ταξίδι και με βοήθησαν με κάθε τρόπο στην πορεία του. Αφιερώνεται όμως και στο Γιώργο Θηραίο που με ενέπνευσε, με στήριξε και μου δίδαξε όλα τα πράγματα που μου δίνουν αξία ως επιστήμονα αλλά και ως άνθρωπο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Ειρήνη Τοπαλίδου για την τεχνική και ηθική υποστήριξή της. Η δικιά της φιλία όπως και των υπολοίπων παιδιών (του Μανώλη, της Νίκης, του Παντελή, της Μυρτώς, του Τάσου, της Κατερίνας κ.α.) μετέτρεπε την καθημερινότητα σε διασκέδαση. Ευχαριστώ την κ. Μαρίνα για την καθημερινή φροντίδα της αλλά και όλους όσους βοήθησαν με οποιονδήποτε τρόπο στην προσπάθεια αυτή. Τέλος ευχαριστώ τη Γεωργία Χουλιάκη για τη σημαντική βοήθεια στην ολοκλήρωση του παρακάτω κειμένου και τα μέλη της επταμελούς επιτροπής μου για το ενδιαφέρον τους. Η επιβράβευση στα μάτια όλων μου έδωσε φτερά να συνεχίσω το ταξίδι αυτό...

«Κάθε αναζήτηση αρχίζει με την τύχη του πρωτάρη και τελειώνει με τη δοκιμασία του κατακτητή».

Ο Αλχημιστής  
Paulo Coehlo

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

#### «Δομή της χρωματίνης και μεταγραφή»

|  |    |
|--|----|
| 1. Πρόλογος  | 3  |
| 2. Δομή της χρωματίνης   | 3  |
| 3. Συσχέτιση της δομής της χρωματίνης με τη μεταγραφή                                  | 5  |
| 3.1. Δομικές και λειτουργικές συνέπειες της ακετυλίωσης των ιστονών                    | 6  |
| 3.2. Συσχέτιση ακετυλίωσης και μεταγραφικής ενεργοποίησης                              | 7  |
| 4. Χαρακτηρισμός και δράση των συμπλόκων HAT της οικογένειας GCN5                      | 9  |
| 4.1. Σύμπλοκα του Gcn5 στη ζύμη  | 9  |
| 4.2. Σύμπλοκα του Gcn5 στα σπονδυλωτά  | 11 |
| 4.3. Λειτουργία των συμπλόκων HAT της οικογένειας Gcn5 στη μεταγραφή                   | 12 |
| 5. Χαρακτηρισμός και δράση των ATP-εξαρτώμενων συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης | 16 |
| 5.1. Σύμπλοκα SWI/SNF  | 17 |
| 5.2. Σύμπλοκα ISWI   | 19 |
| 5.3. Μηχανισμοί δράσης των ATP-εξαρτώμενων συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης     | 20 |
| ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ  | 23 |

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

#### «Η ενζυμική δράση του GCN5 ενδυναμώνεται με την ενσωμάτωση στα σύμπλοκά του»

|   |    |
|---|----|
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ  | 25 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ  | 26 |
| - Δημιουργία μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5 με σημαντικά εξασθενημένη <i>in vitro</i> ενεργότητα HAT                      | 26 |
| - Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn5 είναι πλήρως λειτουργικές <i>in vivo</i>  | 28 |
| - Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn5 στηρίζουν πλήρως τη δράση του ενεργοποιητή Gcn4                                       | 30 |
| - Η ικανότητα των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5 να ακετυλιώνουν τις ιστόνες ενισχύεται όταν παράγονται παρουσία του Ada2 | 31 |
| - Η παρουσία του Ada2 αυξάνει τον ρυθμό κατάλυσης HAT των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5                                  | 33 |
| - Η ενεργότητα HAT των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5 ενισχύεται περαιτέρω με τη χρήση νουκλεοσωμικών υποστρωμάτων        | 35 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ  | 36 |

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

#### «Η μεταγραφική ενεργοποίηση εξαρτάται από τη συντονισμένη δράση συμπλόκων ακετυλίωσης και αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης»

|  |    |
|--|----|
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ   | 44 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ   | 46 |
| - Κατασκευή του υποκινητή <i>gPHO5</i>   | 46 |
| - Η Gcn4-εξαρτώμενη έκφραση του <i>gPHO5</i> απαιτεί τη δράση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF         | 48 |
| - Η μεταγραφική ενεργοποίηση συνοδεύεται με αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στον υποκινητή <i>gPHO5</i> | 50 |

|   |    |
|---|----|
| - Η ακετυλίωση των ιστονών είναι αναγκαία αλλά όχι ικανή για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στον υποκινητή <i>gPHO5</i> | 52 |
| - Ανεξάρτητη στρατολόγηση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF στον υποκινητή <i>gPHO5</i> από τον ενεργοποιητή Gcn4            | 54 |
| - Η στρατολόγηση και δράση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF στον υποκινητή <i>gPHO5</i> γίνεται ανεξάρτητα της μεταγραφής   | 55 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ  | 57 |

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **«Η λειτουργία των bromodomains συντονίζει την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης»**

|   |    |
|---|----|
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ  | 63 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ  | 66 |
| - Δημιουργία μεταλλαγών στο bromodomain του Gcn5 που επηρεάζουν τη δράση του ως συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής           | 66 |
| - Οι μεταλλαγές στο bromodomain του Gcn5 επηρεάζουν τη μεταγραφή μετά την ακετυλίωση των ιστονών στον <i>gPHO5</i>        | 68 |
| - Η έλλειψη της πρωτεΐνης Sin1 καταστέλλει μεταλλαγές στο bromodomain του Gcn5 και σε συστατικά του SWI/SNF               | 70 |
| - Το bromodomain του Gcn5 συντονίζει τη δράση του συμπλόκου SWI/SNF στον υποκινητή <i>gPHO5</i>                           | 73 |
| - Το bromodomain του SWI2/SNF2 είναι επίσης απαραίτητο για την ενεργοποίηση της μεταγραφής από τον υποκινητή <i>gPHO5</i> | 74 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ  | 76 |
| Προτεινόμενο μοντέλο μεταγραφικής ενεργοποίησης στον υποκινητή <i>gPHO5</i>   | 81 |

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

### **«Υλικά και Μέθοδοι»**

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| - Στελέχη και πλασμιδιακοί φορείς | 85 |
| - Υλικά                           | 86 |
| - Μέθοδοι                         | 88 |

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6**

### **«Βιβλιογραφία»**

104

## ABSTRACT

The Gcn5 histone acetyltransferase (HAT) is part of a large multimeric complex (SAGA) that is required for transcriptional activation in yeast. This complex can acetylate *in vitro* and in a Gcn5-dependent manner both nucleosomal and core free histones. One major question is whether the HAT activity of Gcn5 is necessary and sufficient for its *in vivo* function as transcriptional coactivator. In the first part of this study, mutated Gcn5 proteins with severely attenuated *in vitro* HAT activities were generated. Despite their apparent loss in enzymatic activity, these *GCN5* derivatives complemented all the defects of a *gcn5* strain. This was due to the potentiation of their HAT activity when assembled into native complexes, as revealed by measuring the activities of the mutated proteins produced in yeast cells in the presence or absence of another SAGA component, Ada2. This potentiation was best elaborated on polynucleosomal substrates, which are the physiological substrates for the complex. Kinetic enzymatic analyses showed that the assembly of Gcn5 derivatives within their native complexes enhanced the rate of catalysis suggesting a regulatory role for other subunits of SAGA.

In the second part of the study a synthetic promoter was generated with known nucleosomal organization and dependent of the function of Gcn5. The existence of positioned nucleosomes allowed the *in vivo* studies of chromatin remodeling. It was revealed that transcription driven by this promoter required the coordinated function of both SAGA and the ATP-dependent chromatin remodeling complex SWI/SNF. Both complexes were recruited independently by the Gcn4 activator but histone acetylation by SAGA did not require the function of SWI/SNF. Yet, acetylation *per se* was not sufficient for nucleosome remodeling and transcriptional activation. Remodeling was accomplished by the function of SWI/SNF on acetylated substrates, in a manner independent of transcription. Finally, it was shown that the functional coordination of SAGA and SWI/SNF was mediated from the function of bromodomains of the Gcn5 and Swi2/Snf2.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

## 1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η άμεση κυτταρική απόκριση σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα συνήθως απαιτεί την ταχεία ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων, είτε αφορά την ενεργοποίηση ή την καταστολή τους. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής αντανακλά την αυξημένη συχνότητα πρόσβασης του ολοενζύμου της RNA πολυμεράσης II στους υποκινητές των αντίστοιχων γονιδίων. Τα στάδια αναγνώρισης αλληλουχιών στους υποκινητές και σχηματισμού του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής, με τους διάφορους παράγοντες που συμμετέχουν, έχουν περιγραφεί εκτενώς με βάση γενετικές, βιοχημικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες (Hampsey, 1998, Berk, 1999). Η στρατολόγηση του ολοενζύμου επιτυγχάνεται με την πρόσδεση των κατάλληλων ενεργοποιητών (activators) στους υποκινητές, μετά την κινητοποίησή τους από το σηματοδοτικό μονοπάτι του ερεθίσματος.

Οι ενεργοποιητές είναι μόρια που έχουν τουλάχιστον δύο αρθρωτές περιοχές: μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA και μια περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Η ενεργοποίηση γίνεται μέσω των αλληλεπιδράσεων που αυτοί κάνουν τόσο με παράγοντες της βασικής μεταγραφικής μηχανής όσο και με άλλα μόρια συν-ενεργοποιητές (co-activators) της μεταγραφής. Οι συν-ενεργοποιητές βρίσκονται συνήθως σε πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα και δρουν ποικιλοτρόπως, έχοντας τη δυνατότητα να κάνουν επαφές με τους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες αλλά και να μεταβάλλουν το περιβάλλον της χρωματίνης. Το τελευταίο επιτυγχάνεται μέσω των ενζυμικών ιδιοτήτων τους και είναι απαραίτητο με δεδομένο ότι η οργάνωση του ευκαρυωτικού DNA στη συμπαγή δομή της χρωματίνης το καθιστά μη-εύκολα προσβάσιμο στους διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες.

## 2. ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

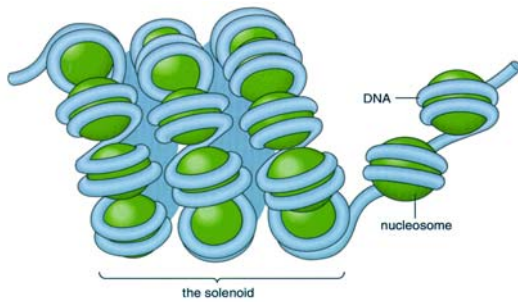
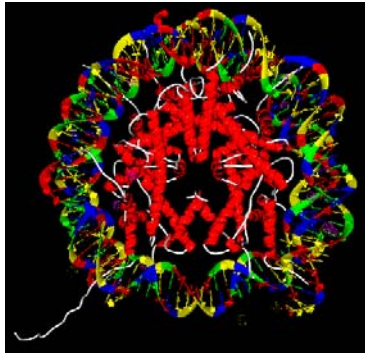
Η βασική επαναλαμβανόμενη μονάδα της χρωματίνης είναι το **νουκλεόσωμα**. Ο πυρήνας του νουκλεοσώματος (nucleosome core particle) συνίσταται από 146-bp του DNA οι οποίες τυλίγονται γύρω από ένα οκταμερές των ιστονών H2A, H2B, H3 και H4, με συμμετοχή δύο μορίων από την καθεμία (Εικ.1, αριστερά). Δομικά το οκταμερές σχηματίζεται από ένα κεντρικό τετραμερές των ιστονών H3/H4 και δύο περιφερειακά διμερή των H2A/H2B. Το DNA τυλίγεται αριστερόστροφα κάνοντας 1.65 στροφές γύρω από το οκταμερές και πραγματοποιώντας επαφές ηλεκτροστατικής κυρίως φύσης ανά 10-bp του DNA. Υπεύθυνες για αυτήν την οργάνωση του πυρήνα του νουκλεοσώματος είναι οι δομικές περιοχές του διπλώματος των ιστονών (histone-fold domains). Η ύπαρξη ενός δικτύου κατάλληλα τοποθετημένων μορίων νερού στις επιφάνειες επαφής των ιστονών μεταξύ τους αλλά και των ιστονών με το DNA, υποδηλώνει τη συμμετοχή του στη ρύθμιση αυτών των



επαφών. Το δίκτυο αυτό μπορεί να επιτρέπει τη διάσπαση του οκταμερούς σε διμερή και τετραμερή ή πιθανώς την τοπική απομάκρυνση του DNA από το οκταμερές, ώστε να επιτευχθεί η μεταγραφή, δίχως την πλήρη διάσπαση αυτού (Luger *et al.*, 1997).

Το υπόλοιπο DNA, έξω από τον πυρήνα των νουκλεοσωμάτων, που ενώνει παρακείμενα νουκλεοσώματα καλείται συνδετικό (linker) DNA. Αυτό συνεισφέρει στην ευκαμψία των ινιδίων της χρωματίνης, που σχηματίζονται με το ακανόνιστο πακετάρισμα σειρών νουκλεοσωμάτων σε σωληνοειδείς δομές με διάμετρο περίπου 30-nm (Εικ.1, δεξιά). Το συνδετικό DNA φαίνεται ότι επάγει τον σχηματισμό των ινιδίων μέσω περιέλιξης του (coiling) ή αλληλεπίδρασής του με την συνδετική ιστόνη H1 (ή τα ανάλογά της). Η υψηλής-τάξης δομή χρωματίνης (higher-order structure) που προκύπτει συντελεί στη συμπίκνωση του ολικού DNA κατά 30-40 φορές. Το μήκος του συνδετικού DNA διαφέρει μεταξύ των οργανισμών και αυτό ίσως αντανακλά διαφορές στις ιδιότητες της συμπυκνωμένης χρωματίνης και στους μηχανισμούς ρύθμισης της μεταγραφής που σχετίζονται με την αποσυμπύκνωσή της (Kornberg and Lorch, 1999).

Ο σχηματισμός των ινιδίων επάγεται όμως και από τις N-τελικές ουρές των ιστονών. Οι προεκβολές αυτών από τα νουκλεοσώματα μπορεί να επηρεάζουν τη διαμόρφωση του συνδετικού DNA ή να πραγματοποιούν επαφές με τα γειτονικά νουκλεοσώματα, φέρνοντάς τα έτσι σε κοντινότερη απόσταση. Πράγματι, από την κρυσταλλογραφική ανάλυση του πυρήνα του νουκλεοσώματος φάνηκε ότι είναι πιθανή η αλληλεπίδραση της ουράς της ιστόνης H4 ενός νουκλεοσώματος με μια περιοχή του διμερούς H2A-H2B στο διπλανό νουκλεόσωμα (Luger *et al.*, 1997). Ενδιαφέρον όμως είναι ότι οι N-τελικές ουρές των ιστονών υπόκεινται σε διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, μεθυλίωση, ουβικουιτινίωση, ριβοζυλίωση και γλυκοζυλίωση (Wollfe and Hayes, 1999). Αυτές πιθανώς να μεταβάλλουν τις αλληλεπιδράσεις μέσα ή μεταξύ των νουκλεοσωμάτων, αλλάζουν τη δομή της χρωματίνης και ρυθμίζουν τελικά την δεκτικότητα της για μεταγραφή ή άλλες βιοχημικές αντιδράσεις που αφορούν το DNA.



**Εικόνα 1.** (Αριστερά) Ο πυρήνας του νουκλεοσώματος μετά τη λύση της δομής του σε ανάλυση 2.8 Å (Luger *et al.*, 1997). (Δεξιά) Η σωληνοειδής δομή των ινιδίων της χρωματίνης.

### 3. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Όπως κανείς αντιλαμβάνεται το νουκλεόσωμα δεν είναι μια στατική κατασκευή αλλά μια δυναμική δομή που αποτελεί στόχο πολλών ενζυμικών δραστηριοτήτων. Οι δραστηριότητες αυτές προκαλούν τοπικές αλλαγές στη δομή των νουκλεοσωμάτων που μπορεί να είναι θετικές για τη μεταγραφή καθώς βοηθούν στο να ξεπεραστεί ο κατασταλτικός ρόλος της χρωματίνης. Οι ίδιες όμως δραστηριότητες μπορεί να είναι και αρνητικές για τη μεταγραφή δημιουργώντας ή διατηρώντας την κατασταλτική δομή της χρωματίνης. Από τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των N-τελικών ουρών των ιστονών η πρώτη που συνδέθηκε με τη μεταγραφή των γονιδίων ήταν η ακετυλίωση (Allfrey, 1964). Συγκεκριμένα, η ακετυλίωση ειδικών θέσεων στις ουρές των ιστονών είχε συνδυαστεί με μεταγραφική ενεργοποίηση *in vivo*, ενώ αντίθετα η απακετυλίωσή τους με τον σχηματισμό ετεροχρωματίνης. Ο προσδιορισμός των ενζύμων που καταλύουν αυτές τις τροποποιήσεις επιβεβαίωσε την παραπάνω συσχέτιση καθώς αρκετά από αυτά είχαν αρχικά χαρακτηριστεί ως συν-ενεργοποιητές ή συν-καταστολείς της μεταγραφής.

Προς ενίσχυση της παραπάνω συσχέτισης, παράγοντες που είχαν απομονωθεί ως θετικοί ρυθμιστές της έκφρασης κάποιων γονιδίων τελικά δείχθηκε ότι είχαν την ικανότητα να υδρολύουν ATP και να χρησιμοποιούν την εκλυόμενη ενέργεια για να προκαλέσουν δομικές αλλαγές στα νουκλεοσώματα *in vitro*. Έτσι διακρίνονται δύο κατηγορίες ενεργοτήτων που μεταβάλλουν τη δομή της χρωματίνης, με βάση τις ενζυμικές ιδιότητες των καταλυτικών τους υπομονάδων: τα σύμπλοκα μεταμεταφραστικής τροποποίησης των N-τελικών ουρών των ιστονών και τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που εξαρτώνται από την υδρόλυση του ATP (Kornberg and Lorch, 1999). Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που ακολουθεί περιορίζεται στον χαρακτηρισμό και δράση των συμπλόκων ακετυλίωσης και ATP-εξαρτώμενης αναδιαμόρφωσης των νουκλεοσωμάτων, χωρίς να αναφέρονται τα εξίσου σημαντικά σύμπλοκα απακετυλασών ή άλλων ενζυμικών δραστηριοτήτων που έχουν στόχο τη χρωματίνη.

### **3.1. Δομικές και λειτουργικές συνέπειες της ακετυλίωσης των ιστονών**

Η ακετυλίωση των N-τελικών ουρών των ιστονών αφορά τη μεταφορά της ακετυλομάδας από το ακετυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA) στην  $\epsilon$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> ομάδα συγκεκριμένων καταλοίπων λυσίνης. Καταλύεται από τα ένζυμα **ακετυλο-τρανσφεράσες των ιστονών** (Histone acetyltransferases, **HAT**) που διακρίνονται σε δύο τύπους. Οι HAT τύπου-B καταλύουν την ακετυλίωση των ελεύθερων ιστονών στο κυταρρόπλασμα, η οποία είναι απαραίτητη για την μετέπειτα συγκρότησή τους σε νουκλεοσώματα στον πυρήνα. Οι HAT τύπου-A ακετυλιώνουν τις ουρές των ιστονών πάνω στην οργανωμένη δομή της χρωματίνης και συνδέονται με τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων (Grunstein, 1997).

Ο μηχανισμός με τον οποίο η ακετυλίωση των ιστονών ενεργοποιεί τη μεταγραφή δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, το πιθανότερο όμως είναι ότι επηρεάζει μια σειρά γεγονότων που σε συνδυασμό οδηγούν στην αυξημένη πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων στη χρωματίνη. Έτσι έχει προταθεί ότι η μεταφορά της αρνητικά φορτισμένης ακετυλομάδας στην ουρά των ιστονών μειώνει το θετικό φορτίο τους και αυτό προκαλεί μια γενική χαλάρωση στη δομή του νουκλεοσώματος λόγω ασθενέστερης αλληλεπίδρασης του DNA με τις ιστόνες (Hong *et al.*, 1993). Ωστόσο έχειδειχθεί ότι η ακετυλίωση των ουρών επιφέρει, τουλάχιστον *in vitro*, πολύ μικρές δομικές αλλαγές στη διαμόρφωση του πυρήνα του νουκλεοσώματος (Bauer *et al.*, 1994). Πιο σημαντικές συνέπειες της ακετυλίωσης έχουν παρατηρηθεί στο επίπεδο των ινιδίων της χρωματίνης. Συγκεκριμένα, η ακετυλίωση των ιστονών

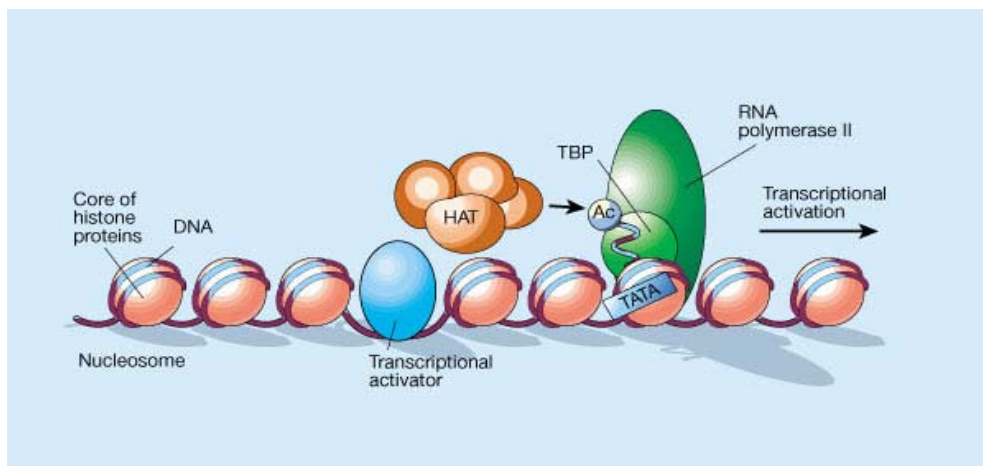
σε ανασυγκροτημένες σειρές νουκλεοσωμάτων *in vitro* δρα παρεμποδιστικά στην ικανότητα αυτών των σειρών να αναδιπλώνονται στις υψηλής-τάξης δομές (Garcia-Ramirez *et al.*, 1995).

Λόγω των παραπάνω αλλαγών στη δομή της χρωματίνης η ακετυλίωση μπορεί να διευκολύνει τη πρόσβαση των διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, μέσω έκθεσης στοιχείων αναγνώρισης στο DNA που πριν δεν ήταν προσβάσιμα σε αυτούς (Lee *et al.*, 1993, Vettese-Dadey *et al.*, 1996). Εναλλακτικά η ακετυλίωση μπορεί να εξουδετερώνει την παρεμποδιστική δράση άλλων συμπλόκων, καθώς σε αρκετές περιπτώσεις φαίνεται ότι η ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων γίνεται μέσω του ανταγωνισμού συμπλόκων απακετυλασών και ακετυλο-τρανσφερασών της χρωματίνης (Pazin and Kadonaga, 1997). Επίσης μπορεί να σηματοδοτεί αλληλεπιδράσεις με άλλα σύμπλοκα ή να επάγει τη δράση αυτών. Πράγματι όλο και πληθαίνουν οι αναφορές για τη συνδυασμένη δράση της ακετυλίωσης των ιστονών με την ATP-εξαρτώμενη αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (Kingston and Narlikar, 1999). Τέλος η αύξηση της ικανότητας αναγνώρισης της ουράς της ιστόνης H3 ως υπόστρωμα για ακετυλίωση μετά από φωσφορυλίωση ή μεθυλίωσή της, οδήγησε στην υπόθεση ότι ο διαφορετικός συνδυασμός των τροποποιήσεων των N-τελικών ουρών δίνει τη δυνατότητα στο σχετικά μικρό σύνολο αυτών να ρυθμίζει ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διαδικασιών. Αυτό γίνεται μέσω ενός “κώδικα των ιστονών” που καθορίζεται από τον συνδυασμό αυτών των σημάτων και μπορεί να διαβαστεί από τις διάφορες πρωτεΐνες ή από ειδικές λειτουργικές περιοχές αυτών, σηματοδοτώντας τη δράση τους (Strahl and Allis, 2000).

### 3.2. Συσχέτιση ακετυλίωσης και μεταγραφικής ενεργοποίησης

Η άμεση συσχέτιση της ακετυλίωσης των ιστονών με τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων δείχθηκε πρώτη φορά με τον καθαρισμό και προσδιορισμό της αμινοξικής αλληλουχίας τμήματος ενός πολυπεπτιδίου με ενεργότητα HAT τύπου-A από τη *Tetrahymena thermophila* (Brownell *et al.*, 1996). Η αποκάλυψη ότι αυτό ήταν ομόλογο με την πρωτεΐνη **Gen5** του *Saccharomyces cerevisiae* που είχε αρχικά χαρακτηριστεί, ως συν-ενεργοποιητής της μεταγραφής συνέδεε τα δύο γεγονότα. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Gen5 είχε απομονωθεί μέσω γενετικών επιλογών στη ζύμη ως παράγοντας που απαιτείται για την πλήρη δράση των όξινων ενεργοποιητών Gen4 και VP16 (Georgakopoulos and Thireos, 1992, Marcus *et al.*, 1994). Έλεγχος της ενζυμικής ενεργότητας του Gen5 έδειξε ότι πράγματι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη έχει την ικανότητα ακετυλίωσης των ελεύθερων ιστονών, κυρίως της H3 και λιγότερο της H4 (Kuo *et al.*, 1996). Στη

συνέχεια δείχθηκε ότι και στα θηλαστικά πολλοί παράγοντες που είχαν χαρακτηριστεί ως συν-ενεργοποιητές της μεταγραφής (PCAF, p300/CBP, SRC-1, ACTR) είχαν την ικανότητα να ακετυλιώνουν τις ιστόνες *in vitro*, με διαφορετική μάλιστα εξειδίκευση υποστρώματος ο καθένας (Sterner and Berger, 2000). Η διαπίστωση ότι η ενεργότητα HAT όλων αυτών των παραγόντων είναι απαραίτητη για την *in vivo* δράση των συμπλόκων που ανήκουν, οδήγησε στην υπόθεση ότι δρουν ως συν-ενεργοποιητές της μεταγραφής λόγω της ικανότητάς τους να τροποποιούν τις ουρές των ιστονών και να προκαλούν αλλαγές στη δομή της χρωματίνης (Εικ.2).



**Εικόνα 2. Μια γενική άποψη της μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων.** Η ακετυλίωση των N-τελικών ουρών των ιστονών από ένα σύμπλοκο HAT οδηγεί σε τοπικές μεταβολές των επαφών του DNA με τα νουκλεοσώματα που επιτρέπουν τη δέσμευση του TBP στο στοιχείο TATA και την έναρξη της μεταγραφής. Η στρατολόγηση αυτών των παραγόντων γίνεται από τον μεταγραφικό ενεργοποιητή του γονιδίου.

Ο σημαντικός ρόλος της ακετυλίωσης των ιστονών στη μεταγραφική ενεργοποίηση φαίνεται και από το γεγονός ότι η βασική υπομονάδα του συμπλόκου TFIID (TAF<sub>II</sub>250) έχει την ικανότητα να ακετυλιώνει *in vitro* τις ιστόνες H3 και H4 (Mizzen *et al.*, 1996). Επίσης τόσο στη ζύμη όσο και σε άλλους οργανισμούς προσδιορίζονται όλο και περισσότερα σύμπλοκα πρωτεϊνών με ενεργότητα HAT *in vitro*, που διαφέρουν τόσο στην καταλυτική υπομονάδα τους όσο και στην εξειδίκευση των υποστρωμάτων τους. Πρόσφατο παράδειγμα είναι η πρωτεΐνη Nut1 του συμπλόκου διαμεσολάβησης (mediator) της μεταγραφής (Lorch *et al.*, 2000). Εξίσου σημαντικό ρόλο όμως πρέπει να παίζει η ακετυλίωση των ιστονών και κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης της μεταγραφής, καθώς έχει ενεργότητα HAT και η

υπομονάδα Elp3 του συμπλόκου επιμήκυνσης (elongator complex) του ολοενζύμου της RNA πολυμεράσης II στη ζύμη (Wittschieben *et al.*, 1999).

Η ακετυλίωση των ιστονών από τα σύμπλοκα HAT φαίνεται να είναι ένας μηχανισμός με τον οποίο ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων, αλλά ίσως να μην είναι και ο μοναδικός. Η ακετυλίωση άλλων πυρηνικών πρωτεϊνών, που αποτελούν επίσης στόχους των ενζύμων των συμπλόκων αυτών, ίσως ρυθμίζει με ανάλογο τρόπο τη μεταγραφή. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί ότι το Gcn5 μπορεί να ακετυλιώνει *in vitro* την πρωτεΐνη **Sin1** της ζύμης, η οποία έχει ομοιότητα με την πρωτεΐνη HMG-1 των θηλαστικών (Pollard and Peterson, 1997). Ανάλογα η PCAF ακετυλιώνει την πρωτεΐνη **HMG-17** στα θηλαστικά (Herrera *et al.*, 1999). Υποστρώματα ακετυλίωσης των PCAF και p300 αποτελούν όμως και οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες **TFIIIE** και **TFIIF** (Imhof *et al.*, 1997). Οι συνέπειες της ακετυλίωσης αυτών των πρωτεϊνών, όπως και της αυτο-ακετυλίωσης που υφίστανται οι PCAF και p300 δεν είναι γνωστές (Herrera *et al.*, 1997). Έχει δειχθεί όμως ότι η ακετυλίωση των παραγόντων **p53**, **GATA-1**, **MyoD**, **E2F1** και **EKLF** από τις παραπάνω ακετυλο-τρανσφεράσες αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης τους στο DNA ρυθμίζοντας τη μεταγραφική τους δράση (Kouzarides, 2000). Αντίθετα, η ακετυλίωση του **HMG1(Y)** από τις ακετυλοτρανσφεράσες PCAF και CBP διασπά την πρόσδεσή του με το DNA, επιδρώντας έτσι με διαφορετικό τρόπο στην μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης της ιντερφερόνης β στα κύτταρα των θηλαστικών (Munshi *et al.*, 1998).

## 4. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ HAT ΤΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΣ GCN5

### 4.1. Σύμπλοκα του Gcn5 στη ζύμη

Η πρωτεΐνη Gcn5 της ζύμης αποτέλεσε, όπως προαναφέρθηκε, τον πρώτο συνδετικό κρίκο της ακετυλίωσης της χρωματίνης με την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Παρότι όμως η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Gcn5 έχει την ικανότητα να ακετυλιώνει αποτελεσματικά τις ελεύθερες ιστόνες (κυρίως την H3), δεν επιδειχνει αυτήν την ιδιότητα σε νουκλεοσωμικές ιστόνες *in vitro*. Για την ακετυλίωση αυτών των πιο φυσιολογικών υποστρωμάτων απαιτείται η συγκρότηση του Gcn5 σε σύμπλοκο με άλλες πρωτεΐνες (Grant *et al.*, 1997).

Γενετικές μελέτες αρχικά και βιοχημικές στη συνέχεια έδειξαν ότι το Gcn5 βρίσκεται σε ένα μεγαλομοριακό σύμπλοκο (μεγέθους 1.8 KDa) με τις πρωτεΐνες Ada2, Ada3, Ada1 και Ada5/Spt20 (Pina *et al.*, 1993, Marcus *et al.*, 1994, 1996, Horiuchi *et al.*, 1997, Grant *et al.*, 1997). Το σύμπλοκο αυτό είχε την ικανότητα να ακετυλιώνει κυρίως τις ιστόνες H3 και H2B σε νουκλεοσωμικά υποστρώματα *in vitro*. Ονομάστηκε **SAGA** (Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase) επειδή μέλη του είναι και οι πρωτεΐνες Spt3, Spt7 και Spt8, οι οποίες είχαν συσχετιστεί λειτουργικά και φυσικά με την πρωτεΐνη TBP που προσδέεται στο στοιχείο TATA των υποκινητών (Eisenmann *et al.*, 1994). Ωστόσο το ίδιο το TBP δεν αποτελεί συστατικό του συμπλόκου SAGA (Grant *et al.*, 1997). Ο προσδιορισμός άλλων μελών του SAGA (Πίνακας 1) αποκάλυψε την ύπαρξη σε αυτό των πρωτεϊνών TAF<sub>II</sub> 90, 68/61, 60,

25/23 και 20/17 καθώς και της Tra1, η οποία ανήκει στην οικογένεια των ATM/PI-κινασών (Grant *et al.*, 1998a, 1998b). Οι πρωτεΐνες TAF<sub>II</sub>s (TBP-associated factors) είχαν χαρακτηριστεί αρχικά ως συστατικά του συμπλόκου TFIID, απαραίτητες για την έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II (Burley and Roeder, 1996). Έτσι το σύμπλοκο SAGA φαίνεται να συνδέει την ακετυλίωση των ιστονών που πραγματοποιείται από το Gcn5, με τη μεταγραφική ενεργοποίηση που επιτυγχάνεται μέσω των αλληλεπιδράσεων των συστατικών του Spts και TAF<sub>II</sub>s με τους γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες.

Βιοχημικά απομονώθηκε παράλληλα με το SAGA και ένα άλλο σύμπλοκο HAT με καταλυτική υπομονάδα το Gcn5, το σύμπλοκο ADA (Πίνακας 1). Το σύμπλοκο ADA είναι μικρότερου μεγέθους (800 KDa) περιέχει επίσης τις πρωτεΐνες Ada2 και Ada3 αλλά καμία από τις Spts (Grant *et al.*, 1997). Δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο αν αποτελεί ένα υποσύνολο του SAGA ή αν δρα ως ξεχωριστό σύμπλοκο HAT στη ζύμη. Ο χαρακτηρισμός ενός συστατικού του συμπλόκου ADA που δεν αποτελεί συστατικό του SAGA συνηγορεί υπέρ της δεύτερης πιθανότητας. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε Ahc1 (ADA HAT complex component 1) και έλλειψη του αντίστοιχου γονιδίου οδηγεί σε απώλεια μόνο του συμπλόκου ADA από τα κύτταρα (Eberharter *et al.*, 1999). Ωστόσο η έλλειψη αυτού του γονιδίου δε συνοδεύεται και από τους χαρακτηριστικούς Ada<sup>-</sup> φαινοτύπους, που επιδεικνύουν τα στελέχη *gcn5*, *ada2* και *ada3* και περιλαμβάνουν χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων ή αδυναμία τους να αναπτυχθούν σε συνθήκες πείνας για αμινοξέα. Επιπλέον δεν έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα γονίδια των οποίων η έκφραση να εξαρτάται ειδικά από το σύμπλοκο ADA και όχι από το SAGA.

Αν και ο ακριβής ρόλος του κάθε συστατικού στην *in vivo* δράση του συμπλόκου SAGA δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί, γενετικές και βιοχημικές μελέτες έχουν προσδιορίσει τη σημασία των ιδιαίτερων υπομονάδων στην ικανότητά του να ακετυλιώνει τη χρωματίνη και να δρα ως συν-ενεργοποιητής της μεταγραφής. Έτσι λειτουργική ανάλυση του συμπλόκου έδειξε ότι:

- Για την *in vivo* δράση του απαιτείται η ενεργότητα HAT, που οφείλεται αποκλειστικά στο Gcn5 (Kuo *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1998).
- Η πρωτεΐνη Spt8, σε αντίθεση με την Spt3, απαιτείται για την άμεση αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το TBP (Sterner *et al.*, 1999).
- Απαραίτητες για την ακεραιότητα του συμπλόκου είναι οι πρωτεΐνες Spt7 και Ada5/Spt20 (Sterner *et al.*, 1999).
- Το TAF<sub>II</sub>68 απαιτείται για την ικανότητα του SAGA να ακετυλιώνει *in vitro* νουκλεοσωμικά υποστρώματα (Grant *et al.*, 1998a).

- Το TAF<sub>II</sub>61 και το Tra1 συμμετέχουν στη στρατολόγηση του SAGA στους υποκινητές των γονιδίων (Natarajan *et al.*, 1998, Utley *et al.*, 1998).

Έτσι η αναγκαιότητα των επιμέρους συστατικών οφείλεται, πέρα από τη συμμετοχή τους στη δομική ακεραιότητα του συμπλόκου, στις επαφές που αυτό κάνει με τους κατάλληλους ενεργοποιητές ή γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Σημαντικό ρόλο όμως έχουν οι διάφορες υπομονάδες για την αναγνώριση και εξειδίκευση των νουκλεοσωμικών υποστρωμάτων αλλά και την ενδυνάμωση της ενεργότητας HAT του Gcn5 (Syntichaki and Thireos, 1998, Grant *et al.*, 1999).

#### 4.2. Σύμπλοκα του Gcn5 στα σπονδυλωτά

Στον άνθρωπο έχουν προσδιοριστεί τρεις πρωτεΐνες που έχουν ομολογία στην αλληλουχία με το Gcn5 της ζύμης ( $\gamma$ Gcn5) και ανάλογη ενεργότητα HAT *in vitro*. Αυτά είναι το PCAF (p300/CBP-associated factor) και οι δύο μορφές του hGCN5 (hGCN5-S και hGCN5-L), που θεωρείται ότι είναι προϊόντα εναλλακτικής συρραφής (alternative splicing) του ίδιου γονιδίου (Yang *et al.*, 1996, Candau *et al.*, 1996, Smith *et al.*, 1998). Η μεγαλύτερη μορφή (hGCN5-L) και το PCAF χαρακτηρίζονται από μια εκτεταμένη N-τελική περιοχή, η οποία είναι σημαντική για την αναγνώριση των νουκλεοσωμικών υποστρωμάτων στην ενεργότητα HAT των ενζύμων (Xu *et al.*, 1998). Ομόλογη N-τελική περιοχή έχουν και οι πρωτεΐνες GCN5 του ποντικού και της δροσόφιλας ενώ δεν υπάρχει στις μορφές hGCN5-S και  $\gamma$ Gcn5 (Smith *et al.*, 1998). Από βιοχημικές μελέτες έχει προσδιοριστεί ότι όλες αυτές οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε μεγαλομοριακά σύμπλοκα, στα οποία έχουν χαρακτηριστεί μέλη ομόλογα με τα υπόλοιπα συστατικά του SAGA (Πίνακας 1).

Το σύμπλοκο PCAF περιέχει, σε αναλογία με το SAGA, τις ομόλογες πρωτεΐνες hADA2, hADA3 και hSPT3, μια παρόμοια ομάδα από TAF<sub>II</sub>s (hTAF<sub>II</sub>31,-30, -20/15, PAF65 $\alpha$  και PAF65 $\beta$ ) και την πρωτεΐνη TRRAP που είναι η ομόλογη της  $\gamma$ Tra1 (Ogryzko *et al.*, 1998, Vassilev *et al.*, 1998). Η ενσωμάτωση του ενζύμου PCAF στο φυσικό του σύμπλοκο αυξάνει την ενεργότητα και την εξειδίκευση του (Ogryzko *et al.*, 1998), όπως έχει αναφερθεί και για το Gcn5 μέσα στο SAGA. Ένα δεύτερο σύμπλοκο που απομονώθηκε από ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, το TF<sub>TC</sub> (TBP-free TAF<sub>II</sub>-containing complex), έχει ως καταλυτική υπομονάδα το hGCN5-L και περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες hADA3, hSPT3 και TRRAP. Δεν περιέχει την hADA2 και διαφέρει από το σύμπλοκο PCAF και ως προς τη σύσταση των TAF<sub>II</sub>s (Brand *et al.*, 1999). Το σύμπλοκο αυτό θεωρείται ομόλογο του STAGA (Spt3-TAF<sub>II</sub>31-Gcn5L acetylase complex) που είχε χαρακτηριστεί βιοχημικά από άλλους (Martinez *et al.*, 1998).



**Πίνακας 1. Γνωστές υπομονάδες των συμπλόκων HAT της οικογένειας Gen5.**

| Yeast SAGA                | Yeast ADA | Human PCAF                | Human TFII250             |
|---------------------------|-----------|---------------------------|---------------------------|
| Gen5                      | Gen5      | PCAF                      | hGCN5-L                   |
| Ada2                      | Ada2      | hADA2                     |                           |
| Ada3                      | Ada3      | hADA3                     | hADA3                     |
| Ada1                      |           |                           |                           |
| Ada5/Spt20                |           |                           |                           |
| Spt3                      |           | hSPT3                     | hSPT3                     |
| Spt7                      |           |                           |                           |
| Spt8                      |           |                           |                           |
| TAF <sub>II</sub> 90      |           | PAF65β                    |                           |
| PAF65β                    |           |                           |                           |
| TAF <sub>II</sub> 68 (61) |           | TAF <sub>II</sub> 20/15   | TAF <sub>II</sub> 20/15   |
| TAF <sub>II</sub> 60      |           | PAF65α                    | TAF <sub>II</sub> 80      |
| TAF <sub>II</sub> 25 (23) |           | TAF <sub>II</sub> 30      | TAF <sub>II</sub> 30      |
| TAF <sub>II</sub> 20 (17) |           | TAF <sub>II</sub> 31 (32) | TAF <sub>II</sub> 31 (32) |
|                           |           |                           | TAF <sub>II</sub> 150     |
|                           |           |                           | TAF <sub>II</sub> 135     |
| Tra1                      |           | TRRAP                     | TRRAP                     |
|                           | Ahc1      |                           |                           |

### **4.3. Λειτουργία των συμπλόκων HAT της οικογένειας Gen5 στη μεταγραφή**

Παρά την ποικιλότητα στη σύσταση, όλα τα παραπάνω σύμπλοκα HAT δε διαφέρουν στην ενζυματική τους ενεργότητα, τουλάχιστον *in vitro*. Όλα ακετυλιώνουν τις N-τελικές ουρές κυρίως της ιστόνης H3 σε ελεύθερα ή νουκλεοσωμικά υποστρώματα. Η ενεργότητά τους αυτή είναι απαραίτητη για τη δράση των μεταγραφικών παραγόντων με τους οποίους αλληλεπιδρούν (Sternier and Berger, 2000). Επίσης η ύπαρξη ομόλογων υπομονάδων και η επιρροή τους στην ενεργότητα των ενζύμων HAT υποδηλώνει ένα ανάλογο ρόλο των συμπλόκων αυτών στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων. Ωστόσο, η διαφορετική απαίτηση για αυτά τα σύμπλοκα σε ένα οργανισμό, ίσως καθορίζεται από την ειδική δράση των επιμέρους συστατικών των συμπλόκων όσον αφορά την *in vivo* λειτουργία τους ή τις επαφές που αυτά κάνουν με άλλους παράγοντες. Βέβαια, η παρατηρούμενη ποικιλότητα μπορεί να εξηγηθεί και από τη διαφορετική διαθεσιμότητα κάποιων συστατικών στα κύτταρα, καθώς έχει παρατηρηθεί διαφορετική χρονική έκφραση των γονιδίων *PCAF* και *GCN5* στους διάφορους ιστούς του ποντικίου (Xu *et al.*, 1998).

Επίσης λόγω αυτού μπορούν να εξηγηθούν, μερικώς τουλάχιστον, οι διαφορετικοί αλλά αλληλοεπικαλυπτόμενοι ρόλοι των αντίστοιχων πρωτεϊνών κατά τη διαδικασία εμβρυογένεσης του ποντικού. Συγκεκριμένα, έμβρυα ελλειμματικά για το γονίδιο *Gcn5* πέθαιναν μεταξύ του διαστήματος των 9.5-11.5 ημερών κυοφορίας ενώ η έλλειψη του *PCAF* δεν είχε κάποιο ξεχωριστό φαινότυπο στην εμβρυογένεση, καθώς η έκφρασή του εντοπίστηκε χρονικά μετά την 12η ημέρα κυοφορίας, (Yamauchi *et al.*, 2000, Xu *et al.*, 2000).

Η **στρατολόγηση** των συμπλόκων HAT στους υποκινητές των γονιδίων φαίνεται ότι γίνεται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους κατάλληλους μεταγραφικούς ενεργοποιητές (Kuo *et al.*, 1998, Utley *et al.*, 1998). Έτσι, σε *in vitro* πειράματα έχει δειχθεί άμεση αλληλεπίδραση του SAGA με τις όξινες περιοχές των ενεργοποιητών Gcn4 και VP16 (Grant *et al.*, 1998a, Utley *et al.*, 1998). Μάλιστα λόγω της άμεσης επαφής που είχε αναφερθεί της πρωτεΐνης Ada2 με τις περιοχές αυτές (Silverman *et al.*, 1994, Barlev *et al.*, 1995), είχε θεωρηθεί ότι αυτή είναι υπεύθυνη για τη στρατολόγηση του SAGA στους υποκινητές. Ωστόσο η επιφάνεια επαφής του Ada2 με τους παραπάνω ενεργοποιητές μάλλον χάνεται μετά τη συγκρότηση του σε σύμπλοκο με άλλες πρωτεΐνες, καθώς ούτε το τριμερές Gcn5/Ada2/Ada3 ούτε το σύμπλοκο ADA αλληλεπιδρά με αυτούς (Utley *et al.*, 1998). Έτσι, έχει προταθεί ως πιθανή επιφάνεια επαφής του SAGA με τους όξινους ενεργοποιητές η πρωτεΐνη Tra1, η οποία αποτελεί τη μόνη κοινή υπομονάδα όλων των γνωστών συμπλόκων HAT που αλληλεπιδρούν με αυτούς. Συγκεκριμένα η Tra1 αποτελεί συστατικό και ενός άλλου συμπλόκου HAT (NuA4) που έχει ως καταλυτική υπομονάδα την πρωτεΐνη Esa1 και ακετυλιώνει την ιστόνη H4 σε νουκλεοσωμικά υποστρώματα (Grant *et al.*, 1997, Allard *et al.*, 1999). Το σύμπλοκο αυτό μπορεί να αλληλεπιδρά *in vitro* με τους όξινους ενεργοποιητές Gcn4 και VP16 και να ενεργοποιεί τη μεταγραφή κατά ανάλογο τρόπο με το SAGA (Utley *et al.*, 1998, Ikeda *et al.*, 1999). Ανάλογα η ομόλογη της Tra1 στα θηλαστικά, η TRRAP, πρόσφατα δείχθηκε να αλληλεπιδρά *in vivo* με την περιοχή ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα c-Myc ως συστατικό του συμπλόκου του hGcn5 (McMahon *et al.*, 2000).

Η κοινή παρουσία των πρωτεϊνών Spts και TAF<sub>II</sub>s στο SAGA και στα σύμπλοκα θηλαστικών αντανακλά ίσως τον κοινό ρόλο τους στις επαφές των συμπλόκων με το TBP και τη βασική μεταγραφική μηχανή. Βέβαια ο ακριβής ρόλος των TAF<sub>II</sub>s είναι δύσκολο να προσδιοριστεί λόγω της συμμετοχής τους επίσης στο σύμπλοκο TFIID όπως και της αναγκαιότητάς τους για τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Έτσι ο έλεγχος της δράσης τους γίνεται με την ανενεργοποίησή τους στα

κύτταρα, κάτω από ειδικές συνθήκες, η οποία όμως συχνά προκαλεί ένα ευρύ φάσμα επιπτώσεων (Arone *et al.*, 1998, Michel *et al.*, 1998, Moqtaderi *et al.*, 1998 and Natarajan *et al.*, 1998). Ανάλυση ολόκληρου του γενώματος χρησιμοποιώντας μικροδιατάξεις DNA (DNA chip microarrays) σε στελέχη με θερμοευαίσθητες μεταλλαγές στα διάφορα TAF<sub>II</sub>s αποκάλυψε τη διαφορετική απαίτηση αυτών στη μεταγραφή των περισσότερων γονιδίων, αλλά και την ύπαρξη ανεξάρτητα επικαλυπτόμενων (redundant) ρόλων για τα σύμπλοκα SAGA και TFIID. Συγκεκριμένα, η έκφραση του 70% των γονιδίων απαιτούν ένα ή περισσότερα από τα κοινά TAF<sub>II</sub>s των δύο συμπλόκων (TAF<sub>II</sub>90, -61/68, -60 και -17). Τη μεγαλύτερη επίδραση στη μεταγραφή (67% των γονιδίων) έχει η ανενεργοποίηση του TAF<sub>II</sub>17 ενώ η επίδραση των υπολοίπων κοινών TAF<sub>II</sub>s ποικίλλει από 8-38% του γενώματος. Μεταλλαγές στις ειδικές για το SAGA υπομονάδες (Spt3, Spt20 και Gcn5) επηρεάζουν την έκφραση περίπου 12% των γονιδίων ενώ αντίστοιχα μεταλλαγές στις ειδικές για το TFIID υπομονάδες (TAF<sub>II</sub>145/130 και TAF<sub>II</sub>150) περίπου το 30% (Lee *et al.*, 2000). Βέβαια οι παραπάνω μετρήσεις γίνονται σε μία συνθήκη θρέψης των κυττάρων όπου πιθανά να μην υπάρχει η αναγκαιότητα δράσης του SAGA σε συγκεκριμένους υποκινητές και επομένως να υποεκτιμούν τη χρήση του.

Πιθανοί ρόλοι που έχουν προταθεί για τα TAF<sub>II</sub>s είναι ότι συνεισφέρουν στην αναγνώριση στοιχείων του ελάχιστου υποκινητή (στοιχείο TATA και σημείο έναρξης) από το ολοένζυμο της πολυμεράσης ή αποτελούν άμεσο στόχο των ενεργοποιητών. Άλλος πιθανός ρόλος είναι στη σταθεροποίηση των συμπλόκων SAGA και TFIID μέσω των αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες όπως το TFIIB, ή με το DNA (Green, 2000). Η τελευταία υπόθεση ενισχύθηκε και από την ύπαρξη τριών κοινών πρωτεϊνών TAF<sub>II</sub>s στα σύμπλοκα αυτά με τη χαρακτηριστική δομή του διπλώματος των ιστονών (histone fold). Συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες των TAF<sub>II</sub>17, TAF<sub>II</sub>60 και TAF<sub>II</sub>68 στη ζύμη έχουν δομική ομολογία με τις περιοχές του διπλώματος των ιστονών H3, H4 και H2B αντίστοιχα (Burley and Roeder, 1996). Έτσι προτάθηκε ότι τα TAF<sub>II</sub>s σχηματίζουν δομές όμοιες με τετραμερή ή οκταμερή των ιστονών και υποκαθιστούν τις επαφές του DNA με αυτά.

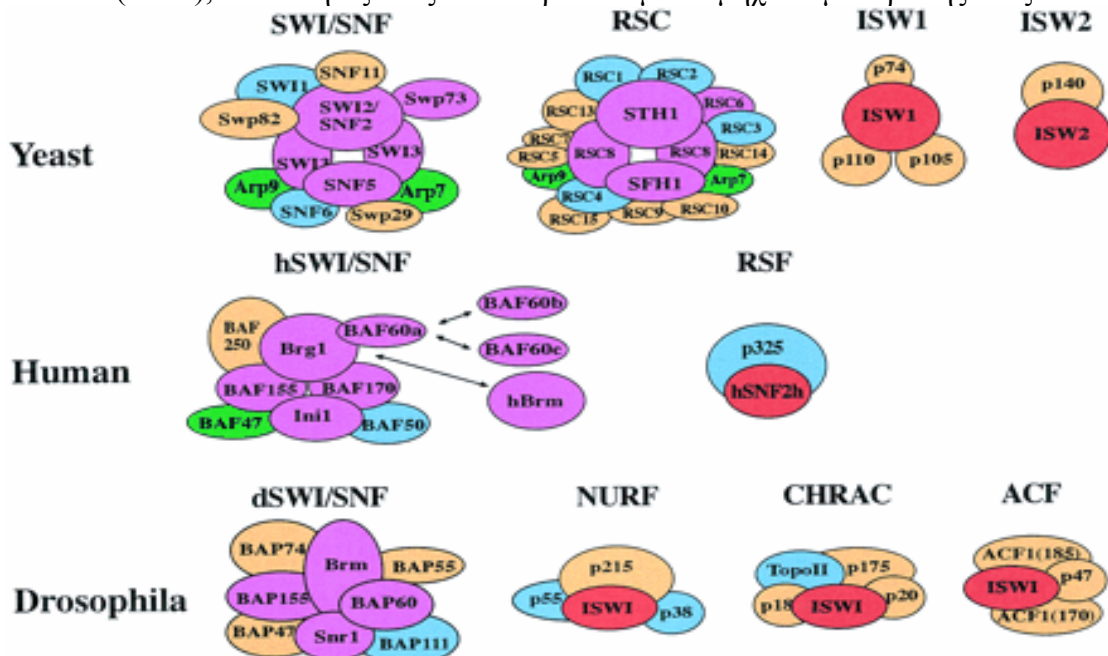
Η κρυσταλλική δομή των ομόλογων πρωτεϊνών των γTAF<sub>II</sub>17 και γTAF<sub>II</sub>60 στη Δροσόφιλα (dTAF<sub>II</sub>40 και dTAF<sub>II</sub>60) αποκάλυψε πράγματι τη δημιουργία ενός τετραμερούς, όμοιο με το τετραμερές των ιστονών (H3/H4)<sub>2</sub> στον πυρήνα του νουκλεοσώματος (Xie *et al.*, 1996). Επίσης, η γTAF<sub>II</sub>68 και η ομόλογή της hTAF<sub>II</sub>20 (που έχουν τη δομή διπλώματος της H2B) αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Ada1 του SAGA και το hTAF<sub>II</sub>135 του TFIID αντίστοιχα, που έχουν ομολογία αλληλουχίας με την H2A. Έτσι αυτές οι αλληλεπιδράσεις ορίζουν πιθανώς το αντίστοιχο διμερές

(H2A/H2B) του νουκλεοσώματος στα σύμπλοκα SAGA και TFIID (Gangloff *et al.*, 2000). Επίσης δομικές μελέτες εντόπισαν την ύπαρξη και ενός άλλου ετεροδιμερούς στο ανθρώπινο TFIID, μεταξύ των hTAF<sub>II</sub>28 και hTAF<sub>II</sub>18, που αλληλεπιδρούν μέσω ενός νέου μοτίβου διπλώματος των ιστονών. Το ενδιαφέρον είναι ότι το ίδιο νέο μοτίβο υπάρχει στην N-τελική και C-τελική περιοχή της πρωτεΐνης hSPT3 οδηγώντας στην υπόθεση ότι μια παρόμοια δομή μπορεί να σχηματίζεται και στα σύμπλοκα του Gen5 (Birck *et al.*, 1998).

Πάντως η αρχική άποψη ότι η δημιουργία αυτών των δομών στα σύμπλοκα SAGA και TFIID οδηγεί σε αλληλεπίδραση με το DNA αντικαθιστώντας το οκταμερές των ιστονών, μετά την ακετυλίωσή του, δεν θεωρείται πολύ πιθανή μετά την πρόσφατη λύση της νουκλεοσωμικής δομής (Luger *et al.*, 1997). Εκεί φαίνεται ότι, οι ιστόνες δεσμεύουν το DNA μέσω πλευρικών αλυσίδων καταλοίπων αργινίνης που εισέρχονται μέσα στη μικρή αύλακα του DNA. Στην περίπτωση όμως των παραπάνω TAF<sub>II</sub>s αυτά τα κατάλοιπα αργινινών δεν είναι συντηρημένα. Έτσι η ύπαρξη τέτοιων δομών στα σύμπλοκα SAGA και TFIID πέρα από την εξελικτική συσχέτιση, ίσως αντανάκλα και τη διατήρηση ενός μοτίβου που διευκολύνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών του ίδιου συμπλόκου ή με πρωτεΐνες της χρωματίνης (Michel *et al.*, 1998).

## 5. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΤΡ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα σύμπλοκα που έχουν την ικανότητα να υδρολύουν ΑΤΡ και να χρησιμοποιούν την εκλυόμενη ενέργεια για να προκαλούν δομικές μεταβολές στη χρωματίνη. Τα μέλη της προσδιορίστηκαν με γενετικές και βιοχημικές μελέτες. Αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμη, έχειδειχθεί ότι μπορούν να προκαλούν μεταβολές στη δομή των νουκλεοσωμάτων, σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα. Αυτές οι μεταβολές οδηγούν σε αύξηση της πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων στο νουκλεοσωμικό DNA και ενεργοποίησης της μεταγραφής (Cairns, 1998b). Τα μέλη των ΑΤΡ-εξαρτώμενων συμπλόκων ανήκουν σε δύο ομάδες ανάλογα με την καταλυτική τους υπομονάδα. Στην πρώτη ομάδα είναι τα σύμπλοκα της οικογένειας SWI/SNF που περιέχουν ως ΑΤΡάση την πρωτεΐνη Swi2/Snf2 της ζύμης ή ομόλογά της, στη ζύμη και σε άλλους οργανισμούς. Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν τα σύμπλοκα με καταλυτική υπομονάδα την πρωτεΐνη ISWI, που έχει ομολογία με την Swi2/Snf2 της ζύμης αλλά διαφορετικές ιδιότητες. Παρακάτω αναλύονται η σύσταση όλων αυτών των συμπλόκων (Εικ.3), οι ιδιότητές τους και οι προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης τους.



Εικόνα 3. Σύσταση των διαφόρων ΑΤΡ-εξαρτώμενων συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Οι συντηρημένες πρωτεΐνες των συμπλόκων της οικογένειας SWI/SNF φαίνονται με το χρώμα ροζ ενώ οι ομόλογες πρωτεΐνες ISWI δείχνονται με το κόκκινο χρώμα. Οι στοιχειομετρίες και οι άμεσες επαφές μεταξύ των πρωτεϊνών είναι υποθετικές (Kingston and Narlikar, 1999).

### 5.1. Σύμπλοκα SWI/SNF

Το σύμπλοκο SWI/SNF της ζύμης αποτελείται από 11 τουλάχιστον μέλη με καταλυτική υπομονάδα την ΑΤΡάση Swi2/Snf2 (Πίνακας 2). Η ενεργότητα της ΑΤΡάσης επάγεται από ελεύθερο αλλά και νουκλεοσωμικό DNA (Peterson and Tamkun, 1995). Ο λειτουργικός ρόλος του κάθε συστατικού του συμπλόκου δεν έχει διευκρινιστεί αν και ορισμένα απαιτούνται για την ικανότητά του να δένεται σε νουκλεοσωμικό DNA. Η ικανότητα αυτή δεν εξαρτάται από την υδρόλυση του ΑΤΡ ούτε από συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA (Quinn *et al.*, 1996). Ομόλογη με την Swi2/Snf2 είναι και η ΑΤΡάση Sth1 στη ζύμη, που αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου RSC. Το RSC περιλαμβάνει 15 υπομονάδες από τις οποίες οι 6 τουλάχιστον είναι ομόλογες με συστατικά του συμπλόκου SWI/SNF. Δύο

κοινά συστατικά των δύο συμπλόκων είναι τα μέλη της οικογένειας των συγγενικών με την ακτίνη πρωτεϊνών (Arps). Σε αντίθεση όμως με το μικρό ποσοστό του SWI/SNF που υπάρχει στα κύτταρα (περίπου 100-200 μόρια ανά κύτταρο), το RSC είναι περίπου 10-φορές αφθονότερο από αυτό (Cairns *et al.*, 1998a).

Στη Δροσόφιλα η ομόλογη πρωτεΐνη της Swi2/Snf2 είναι η **Brm** που βρίσκεται σε σύμπλοκο με άλλες πρωτεΐνες (Brm-associated proteins, BAPs), πολλές από τις οποίες έχουν ομολογία με τις αντίστοιχες του SWI/SNF της ζύμης (Πίνακας 2). Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί δύο ομόλογα μέλη με την Swi2/Snf2, η **hBRG1** και η **hBRM**, που αποτελούν τις καταλυτικές υπομονάδες δύο διαφορετικών συμπλόκων. Η ύπαρξη δύο ομολόγων συμπλόκων με διαφορετική σύσταση πολλές φορές και στις υπόλοιπες υπομονάδες, πιθανώς εξηγείται από τη διαφορετική κυτταροειδική ή ιστοειδική έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων (Wang *et al.*, 1996).

**Πίνακας 2. Γνωστές υπομονάδες των συμπλόκων SWI/SNF (Vignali *et al.*, 2000).**

| Yeast SWI/SNF              | Yeast RSC  | Drosophila Brahma | Human SWI/SNF        |
|----------------------------|------------|-------------------|----------------------|
| Swi2/Snf2                  | Sth1/Nsp1  | Brm               | hBRG1 or hBRM        |
| Swi1                       |            | Osa               | p270/BAF250          |
| Snf5                       | Sfh1       | Snr1              | hSNF5/INI1/BAF47     |
| Swi3                       | Rsc8/Swh3  |                   | Bap155/Moira BAF170, |
| BAF155                     |            |                   |                      |
| Swp82                      |            |                   |                      |
| Swp73/Snf12                | Rsc6       | Bap60             | BAF60 (a, b, c)      |
| Swp61/Arp7                 | Rsc11/Arp7 | Bap55 (?)         | BAF53                |
| (?)                        |            |                   |                      |
| Swp59/Arp9                 | Rsc12/Arp9 | Bap55 (?)         | BAF53                |
| (?)                        |            |                   |                      |
| Snf6                       |            |                   |                      |
| Swp29/Taf <sub>II</sub> 30 |            |                   |                      |
| Snf11                      |            |                   |                      |

Ο αρχικός προσδιορισμός μελών της οικογένειας SWI/SNF είχε γίνει σε γενετικές μελέτες στη ζύμη, όπου είχαν απομονωθεί ως θετικοί ρυθμιστές της έκφρασης των γονιδίων *HO* και *SUC2*. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν τα ένζυμα ενδοουκλεάση *HO* (στην αλλαγή του συζευκτικού τύπου της ζύμης) και υδρολάση της σακχαρόζης (στον καταβολισμό της σακχαρόζης) αντίστοιχα (Winston and Carlson, 1992). Στη συνέχεια βέβαια διαπιστώθηκε ότι ρυθμίζουν την έκφραση πολλών άλλων γονιδίων που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη της ζύμης σε διάφορα θρεπτικά μέσα όπως γλυκερόλη, αιθανόλη ή γαλακτόζη. Επίσης, αυτές οι γενετικές μελέτες είχαν συσχετίσει τη δράση του SWI/SNF με τη χρωματίνη, καθώς μεταλλαγές σε διάφορα συστατικά της χρωματίνης αλλά και μεταβολές στη στοιχειομετρία των ιστονών, καταστέλλουν *swi/snf* μεταλλαγές (Kruger and Herskowitz, 1991, Winston and Carlson, 1992). Κατά ανάλογο τρόπο, η μεταλλαγή *brm* στη Δροσόφιλα είχε δείξει ότι καταστέλλει μεταλλαγές της ομάδας *polycomb*, τα μέλη της οποίας σχετίζονται με το σχηματισμό ετεροχρωματίνης στους υποκινητές πολλών ομοιοτικών γονιδίων (Tamkun *et al.*, 1992). Βιοχημικές μελέτες ενίσχυσαν την παραπάνω συσχέτιση, καθώς τα σύμπλοκα SWI/SNF είχαν την ικανότητα να προκαλούν τοπολογικές αλλαγές σε νουκλεοσωμικά υποστρώματα *in vitro* αλλά και *in vivo*, διευκολύνοντας έτσι τους μεταγραφικούς παράγοντες να υπερνικούν την κατασταλτική φύση της χρωματίνης και να προσδένονται στο DNA (Sudarsanam and Winston, 2000). Απαραίτητη βέβαια για τη δράση όλων αυτών των συμπλόκων είναι η ενεργότητα της ATPάσης και το γεγονός ότι οι περιοχές της ATPάσης της Swi2/Snf2 και της Brm

είναι λειτουργικά ανταλλάξιμες υποδεικνύει ότι τα σύμπλοκα είναι και λειτουργικά ομόλογα στους δύο οργανισμούς (Elfring *et al.*, 1994).

Τα σύμπλοκα της οικογένειας SWI/SNF όμως φαίνεται ότι διαφοροποιούνται ως προς τους ρόλους τους *in vivo*. Έχει δειχθεί ότι το SWI/SNF ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων τόσο στο τέλος της μίτωσης όσο και στη μεσόφαση (Krebs *et al.*, 2000). Το RSC απαιτείται για απαραίτητες διεργασίες του κυτταρικού κύκλου της ζύμης και αντίστοιχα το σύμπλοκο Brahma φαίνεται να απαιτείται νωρίς κατά την εμβρυογένεση στη Δροσόφιλα (Cao *et al.*, 1997, Yukawa *et al.*, 1999, Kal *et al.*, 2000). Λόγω των διαφορετικών γονιδίων που ρυθμίζουν αυτά τα σύμπλοκα εξηγείται ίσως και η διαφορετική επίδραση της έλλειψης αυτών των συμπλόκων στα κύτταρα. Έτσι το γονίδιο *SWI2/SNF2* δεν είναι απαραίτητο για τη βιωσιμότητα των κυττάρων, ενώ τα ομόλογά του *STH1* και *BRM* είναι (Cairns *et al.*, 1996a, Elfring *et al.*, 1998). Τέλος, το hSWI/SNF ρυθμίζει την έκφραση κυκλινών και κινασών του κυτταρικού κύκλου μέσω της αλληλεπίδρασής του με την πρωτεΐνη Retinoblastoma (Rb) και σε συνεργασία με το σύμπλοκο απακετυλάσης HDAC (Zhang *et al.*, 2000).

## 5.2. Σύμπλοκα ISWI

Εδώ ανήκουν τα σύμπλοκα **NURF**, **CHRAC** και **ACF** που απομονώθηκαν από εκχυλίσματα Δροσόφιλας βάσει της ιδιότητάς τους να προκαλούν δομικές αλλαγές σε *in vitro* νουκλεοσωμικά υποστρώματα, υποβοηθώντας έτσι τη δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων σε αυτά (Tsukiyama and Wu, 1995, Varga-Weisz *et al.*, 1997, Ito *et al.*, 1997). Τα σύμπλοκα αυτά βρίσκονται σε σχετικά μεγάλο ποσοστό στα κύτταρα και όλα περιέχουν ως καταλυτική υπομονάδα την πρωτεΐνη **ISWI**.

Διαφέρουν όμως στις υπόλοιπες υπομονάδες οι οποίες δε ξεπερνούν σε αριθμό τα 3-4 πολυπεπτίδια (Πίνακας 3). Η ISWI είναι μια ATPάση που επάγεται μόνο από νουκλεοσωμικό DNA και η ενεργότητά της είναι απαραίτητη για την *in vitro* δράση των παραπάνω συμπλόκων (Tsukiyama and Wu, 1995, Corona *et al.*, 1999). Επίσης για τη δράση του συμπλόκου NURF φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο οι N-τελικές ουρές των ιστονών (κυρίως της H4) καθώς η έλλειψή τους επηρεάζει την αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το υπόστρωμα (Georgel *et al.*, 1997). Τέλος, μια άλλη ιδιότητα που χαρακτηρίζει τα CHRAC και ACF είναι η ικανότητά τους να επανατοποθετούν, σε κανονικές μεταξύ τους αποστάσεις, ατάκτως ανασυγκροτημένα νουκλεοσώματα *in vitro* (Varga-Weisz *et al.*, 1997, Ito *et al.*, 1997). Έτσι έχει προταθεί ότι ο *in vivo* ρόλος των συμπλόκων ISWI στη Δροσόφιλα είναι διπλός, δρώντας θετικά στην έκφραση των γονιδίων αλλά και αρνητικά διατηρώντας ή δημιουργώντας την υψηλή-τάξης δομή της χρωματίνης (Deuring *et al.*, 2000).

Στη ζύμη υπάρχουν δύο ομόλογες πρωτεΐνες της ISWI, οι **ISW1** και **ISW2**, που βρίσκονται σε διαφορετικά σύμπλοκα, με διαφορετικές υπομονάδες το καθένα. Οι διαφορετικές βιοχημικές ιδιότητες των συμπλόκων αυτών πιθανόν αντανακλούν και διαφορετικούς ρόλους στη ζύμη, αφού μόνο το ISW1 έχει την ικανότητα να διασπά τη νουκλεοσωμική οργάνωση *in vitro* (Tsukiyama *et al.*, 1999). Αντίθετα, το ISW2 πρόσφατα δείχθηκε να δρα σε παράλληλα και μερικώς αντισταθμιστικά μονοπάτια με το σύμπλοκο απακετυλασών Rpd3-Sin3 για την καταστολή της έκφρασης πολλών πρώιμων μειωτικών γονιδίων, δημιουργώντας κατασταλτική δομή χρωματίνης (Goldmark *et al.*, 2000). Ενώ όμως το ISWI είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και τη κυτταρική βιωσιμότητα στη Δροσόφιλα (Deuring *et al.*, 2000), τα γονίδια ISW1 και ISW2 στη ζύμη δεν είναι απαραίτητα (Tsukiyama *et al.*, 1999).

Η ομόλογη πρωτεΐνη ISWI στον άνθρωπο, είναι η **hSNF2L** που έχει προσδιοριστεί σε δύο σύμπλοκα, το **RSF** και το **hCHRAC** (Wang *et al.*, 1996). Το hCHRAC μάλιστα περιέχει την αντίστοιχη πρωτεΐνη hACF και δύο ομόλογα συστατικά του συμπλόκου CHRAC της Δροσόφιλας, που έχουν τη δομική περιοχή του “διπλώματος των ιστονών”, (Poot *et al.*, 2000). Ο ρόλος των συμπλόκων αυτών *in vivo* δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.

Πίνακας 3. Γνωστές υπομονάδες των συμπλόκων ISWI (Vignali *et al.*, 2000).

| dNURF          | dCHRAC | dACF        | yISWI    |
|----------------|--------|-------------|----------|
| hCHRAC         | hRSF   |             |          |
| ISWI           | ISWI   | ISWI        | ISW1, -2 |
| hSNF2h         |        |             | hSNF2h   |
| Nurf-55        |        |             |          |
| p215           |        |             |          |
| Nurf-38/iPPase |        |             |          |
|                | Top II |             |          |
|                | p175   |             |          |
|                | p20    |             | p17      |
|                | p18    |             | p15      |
|                |        | Acfl (p185) | hAcfl    |
|                |        | n71         |          |

### 5.3. Μηχανισμοί δράσης των ATP-εξαρτώμενων συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης

Έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους ένα σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης μπορεί να δράσει, χρησιμοποιώντας την εκλυόμενη ενέργεια από την υδρόλυση του ATP (Εικ.4):

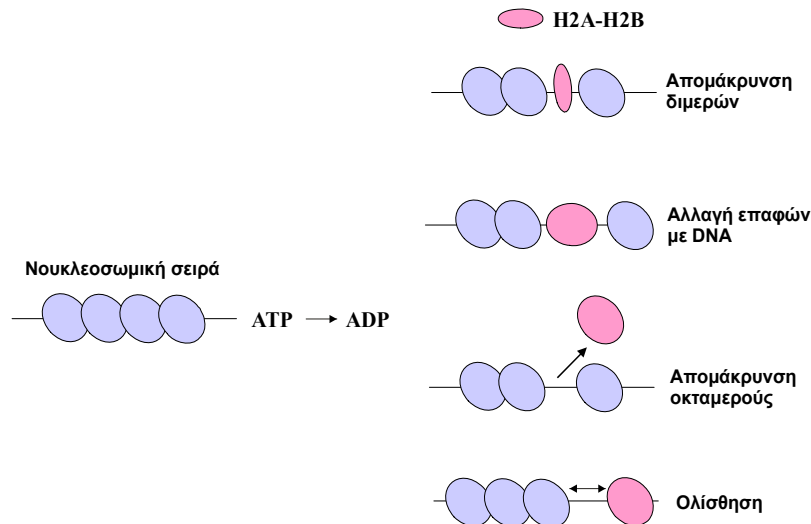
(1) Το σύμπλοκο απομακρύνει τα διμερή (H2A-H2B) και δημιουργεί τετραμερή (H3-H4) των ιστονών, που είναι πιο εύκολα προσβάσιμα στις νουκλεάσες ή στους DNA-δεσμευόμενους παράγοντες. Όμως *in vitro* πειράματα με παρακολούθηση της σύστασης της αναδιαμορφωμένης χρωματίνης ή με τη χρήση σειρών νουκλεοσωμάτων που περιείχαν ομοιοπολικά δεμένα (covalently cross-linked) οκταμερή, έδειξαν ότι κάτι τέτοιο δεν ισχύει, τουλάχιστον για τα σύμπλοκα SWI/SNF της ζύμης και NURF της Δροσόφιλας (Boyer *et al.*, 2000, Hamiche *et al.*, 1999).

(2) Το σύμπλοκο μεταβάλλει τοπικά τις επαφές του DNA με τις ιστόνες, χωρίς κάποια δομική αλλαγή στο οκταμερές των ιστονών. Έτσι προκαλώντας περιστροφή της διπλής έλικας μέσα στο νουκλεόσωμα (rotational phasing), επανακατευθύνει τις επαφές του DNA με αυτό και εκθέτει νέες περιοχές στη δράση νουκλεασών ή στην πρόσδεση παραγόντων. Από αποτελέσματα *in vitro* πειραμάτων φαίνεται να ισχύει αυτό τουλάχιστον για το SWI/SNF της ζύμης και το hSWI/SNF (Imbalzano *et al.*, 1994, Côté *et al.*, 1998, Bazett-Jones *et al.*, 1999, Boyer *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 1999).

(3) Μπορεί να προκαλεί μεταβολές στη δομή της χρωματίνης λόγω μεταφοράς ολόκληρου του οκταμερούς *in trans*, σε ένα νέο κομμάτι DNA-δέκτη. Αυτό έχειδειχθεί να συμβαίνει στην περίπτωση δράσης των συμπλόκων της ζύμης SWI/SNF και RSC όπως και του hSWI/SNF, σε *in vitro* νουκλεοσωμικές σειρές (Owen-Hughes *et al.*, 1996, Lorch *et al.*, 1999, Phelan *et al.*, 2000).

(4) Προκαλεί αλλαγές στην αλληλεπίδραση του DNA με τις ιστόνες αυξάνοντας την κινητικότητα του οκταμερούς *in cis* και την ανακατανομή των νουκλεοσωμάτων κατά μήκος του DNA (ολίσθηση). Βιοχημικές μελέτες, πάλι σε *in vitro* ανασυγκροτημένα νουκλεοσωμικά υποστρώματα, υποστηρίζουν αυτό το μοντέλο ως μηχανισμό δράσης των συμπλόκων NURF και CHRAC της Δροσόφιλας, αλλά και του SWI/SNF της ζύμης (Hamiche *et al.*, 1999, Längst *et al.*, 1999, Whitehouse *et al.*, 1999).





**Εικόνα 4. Προτεινόμενοι μηχανισμοί δράσης των ATP-εξαρτούμενων συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης.**

Πέρα από το μηχανισμό δράσης των συμπλόκων SWI/SNF *in vivo*, ένα κρίσιμο ερώτημα αφορά τον **τρόπο στρατολόγησης** αυτών, στους υποκινητές-στόχους των γονιδίων. Αρχικές βιοχημικές μελέτες στη ζύμη και τον άνθρωπο, είχαν αναφέρει την ανοσοκατακρήμνιση και καθαρισμό των συμπλόκων SWI/SNF με το ολοένζυμο της RNA πολυμεράσης II. Μετέπειτα όμως γενετικά και βιοχημικά στοιχεία διέψευσαν αυτήν την υπόθεση στρατολόγησης των συμπλόκων με το ολοένζυμο (Peterson and Workman, 2000). Σε πειράματα *in vitro* αλληλεπίδρασης και ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών δείχθηκε η άμεση αλληλεπίδραση του SWI/SNF της ζύμης με όξιņους ενεργοποιητές όπως οι Gcn4, VP16, Hap4 και Swi5 (Neely *et al.*, 1999, Natarajan *et al.*, 1999, Yudkovsky *et al.*, 1999). Με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης επιβεβαιώθηκε και *in vivo* η στρατολόγηση του SWI/SNF από αυτούς τους παράγοντες (Cosma *et al.*, 1999, Krebs *et al.*, 1999, Syntichaki *et al.*, 2000). Πρόσφατα δείχθηκε και η *in vitro* αλληλεπίδραση του συμπλόκου Brahma με τον ενεργοποιητή πολλών ομοιοτικών γονιδίων στη Δροσόφιλα, Zeste (Kal *et al.*, 2000). Επίσης έχουν προσδιοριστεί *in vitro* αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου hSWI/SNF με διάφορους μεταγραφικούς ενεργοποιητές (Muchardt and Yaniv, 1993, Cheng *et al.*, 1999, Kadam *et al.*, 2000). Αξιοσημείωτη είναι όμως και η ικανότητα του γSWI/SNF να αλληλεπιδρά και με συν-καταστολείς της μεταγραφής όπως τις HIR1 και HIR2, για τη στρατολόγηση και δράση του συμπλόκου στους υποκινητές όπου χρειάζεται να ξεπεραστεί η παρεμποδιστική φύση της χρωματίνης (Dimova *et al.*, 1999).

Γενικά τα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ένα πολλαπλό ρόλο των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, τόσο στη δημιουργία εύκολα προσβάσιμης όσο και κατασταλτικής δομής της χρωματίνης για τη μεταγραφή. Η αντιθετική δράση των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης φαίνεται να καθορίζεται από τις επαφές που αυτά κάνουν με τους ενεργοποιητές/καταστολείς της μεταγραφής αλλά και με τα σύμπλοκα τροποποίησης της χρωματίνης. Έτσι, η μεγάλη ποικιλομορφία στον αριθμό, τη σύσταση και πιθανώς στους μηχανισμούς δράσης των συμπλόκων τροποποίησης και αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης μέσα στα κύτταρα μπορεί να εξηγηθεί από τις διαφορετικές προϋποθέσεις δράσης αυτών. Οι τελευταίες καθορίζονται από το συγκεκριμένο ενεργοποιητή, τη δομή του υποκινητή του συγκεκριμένου γονιδίου και του μικροπεριβάλλοντος στο οποίο εκφράζεται το γονίδιο αυτό (κυτταρική φάση, ειδικός ιστός κλπ.). Παρά τα μέχρι τώρα γνωστά στοιχεία για την λειτουργία όλων αυτών των συμπλόκων, τροποποίησης και αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, υπάρχουν ακόμη αρκετά ανοικτά ερωτήματα. Αυτά εντοπίζονται στις παραπάνω προϋποθέσεις δράσης τους, στους μηχανισμούς

στρατολόγησης, αλλά και στους μηχανισμούς αλληλεπίδρασής τους στους διάφορους υποκινητές γονιδίων *in vivo*, για τη μεταγραφική ρύθμιση στα κύτταρα.

## **ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Στα κεφάλαια που ακολουθούν αναλύονται τα αποτελέσματα μελετών που έγιναν προκειμένου να διευκρινιστεί ο τρόπος δράσης της ακετυλο-τρανσφεράσης των ιστονών Gcn5 στη ζύμη (*Saccharomyces cerevisiae*). Το κύριο ερώτημα ήταν αν η ενεργότητα HAT της πρωτεΐνης είναι αναγκαία και ικανή για την *in vivo* δράση της, ως συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής κάποιων γονιδίων. Στα πλαίσια διερεύνησης του πρώτου σκέλους, έγιναν μεταλλαγές στη δομική περιοχή της ενεργότητας HAT του Gcn5, οι οποίες μείωναν σημαντικά την *in vitro* ενεργότητα του ενζύμου. Αυτές οι μεταλλαγμένες όμως μορφές του Gcn5 ήταν πλήρως λειτουργικές *in vivo* λόγω της ενδυνάμωσης της ενεργότητάς τους όταν ενσωματώνονταν στα σύμπλοκά τους και δρούσαν στα φυσικά νουκλεοσωμικά υποστρώματά τους. Έτσι παρότι οι συγκεκριμένες μεταλλαγές δεν κατήργησαν την *in vivo* ενζυματική δράση του Gcn5 ώστε να απαντηθεί το παραπάνω ερώτημα, ωστόσο αποκάλυψαν ένα ρυθμιστικό ρόλο των υπολοίπων συστατικών του συμπλόκου στην ενεργότητα HAT του Gcn5.

Για τη διερεύνηση του δεύτερου σκέλους του παραπάνω ερωτήματος δημιουργήθηκε ένας τεχνητός υποκινητής με καθορισμένη νουκλεοσωμική οργάνωση, που εξαρτάται από τη δράση του Gcn5. Έτσι η ύπαρξη των αυστηρά τοποθετημένων νουκλεοσωμάτων επιτρέπει την *in vivo* μελέτη των τυχόν αλλαγών στη δομή της χρωματίνης του υποκινητή, λόγω της δράσης του Gcn5. Μελέτη της ρύθμισης της μεταγραφής που καθοδηγείται από αυτόν τον υποκινητή αποκάλυψε την αναγκαιότητα για τη συνδυασμένη δράση του συμπλόκου του Gcn5 (SAGA) και του ATP-εξαρτώμενου συμπλόκου SWI/SNF. Τα δύο σύμπλοκα στρατολογούνται ανεξάρτητα στον υποκινητή, από τον ενεργοποιητή Gcn4 και η ακετυλίωση των ιστονών από το SAGA, γίνεται ανεξάρτητα της δράσης του SWI/SNF. Όμως η ακετυλίωση δεν ήταν από μόνη της ικανή για την αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων στην περιοχή και την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η αναδιαμόρφωση ήταν το αποτέλεσμα της δράσης του SWI/SNF και προϋπόθεση γι' αυτήν ήταν η ακετυλίωση των ιστονών. Επίσης δείχθηκε ότι τα δύο γεγονότα της ακετυλίωσης και της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης είναι ανεξάρτητα της μεταγραφής. Τέλος, μέσω σημειακών μεταλλαγών ή ελλείψεων των δομικών περιοχών bromodomains που υπάρχουν στις καταλυτικές υπομονάδες των παραπάνω συμπλόκων, διαπιστώθηκε η αναγκαιότητά τους για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Έτσι προτείνεται ένας ρόλος για αυτές τις δομικές περιοχές μέσω ενός μηχανισμού συνδυασμένης δράσης τους.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

**η Ενζυμική Δραση του Gcn5  
Ενδυναμώνεται με την Ενσωματώση  
στα Συμπλοκα του**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρωτεΐνη Gcn5 της ζύμης είχε αρχικά χαρακτηριστεί ως μεταγραφικός συν-ενεργοποιητής (coactivator) που διαμεσολαβεί τη μεταγραφική ενεργοποίηση διαφόρων γονιδίων από όξινους ενεργοποιητές όπως τους Gcn4, Gal4, Adr1 και VP16. Από αυτές τις γενετικές μελέτες, αλλά και βιοχημικές, φάνηκε ότι η Gcn5 βρίσκεται σε σύμπλοκο με άλλες δύο πρωτεΐνες, τις Ada2 και Ada3 (Georgakopoulos and Thireos, 1992, Pina *et al.*, 1993, Marcus *et al.*, 1994, Georgakopoulos *et al.*, 1995, Horiuchi *et al.*, 1995). Η ικανότητα που είχε το σύμπλοκο Gcn5/Ada να αλληλεπιδρά με τους ενεργοποιητές αλλά και με βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες εξηγούσε τη δράση του ως συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής (Barlev *et al.*, 1995, Chiang *et al.*, 1996). Στη συνέχεια όμως διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη Gcn5 έχει *in vitro* ενζυμική ενεργότητα ακετυλο-τρανσφεράσης των ιστονών (HAT) καταλύοντας την ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης στις N-τελικές ουρές τους (Brownell *et al.*, 1996). Έτσι η *in vivo* δράση του παραπάνω συμπλόκου θα μπορούσε να καθορίζεται και από την ικανότητά του να τροποποιεί άμεσα το περιβάλλον της χρωματίνης μέσα στο οποίο δρα η μεταγραφική μηχανή.

Βιοχημικές μελέτες προσδιόρισαν δύο σύμπλοκα, τα SAGA και ADA, τα οποία είχαν καταλυτική υπομονάδα το Gcn5. Και τα δύο είχαν την ικανότητα να ακετυλιώνουν τις ιστόνες H3 και H2B σε *in vitro* νουκλεοσωμικά υποστρώματα (Grant *et al.*, 1997). Σε αντίθεση με αυτήν την ιδιότητα των συμπλόκων του Gcn5, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Gcn5 ήταν ικανή να ακετυλιώνει μόνο τις ελεύθερες ιστόνες και όχι τις νουκλεοσωμικές (Kuo *et al.*, 1996). Αυτό υπονοεί ότι για την *in vivo* δράση της πρωτεΐνης ως ακετυλο-τρανσφεράση ιστονών, απαιτούνται και τα υπόλοιπα συστατικά των συμπλόκων είτε για την αναγνώριση των νουκλεοσωμικών υποστρωμάτων ή για τη ρύθμιση της ενζυμικής της ενεργότητας.

Πράγματι λειτουργική ανάλυση του μορίου Gcn5 έδειξε ότι για την *in vivo* δράση του απαιτείται τόσο η λειτουργική περιοχή του με ενεργότητα HAT (HAT domain, Εικ.1) όσο και η περιοχή αλληλεπίδρασής του με το Ada2 (ADA domain, Εικ.1). Ελλείψεις των περιοχών αυτών καταργούσαν την *in vitro* ενζυμική ενεργότητα του Gcn5 σε υποστρώματα ελεύθερων ιστονών και δεν υποστήριζαν την μεταγραφή σε γονίδια που απαιτούσαν την *in vivo* δράση του Gcn5 (Candau *et al.*, 1997). Για την περαιτέρω διευκρίνιση της σχέσης ακετυλίωσης και μεταγραφής αλλά και τον έλεγχο της αναγκαιότητας της ενεργότητας HAT του Gcn5 για την *in vivo* δράση του, χρήσιμες θα ήταν σημειακές μεταλλαγές στο μόριο που να καταργούν την ενεργότητα HAT. Οι σημειακές μεταλλαγές δρουν εντοπισμένα χωρίς να επηρεάζουν τις υπόλοιπες λειτουργίες της πρωτεΐνης όπως γίνεται στην περίπτωση έλλειψης

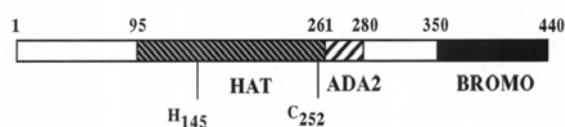
ολόκληρων περιοχών. Παρακάτω περιγράφεται μία τέτοια προσπάθεια και αναλύεται η δράση αυτών των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5 *in vitro* και *in vivo*. Η μελέτη της ενζυμικής τους ενεργότητας *in vivo* έγινε απουσία ή παρουσία άλλων συστατικών των συμπλόκων του Gcn5 και δεν περιορίστηκε σε υποστρώματα ελεύθερων ιστονών αλλά επεκτάθηκε και σε *in vitro* ανασυγκροτημένα νουκλεοσώματα.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Δημιουργία μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5 με σημαντικά

#### εξασθενημένη *in vitro* ενεργότητα HAT

Για να προσδιοριστεί ο ρόλος της ενεργότητας HAT του Gcn5 στην *in vivo* δράση του συμπλόκου SAGA, αποκτήθηκαν κατευθυνόμενες σημειακές μεταλλαγές που αναμενόταν να επηρεάζουν αυτήν την ενεργότητα. Από προηγούμενη λειτουργική ανάλυση του μορίου Gcn5 είχαν προσδιοριστεί οι δομικές περιοχές του, όπως παριστάνονται σχηματικά στην Εικ.1 (Candau *et al.*, 1997). Η ελάχιστη περιοχή HAT αφορά τα αμινοξέα 95-253 του μορίου και περιλαμβάνει πολλά συντηρημένα αμινοξέα σε όλα τα μέλη των ενζύμων HAT. Ακολουθεί η περιοχή αλληλεπίδρασης του Gcn5 με την πρωτεΐνη Ada2, ενώ στο C-τελικό άκρο του Gcn5 υπάρχει μια περιοχή γνωστή ως bromodomain, που είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση του Gcn5 με τις ακετυλιωμένες ιστόνες (βλ. Κεφ.4). Οι μεταλλαγές έγιναν σε αμινοξέα της περιοχής HAT που είχαν προταθεί ως κρίσιμα για την ενεργότητα της πρωτεΐνης, με βάση τις μέχρι τότε μελέτες και τη στοίχιση των αλληλουχιών των διαφόρων ενζύμων που προσδέουν ακετυλο-συνένζυμο A (Brownell and Allis, 1996). Συγκεκριμένα έγιναν τρεις μεταλλαγές, η ιστιδίνη His-145 σε αλανίνη (HA), η κυστεΐνη Cys-252 σε αλανίνη (CA) και ο συνδυασμός των δύο (HACA).



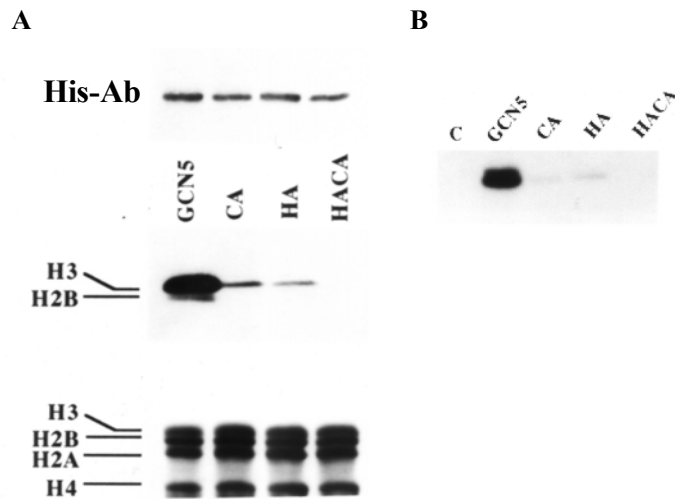
**Εικόνα 1. Οι δομικές περιοχές της πρωτεΐνης Gcn5.** Διακρίνονται στην N-τελική περιοχή, την περιοχή ενζυμικής ενεργότητας HAT, την περιοχή αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη Ada2 (ADA) και το bromodomain (BROMO) (Candau *et al.*, 1997).

Οι αντίστοιχες μεταλλαγμένες πρωτεΐνες (HA, CA και HACA) παράγονταν σε κύτταρα *E. coli* σε σύντηξη με 6 κατάλοιπα ιστιδίνης (6xHis) στο N-τελικό τους άκρο. Με αυτόν τον τρόπο μπορούσαν να εκχυλιστούν και να καθαριστούν από τα βακτήρια, με χρωματογραφία συγγένειας μέσω σφαιριδίων αγαρόζης καλυμμένων με ιόντα νικελίου (ρητίνη Ni-NTA). Ο έλεγχος της ενζυμικής ενεργότητας των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών Gcn5 *in vitro* έγινε με αντιδράσεις ακετυλίωσης σε

διάλυμα (liquid assays), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μίγμα ελεύθερων ιστονών (Brownell and Allis, 1995). Η σήμανση των ακετυλιωμένων ιστονών έγινε με [<sup>3</sup>H]-ακετυλο-συνένζυμο Α και η ανάλυσή τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Εκμεταλλευόμενοι τη μεγάλη διαφορά μεγέθους των πρωτεϊνών Gcn5 (μοριακό βάρος 48.5 KDa) με τις ιστόνες (μοριακό βάρος 11-16 KDa) το πάνω μισό του πηκτώματος χρησιμοποιήθηκε για ποσοτικοποίηση του ενζύμου ανά αντίδραση. Αυτό έγινε με μεταφορά σε μεμβράνη και ανοσοεντοπισμό των πρωτεϊνών Gcn5 με το κατάλληλο αντίσωμα. Ταυτόχρονα, στο κάτω μισό του ίδιου πηκτώματος έγινε εντοπισμός (με σπινθηρογραφία) του προτύπου ακετυλίωσης των ιστονών σε κάθε αντίδραση.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ο έλεγχος της ικανότητας ακετυλίωσης των ελεύθερων ιστονών από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες 6xHis-Gcn5 έδειξε διαφορές στην *in vitro* ενεργότητά τους. Η Εικ.2Α (πάνω τμήμα) δείχνει την ποσοτικοποίηση των ενζύμων, με το αντίσωμα εναντίον των 6 ιστιδινών (6xHis), που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση ακετυλίωσης. Όπως φαίνεται στην Εικ.2Α (μεσαίο τμήμα, διαδρομή 1) η φυσικού τύπου πρωτεΐνη ακετυλίωσε κατά προτίμηση την ιστόνη H3 και σε μικρότερο βαθμό την H2B. Ο προσδιορισμός των ιστονών έγινε με βάση το πρότυπο ανάλυσής τους στο ίδιο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, μετά τη χρώση με Coomassie Blue (Εικ.2Α, κάτω τμήμα). Όμως για τα ίδια ποσά ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών οι HA και CA μορφές του Gcn5 είχαν σημαντικά μειωμένη HAT ενεργότητα, σε σχέση με την φυσικού τύπου πρωτεΐνη (Gcn5), ενώ η HACA είχε χάσει τελείως την ικανότητα να ακετυλιώνει τις ελεύθερες ιστόνες (Εικ.2Α, μεσαίο τμήμα).

Από τα παραπάνω πειράματα όμως είχε παρατηρηθεί ότι η ενζυμική ενεργότητα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών Gcn5 στις αντιδράσεις ακετυλίωσης σε διάλυμα, διαφοροποιούνταν ανάλογα με το ποσοστό καθαρότητας των πρωτεϊνών μετά τη διαδικασία της χρωματογραφίας μέσω Ni-NTA ρητίνης. Έτσι ένας πιο ακριβής τρόπος ελέγχου της ενεργότητας αυτών ήταν η διαδικασία ακετυλίωσης των ελεύθερων ιστονών μέσα σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (*in-gel* HAT activity assay), (Brownell and Allis, 1995). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των βακτηρίων που παρήγαγαν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που είχε ενσωματωμένες τις ιστόνες. Ακολούθησε επώαση του πηκτώματος με το [<sup>3</sup>H]-ακετυλο-συνένζυμο Α, στέγνωμα και σπινθηρογραφία. Ο έλεγχος της ενεργότητας HAT των μεταλλαγμένων μορφών Gcn5 και με αυτήν την τεχνική επιβεβαίωσε τον εξασθενημένο χαρακτήρα τους (Εικ.2B).

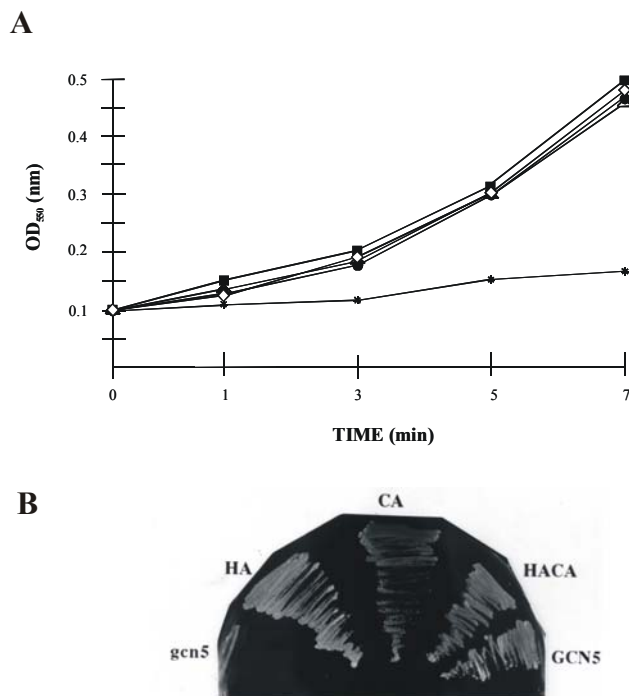


**Εικόνα 2. Δημιουργία μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5 με εξασθενημένη *in vitro* ενεργότητα HAT. (A) (Πάνω τμήμα)** Ανοσοεντοπισμός των καθαρισμένων πρωτεϊνών 6xHis-Gcn5, φυσικού τύπου (GCN5) ή μεταλλαγμένων (HA, CA, HACA), που χρησιμοποιήθηκαν ανά αντίδραση ακετυλίωσης μίγματος ελεύθερων ιστονών. Ο ανοσοεντοπισμός έγινε στο πάνω μέρος του πηκτώματος που αναλύθηκαν οι αντιδράσεις, με το αντίσωμα εναντίον των 6xHis. **(Μεσαίο τμήμα)** Σπινθηρογραφία προτύπου ακετυλίωσης των ελεύθερων ιστονών από τις παραπάνω πρωτεΐνες. **(Κάτω τμήμα)** Ανάλυση της θέσης μετακίνησης των τεσσάρων ιστονών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12% μετά τη χρώση τους με Coomassie Blue. **(B)** Σπινθηρογραφία προτύπου ακετυλίωσης των ενσωματωμένων στο πήκτωμα ελεύθερων ιστονών από τα ολικά εκχυλίσματα των βακτηρίων που παράγουν τις παραπάνω πρωτεΐνες 6xHis-Gcn5 (*in-gel* HAT assay). Σε όλες τις περιπτώσεις η σήμανση των ακετυλιωμένων ιστονών έγινε με [<sup>3</sup>H]-ακετυλο-συνένζυμο Α και η ανάλυσή τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12%.

## Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn5 είναι πλήρως λειτουργικές *in vivo*

Προκειμένου να διερευνηθούν οι *in vivo* ιδιότητες των διαφόρων μορφών του Gcn5, τα μεταλλαγμένα γονίδια εκφράστηκαν στο στέλεχος ζύμης *gcn5* και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες παράγονταν συντηγμένες με το πεπτιδίο LexA στο N-τελικό τους άκρο. Αυτό έδινε τη δυνατότητα ανοσοκατακρήμνισης αυτών από εκχυλίσματα κυττάρων ζύμης με το αντίσωμα εναντίον του πεπτιδίου LexA (βλ. παρακάτω). Αρχικά ελέγχθηκε η ικανότητα των γονιδίων αυτών να συμπληρώνουν τους φαινότυπους του στελέχους *gcn5*, αφού στο παρελθόν είχεδειχθεί ότι η συντηγμένη πρωτεΐνη LexA-Gcn5 είναι λειτουργική στη ζύμη (Georgakopoulos *et al.*, 1995). Δύο γνωστοί φαινότυποι του στελέχους αυτού είναι ο αργός ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων κάτω από όλες τις συνθήκες θρέψης και η ανικανότητα των κυττάρων να μεγαλώνουν κάτω από συνθήκες πείνας για αμινοξέα. Μια τέτοια συνθήκη πείνας για ιστιδίνη δημιουργείται σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν το συναγωνιστικό αναστολέα του προϊόντος του γονιδίου *HIS3*, 3-αμινο 1,2,4-τριαζόλη (AT). Στην Εικ.3Α φαίνεται

ότι και τα τρία μεταλλαγμένα γονίδια GCN5 συμπλήρωναν πλήρως τον αργό ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων *gcn5* σε κανονικές συνθήκες θρέψης. Πλήρως συμπλήρωναν και την αδυναμία του στελέχους *gcn5* να αναπτύσσεται σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν AT (Εικ.3B), παρά την φανερή μειωμένη ενεργότητα HAT των αντίστοιχων πρωτεϊνών *in vitro*.



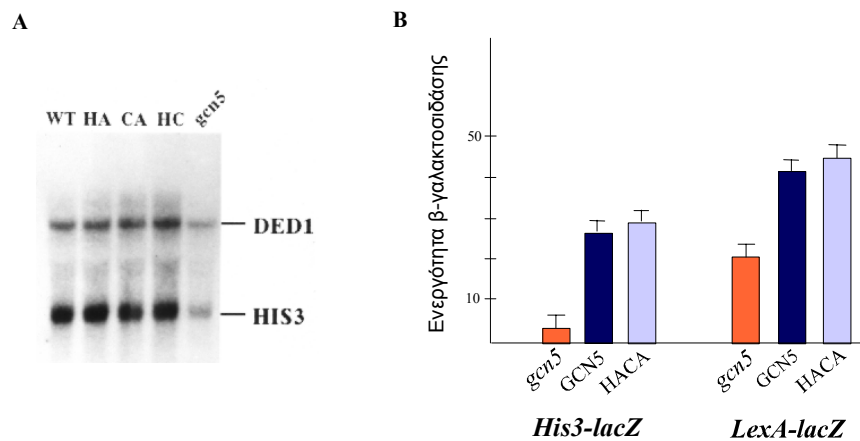
**Εικόνα 3. Τα μεταλλαγμένα γονίδια GCN5 συμπληρώνουν πλήρως τους φαινοτύπους ανάπτυξης ενός στελέχους *gcn5*. (A)** Ο εκθετικός ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών που παράγουν τις μεταλλαγμένες (●HA, ◊CA, ▲HACA) ή φυσικού τύπου (■) πρωτεΐνες LexA-Gcn5 σε σχέση με αυτόν του στελέχους *gcn5* (\*). **(B)** Ανάπτυξη των παραπάνω στελεχών σε τρυβλίο με ελάχιστο θρεπτικό μέσο (MIN) που περιέχει 10 mM AT (συνθήκες πείνας για ιστιδίνη).

### **Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn5 στηρίζουν πλήρως τη δράση του ενεργοποιητή Gcn4**

Ένας άλλος φαινότυπος του στελέχους *gcn5* είναι η μειωμένη ικανότητα του ενεργοποιητή Gcn4 να επάγει τη μεταγραφή σε γονίδια που απαιτούν τη δράση του (Georgakopoulos and Thireos, 1992). Έτσι, για περαιτέρω ποσοτικοποίηση των παραπάνω παρατηρήσεων ελέγχθηκε η δράση του Gcn4 παρουσία των διαφόρων μορφών του Gcn5. Στην περίπτωση αυτή οι πρωτεΐνες Gcn5 παράγονταν στη ζύμη χωρίς τη σύντηξη με το πεπτίδιο LexA στο N-τελικό τους άκρο. Αρχικά ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου *HIS3* τα οποία εξαρτώνται από το Gcn4 σε συνθήκες επαγωγής του (Struhl, 1985). Ανάλυση του ολικού RNA έδειξε ότι τα επαγόμενα επίπεδα έκφρασης του *HIS3* σε συνθήκες πείνας για αμινοξέα, παραμένουν αμετάβλητα σε όλα τα στελέχη *gcn5* που παράγουν τη φυσικού τύπου ή



τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn5 (Εικ.4Α). Το ίδιο αμετάβλητη παρέμενε και η έκφραση τεχνιτών γονιδίων αναφοράς που απαιτούσαν το Gcn4. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *HIS3-lacZ* η έκφραση του οποίου οδηγείται από τον υποκινητή του *HIS3* και επάγεται από το ενδογενές Gcn4 στις παραπάνω συνθήκες (Georgakopoulos and Thireos, 1992). Επίσης χρησιμοποιήθηκε ένα γονίδιο αναφοράς *LexA-lacZ* όπου η μεταγραφική ενεργοποίηση εξαρτάται από την παρουσία του LexA-Gcn4 στα κύτταρα. Η μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης που παραγόταν κατά τη μεταγραφή αυτών των γονιδίων αναφοράς, έγινε σε στελέχη απουσία του Gcn5 (*gcn5*) ή παρουσία των διαφόρων πρωτεϊνών Gcn5. Η Εικ.4Β δείχνει ότι όλες οι μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης Gcn5 υποστήριζαν πλήρως τη δράση του ενεργοποιητή Gcn4, όπως και η φυσικού τύπου πρωτεΐνη.



**Εικόνα 4. Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn5 υποστηρίζουν πλήρως την μεταγραφική ενεργοποίηση από το Gcn4 (A)** Ανάλυση ολικού RNA από στέλεχος *gcn5* και από στελέχη που παράγουν τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη (Gcn5) ή τις μεταλλαγμένες HA, CA και HACA. Η Gcn4-εξαρτώμενη επαγωγή του *HIS3* έγινε σε μέσο ανάπτυξης των κυττάρων που περιέχει 10 mM AT. Η ανίχνευση του mRNA του *HIS3* και η ποσοτικοποίησή του βάσει του μάρτυρα (control) mRNA του *DED1* έγινε με <sup>32</sup>P-ραδιοσημασμένο τμήμα DNA που αντιστοιχούσε στα γονίδια αυτά. **(B)** Μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης που παράγεται από τη Gcn4-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων αναφοράς *HIS3-lacZ* (σε συνθήκες επαγωγής με 10 mM AT) και *LexA-lacZ* (από το LexA-Gcn4) παρουσία των διαφόρων πρωτεϊνών Gcn5.

## Η ικανότητα των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5 να ακετυλιώνουν τις ιστόνες ενισχύεται όταν παράγονται παρουσία του Ada2

Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούσαν στο συμπέρασμα ότι πιθανώς η ενεργότητα HAT του Gcn5 να μην είναι απαραίτητη για την *in vivo* δράση του ως συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής. Έτσι ελέγχθηκε η ενζυμική ενεργότητα των μεταλλαγμένων μορφών του Gcn5 όταν αυτές ενσωματώνονται σε σύμπλοκο με άλλες πρωτεΐνες, όπως συμβαίνει στα κύτταρα. Αυτό έγινε με ανοσοκατακρήμιση

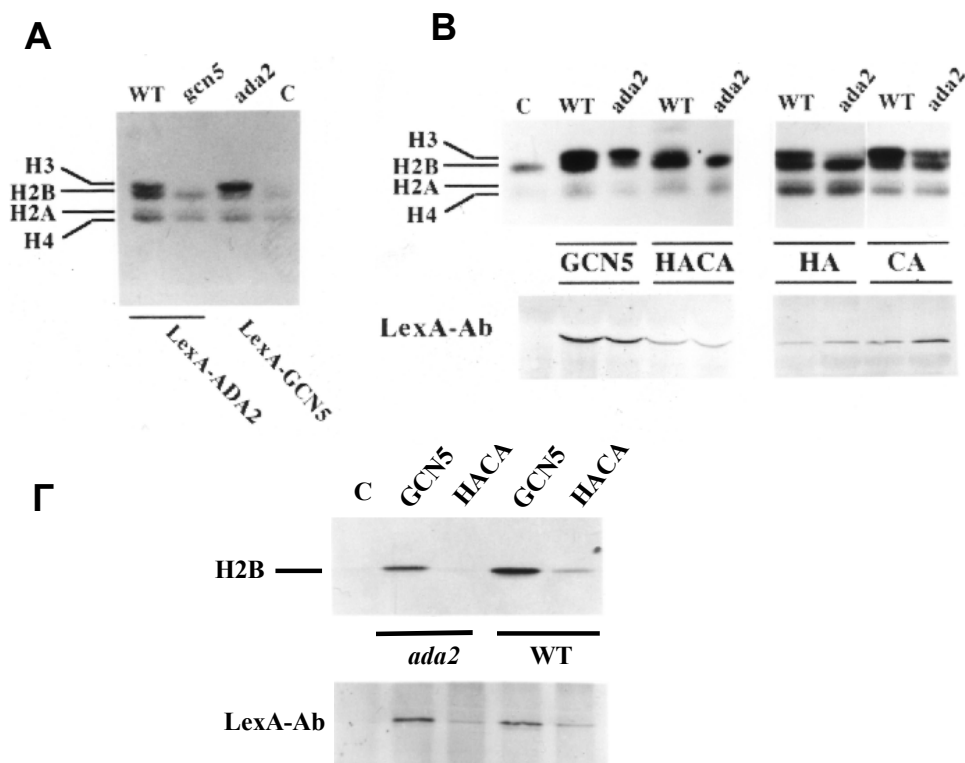
των αντίστοιχων συντηγμένων πρωτεϊνών LexA-Gcn5, από ολικό εκχύλισμα κυττάρων ζύμης, με το αντίσωμα εναντίον του LexA. Οι ανοσοκατακρημνισμένες πρωτεΐνες προσδέθηκαν λόγω συγγένειας σε σφαιρίδια Protein-A Sepharose και το μίγμα χρησιμοποιήθηκε σε αντιδράσεις ακετυλίωσης με υπόστρωμα μίγμα ελεύθερων ιστονών. Οι αντιδράσεις ακετυλίωσης (σε διάλυμα) και η ανάλυσή τους έγιναν όπως περιγράφηκαν πιο πάνω για τις ανασυνδυσασμένες πρωτεΐνες Gcn5.

Αρχικά ελέγχθηκε αν με την παραπάνω μέθοδο ανοσοκατακρημνίζονται πράγματι οι πρωτεΐνες με το σύμπλοκο που αυτές ανήκουν. Με βάση το γεγονός ότι οι συντηγμένες πρωτεΐνες φυσικού τύπου LexA-Gcn5 και LexA-Ada2 είναι λειτουργικές στη ζύμη, έγινε ανοσοκατακρήμνισή τους από τα στελέχη *ada2* και *gcn5ada2* που εξέφραζαν τα αντίστοιχα γονίδια.. Στην Εικ.5A φαίνεται ότι η κατακρήμνιση του LexA-Ada2 από στέλεχος *gcn5ada2*, έδωσε λόγω μεθόδου ένα ποσοστό ακετυλίωσης που ήταν μη-εξαρτώμενο από τα Gcn5 και Ada2 (διαδρομές 2 και 4). Παρουσία όμως του Gcn5 στα κύτταρα (διαδρομή 1) το ποσοστό ακετυλίωσης στις ιστόνες H3 και H2B σαφώς αυξανόταν, υποδηλώνοντας τη συν-κατακρήμνιση της ενδογενούς πρωτεΐνης Gcn5 με τη LexA-Ada2. Αυτό το πρότυπο ακετυλίωσης ήταν ποσοτικά και ποιοτικά διαφορετικό από αυτό που προέκυψε όταν η ανοσοκατακρήμνιση γινόταν μέσω του LexA-Gcn5 από στέλεχος *gcn5ada2* (διαδρομή 3). Εκεί η ακετυλίωση περιοριζόταν κυρίως στην ιστόνη H3, όπως γινόταν και *in vitro* για την ανασυνδυσασμένη πρωτεΐνη Gcn5. Το τελευταίο υποδηλώνει την ανοσοκατακρήμνιση σε αυτήν την περίπτωση της μη-συγκροτημένης στο σύμπλοκο πρωτεΐνης Gcn5.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η ενζυμική ενεργότητα των ανοσοκατακρημνισμένων συμπλόκων με τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες LexA-Gcn5. Όπως δείχνει η Εικ.5B (πάνω τμήμα), όταν τα σύμπλοκα περιείχαν την φυσικού τύπου πρωτεΐνη (GCN5) ήταν ικανά να ακετυλιώνουν την ιστόνη H3 είτε παρουσία (διαδρομή 2) είτε απουσία (διαδρομή 3) του Ada2, σε συμφωνία με την Εικ.5A. Αντίθετα, σύμπλοκα με τη μεταλλαγμένη μορφή HACA είχαν κάποια μικρή ενεργότητα ακετυλίωσης της H3 μόνο παρουσία του Ada2 σε αυτό (διαδρομές 4 και 5). Παρόμοια, η ενεργότητα των πρωτεϊνών HA και CA αυξάνονταν σημαντικά όταν αυτές παράγονταν παρουσία του Ada2 (διαδρομές 6-9). Για τον έλεγχο του ποσού των πρωτεϊνών Gcn5 στις αντιδράσεις ανοσοκατακρήμνισης και ακετυλίωσης, έγινε ανοσοεντοπισμός αυτών στο πάνω μισό του ίδιου πηκτώματος που είχαν αναλυθεί οι αντιδράσεις. Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε αυτή τη φορά ήταν εναντίον του πεπτιδίου LexA. Με αυτό τον τρόπο, από την Εικ.5B (κάτω τμήμα) συμπεραίνεται ότι οι παρατηρούμενες διαφορές στην ενεργότητα κάθε πρωτεΐνης στα δύο στελέχη, δεν οφείλονται σε

σημαντικές ποσοτικές διαφορές αλλά αντανακλούν την ειδική ενεργότητα κάθε πρωτεΐνης.

Λόγω του μη-εξαρτώμενου από το Gcn5 ποσοστού ακετυλίωσης, που δίνει η παραπάνω μέθοδος (Εικ.5Α, διαδρομή 4) είναι δύσκολο να μετρηθούν διαφορές στην ακετυλίωση της ιστόνης H2B. Για να ξεπεραστεί αυτό, ελέγχθηκε η ενεργότητα HAT κάθε ανοσοκατακρημνισμένου συμπλόκου χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα μόνο την H2B. Το πρότυπο ακετυλίωσης που προέκυψε (Εικ.5Γ, πάνω τμήμα) σε σχέση με τις ποσότητες των ενζύμων ανά αντίδραση (Εικ.5Γ, κάτω τμήμα) επιβεβαίωσε ότι η πρωτεΐνη HACA είναι ανενεργή όταν παράγεται απουσία του Ada2. Αντίθετα, επανακτά μέρος της ενεργότητάς της όταν παράγεται παρουσία του Ada2 και επομένως συγκροτείται σε σύμπλοκο. Ανάλογα συμπεράσματα με τη μορφή HACA έδωσαν και οι αντιδράσεις ακετυλίωσης της H2B με τις υπόλοιπες μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn5.

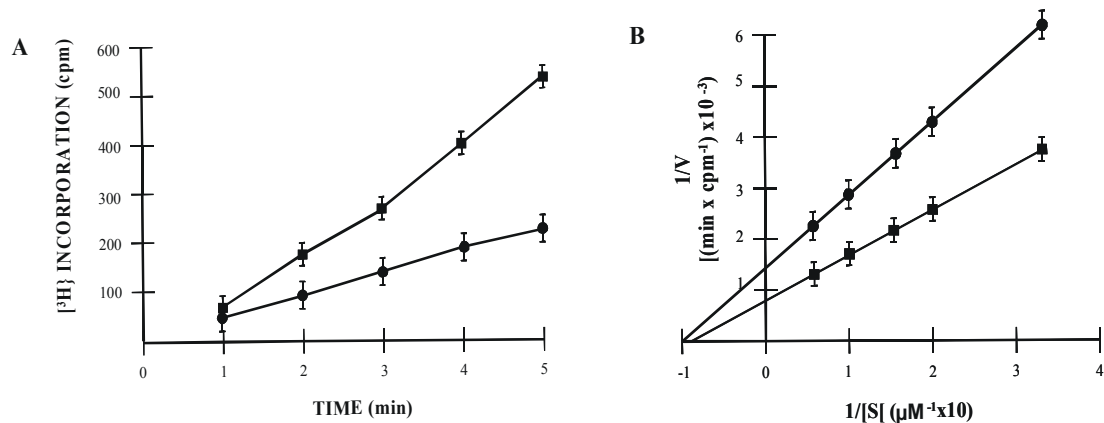


**Εικόνα 5. Ενίσχυση της ενεργότητας HAT σε ελεύθερες ιστόνες των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5 όταν συγκροτούνται σε σύμπλοκο. (Α)** Σπινθηρογραφία προτύπου ακετυλίωσης των ελεύθερων ιστονών από ανοσοκατακρημνισμένα σύμπλοκα των πρωτεϊνών LexA-Ada2 και LexA-Gcn5. Η ανοσοκατακρήμνιση έγινε από στέλεχος *ada2* μετασηματισμένο με το γονίδιο *LexA-ADA2* (WT) και στέλεχος *ada2gcn5* μετασηματισμένου με το *LexA-ADA2* (*gcn5*) ή με το *LexA-GCN5* (*ada2*). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα μη-μετασηματισμένου στελέχους *ada2gcn5* (C). **(Β) (Πάνω τμήμα)** Σπινθηρογραφία προτύπου ακετυλίωσης των ελεύθερων ιστονών από τα ανοσοκατακρημνισμένα σύμπλοκα των πρωτεϊνών LexA-Gcn5 και LexA-HACA, από στελέχη *gcn5* (WT) ή *ada2gcn5* (*ada2*). **(Κάτω τμήμα)** Ανοσοεντοπισμός των LexA-συντηγμένων πρωτεϊνών που

χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω αντιδράσεις ακετυλίωσης. **(Γ) (Πάνω τμήμα)** Σπινθηρογραφία προτύπου ακετυλίωσης της ιστόνης H2B από τα ανοσοκατακρημνισμένα σύμπλοκα των πρωτεϊνών LexA-Gcn5 και LexA-HACA, από στελέχη *gcn5* (WT) ή *ada2gcn5* (*ada2*). **(Κάτω τμήμα)** Ανοσοεντοπισμός των LexA-συντηγμένων πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στις πιο πάνω αντιδράσεις ακετυλίωσης. Η ανοσοκατακρήμνηση και ο ανοσοεντοπισμός έγινε με το αντίσωμα LexA. Η σήμανση των ακετυλιωμένων ιστονών έγινε με [<sup>3</sup>H]-ακετυλο-συνένζυμο Α και η ανάλυσή τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12%.

## **Η παρουσία του Ada2 αυξάνει τον ρυθμό κατάλυσης HAT των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5**

Για να διευκρινιστεί ποια ενζυμική ιδιότητα του Gcn5 βελτιωνόταν παρουσία της πρωτεΐνης Ada2, έγιναν κινητικές ενζυματικές αναλύσεις χρησιμοποιώντας τα ανοσοκατακρημνισμένα σύμπλοκα της μορφής LexA-HA από τα στελέχη *gcn5* και *gcn5ada2*. Αυτό επιλέχθηκε επειδή η παραγόμενη πρωτεΐνη ήταν μετρήσιμα ενεργή στο στέλεχος *gcn5ada2*, αντίθετα με τη LexA-HACA. Τα κινητικά πειράματα εκτελέστηκαν χρησιμοποιώντας κορεσμένες ποσότητες του [<sup>3</sup>H]-ακετυλο-συνενζύμου Α και ισοδύναμες ποσότητες του ενζύμου από τα δύο στελέχη, όπως πιστοποιήθηκε με ανοσολογική ανάλυση. Χρησιμοποιώντας την ιστόνη H3 ως υπόστρωμα, προσδιορίστηκε αρχικά ότι το επίπεδο κορεσμού του υποστρώματος για το ανοσοκατακρημνισμένο ένζυμο και από τα δύο στελέχη ήταν το ίδιο (20 μM). Σε αυτή την συγκέντρωση υποστρώματος υπολογίστηκε ο ρυθμός κατάλυσης μέσω χρονικής ανάλυσης. Όπως δείχνει η Εικ.6Α ο ρυθμός αυτός μειωνόταν αισθητά (περίπου στο μισό) όταν η πρωτεΐνη HA παράγονταν απουσία του Ada2. Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκε και στις δύο περιπτώσεις, ο ρυθμός ενσωμάτωσης της ραδιενέργειας για διαφορετικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος. Το διάγραμμα του διπλού αντιστρόφου αυτών των μετρήσεων (Εικ.6B) δείχνει ότι, αν και οι τιμές της μέγιστης ταχύτητας  $V_{max}$  για τα δύο ένζυμα διέφεραν σημαντικά, η τιμές της σταθεράς Michaelis ( $K_m$ ) ήταν ισοδύναμες (~10 μM). Από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι, όταν στη ζύμη παράγεται η μορφή HA του Gcn5 παρουσία της πρωτεΐνης Ada2, ενισχύεται ο ρυθμός της ενζυμικής κατάλυσης ενώ δεν επηρεάζεται η ικανότητα αναγνώριση του υποστρώματος.



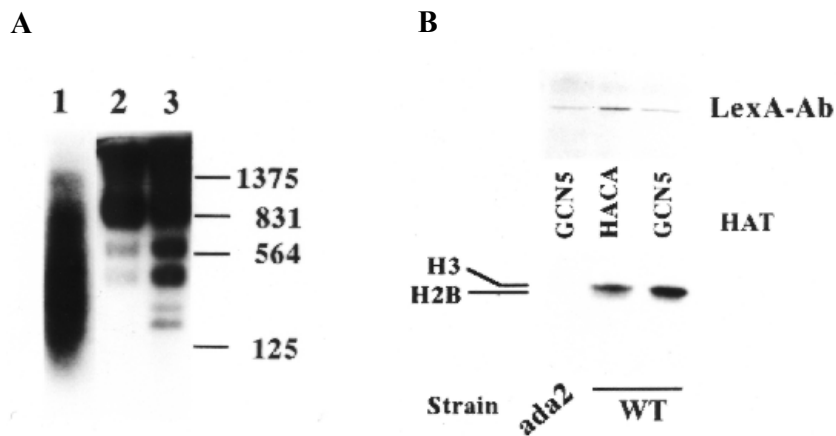
**Εικόνα 6. Ενίσχυση του ρυθμού κατάλυσης της ανοσοκατακρημνισμένης πρωτεΐνης LexA-HA παρουσία του Ada2, σε ελεύθερες ιστόνες. (Α)** Ρυθμός ενσωμάτωσης της [<sup>3</sup>H]-ακετυλομάδας σε αντιδράσεις ακετυλίωσης από την ανοσοκατακρημνισμένη πρωτεΐνη LexA-HA χρησιμοποιώντας κορεσμένες συγκεντρώσεις υποστρώματος ιστόνης H3. Η ανοσοκατακρήμνιση έγινε με το αντίσωμα LexA από στελέχη *gcn5* (■) ή *gcn5ada2* (●) και η μέτρηση της ενσωματωμένης ραδιενέργειας κατά τη χρονική ανάλυση της αντίδρασης ακετυλίωσης έγινε σε σπινθηρηστή κρούσεων. **(Β)** Διάγραμμα του διπλού αντιστρόφου της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε σχέση με το ρυθμό ενσωμάτωσης της ραδιενέργειας των παραπάνω αντιδράσεων ακετυλίωσης.

### Η ενεργότητα HAT των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5 ενισχύεται περαιτέρω με τη χρήση νουκλεοσωμικών υποστρωμάτων

Από τα μέχρι τώρα δεδομένα συμπεραίνεται ότι, η παρατηρούμενη μερική ενζυμική ενεργότητα της μορφής HACA του Gcn5 όταν ενσωματώνεται σε σύμπλοκο με άλλες πρωτεΐνες είναι ικανή για την πλήρη δράση του συμπλόκου αυτού *in vivo*. Θεωρώντας ότι τα φυσιολογικά υποστρώματα του SAGA είναι οι νουκλεοσωμικές ιστόνες ελέγχθηκε σε αυτά τα υποστρώματα η ενεργότητα των συμπλόκων που περιείχαν είτε τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη Gcn5 ή τη μεταλλαγμένη μορφή HACA. Έγινε *in vitro* ανασυγκρότηση νουκλεοσωμάτων με τη μέθοδο της διαπίδυσης σε κλίση αλατιού, χρησιμοποιώντας καθαρισμένες ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4. Τα υποστρώματα ήταν κομμάτια DNA μήκους 200-bp ή 1100-bp για τη δημιουργία μονο- ή ολιγο-νουκλεοσωμάτων αντίστοιχα. Ο σχηματισμός νουκλεοσωμάτων επιβεβαιώθηκε μετά από μερική πέψη με μικροκοκκική νουκλεάση (MNase I) και ανίχνευση του προτύπου πέψης με υβριδοποίηση. Η Εικ.7Α δείχνει αυτό το πρότυπο πέψης όπου διακρίνονται τα τμήματα DNA που αντιστοιχούσαν σε μονο- ως τετρα-νουκλεοσώματα.

Αυτές οι ανασυγκροτημένες σειρές νουκλεοσωμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα σε αντιδράσεις ακετυλίωσης, με ανοσοκατακρημνισμένες πρωτεΐνες LexA-Gcn5 ή LexA-HACA από στελέχη φυσικού τύπου ή *ada2*. Όπως φαίνεται στην Εικ.7B και οι δύο πρωτεΐνες ακετυλίωσαν την ιστόνη H3 στα ολιγο-νουκλεοσωμικά υποστρώματα, και σε λιγότερο βαθμό στην H2B, αλλά μόνο όταν παραγόταν στα

κύτταρα και η πρωτεΐνη Ada2. Μάλιστα οι παρατηρούμενες διαφορές στην αποτελεσματικότητα ακετυλίωσης των ελεύθερων ιστονών μεταξύ των δύο μορφών Gcn5 ελαχιστοποιούνται με τη χρήση νουκλεοσωμικών υποστρωμάτων. Επομένως, πάλι η ενσωμάτωση των πρωτεϊνών Gcn5 στα φυσικά τους σύμπλοκα ενισχύει την HAT ενεργότητά τους, με ακόμη εντονότερο τρόπο όταν αυτή εφαρμόζεται στα φυσιολογικά υποστρώματα των συμπλόκων. Ενδιαφέρον είναι ότι τα παραπάνω ανοσοκατακρημνισμένα σύμπλοκα ήταν ανίκανα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες αντίδρασης, να ακετυλιώσουν *in vitro* ανασυγκροτημένα μονο-νουκλεοσώματα. Η αδυναμία αυτή είχε αναφερθεί και για τα βιοχημικά απομονωμένα σύμπλοκα του Gcn5, όπως συμφωνεί με αυτά και η παρατηρούμενη εξειδίκευση ακετυλίωσης των παραπάνω ανοσοκατακρημνισμένων συμπλόκων για τις νουκλεοσωμικές ιστόνες (Grant *et al.*, 1997).



**Εικόνα 7. Περαιτέρω ενίσχυση της ενεργότητας HAT του συμπλόκου της πρωτεΐνης LexA-HACA σε *in vitro* ανασυγκροτημένες σειρές νουκλεοσωμάτων. (A)** Πρότυπο πένης των *in vitro* ανασυγκροτημένων oligo-νουκλεοσωμάτων με μικροκοκκική νουκλεάση (MNase I). Το ανασυγκροτημένο DNA επώαστηκε είτε μετά την αφαίρεση των πρωτεϊνών από το δείγμα με 0.015 units/μl ενζύμου (διαδρομή 1) είτε με δύο συγκεντρώσεις του ενζύμου (0.015 units/μl στη διαδρομή 2 ή 0.03 units/μl στη διαδρομή 3). Στη συνέχεια αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης, μεταφέρθηκε σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και το πρότυπο πένης ελέγχθηκε με υβριδοποίηση. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε ένα  $^{32}\text{P}$ -ραδιοσημασμένο τμήμα του υποστρώματος DNA στην αντίδραση ανασυγκρότησης νουκλεοσωμάτων. Η θέση των μοριακών βαρών (σε bp) αντιστοιχεί στο πρότυπο πένης του λ DNA με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoRI-HindIII*. **(B) (Πάνω τμήμα)** Ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών LexA-Gcn5 (GCN5) και LexA-HACA (HACA) που χρησιμοποιήθηκαν στις παρακάτω αντιδράσεις ακετυλίωσης. **(Κάτω τμήμα)** Σπινθηρογραφία προτύπου ακετυλίωσης των νουκλεοσωμικών ιστονών από τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών LexA-Gcn5 και LexA-HACA που ανοσοκατακρημνίστηκαν από στελέχη *gcn5* (WT) ή *ada2gcn5* (*ada2*). Ο ανοσοεντοπισμός όπως και η κατακρήμνιση έγιναν με το αντίσωμα LexA. Η σήμανση των ακετυλιωμένων ιστονών έγινε με [ $^3\text{H}$ ]-ακετυλο-συνένζυμο A και η ανάλυσή τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12%.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της διερεύνησης του ρόλου και τρόπου ρύθμισης της ενζυμικής ενεργότητας του Gcn5 αποκτήθηκαν τρεις εξασθενημένες, ως προς την ενεργότητα HAT, μορφές της πρωτεΐνης. Από αυτές οι δύο είχαν σημαντικά μειωμένη ικανότητα ακετυλίωσης των ελεύθερων ιστονών *in vitro*, ενώ η τρίτη είχε χάσει τελείως αυτήν την ιδιότητα. Παρά όμως αυτή τους την αδυναμία, όλες ήταν πλήρως λειτουργικές στη ζύμη. Αυτό προέκυψε συγκρίνοντας τους μέχρι σήμερα γνωστούς φαινοτύπους των στελεχών *gcn5* όταν παράγονταν οι διάφορες πρωτεΐνες Gcn5, μεταλλαγμένες ή φυσικού τύπου. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες Gcn5 ήταν ικανές να υποστηρίξουν τον φυσιολογικό ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων σε όλα τα θρεπτικά μέσα και σε συνθήκες πείνας για αμινοξέα. Επίσης υποστήριζαν πλήρως και τη μεταγραφική επαγωγή φυσικών ή τεχνητών γονιδίων από τον ενεργοποιητή Gcn4. Τα παραπάνω έρχονταν φαινομενικά σε αντίθεση με τη γενική αντίληψη ότι η ενεργότητα HAT του Gcn5 είναι απαραίτητη για την *in vivo* δράση του ως συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής κάποιων γονιδίων.

Προκειμένου να μετρηθεί η ενεργότητα του Gcn5 σε συνθήκες που ανταποκρίνονται πιο πολύ στην *in vivo* κατάσταση, δοκιμάστηκε η μέθοδος της ακετυλίωσης ελεύθερων ιστονών από ανοσοκατακρημνισμένα σύμπλοκα του Gcn5. Αυτά απομονώθηκαν με αντίσωμα LexA από εκχυλίσματα διαφόρων στελεχών ζύμης, που περιείχαν τις πρωτεΐνες LexA-Ada2 ή LexA-Gcn5. Το πρότυπο ακετυλίωσης των ιστονών από τα μόρια του Gcn5 που ανοσοκατακρημνίζονταν σε σύμπλοκο με την πρωτεΐνη Ada2 ήταν ποσοτικά και ποιοτικά διαφορετικό από αυτό των μη-συγκροτημένων σε σύμπλοκο μορίων Gcn5. Στην τελευταία περίπτωση η ακετυλίωση περιοριζόταν κυρίως στην ιστόνη H3, όπως και για την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Gcn5, ενώ στην πρώτη περίπτωση η ενεργότητα του συμπλόκου επεκτεινόταν και στην H2B. Έτσι ελέγχθηκαν οι ενζυμικές ιδιότητες των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5 όταν αυτές ενσωματώνονταν σε σύμπλοκα μέσα στα κύτταρα. Με ανοσοκατακρήμνιση τους με αντίσωμα LexA και μέτρηση της ενεργότητάς τους σε υπόστρωμα ελεύθερων ιστονών παρατηρήθηκαν διαφορές στην ενεργότητα αυτών, ανάλογα αν παράγονταν στα κύτταρα παρουσία ή απουσία της πρωτεΐνης Ada2. Συγκεκριμένα:

- (1) Όταν οι μεταλλαγμένες μορφές CA και HA παράγονταν απουσία του Ada2, είχαν την ίδια εξειδίκευση υποστρώματος όπως και η φυσικού τύπου πρωτεΐνη Gcn5 αλλά σαφώς μειωμένη ενεργότητα από αυτήν. Δραματικότερη μείωση από τις δύο είχε η μορφή HA ενώ η τρίτη μορφή HACA δεν έδειχνε καθόλου ενεργότητα όταν κατακρημνιζόταν από στέλεχος *ada2*. Αυτό εξηγείται από την ενεργότητα των αντίστοιχων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών καθώς απουσία του Ada2 οι παραπάνω πρωτεΐνες Gcn5 ανοσοκατακρημνίζονται σε μη-συγκροτημένη σε σύμπλοκο μορφή.
- (2) Όταν οι πρωτεΐνες παράγονταν στη ζύμη παρουσία της Ada2 το πρότυπο των ακετυλιωμένων ιστονών άλλαζε δραστικά. Η ικανότητα ακετυλίωσης των ιστονών H3

και H2B από τα ανοσοκατακρημνισμένα σύμπλοκα της HA, και σε μικρότερο βαθμό της CA, αυξήθηκε σημαντικά ενώ παρατηρήθηκε ενεργότητα ακόμη και για τα σύμπλοκα της πρωτεΐνης HACA. Η ικανότητα ακετυλίωσης βέβαια των συμπλόκων των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών ήταν μικρότερη από την αντίστοιχη του συμπλόκου με τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη Gen5. Ακόμη όμως και στην τελευταία περίπτωση παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση στην ενεργότητα της πρωτεΐνης όταν παράγονταν παρουσία του Ada2. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποκαλύπτουν ένα ρυθμιστικό ρόλο για το Ada2 στην ενζυμική ενεργότητα των συμπλόκων του Gen5.

Στοιχεία που συνηγορούν στο συμπέρασμα ότι η αύξηση της ενεργότητας HAT των διαφόρων μορφών του Gen5 παρουσία της πρωτεΐνης Ada2 οφείλεται στη συγκρότηση των μορίων Gen5 μέσα στα φυσικά τους σύμπλοκα είναι: **(α)** Η φυσική αλληλεπίδραση του Gen5 με την πρωτεΐνη Ada2, όπως έχει δειχθεί τόσο *in vitro* με ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες όσο και *in vivo* με πειράματα δύο-υβριδίων (two-hybrid assays) ή ανοσοκατακρήμισης (Marcus *et al.*, 1994, Horiuchi *et al.*, 1995, Candau *et al.*, 1996). **(β)** Η έλλειψη της δομικής περιοχής ADA της πρωτεΐνης Gen5 (Εικ.1), την καθιστά *in vivo* μη-λειτουργική (Candau *et al.*, 1997). **(γ)** Βιοχημικά καθαρισμένα σύμπλοκα του Gen5 απαιτούν για την ακεραιότητα και την *in vitro* ενεργότητά τους σε νουκλεοσωμικά υποστρώματα, την πρωτεΐνη Ada2 (Grant *et al.*, 1997). Καθώς δεν έχουν αναφερθεί άλλες άμεσες αλληλεπιδράσεις του Gen5 ένας πιθανός ρόλος του Ada2 ίσως είναι η ενσωμάτωση του Gen5 στα σύμπλοκα SAGA.

Η συγκρότηση των μορίων Gen5 μέσα στα φυσικά τους σύμπλοκα οδηγεί σε ενδυνάμωση της ενεργότητας HAT αυτών, είτε λόγω αύξησης του ρυθμού κατάλυσης είτε λόγω βελτίωσης της ικανότητας αναγνώρισης του υποστρώματος. Για να διευκρινιστεί τι από τα δύο ισχύει, αναλύθηκαν οι ενζυμικές ιδιότητες των μη-συγκροτημένων έναντι των συγκροτημένων σε σύμπλοκο, μορίων της μορφής HA, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ελεύθερες ιστόνες. Η κινητική ανάλυση έδειξε ότι τα συγκροτημένα μόρια είχαν αυξημένο ρυθμό κατάλυσης αλλά σχεδόν ίδιες τιμές της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ ), με τα μη-συγκροτημένα μόρια. Αυτό σημαίνει ότι και τα δύο μπορούν να αναγνωρίσουν τα υποστρώματα των ιστονών με την ίδια αποτελεσματικότητα. Παρόμοια αποτελέσματα αποκτήθηκαν και με τη μεταλλαγμένη μορφή CA, ενώ η ενσωμάτωση ακόμη και της φυσικού τύπου πρωτεΐνης στα σύμπλοκα οδηγούσε σε αυξημένο ρυθμό κατάλυσης. Βέβαια τα επίπεδα της κατάλυσης από τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών HA και CA ποτέ δεν έφτασαν τα επίπεδα από τα σύμπλοκα με τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη. Έτσι φαίνεται ότι, η παρατηρούμενη ενδυνάμωση της ενζυμικής ενεργότητας των μεταλλαγμένων μορφών του Gen5 μάλλον αντανάκλα τις αλλαγές στη στερεοδιάταξη που προκαλεί η



ανασυγκρότησή τους στα σύμπλοκα και δεν αφορά την πλήρη κατάργηση του μεταλλαγμένου χαρακτήρα τους.

Η χρησιμοποίηση στη συνέχεια *in vitro* ανασυγκροτημένων ολιγονουκλεοσωμάτων ως υπόστρωμα ακετυλίωσης, ενίσχυσε ακόμη περαιτέρω την ενζυμική ενεργότητα της συγκροτημένης στα σύμπλοκα μορφής HACA. Υποθέτοντας ότι τα νουκλεοσώματα είναι τα φυσιολογικά υποστρώματα των πρωτεϊνών Gcn5, αυτή η παρατήρηση είναι συνεπής με το γεγονός ότι η μεταλλαγμένη μορφή HACA είναι *in vivo* πλήρως λειτουργική. Έτσι φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με τα νουκλεοσώματα προκαλεί κάποιες δομικές αλλαγές στο σύμπλοκο που ενισχύουν ακόμη περαιτέρω την ενζυμική ενεργότητα της καταλυτικής υπομονάδας Gcn5. Πράγματι μετέπειτα μελέτες στη ζύμη έδειξαν ότι, η ενσωμάτωση του Gcn5 μέσα στα φυσικά του σύμπλοκα επεκτείνει την εξειδίκευση του ενζύμου για το υπόστρωμα, ακετυλιώνοντας κατάλοιπα λυσινών της ιστόνης H3 (σε ελεύθερη ή νουκλεοσωμική μορφή) που δεν ακετυλιώνονταν από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη (Grant *et al.*, 1999).

Ανάλογη αύξηση της ενεργότητας και εξειδίκευσης του ενζύμου μέσα στο φυσικό του σύμπλοκο, έχει αναφερθεί και για την ομόλογη πρωτεΐνη του Gcn5 στα θηλαστικά, την PCAF (Ogryzko *et al.*, 1998). Άλλα παραδείγματα είναι η αύξηση της ενεργότητας ATPάσης του Swi2/Snf2 της ζύμης και η ενδυνάμωση της ενεργότητας αναδιαμόρφωσης των νουκλεοσωμάτων (remodeling activity) από τις ATPάσεις BRG1 και hBRM του ανθρώπου, όταν βρίσκονται στα σύμπλοκα SWI/SNF (Cairns *et al.*, 1996b, Phelan *et al.*, 1999). Ρύθμιση της ενεργότητας πρωτεϊνών μέσω της συγκρότησής τους στα φυσικά τους σύμπλοκα έχει αναφερθεί και στις περιπτώσεις των CDK κινασών από τις κυκλίνες (Morgan, 1997). Επίσης η ρύθμιση της ενεργότητας κινάσης αλλά και ATPάσης του TFIIH από το TFIIE (Orphanides *et al.*, 1996). Τέλος, η ενεργότητα της κυτοπλασματικής Hat1 της ζύμης ενδυναμώνεται παρουσία της υπομονάδας Hat2, που σχετίζεται με την αναγνώριση του υποστρώματος (Parthun *et al.*, 1996).

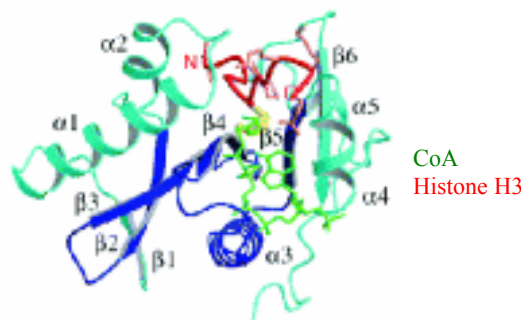
Η τακτική των κατευθυνόμενων μεταλλαγών σε κατάλοιπα απόλυτα συντηρημένα μέσα στην ορθόλογη οικογένεια των N-ακετυλο-τρανσφερασών (NATs) δεν απάντησε το αρχικό ερώτημα που αφορούσε την αναγκαιότητα της ενζυμικής ενεργότητας του Gcn5 για την μεταγραφική ενεργοποίηση από αυτό. Παράλληλες μελέτες όμως ακολούθησαν την τακτική των σαρωτικών μεταλλαγών που κατευθύνονταν σχεδόν σε όλο το μήκος της περιοχής HAT του Gcn5 (Kuo *et al.*, 1998 και Wang *et al.*, 1998). Αν και η πλειοψηφία των μεταλλαγών αυτών συμπλήρωναν κανονικά τους φαινοτύπους του στελέχους *gcn5*, κάποιες από αυτές

μείωναν την *in vitro* ενεργότητα HAT των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Από αυτές ένα ποσοστό (~30%) είχαν και *in vivo* επίδραση, καθώς δε συμπλήρωναν τον αργό ρυθμό ανάπτυξης του στελέχους *gcn5* και δεν υποστήριζαν τη μεταγραφική ενεργοποίηση κατάλληλων γονιδίων-στόχων από όξινο ενεργοποιητές. Όπως δείχθηκε η αδυναμία ενεργοποίησης αυτών των γονιδίων οφειλόταν πράγματι σε αδυναμία ακετυλίωσης των ιστονών στην περιοχή των υποκινητών τους, από αυτές τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn5 (Kuo *et al.*, 1998). Έτσι προσδιορίστηκαν κάποια συγκεκριμένα κατάλοιπα που ήταν απαραίτητα για την ενζυμική ενεργότητα και την *in vivo* δράση του Gcn5, ενώ ταυτόχρονα δείχθηκε ότι οι ιστόνες στην περιοχή των υποκινητών αποτελούν ένα φυσιολογικό υπόστρωμα του ενζύμου.

Ο ρόλος των παραπάνω καταλοίπων στην ενζυμική δραστηριότητα του Gcn5 διευκρινίστηκε περαιτέρω με τη λύση της δομής της περιοχής HAT. Αρχικά λύθηκε η κρυσταλλική δομή της περιοχής HAT από τις πρωτεΐνες Gcn5 της ζύμης και P/CAF του ανθρώπου ((Trievel *et al.*, 1999, Clements *et al.*, 1999). Ακολούθησε η λύση της καταλυτικής περιοχής του Gcn5 από τη *Tetrahymena* (tGcn5) πρώτα σε διάλυμα και μετά με τη δημιουργία κρυστάλλων, παρουσία του ακετυλο-συνενζύμου A (Lin *et al.*, 1999, Rojas *et al.*, 1999). Στην τελευταία περίπτωση οι κρύσταλλοι περιείχαν προσδεμένο εκτός από το ακετυλο-συνένζυμο A και ένα πεπτίδιο ιστόνης H3 (Εικ.8). Σε όλες τις περιπτώσεις το χαρακτηριστικό της καταλυτικής περιοχής είναι ότι περιλαμβάνει α-ελικοειδείς και β-πτυχωτές δομές που ορίζουν δύο λειτουργικά μέρη, ένα N- και ένα C-τελικό, με μια υδρόφοβη επιφάνεια μεταξύ τους. Η περιοχή πρόσδεσης του CoA βρίσκεται σε αυτήν την υδρόφοβη σχισμή και περιλαμβάνει τα μοτίβα αλληλουχιών A, B και D, που είναι συντηρημένα σε όλες τις σχετικές με το Gcn5 NATs (Gcn5-related NATs ή GNATs).

Συγκεκριμένα η αλληλουχία αναγνώρισης του CoA (QxxGxG) εντοπίζεται στο μοτίβο A ενώ άλλες περιοχές αλληλεπίδρασης αφορούν κατάλοιπα στο μοτίβο B και στο N-τελικό μέρος. Συγκρίνοντας τις δομές της περιοχής HAT του tGcn5 χωρίς ή με προσδεμένο CoA, φάνηκε ότι η δέσμευση του συνενζύμου προκαλεί μικρές δομικές αλλαγές στην πρωτεΐνη, οι οποίες επιτρέπουν στη συνέχεια τη δέσμευση του υποστρώματος. Πολλές από τις περιοχές αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με το υπόστρωμα (πεπτίδιο H3) ήταν γειτονικές ή αλληλοεπικαλυπτόμενες με τις περιοχές αλληλεπίδρασης με το συνένζυμο, στα μοτίβα A και B κυρίως. Η επιβεβαίωση του ρόλου αυτών των περιοχών στην ενζυμική ενεργότητα του Gcn5 προερχόταν από τις παραπάνω μελέτες των σαρωτικών κατευθυνόμενων μεταλλαγών (Kuo *et al.*, 1998 and Wang *et al.*, 1998), όπου οι μεταλλαγές που επηρέαζαν δραματικά την *in vitro*

και *in vivo* ενζυμική δράση του Gcn5 εντοπίζονταν στα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν άμεσα με το συνένζυμο ή το υπόστρωμα ή και τα δύο.



**Εικόνα 8. Δομή του τριμερούς συμπλόκου ενζύμου-συνενζύμου-ιστόνης (tGcn5/CoA/H3).** Λύση της κρυσταλλικής δομής της καταλυτικής περιοχής HAT του Gcn5 από τη *Tetrahymena* (tGcn5), προσδεμένης με το ακετυλο-συνένζυμο A και ένα πεπτίδιο ιστόνης H3 (Rojas *et al.*, 1999).

Σχετικά με τον μηχανισμό κατάλυσης της ακετυλίωσης των ιστονών, κινητικές μελέτες του ενζύμου Gcn5 της ζύμης έδειξαν ότι αφορά την άμεση προσβολή του ακετυλο-συνενζύμου από τη λυσίνη (Lys-14) του υποστρώματος H3 (Tanner *et al.*, 1999). Γίνεται δηλαδή άμεση μεταφορά της ακετυλομάδας στο υπόστρωμα μέσω του σχηματισμού ενός τριμερούς συμπλόκου ενζύμου-συνενζύμου-ιστόνης (Gcn5/CoA/H3) και όχι ενδιάμεση μεταφορά πρώτα στο ένζυμο και μετέπειτα στο υπόστρωμα. Βέβαια αυτός ο καταλυτικός μηχανισμός προϋποθέτει την προηγούμενη αποπρωτονίωση της  $\epsilon$ -αμινομάδας της λυσίνης για να ενεργοποιηθεί, αφού στις φυσιολογικές τιμές του pH αυτή είναι πρωτονιωμένη και ανενεργή. Το κατάλοιπο που είναι υπεύθυνο για την αποπρωτονίωση προσδιορίστηκε ότι ήταν το γλουταμινικό οξύ Glu-173 (E173), δικαιολογώντας και την δραματική επίπτωση των μεταλλαγών του (Wang *et al.*, 1998) στην ενζυμική ενεργότητα του Gcn5.

Από την τρισδιάστατη δομή του τριμερούς tGcn5/CoA/H3 φάνηκε ότι σημαντικά για την αναγνώριση του υποστρώματος, ιστόνης H3, είναι και τα κατάλοιπα που βρίσκονται γύρω από τον κύριο στόχο δράσης του ενζύμου που είναι η λυσίνη-14. Έτσι τα κατάλοιπα γλυκίνη-13 και προλίνη-16 συμμετέχουν στην εξειδίκευση του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα ορίζοντας το μοτίβο αναγνώρισης G-K14-X-P στην ιστόνη H3 (Rojas *et al.*, 1999). Στην ίδια όμως κοιλότητα πρόσδεσης του υποστρώματος, βρίσκεται και ένα κατάλοιπο σερίνης (Ser-10) η φωσφορυλίωση της οποίας είχεδειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου αλλά και στη μεταγραφή γονιδίων, στα θηλαστικά (Cheung *et al.*, 2000). Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν ότι η φωσφορυλίωση της Ser-10 αυξάνει την ταχύτητα αναγνώρισης του υποστρώματος H3 από τις HAT yGcn5, PCAF και

p300, επάγοντας την ακετυλίωση της Lys-14 από αυτά. Μάλιστα προσδιορίστηκε ότι η αργινίνη R164 του  $\gamma$ Gcn5 είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του ενζύμου με τη Ser-10 της ιστόνης H3 και μεταλλαγές σε αυτό το κατάλοιπο επηρεάζουν τη μεταγραφική δράση του Gcn5 σε ένα υποσύνολο υποκινητών που απαιτούν τη δράση του (Lo *et al.*, 2000, Cheung *et al.*, 2000). Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι μέσα στα κύτταρα υπάρχουν διάφοροι τρόποι ρύθμισης της ενεργότητας HAT του Gcn5, η οποία είναι απαραίτητη για την *in vivo* δράση του.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Η ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ  
ΕΞΑΡΤΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΕΝΗ  
ΔΡΑΣΗ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗΣ  
ΚΑΙ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ ΤΗΣ  
ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

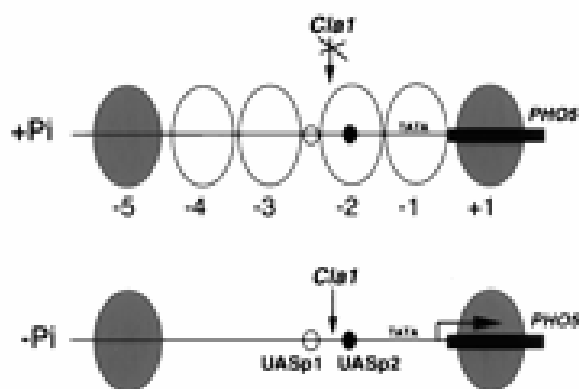
Η ενεργότητα ακετυλο-τρανσφεράσης των ιστονών (HAT) της πρωτεΐνης Gen5 είναι απαραίτητη για την *in vivo* δράση της ως συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής, στα γονίδια όπου απαιτείται και φαίνεται να ρυθμίζεται με διάφορους τρόπους μέσα στα κύτταρα. Η αναγκαιότητα αυτή ενισχύει την γενική άποψη της θετικής συσχέτισης της μεταγραφής με την ακετυλίωση της χρωματίνης. Ένα ερώτημα που προκύπτει είναι αν η ακετυλίωση των ιστονών *per se* είναι ικανή να προκαλέσει αλλαγές στη δομή της χρωματίνης *in vivo*, οι οποίες επιτρέπουν περαιτέρω τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Εναλλακτικά, η ακετυλίωση μπορεί να αποτελεί προϋπόθεση ή επακόλουθο της δράσης άλλων συμπλόκων που αναδιαμορφώνουν τη χρωματίνη, αλλά και να δρα παράλληλα και μερικώς επικαλυπτόμενα με αυτά. Μια απαραίτητη συνθήκη για τη μελέτη των αλλαγών στη δομή της χρωματίνης *in vivo* είναι τα νουκλεοσώματα στη συγκεκριμένη περιοχή να είναι “αυστηρώς τοποθετημένα” (positioned). Στην περίπτωση αυτή η οργάνωση της χρωματίνης είναι σε κάθε κύτταρο ομοιογενής και τυχόν αλλαγές σε αυτήν μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν και να μετρηθούν.

Στη ζύμη, όπως και σε άλλα συστήματα, χρησιμοποιούνται τρεις βασικές τεχνικές για τον προσδιορισμό της οργάνωσης των νουκλεοσωμάτων μιας περιοχής και εφαρμόζονται σε απομονωμένους πυρήνες κυττάρων: η πρώτη αφορά επώαση των πυρήνων με τη νουκλεάση DNase I για τον προσδιορισμό αυστηρώς τοποθετημένων νουκλεοσωμάτων ή υπερευαίσθητων θέσεων μέσα σε μια συγκεκριμένη περιοχή της χρωματίνης. Στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιείται η μικροκοκκική νουκλεάση (MNase I) για τον έλεγχο της παρουσίας ή απουσίας ενός νουκλεοσώματος σε μια περιοχή του DNA. Τέλος, η επίδραση διαφόρων περιοριστικών ενζύμων στο χρωμοσωμικό DNA των πυρήνων δίνει την δυνατότητα ποσοτικής παρακολούθησης της πρόσβασης των ενζύμων στο DNA, ανάλογα με τη νουκλεοσωμική οργάνωσή του (Wassarman and Wolffe, 1999).

Ένας καλά χαρακτηρισμένος υποκινητής στη ζύμη με αυστηρή νουκλεοσωμική οργάνωση αποτελεί ο υποκινητής του γονιδίου *PHO5*, που κωδικοποιεί για μια όξινη φωσφατάση (Svaren and Hörz, 1997). Η μεταγραφή του επάγεται σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης ή έλλειψης ιόντων φωσφόρου (Pi) στο μέσο καλλιέργειας. Η νουκλεοσωμική του δομή έχει καλά μελετηθεί και στις συνθήκες καταστολής χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τεσσάρων αυστηρώς τοποθετημένων νουκλεοσωμάτων. Το πρώτο νουκλεόσωμα (-1) καλύπτει το στοιχείο TATA ενώ το δεύτερο (-2) καλύπτει τη μία από τις δύο θέσεις πρόσδεσης του ενεργοποιητή του

συστήματος, Pho4 (UASp2). Η άλλη θέση πρόσδεσης του Pho4 (UASp1) βρίσκεται στην ενδιάμεση περιοχή των νουκλεοσωμάτων -2 και -3, η οποία είναι και θέση υπερευαισθησίας στη DNase I (Εικ.1).

Στις συνθήκες καταστολής της έκφρασης του *PHO5* η ρύθμιση της δράσης του Pho4 γίνεται μέσω φωσφορυλίωσής του από ένα cyclin-CDK σύμπλοκο (το PHO80-PHO85), που το καθιστά εντοπισμένο κυρίως στο κυτόπλασμα αλλά και ανενεργό στον πυρήνα (Komeili and O'Shea, 1999). Στις συνθήκες επαγωγής η πρόσδεση του Pho4 στον υποκινητή γίνεται αρχικά στην ελεύθερη νουκλεοσωμάτων θέση UASp1, προκαλεί αναδιαμόρφωση των τεσσάρων νουκλεοσωμάτων και οδηγεί σε μεταγραφική ενεργοποίηση. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αναδιαμόρφωσης φαίνεται να παίζει τόσο η περιοχή ενεργοποίησης όσο και η περιοχή πρόσδεσης στο DNA του ενεργοποιητή Pho4 (McAndrew *et al.*, 1998). Δεν έχει όμως προσδιοριστεί ακόμη ποιος ακριβώς παράγοντας ή σύμπλοκο τροποποίησης/αναδιαμόρφωσης ευθύνεται για αυτή τη διαδικασία, αν και έχει δειχθεί ότι τα σύμπλοκα SAGA και SWI/SNF δεν απαιτούνται (Pollard and Peterson, 1997, Gaudreau *et al.*, 1997). Τέλος, δεν είναι σαφές αν ο μηχανισμός αφορά απώλεια των τεσσάρων νουκλεοσωμάτων από την περιοχή ή αν απλώς προκαλείται χαλάρωση στη δομή τους ή/και στις επαφές τους με το DNA. Για τον απόλυτο έλεγχο πάντως της έκφρασης του γονιδίου *PHO5* είναι απαραίτητη η ακριβής τοποθέτηση των ρυθμιστικών στοιχείων του υποκινητή και η νουκλεοσωμική οργάνωσή του (Svaren and Hörz, 1997).



**Εικόνα 1. Νουκλεοσωμική οργάνωση του υποκινητή *PHO5*.** Σε συνθήκες καταστολής της μεταγραφής (+Pi) χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τεσσάρων αυστηρώς τοποθετημένων νουκλεοσωμάτων (-1 ως -4), τα οποία αναδιαμορφώνονται σε συνθήκες επαγωγής της μεταγραφής (-Pi). UASp1 και UASp2 είναι οι θέσεις πρόσδεσης του ενεργοποιητή Pho4 (McAndrew *et al.*, 1998).

Από τους μέχρι σήμερα γνωστούς υποκινητές γονιδίων στη ζύμη που απαιτούν τη δράση του Gcn5, κανένας δεν έχει αυστηρώς τοποθετημένα νουκλεοσώματα, η οργάνωση των οποίων φαίνεται ότι εξαρτάται και από τη σύσταση του DNA στην περιοχή. Ένα σημαντικό βήμα για τη μελέτη της δράσης του Gcn5 *in vivo* θα ήταν η

απόκτηση ενός κατάλληλου συστήματος-υποκινητή που να συνδυάζει την αυστηρή νουκλεοσωμική οργάνωση με την εξάρτηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης από το Gcn5. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται ο σχεδιασμός και η κατασκευή ενός τέτοιου τεχνητού υποκινητή και μελετούνται οι παράγοντες που απαιτούνται για τη μεταγραφική ενεργοποίησή του.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

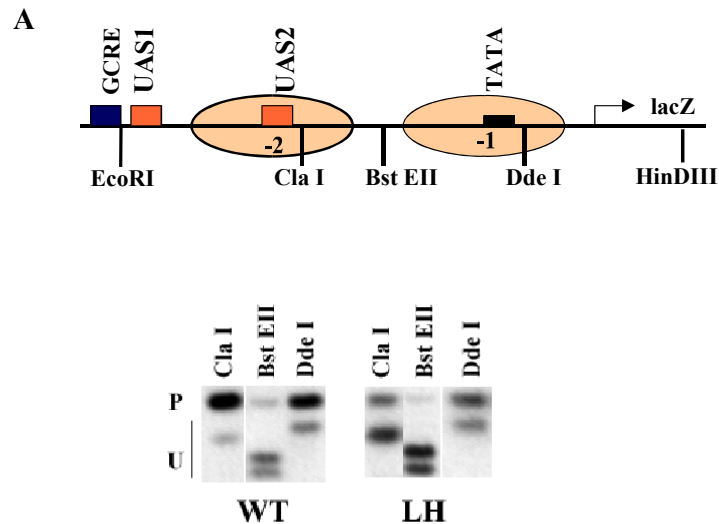
### **Κατασκευή του υποκινητή *gPHO5***

Προκειμένου ο τεχνητός υποκινητής να έχει αυστηρή νουκλεοσωμική οργάνωση εκμεταλλευτήκαμε την γνωστή χρωματινική δομή του υποκινητή *PHO5* που καθορίζεται από την αλληλουχία του DNA του. Συγκεκριμένα, το τμήμα της αλληλουχίας του *PHO5* (-392 ως +3 νουκλεοτίδια από το AUG), που αντιστοιχούσε στην περιοχή του υποκινητή όπου οργανώνονταν τα δύο (-1 και -2) από τα τέσσερα αυστηρώς τοποθετημένα νουκλεοσώματα, εντέθηκε στις θέσεις *EcoRI-HindIII* κατάλληλου φορέα ζύμης (Εικ.2Α). Προκειμένου επίσης η μεταγραφική ενεργότητα που καθοδηγεί ο υποκινητής αυτός να εξαρτάται από τη δράση του Gcn5 τοποθετήθηκε στη θέση υπερευαισθησίας του *PHO5*, ακριβώς πριν το UASp1, μια θέση-στόχος για την πρόσδεση του ενεργοποιητή Gcn4 (GCRE). Για τη διευκόλυνση της παρακολούθησης της λειτουργίας του ο υβριδικός αυτός υποκινητής, που ονομάστηκε *gPHO5*, οδηγούσε την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *lacZ* που κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση (γονίδιο *gPHO5-lacZ*).

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η νουκλεοσωμική οργάνωση του *gPHO5* είναι η προβλεπόμενη χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία που βασίζεται στην απομόνωση πυρήνων ζύμης και επώαση του νουκλεοσωμικού DNA με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Το ποσοστό της δεκτικότητας του DNA σε αυτά αντανακλά την ύπαρξη νουκλεοσωμάτων στις αντίστοιχες περιοριστικές θέσεις. Η μεθοδολογία αυτή είχε εφαρμοστεί στην περίπτωση του ενδογενούς γονιδίου *PHO5* και στις συνθήκες καταστολής (+Pi) ήταν χαρακτηριστική η αδυναμία πρόσβασης των ενζύμων *ClaI* και *DdeI* στο νουκλεοσωμικό DNA, λόγω της ύπαρξης των νουκλεοσωμάτων -2 και -1 αντίστοιχα. Αντίθετα στις συνθήκες επαγωγής (-Pi) λόγω αναδιαμόρφωση της χρωματίνης ήταν δυνατή πλέον η πρόσβαση των ενζύμων αυτών στο νουκλεοσωμικό DNA. Επίσης, η περιοριστική θέση *BstEII* που υπάρχει μεταξύ των δύο νουκλεοσωμάτων του υποκινητή *PHO5* ήταν δεκτική και στις δύο συνθήκες θρέψης (Almer *et al.*, 1986). Αξιοποιώντας τη μεθοδολογία αυτή ελέγχθηκε η δυνατότητα πρόσβασης των ίδιων ενζύμων στις αντίστοιχες θέσεις του υποκινητή *gPHO5*.



Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος ζύμης όπου η μόνη ιστόνη H4 που παράγεται στα κύτταρα βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή *GAL1* (Kim *et al.*, 1988). Έτσι σε συνθήκες επαγωγής του *GAL1* (γαλακτόζη στο μέσο καλλιέργειας) η σύνθεση της H4 γίνεται κανονικά, ενώ σε συνθήκες καταστολής του (γλυκόζη στο μέσο) σταματά η σύνθεση της H4 και οδηγεί σε απώλεια των νουκλεοσωμάτων από το DNA. Έγινε μετασχηματισμός αυτού του στελέχους με το πλασμίδιο του *gPHO5-lacZ* και απομονώθηκαν πυρήνες από κύτταρα που αναπτύχθηκαν στις δύο συνθήκες θρέψης. Οι πυρήνες επώαστηκαν με τα αντίστοιχα περιοριστικά ένζυμα και ακολούθησε ανάλυση του απομονωμένου DNA όπως περιγράφεται στην Εικ.2B. Στις συνθήκες επαγωγής του υποκινητή *GAL1* παρατηρήθηκε αδυναμία πρόσβασης των ενζύμων *ClaI* και *DdeI* στον υποκινητή *gPHO5* σε αντίθεση με τη *BstEII* που ήταν δεκτική (Εικ.2B, διαδρομές 1-3). Αντίθετα σε συνθήκες τεχνητής απώλειας των νουκλεοσωμάτων από την περιοχή του υποκινητή (γλυκόζη στο μέσο καλλιέργειας) η πρόσβαση των ενζύμων *ClaI* και *DdeI* αυξάνεται (διαδρομές 4-6). Την ίδια συμπεριφορά έχει και ο υποκινητής του ενδογενούς γονιδίου *PHO5*, όπως είχαν δείξει προηγούμενες μελέτες με το ίδιο στέλεχος ζύμης (Han *et al.*, 1988). Αυτό υποδηλώνει μια παρόμοια οργάνωση της χρωματίνης στους δύο υποκινητές (*gPHO5* και *PHO5*), με τα αυστηρώς τοποθετημένα νουκλεοσώματα να αποτελούν εμπόδιο για τη δεκτικότητα του νουκλεοσωμικού DNA στα περιοριστικά ένζυμα. Η ίδια παρεμπόδιση πρόσβασης των ενζύμων στο νουκλεοσωμικό DNA *gPHO5* παρατηρήθηκε και σε άλλα φυσικού τύπου στελέχη ζύμης κάτω από κανονικές συνθήκες θρέψης (βλ. παρακάτω). Η προτεινόμενη νουκλεοσωμική οργάνωση του υποκινητή *gPHO5*, επιβεβαιώθηκε περαιτέρω και με ανάλυση της χρωματινικής δομής μετά από πέψη με μικροκκοκική νουκλεάση (Ε.Τοπαλίδου).



**Εικόνα 2. Νουκλεοσωμική οργάνωση του υποκινητή-μοντέλου *gPHO5*.** (A) Διάγραμμα του υποκινητή *gPHO5* με τις καθορισμένες θέσεις των νουκλεοσωμάτων -1 και -2. Σημειώνονται οι θέσεις πρόσδεσης των ενεργοποιητών Gcn4 (GCRE) και Pho4 (UAS1 και UAS2) καθώς και το στοιχείο TATA. Το βέλος δείχνει το σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*) ενώ φαίνονται και οι θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν παρακάτω. (B) Μέτρηση της δεκτικότητας του νουκλεοσωμικού DNA *gPHO5* στα περιοριστικά ένζυμα *ClaI*, *BstEII* και *DdeI*, σε απομονωμένους πυρήνες στελέχους όπου η ιστόνη H4 βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή *GALI*. Οι πυρήνες απομονώθηκαν από κύτταρα που αναπτύχθηκαν είτε σε συνθήκες επαγωγής του υποκινητή *GALI* (γαλακτόζη στο μέσο, WT) είτε σε συνθήκες καταστολής του όπου σταματά η σύνθεση της H4 (γλυκόζη, LH). Μετά την επώαση των πυρήνων με τα παραπάνω ένζυμα, απομονώθηκε το DNA τους, έγινε πέψη του με τα ένζυμα *EcoRI-HindIII*, ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης και μεταφορά σε νάυλον μεμβράνη. Υβριδοποιώντας με το <sup>32</sup>P-ραδιοσημασμένο τμήμα *EcoRI-HindIII* του υποκινητή *gPHO5* διακρίνεται το αντίστοιχο κομμάτι DNA που είναι μη-δεκτικό στα ένζυμα *ClaI*, *BstEII* και *DdeI* (P) ή τμήματα αυτού μετά την προσβολή του από τα ένζυμα (U).

## Η Gcn4-εξαρτώμενη έκφραση του *gPHO5* απαιτεί τη δράση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF

Η παρακολούθηση της έκφρασης του γονιδίου αναφοράς *gPHO5-lacZ* σε διάφορα στελέχη και διάφορες συνθήκες θρέψης αυτών ήταν δυνατή με μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης που παράγεται σε κάθε περίπτωση. Έχοντας μάλιστα διατηρήσει τις θέσεις πρόσδεσης του Pho4 στη διάρθρωση του υποκινητή, σε συνδυασμό με την ένθεση της θέσης πρόσδεσης του Gcn4, ο *gPHO5* αναμενόταν να αντιδρά σε δύο διαφορετικά περιβαλλοντικά σήματα, ανάλογα με την επαγωγή των δύο ενεργοποιητών που προσδένονται σε αυτόν: Τόσο σε συνθήκες πείνας για αμινοξέα όπου επάγεται η παραγωγή μεγαλύτερων συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης Gcn4 (Georgakopoulos and Thireos, 1992), όσο και σε συνθήκες χαμηλής

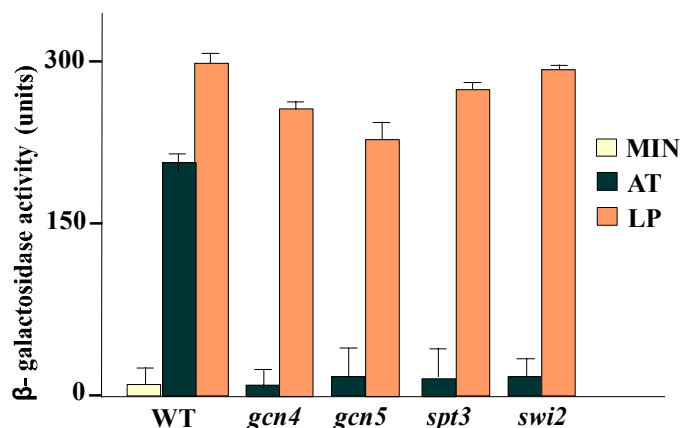
συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων όπου επάγεται η πρόσδεση της πρωτεΐνης Pho4 (Svaren and Hörz, 1997). Πράγματι δείχθηκε ότι, ενώ σε κανονικές συνθήκες θρέψης (MIN) δεν υπήρχε μεταγραφική επαγωγή από τον υποκινητή *gPHO5*, στις δύο παραπάνω συνθήκες θρέψης κυττάρων φυσικού τύπου (WT) η αύξηση της μεταγραφής ήταν εντυπωσιακή (Εικ.3, διαδρομές 1-3). Συγκεκριμένα για την επαγωγή του Gcn4 μέσω δημιουργίας πείνας για ιστιδίνη, τα θρεπτικά μέσα περιείχαν το συναγωνιστικό αναστολέα του προϊόντος του γονιδίου *HIS3*, 3-αμινο 1,2,4-τριαζόλη (10 mM AT). Για τη δημιουργία συνθηκών επαγωγής του Pho4 τα κύτταρα μεταφέρονταν σε θρεπτικό μέσο χαμηλής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων (LP), για 6 ώρες. Παρά όμως τις διαφορετικές συνθήκες επαγωγής ο υποκινητής οδηγούσε την αυξημένη έκφραση του γονιδίου *lacZ* κατά ανάλογο τρόπο και στις δύο περιπτώσεις.

Όπως αναμενόταν επίσης η μεταγραφική επαγωγή του *gPHO5* από τον ενεργοποιητή Gcn4 εξαρτάται απόλυτα από τη δράση του Gcn5 μέσα στο σύμπλοκο SAGA. Στην Εικ.3 φαίνεται ότι η έλλειψη διαφόρων συστατικών του SAGA όπως του Gcn5 και Spt3 (όπως και των Ada2, Spt7 και Spt20) έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία επαγωγής του *gPHO5-lacZ* σε συνθήκες πείνας για ιστιδίνη (AT). Αντίθετα σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων (LP) η έλλειψη του SAGA δεν επηρεάζει την μεταγραφική ενεργότητα του Pho4. Επίσης απαραίτητη για τη δράση του SAGA είναι και η ενζυμική ενεργότητα HAT του Gcn5, καθώς η παρουσία μιας μεταλλαγμένης μορφής του Gcn5 (μεταλλαγή F221A στην περιοχή HAT), που το καθιστά ανίκανο για ακετυλίωση *in vivo* (Kuo *et al.*, 1998), συνοδεύεται με αδυναμία ενεργοποίησης της έκφρασης του *gPHO5-lacZ* από το Gcn4 (φαινότυπος *gcn5*).

Γενετικές μελέτες στη ζύμη έχουν αποκαλύψει ότι, σε κάποιες περιπτώσεις γονιδίων, η μεταγραφική ενεργοποίησή τους απαιτεί εκτός από το σύμπλοκο SAGA και το ATP-εξαρτώμενο σύμπλοκο αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF (Pollard and Peterson, 1997). Τα δύο σύμπλοκα έχειδειχθεί ότι μπορεί να έχουν παράλληλη και μερικώς επικαλυπτόμενη δράση ή η δράση του ενός να προαπαιτεί τη δράση του άλλου (βλ. συζήτηση κεφαλαίου). Λόγω της απαίτησης του *gPHO5* για το σύμπλοκο SAGA ελέγξαμε και την απαίτηση του υποκινητή αυτού για το σύμπλοκο SWI/SNF στις διάφορες συνθήκες επαγωγής. Όπως φαίνεται στην Εικ.3 η έλλειψη του συστατικού Swi2/Snf2, που αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου SWI/SNF, έχει σαν αποτέλεσμα την αδυναμία μεταγραφικής ενεργοποίησης του *gPHO5-lacZ* από το Gcn4 σε συνθήκες πείνας για αμινοξέα (AT). Αντίθετα δεν επηρεάζεται η επαγωγή του από τον ενεργοποιητή Pho4 στις συνθήκες επαγωγής του

(LP). Το τελευταίο έρχεται σε συμφωνία με αποτελέσματα στον ενδογενή υποκινητή *PHO5*, όπου η μεταγραφή δεν απαιτεί το σύμπλοκο SWI/SNF (Gaudreau *et al.*, 1997).

Επομένως η Gcn4-εξαρτώμενη έκφραση του *gPHO5-lacZ* απαιτεί τη δράση και των δύο συμπλόκων SAGA και SWI/SNF, τα οποία δρουν συνδυασμένα και όχι παράλληλα ή μερικώς επικαλυπτόμενα.



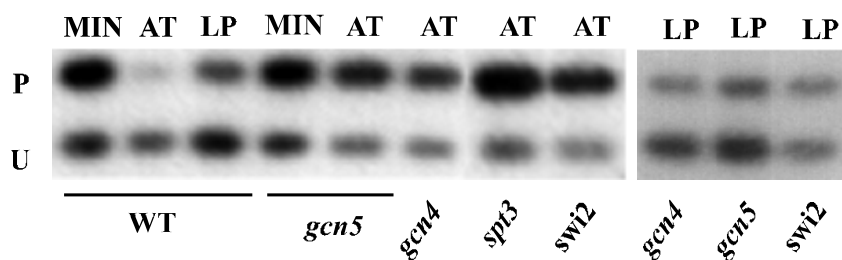
**Εικόνα 3.** Η επαγωγή της μεταγραφής του *gPHO5-lacZ* από τον ενεργοποιητή Gcn4, απαιτεί τη συνδυασμένη δράση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF. Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης που παράγεται από τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς *gPHO5-lacZ* στα διάφορα στελέχη ζύμης. Η ανάπτυξη των στελεχών γινόταν είτε κανονικά σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο (MIN) είτε κάτω από συνθήκες πείνας για ιστιδίνη, όπου επάγεται ο ενεργοποιητής Gcn4 (AT). Οι τιμές σε συνθήκες θρέψης με χαμηλή συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων (LP) αντιστοιχούν στη δράση του ενεργοποιητή Pho4.

### **Η μεταγραφική ενεργοποίηση συνοδεύεται με αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στον υποκινητή *gPHO5***

Καθώς τα νουκλεοσώματα αποτελούν εμπόδιο για τη πρόσβαση των περιοριστικών ενζύμων στο DNA του υποκινητή *gPHO5* σε κανονικές συνθήκες θρέψης των κυττάρων, όπου δεν παρατηρείται και μεταγραφική ενεργοποίηση, είναι πιθανόν η επαγωγή της μεταγραφής να συνοδεύεται και από μεταβολές της χρωματίνης στην περιοχή. Προκειμένου να προσδιοριστούν τυχόν αλλαγές στη δομή της χρωματίνης του υποκινητή *gPHO5* σε συνθήκες μεταγραφικής ενεργοποίησης από το Gcn4, χρησιμοποιήθηκε η παραπάνω μεθοδολογία εφαρμογής περιοριστικών ενζύμων σε απομονωμένους πυρήνες κυττάρων ζύμης. Με μέτρηση της δεκτικότητας του νουκλεοσωμικού DNA στο περιοριστικό ένζυμο *ClaI*, ελέγξαμε αν η δράση του Gcn4 προκαλούσε κάποια αναδιαμόρφωση στο νουκλεόσωμα (-2) του *gPHO5*. Στις κανονικές συνθήκες θρέψης του φυσικού τύπου στελέχους (WT), λόγω της οργανωμένης δομής των νουκλεοσωμάτων, η θέση *ClaI* δεν είναι προσβάσιμη (Εικ.4,

διαδρομή 1). Ωστόσο, σε συνθήκες πείνας για ιστιδίνη (AT στο θρεπτικό μέσο) η δράση του Gcn4 οδηγούσε σε αυξημένη πρόσβαση του ενζύμου αυτού στη συγκεκριμένη περιοχή (διαδρομή 2 σε σύγκριση με τη διαδρομή 6). Το ίδιο αποτέλεσμα είχε και η δράση του ενεργοποιητή Pho4 σε συνθήκες θρέψης χαμηλής συγκέντρωσης ιόντων φωσφόρου (διαδρομή 3). Η Gcn4-εξαρτώμενη αύξηση της δεκτικότητας του DNA στην *ClaI* δεν παρατηρείται σε πυρήνες κυττάρων με τη μεταλλαγμένη μορφή F221A του Gcn5, που δεν έχει ενεργότητα HAT (φαινότυπος *gcn5*, διαδρομές 4-5). Το ίδιο ισχύει και για τα κύτταρα που στερούνται τη δράση των πρωτεϊνών Spt3 ή Swi2 (Εικ.4, διαδρομές 7-8). Αντίθετα η Pho4-εξαρτώμενη αύξηση της δεκτικότητας του DNA στην *ClaI* δεν επηρεάζεται από την έλλειψη του Gcn4 ή συστατικών των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF (διαδρομές 9-11).

Επομένως, η μεταγραφική ενεργοποίηση του *gPHO5-lacZ* από το Gcn4, όπως και από το Pho4, συνοδεύεται από αυξημένη πρόσβαση του νουκλεοσωμικού DNA στο ένζυμο *ClaI* και αντανακλά την αναδιαμόρφωση που προκαλείται στη χρωματίνη σε αυτή τη θέση. Στην περίπτωση όμως της Gcn4-επαγόμενης έκφρασης η αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων εξαρτάται από τη συνδυασμένη δράση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF.



**Εικόνα 4. Η Gcn4-επαγόμενη αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στην περιοχή του υποκινητή *gPHO5* απαιτεί τη συνδυασμένη δράση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF.** Μέτρηση της δεκτικότητας του νουκλεοσωμικού DNA που αντιστοιχεί στην περιοχή του -2 νουκλεοσώματος του υποκινητή *gPHO5*, στο περιοριστικό ένζυμο *ClaI* σε απομονωμένους πυρήνες διαφόρων στελεχών. Η ανάπτυξη των στελεχών έγινε είτε σε κανονικές συνθήκες θρέψης (MIN) είτε σε συνθήκες επαγωγής των ενεργοποιητών Gcn4 (AT) και Pho4 (LP). Η ανάλυση του απομονωμένου DNA έγινε όπως περιγράφηκε στην Εικ.2B.

### **Η ακετυλίωση των ιστονών είναι αναγκαία αλλά όχι ικανή για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στον υποκινητή *gPHO5***

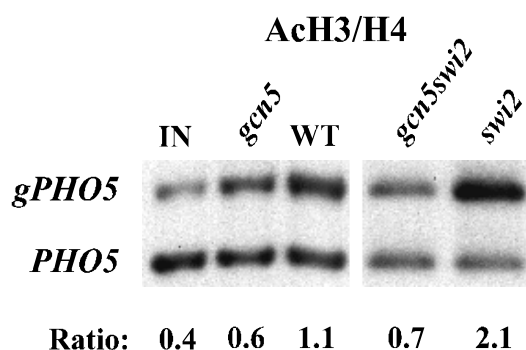
Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης που παρατηρείται στον υποκινητή *gPHO5* μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της ακετυλίωσης των N-τελικών ουρών των ιστονών από το Gcn5 και της χαλάρωσης της δομής που επιφέρει στο επίπεδο των επαφών των νουκλεοσωμάτων ή του DNA με αυτά. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης έγιναν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ακετυλιωμένης χρωματίνης (CHIP) και μέτρηση του

ποσοστού των υπερακετυλιωμένων νουκλεοσωμάτων μέσα στην περιοχή του υποκινητή (Wassarman and Wolffe, 1999). Περιληπτικά, έγινε στερέωση (fixing) των κυττάρων με φορμαλδεΐδη, η οποία συνδέει πρωτεΐνες με DNA αλλά και πρωτεΐνες μεταξύ τους. Μετά την απομόνωση της ολικής χρωματίνης έγινε ανοσοκατακρήμιση της με αντισώματα εναντίον ακετυλιωμένων N-τελικών πεπτιδίων των ιστονών H3 και H4. Ακολούθησε απομόνωση του ανοσοκατακρημισμένου DNA και ποσοτική ανάλυσή του με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (quantitative PCR). Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τρεις εκκινητές (primers) ο συνδυασμός των οποίων έδινε δύο προϊόντα: ένα που αντιστοιχούσε στην περιοχή των δύο νουκλεοσωμάτων του υποκινητή *gPHO5* και ένα που αντιστοιχούσε στη χρωμοσωμική περιοχή των δύο νουκλεοσωμάτων του ενδογενούς υποκινητή *PHO5*. Το τελευταίο χρησίμευε ως μάρτυρας για τη μέτρηση της υπερακετυλιωμένης χρωματίνης στην περιοχή του *gPHO5* καθώς αντιστοιχούσε σε ένα υποκινητή με την ίδια νουκλεοσωμική οργάνωση με αυτόν αλλά κατασταλαμένος κάτω από τις συνθήκες πείνας για αμινοξέα.

Με αυτήν την μεθοδολογία ελέγχθηκε αν η Gcn4-επαγόμενη μεταγραφή συνοδεύεται από αυξημένη ακετυλίωση στην περιοχή του υποκινητή, λόγω δράσης του SAGA, καθώς και αν αυτή η ακετυλίωση προαπαιτεί τη δράση του SWI/SNF. Όπως φαίνεται στην Εικ.5 (διαδρομή 1) η χρησιμοποίηση των τριών εκκινητών στις αντιδράσεις PCR με υπόστρωμα το απομονωμένο DNA από την ολική χρωματίνη (total/input, IN) πυρήνων δίνει ένα ποσοστό του DNA των *gPHO5/PHO5* ίσο με 0.4. Αυτό το κλάσμα ήταν σχεδόν το ίδιο σε όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν και κάτω από οποιεσδήποτε συνθήκες θρέψης αυτών. Μετά όμως την ανοσοκατακρήμιση της ακετυλιωμένης χρωματίνης από στελέχη φυσικού τύπου, κάτω από συνθήκες πείνας για ιστιδίνη, το ποσοστό του DNA των *gPHO5/PHO5* αυξήθηκε σε 1.1 (διαδρομή 3). Αυτή η αύξηση εξαρτιόταν από την παρουσία τόσο του Gcn5 (διαδρομή 2) και δεν εξαρτιόταν από την παρουσία του Swi2/Snf2 (διαδρομή 6). Στην τελευταία περίπτωση είναι αξιοσημείωτη η μεγαλύτερη τιμή του κλάσματος (2.1) που αντανακλά την υπερακετυλίωση της περιοχής πάλι όμως αποκλειστικά από τη δράση του Gcn5 (διαδρομή 5).

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι, η αναδιαμόρφωση και μεταγραφική ενεργοποίηση του *gPHO5-lacZ* από το Gcn4 συνοδεύεται και από αύξηση του ποσοστού ακετυλιωμένης χρωματίνης στον υποκινητή, σε σχέση με την αντίστοιχη περιοχή του ενδογενούς γονιδίου *PHO5*. Η αυξημένη ακετυλίωση οφείλεται στη δράση του SAGA και δεν προαπαιτεί τη δράση του συμπλόκου SWI/SNF. Ωστόσο από τα αποτελέσματα των Εικ.3 και 4 φαίνεται ότι αυτή η ακετυλίωση από μόνη της

δεν είναι ικανή για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και επαγωγή της μεταγραφής. Έτσι η Gcn4-εξαρτώμενη αναδιαμόρφωση οφείλεται στη δράση του SWI/SNF και προαπαιτεί τη δράση του SAGA.



**Εικόνα 5.** Η Gcn5-εξαρτώμενη ακετυλίωση της χρωματίνης στην περιοχή του υποκινητή *gPHO5* δεν προαπαιτεί τη δράση του SWI/SNF. Το ποσοστό της ακετυλιωμένης χρωματίνης στην περιοχή του υποκινητή μετρήθηκε μετά την ανοσοκατακρήμνισή της με αντισώματα εναντίον των ακετυλιωμένων ιστονών H3 και H4. Στη διαδρομή 1 είναι το ποσοστό του DNA της περιοχής των υποκινητών *gPHO5* και *PHO5* όπως απομονώθηκε από την ολική χρωματίνη των κυττάρων (IN). Στις υπόλοιπες διαδρομές είναι το αντίστοιχο ποσοστό μετά την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης με τα παραπάνω αντισώματα, από διάφορα στελέχη ζύμης. Όλα τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε συνθήκες επαγωγής του ενεργοποιητή Gcn4 (AT). Το απομονωμένο από τη χρωματίνη DNA ήταν το υπόστρωμα σε αντιδράσεις ποσοτικού PCR με τους τρεις εκκινητές που περιγράφηκαν στο κείμενο και ραδιενεργά νουκλεοτίδια. Τα προϊόντα της κάθε αντίδρασης αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% για το διαχωρισμό της ζώνης 740-bp που αντιστοιχεί στην περιοχή του υποκινητή *gPHO5* από τη ζώνη 400-bp του υποκινητή *PHO5*. Μετά το στέγνωμα του πηκτώματος έγινε ποσοτικοποίηση σε αναλυτή φωσφόρου (Phosphoimager).

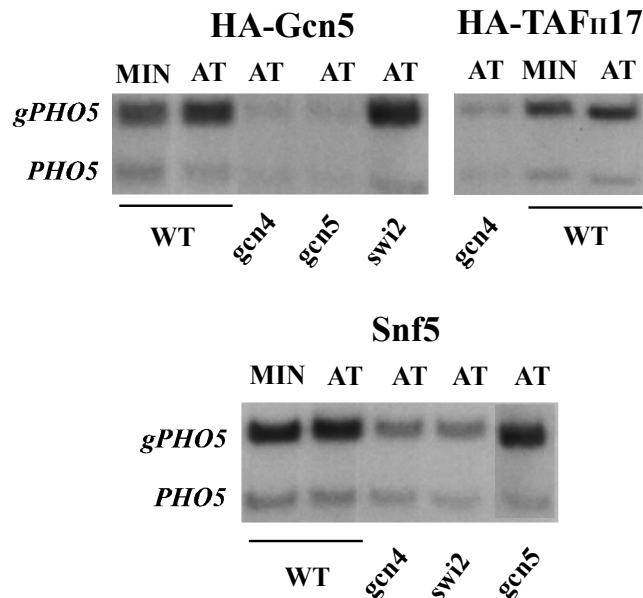
### **Ανεξάρτητη στρατολόγηση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5* από τον ενεργοποιητή Gcn4**

Από *in vitro* πειράματα αλληλεπιδράσεων καθαρισμένων πρωτεϊνών και συμπλόκων ή πρωτεϊνών σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η στρατολόγηση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF στους υποκινητές *in vivo* γίνεται μέσω του ενεργοποιητή ενός γονιδίου (Utley *et al.*, 1998, Peterson and Workman, 2000). Προς έλεγχο αυτής της υπόθεσης εξετάστηκε αν η στρατολόγηση των δύο συμπλόκων στον υποκινητή *gPHO5 in vivo* γίνεται από τον ενεργοποιητή Gcn4. Επίσης ελέγχθηκε αν η στρατολόγηση του ενός συμπλόκου εξαρτάται από τη στρατολόγηση ή τη δράση του άλλου. Εφαρμόστηκε η ίδια μεθοδολογία ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης που περιγράφηκε πιο πάνω με τη χρήση όμως αντισωμάτων για πρωτεΐνες των συμπλόκων. Συγκρίνοντας πάλι το ποσοστό του ανοσοκατακρήμνισμένου DNA *gPHO5/PHO5* μετά από ποσοτική ανάλυσή του,

προσδιορίζεται η ύπαρξη των παραπάνω συμπλόκων στη συγκεκριμένη περιοχή. Έτσι για τον ανοσοεντοπισμό του SAGA χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα εναντίον του επίτοπου HA, με το οποίο ήταν συντηγμένη η πρωτεΐνη Gcn5 ή TAF<sub>II</sub>17 του συμπλόκου. Για τον ανοσοεντοπισμό του SWI/SNF χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα εναντίον της υπομονάδας Snf5 του συμπλόκου.

Στην Εικ.6 φαίνεται ότι η στρατολόγηση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5* εξαρτάται αποκλειστικά από την παρουσία του Gcn4 καθώς η έλλειψή του συνοδεύεται και από έλλειψη των συμπλόκων στον υποκινητή (διαδρομές *gcn4*). Ενδιαφέρον είναι ότι, ακόμη και η μικρή συγκέντρωση Gcn4 που υπάρχει στα κύτταρα σε συνθήκες ανάπτυξης τους σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο (MIN) είναι ικανή να στρατολογήει αυτά τα σύμπλοκα στον υποκινητή. Όμως μόνο στις συνθήκες αύξησης της συγκέντρωσης του Gcn4 (AT) παρατηρείται ενεργοποίηση, με κάποιο τρόπο, της δράσης τους καθώς μόνο τότε παρατηρείται ακετυλίωση και αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στην περιοχή. Τέλος, η έλλειψη του Swi2/Snf2 δεν επηρεάζει τη στρατολόγηση του SAGA ούτε η έλλειψη του Gcn5 τη στρατολόγηση του SWI/SNF (Εικ.6). Επομένως τα δύο γεγονότα είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους παρότι η δράση του SWI/SNF, όπως δείχθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, προαπαιτεί τη δράση του SAGA. Αυτή η απαίτηση για ακετυλίωση όμως εντοπίζεται σε ένα βήμα μετά τη δέσμευση του SWI/SNF στον υποκινητή. Βέβαια στο συγκεκριμένο σύστημα δεν είναι δυνατή η διευκρίνηση αν η στρατολόγηση των δύο συμπλόκων από το Gcn4 συμβαίνει ταυτόχρονα ή διαδοχικά. Έτσι μπορεί να υπάρχουν διαφορετικές επιφάνειες επαφής στην πρωτεΐνη Gcn4 με τις υπομονάδες των συμπλόκων αυτών ή να υπάρχει μια δυναμική κατάσταση αλληλεπιδράσεων του ενεργοποιητή με τα σύμπλοκα αυτά, όπως και με άλλους βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες που έχει αναφερθεί στο παρελθόν ότι αλληλεπιδρούν *in vitro* με το Gcn4 (Drysdale *et al.*, 1993).





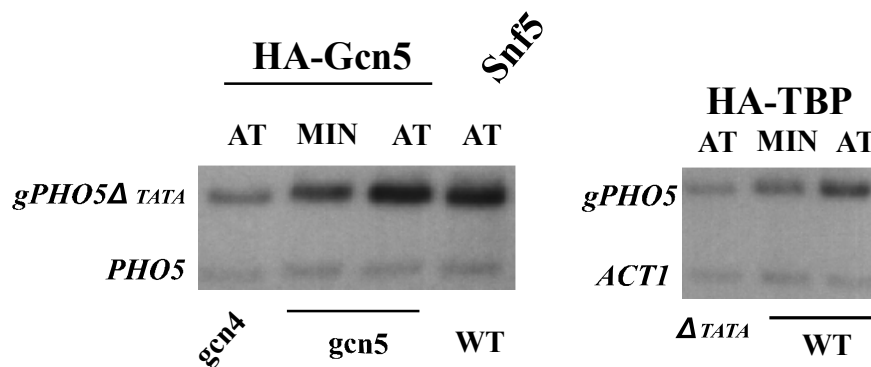
**Εικόνα 6. Ανεξάρτητη στρατολόγηση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5* από τον ενεργοποιητή Gcn4.** Η στρατολόγηση των δύο συμπλόκων ελέγχθηκε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών των δύο συμπλόκων μετά τη στερέωσή τους (με φορμαλδεΐδη) στη χρωματίνη. Η ανοσοκατακρήμνιση έγινε με το αντίσωμα εναντίον του επιτόπου HA για τις HA-συντηγμένες πρωτεΐνες Gcn5 και TAF<sub>II</sub>17 του SAGA, ενώ για το SWI/SNF χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα εναντίον της υπομονάδας του Snf5. Οι συνθήκες ανάπτυξης των στελεχών ήταν είτε σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο (MIN) είτε σε 10 mM AT (AT). Η ανάλυση του απομονωμένου DNA έγινε όπως περιγράφηκε στην Εικ.5.

## Η στρατολόγηση και δράση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5* γίνεται ανεξάρτητα της μεταγραφής

Από τα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση του *gPHO5-lacZ* από το Gcn4 συνοδεύεται από αναδιαμόρφωση του νουκλεοσώματος -2 του υποκινητή, που απαιτεί τη δράση του SWI/SNF σε ένα βήμα μετά τη δράση του SAGA. Προκειμένου να ελεγχθεί αν η παρατηρούμενη αναδιαμόρφωση απαιτεί και το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής (preinitiation complex) ή γίνεται ανεξάρτητα της μεταγραφής, το στοιχείο TATA του υποκινητή μεταλλάχθηκε ώστε να μην είναι πλέον λειτουργικό. Έγιναν δύο αντικαταστάσεις βάσεων, με κατευθυνόμενη σημειακή μεταλλαξογένεση, ώστε το στοιχείο TATA να γίνει CGTA και εξετάστηκαν οι ιδιότητες του νέου υποκινητή (*gPHO5 $\Delta$ TATA*). Η νουκλεοσωμική οργάνωσή του πάντως παρέμενε η ίδια με αυτήν του *gPHO5* όπως επιβεβαίωσε το πρότυπο πέψης του νουκλεοσωμικού DNA του υποκινητή με μικροκκοκική νουκλεάση (MNase I) (Ε. Τοπαλίδου).

Έγιναν μετρήσεις της ενζυμικής ενεργότητας της παραγόμενης β-γαλακτοσιδάσης από το γονίδιο *gPHO5 $\Delta$ TATA-lacZ* τόσο σε συνθήκες μη-επαγωγής (ελάχιστο θρεπτικό μέσο MIN) όσο και σε συνθήκες επαγωγής των δύο ενεργοποιητών του συστήματος (Gcn4 και Pho4). Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις η έλλειψη μεταγραφής από τον υποκινητή επιβεβαίωσε τη μη-λειτουργικότητα του μεταλλαγμένου στοιχείου TATA και την αδυναμία πρόσδεσης σε αυτό της πρωτεΐνης TBP. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η δυνατότητα στρατολόγησης των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5 $\Delta$ TATA* από τον

ενεργοποιητή Gcn4. Εφαρμόστηκε η μεθοδολογία ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης με τη χρήση αντισωμάτων για υπομονάδες των δύο συμπλόκων όπως αναφέρθηκαν πιο πάνω. Όπως φαίνεται στην Εικ.7 (αριστερά), η στρατολόγηση αυτών γινόταν κανονικά μέσω του Gcn4 όπως γινόταν και στον υποκινητή *gPHO5*. Τέλος, με μετρήσεις της δεκτικότητας πρόσβασης του περιοριστικού ενζύμου *ClaI* στο νουκλεοσωμικό DNA απομονωμένων πυρήνων δείχθηκε ότι στις συνθήκες επαγωγής του Gcn4 και το SWI/SNF έχει την ικανότητα να αναδιαμορφώνει το -2 νουκλεόσωμα του υποκινητή *gPHO5Δ<sub>TATA</sub>* (Ε. Τοπαλίδου). Το ίδιο αποτέλεσμα, αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης μετά από έλλειψη της περιοχής του στοιχείου TATA, είχε αναφερθεί και για τον ενδογενές υποκινητή *PHO5* στις συνθήκες επαγωγής του ενεργοποιητή Pho4 (Gaudreau *et al.*, 1997). Επομένως, η στρατολόγηση και δράση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5Δ<sub>TATA</sub>* από τον ενεργοποιητή Gcn4 δείχνει ότι τα δύο γεγονότα είναι ανεξάρτητα της πρόσδεσης του TBP στο στοιχείο TATA στον υποκινητή *gPHO5*. Αντιθέτως η ενεργοποίηση της μεταγραφής, που ακολουθεί τη δράση των συμπλόκων αυτών στον υποκινητή *gPHO5*, συσχετίζεται απόλυτα με την αύξηση του ποσού του TBP που δένεται στο στοιχείο TATA, όπως έδειξαν πειράματα ανοσοκατακρήμισης του HA-TBP (Εικ.7, δεξιά).



**Εικόνα 7. Η στρατολόγηση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5* γίνονται ανεξάρτητα της πρόσδεσης του TBP στο στοιχείο TATA. (Αριστερά)** Η στρατολόγηση των δύο συμπλόκων ελέγχθηκε με πειράματα ανοσοκατακρήμισης πρωτεϊνών των δύο συμπλόκων, με αντίσωμα εναντίον του επιτόπου HA για την υπομονάδα Gcn5 του SAGA ή εναντίον της πρωτεΐνης Snf5 για το SWI/SNF. (Δεξιά) Η στρατολόγηση του TBP έγινε με το αντίσωμα εναντίον του HA σε στέλεχος φυσικού τύπου που περιείχε είτε το *gPHO5Δ<sub>TATA</sub>-lacZ* (διαδρομή  $\Delta_{TATA}$ ) ή το *gPHO5-lacZ* (διαδρομή WT). Η ανάλυση του απομονωμένου DNA έγινε όπως περιγράφηκε στην Εικ.5, με τη διαφορά ότι στην περίπτωση της στρατολόγησης του TBP ως μάρτυρας στο ποσοστό ανοσοκατακρημιτισμένου DNA χρησιμοποιήθηκε ένα προϊόν-PCR που αντιστοιχεί στο τέλος της κωδικής περιοχής της ακτίνης (*ACT1*).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προκειμένου να μελετηθεί η δράση της πρωτεΐνης Gcn5 *in vivo* και οι συνέπειες της ενεργότητας HAT αυτής στη δομή της χρωματίνης, κατασκευάστηκε ένας κατάλληλος υποκινητής-μοντέλο (*gPHO5*), που έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- 1) Έχει καθορισμένη οργάνωση δομής χρωματίνης με αυστηρώς τοποθετημένα νουκλεοσώματα, τα οποία δρουν παρεμποδιστικά στη μεταγραφή σε συνθήκες μη-επαγωγής της.
- 2) Η μεταγραφική ενεργοποίηση γίνεται με την επαγωγή δύο διαφορετικών ενεργοποιητών που έχουν την ικανότητα πρόσδεσης σε αυτόν: της πρωτεΐνης

Gcn4 που επάγεται σε συνθήκες πείνας για αμινοξέα και της πρωτεΐνης Pho4 που επάγεται σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων.

- 3) Είναι δυνατή η παρακολούθηση της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης κατά τη μεταγραφική επαγωγή του υποκινητή, χρησιμοποιώντας ειδικές μεθοδολογίες για περιοχές χρωματίνης με αυστηρώς τοποθετημένα νουκλεοσώματα.
- 4) Είναι δυνατή η παρακολούθηση της έκφρασής του μέσω της μέτρησης της ενεργότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση, το οποίο κωδικοποιεί το γονίδιο αναφοράς *lacZ* που οδηγεί ο υποκινητής αυτός.

Μελετώντας τη μεταγραφική ενεργοποίηση από τους δύο ενεργοποιητές του συστήματος φάνηκαν οι διαφορετικές απαιτήσεις του καθενός αλλά και η ομοιότητα στο τελικό αποτέλεσμα που προκαλούν. Συγκεκριμένα η Gcn4-εξαρτώμενη επαγωγή του *gPHO5-lacZ* απαιτούσε τη δράση τόσο του συμπλόκου SAGA όσο και του SWI/SNF, σε αντίθεση με τη Pho4-εξαρτώμενη επαγωγή του που δεν απαιτούσε κανένα από αυτά τα σύμπλοκα. Το αποτέλεσμα της συνδυασμένης δράσης των συμπλόκων αυτών ήταν η αναδιαμόρφωση της δομής των νουκλεοσωμάτων στη περιοχή του υποκινητή και η ενεργοποίηση της μεταγραφής. Το ίδιο αποτέλεσμα όμως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της Pho4-εξαρτώμενη επαγωγής, πιθανότατα λόγω της δράσης ενός άλλου (ή περισσοτέρων), απροσδιόριστου μέχρι σήμερα, παράγοντα. Βέβαια ενδιαφέρον είναι ότι και στην περίπτωση της τεχνητής απώλειας νουκλεοσωμάτων από τον υποκινητή (λόγω πάυσης της έκφρασης της ιστόνης H4) παρατηρήθηκε το ίδιο αποτέλεσμα στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και μεταγραφική ενεργοποίηση (με μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης), υποδηλώνοντας πιθανώς το μηχανισμό δράσης των παραπάνω συμπλόκων. Τέλος, η παρατηρούμενη αναδιαμόρφωση του -2 νουκλεοσώματος στον υποκινητή τόσο στην περίπτωση επαγωγής του Gcn4 όσο και του Pho4 ήταν ανεξάρτητη του γεγονότος της μεταγραφής.

Λόγω της αναγκαιότητας για συνδυασμένη δράση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5* ελέγχθηκε η απαίτηση του ενός για τη στρατολόγηση και τη δράση του άλλου. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντίσωμα εναντίον υπομονάδων των συμπλόκων, έδειξαν την ανεξάρτητη στρατολόγηση αυτών από τον ενεργοποιητή Gcn4, στις συνθήκες επαγωγής του. Επίσης πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ακετυλιωμένης χρωματίνης έδειξαν ότι η ακετυλίωση των ιστονών στην περιοχή του υποκινητή, λόγω δράσης του SAGA, συμβαίνει ανεξάρτητα της παρουσίας και δράσης του SWI/SNF. Ωστόσο η ακετυλίωση των ιστονών δεν είναι ικανή για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης του υποκινητή και τη μεταγραφή που ακολουθεί. Η αναδιαμόρφωση αυτή απαιτεί το

SWI/SNF, η δράση του οποίου όμως προϋποθέτει την ακετυλίωση της χρωματίνης στην περιοχή καθώς η στρατολόγηση του συμπλόκου σε στέλεχος *gen5* δεν οδηγεί σε αναδιαμόρφωση.

Πρόσφατες μελέτες στα θηλαστικά, αναφέρουν δύο περιπτώσεις ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων με την ίδια διαδοχή στη δράση συμπλόκων HAT και hSWI/SNF. Ειδικότερα, στον υποκινητή του γονιδίου *INF-β* ο σχηματισμός του enhanceosome μετά την ιϊκή μόλυνση, στρατολογεί *in vitro* και *in vivo* τα σύμπλοκα του hGCN5 και CBP/PoII ολοενζύμου. Όμως η ακετυλίωση των ιστονών, κυρίως από το hGCN5, που παρατηρείται στην περιοχή δεν είναι ικανή για την αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων και τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Επίσης η ακετυλίωση γίνεται ανεξάρτητα από την παρουσία του hSWI/SNF, το οποίο στρατολογείται στον υποκινητή από το CBP. Ωστόσο δείχθηκε ότι η ακετυλίωση διευκολύνει τη στρατολόγηση του hSWI/SNF και ρυθμίζει τη δράση του, συντελώντας στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και ενεργοποίηση της μεταγραφής. Σε πλήρη συμφωνία επίσης με τον υποκινητή *gPHO5*, τα δύο γεγονότα της ακετυλίωσης και αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης είναι ανεξάρτητα της στρατολόγησης του TBP και έναρξη της μεταγραφής, παρότι στον υποκινητή *INF-β* το ολοένζυμο της πολυμεράσης II έχει ήδη έρθει με το CBP (Agalioti *et al.*, 2000). Στην περίπτωση των γονιδίων που επάγονται από το ρετινοϊκό οξύ μέσω των ετεροδιμερών των υποδοχέων RAR/RXR, η ρύθμιση της μεταγραφής γίνεται πάλι μέσω συνδυασμένης δράσης των ενεργοτήτων HAT και αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Όπως δείχθηκε σε *in vitro* πειράματα, για την ισχυρή δέσμευση του ετεροδιμερούς απαιτείται η δράση αναδιαμόρφωσης ενός συμπλόκου ISWI και ακολουθεί η στρατολόγηση και δράση ενός συμπλόκου HAT. Η ακετυλίωση της χρωματίνης στη συνέχεια διευκολύνει τη στρατολόγηση αλλά και ρυθμίζει τη δράση του συμπλόκου hSWI/SNF που απαιτείται για την έναρξη της μεταγραφής (Dilworth *et al.*, 2000).

Γενετικές μελέτες στη ζύμη έχουν προσδιορίσει επίσης κάποια γονίδια που η έκφρασή τους απαιτεί τόσο το σύμπλοκο SAGA όσο και το SWI/SNF (Pollard and Peterson, 1997, Roberts and Winston 1997). Τα περισσότερα μελετημένα παραδείγματα είναι το γονίδιο *SUC2* που κωδικοποιεί για το ένζυμο υδρολάση της σακχαρόζης και το *HO* που κωδικοποιεί για μια ενδονουκλεάση απαραίτητη στην αλλαγή του συζευκτικού τύπου της ζύμης. Έχει δειχθεί ότι στην περίπτωση της έκφρασης του *SUC2* τα δύο σύμπλοκα έχουν παράλληλη και μερικώς επικαλυπτόμενη δράση, καθώς η έλλειψη του *GCN5* προκαλούσε μια σχετική μείωση στα επίπεδα του mRNA του *SUC2* αλλά η έλλειψη του *SWI2*, ή ακόμη περισσότερο και των δύο μαζί, είχε πολύ πιο δραματικό αποτέλεσμα (Sudarsanam *et al.*, 1999,

Biggar and Crabtree, 1999). Αντίθετα στην περίπτωση της έκφρασης του *HO* απαιτείται απόλυτα η δράση και των δύο συμπλόκων, τα οποία δρουν συνεργατικά στο ίδιο μονοπάτι ρύθμισης της μεταγραφής (Krebs *et al.*, 1999, Cosma *et al.*, 1999). Έτσι έχει προταθεί ότι ο ρόλος των SAGA και SWI/SNF στη μεταγραφική ενεργοποίηση του 3% περίπου των γονιδίων του συνολικού γενώματος της ζύμης που εξαρτώνται και από τα δύο σύμπλοκα (Holstege *et al.*, 1998) μπορεί να είναι παράλληλος και μερικώς αλληλοεπικαλυπτόμενος ή συνεργατικός.

Ενδιαφέρον όμως είναι ότι, παρά τη συνεργατικότητα της δράσης των δύο συμπλόκων στον υποκινητή *HO* όπως και στον *gPHO5*, τα δύο συστήματα παρουσιάζουν διαφορές. Έτσι, η στρατολόγηση του συμπλόκου SWI/SNF στον υποκινητή *HO*, από τον μεταγραφικό παράγοντα Swi5, προηγείται της στρατολόγησης και δράσης του SAGA από τον ίδιο παράγοντα. Η ακετυλίωση των ιστονών στην περιοχή διευκολύνει περαιτέρω την πρόσβαση ενός άλλου παράγοντα, του SBF, και τη μεταγραφική ενεργοποίηση που αυτός επάγει. Η διαδοχική παρακολούθηση της στρατολόγησης των διαφόρων παραγόντων στον *HO* ήταν δυνατή σε συγχρονισμένα κύτταρα λόγω της απόλυτης ρύθμισης της δράσης τους στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου (Cosma *et al.*, 1999). Αυτή η διαδοχική σειρά των γεγονότων όμως έρχεται σε αντίθεση με τα παραπάνω αποτελέσματα στον υποκινητή *gPHO5* όπου η ακετυλίωση προαπαιτείται για τη δράση του SWI/SNF. Μια πιθανότητα θα ήταν το SWI/SNF, στην περίπτωση του *HO*, να στρατολογείται πρώτο στον υποκινητή αλλά για την περαιτέρω δράση του να απαιτείται η ακετυλίωση των ιστονών από το SAGA. Αν και δεν έχει ελεγχθεί με τις γνωστές μεθοδολογίες αν γίνεται αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στον *HO* πριν την ακετυλίωση, ωστόσο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι για να μπορέσει να δράσει το Gen5 στον υποκινητή απαιτείται η ενεργότητα ATPάσης του συμπλόκου SWI/SNF και όχι απλά η παρουσία του (Krebs *et al.*, 2000).

Από την ίδια όμως μελέτη πηγάζει και μια ενδιαφέρουσα εξήγηση της παρατηρούμενης διαφοροποίησης, όσον αφορά τη συνεργατική δράση των δύο συμπλόκων στους δύο υποκινητές *HO* και *gPHO5*. Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να εξηγηθεί λόγω ίσως της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα δείχθηκε ότι η απαίτηση της δράσης του SWI/SNF πριν την ακετυλίωση των ιστονών από το Gen5 είναι χαρακτηριστικό των γονιδίων που εκφράζονται κατά τη διάρκεια της μίτωσης του κυτταρικού κύκλου, ένα από τα οποία είναι το *HO*. Αντίθετα σε γονίδια που εκφράζονται στη μεσόφαση και απαιτούν τη συνδυασμένη δράση των δύο συμπλόκων, η παραπάνω διαδοχή δεν ίσχυε και η ακετυλίωση συνέβαινε ανεξάρτητα της δράσης του SWI/SNF (Krebs *et*

*al.*, 2000). Μια πιθανή ερμηνεία της αναγκαιότητας για την παραπάνω διαδοχή κατά τη διάρκεια της μίτωσης είναι ότι, σε αυτήν την κυτταρική φάση η χρωματίνη είναι πολύ συμπαγής και η έκθεση των N-τελικών ουρών προς ακετυλίωση ίσως απαιτεί την προηγούμενη χαλάρωση της χρωματίνης από το SWI/SNF. Καθώς όμως δεν έχει ελεγχθεί αν η δράση του SWI/SNF απαιτείται και για το επόμενο βήμα, μετά τη δράση του Gcn5, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα η ακετυλίωση να επάγει τότε τη δράση του SWI/SNF ή να συμβάλλει στην εξάπλωση της δράσης του.

Δύο ενδογενή γονίδια της ζύμης που εκφράζονται στη μεσόφαση και απαιτούν τη δράση τόσο του συμπλόκου SAGA όσο και του SWI/SNF είναι το *HIS3* και το *PHO8* (Natarajan *et al.*, 1999, Gregory *et al.*, 1999). Το *PHO8* κωδικοποιεί για μια αλκαλική φωσφατάση που επάγεται, όπως και το *PHO5*, από τον ενεργοποιητή Pho4 σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης φωσφορικών ιόντων στο μέσο καλλιέργειας. Σε αντίθεση όμως με το *PHO5*, η επαγωγή της έκφρασης του *PHO8* απαιτεί τη συνδυασμένη δράση των παραπάνω συμπλόκων, σε επόμενο βήμα μάλιστα από την πρόσδεση του ενεργοποιητή στον υποκινητή (Gregory *et al.*, 1999). Σε αντιστοιχία επίσης με τον τεχνητό υποκινητή *gPHO5* και σε συμφωνία με την παραπάνω υπόθεση, η ακετυλίωση της χρωματίνης στους υποκινητές *PHO8* και *HIS3*, είναι ανεξάρτητη της δράσης του SWI/SNF (Krebs *et al.*, 2000). Δεν έχει όμως προσδιοριστεί αν η ακετυλίωση προαπαιτείται για τη δράση του SWI/SNF σε αυτούς τους υποκινητές, όπως έχει δειχθεί για τον *gPHO5*.

Η λειτουργική σχέση που υπάρχει στις παραπάνω περιπτώσεις μεταξύ των παραγόντων ακετυλίωσης και αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης αλλά και με τους παράγοντες της βασικής μεταγραφικής μηχανής, μπορεί να σηματοδοτείται από ειδικές αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με τις ακετυλιωμένες ιστόνες. Είναι πιθανό η δράση των συμπλόκων HAT να μαρκάρει τις ιστόνες των νουκλεοσωμάτων και να επάγει τη “συνομιλία” αυτών με άλλα σύμπλοκα, με διαφορετικές ενζυμικές ιδιότητες. Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις θα πρέπει τότε να καθορίζονται από ειδικές λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνών (domains), που έχουν την ικανότητα δέσμευσης των ακετυλιωμένων ιστονών και είναι εξελικτικά πολύ συντηρημένες στις διάφορες πρωτεΐνες.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ BROMODOMAINS  
ΣΥΝΤΟΝΙΖΕΙ ΤΗΝ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ  
ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ερώτημα που γεννάται από το προηγούμενο κεφάλαιο είναι, με ποιο τρόπο η ακετυλίωση των N-τελικών ουρών των ιστονών διαμορφώνει το κατάλληλο υπόστρωμα για τη δράση των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Είναι πιθανό η ακετυλίωση να σηματοδοτεί τις αλληλεπιδράσεις των διαφόρων παραγόντων με τη χρωματίνη, μέσω της αναγνώρισης από αυτούς ενός ειδικού “κώδικα” που καθορίζεται από τις διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των N-τελικών ουρών των ιστονών. Έτσι έχειδειχθεί ότι, η ακετυλίωση ειδικών καταλοίπων στην N-τελική ουρά της ιστόνης H4 αποτελεί το σήμα αναγνώρισης για την πρόσβαση του συμπλόκου SIR στη χρωματίνη και τη δημιουργία ή διατήρηση της ετεροχρωματίνης στην περιοχή (Braunstein *et al.*, 1996). Παρόμοιοι ρόλοι στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων έχουν προταθεί και για άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών όπως η φωσφορυλίωση και η μεθυλίωση (Strahl and Allis, 2000).

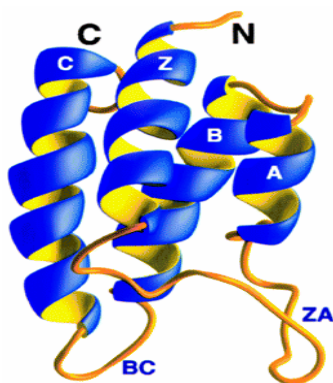
Η αναγνώριση του “κώδικα των ιστονών” από τις διάφορες πρωτεΐνες προϋποθέτει την αλληλεπίδραση αυτών ή ειδικών λειτουργικών περιοχών τους με τις τροποποιημένες ιστόνες. Πρόσφατες κρυσταλλογραφικές μελέτες (βλ. παρακάτω) προσδιόρισαν για πρώτη φορά μια τέτοια λειτουργική περιοχή πρωτεϊνών, που είναι ικανή να αλληλεπιδρά με τις ακετυλιωμένες ουρές των ιστονών H3 και H4. Η περιοχή αυτή γνωστή ως **bromodomain**, είναι εξελικτικά συντηρημένη σε αρκετούς ευκαρυωτικούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως σχεδόν σε κάθε μέλος της οικογένειας των πυρηνικών HAT αλλά και των ATPασών της οικογένειας SWI/SNF, που η δράση τους σχετίζεται με τη δομή της χρωματίνης (Jeanmougin *et al.*, 1997). Όμως μέχρι σήμερα, η λειτουργία της περιοχής αυτής παραμένει άγνωστη και η αναγκαιότητά της δεν είναι ξεκάθαρη. Ωστόσο λόγω της συντηρημένης αλληλουχίας των bromodomains των πρωτεϊνών σε όλους τους οργανισμούς και της παρόμοιας δομής τους, προτείνεται ένας κοινός ρόλος στην αναγνώριση και αλληλεπίδραση αυτών των περιοχών με ακετυλιωμένες ιστόνες.

Συγκεκριμένα, μετρήσεις NMR προσδιόρισαν την τρισδιάστατη δομή του bromodomain της ακετυλο-τρανσφεράσης των ιστονών PCAF. Αυτή αποτελείται από 4 αντιπαράλληλες α-έλικες, σε αριστερόστροφη διάταξη, με μια σαφή κοιλότητα μεταξύ δύο θηλειών (loops), όπως φαίνεται στην Εικ.1. Το ενδιαφέρον είναι ότι, στην υδροφοβική κοιλότητα που σχηματίζεται μεταξύ των θηλειών ZA και BZ μπορεί να δεσμεύεται, έστω και με μικρή συγγένεια, πεπτίδιο που αντιστοιχεί σε περιοχή της N-τελικής ουράς της ιστόνης H3 ή H4. Η δέσμευση αυτή εξαρτάται απόλυτα από την



ακετυλίωση των λυσινών των πεπτιδίων (Dhalluin *et al.*, 1999). Ανάλογα αποτελέσματα είχαν κρυσταλλογραφικές μελέτες στη δομή των bromodomains της βασικής υπομονάδας TAF<sub>II</sub>250 του συμπλόκου TFIID στα θηλαστικά. Η πρωτεΐνη αυτή, που είναι επίσης ακετυλο-τρανσφεράση των ιστονών, χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο bromodomains στο μόριό της. Η δομή της καθεμίας περιοχής δείχθηκε ότι είναι παρόμοια με τη δομή του bromodomain του PCAF, ενώ επιβεβαιώθηκε και η ιδιότητά τους να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν ακετυλιωμένα πεπτίδια της ιστόνης H4. Αξιοσημείωτη είναι η μεγαλύτερη συγγένεια με την οποία δέσμευαν υπόστρωμα με δύο ακετυλιωμένες λυσίνες από ότι μονο-ακετυλιωμένο, δικαιολογώντας ίσως την ύπαρξη δύο bromodomains στην πρωτεΐνη για λόγους αύξησης της εξειδίκευσης (Jacobson *et al.*, 2000).

Ακολούθησε η λύση της κρυσταλλικής δομής του bromodomain του Gen5 της ζύμης, σε σύμπλοκο με ένα ακετυλιωμένο πεπτίδιο της ιστόνης H4 (Owen *et al.*, 2000). Είχε και αυτό την ίδια δομή των 4  $\alpha$ -ελίκων, με το πεπτίδιο να προσδένεται στην αντίστοιχη σχηματιζόμενη υδροφοβική κοιλότητα. Εξακριβώθηκε ότι ο κύριος καθοριστικός παράγοντας για τη δέσμευση της ιστόνης είναι η ακετυλιωμένη λυσίνη. Ωστόσο παρατηρήθηκαν σημαντικές επαφές του bromodomain και με κατάλοιπα του πεπτιδίου γειτονικά της ακετυλιωμένης λυσίνης, προσφέροντας πιθανώς στην εξειδίκευση του bromodomain για ιστονικά υποστρώματα. Επίσης, μια πολύ μικρότερη ικανότητα πρόσδεσης είχαν και μη-ακετυλιωμένα πεπτίδια, γεγονός που εξηγεί την αλληλεπίδραση που είχε αναφερθεί του bromodomain του Gen5 με μη-τροποποιημένες ιστόνες H3 και H4, καθαρισμένες από βακτηριακά εκχυλίσματα (Ornaghi *et al.*, 1999).



**Εικόνα 1:** Δομή του bromodomain του PCAF από ανάλυση NMR. Διακρίνονται οι τέσσερις  $\alpha$ -έλικες και η κοιλότητα που σχηματίζουν οι θηλειές BC και ZA (Dhalluin *et al.*, 1999).

Από τις παραπάνω δομικές μελέτες προσδιορίστηκαν και τα κατάλοιπα αμινοξέων των bromodomains που ευθύνονται για την άμεση αλληλεπίδρασή τους με τα ακετυλιωμένα πεπτίδια των ιστονών. Τα κατάλοιπα αυτά είναι σε πολύ μεγάλο βαθμό συντηρημένα μέσα στην οικογένεια των bromodomains, υποδηλώνοντας ένα

γενικό χαρακτηριστικό των περιοχών αυτών να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν ακετυλιωμένες λυσίνες ιστονών. Ωστόσο, παρά τον προτεινόμενο γενικό ρόλο των bromodomains, η *in vivo* δράση τους φαίνεται να διαφέρει ανάλογα με την πρωτεΐνη στην οποία ανήκουν. Ίσως έτσι εξηγείται και η παρατηρούμενη ποικιλότητα στους φαινοτύπους από την έλλειψη του bromodomain διαφόρων πρωτεϊνών (βλ. συζήτηση).

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται λειτουργική ανάλυση μεταλλαγών στο bromodomain της πρωτεΐνης Gcn5, της ζύμης, που επιλέχθηκαν βάση της λυμένης δομής του bromodomain του PCAF (καθώς μέχρι εκείνη τη στιγμή ήταν η μόνη, από τις παραπάνω, που είχε λυθεί). Οι μεταλλαγές αυτές εντοπίζονταν σε κατάλοιπα αμινοξέων της υδρόφοβης κοιλότητας του bromodomain του PCAF και ήταν απόλυτα συντηρημένα σε όλες τις πρωτεΐνες HAT. Λόγω της πιθανής συμμετοχής των καταλοίπων αυτών στην αλληλεπίδραση της αντίστοιχης περιοχής του Gcn5 με τις ακετυλιωμένες ιστόνες, ήταν ενδιαφέρον να δούμε τις επιπτώσεις αυτών των μεταλλαγών στην *in vivo* δράση του Gcn5. Έχοντας μάλιστα το μοντέλο-υποκινητή που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, όπου η ακετυλίωση της χρωματίνης, η αναδιαμόρφωσή της και η μεταγραφή μπορούσαν να μετρηθούν διακριτά, ερευνήθηκε ο ρόλος του bromodomain του Gcn5 σε αυτές τις διαδικασίες. Τέλος λόγω της ύπαρξης bromodomain και στην καταλυτική υπομονάδα του SWI/SNF, ελέγχθηκε η αναγκαιότητα της περιοχής αυτής για την *in vivo* δράση του συμπλόκου SWI/SNF στον συγκεκριμένο υποκινητή.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Δημιουργία μεταλλαγών στο bromodomain του Gcn5 που επηρεάζουν τη δράση του ως συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής

Με βάση τη λυμένη δομή του bromodomain του PCAF και την ομολογία της αλληλουχίας του με την αντίστοιχη περιοχή του Gcn5, σχεδιάστηκαν και αποκτήθηκαν κατευθυνόμενες σημειακές μεταλλαγές στο bromodomain του Gcn5. Οι μεταλλαγές αυτές έγιναν σε κατάλοιπα που βρίσκονται μέσα στην προβλεπόμενη υδρόφοβη κοιλότητα του Gcn5, με πιθανή λειτουργία τη δέσμευση των ακετυλολυσινών των ιστονών. Μια από αυτές ήταν η αντικατάσταση της τυροσίνης Tyr-413 με αλανίνη (μεταλλαγή **BrYA**). Η Tyr-413 αντιστοιχεί στην Tyr-809 του PCAF, η οποία είχε δειχθεί (με μεταλλαξογένεση) ότι ήταν απαραίτητη για την αλληλεπίδραση των ακετυλιωμένων πεπτιδίων των ιστονών H3 και H4 με το συγκεκριμένο bromodomain (Dhalluin *et al.*, 1999). Επίσης έγινε η διπλή αντικατάσταση της προλίνης Pro-371 σε θρεονίνη και της μεθειονίνης Met-372 σε αλανίνη (μεταλλαγή **BrTA**). Αυτά τα αμινοξέα βρίσκονται στην ίδια προβλεπόμενη υδρόφοβη κοιλότητα του bromodomain του Gcn5 και είναι απόλυτα συντηρημένα, όπως και η Tyr-413, σε όλα τα μέλη της οικογένειας HAT. Τέλος αποκτήθηκε, λόγω αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης, μια μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης Gcn5 που της έλλειπαν τα αμινοξέα 376-440, αφαιρώντας περίπου τη μισή περιοχή του bromodomain (μεταλλαγή **BrΔ**). Στην Εικ.2Α φαίνεται σχηματικά η θέση των μεταλλαγών αυτών σε σχέση με τις 4 έλικες του bromodomain. Όλες οι παραπάνω μεταλλαγμένες μορφές παράγονταν σταθερά στα κύτταρα ζύμης, ως συντηγμένες πρωτεΐνες με τον επίτοπο HA (haemagglutinin) στο N-τελικό τους άκρο, όπως πιστοποίησε ο ανοσοεντοπισμός τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με το HA-αντίσωμα (Εικ.2Β, Ε. Τοπαλίδου).

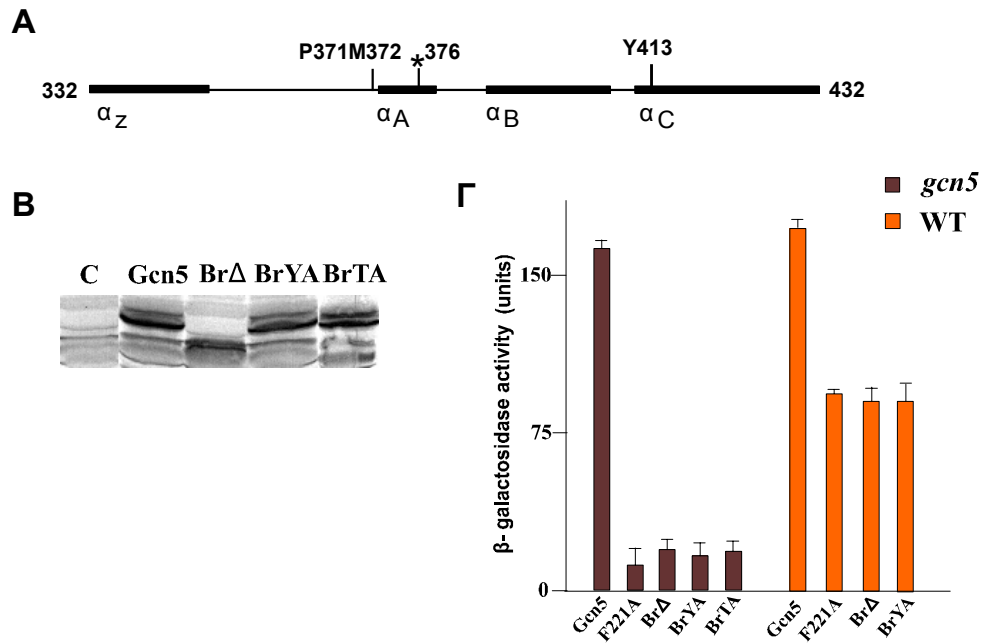
Στη συνέχεια ελέγχθηκε αν οι μεταλλαγές του bromodomain του *Gcn5* συμπλήρωναν τους φαινοτύπους ενός στελέχους *gcn5*, όπως είναι η αργή ανάπτυξη των κυττάρων ή η αδυναμία ανάπτυξής τους σε μέσο που περιέχει το συναγωνιστικό αναστολέα του προϊόντος του γονιδίου *HIS3*, 3-αμινο 1,2,4-τριαζόλη (AT). Δείχθηκε ότι οι μεταλλαγές αυτές συμπλήρωναν μερικώς τους παραπάνω φαινοτύπους, με διαφορετική όμως αποτελεσματικότητα μεταξύ τους. Σε κανονικές συνθήκες θρέψης, ο αργός ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων συμπληρώνονταν καλύτερα από τη μεταλλαγή BrYA και ακολουθούσαν οι BrTA και BrΔ. Κατ' αντιστοιχία, όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του AT στο μέσο καλλιέργειας (από 10 έως 50 mM) τόσο μειωνόταν η ικανότητα ανάπτυξής τους σε αυτό, με πιο εξασθενημένη τη μορφή BrΔ

και πιο αποτελεσματική την BγYA. Τέλος, σε απόλυτη συμφωνία με τους φαινότυπους αυτούς, η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *HIS3* από τον ενεργοποιητή Gcn4, που απαιτεί τη δράση του Gcn5, έδειξε την ίδια μείωση ανάλογα με την παραγόμενη μορφή του Gcn5 (μετά από ανάλυση του RNA από την E. Τοπαλίδου). Οι παραπάνω φαινότυποι αντανακλούν τις επιρροές αυτών των μεταλλαγών στην *in vivo* λειτουργία του bromodomain, στα διάφορα γονίδια που απαιτούν τη δράση του.

Αρχικές μελέτες επίσης στη ζύμη, είχαν αναφέρει την αναγκαιότητα του bromodomain για τη δράση του Gcn5 ως συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής σε γονίδια αναφοράς (Georgakopoulos *et al.*, 1995). Πράγματι ο έλεγχος της ικανότητας των παραπάνω μεταλλαγών να υποστηρίζουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς *gPHO5-lacZ* από το Gcn4, έδειξε την απόλυτη εξάρτηση της μεταγραφής από τη δράση του bromodomain του Gcn5. Με μετρήσεις της ενζυμικής ενεργότητας της παραγόμενης β-γαλακτοσιδάσης, στις συνθήκες επαγωγής του Gcn4 (AT στο μέσο καλλιέργειας) φάνηκε ότι και οι τρεις μεταλλαγμένες μορφές του *GCN5* αδυνατούσαν να συμπληρώσουν, έστω και μερικώς, την έλλειψη του φυσικού τύπου γονιδίου (σε στέλεχος *gcn5*, Εικ.2Γ). Το ίδιο αποτέλεσμα έχει και η μεταλλαγή F221A στην περιοχή HAT του Gcn5 (Kuo *et al.*, 1998), που καταργεί την ενζυμική του ενεργότητα (Εικ.2Γ).

Η δυνατότητα ενσωμάτωσης όλων των παραπάνω μεταλλαγμένων πρωτεϊνών στο σύμπλοκο SAGA και στρατολόγησής τους στον συγκεκριμένο υποκινητή *in vivo*, αποδεικνύεται έμμεσα από το γεγονός ότι όλες είχαν επικρατούσα αρνητική δράση (dominant negative effect) στην έκφραση του *gPHO5-lacZ* σε φυσικού τύπου στελέχη (WT, Εικ.2Γ). Επομένως, σε αυτόν τον υποκινητή η δράση του Gcn4 εξαρτάται απόλυτα από ένα πλήρως λειτουργικό bromodomain του Gcn5. Η απόλυτη εξάρτηση που έχει ο υποκινητής *gPHO5* από τα σύμπλοκα SAGA και SWI/SNF, σε αντίθεση με τον υποκινητή του *HIS3* όπου η εξάρτηση από τα σύμπλοκα αυτά είναι μικρότερη, ίσως εξηγεί τις διαφορές στην αναγκαιότητα του bromodomain του Gcn5 για την Gcn4-επαγόμενη έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων.

Έτσι, μεταλλαγές στην πρωτεΐνη Gcn5 που αφαιρούν τη λειτουργική περιοχή bromodomain ή επηρεάζουν τη δράση της, επιδρώντας πιθανώς στις επαφές αυτής της περιοχής με ακετυλιωμένες λυσίνες ιστονών, καθιστούν την πρωτεΐνη μη-λειτουργική ως συν-ενεργοποιητή της μεταγραφής στον υποκινητή *gPHO5*.



**Εικόνα 2. Το bromodomain του Gcn5 είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση της μεταγραφής από τον υποκινητή *gPHO5*.** (Α) Διάγραμμα του bromodomain του Gcn5 που δείχνει τις 4 α-έλικες και τη θέση των καταλοίπων που μεταλλάχθηκαν (Y413A, P371T και M372A) στις μορφές BrYA και BrTA της πρωτεΐνης Gcn5. Με αστερίσκο σημειώνεται το τέλος του πλαισίου ανάγνωσης στην πρωτεΐνη BrΔ που της λείπει μέρος του bromodomain. (Β) Ανοσοεντοπισμός των παραγόμενων HA-συντηγημένων πρωτεϊνών Gcn5, φυσικού τύπου (Gcn5) ή μεταλλαγμένων στο bromodomain, σε ολικά εκχυλίσματα ζύμης με το αντίσωμα εναντίον του επιτόπου HA. Στη διαδρομή 1 (C) είναι το εκχύλισμα-μάρτυρας από μη-μετασχηματισμένα κύτταρα ζύμης. (D) Μετρήσεις της ενζυμικής ενεργότητας της παραγόμενης β-γαλακτοσιδάσης από την έκφραση του γονιδίου αναφοράς *gPHO5-lacZ*, σε στελέχη *gen5* ή WT μετασχηματισμένα με τα διάφορα γονίδια *GCN5*, φυσικού τύπου ή μεταλλαγμένων στο bromodomain. Χρησιμοποιήθηκε επίσης και μια μεταλλαγμένη μορφή του *GCN5* στην περιοχή HAT (μεταλλαγή F221A), που καταργούσε την ενεργότητα HAT του ενζύμου. Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε συνθήκες επαγωγής του ενεργοποιητή Gcn4, με την προσθήκη 10 mM AT στο μέσο καλλιέργειας (πέινα για ιστιδίνη).

## Οι μεταλλαγές στο bromodomain του Gcn5 επηρεάζουν τη μεταγραφή μετά την ακετυλίωση των ιστονών στον *gPHO5*

Η αδυναμία των παραπάνω μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5 να υποστηρίζουν τη Gcn4-εξαρτώμενη μεταγραφή στον υποκινητή *gPHO5* μπορεί να εντοπίζεται είτε στο τελικό στάδιο της μεταγραφικής ενεργοποίησης ή πιο πριν, στην ακετυλίωση ή αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στην περιοχή. Λόγω των ιδιοτήτων της νουκλεοσωμικής δομής του υποκινητή *gPHO5* και της δυνατότητας να μελετηθούν σε αυτόν διακριτά οι παραπάνω διαδικασίες, ήταν εφικτή η διερεύνηση του ρόλου του bromodomain του Gcn5 σε κάθε μια από αυτές. Αρχικά ελέγχθηκε η ικανότητα των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών να ακετυλιώνουν τις N-τελικές ουρές των ιστονών *in vivo*, καθώς είχε αναφερθεί μειωμένη ικανότητα ακετυλίωσης νουκλεοσωμικών

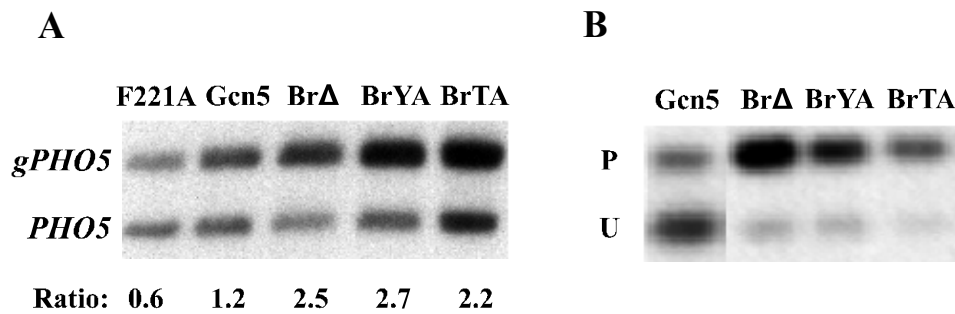
ιστονών *in vitro*, από βιοχημικά καθαρισμένα σύμπλοκα SAGA με ενσωματωμένη μια μορφή του Gcn5 που της έλλειπε το bromodomain (Sternier *et al.*, 1999).

Χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της ανοσοκατακρήμνισης ακετυλιωμένης χρωματίνης (CHIP) με αντισώματα εναντίον ακετυλιωμένων ιστονών H3 και H4. Η ανάλυση του ανοσοκατακρημνισμένου DNA του υποκινητή *gPHO5* σε σχέση με αυτό του ενδογενούς υποκινητή *PHO5* έγινε σε αντιδράσεις ποσοτικού PCR, με τους τρεις εκκινητές που περιγράφηκαν στο Κεφ.3. Στην Εικ.3Α φαίνεται ότι όλες οι μεταλλαγμένες μορφές του Gcn5, στην περιοχή του bromodomain, ήταν ικανές να ακετυλιώνουν τη χρωματίνη στην περιοχή του *gPHO5* στις συνθήκες επαγωγής του ενεργοποιητή Gcn4, σε αντίθεση με την μη-ενεργή μορφή HAT του Gcn5 (F221A). Συγκρίνοντας μάλιστα το ποσοστό του ανοσοκατακρημνισμένου DNA *gPHO5/PHO5* στην περίπτωση των μεταλλαγμένων (στο bromodomain) πρωτεϊνών, ήταν ακόμη μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό της φυσικού τύπου πρωτεΐνης. Αυτό φανερώνει μια κατάσταση υπερακετυλίωσης στον υποκινητή στις συνθήκες έλλειψης της δράσης του bromodomain και όχι μείωση της ενεργότητας του Gcn5 *in vivo*.

Λόγω της συνδυασμένης δράσης των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5* και της επαγωγής της δράσης του SWI/SNF από την ακετυλίωση (Κεφ.3), ελέγχθηκε αν και παρουσία των μεταλλαγμένων μορφών του bromodomain του Gcn5 ήταν δυνατή η επαγωγή της δράσης του SWI/SNF στον υποκινητή αυτόν. Χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της επίδρασης περιοριστικών ενζύμων στο νουκλεοσωμικό DNA απομονωμένων πυρήνων, για την παρακολούθηση των αλλαγών στη δομή της χρωματίνης όπως περιγράφηκε στο Κεφ.3. Συγκεκριμένα, απομονωμένοι πυρήνες από στελέχη ζύμης με τις διάφορες πρωτεΐνες Gcn5, επώαστηκαν με το ένζυμο *ClaI* και μετρήθηκε η δεκτικότητα σε αυτό του νουκλεοσωμικού DNA που αντιστοιχεί στην περιοχή του υποκινητή *gPHO5*. Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης λόγω δράσης του SWI/SNF στην περιοχή συνοδεύεται με αύξηση της πρόσβασης της *ClaI* στο DNA του -2 νουκλεοσώματος του *gPHO5*, όπως φαίνεται στην Εικ.3B (διαδρομή 1), για στελέχη με τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη Gcn5. Αντίθετα, στα στελέχη με τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn5 παρατηρήθηκε αδυναμία πρόσβασης της *ClaI* στο αντίστοιχο DNA, υποδηλώνοντας την έλλειψη αναδιαμόρφωσης αυτού του νουκλεοσώματος λόγω μη-επαγωγής της δράσης του συμπλόκου SWI/SNF στον υποκινητή (Εικ.3B, διαδρομές 2-4).

Επομένως, οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn5 που καταργούν τη δράση του bromodomain, έχουν την ικανότητα να ενσωματώνονται στο σύμπλοκο SAGA και να ακετυλιώνουν τη χρωματίνη στην περιοχή του υποκινητή *gPHO5*, στις συνθήκες επαγωγής του ενεργοποιητή Gcn4. Αδυνατούν όμως παραπέρα να επάγουν τη δράση

του συμπλόκου SWI/SNF, η οποία είναι απαραίτητη για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και ενεργοποίηση της μεταγραφής.



**Εικόνα 3. Οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn5 είναι ικανές να ακετυλιώνουν τη χρωματίνη αλλά αδυνατούν να επάγουν την αναδιαμόρφωσή της στον υποκινητή *gPHO5*. (A)** Μέτρηση του ποσοστού της ανοσοκατακρημνισμένης ακετυλιωμένης χρωματίνης στον υποκινητή *gPHO5*, με αντισώματα εναντίον των ακετυλιωμένων ιστονών H3 και H4. Στη διαδρομή 1 είναι το ποσοστό του ανοσοκατακρημνισμένου DNA της περιοχής του *gPHO5* σε σχέση με τον υποκινητή *PHO5* σε στέλεχος με την πρωτεΐνη Gcn5 που δεν έχει ενεργότητα HAT (F221A). Στις υπόλοιπες διαδρομές φαίνεται το αντίστοιχο ποσοστό σε στελέχη με τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη (Gcn5) ή τις μεταλλαγμένες στην περιοχή του bromodomain. Όλα τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε συνθήκες επαγωγής του Gcn4 (10 mM AT). Η ανάλυση του ανοσοκατακρημνισμένου DNA έγινε όπως περιγράφηκε στην Εικ.5 του Κεφ.3. **(B)** Μέτρηση της δεκτικότητας του νουκλεοσωμικού DNA του υποκινητή *gPHO5* στο περιοριστικό ένζυμο *ClaI* σε απομονωμένους πυρήνες στελεχών με τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη (Gcn5) ή τις μεταλλαγμένες στο bromodomain. Η ανάπτυξη των στελεχών έγινε σε θρεπτικό μέσο με 10 mM AT και η ανάλυση του απομονωμένου DNA όπως περιγράφεται στην Εικ.2B του Κεφ.3.

## Η έλλειψη της πρωτεΐνης Sin1 καταστέλλει μεταλλαγές στο bromodomain του Gcn5 και σε συστατικά του SWI/SNF

Γενετικές μελέτες στη ζύμη είχαν προσδιορίσει από παλιά, μια ομάδα γονιδίων (*SIN* και *SPT*) μεταλλαγές των οποίων καταστέλλουν τις μεταλλαγές σε συστατικά του συμπλόκου SWI/SNF και επιτρέπουν την έκφραση γονιδίων που απαιτούν τη δράση του. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει γονίδια είτε των τεσσάρων ιστονών ή άλλων συστατικών της χρωματίνης, που εμπλέκονται στη συγκρότηση της δομής της αλλά μπορεί και να επηρεάζουν άμεσα τη μεταγραφή (Winston and Carlson, 1992). Ένα από αυτά τα γονίδια είναι και το *SINI/SPT2* που κωδικοποιεί για μια σχετικά άφθονη πρωτεΐνη στον πυρήνα των κυττάρων, με ικανότητα να προσδένεται, μη-επιλεκτικά, σε DNA *in vitro*. Στην αλληλουχία έχει ομόλογες περιοχές με την πρωτεΐνη HMG1 των θηλαστικών και γι' αυτό έχουν προταθεί ανάλογοι ρόλοι με αυτήν, στη συγκρότηση της χρωματίνης και παρεμπόδιση της μεταγραφής (Kruger and Herskowitz, 1991). Η διαπίστωση ότι οι μεταλλαγές *sin1* μπορούν να καταστείλουν, εκτός από τις μεταλλαγές *swi/snf* και μεταλλαγές σε συστατικά του συμπλόκου

SAGA, σύνδεσε τη δράση των δύο συμπλόκων *in vivo*. Το γεγονός επίσης ότι το σύμπλοκο SAGA μπορεί να ακετυλιώνει *in vitro* την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Sin1, όπως και η *in vitro* φυσική αλληλεπίδραση που παρατηρήθηκε της Sin1 με το σύμπλοκο SWI/SNF, έχουν οδηγήσει στην υπόθεση ότι η Sin1 αποτελεί έναν από τους άμεσους στόχους της δράσης των παραπάνω συμπλόκων στη διαδικασία της μεταγραφικής ενεργοποίησης (Pollard and Peterson, 1997, Perez-Martin and Johnson, 1998). Ο ακριβής ρόλος όμως της πρωτεΐνης Sin1 στη χρωματίνη και πως η έλλειψή της επηρεάζει τη μεταγραφή δεν είναι ακόμη ξεκάθαρα.

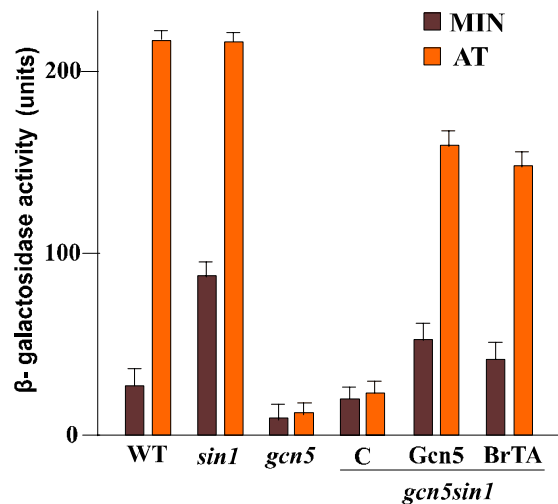
Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της μεταλλαγής *sin1* στην έκφραση του γονιδίου *gPHO5-lacZ*, δημιουργήθηκαν τα κατάλληλα ισογενή στελέχη ζύμης, με έλλειψη του γονιδίου *SINI*. Μετρήσεις της ενζυμικής ενεργότητας της παραγόμενης β-γαλακτοσιδάσης στα στελέχη αυτά (Εικ.4), έδειξαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *gPHO5-lacZ* στο στέλεχος *sin1* σε σχέση με το φυσικό τύπο (WT), στις κανονικές συνθήκες θρέψης (MIN). Αυτό υποδηλώνει ίσως μια χαλάρωση της δομής της χρωματίνης στην περιοχή του υποκινητή από την απουσία του Sin1. Η χαλάρωση αυτή όμως δεν αντιστοιχούσε στην παρατηρούμενη αναδιαμόρφωση της χρωματίνης που επιτυγχάνεται σε συνθήκες επαγωγής του συστήματος (AT), όπως έδειξαν προκαταρκτικά πειράματα επίδρασης του περιοριστικού ενζύμου *ClaI* στο νουκλεοσωμικό DNA της περιοχής. Η αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων παρατηρήθηκε μόνο στις συνθήκες επαγωγής του *Gcn4* και η μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή (Εικ.4) γινόταν κατ' ανάλογο τρόπο στα δύο στελέχη, όπως έδειξαν κινητικές μελέτες της επαγωγής.

Στο στέλεχος *gcn5* η έλλειψη του *SINI* είχε μια μικρή μόνο επίδραση στα επίπεδα έκφρασης του *gPHO5-lacZ*, στις κανονικές συνθήκες θρέψης, αυξάνοντάς τα ελαφρώς σε σχέση με την παρουσία του *SINI* (Εικ.4, σύγκριση διαδρομής *gcn5sin1-C* με διαδρομή *gcn5*). Όπως αναμενόταν, λόγω της έλλειψης του *Gcn5* δε γινόταν επαγωγή της μεταγραφής σε θρεπτικό μέσο με AT. Για τον έλεγχο στη συνέχεια της αναγκαιότητας του bromodomain του *Gcn5*, στελέχη *gcn5sin1* μετασχηματίστηκαν με τα διάφορα γονίδια *GCN5*, φυσικού τύπου ή μεταλλαγμένα και μετρήθηκε η έκφραση του *gPHO5-lacZ* στις διάφορες συνθήκες. Όπως φαίνεται στην Εικ.4, η έλλειψη του *SINI* μπορούσε να καταστείλει, σχεδόν πλήρως, τις μεταλλαγές στο bromodomain του *GCN5* (δείχνεται μόνο το BrTA). Τα επαγόμενα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου, παρουσία αυτών των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών έφταναν σχεδόν τα επίπεδα του φυσικού τύπου πρωτεΐνης (*Gcn5*).

Επίσης προκαταρκτικές μετρήσεις της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης που παράγεται από την έκφραση του *gPHO5-lacZ* σε στέλεχος *swi2sin1* έδειξαν την πλήρη σχεδόν καταστολή της μεταλλαγής *swi2* από την μεταλλαγή *sin1*. Έτσι παρότι η έλλειψη του *SINI* σε στέλεχος *gcn5* έχει μικρή μόνο επίδραση στην επαγωγή του *gPHO5-lacZ*, σε στελέχη που στερούνται τη δράση του bromodomain του *Gcn5* ή του συμπλόκου SWI/SNF έχει σημαντική επίδραση, καταργώντας κατά πολύ την απαίτησή τους για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου. Αυτοί οι κοινοί γενετικοί φαινότυποι μπορεί να συσχετίζονται με ένα κοινό ρόλο του bromodomain του *Gcn5* και του συμπλόκου SWI/SNF, στο να ξεπεραστεί η παρεμποδιστική για τη



μεταγραφή φύση της χρωματίνης στον υποκινητή *gPHO5*, μέρος της οποίας φαίνεται να είναι και η πρωτεΐνη Sin1.



**Εικόνα 4. Η έλλειψη της πρωτεΐνης Sin1 καταστέλλει την έλλειψη της δράσης του bromodomain του Gcn5.** Μετρήσεις της ενζυμικής ενεργότητας της παραγόμενης β-γαλακτοσιδάσης από την έκφραση του *gPHO5-lacZ*, στα διάφορα στελέχη, στις κανονικές συνθήκες θρέψης (MIN) ή στις συνθήκες επαγωγής της Gcn4-εξαρτώμενης μεταγραφής (AT). Το στέλεχος *gen5sin1* ήταν είτε μη-μετασχηματισμένο (C) είτε παρήγαγε τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη Gcn5 ή τη μεταλλαγμένη BrTA.

### **Το bromodomain του Gcn5 συντονίζει τη δράση του συμπλόκου SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5***

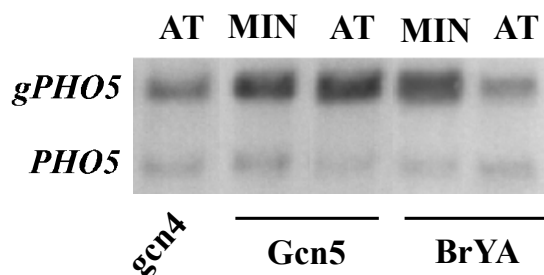
Ο γενετικός συσχετισμός του bromodomain του Gcn5 με το σύμπλοκο SWI/SNF ενισχύει τη λειτουργική συσχέτισή τους, που προκύπτει από την αδυναμία αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και επαγωγής της έκφρασης του υποκινητή *gPHO5* λόγω έλλειψης αυτών. Η λειτουργική συσχέτισή τους ίσως συνδυάζεται και με την υπερακετυλίωση της χρωματίνης που παρατηρείται στις δύο περιπτώσεις, στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της ακετυλιωμένης χρωματίνης του υποκινητή (Εικ.5 του Κεφ.3 και Εικ.3Α εδώ). Είναι πιθανόν το bromodomain του Gcn5, μέσω των αλληλεπιδράσεων που μπορεί να κάνει με τις ακετυλιωμένες ιστόνες, να ρυθμίζει τη δράση του SWI/SNF, επηρεάζοντας τις επαφές του με τη χρωματίνη ή/και την ενζυμική ενεργότητά του. Έτσι αρχικά εξετάστηκε η δυνατότητα στρατολόγησης του συμπλόκου SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5*, παρουσία των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5.

Έγινε ανοσοκατακρήμνιση του συμπλόκου SWI/SNF με αντίσωμα εναντίον της υπομονάδας Snf5 του SWI/SNF και σύγκριση του ανοσοκατακρημνισμένου ποσοστού του DNA των υποκινητών *gPHO5/PHO5* μετά από ποσοτική ανάλυσή του, όπως περιγράφηκε στο Κεφ.3. Όπως δείχνει η Εικ.5, το Gcn4 στρατολόγούσε το σύμπλοκο SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5*, στις κανονικές συνθήκες θρέψης των κυττάρων (MIN), ανεξάρτητα της μορφής των πρωτεϊνών Gcn5 που είναι ενσωματωμένες στα σύμπλοκα SAGA (φυσικού τύπου ή μεταλλαγμένης στο

bromodomain). Στις συνθήκες επαγωγής του Gcn4 (AT) όμως, όπου επάγεται κανονικά η ενεργότητα HAT και των δύο μορφών του συμπλόκου SAGA, το σύμπλοκο SWI/SNF παρέμενε και δρούσε στον υποκινητή μόνο παρουσία της φυσικού τύπου πρωτεΐνης Gcn5 στο SAGA (Εικ.5). Αντίθετα παρουσία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Gcn5 (BrYA), το σύμπλοκο SWI/SNF δεν παρέμενε στον υποκινητή, στις συνθήκες βέβαια που ελέγχθηκε η παρουσία του (μετά 12 τουλάχιστον ώρες επαγωγής). Αυτό ίσχυε και για τις τρεις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Gcn5, στις ίδιες συνθήκες.

Έτσι η δράση του bromodomain του Gcn5 φαίνεται ότι απαιτείται, τουλάχιστον, για τη σταθερή παραμονή του συμπλόκου SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5*, στις συνθήκες όπου η δράση του SAGA οδηγεί σε αυξημένη ακετυλίωση των ιστονών στην περιοχή.

### Snf5



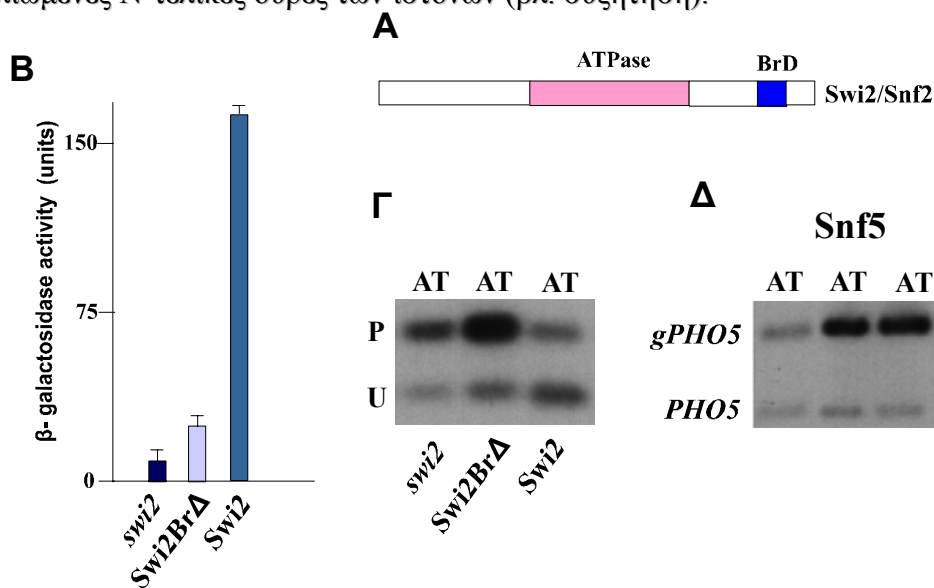
**Εικόνα 5.** Το bromodomain του Gcn5 απαιτείται για την παραμονή του συμπλόκου SWI/SNF στον υποκινητή *gPHO5*. Ανοσοκατακρήμνιση του SWI/SNF μετά τη στερέωσή του (με φορμαλδεΰδη) στη χρωματίνη, με το αντίσωμα εναντίον της υπομονάδας Snf5. Οι συνθήκες ανάπτυξης των στελεχών ήταν σε κανονικές συνθήκες θρέψης (MIN) ή σε συνθήκες πείνας για ιστιδίνη (10 mM AT στο μέσο). Η ανάλυση του απομονωμένου DNA έγινε όπως περιγράφεται στην Εικ.5 του Κεφ.3.

### Το bromodomain του SWI2/SNF2 είναι επίσης απαραίτητο για την ενεργοποίηση της μεταγραφής από τον υποκινητή *gPHO5*

Ανάμεσα στην κατηγορία των πρωτεϊνών που περιέχουν bromodomain στο μόριό τους ανήκουν και όλες οι ATPάσες των συμπλόκων της οικογένειας SWI/SNF (Κεφ.1, Πίνακας 2). Μια από αυτές στη ζύμη είναι η πρωτεΐνη Swi2/Snf2, που αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου SWI/SNF. Η πρωτεΐνη αυτή έχει ένα bromodomain, στο C-τελικό της άκρο (Εικ.6Α), ο ρόλος του οποίου δεν έχει διευκρινιστεί μέχρι σήμερα, αν και γενικά θεωρείται μη-απαραίτητο για τη δράση της πρωτεΐνης. Το τελευταίο προκύπτει από μια γενετική μελέτη όπου η έλλειψη του bromodomain του Swi2/Snf2 συμπληρώνει κανονικά τους φαινοτύπους ενός στελέχους *swi2/snf2*, που αφορούν την αδυναμία ανάπτυξής του σε θρεπτικά μέσα με πηγή άνθρακα τη ραφινόζη, σουκρόζη, γαλακτόζη ή γλυκερόλη (Laurent *et al.*, 1993). Η ενεργή συμμετοχή του bromodomain του Gcn5 στη μεταγραφική επαγωγή του υποκινητή *gPHO5* μας ώθησε στον έλεγχο της πιθανής συμμετοχής σε αυτήν και του bromodomain του Swi2/Snf2.

Έγινε η αντίστοιχη πλασμιδιακή κατασκευή που είχε αναφερθεί στην παραπάνω γενετική μελέτη, με έλλειψη της C-τελικής περιοχής του γονιδίου *SWI2/SNF2*, αφαιρώντας τα κατάλοιπα 1554-1703 και όλη την περιοχή του bromodomain (SBrΔ). Σε συμφωνία με τη μελέτη αυτή, το στέλεχος *swi2/snf2* μετασχηματισμένο με τη μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου *SWI2/SNF2*, μεγάλωνε κανονικά στα παραπάνω θρεπτικά μέσα. Στο ίδιο όμως στέλεχος παρατηρήθηκε αδυναμία πλήρους επαγωγής του υποκινητή *gPHO5*. Μετρώντας τα επίπεδα ενζυμικής ενεργότητας της παραγόμενης β-γαλακτοσιδάσης από το γονίδιο αναφοράς *gPHO5-lacZ* σε συνθήκες επαγωγής του Gcn4 (AT), φάνηκε ότι η πλήρης έκφραση του γονιδίου απαιτούσε το bromodomain του Swi2/Snf2 (Εικ.6B). Παρουσία της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Swi2/Snf2 επίσης δε γινόταν αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στην περιοχή του υποκινητή, όπως διαπιστώθηκε με την επίδραση του περιοριστικού ενζύμου *ClaI* σε απομονωμένους πυρήνες των παραπάνω στελεχών (Εικ.6Γ). Τέλος ελέγχθηκε η στρατολόγηση του συμπλόκου SWI/SNF που περιείχε αυτήν τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Swi2/Snf2, στον υποκινητή *gPHO5* στις συνθήκες επαγωγής του. Αυτό έγινε με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμισης του συμπλόκου μετά τη στερέωσή του στη χρωματίνη, με αντίσωμα εναντίον της υπομονάδας Snf5. Συγκρίνοντας το ανοσοκατακρημισμένο ποσοστό του DNA των υποκινητών *gPHO5/PHO5* φαίνεται ότι στις συνθήκες επαγωγής του ενεργοποιητή Gcn4, ήταν δυνατή η στρατολόγηση του παραπάνω συμπλόκου και η παραμονή του στον υποκινητή παρά την αδυναμία δράσης του (Εικ.6Δ).

Επομένως η λειτουργία του bromodomain του Swi2/Snf2, όπως και του Gcn5, συντονίζει την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στον υποκινητή *gPHO5* από το σύμπλοκο SWI/SNF και οδηγεί σε ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η λειτουργία των bromodomains ίσως καθορίζεται από τις ειδικές αλληλεπιδράσεις τους με τις ακετυλιωμένες N-τελικές ουρές των ιστονών (βλ. συζήτηση).



**Εικόνα 6. Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και επαγωγή της μεταγραφής στον υποκινητή *gPHO5* απαιτεί την ύπαρξη του bromodomain του Swi2/Snf2. (A)** Οι δομικές περιοχές της πρωτεΐνης Swi2/Snf2, της ζύμης. Διακρίνονται η περιοχή της ενζυμικής ενεργότητάς της ως ATPάση (ATPase) και το bromodomain (BrD). **(B)** Μετρήσεις της ενεργότητας της παραγόμενης β-γαλακτοσιδάσης από την έκφραση του *gPHO5-lacZ*, σε στελέχη με τη φυσικού τύπου πρωτεΐνη Swi2/Snf2 (*Swi2*) ή αυτήν που της έλλειπε το bromodomain (SBrΔ). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε μη-μετασχηματισμένο στέλεχος *swi2/snf2* και όλες οι μετρήσεις έγιναν σε συνθήκες επαγωγής του Gcn4 (10 mM AT). **(Γ)** Μέτρηση της δεκτικότητας του νουκλεοσωμικού DNA του υποκινητή *gPHO5* στο περιοριστικό ένζυμο *ClaI* σε απομονωμένους πυρήνες των παραπάνω στελεχών και στις παραπάνω συνθήκες. **(Δ)** Ανοσοκατακρήμιση του συμπλόκου SWI/SNF, μετά τη στερέωσή του στη χρωματίνη, με το αντίσωμα εναντίον της υπομονάδας Snf5, από τα παραπάνω στελέχη και στις ίδιες συνθήκες. Η ανάλυση του απομονωμένου DNA έγινε όπως περιγράφεται στην Εικ.5 του Κεφ.3.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λειτουργική σχέση που παρατηρείται στον υποκινητή *gPHO5* μεταξύ της δράσης των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF προϋποθέτει την ύπαρξη ενός συνδετικού κρίκου, που να συνδέει την ακετυλίωση των ιστονών με την αναδιαμόρφωσή τους. Η ύπαρξη στις καταλυτικές υπομονάδες αυτών των συμπλόκων μιας λειτουργικής περιοχής (bromodomain) που πρόσφατα δείχθηκε ότι έχει την ικανότητα να δεσμεύει ακετυλιωμένες λυσίνες ιστονών, φαντάζει ως ένας τέτοιος πιθανός συνδετικός κρίκος. Η αλληλεπίδραση αυτών των περιοχών με τις ακετυλιωμένες ιστόνες ίσως σηματοδοτεί τις επαφές ή τη δράση αυτών ή άλλων παραγόντων της χρωματίνης και της μεταγραφής. Για τη διερεύνηση του ρόλου των bromodomains των πρωτεϊνών Gcn5 και Swi2/Snf2 έγιναν μεταλλάξεις ή ελλείψεις σε αυτές τις περιοχές και ελέγχθηκε η επίδρασή τους στα διάφορα στάδια της μεταγραφικής επαγωγής του γονιδίου *gPHO5-lacZ*, *in vivo*.

Όπως δείχθηκε, η Gcn4-εξαρτώμενη επαγωγή του υποκινητή *gPHO5* απαιτούσε απόλυτα και τα δύο παραπάνω bromodomains. Αυτό ίσχυε τόσο για τις πρωτεΐνες Gcn5 με εντοπισμένες μεταλλάξεις σε κατάλοιπα του bromodomain όσο και για τις πρωτεΐνες Gcn5 και Swi2/Snf2 με έλλειψη της αντίστοιχης περιοχής. Ο έλεγχος πάντως των υπολοίπων φαινοτύπων των στελεχών *gcn5* και *swi/snf* που παρήγαγαν τις παραπάνω μεταλλαγμένες μορφές, έδειξε ότι η απαίτηση του bromodomain στην *in vivo* δράση των πρωτεϊνών Gcn5 και Swi2/Snf2, δεν ήταν η ίδια για όλα τα γονίδια. Για τη διευκρίνηση του ρόλου των bromodomains στη μεταγραφική επαγωγή του υποκινητή *gPHO5* εξετάστηκε αν κάποια από τις δράσεις των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF επηρεαζόταν από τις μεταλλάξεις των bromodomains. Έτσι, για τις μεταλλαγμένες μορφές του Gcn5 δείχθηκε ότι δεν επηρέαζαν την ενεργότητα HAT του συμπλόκου SAGA στο οποίο ανήκαν, αλλά επιδρούσαν στη μετέπειτα δράση του συμπλόκου SWI/SNF. Την ίδια επίδραση σε αυτό είχε και η έλλειψη του bromodomain του Swi2/Snf2. Η αδυναμία επαγωγής της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και στις δύο περιπτώσεις εξηγούσε και την έλλειψη μεταγραφής από τον υποκινητή *gPHO5*, στις συνθήκες που απαιτούσε τη δράση του SWI/SNF.

Η λειτουργική σχέση που παρατηρήθηκε μεταξύ της δράσης του bromodomain του Gcn5 και της δράσης του συμπλόκου SWI/SNF ενισχύθηκε και από τον γενετικό συσχετισμό τους. Συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις στο bromodomain του Gcn5 όπως και οι μεταλλάξεις *swi/snf* καταστέλλονταν από την έλλειψη της πρωτεΐνης Sin1, που θεωρείται συστατικό της χρωματίνης και αρνητικός ρυθμιστής της έκφρασης γονιδίων που απαιτούν τη δράση του SAGA και του SWI/SNF. Περαιτέρω έλεγχος της επίδρασης των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών Gcn5 στη δράση του SWI/SNF έδειξε

ότι το bromodomain του Gcn5 ήταν απαραίτητο, τουλάχιστον για τη σταθερή παραμονή του συμπλόκου στον υποκινητή *gPHO5*, στις συνθήκες επαγωγής του Gcn4. Η αυξημένη ακετυλίωση των ιστονών που παρατηρείται τότε στην περιοχή, από τη δράση του SAGA, ίσως δρα αρνητικά στη σταθεροποίηση του SWI/SNF στη χρωματίνη. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι, σε *in vitro* πειράματα έχει δειχθεί η ικανότητα του SWI/SNF να προσδένεται σε νουκλεοσωμικό DNA και οι επαφές αυτές, όπως δείχθηκε *in vivo* στον υποκινητή *HO*, είναι ανεξάρτητες από τον ενεργοποιητή που το στρατολογεί (Quinn *et al.*, 1996, Cosma *et al.*, 1999). Το bromodomain του Gcn5, μέσω των αλληλεπιδράσεων που κάνει με τις ακετυλιωμένες ιστόνες, μπορεί να εξουδετερώνει την παραπάνω αρνητική επίδραση της ακετυλίωσης στην πρόσδεση του SWI/SNF. Δεν αποκλείεται όμως η δράση του bromodomain να σηματοδοτεί και την ενεργότητα του SWI/SNF για αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, μετά την ακετυλίωσή της. Αυτό μπορεί να γίνεται με την απελευθέρωση των ακετυλιωμένων ουρών των ιστονών από την οργανωμένη δομή της χρωματίνης ή τον πυρήνα του νουκλεοσώματος και έκθεσή τους στη δράση του SWI/SNF. Σε αυτήν την περίπτωση, η μη-σταθερή παραμονή του συμπλόκου SWI/SNF λόγω έλλειψης της δράσης του bromodomain του Gcn5 (Εικ.4) μπορεί να είναι το αποτέλεσμα και όχι η αιτία της αδυναμίας δράσης του συμπλόκου στον υποκινητή *gPHO5*.

Στην περίπτωση της μεταλλαγμένης μορφής του Swi2/Snf2, η ύπαρξη του συμπλόκου SWI/SNF στον υποκινητή στις συνθήκες επαγωγής του παρά την αδυναμία δράσης του, αντανακλά την αναγκαιότητα του bromodomain της πρωτεΐνης για την ενεργοποίηση της δράσης του συμπλόκου. Είναι πιθανό για την επαγωγή της ενζυμικής ενεργότητας της Swi2/Snf2 να απαιτούνται οι ακετυλιωμένες ουρές των ιστονών και οι επαφές που κάνει το bromodomain της πρωτεΐνης με αυτές. Ωστόσο σε *in vitro* πειράματα έχει αναφερθεί ότι η ενεργότητα ATPάσης και η αναδιαμόρφωση νουκλεοσωμάτων από τα σύμπλοκα SWI/SNF της ζύμης και των θηλαστικών, δεν εξαρτάται καν από τις ουρές των ιστονών (Guyon *et al.*, 1999, Logie *et al.*, 1999). Άλλοι πιθανοί ρόλοι του bromodomain του Swi2/Snf2 είναι στη σηματοδότηση αυτής της ενεργότητας με την αναγνώριση ειδικών προτύπων ακετυλίωσης στα νουκλεοσωμικά υποστρώματα ή στη ρύθμιση των επαφών του SWI/SNF (στην περίπτωση υπερακετυλιωμένης χρωματίνης) και στόχευση της δράσης του σε συγκεκριμένο νουκλεοσωμικό υπόστρωμα.

Ανεξάρτητα πάντως του μηχανισμού δράσης των bromodomains των Gcn5 και Swi2/Snf2, ο οποίος μπορεί να είναι κοινός ή να διαφέρει, και τα δύο απαιτούνται για την επαγωγή της μεταγραφής από τον υποκινητή *gPHO5 in vivo*, αποτελώντας το συνδετικό κρίκο της ακετυλίωσης με την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Αυτό σε

συνδυασμό με τη μεγάλη εξελικτική συγγένειά τους, ενισχύουν την γενική προτεινόμενη δομική αλλά και λειτουργική ομολογία των bromodomains. Πρόσφατα κρυσταλλογραφικά δεδομένα πάντως επιβεβαίωσαν την δομική ομολογία του bromodomain του Gen5 με αυτό του PCAF, καθώς και την ικανότητά του να αναγνωρίζει και να δεσμεύει τις ακετυλιωμένες λυσίνες πεπτιδίων της ιστόνης H4 *in vitro* (Owen *et al.*, 2000). Έτσι ο *in vivo* ρόλος του bromodomain του Gen5 αλλά και των άλλων ενζύμων HAT, συσχετίζεται άμεσα με τις επαφές που αυτό κάνει με τις ακετυλιωμένες ιστόνες. Για τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των bromodomains που δεν έχει ακόμη δειχτεί κάτι αντίστοιχο, δεν αποκλείεται να πραγματοποιούν και διαφορετικές επαφές μέσα στο ίδιο περιβάλλον ακετυλιωμένης χρωματίνης. Την εξειδίκευση της αλληλεπίδρασής τους με το υπόστρωμα μπορεί να καθορίζει η παρατηρούμενη ποικιλότητα των καταλοίπων, που για τα ένζυμα HAT έχει δειχθεί ότι κάνουν άμεση επαφή με τα ακετυλιωμένα πεπτίδια, αλλά και άλλων καταλοίπων της περιοχής. Επίσης ο αριθμός των bromodomains μέσα σε μια πρωτεΐνη (συνήθως υπάρχουν 1 έως 2) ίσως συνεισφέρει στην εξειδίκευσή της για το υπόστρωμα.

Με βάση τα παραπάνω μπορεί να εξηγηθεί και η ποικιλότητα των φαινοτύπων που παρατηρείται μεταξύ των διαφόρων πρωτεϊνών από την έλλειψη του bromodomain. Ειδικότερα, η έλλειψη του bromodomain από τις ATPάσες της οικογένειας των συμπλόκων SWI/SNF προκαλεί σε κάθε περίπτωση διαφορετικούς φαινοτύπους. Για την ATPάση Brahma της δροσόφιλας, η έλλειψή του δεν προκαλεί κάποιο διακριτό φαινότυπο και χαρακτηρίζεται μη απαραίτητο για τη λειτουργία της πρωτεΐνης, σε αντιστοιχία με αυτό που αναφέρθηκε για την ομόλογή της Swi2/Snf2 στη ζύμη. Αντίθετα η απουσία του bromodomain της ομόλογης πρωτεΐνης hBRM στα θηλαστικά, οδηγεί σε μειωμένη σταθερότητα και απώλεια του πυρηνικού εντοπισμού της πρωτεΐνης. Όσον αφορά το bromodomain της ATPάσης του συμπλόκου RSC, στη ζύμη, φαίνεται να είναι απαραίτητο για τη δράση της καθώς η έλλειψή του προκαλεί ατελή ανάπτυξη των κυττάρων στους 37°C. Απαραίτητο όμως είναι και το ένα από τα δύο bromodomains που υπάρχουν σε κάθε μια από τις υπομονάδες Rsc1 και Rsc2 του ίδιου συμπλόκου. Ενώ η απομάκρυνση του πρώτου bromodomain δεν προκαλεί κάποιο ιδιαίτερο φαινότυπο, η απομάκρυνση του δεύτερου καταργεί τελείως τη δράση της κάθε υπομονάδας, προκαλώντας ίδιους φαινοτύπους με την έλλειψη όλης της πρωτεΐνης (Winston and Allis, 1999). Οι παρατηρήσεις αυτές, όπως και τα παραπάνω αποτελέσματα για τη δράση των bromodomains των Gen5 και Swi2/Snf2 συμπεραίνουν ότι, η αναγκαιότητα του bromodomain για τη δράση μιας πρωτεΐνης *in vivo* εξαρτάται από το συγκεκριμένο περιβάλλον που αυτή δρα και γενικεύσεις πιθανώς να οδηγούν σε λάθος εκτίμηση του ρόλου του αντίστοιχου bromodomain.

Σχετικά με τον *in vivo* ρόλο των bromodomains, με βάση την προτεινόμενη δομική και λειτουργική ομολογία τους έχουν διατυπωθεί διάφορα μοντέλα δράσης, που το ένα δεν αποκλείει αναγκαστικά το άλλο αλλά μπορεί και να διαφέρουν σε κάθε περίπτωση πρωτεϊνών:

- **Σταθεροποίηση συμπλόκων στην ακετυλιωμένη χρωματίνη.** Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η αλληλεπίδραση του bromodomain με τις ακετυλιωμένες ιστόνες μιας περιοχής μπορεί να εξουδετερώνει την αρνητική επίδραση της ακετυλίωσης στη σταθεροποίηση παραγόντων στη χρωματίνη. Η σταθεροποίηση των επαφών αυτών μπορεί να είναι απαραίτητη για να επάγει τη δράση ή να διευκολύνει την πιο τοπική δράση των παραγόντων αυτών (Winston and Allis, 1999).

- **Αλληλεπίδραση με ακετυλιωμένες πρωτεΐνες διαφορετικές από τις ιστόνες.** Από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες φάνηκε ότι οι επαφές που κάνει το bromodomain με τα ακετυλιωμένα πεπτίδια των ιστονών περιορίζονται σε σχετικά μικρή επιφάνεια του υποστρώματος (μόνο σε 4 κατάλοιπα), σε αντίθεση με την εκτεταμένη επιφάνεια επαφών με τις περιοχές HAT (Owen *et al.*, 2000). Αυτό δεν αποκλείει το ενδεχόμενο, το bromodomain να μπορεί να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες, διαφορετικές από τις ιστόνες, που περιέχουν αυτήν την κατάλληλη αλληλουχία. Το γεγονός ότι τα σύμπλοκα HAT ακετυλιώνουν και μη-ιστονικές πρωτεΐνες (Κεφ.1) συνηγορεί σε αυτήν την υπόθεση. Έτσι το bromodomain μιας πρωτεΐνης μπορεί να συμμετέχει στην απομάκρυνση συστατικών της χρωματίνης που είναι αρνητικοί ρυθμιστές της μεταγραφής (Sin1, HMG-17 κλπ.) ή στη σταθεροποίηση μεταγραφικών παραγόντων στη χρωματίνη (p53, MyoD, TFIIIE/TFIIF κλπ.), μετά την ακετυλίωσή τους από τα σύμπλοκα HAT.

- **Αυτορύθμιση της εγγενούς ενζυμικής ενεργότητας των συμπλόκων HAT.** Κατά αναλογία με τις κινάσες τυροσίνης οι οποίες αυτο-φωσφορυλιώνονται και ανενεργοποιούνται ενζυμικά, έχει προταθεί ένας παρόμοιος ρόλος για την αυτο-ακετυλίωση που παρατηρείται σε κάποια ένζυμα HAT. Η αλληλεπίδραση του bromodomain αυτών με τις ακετυλιωμένες λυσίνες στο μόριό τους ή στη χρωματίνη πιθανώς ρυθμίζει την περαιτέρω ενζυμική δράση τους (Winston and Allis, 1999).

- **Ανακύκλωση (recycling) της δράσης των συμπλόκων στα νουκλεοσωμικά υποστρώματα.** Από μελέτες της ενζυμικής δράσης των συμπλόκων SWI/SNF και RSC της ζύμης, σε σειρές *in vitro* ανασυγκροτημένων νουκλεοσωμάτων, έχει δειχθεί ότι οι N-τελικές ουρές των ιστονών απαιτούνται για την απομάκρυνση του υποστρώματος από τα σύμπλοκα και την ανακύκλωση της δράσης τους σε πολλαπλές σειρές. Μάλιστα παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού ανακύκλωσης όταν το υπόστρωμα ήταν υπερακετυλιωμένο (Logie *et al.*, 1999). Έτσι ένας άλλος πιθανός

ρόλος του bromodomain των ATPασών μπορεί να είναι η συμμετοχή του στην απομάκρυνση του υποστρώματος από το ένζυμο και συνέχιση του κύκλου της καταλυτικής του δράσης. Η θεώρηση του καταλυτικού κύκλου στην ενεργότητα του συμπλόκου SWI/SNF στηρίζεται σε παρατηρήσεις τόσο σε *in vitro* νουκλεοσωμικές σειρές όσο και *in vivo* στην έκφραση του *SUC2*, όπου για την αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων απαιτείται η συνεχής δράση του συμπλόκου (Logie *et al.*, 1999, Sudarsanam *et al.*, 1999, Biggar and Crabtree, 1999).

Έτσι η ύπαρξη του bromodomain, ενός εξελικτικά συντηρημένου μοτίβου, σε πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με την τροποποίηση ή αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, είχε αρχικά οδηγήσει στην υπόθεση ότι το bromodomain δρα στην “αγκυροβόληση” αυτών των παραγόντων στη χρωματίνη. Η *in vitro* αλληλεπίδραση του bromodomain με τις ακετυλιωμένες λυσίνες ιστονών, που παρατηρήθηκε στη συνέχεια, εντοπίζει τη δράση του στη μεταγραφικά ενεργή, ακετυλιωμένη χρωματίνη. Τέλος η *in vivo* συμμετοχή του στο συντονισμό της δράσης των παραγόντων SAGA και SWI/SNF, που δείχθηκε σε αυτό το κεφάλαιο, οριοθετεί τη δράση του bromodomain στην επαγωγή της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης από την ακετυλίωση των ιστονών.

### **Προτεινόμενο μοντέλο μεταγραφικής ενεργοποίησης στον υποκινητή *gPHO5***

Η μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή *gPHO5* που χαρακτηρίζεται από την αυστηρή οργάνωση δύο νουκλεοσωμάτων, το ένα μάλιστα πάνω στο στοιχείο TATA, προϋποθέτει την αναδιαμόρφωση αυτών για την εύκολη πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων. Η αναδιαμόρφωση αυτή επιτυγχάνεται από τη συνδυασμένη δράση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF που στρατολογούνται στον υποκινητή από τον ενεργοποιητή Gcn4. Ενεργό ρόλο στην δράση αυτή παίζουν οι λειτουργικές περιοχές bromodomains των καταλυτικών υπομονάδων των δύο συμπλόκων.

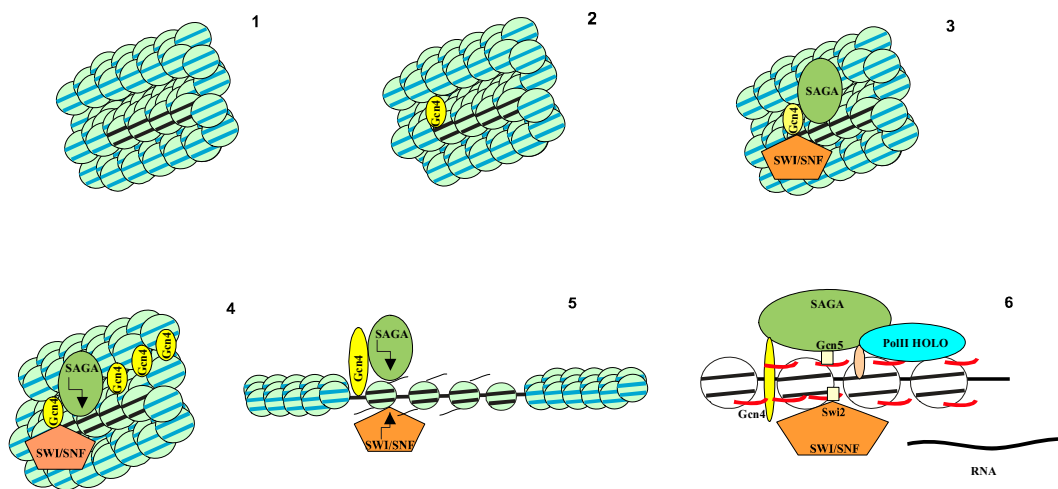
Στην Εικ.7 φαίνονται σχηματικά τα διάφορα στάδια της μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή *gPHO5* όπως αυτά προσδιορίστηκαν από τα στοιχεία που παρουσιάστηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια. Περιληπτικά, η πρόσδεση του ενεργοποιητή Gcn4 στη θέση-στόχο του, έστω και στις συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσής του στα κύτταρα, έχει την ικανότητα να στρατολογεί τα σύμπλοκα SAGA και SWI/SNF στην περιοχή. Στις συνθήκες επαγωγής του συστήματος, όπου αυξάνονται τα ποσά του Gcn4, ενισχύεται ή πιθανώς σταθεροποιείται και η παρουσία του SAGA οδηγώντας σε αύξηση της ακετυλίωσης των N-τελικών ουρών των ιστονών. Η ακετυλίωση των ιστονών επάγει στη συνέχεια τη δράση του SWI/SNF προκαλώντας αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων στον υποκινητή και διευκόλυνση της πρόσβασης των βασικών μεταγραφικών παραγόντων.

Στο στάδιο της επαγωγής της δράσης του SWI/SNF από την ακετυλίωση των ιστονών, βασικό ρόλο παίζουν και τα bromodomains των πρωτεϊνών Gcn5 και Swi2/Snf2. Στην Εικ.8 προτείνεται ένα μοντέλο συνδυασμένης δράσης των bromodomains που είναι απαραίτητος για την ολοκλήρωση του καταλυτικού κύκλου της αναδιαμόρφωσης των νουκλεοσωμάτων. Η ύπαρξη του καταλυτικού αυτού κύκλου υποστηρίζεται από τις *in vivo* παρατηρήσεις για τη συνεχή απαίτηση της δράσης του SWI/SNF στη διαδικασία αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Στο πρώτο στάδιο του κύκλου γίνεται η στρατολόγηση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF από το Gcn4. Ακολουθεί ακετυλίωση της χρωματίνης από το SAGA και αυτορύθμισή της από τη δράση του bromodomain

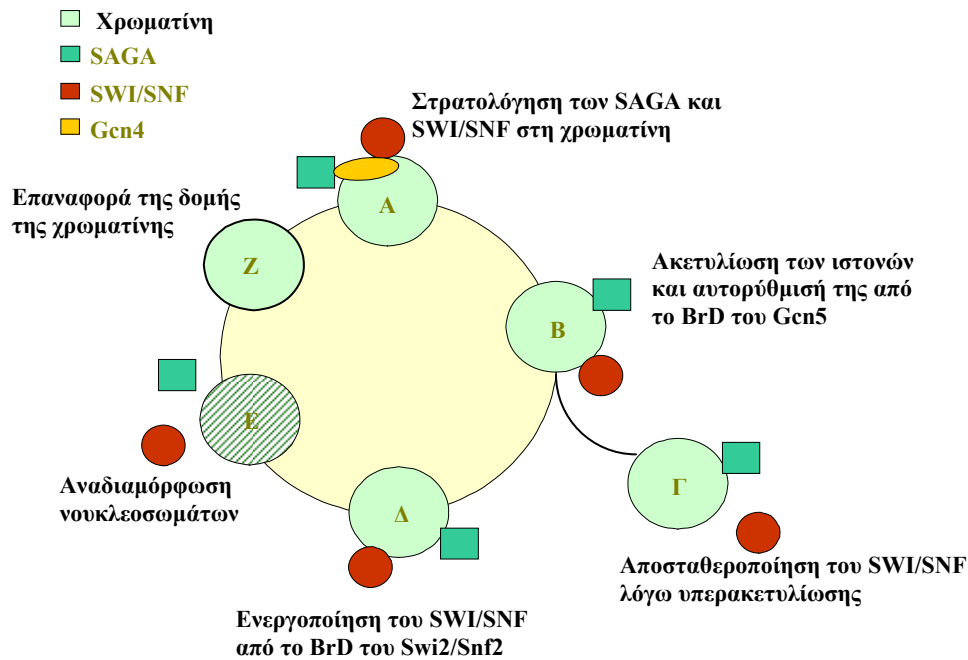


του Gcn5 μέσω των επαφών του με τις ακετυλιωμένες ιστόνες. Η υπερακετυλίωση της χρωματίνης λόγω έλλειψης της δράσης του bromodomain του Gcn5 οδηγεί σε αποσταθεροποίηση του SWI/SNF από αυτήν. Για την συνέχιση του κύκλου απαιτείται όμως και το bromodomain του Swi2/Snf2, το οποίο ενεργοποιεί τη δράση του SWI/SNF πιθανώς μέσω της αλληλεπίδρασής του με το ακετυλιωμένο υπόστρωμα. Η αναδιαμόρφωση που ακολουθεί απομακρύνει τα σύμπλοκα από τα νουκλεοσώματα και ο κύκλος κλείνει με τη δράση απακετυλασών ή άλλων παραγόντων που επαναφέρουν τη δομή της χρωματίνης στην αρχική της μορφή.

Ο προτεινόμενος *in vivo* ρόλος των bromodomains ως “αισθητήρων” του κώδικα ακετυλίωσης των ιστονών στην περιοχή του υποκινητή, ρυθμίζει την αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων και οδηγεί τελικά στην ενεργοποίηση της μεταγραφής.



**Εικόνα 7. Στάδια της μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή *gPHO5*.** (1) Η περιοχή του υποκινητή βρίσκεται “πακεταρισμένη” στην υψηλής-τάξης δομή της χρωματίνης. (2) Πρόσδεση του ενεργοποιητή Gcn4 στη θέση-στόχο του στον υποκινητή. (3) Στρατολόγηση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF από το Gcn4 σε συνθήκες μη-επαγωγής του συστήματος. (4) Αύξηση του ποσού του Gcn4 και του SAGA στην περιοχή οδηγεί σε αυξημένη ακετυλίωση των ουρών των ιστονών. (5) Η ακετυλίωση ενεργοποιεί τη δράση του SWI/SNF και προκαλεί αναδιαμόρφωση στα νουκλεοσώματα. (6) Ενεργοποίηση της μεταγραφής με τη στρατολόγηση και πρόσβαση των βασικών μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή.



**Εικόνα 8. Προτεινόμενο μοντέλο συνδυασμένης δράσης των bromodomains των Gcn5 και Swi2/Snf2.** (A) Στρατολόγηση των συμπλόκων SAGA και SWI/SNF στη χρωματίνη από τον ενεργοποιητή Gcn4. (B) Ακετυλίωση των ιστονών από το SAGA και αυτορύθμισή της από τη δράση του bromodomain του Gcn5. (Γ) Η έλλειψη της δράσης του bromodomain του Gcn5 οδηγεί σε υπερακετυλίωση της χρωματίνης και αποσταθεροποίηση του SWI/SNF από αυτήν. (Δ) Ενεργοποίηση της δράσης του SWI/SNF από το bromodomain του Swi2/Snf2. (E) Αναδιαμόρφωση των νουκλεοσωμάτων και απομάκρυνση των συμπλόκων από την περιοχή. (Z) Η δράση απακετυλασών ή άλλων παραγόντων επαναφέρουν τη δομή της χρωματίνης στην αρχική της μορφή.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

- Τα βακτηριακά στελέχη της *Escherichia coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: **XL1-Blue** (Stratagen), **DH5α** (GibcoBRL) και **JM109** (Stratagen), οι γονότυποι των οποίων αναφέρονται στο εγχειρίδιο Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, 1989).
- Τα στελέχη ζύμης (*Saccharomyces cerevisiae*) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: ο φυσικός τύπος (WT) **FYH** με γονότυπο (MATα *leu2-3 ura3-52 trp1-1*) και τα ισογενή του ***gcn4***, ***gcn5***, ***ada2***, ***gcn5ada2*** που προήλθαν με έλλειψη των αντίστοιχων γονιδίων από το γένωμα (Georgakopoulos and Thireos, 1992, Georgakopoulos *et al.*, 1995). Τα στελέχη ***sin1*** και ***gcn5sin1*** έγιναν με έλλειψη του γονιδίου *SIN1* από τα αντίστοιχα WT και *gcn5*. Τα στελέχη ***spt3***, ***spt7***, ***spt8***, ***spt20***, ***snf2***, ***gcn5snf2***, επίσης ισογενή του FYH, ήταν ευγενική προσφορά του F. Winston (Roberts and Winston, 1997). Το στέλεχος **UK403** με γονότυπο: MATα *ade2-101 lys-801 ura3-52 thr tyr arg4-1 h4-1 h4-2*/pUK421 (CEN, *TRP1*, GAL-H4-2), όπου η μόνη ιστόνη H4 που παράγεται βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του *GAL1* υποκινητή, αποκτήθηκε από τον M. Grunstein (Han *et al.*, 1988). Τα στελέχη που παρήγαγαν τις συντηγμένες πρωτεΐνες HA-TAF<sub>II</sub>17 και HA-TBP, προσφορά του K. Struhl, προέρχονταν από το στέλεχος **W303-1A** (Kuras and Struhl, 1999).
- Οι βακτηριακοί πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για κλωνοποιήσεις τμημάτων DNA ήταν οι **pBluescript** (Biolabs) και **pUC19** (Biolabs), ενώ για κατευθυνόμενη σημειακή μεταλλαξογένεση του DNA ο **pALTER-Ex1** (Promega). Για την παραγωγή πρωτεϊνών συντηγμένων στο N-τελικό τους άκρο με 6 κατάλοιπα ιστιδίνης (6xHIS-tagged) χρησιμοποιήθηκε ο φορέας έκφρασης **pQE-30** (Qiagen).
- Ο πλασμιδιακός φορέας ζύμης που αποτέλεσε τη βάση για τη κατασκευή όλων των τεχνητών γονιδίων αναφοράς, οδηγώντας την έκφραση της β-

γαλακτοσιδάσης από ετερόλογους υποκινητές, ήταν ο **YCp20** (CEN, Amp, *URA3*). Για την παραγωγή πρωτεϊνών στη ζύμη χρησιμοποιήθηκε ο **pYX142** (Novagen) όπου η έκφραση των γονιδίων οδηγείται από τον υποκινητή *TPI* (CEN, Amp, *LEU2*). Σε αυτόν τον φορέα εντέθηκε στις περιοριστικές θέσεις *EcoRI-BamHI* ο επίτοπος HA (**pYX142-HA**), για την παραγωγή πρωτεϊνών συντηγμένων με το HA στο N-τελικό τους άκρο. Παραγωγή υβριδικών πρωτεϊνών με το πεπτίδιο LexA στο N-τελικό άκρο τους γινόταν από ένα φορέα παράγωγο του **YCp91** (CEN, Amp, *TRP1*) κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή *ADHI* (Georgakopoulos *et al.*, 1995).

## ΥΛΙΚΑ

Όλα τα θρεπτικά μέσα, υγρά και στερεά, καθώς και τα ανάλογα διαλύματα αντιβιοτικών, που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των στελεχών βακτηρίων και ζύμης, κατασκευάστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των εργαστηριακών εγχειριδίων *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1999) και *Molecular Cloning* (Sambrook *et al.*, 1989). Οι συγκεντρώσεις των διαφόρων διαλυμάτων αμινοξέων αναφέρονταν στο εγχειρίδιο *Methods in Yeast Genetics* (Kaiser *et al.*, 1994).

Η παρασκευή ελάχιστου θρεπτικού μέσου (MIN) με χαμηλή συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων έγινε όπως περιγράφεται από τους Han *et al.* (1988). Συγκεκριμένα, για την παρασκευή 100 ml μέσου διαλύθηκαν 0.7 g yeast nitrogen base (χωρίς αμινοξέα) σε 30 ml νερό. Προστέθηκε 1 ml διαλύματος 1 M  $MgSO_4$  και 1 ml διαλύματος συγκεντρωμένου  $NH_4OH$  για την κατακρήμνιση των φωσφορικών ιόντων. Το υπερκείμενο διαχωρίστηκε από το ίζημα μέσω φίλτρου Whatman και αραιώθηκε με 30 ml νερό. Ακολούθησε ρύθμιση του pH στα 4.5-5 με μερικές σταγόνες πυκνού HCl και προσθήκη 2 g γλυκόζης. Αυτή η διαδικασία απομάκρυνε περίπου το 97-99% των φωσφορικών ιόντων. Για να έχουμε τελικά χαμηλή συγκέντρωση φωσφορικών ιόντων στο θρεπτικό μέσο (**LP**) προστέθηκε σε αυτό 0.2 mM διαλύματος  $K_2HPO_4$ .

Για τις κατευθυνόμενες σημειακές μεταλλαξογενέσεις χρησιμοποιήθηκε το σύστημα *Altered Sites II in vitro Mutagenesis System* (Promega) ενώ ο προσδιορισμός των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών έγινε με το *UBS Sequenase Kit* (DuPont Co).

Τα πολυκλωνικά αντισώματα His-probe (G-18), HA-probe (Y-11) και LexA-probe (N-19), καθώς επίσης και τα αντίστοιχα anti-rabbit ή anti-goat αντισώματα συζευγμένα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (AP-conjugated), προήλθαν από τη Santa Cruz Biotechnology. Τα πολυκλωνικά αντισώματα εναντίων ακετυλιωμένων πεπτιδίων των ιστονών H3 και H4 (Upstate Biotechnology) αφορούσαν τα αμινοξέα 1-21 για την H3 (όπου υπάρχουν οι ακετυλιωμένες λυσίνες K9, K14 και K22) και 2-19 για την H4 (ακετυλιωμένες λυσίνες K5, K8, K12, K16).

Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα προήλθαν από τις εταιρίες Minotech, New England Biolabs, Promega και Stratagene, η μικροκοκκική νουκλεάση από την Boehringer Mannheim και η ζυμολύση από την εταιρία Sigma. Τα σφαιρίδια Protein-A Sepharose προμηθεύτηκαν από την Pharmacia. Οι καθαρισμένες, μεμονωμένες ιστόνες H3, H4, H2A και H2B από την Boehringer Mannheim ενώ το μίγμα αυτών από τη Sigma.

Τα ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια  $\alpha[^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ ,  $\alpha[^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ ,  $\alpha[^{35}\text{S}]\text{-dATP}$  και  $[^3\text{H}]\text{-acetyl-coenzymeA}$  προμηθεύτηκαν από την Amersham. Όλα τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από το Εργαστήριο Μικροχημείας του ΙΤΕ.

Η μεταφορά νουκλεονικών οξέων έγινε σε νάυλον μεμβράνες Nytran SuPerCharge (Schleicher and Schuell) ενώ η μεταφορά πρωτεϊνών έγινε σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης Protran BA 85 (Schleicher and Schuell).

## **ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.**

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια σε μικρή κλίμακα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του βρασμού (boiling-prep) ενώ σε μεσαία κλίμακα η αλκαλική μέθοδος (alkaly-prep), όπως αυτές περιγράφονται από τους Sambrook *et al.* (1989). Όταν ήταν απαραίτητη η απόκτηση υπερελικωμένου DNA υψηλής ποιότητας

και καθαρότητας ακολουθούσε κατακρήμνιση με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG-8000), (Sambrook *et al.*, 1989).

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα ζύμης, για μετασχηματισμό επιδεκτικών βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε η μηχανική μέθοδος λύσης των κυττάρων με σφαιρίδια γυαλιού (glass-beads) παρουσία απορρυπαντικών, όπως αναφέρεται στο εγχειρίδιο CPMB (Ausubel *et al.*, 1999).

### **Μέθοδοι χειρισμού των μορίων DNA.**

Περιλάμβαναν αντιδράσεις πέψης του DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού, τροποποίησης των άκρων του με DNA πολυμεράση I (Klenow fragment), υδρόλυσης των 5' ελεύθερων φωσφορικών ομάδων με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (CIP) και συνένωση μορίων DNA με το ένζυμο T4 DNA λιγάση. Όλες αναφέρονται από τους Sambrook *et al.* (1989) και εκτελέστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των προμηθευτών των ενζύμων.

Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μορίων DNA σε πηκτώματα αγαρόζης έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTBE όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο CPMB. Η απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης με τη μέθοδο της ηλεκτροέκλουσης (electroelution) ή με τη χρήση πηκτώματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης (low-melting) έγιναν σύμφωνα με τους Sambrook *et al.* (1989).

Η ραδιοσήμανση μορίων DNA με  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-dATP και  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-dCTP για την απόκτηση ραδιενεργών ανιχνευτών, έγινε με την μέθοδο της “μετάφρασης εγκοπής” (Nick translation) όπως αναφέρεται στο CPMB (Ausubel *et al.*, 1999).

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA (DNA Sequencing) έγινε με τη μέθοδο των Sanger *et al.* (1977). Η μέθοδος αυτή αφορά τον τερματισμό της επιμήκυνσης της DNA αλυσίδας μέσω ενσωμάτωσης τριφωσφορικών δι-δεοξυνουκλεοτιδίων.

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) μορίων DNA χρησιμοποιήθηκαν οι DNA πολυμεράσες Taq (Minotech) και AmpliTaq, στα

διαλύματα και συνθήκες που ανέφεραν οι αντίστοιχες εταιρίες. Για τον προσδιορισμό του γονοτύπου ενός στελέχους ζύμης, έγινε PCR κατευθείαν στα κύτταρα με την προσθήκη του μίγματος της αντίδρασης σε αυτά, όπως περιγράφεται στο *Methods in Yeast Genetics* (Kaiser *et al.*, 1994).

### **Κατευθυνόμενες, σημειακές μεταλλαγές μορίων DNA.**

Χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας βακτηρίων pALTER-Ex1 και το σύστημα Altered Sites II *in vitro* Mutagenesis System (Promega). Η διαδικασία κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης, με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών που περιείχαν τις σημειακές μεταλλαγές, περιγράφεται στο εγχειρίδιο της προμηθεύτριας εταιρίας. Συνοπτικά:

Το υπόστρωμα-DNA κλωνοποιήθηκε στον παραπάνω φορέα και αποδιατάχθηκε σε αλκαλικό μέσο. Ακολούθησε επαναδιάταξη του DNA με τρεις εκκινητές: ο πρώτος περιελάμβανε την επιθυμητή μεταλλαγή στο τμήμα του κλωνοποιημένου DNA ενώ οι άλλοι δύο έφεραν από μία μεταλλαγή στα γονίδια του φορέα που κωδικοποιούσαν για ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αμικικιλίνη και τετρακυκλίνη. Συγκεκριμένα, η μία μεταλλαγή καθιστούσε ανενεργό το γονίδιο που ευθυνόταν για την αρχική ανθεκτικότητα των, μετασχηματισμένων με αυτό τον φορέα, βακτηρίων στην τετρακυκλίνη. Παράλληλα, η άλλη μεταλλαγή επιδιόρθωνε το γονίδιο της β-λακταμάσης προσδίνοντας στα βακτήρια ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη.

Μετά την επαναδιάταξη του DNA με τους τρεις εκκινητές έγινε σύνθεση της μεταλλαγμένης αλυσίδας με τη βοήθεια της T4 DNA πολυμεράσης και T4 DNA λιγάσης. Ακολούθησε μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων με το DNA της αντίδρασης σύνθεσης, με τη μέθοδο της παροχής ηλεκτρικού πεδίου. Ο μετασχηματισμός έγινε πρώτα σε κύτταρα του στελέχους ES1301 *mutS*, που δεν έχουν τη δυνατότητα επιδιόρθωσης των μεταλλαγών στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, και η επιλογή σε μέσο με αμικικιλίνη. Στη συνέχεια το DNA από τα βακτήρια αυτά απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό επιδεκτικών βακτηρίων



JM103, με την ίδια μέθοδο και την ίδια επιλογή. Ο δεύτερος αυτός κύκλος μετασχηματισμού ήταν απαραίτητος για την αποφυγή της ύπαρξης ενός μικτού πληθυσμού DNA, μεταλλαγμένου και μη, σε ένα κύτταρο, αλλά και για την μακροχρόνια διατήρηση των πλασμιδίων αφού τα κύτταρα ES1301 *mutS* δεν είναι σταθεροί ξενιστές αυτών.

### **Παρασκευή και μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων με τη μέθοδο της παροχής ηλεκτρικού πεδίου (electrocompetent cells).**

Για την παρασκευή των επιδεκτικών βακτηρίων, κύτταρα αναπτύχθηκαν σε μέσο LB στους 37°C και συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση σε εκθετική φάση ( $OD_{600}=0.4-0.6$ ). Επαναιωρήθηκαν με ήπιο τρόπο σε παγωμένο διάλυμα 10% γλυκερόλης (glycerol), ίσου όγκου με την αρχική καλλιέργεια. Συλλέχθηκαν και ξεπλύθηκαν ακόμα μια φορά με το ίδιο διάλυμα, στο 1/2 του αρχικού τους όγκου. Τελικά τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 1/100 του αρχικού τους όγκου στο διάλυμα γλυκερόλης, μοιράστηκαν σε κλάσματα των 100 μl και διατηρήθηκαν στους -80°C. Όλα τα υλικά και μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα και όλοι οι χειρισμοί έγιναν στον πάγο.

Για τον μετασχηματισμό των επιδεκτικών βακτηρίων, ένα κλάσμα αυτών (100 μl) αναμείχθηκε με πλασμιδιακό DNA (<50 ng) και επωάστηκε στον πάγο για 1 λεπτό. Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε ειδική κυψελίδα (0.1 cm) και υποβλήθηκαν σε ηλεκτρικό πεδίο παρεχόμενο από ειδικό μηχάνημα (electroporator) στις κατάλληλες συνθήκες (1.65V, 25μF, 200ohms). Επαναιωρήθηκαν σε 1 ml θρεπτικού μέσου SOC και επωάστηκαν για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση. Τέλος απλώθηκαν σε πιάτο LB που περιέχει κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων.

Παρασκευή και μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων ζύμης.

Για την παρασκευή επιδεκτικών κυττάρων ζύμης και μετασχηματισμό αυτών με πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χλωριούχου λιθίου όπως

περιγράφεται από τους Ito *et al.*(1983). Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής φτάνει τα  $10^5$  μετασχηματισμένα κύτταρα / $\mu\text{g}$  DNA.

Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας  $\beta$ -γαλακτοσιδάσης.

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διαπερατών κυττάρων (permeabilized cell assay) σε καλλιέργειες ζύμης 1.5 ml, όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο *Methods in yeast genetics* (Kaiser *et al.*, 1994).

### **Απομόνωση και ανάλυση γενωμικού DNA ή ολικού RNA από κύτταρα ζύμης.**

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα ζύμης σε μικρή κλίμακα (από 10 ml καλλιέργεια) εφαρμόστηκε η μέθοδος της επεξεργασίας των κυττάρων με ζυμολύση (Guthrie and Fink, 1991). Αυτό χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ή αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης και μεταφέρθηκε σε νάυλον μεμβράνη (Southern analysis). Για τη μεταφορά του DNA στη μεμβράνη έγινε προετοιμασία του πήκτωματος με τη διαδοχική χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων υψηλής συγκέντρωσης αλάτων. Συγκεκριμένα το πήκτωμα επώαστηκε 2x15 λεπτά σε διάλυμα αποδιάταξης (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) και 2x30 λεπτά σε διάλυμα εξουδετέρωσης (1 M Tris-HCl pH=8, 1.5 M NaCl). Η μεταφορά έγινε σε διάλυμα 20xSSC και η υβριδοποίηση της μεμβράνης με ραδιενεργούς ανιχνευτές έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο κατά Church (Sambrook *et al.*, 1989).

Η απομόνωση ολικού RNA (από 10 ml καλλιέργεια ζύμης) έγινε με τη μέθοδο της όξινης φαινόλης και αναλύθηκε σε πήκτωμα 1.5% αγαρόζης που περιείχε 5% φορμαλδεΐδη. Μετά τη μεταφορά του σε νάυλον μεμβράνη σταθεροποιήθηκε σε αυτήν με την έκθεση της μεμβράνης στο UV για 5 λεπτά (Northern analysis). Όλα τα στάδια αυτά περιγράφονται στο εγχειρίδιο CPMB (Ausubel *et al.*, 1999). Η υβριδοποίηση της μεμβράνης με ραδιενεργούς ανιχνευτές έγινε όπως παραπάνω.

Ετερόλογη έκφραση και εκχύλιση πρωτεϊνών από βακτήρια.

Χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια που παρήγαγαν τις πρωτεΐνες συντηγμένες στο N-τελικό τους άκρο με 6 ιστιδίνες (6xHis). Καλλιέργειες αυτών (50 ml) αναπτύχθηκαν στους 37°C μέχρι  $\text{OD}_{600}=0.6-0.8$  και ακολούθησε επαγωγή της έκφρασης των

πρωτεϊνών με την προσθήκη 0.5 mM IPTG. Μετά την επώαση στους 37°C για άλλες 3-4 ώρες, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και επαναδιαλύθηκαν ανάλογα με την περίπτωση λύσης:

A) Σε 1 ml αποδιατακτικού διαλύματος (2% SDS, 10% glycerol, 62.5 mM Tris-HCl pH=6.8 και 5% β-ME). Ακολούθησε βράσιμο στους 100°C για 5 λεπτά και ηλεκτροφορητική ανάλυση του συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε αποδιατακτικό πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης.

B) Σε 0.5 ml μη-αποδιατακτικού διαλύματος που περιείχε 10% glycerol, 50 mM Tris-HCl pH=7.5, 1 mM EDTA, 0.05% Triton X-100 και 10 mM β-ME. Τα βακτήρια λύθηκαν με ηχοβόληση (sonication) στα 45 Hertz για 4x15 δευτερόλεπτα, στον πάγο. Το υπερκείμενο των πρωτεϊνών συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση (στις 12000 rpm, για 15 λεπτά, στους 4°C) και χρησιμοποιήθηκε για αντίδραση ακετυλίωσης.

Γ) Για τον **καθαρισμό των ετερόλογων πρωτεϊνών**, τα βακτήρια λύθηκαν σε 0.5 ml Ni-NTA διαλύματος (50 mM Na-phosphate pH=8, 800 mM NaCl) με ηχοβόληση στα 45 Hertz για 4x15 δευτερόλεπτα, στον πάγο. Το υπερκείμενο αραιώθηκε με άλλα 5 ml Ni-NTA διαλύματος και μεταφέρθηκε σε 200 μl 50% γαλάκτωμα Ni-NTA ρητίνης (nickel nitrilotriacetic acid agarose). Η ρητίνη προηγουμένως είχε εξισορροπηθεί σε νερό και μετά σε Ni-NTA διάλυμα. Το δείγμα αναδεύτηκε για 1 ώρα στους 4°C. Με αυτόν τον τρόπο, πρωτεΐνες του συνολικού βακτηριακού εκχυλίσματος που ήταν συντηγμένες με 6 ιστιδίνες μπορούσαν να δεσμευτούν στα σφαιρίδια αγαρόζης καλυμμένα με ιόντα νικελίου της παραπάνω ρητίνης, λόγω χρωματογραφίας συγγένειας. Οι μη-ειδικά δεσμευμένες πρωτεΐνες απομακρύνθηκαν με πλύσιμο των σφαιριδίων αρχικά με 3x1 ml Ni-NTA διαλύματος και μετά με 3x1 ml διαλύματος πλυσίματος (50 mM Na-phosphate pH=6, 800 mM NaCl, 10% glycerol). Η έκλυση των πρωτεϊνών έγινε με 100 mM EDTA στο διάλυμα πλυσίματος.

Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα ζύμης.

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μετασχηματισμένα με πλασμίδια-φορείς έκφρασης που οδηγούσαν στην παραγωγή πρωτεϊνών συντηγμένων με τον επίτοπο HA ή το πεπτίδιο LexA στο N-τελικό τους άκρο.

Καλλιέργειες των 10 ml αναπτύχθηκαν μέχρι  $OD_{550}=0.5-1$  και συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (στις 3000 rpm, για 5 λεπτά, στους 4°C). Πλύθηκαν 2 φορές με 0.5 ml διαλύματος εκχύλισης (0.2 M Tris-HCl pH=8, 0.4 M  $(NH_4)_2SO_4$ , 10 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA 10% glycerol, 7 mM  $\beta$ -ME, 1mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml leupeptin και pepstatin). Επαναδιαλύθηκαν σε 50  $\mu$ l διαλύματος εκχύλισης και προστέθηκε ίσος όγκος σφαιριδίων γυαλιού (glass-beads). Η λύση των κυττάρων έγινε με ισχυρή ανάδευση (vortex) για 1 λεπτό, που επαναλήφθηκε για 5 φορές με ενδιάμεσες επώσεις στον πάγο. Μετά από φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, για 20 λεπτά, στους 4°C, το υπερκείμενο πρωτεϊνικό εκχύλισμα αναλύθηκε ηλεκτροφορητικά σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

**Ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ανοσοεντοπισμός ακινητοποιημένων πρωτεϊνών σε μεμβράνη (SDS-PAGE και Western Blot analysis).**

Για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους χρησιμοποιήθηκαν επίπεδα πηκτώματα 1.5 mm πάχους, η παρασκευή των οποίων όμως έγινε χωρίς την προσθήκη SDS (Sambrook *et al.*, 1989).

Για την παρατήρηση των αναλυθέντων πρωτεϊνών τα πηκτώματα χρωματίστηκαν με 0.025% Coomassie Brilliant Blue R-250, σε διάλυμα 40% μεθανόλης και 7% οξικού οξέος. Στη συνέχεια αποχρωματίστηκαν σε διάλυμα 20% μεθανόλης και 7% οξικού οξέος.

Για τον ανοσοεντοπισμό των αναλυθέντων πρωτεϊνών, έγινε ηλεκτροφορητική μεταφορά αυτών από τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνες νιτροκυταρίνης. Η μεταφορά και η διαδικασία εφαρμογής των κατάλληλων πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων, έγιναν όπως περιγράφονται στο CPMB.

Ο ανοσοεντοπισμός έγινε ενζυματικά με τη δράση της αλκαλικής φωσφατάσης, η οποία ήταν συζευγμένη με το δευτερογενές αντίσωμα, στα υποστρώματά της BCIP και NBT (Promega).

### **Ανοσοκατακρήμνηση πρωτεϊνών από συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων ζύμης.**

Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μετασχηματισμένα με πλασμίδια-φορείς έκφρασης που οδηγούσαν στην παραγωγή πρωτεϊνών συντηγμένων με τον επίτοπο HA ή το πεπτιδίο LexA στο N-τελικό τους άκρο.

Καλλιέργειες των 100 ml αναπτύχθηκαν μέχρι  $OD_{550}=0.5-1$  και συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (στις 3000 rpm, για 5 λεπτά, στους 4°C). Πλύθηκαν με ίσο όγκο νερού και επαναδιαλύθηκαν σε 250 μl διαλύματος εκχύλισης (10 mM Tris-HCl pH=8, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml pepstatin). Προστέθηκε ίσος όγκος σφαιριδίων γυαλιού (glass-beads) και η λύση των κυττάρων έγινε με ισχυρή ανάδευση (vortex) για 30 δευτερόλεπτα. Αυτό επαναλήφθηκε για 8 φορές με ενδιάμεσες επώσεις στον πάγο. Μετά από φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, για 20 λεπτά, στους 4°C, συλλέχθηκε το υπερκείμενο συνολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα.

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε σφαιρίδια Protein-A Sepharose, τα οποία προηγουμένως είχαν επωαστεί με το κατάλληλο αντίσωμα εναντίον του συγκεκριμένου επιτόπου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 100 μl εναιωρήματος (50% σε νερό) σφαιριδίων τα οποία πλύθηκαν 3 φορές με 1 ml TNTB διαλύματος (10 mM Tris-HCl pH=8, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% BSA). Σε αυτά προστέθηκε 5 μl (μ) από το αντίσωμα. Επώαστηκαν για 12 ώρες στους 4°C και ξεπλύθηκαν 3 φορές πάλι με 1 ml TNTB διαλύματος. Σε αυτά μεταφέρθηκε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα και το δείγμα αναδεύτηκε για 1-3 ώρες στους 4°C.

Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και τα σφαιρίδια πλύθηκαν 2 φορές με 1 ml TNTB διαλύματος για την απομάκρυνση των μη-ειδικά προσδεμένων

πρωτεϊνών. Τέλος, τα σφαιρίδια με τις προσδεμένες πρωτεΐνες πλύθηκαν 2 φορές με 1 ml διαλύματος ακετυλίωσης και χρησιμοποιήθηκαν για αντιδράσεις ακετυλίωσης.

#### **Αντιδράσεις ακετυλίωσης των ιστονών.**

Το υπόστρωμα των αντιδράσεων ήταν είτε ελεύθερες ιστόνες (η καθεμιά χωριστά ή μίγμα αυτών) ή ιστόνες σε *in vitro* ανασυγκροτημένα μονο- ή ολιγονουκλεοσώματα. Ως ένζυμο χρησιμοποιήθηκε είτε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Gcn5 (περίπου 50 ng ανά αντίδραση) είτε ανοσοκατακρημνισμένα σύμπλοκα του Gcn5, από διάφορα στελέχη ζύμης. Η σήμανση των ακετυλιωμένων ιστονών έγινε με [<sup>3</sup>H]-ακετυλο-συνένζυμο (Brownell and Allis, 1995).

Μια τυπική αντίδραση (20 μl) περιλάμβανε 1-10 μg ιστόνες, 0.25 μCi του [<sup>3</sup>H]-ακετυλο-συνενζύμου (5 Ci/mmol) και το διάλυμα ακετυλίωσης (50 mM Tris-HCl pH=8, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 1 mM PMSF). Οι αντιδράσεις έγιναν στους 30°C για 10 λεπτά και τερματίστηκαν με την προσθήκη SDS-διαλύματος-φόρτωσης (σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης). Κάτω από αυτές τις συνθήκες η ενσωμάτωση της ραδιενέργειας ήταν γραμμική για τα πρώτα 10 λεπτά και οι συγκεντρώσεις τόσο των ιστονών όσο και του [<sup>3</sup>H]-ακετυλο-συνενζύμου ήταν κορεσμένες.

Η ανάλυση των ακετυλιωμένων ιστονών έγινε σε 12% αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, το οποίο μετά την ηλεκτροφόρηση χωρίστηκε στη μέση. Στο κάτω μέρος του έγινε χρώση με Coomassie Blue και εντοπισμός του [<sup>3</sup>H]-ακετυλιωμένου προτύπου των ιστονών με σπινθηρογραφία (fluorography). Στο πάνω μέρος του έγινε ανοσοεντοπισμός του ενζύμου, με μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, για ποσοτικοποίηση του ενζύμου ανά αντίδραση.

Τα κινητικά πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την H3. Οι αντιδράσεις ξεκίνησαν με την προσθήκη του [<sup>3</sup>H]-ακετυλο-συνενζύμου και τερματίστηκαν με προσρόφησή τους σε κυτταρικές μεμβράνες Whatman P81. Οι μεμβράνες στη συνέχεια πλύθηκαν πρώτα με 50 mM ανθρακικό διάλυμα pH=9.2 και

μετά με ακετόνη. Αφού στέγνωσαν, μετρήθηκε η ραδιενέργεια σε διάλυμα σπινθηριστή.

**Δοκιμασία ακετυλίωσης ιστονών μέσα σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης** (In-gel HAT activity assays, Brownell and Allis, 1995). Χρησιμοποιήθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα βακτηρίων που παρήγαγαν τις διάφορες ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες Gen5. Αυτά αναλύθηκαν σε 10% αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) που παρασκευάστηκε κανονικά εκτός από το γεγονός ότι στο πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel) πριν τον πολυμερισμό προστέθηκε 1 mg/ml μίγματος ιστονών. Μετά την ηλεκτροφόρηση των βακτηριακών πρωτεϊνών, το πήκτωμα πλύθηκε, σε θερμοκρασία δωματίου, για 1 ώρα με το διάλυμα B (50 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA) που περιείχε 20% ισοπροπανόλη, και στη συνέχεια για 30 λεπτά με το διάλυμα B. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα σε διάλυμα B που περιείχε 8 M ουρία και μετά επώαση για 12 ώρες, στους 4°C, σε διάλυμα B που περιείχε 0.04% Tween-20. Το πήκτωμα πλύθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, για 1 ώρα με το διάλυμα A (50 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM PMSF) και επώαστηκε με [<sup>3</sup>H]-ακετυλο-συνένζυμο (10 μCi) για 30 λεπτά στους 30°C. Τελικά το σημασμένο πήκτωμα πλύθηκε 2 φορές, για 15 λεπτά, με 5% TCA για την απομάκρυνση της μη-προσδεμένης ραδιενέργειας και υποβλήθηκε σε σπινθηρογραφία.

#### **Ανασυγκρότηση νουκλεοσωμάτων.**

Έγινε *in vitro* ανασυγκρότηση νουκλεοσωμάτων με τη μέθοδο της διαπίδυσης σε κλίση αλατιού (gradient salt dialysis), όπως περιγράφεται από τους Workman and Kingston (1992). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε, για μονο-νουκλεοσώματα ένα κομμάτι DNA μήκους 200-bp (προϊόν αντίδρασης PCR) ενώ για ολιγονουκλεοσώματα ένα κομμάτι DNA μήκους 1100-bp (προϊόν πέψης του πλασμιδίου pUC19 με την ενδονουκλεάση *Bgl*I). Το υπόστρωμα αναμείχθηκε με καθαρισμένες ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4, σε ένα ισομοριακό κλάσμα ιστονών/DNA, σε

διάλυμα υψηλής αλατότητας (2 M NaCl) με 10 mM HEPES pH=8, 1 mM EDTA, 2 mM β-ME και 10 μg BSA. Ακολούθησε διαπίδυση (dialysis) του μίγματος (τελικού όγκου 200 μl) για 2 ώρες, σε 200 ml διαλύματος διαπίδυσης Α (2 M NaCl, 10 mM HEPES pH=8, 1 mM EDTA και 2 mM β-ME). Η διαπίδυση του μίγματος συνεχίστηκε σε κλίση αλατιού (2 ως 0.5 M NaCl) αραιώνοντας το αρχικό διάλυμα Α με τη σταδιακή προσθήκη 600 ml διαλύματος Β (10 mM HEPES pH=8, 1 mM EDTA και 2 mM β-ME) μέσω περισταλτικής αντλίας (35-40 ml/ώρα), στους 4°C. Η διαπίδυση του μίγματος ανασυγκρότησης ολοκληρώθηκε σε 200 ml διαλύματος Γ (250 mM NaCl, 10 mM HEPES pH=8, 1 mM EDTA και 2 mM β-ME), για άλλες 2 ώρες.

Τα ανασυγκροτημένα με αυτόν τον τρόπο νουκλεοσώματα κλασματώθηκαν με υπερφυγοκέντρωση (στις 35000 rpm σε κεφαλή Beckman SW41, για 19 ώρες, στους 4°C) μέσω μιας γραμμικής κλίσης συγκέντρωσης σακχαρόζης 5-30%. Τα διαλύματα 5% και 30% σακχαρόζης έγιναν σε 10 mM HEPES pH=8, 1 mM EDTA και 0.1% Nonidet P-40. Συλλέχτηκαν κλάσματα του 1-ml, αναλύθηκε μια ποσότητά τους σε πήκτωμα αραρόζης και επιλέχτηκαν τα κλάσματα που περιείχαν μόνο νουκλεοσωμικό DNA. Αυτά υπέστησαν διαπίδυση σε 10 mM Tris-HCl pH=8, 0.5 mM EDTA και συμπυκνώθηκαν με φυγοκεντρικά φίλτρα (NanaSpin-Plus, Gelman Sciences).

Η παρουσία oligo-νουκλεοσωμάτων επιβεβαιώθηκε μετά από μερική πέψη με μικροκοκκική νουκλεάση (0.015-0.03 units/μl), για 1 λεπτό, στους 25°C. Η πέψη έγινε στο διάλυμα (15 mM Tris-HCl pH=8, 50 mM NaCl, 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EGTA, 0.2 mM EDTA και 5 mM β-ME) και τερματίστηκε με την προσθήκη 2 mM EDTA και 0.5% SDS. Μετά από εκχύλιση του DNA με διάλυμα φαινόλης/χλωροφορμίου και κατακρήμνισή του με αιθανόλη, αυτό αναλύθηκε σε 1.5% πήκτωμα αραρόζης. Ακολούθησε μεταφορά του DNA σε νάυλον μεμβράνη και ανίχνευση του προτύπου της πέψης με υβριδοποίηση. Ως ραδιενεργός ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε το 1.1-kb κομμάτι DNA που αποτελούσε το υπόστρωμα ανασυγκρότησης των oligo-νουκλεοσωμάτων.



Απομόνωση πυρήνων από κύτταρα ζύμης.

Εφαρμόστηκε η διαδικασία που περιγράφεται από τους Almer and Horz (1986) με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, κύτταρα ζύμης από καλλιέργειες 100 ml ( $OD_{550}=0.7-1$ ) συλλέχτηκαν με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm, για 5 λεπτά και πλύθηκαν δύο φορές με νερό. Επαναιωρήθηκαν σε 0.5 ml διαλύματος (10 mM Tris HCl pH=7.4, 20 mM EDTA, 0.7 M β-ME) και επώαστηκαν στους 30°C για 15 λεπτά. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν και πλύθηκαν σε διάλυμα 1 M σορβιτόλης. Επαναιωρήθηκαν σε 250 μl διαλύματος ζυμολύσεως (1 M Sorbitol, 10 mM Tris HCl pH=7.4, 5 mM β-ME και 20 μg/ml Zymolyase) και επώαστηκαν στους 30°C για 15-30 λεπτά, με σκοπό την δημιουργία σφαιροπλαστών.

Οι σφαιροπλάστες που προέκυψαν συλλέχτηκαν με φυγοκέντρηση στις 2000 rpm, για 5 λεπτά και πλύθηκαν με 1 M σορβιτόλη. Επαναδιαλύθηκαν σε 2.5 ml διαλύματος φικόλης (18% Ficoll, 20 mM potassium phosphate pH=6.8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM EDTA, 0.25 mM EGTA, 1 mM PMSF) και λύθηκαν σε ομογενοποιητή Dounce (8 χτυπήματα). Με φυγοκέντρηση στις 6000 rpm, για 5 λεπτά, στους 4°C, απομακρύνθηκαν τα κυτταρικά υπολείμματα και το υπερκείμενο επώαστηκε για 10 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε καθίζηση των πυρήνων με υπερφυγοκέντρηση στις 23000 rpm (περίπου 50000 g σε κεφαλή SW40) για 40 λεπτά.

Οι απομονωμένοι πυρήνες επαναδιαλύθηκαν και πλύθηκαν σε 0.5 ml διαλύματος πένης (10 mM Tris HCl pH=7.4, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM EGTA 1 mM β-ME). Έγινε καθίζηση πάλι των πυρήνων με φυγοκέντρηση στις 14000 rpm, για 1 λεπτό, και επαναδιαλύθηκαν σε 100 μl του διαλύματος πένης με 50-100 units περιοριστικού ενζύμου. Η επώαση των πυρήνων με το ένζυμο έγινε για 1 ώρα στην κατάλληλη θερμοκρασία για το συγκεκριμένο ένζυμο και τερματίστηκε με την προσθήκη (12 mM EDTA, 0.5% SDS, 50 mM Tris HCl pH=9). Ακολούθησε επώαση με 0.5 mg/ml Πρωτεϊνάσης K στους 37°C για 30

λεπτά και εκχύλιση του DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο. Το DNA τελικά κατακρημνίστηκε με αιθανόλη και επαναδιαλύθηκε σε νερό. Τότε επώαστηκε για δεύτερη φορά με άλλα περιοριστικά ένζυμα και αναλύθηκε σε πήκτωμα 1.5% αγαρόζης. Τέλος μεταφέρθηκε σε νάυλον μεμβράνη και υβριδοποιήθηκε με τον κατάλληλο ραδιενεργό ανιχνευτή.

Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης.

Η μέθοδος περιγράφεται στο εγχειρίδιο *Methods in enzymology* (Wassarman and Wolffe, 1999). Η διαδικασία περιληπτικά είναι η εξής:

Αναπτύχθηκαν καλλιέργειες ζύμης (50 ml) μέχρι πυκνότητας  $2 \times 10^7$  κύτταρα/ml. Έγινε στερέωση (fixing) των κυττάρων με την προσθήκη 1% φορμαλδεΐδης (formaldehyde) και επώαση για 10-30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη 125 mM γλυκίνης (glycine) και επώαση για άλλα 5 λεπτά στην ίδια θερμοκρασία. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm, για 5 λεπτά και πλύθηκαν δύο φορές με 10 ml διαλύματος TBS (20 mM Tris-HCl pH=7.6, 200 mM NaCl). Στη συνέχεια λύθηκαν σε 400  $\mu$ l διαλύματος λύσης (50 mM HEPES-KOH pH=7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 0.1% sodium deoxycholate, 1mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin). Η λύση έγινε με την προσθήκη ίσου όγκου (400  $\mu$ l) σφαιριδίων γυαλιού και ισχυρή ανάδευση (vortex) του μίγματος για 40 λεπτά στους 4°C. Το εναιώρημα ηχοβολήθηκε στο 20% περίπου της ισχύς του ηχοβολητή (Soniprep 150, MSE), για 5 φορές επί 10 δευτερόλεπτα, ώστε να αποκτηθούν κομμάτια DNA μέσου μεγέθους 0.3-0.8 Kb. Με φυγοκέντρηση 60 λεπτών στις 14000 rpm (4°C) καθарίστηκε το υπερκείμενο διάλυμα ολικής χρωματίνης.

Μια ποσότητα (περίπου το 1/3) από το διάλυμα ολικής χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα-μάρτυρας, αφού έγινε αναστροφή της στερέωσης με φορμαλδεΐδη με επώασή του στους 65°C για 4-5 ώρες. Το DNA εκχυλίστηκε με φαινόλη/χλωροφόρμιο, κατακρημνίστηκε με αιθανόλη και επαναδιαλύθηκε σε 30  $\mu$ l διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA).

Η υπόλοιπη ποσότητα του αρχικού διαλύματος ολικής χρωματίνης ανοσοκατακρημνίστηκε με αντισώματα εναντίον είτε ακετυλιωμένων πεπτιδίων των ιστονών H3 και H4 ή άλλων πρωτεϊνών. Ειδικότερα χρησιμοποιήθηκε

πολυκλωνικό αντίσωμα εναντίον του επιτόπου HA (Santa Cruz Biotechnology) για τις συντηγμένες με αυτό πρωτεΐνες, ή εναντίον της πρωτεΐνης Snf5 (προσφορά του B. Laurent). Το διάλυμα επώαστηκε με 2.5 μg από το κάθε αντίσωμα, με περιστροφική ανάδευση, για 12 ώρες στους 4°C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 60 μl σφαιριδίων Protein-A Sepharose (από ένα 50% εναιώρημα των σφαιριδίων στο παραπάνω διάλυμα λύσης των κυττάρων) και 1-2 μg από ηχοβολημένο DNA του φάγου λ. Η επώαση συνεχίστηκε όπως παραπάνω για άλλες 1-2 ώρες, στους 4°C. Τα σφαιρίδια συλλέχθηκαν και πλύθηκαν διαδοχικά, για 5 λεπτά κάθε φορά, σε 1 ml από τα παρακάτω διαλύματα: TBS (20 mM Tris-HCl pH=8, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) με 150 mM NaCl, TBS με 500 mM NaCl, διάλυμα III (10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate) και τελικά TE. Τα πλυσίματα έγιναν με περιστροφική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο απομακρυνόταν μετά από φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Η έκλουση των ανοσοκατακρημνισμένων συμπλόκων έγινε σε 200 μl διαλύματος έκλουσης (50 mM Tris-HCl pH=7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS) με επώαση στους 65°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλα 200 μl TE και υπέστη αναστροφή της στερέωσης λόγω φορμαλδεύδης, όπως περιγράφηκε παραπάνω για τα δείγματα-μάρτυρες. Ακολούθησε εκχύλιση και κατακρήμνιση του DNA και επαναδιάλυσή του σε 20 μl TE.

Το DNA από τα διαλύματα ολικής και ανοσοκατακρημνισμένης χρωματίνης χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα σε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού (quantitative PCR). Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη χρήση ραδιενεργών νουκλεοτιδίων σε συνθήκες γραμμικότητας της αντίδρασης. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τρία ζεύγη εκκινητών που ο συνδυασμός τους έδινε δύο προϊόντα: ένα που αντιστοιχούσε στο πειραματικά ελεγχόμενο τμήμα του DNA και ένα που αντιστοιχούσε στο μάρτυρα. Σε κάθε περίπτωση συγκρινόταν ποσοτικά το κλάσμα των δύο αυτών προϊόντων (σε PhosphoImager) μετά από ανάλυσή τους σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agalioti T., Lomvardas S., Parekh B., Yie J., Maniatis T. and Thanos D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the *IFN- $\beta$*  promoter. *Cell* **103**, 667-678.
- Allard S., Utley R.T., Savard J., Clarke A., Grant P., Brandl C.J., Pillus L., Workman J.L. and Côté J. (1999). NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO J.* **18**, 5108-5119.
- Allfrey V., Faulkner R.M. and Mirsky A.E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 786-794.
- Almer A., Rudolph H., Hinnen A. and Hörz W. (1986). Removal of positioned nucleosomes from the yeast *PHO5* promoter upon *PHO5* induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J.* **5**, 2689-2696.
- Almer A. and Hörz W. (1986). Nuclease hypersensitive regions with adjacent positioned nucleosomes mark the gene boundaries of the *PHO5/PHO3* locus in yeast. *EMBO J.* **5**, 2681-2687.
- Apone L.M., Virbsius C.A., Holstege F.C., Wang J., Young R. and Green M.R. (1998). Broad, but not universal, transcriptional requirement for yTAF<sub>II</sub>17, a histone H3-like TAF<sub>II</sub> present in TFIID and SAGA. *Mol. Cell* **2**, 653-661.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. (1999). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Barlev N.A., Candau R., Wang L., Darpino P., Silverman N. and Berger S.L. (1995). Characterization of physical interactions of the putative transcriptional adaptor, ADA2, with acidic activation domains and TATA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 19337-19344.
- Bauer W.R., Hayes J.J., White J.H. and Wolffe A.P. (1994). Nucleosome structural changes due to acetylation. *J. Mol. Biol.* **236**, 685-690.
- Bazett-Jones D.P., Côté J., Landel C.C., Peterson C.L. and Workman J.L. (1999). The SWI/SNF complex creates loop domains in DNA-histone contacts within these domains. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1470-1478.
- Berk A.J. (1999). Activation of RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 330-335.
- Biggar S.R. and Crabtree G.R. (1999). Continuous and widespread roles for the Swi-Snf complex in transcription. *EMBO J.* **18**, 2254-2264.
- Birck C., Poch O., Romier C., Ruff M., Mengus G., Lavigne A.C., Davidson I. and Moras D. (1998). Human TAF<sub>II</sub>28 and TAF<sub>II</sub>18 interact through a histone fold encoded by atypical evolutionary conserved motifs also found in the SPT3 family. *Cell* **94**, 239-249.
- Boyer L.A., Shao X., Edright R.H. and Peterson C.L. (2000). Roles of the histone H2A-H2B dimers and the (H3-H4)<sub>2</sub> tetramer in nucleosome remodeling by the SWI/SNF complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 11545-11552.
- Brand M., Yamamoto K., Staub A. and Tora L. (1999). Identification of TATA-binding protein-free TAFII-containing complex subunits suggests a role in nucleosome acetylation and signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**, 18285-18289.
- Braunstein M., Sobel R.E., Allis C.D., Turner B.M. and Broach J.R. (1996). Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4349-4356.
- Brownell J.E. and Allis C.D. (1995). An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in *Tetrahymena* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6364-6368.
- Brownell J.E. and Allis C.D. (1996). Special HATs for special occasions: Linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 176-184.
- Brownell J.E., Zhou J., Ranalli T., Kobayashi R., Edmondson D.G., Roth S.Y. and Allis C.D. (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**, 843-851.
- Burley S.K. and Roeder R.G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 769-799.

- Cairns B.R., Lorch Y., Li Y., Zhang M., Lacomis L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Du J., Laurent B. and Kornberg R.D. (1996a). RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* **87**, 1249-1260.
- Cairns B.R., Levinson R.S., Yamamoto K.R. and Kornberg R.D. (1996b). Essential role of Swp73p in the function of yeast Swi/Snf complex. *Genes Dev.* **10**, 2131-2144.
- Cairns B.R., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Winston F. and Kornberg R.D. (1998a). Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF. *Mol. Cell* **2**, 639-651.
- Cairns B.R. (1998b). Chromatin remodeling machines: similar motors, ulterior motives. *TIBS* **23**, 20-25.
- Candau R., Moore P.A., Wang L., Barlev N., Ying C.Y., Rosen C. and Berger S.L. (1996). Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 593-602.
- Candau R., Zhou J.X., Allis C.D. and Berger S.L. (1997). Histone acetyltransferase activity and interaction with ADA2 are critical for GCN5 function *in vivo*. *EMBO J.* **16**, 555-565.
- Cao Y., Cairns B.R., Kornberg R.D. and Laurent B.L. (1997). Sfh1p, a component of a novel chromatin-remodeling complex, is required for cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3323-3334.
- Cheng G., Davies K., Yung E., Beltran R., Yu J. and Kalpana G. (1999). c-MYC interacts with INI/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nature Gen.* **22**, 102-105.
- Cheung P., Tanner K.G., Cheung W.L., Sassone-Corsi P., Denu J.M. and Allis D.C. (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol. Cell* **5**, 905-915.
- Chiang Y.C., Komarnitsky P., Chase D. and Denis C.L. (1996). ADR1 activation domains contact the histone acetyltransferase GCN5 and the core transcriptional factor TFIIB. *J. Biol. Chem.* **271**, 32359-32365.
- Clements A., Rojas J.R., Trievel R.C., Wang L., Berger S.L. and Marmorstein R. (1999). Crystal structure of the histone acetyltransferase domain of the human PCAF transcriptional regulator bound to coenzyme A. *EMBO J.* **18**, 3521-3532.
- Corona D.F.V., Langst G., Clapier C.R., Bonte E.J., Ferrari S., Tamkun J.W. and Becker P.B. (1999). ISWI is an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Mol. Cell* **3**, 239-245.
- Cosma M.P., Tanaka T. and Nasmyth K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* **97**, 299-311.
- Côté J., Peterson C.L. and Workman J.L. (1998). Perturbation of nucleosome core structure by the SWI/SNF complex persists after its detachment, enhancing subsequent transcription factor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4947-4952.
- Deuring R., Fanti L., Armstrong J.A., Sarte M., Papoulas O., Prestel M., Daubresse G., Verardo M., Moseley S.L., Berloco M., Tsukiyama T., Wu C., Pimpinelli S. and Tamkun J.W. (2000). The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and the maintenance of higher order chromatin structure *in vivo*. *Mol. Cell* **5**, 355-365.
- Dhalluin C., Carlson J.E., Zeng L., He C., Aggarwal A.K. and Zhou M.M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**, 491-496.
- Dilworth J.F., Fromental-Ramain C., Yamamoto K. and Chambon P. (2000). ATP-driven chromatin remodeling activity and histone acetyltransferases act sequentially during transactivation by RAR/RXR *in vitro*. *Mol. Cell* **6**, 1049-1058.
- Dimova D., Nackerdien Z., Furgeson S., Eguchi S. and Osley M.A. (1999). A role for transcriptional repressors in targeting the Swi/Snf complex. *Mol. Cell* **4**, 75-83.
- Drysdale C.M., Jackson B.M., McVeigh R., Klebanow E.R., Bai Y., Kokubo T., Swanson M., Nakatani Y., Weil P.A. and Hinnebusch A.G. (1993). The Gcn4p activation domain interacts specifically *in vitro* with RNA polymerase II holoenzyme, TFIID, and the ADAP-Gcn5p coactivator complex. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1711-1724.

- Eberharther A., Sterner D.E., Schieltz D., Hassan A., Yates III J.R., Berger S.L. and Workman J.L. (1999). The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6621-6631.
- Eisenmamm D.M., Chapon C., Roberts S.M., Dollard C. and Winston F. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* SPT8 gene encodes a very acidic protein that is functionally related to SPT3 and TATA-binding protein. *Genetics* **137**, 647-657.
- Elfring L.K., Deuring R., McCallum C.M., Peterson C.L. and Tamkun J.W. (1994). Identification and characterization of *Drosophila* relatives of the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2225-2234.
- Elfring L.K., Daniel C., Papoulas O., Deuring R., Sarte M., Moseley S., Beek S.J., Waldrip W.P., Daubresse G., DePace A., Kennison J.A. and Tamkun J.W. (1998). Genetic analysis of *brahma*: the *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* **148**, 251-265.
- Farrants A.O., Blomquist P., Kwon H. and Wrangle O. (1997). Glucocorticoid receptor-glucocorticoid response element binding stimulates nucleosome disruption by the SWI/SNF complex. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 895-905.
- Gangloff Y.G., Werten S., Romier C., Carré L., Poch O., Moras D. and Davidson I. (2000). The human TFIID components TAF<sub>II</sub>135 and TAF<sub>II</sub>20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAF<sub>II</sub>68 heterodimerize to form histone-like pairs. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 340-351.
- Garcia-Ramirez M., Rocchini C. and Ausio J. (1995). Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J. Biol. Chem.* **270**, 17923-17928.
- Gaudreau L., Schmid A., Blaschke D., Ptashne M. and Hörz W. (1997). RNA polymerase II holoenzyme recruitment is sufficient to remodel chromatin at the yeast *PHO5* promoter. *Cell* **89**, 55-62.
- Georgakopoulos T. and Thireos G. (1992). Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *EMBO J.* **11**, 4145-4152.
- Georgakopoulos T., Gounalaki N. and Thireos G. (1995). Genetic evidence for the interaction of the yeast transcriptional co-activator proteins GCN5 and ADA2. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 723-728.
- Georgel P.T., Tsukiyama T. and Wu C. (1997). Role of histone tails in nucleosome remodeling by *Drosophila* NURF. *EMBO J.* **16**, 4717-4726.
- Goldmark J.P., Fazzio T.G., Estep P.W., Church G.M. and Tsukiyama T. (2000). The ISW2 chromatin remodeling complex represses early meiotic genes upon recruitment by Ume6p. *Cell* **103**, 423-433.
- Grant P.A., Duggan L., Cote J., Roberts S.M., Brownell J.E., Candau R., Ohba R., Owen-Hughes T., Allis C.D., Winston F., Berger S.L. and Workman J.L. (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* **11**, 1640-1650.
- Grant P.A., Schieltz D., Pray-Grant M.G., Steger D.J., Reese J.C., Yates III J.R. and Workman J.L. (1998a). A subset of TAF<sub>II</sub>s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* **94**, 45-53.
- Grant P.A., Schieltz D., Pray-Grant M.G., Yates III J.R. and Workman J.L. (1998b). The ATM-related cofactor Tra1 is a component of the purified SAGA complex. *Mol. Cell* **2**, 863-867.
- Grant P.A., Eberharther A., John S., Cook R.G., Turner B.M. and Workman J.L. (1999). Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J. Biol. Chem.* **274**, 5895-5900.
- Green M.R. (2000). TBP-associated factors (TAF<sub>II</sub>s): multiple, selective transcriptional mediators in common complexes. *TIBS* **25**, 59-63.
- Gregory P.D., Schmid A., Zavari M., Münsterkötter M. and Hörz. (1999). Chromatin remodeling at the *PHO8* promoter requires SWI-SNF and SAGA at a step subsequent to activator binding. *EMBO J.* **18**, 6407-6414.
- Grunstein M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.



- Guthrie C. and Fink G.R. (1991). *Methods in enzymology-Guide to yeast genetics and molecular biology*. Academic press.
- Guyon J.R., Narlikar G.J., Sif S. and Kingston R.E. (1999). Stable remodeling of tailless nucleosomes by the human SWI-SNF complex. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2088-2097.
- Hamiche A., Sandaltzopoulos R., Gdula D.A. and Wu C. (1999). ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF. *Cell* **97**, 833-842.
- Hampsey M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **62**, 465-503.
- Han M., Kim U.J., Kayne P. and Grunstein M. (1988). Depletion of histone H4 and nucleosomes activates the *PHO5* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **7**, 2221-2228.
- Herrera J.E., Bergel M., Yang X.J., Nakatani Y. and Bustin M. (1997). The histone acetyltransferase activity of human GCN5 and PCAF is stabilized by coenzymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 27253-27258.
- Herrera J.E., Sakaguchi K., Bergel M., Trieschmann L., Nakatani Y. and Bustin M. (1999). Specific acetylation of chromosomal protein HMG-17 by PCAF alters its interaction with nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3466-3473.
- Holstege F.C., Jennings E.G., Wyrick J.J., Lee T.I., Hengartner C.J., Green M.R., Golub T.R., Lander E.S. and Young R.A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* **95**, 717-728.
- Hong L., Schroth G.P., Matthews H.R., Yau P. and Bradbury E.M. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J. Biol. Chem.* **268**, 305-314.
- Horiuchi J., Silverman N., Marcus G.A. and Guarente L. (1995). ADA3, a putative transcriptional adaptor, consists of two separable domains and interacts with ADA2 and GCN5 in a trimeric complex. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1203-1209.
- Horiuchi J., Silverman N., Pina B., Marcus G.A. and Guarente L. (1997). *ADA1*, a novel component of the ADA/GCN5 complex, has broader effects than *GCN5*, *ADA2*, or *ADA3*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3220-3228.
- Ikeda K., Sterner D.J., Eberharter A. and Workman J.L. (1999). Activation domain-specific and general transcription stimulation by native histone acetyltransferase complexes. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 855-863.
- Imbalzano A.N., Kwon H., Green M.R. and Kingston R.E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* **370**, 481-485.
- Imhof A., Yang X.J., Ogryzko V.V., Nakatani Y., Wolffe A.P. and Ge H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr. Biol.* **7**, 689-692.
- Ito H., Fucuda Y., Murata K. and Kimura A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
- Ito T., Bulger M., Pazin M.J., Kobayashi R. and Kadonaga J.T. (1997). ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* **90**, 145-155.
- Jacobson R.H., Ladurner A.G., King D.S. and Tjian R. (2000). Structure and function of a human TAF<sub>II</sub>250 double bromodomain module. *Science* **288**, 1422-1425.
- Jeanmougin F., Wurtz J.M., Douarin B.L., Chambon P. and Losson R. (1997). The bromodomain revisited. *TIBS* **22**, 151-153.
- Kadam S., McAlpine G.S., Phelan M.L., Kingston R.E., Jones K.A. and Emerson B.M. (2000). Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev.* **14**, 2441-2451.
- Kaiser C., Michaelis S. and Mitchell A. (1994). *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kal A.J., Mahmoudi T., Zak N.B. and Verrijzer P.C. (2000). The *Drosophila* Brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein Zeste. *Genes Dev.* **14**, 1058-1071.
- Kim U.J., Han M., Kayne P. and Grunstein M. (1988). Effects of histone H4 depletion on the cell cycle and transcription of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **7**, 2211-2219.

- Kingston R.E. and Narlikar G.J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* **13**, 2339-2352.
- Komeili A. and O'Shea E. (1999). Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* **284**, 977-980.
- Kornberg R. D. and Lorch Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285-294.
- Kouzarides T. (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* **19**, 1176-1179.
- Krebs J.E., Kuo M.H., Allis C.D. and Peterson C.L. (1999). Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast *HO* gene. *Genes Dev.* **13**, 1412-1421.
- Krebs J.E., Fry C.J., Samuels M.L. and Peterson C.L. (2000). Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell* **102**, 587-598.
- Kruger W. and Herskowitz I. (1991). A negative regulator of *HO* transcription, SIN1 (SPT2), is a nonspecific DNA-binding protein related to HMG1. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4135-4146.
- Kuo M.H., Brownell J.E., Sobel R.E., Ranalli T.A., Cook R.G., Edmondson D.G., Roth S.Y. and Allis C.D. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* **383**, 269-272.
- Kuo M.H., Zhou J., Jambeck P., Churchill M.E.A. and Allis C.D. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes *in vivo*. *Genes Dev.* **12**, 627-639.
- Kuras L. and Struhl K. (1999). Binding of TBP to promoters *in vivo* is stimulated by activators and requires Pol II holoenzyme. *Nature* **399**, 609-613.
- Kwon H., Imbalzano A.N., Khavari P.A., Kingston R.E. and Green M.R. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SWI/SNF complex. *Nature* **370**, 477-481.
- Längst G., Bonte E.J., Corona D.F.V. and Becker P.B. (1999). Nucleosome movement by CHRAC and ISWI without disruption or trans-displacement of the histone octamer. *Cell* **97**, 843-852.
- Laurent B.C., Treich I. and Carlson M. (1993). The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev.* **7**, 583-591.
- Lee D.Y., Hayes J.J., Pruss D. and Wolffe A.P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**, 73-84.
- Lee K.M., Sif S., Kingston R.E. and Hayes J.J. (1999). hSWI/SNF disrupts interactions between the H2A N-terminal tail and nucleosomal DNA. *Biochem.* **38**, 8423-8429.
- Lee T.I., Causton H.C., Holstege F.C.P., Shen W.C., Hannett N., Jennings E.G., Winston F., Green M.R. and Young R.A. (2000). Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature* **405**, 701-704.
- Lin Y., Fletcher M.C., Zhou J., Allis C.D. and Wagner G. (1999). Solution structure of the catalytic domain of GCN5 histone acetyltransferase bound to coenzyme A. *Nature* **400**, 86-89.
- Lo W-S., Trievel R.C., Rojas J.R., Duggan L., Hsu J-Y., Allis D.C., Marmorstein R. and Berger S.L. (2000). Phosphorylation of Serine 10 in histone H3 is functionally linked *in vitro* and *in vivo* to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol. Cell* **5**, 917-926.
- Logie C., Tse C., Hansen C. and Peterson C.L. (1999). The core histone N-terminal domains are required for multiple rounds of catalytic chromatin remodeling by the SWI/SNF and RSC complexes. *Biochem.* **38**, 2514-2522.
- Lorch Y., Zhang M. and Kornberg R.D. (1999). Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* **96**, 389-392.
- Lorch Y., Beve J., Gustafsson C.M., Myers L.C. and Kornberg R.D. (2000). Mediator-nucleosome interaction. *Mol. Cell* **6**, 197-201.
- Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F. and Richmond T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- McAndrew P.C., Svaren J., Martin S.R., Hörz W. and Goding C.R. (1998). Requirements for chromatin modulation and transcription activation by the Pho4 acidic activation domain. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5818-5827.

- McMahon S.B., Wood M.A. and Cole M.D. (2000). The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGcn5 to c-Myc. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 556-562.
- Marcus G.A., Silverman N., Berger S.L., Horiuchi J. and Guarente L. (1994). Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: Putative transcriptional adaptors. *EMBO J.* **13**, 4807-4815.
- Marcus G.A., Horiuchi J., Silverman N. and Guarente L. (1996). ADA5/SPT20 links the ADA and SPT genes, which are involved in yeast transcription. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3197-3205.
- Martinez E., Kundu T.K., Fu J. and Roeder R.G. (1998). A human SPT3-TAF<sub>II</sub>31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID. *J. Biol. Chem.* **273**, 23781-23785.
- Michel B., Komarnitsky P. and Buratowski S. (1998). Histone-like TAFs are essential for transcription *in vivo*. *Mol. Cell* **2**, 663-673.
- Mizzen C.A., Yang X.J., Kokubo T., Brownell J.E., Bannister A.J., Owen-Hughes T., Workman J., Wang L., Berger S.L., Kouzarides T., Nakatani Y. and Allis C.D. (1996). The TAF<sub>II</sub>250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**, 1261-1270.
- Moqtaderi Z., Keaveney M. and Struhl K. (1998). The histone H3-like TAF is broadly required for transcription in yeast. *Mol. Cell* **2**, 675-682.
- Morgan D. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **13**, 261-291.
- Muchardt C. and Yaniv M. (1993). A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila brm* genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* **12**, 4279-4290.
- Munshi N., Merika M., Senger K., Chen G. and Thanos D. (1998). Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off INF beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol. Cell* **2**, 457-467.
- Natarajan, K. Jackson B.M., Rhee E. and Hinnebusch A.G. (1998). yTAF<sub>II</sub>61 has a general role in RNA polymerase II transcription and is required by Gcn4p to recruit the SAGA coactivator complex. *Mol. Cell* **2**, 683-692.
- Natarajan, K. Jackson B.M., Zhou H., Winston F. and Hinnebusch A.G. (1999). Transcriptional activation by Gcn4p involves independent interactions with the SWI/SNF complex and the SRB/mediator. *Mol. Cell* **4**, 657-664.
- Neely K.E., Hassan A.H., Wallberg A.E., Steger D.J., Cairns B.R., Wright A.P.H. and Workman J.L. (1999). Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. *Mol. Cell* **4**, 649-655.
- Ogryzko V., Kotani T., Zhang X., Schiltz L., Howard T., Yang X.J., Howard B.H., Qin J. and Nakatani Y. (1998). Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* **94**, 35-44.
- Ornaghi P., Ballario P., Lena A.M., Gonzales A. and Filetici P. (1999). The bromodomain of Gcn5p interacts *in vitro* with specific residues in the N terminus of histone H4. *J. Biol. Chem.* **274**, 1-7.
- Orphanides G., Lagrange T. and Reinberg D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* **10**, 2657-2683.
- Owen-Hughes T., Utley R.T., Côte J., Peterson C.L and Workman J.L. (1996). Persistent site-specific remodeling of a nucleosome array by transient action of the SWI/SNF complex. *Science* **273**, 513-516.
- Owen D.J., Ornaghi P., Yang J.C., Lowe N., Evans P.R., Ballario P., Neuhaus D., Filetici P. and Travers A.A. (2000). The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase Gcn5p. *EMBO J.* **19**, 6141-6149.
- Parthun M., Widom J. and Gottschling D. (1996). The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **87**, 85-94.
- Pazin M.J. and Kadonaga J.T. (1997). What's up and down with deacetylation and transcription? *Cell* **89**, 325-328.
- Perez-Martin J. and Johnson A. (1998). The C-terminal domain of Sin1 interacts with the SWI-SNF complex in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4157-4164.

- Peterson C.L. and Tamkun J.W. (1995). The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *TIBS* **20**, 143-146.
- Peterson C.L. and Workman J.L. (2000). Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **10**, 187-192.
- Phelan M.L., Sif S., Narlikar G.J and Kingston R.E. (1999). Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol. Cell* **3**, 247-253.
- Phelan M.L., Schnitzler G.R. and Kingston R.E. (2000). Octamer transfer and creation of stably remodeled nucleosomes by human SWI/SNF and its isolated ATPases. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6380-6389.
- Pina B., Berger S.L., Marcus G.A., Silverman N., Agapite J. and Guarente L. (1993). *ADA3*: a gene, identified by resistance to GAL4-VP16, with properties similar to and different from those of *ADA2*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5981-5989.
- Pollard K.J. and Peterson C.L. (1997). Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6212-6222.
- Poot R.A., Dellaire G., Hülsmann B.B., Grimaldi M.A., Corona D.F.V., Becker P.B., Bickmore W.A. and Varga-Weisz P.D. (2000). HuCHRAC, a human ISWI chromatin remodeling complex contains hACF1 and two novel histone-fold proteins. *EMBO J.* **19**, 3377-3387.
- Quinn J., Fyrberg A.M., Ganster R.W., Schmidt M.C. and Peterson C.L. (1996). DNA-binding properties of the yeast SWI/SNF complex. *Nature* **379**, 844-847.
- Roberts S.M. and Winston F. (1997). Essential functional interactions of SAGA, a *Saccharomyces cerevisiae* complex of Spt, Ada, and Gcn5 proteins, with the Snf/Swi and Srb/mediator complexes. *Genetics* **147**, 451-465.
- Rojas J.R., Trievel R.C., Zhou J., Mo Y., Li X., Berger S., Allis C.D. and Marmorstein R. (1999). Structure of *Tetrahymena* GCN5 bound to coenzyme A and a histone H3 peptide. *Nature* **401**, 93-98.
- Ryan M.P., Jones R. and Morse R.H. (1998). SWI/SNF complex participation in transcriptional activation at a step subsequent to activator binding. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 1774-1782.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). Molecular cloning (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F. and Coulson A.R. (1975). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *J. Mol. Biol.* **94**, 441-449.
- Silverman N., Agapite J. and Guarente L. (1994). Yeast ADA2 protein binds to the VP16 protein activation domain and activates transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11665-11668.
- Smith E.R., Belote J.M., Schiltz L.R., Yang X.J., Moore P.A., Berger S.L., Nakatani Y. and Allis C.D. (1998). Cloning of drosophila GCN5: conserved features among metazoan GCN5 family members. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2948-2954.
- Sterner D.E., Grant P.A., Roberts S.M., Duggan L.J., Belotserkovskaya R., Pacella L.A., Winston F., Workman J.L. and Berger S.L. (1999). Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 86-98.
- Sterner D.E. and Berger S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Micr. Mol. Biol. Rev.* **64**, 435-459.
- Strahl B.D. and Allis C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Struhl K. (1985). Nucleotide sequence and transcriptional mapping of the yeast *pet56-his3-ded1* gene region. *Nucleic Acids Res.* **13**, 8587-601.
- Sudarsanam P., Cao Y., Wu L., Laurent B. and Winston F. (1999). The nucleosome remodeling complex, Snf/Swi, is required for the maintenance of transcription *in vivo* and is partially redundant with the histone acetyltransferase, Gcn5. *EMBO J.* **18**, 3101-3106.
- Sudarsanam P. and Winston F. (2000). The SWI/SNF family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *TIG* **16**, 345-351.
- Svaren J. and Hörz W. (1997). Transcription factors vs nucleosomes: regulation of the *PHO5* promoter in yeast. *TIBS* **22**, 93-97.

- Syntichaki P. and Thireos G. (1998). The Gcn5.Ada complex potentiates the histone acetyltransferase activity of Gcn5. *J. Biol. Chem.* **273**, 24414-24419.
- Syntichaki P., Topalidou I. and Thireos G. (2000). The bromodomain co-ordinates nucleosome remodeling. *Nature* **404**, 414-417.
- Tamkun J.M., Deuring R., Scott M.P., Kissinger M., Pattatucci A.M., Kaufman T.C. and Kennison J.A. (1992). Brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* **68**, 561-572.
- Tanner K.G., Trievel R.C., Kuo M.H., Howard R.M., Berger S.L., Allis C.D., Marmorstein R. and Denu J.M. (1999). Catalytic mechanism and function of invariant Glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator. *J. Biol. Chem.* **274**, 18157-18160.
- Trievel R.C., Rojas J.R., Sterner D.E., Venkataramani R.N., Wang L., Zhou J., Allis C.D., Berger S.L. and Marmorstein R. (1999). Crystal structure and mechanism of histone acetylation of the yeast GCN5 transcriptional coactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8931-8936.
- Tsukiyama T. and Wu C. (1995). Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell* **83**, 1011-1020.
- Tsukiyama T., Palmer J., Landel C.C., Shiloach J. and Wu C. (1999). Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **13**, 686-697.
- Utley R.T., Ikeda K., Grant P.A., Côté J., Steger D.J., Eberharter A., John S. and Workman J.L. (1998). Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* **394**, 498-502.
- Varga-Weisz P.D., Wilm M., Bonte E., Dumas K., Mann M. and Becker P.B. (1997). Chromatin-remodeling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature* **388**, 598-602.
- Vassilev A., Yamauchi J., Kotani T., Prives C., Avantaggiati M.L., Qin J. and Nakatani Y. (1998). The 400-kDa subunit of the PCAF histone acetylase complex belongs to the ATM superfamily. *Mol. Cell* **2**, 869-875.
- Vettese-Dadey M., Grant P.A., Hebbes T.R., Crane-Robinson C., Allis C.D. and Workman J.L. (1996). Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA *in vitro*. *EMBO J.* **15**, 2508-2518.
- Vignali M., Hassan A.H., Neely K.E. and Workman J.L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1899-1910.
- Wang W., Xue Y., Zhou S., Kuo A., Cairns B.R. and Crabtree G.R. (1996). Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev.* **10**, 2117-2130.
- Wang L., Liu L. and Berger S.L. (1998). Critical residues for histone acetylation by Gcn5, functioning in Ada and SAGA complexes, are also required for transcriptional function *in vivo*. *Genes Dev.* **12**, 640-653.
- Wassarman P.M. and Wolffe A.P. (1999). *Methods in enzymology-Chromatin*. Vol.304. Academic Press.
- Whitehouse I., Flaus A., Cairns B.R., White M.F., Workman J.L. and Owen-Hughes T. (1999). Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* **400**, 784-787.
- Winston F. and Carlson M. (1992). Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection. *TIG* **8**, 387-391.
- Winston F. and Allis C.D. (1999). The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nature Struct. Biol.* **6**, 601-604.
- Wittschieben B., Otero G., Bizemont T., Fellows J., Erdjument-Bromage H., Ohba R., Li Y., Allis C.D., Tempst P. and Svejstrup J.Q. (1999). A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell* **4**, 123-128.
- Wolffe A.P. and Hayes J.J. (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids. Res.* **27**, 711-720.
- Workman J.L. and Kingston R.E. (1992). Nucleosome core displacement *in vitro* via a metastable transcription factor-nucleosome complex. *Science* **258**, 1780-1784.
- Xie X., Kokubo T., Cohen S.L., Mirza U.A., Hoffmann A., Chait B.T., Roeder R.G., Nakatani Y. and Burley S.K. (1996). Structural similarity between TAFs and the heterotetrameric core of the histone octamer. *Nature* **380**, 316-322.

- Xu W., Edmondson D.G. and Roth S.Y. (1998). Mammalian GCN5 and PCAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5659-5669.
- Xu W., Edmondson D.G., Ervard Y.A., Wakamiya M., Behringer R.R. and Roth S.Y. (2000). Loss of *Gcn5l2* leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. *Nature Gen.* **26**, 229-232.
- Yamauchi T., Yamauchi J., Kuwata T., Tamura T., Yamashita T., Bae N., Westphal H., Ozato K. and Nakatani Y. (2000). Distinct but overlapping roles of histone acetylase PCAF and of the closely related PCAF-B/GCN5 in mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 11303-11306.
- Yang X.J., Ogryzko V., Nishikawa J-I., Howard B.H. and Nakatani Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, **382**, 319-324.
- Yudkovsky N., Logie C., Hahn S. and Peterson C.L. (1999). Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev.* **13**, 2369-2374.
- Yukawa M., Katoh S., Miyakawa T. and Tsuchiya E. (1999). Nps1/Sth1p, a component of an essential chromatin remodeling complex of *Saccharomyces cerevisiae*, is required for the maximal expression of early meiotic genes. *Genes Cells* **4**, 99-110.
- Zhang S.H., Gavin M., Dahiya A., Postigo A.A., Ma D., Luo R.X., Harbour W.J. and Dean D.C. (2000). Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* **101**, 79-89.