

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ (ΙΜΒΒ)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ -
ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

“ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ
ΤΩΝ TAFIIs ”

ΑΝΤΙΓΟΝΗ ΚΟΥΣΚΟΥΤΗ

Υπεύθυνος ερευνητής : Ι .ΤΑΛΙΑΝΙΔΗΣ

Υπεύθυνος καθηγητής : Ι ΠΑΠΑΜΑΤΘΑΙΑΚΗΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΤΑΦΙIs	4
1.2 ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΤΑΦΙIs ΜΕ ΤΙΣ ΙΣΤΟΝΕΣ	5
1.3 ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΤΑΦΙIs	6
2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	13
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	14
3.1 ΦΟΡΕΙΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	14
3.2 ΈΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	14
3.3 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ	15
3.4 ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	16
3.5 IN VITRO ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗΣ / ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΙΣΤΟΝΩΝ	17
3.6 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (IN GEL HISTONE METHYLASE ASSAY)	17
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	19
4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΗΤΑΦΙIs	19
4.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΗΤΑΦΙIs ΑΠΟ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΝΟΥΝ ΤΗΝ ΙΣΤΟΝΗ 3	24
4.2.1 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΑΠΟ ΗSET7 / SET9	24
4.2.2 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΑΠΟ SUV39H1	30
4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΤΑΦ6 (ΗΤΑΦII8o)	32
5. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ	36

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μεταγραφή των μηνυμάτων, ριβοσωμικών και μικρών ριβονουκλεϊνικών οξέων (mRNAs, rRNAs και small RNAs) πραγματοποιείται στα ευκαρυωτικά κύτταρα από την RNA πολυμεράση I, II και III αντίστοιχα. Ο έλεγχος της μεταγραφής συμβαίνει πρώτιστα στους υποκινητές των γονιδίων, όπου οι μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την πρόσδεση της πολυμεράσης και των υπόλοιπων παραγόντων, το ρυθμό με τον οποίο οι πολυμεράσες θα απομακρυνθούν από τον υποκινητή όπως επίσης και το ρυθμό της μεταγραφικής επιμήκυνσης.

Η σύνθεση των mRNAs από την RNA πολυμεράση II απαιτεί τη συνδυασμένη δραστηριότητα ενός μεγάλου πλήθους πρωτεϊνών, όπως έδειξαν πειράματα διαχωρισμού των πρωτεϊνών με μεθόδους χρωματογραφίας και ελέγχου της ενεργότητας των διαφορετικών κλασμάτων για την έναρξη της μεταγραφής από αλληλουχίες DNA που περιλαμβάνουν υποκινητές (1, 2, 3). Οι παράγοντες εκείνοι που είναι απαραίτητοι για τη μεταγραφή γονιδίων από την RNA πολυμεράση II ονομάστηκαν γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες II, TFIIs. Πειράματα foot printing έδειξαν ότι κύριος συντονιστής της έναρξης της μεταγραφής είναι ο βασικός γενικός μεταγραφικός παράγοντας TFIID, που αναγνωρίζει τον υποκινητή και παρέχει την απαραίτητη επιφάνεια, πάνω στην οποία θα συναθροιστεί το σύνολο της μεταγραφικής μηχανής. Την πρόσδεση του TFIID στην περιοχή του υποκινητή ακολουθεί η διαδοχική πρόσδεση των παραγόντων TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIIF, TFIIH, TFIIF και RNAPol II (4-6), ώστε να δημιουργηθεί ένα λειτουργικό προ-εναρκτήριο σύμπλοκο μεταγραφής (Pre-Initiation Complex, PIC) (Πίνακας 1).

Ο μεταγραφικός παράγοντας TFIID είναι ένα σύμπλοκο αποτελείται από την πρωτεΐνη που προσδένεται στην αλληλουχία TATA του υποκινητή (TATA Binding Protein, TBP) και 10-13 άλλους παράγοντες που συνδέονται με το TBP (TBP associated proteins, TAFIIs) , των οποίων η αλληλουχία είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη από τον σακχαρομύκητα ως και τον άνθρωπο.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΓΕΝΙΚΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΝΑΡΞΗΣ
ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

<u>ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ</u>	<u>ΑΡΙΘΜΟΣ</u>	<u>ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ</u>
<u>ΥΠΟΜΟΝΑΔΩΝ</u>		
→ TFIID –TBP	1	Αναγνώριση υποκινητή, Στρατολόγηση TFIIB
- TAFIIIs	10-12	Αναγνώριση υποκινητή (χωρίς TATA box), Θετικές και αρνητικές ρυθμιστικές λειτουργίες
→ TFIIA	3	Σταθεροποίηση της πρόσδεσης του TBP, Σταθεροποίηση TAF-DNA αλληλεπιδράσεων
→ TFIIB	1	Στρατολόγηση RNAPol II και TFIIF, Επιλογή της θέσης έναρξης από την RNAPol II
→ TFIIF	2	Στόχευση της RNAPol II στον υποκινητή, Αποσταθεροποίηση των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων RNAPol II-DNA
→ RNAPol II	12	Ενεργότητα σύνθεσης RNA, Στρατολόγηση TFIIE
→ TFIIE	2	Στρατολόγηση TFIIF, Τροποποίηση της ενεργότητας της ελικάσης του TFIIF, Ενεργότητα ΑΤΡάσης και κινάσης, Κατευθύνει την ενίσχυση του ανοίγματος του υποκινητή
→ TFIIH	9	Άνοιγμα του υποκινητή με την ενεργότητα της ελικάσης, Καθαρισμός του υποκινητή από την ενεργότητα της κινάσης της καρβοξυ-τελικής περιοχής της RNAPol II.

Πειραματικά δεδομένα από τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων των TAFIIs και συστήματα ανασύστασης της μεταγραφής *in vitro* δείχνουν ότι τα TAFIIs συμμετέχουν στην αναγνώριση του υποκινητή και λειτουργούν ως «συνενεργοποιητές» γεφυρώνοντας τις αλληλεπιδράσεις των παραγόντων που έχουν προσδεθεί στον ενισχυτή με τη βασική μεταγραφική μηχανή.

1.1 Λειτουργίες των TAFIIs

Οι πρώτες ενδείξεις για τη λειτουργικότητα των TAFIIs προήλθαν από μελέτη *in vitro* συστημάτων μεταγραφής σε *Drosophila* και άνθρωπο, όπου ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη TBP μπορεί να υποστηρίξει μόνο τη μεταγραφική ενεργοποίηση υποκινητών που περιλαμβάνουν την αλληλουχία TATA. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων που δεν περιλαμβάνουν TATA ή των γονιδίων εκείνων που η μεταγραφή πραγματοποιείται μετά την επίδραση ειδικού ενεργοποιητή πραγματοποιείται μόνο παρουσία του συμπλόκου TFIID (7-11) , γεγονός που ενδυναμώνει την άποψη ότι κάποιοι τουλάχιστον από τους παράγοντες που συνδέονται με το TBP συμμετέχουν στην αναγνώριση της περιοχής του υποκινητή (12).

Επιπλέον ενδείξεις ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες TAFIIs λειτουργούν ως μεταγραφικοί συνενεργοποιητές προέρχονται από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων θηλαστικών, κατά τα οποία βρέθηκε ότι εκτοπική έκφραση συγκεκριμένων υπομονάδων του TFIID ενισχύει την ενεργοποίηση της μεταγραφής από διαφορετικούς πυρηνικούς υποδοχείς. Έτσι βρέθηκε ότι ο ανθρώπινος παράγοντας hTAFII135 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της βιταμίνης D3 , του ρετινοϊκού οξέος και της θυρεοειδικής ορμόνης (13), ο παράγοντας hTAFII28 αλληλεπιδρά με υποδοχέα RXR και ο hTAFII30 με τον υποδοχέα του οιστρογόνου (14 και 15).

Ο γενικός μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται με το TBP hTAFII250, έχει ενεργότητα κινάσης που αυτοφωσφορυλιώνεται και φωσφορυλιώνει τον γενικό μεταγραφικό παράγοντα TFIIFa (16), ενζυμική ενεργότητα ενεργοποίησης και σύζευξης της ομπικουιτίνης, γνωστό

υπόστρωμα της οποίας είναι η ιστόνη 1, H1 (17) καθώς επίσης και ενζυμική ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών 3 και 4 (18).

Πειράματα αδρανοποίησης ή αφαίρεσης των γονιδίων των TAFIIς στον σακχαρομύκητα έχουν δείξει ότι οι παράγοντες εκείνοι δεν χρειάζονται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του συνόλου των γονιδίων (19, 20). Η παρουσία θερμοευαίσθητων μεταλλαγών σε συγκεκριμένα γονίδια των TAFIIς έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου του σακχαρομύκητα σε διαφορετική φάση. Όμοια, η παρουσία μιας θερμοευαίσθητης μεταλλαγής στο γονίδιο το hTAFII250 σε κύτταρα ινδικού χοιριδίου είχε ως αποτέλεσμα τη σύλληψη των κυττάρων στη φάση G₁, όταν τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε μη επιτρεπτή θερμοκρασία (21), γεγονός που ενδυναμώνει την άποψη ότι οι παράγοντες TAFIIς έχουν συγκεκριμένο μεταγραφικό ρόλο και καθένα από εκείνους συμμετέχει στη μεταγραφή κάποιου υποσυνόλου των γονιδίων του οργανισμού.

1.2 Περιοχές ομολογίας των TAFIIς με τις ιστόνες

Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των TFIIs έχει δείξει ότι οι περισσότεροι από τους παράγοντες που υπάρχουν στο TFIID παρουσιάζουν περιοχή αναδίπλωσης όμοια με των ιστονών, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι τα TFIIs ετεροδιμερίζονται για να σχηματίσουν ζευγάρια όμοια με εκείνα των ιστονών H₃-H₄ και H₂A-H₂B, τα οποία δημιουργούν δομή “νουκλεοσώματος” στο TFIID ()().

Η μικρότερη περιοχή αναδίπλωσης ιστονών αποτελείται από τρεις α-έλικες (α₁-α₃) που συνδέονται μεταξύ τους με δυο θηλιές (L₁, L₂), ενώ πολλές φορές παρατηρείται η παρουσία επιπλέον α έλικας στο N- ή /και C-τελικό άκρο της πρωτεΐνης. Στη δημιουργία των ετεροδιμερών ιστονών οι δυο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με κατεύθυνση κεφάλι- ουρά, έτσι ώστε η α₁-L₁ περιοχή της μιας πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά με την L₂-α₃ της άλλης. Η διευθέτηση αυτή των ιστονών στο χώρο έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δυο πρωτεϊνών και τη δημιουργία μιας σφιχτά πακεταρισμένης δομής ().

Το μοτίβο αναδίπλωσης των ιστονών υπάρχει σε μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών κάποιες εκ των οποίων συμμετέχουν στο σχηματισμό του TFIID, TFIIs. Έτσι, οι πρωτεΐνες του hTAFII80 (TAF6) και hTAFII32 (TAF9) παρουσιάζουν μοτίβο αναδίπλωσης όμοιο με εκείνο της ιστόνης 4 και της ιστόνης 3, αντίστοιχα και θεωρείται ότι δημιουργούν ετεροδιμερές μέσα στο σύμπλοκο του TFIID (). Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε όταν διαπιστώθηκε ότι στο σύμπλοκο του hPCAF, από το οποίο απουσιάζει ο hTAFII80 (TAF6), ο hTAFII32 (TAF9) αλληλεπιδρά με μια πρωτεΐνη που φέρει μοτίβο αναδίπλωσης ιστονών όμοιο με εκείνο του hTAFII80 ().

Επίσης, οι πρωτεΐνες hTAFII28 (TAF11) και hTAFII18 (TAF13) φαίνεται ότι δημιουργούν ετεροδιμερές μέσω ενός μη κανονικού μοτίβου αναδίπλωσης (). Η πρωτεΐνη hTAFII20 (TAF12) έχει βρεθεί ότι έχει περιοχή μεγάλης ομολογίας με την ιστόνη H2B και ετεροδιμερίζεται με το hTAFII135 (TAF4) φέρει μοτίβο αναδίπλωσης όμοιο με την H2A(). Κρυσταλλογραφικά δεδομένα με ταυτόχρονη χρήση αντισωμάτων για τις υπομονάδες του συμπλόκου του TFIID του σακχαρομύκητα () έδειξαν τα TAFIIs που θεωρείται ότι ετεροδιμερίζονται, βρίσκονται ως “ζευγάρια” σε δυο διακριτές περιοχές του συμπλόκου, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία από την κρυσταλλογραφική ανάλυση του ανθρώπινου TFIIDβ ().

1.3 Σύμπλοκα που περιλαμβάνουν TAFIIs

Μελέτη των συμπλόκων TFIID από διαφορετικούς τύπους κυττάρων θηλαστικών αλλά και πειράματα ανοσοκατακρήμνισης των συμπλόκων των TAFIIs έχουν δείξει ότι υπάρχουν διαφορετικά σύμπλοκα που περιέχουν TAFIIs εντός του κύτταρου, όπως επίσης υπάρχουν και διακριτά σύμπλοκα TFIID σε διαφορετικού τύπου κύτταρα του ίδιου οργανισμού (Εικόνα 1). Επιπλέον, ενώ ως TAFIIs έχουν οριστεί οι πρωτεΐνες εκείνες που συνδέονται με το TBP, έχει πλέον αποδειχτεί ότι οι συγκεκριμένοι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες συμμετέχουν και στη δημιουργία συμπλόκων απουσία TBP.

Αναλυτικότερα, πειράματα ανοσοκατακρήμνισης του TFIID με αντισώματα για τους διαφορετικούς παράγοντες TAFIIs σε κυτταρικά εκχυλίσματα που έχουν κλασματοποιηθεί με μεθόδους χρωματογραφίας και

έχουν υποστεί έκλυση από κολώνα φωσφο-κυτταρίνης σε διαφορετική συγκέντρωση άλατος, έδειξαν ότι υπάρχουν τουλάχιστον δυο σύμπλοκα TFIID (22). Τα σύμπλοκα εκείνα απαρτίζονται από τις κοινές υπομονάδες hTAFII20, hTAFII28, hTAFII 32, hTAFII55, hTAFII80, hTAFII100, hTAFII135, hTAFII250 (TFIIDα) και την υπομονάδα hTAFII30 και hTAFII18 που βρίσκονται στο TFIIDβ, το οποίο αποτελεί το 50% του συνόλου των συμπλόκων TFIID στο κύτταρο. Το hTAFII30 έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του οιστρογόνου και συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων του (23), ενώ αδρανοποίηση του γονιδίου του σε κύτταρα εμβρυϊκού καρκινώματος είχε ως αποτέλεσμα τα κύτταρα να πεθαίνουν μετά από σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1/Go (23b).

Αποκλειστικά στα B λεμφοκύτταρα του ανθρώπου έχει βρεθεί ο γενικός μεταγραφικός παράγοντας hTAFII105, υπερέκφραση του οποίου είχε ως αποτέλεσμα αλλαγές στο επίπεδο μεταγραφικής ρύθμισης ορισμένων μόνο γονιδίων των κυττάρων (24).

Το σύμπλοκο B- TFIID δεν περιλαμβάνει κανένα από τους παράγοντες των TAFIIs του κλασσικού TFIID, αλλά μια μόνο υπομονάδα TAFII170, που έχει ενεργότητα ATPάσης (69). Ο παράγοντας TAFII170 αποτελεί έναν καταστολέα της μεταγραφής των γονιδίων που ενεργοποιούνται με την επίδραση του TBP, καθώς έχει βρεθεί ότι προσδένεται στο TBP και απομακρύνει τον παράγοντα από την αλληλουχία TATA. Πρόσφατες μελέτες όμως έχουν δείξει ότι ο TAFII170 μπορεί να συμμετέχει και στην μεταγραφική ενεργοποίηση ορισμένων γονιδίων (26).

Σε αποπτωτικά κύτταρα που οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο έχει βρεθεί το σύμπλοκο TFIID που φέρει την υπομονάδα hTAFII80δ (27). Ο παράγοντας hTAFII80δ αποτελεί ισομορφή του hTAFII80, η οποία φέρει έλλειψη 10 αμινοξέων στο κέντρο της α2 έλικας και μια ανάστροφη επανάληψη Alu, στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί για μια ένθεση 49 αμινοξέων και εκφράζεται αποκλειστικά σε κύτταρα που οδηγούνται σε αποπτωτικό θάνατο. Στο σύμπλοκο του hTAFIIDπ που συμμετέχει το hTAFII80δ δεν υπάρχει hTAFII32 (που αποτελεί τον παράγοντα που αλληλεπιδρά με το hTAFII80 μέσω της περιοχής της πρωτεΐνης που φέρει ομολογία με την ιστόνη 3), γεγονός που θεωρείται ότι

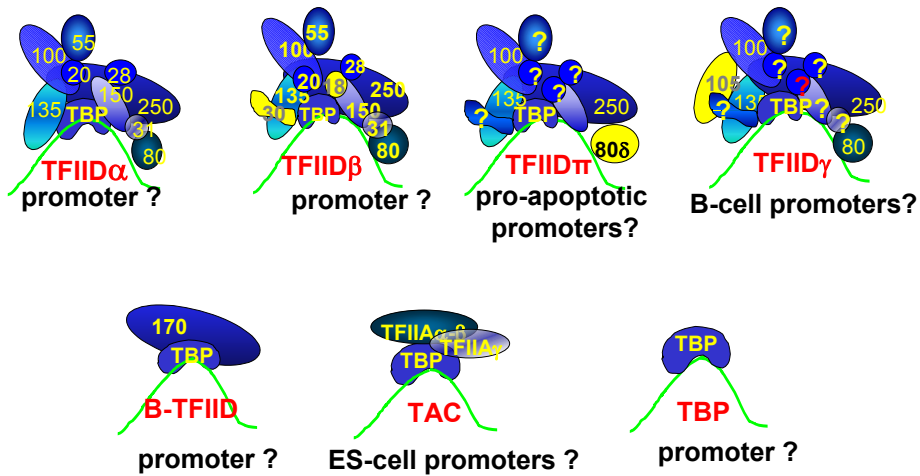
είναι υπεύθυνο για την αλλαγή του προτύπου μεταγραφής ενός συνόλου γονιδίων του κυττάρου.

Σε κύτταρα εμβρυϊκού καρκινώματος έχει απομονωθεί ένα σύμπλοκο που περιλαμβάνει TBP που αλληλεπιδρά με το πρόδρομο μόριο TFIIA $\alpha\beta$ και TFIIA γ απουσία των υπόλοιπων hTAFIIs, (28), ενώ σε διαφοροποιημένα κύτταρα δεν έχει ανιχνευτή η παρουσία του TAC. Το σύμπλοκο εκείνο προσδένεται σε χρωματίνη *in vivo* και συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων, όπως διαπιστώθηκε με πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε κύτταρα εμβρυϊκού καρκινώματος, θεωρείται δε, ότι συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων που ελέγχονται από σύμπλοκα που δεν περιλαμβάνουν TBP.

Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα (29) δείχνουν ότι στον υποκινητή ενός γονιδίου που δεν είναι ακόμα μεταγραφικά ενεργό αλλά έχει “δεσμευτεί” για ενεργοποίηση, υπάρχει προσδεμένο TBP απουσία των παραγόντων hTAFIIs, γεγονός που δείχνει ότι το TBP μπορεί να προσδένεται, χωρίς να βρίσκεται απαραίτητα σε σύμπλοκο, και να “μαρκάρει ” μια περιοχή που θα ενεργοποιηθεί για μεταγραφή, .

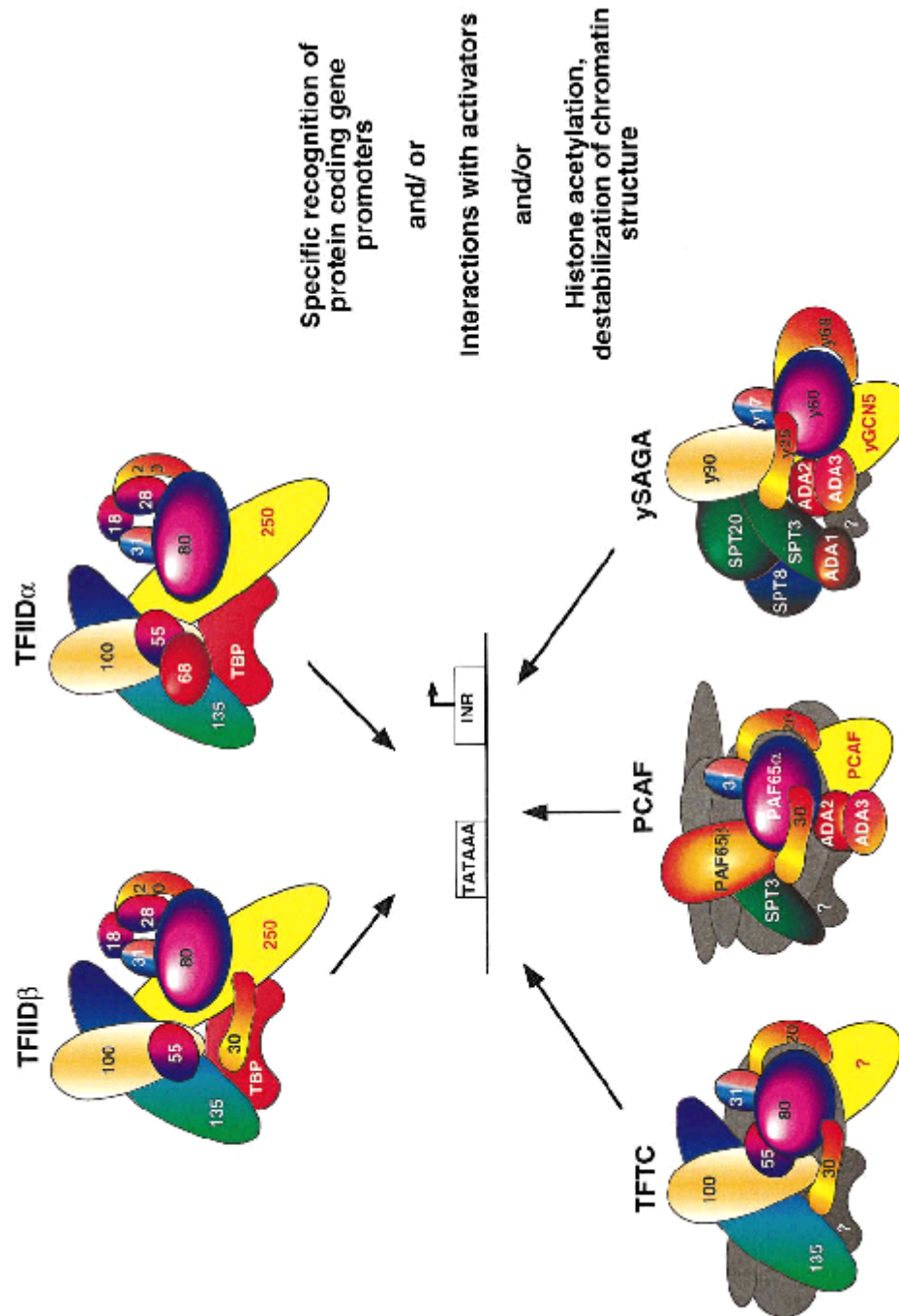
Η μελέτη του συμπλόκου TFIID και των διαφορετικών υπομονάδων που το απαρτίζουν οδήγησε στην ανακάλυψη ότι οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το TBP, TAFIIs, μπορούν να υπάρξουν σε σύμπλοκα από τα οποία απουσιάζει ο παράγοντας που προσδένεται στην αλληλουχία TATA. Έτσι, από τα κύτταρα HeLa απομονώθηκε ένα σύμπλοκο που περιλαμβάνει TAFIIs αλλά όχι TBP και ονομάζεται TFTC (30) .

Multiplicity of TBP-containing complexes participating in Pol II transcription initiation



Εικόνα 1: Διαφορετικά σύμπλοκα που περιλαμβάνουν TAFIIs και συμμετέχουν στη μεταγραφική ενεργοποίηση από την πολυμεράση II.

Το TFIC έχει δείξει ότι μπορεί να αντικαταστήσει το TFIID και να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων που περιλαμβάνουν ή όχι αλληλουχία TATA στον υποκινητή τους *in vitro*. Από το σύμπλοκο αυτό έχει βρεθεί ότι απουσιάζει η μεγάλη υπομονάδα του TFIID, TAFII250 και οι TAFII28 και TAFII18 (Εικόνα 2), που θεωρείται ότι σχηματίζουν ετεροδιμερές μέσω του μοτίβου αναδίπλωσης των ιστονών. Το σύμπλοκο όμως αυτό συνδέεται με πρωτεΐνη που παρουσιάζει ενεργότητα ακετυλίωσης ιστονών GCN5 (30) και λειτουργεί ως συνενεργοποιητής στη μεταγραφική ενεργοποίηση των πυρηνικών υποδοχέων.



Εικόνα 2: Διαφορετικά σύμπλοκα που περιλαμβάνουν TAFIIs μέσα στο κύτταρο: στη δεξιά άκρη παρουσιάζονται τα σύμπλοκα από τα οποία απουσιάζει το TBP και στην αριστερή, οι δυο πληθυσμοί του TFIID.

hTAFIIs περιλαμβάνονται και στο σύμπλοκο που παρουσιάζει ενεργότητα ακετυλίωσης ιστονών, PCAF (32). Στο σύμπλοκο αυτό υπάρχουν οι παράγοντες hTAFII32, hTAFII20 , οι οποίοι όμοια όπως το TFIID και TFIIC (33, 34) θεωρείται ότι ετεροδιμερίζονται με πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μοτίβο αναδίπλωσης ιστονών, ώστε να δημιουργηθεί δομή όμοια με του νουκλεοσώματος .

Επίσης, ο γενικός μεταγραφικός παράγοντας hTAFII32 συμπεριλαμβάνεται σε ένα σύμπλοκο (hSTAGA) μαζί με την ακετυλοτρανσφεράση hGCN5 –L και παράγοντες που παρουσιάζουν ομολογία με την πρωτεΐνη SPT3 του συμπλόκου του σακχαρομύκητα , SAGA (33). Το σύμπλοκο hSTAGA έχει δείχτει ότι παρουσία ακέτυλο-συνενζύμου-A μπορεί να λειτουργήσει ως συνενεργοποιητής στη μεταγραφική ενεργοποίηση χρωματικών υποστρωμάτων, *in vitro* και ότι αλληλεπιδρά με παράγοντες που συμμετέχουν στο εναλλακτικό μάτισμα των mRNAs () .

Πρόσφατα προτάθηκε νέα ενιαία ονομασία των παραγόντων που συμμετέχουν στο σχηματισμό του TFIID διαφορετικών οργανισμών(), η οποία στηρίζεται στην ομολογία των παραγόντων και όχι στο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης (Εικόνα 3).

New name	<i>H. sapiens</i> (hs)	<i>D. melanogaster</i> (dm)	<i>C. elegans</i> (ce)		<i>S. cerevisiae</i> (sc)	<i>S. pombe</i> (sp)
			previous name	new name		
TAF1	TAF _{II} 250	TAF _{II} 230	<i>taf-1</i> (W04A8.7)	<i>taf-1</i>	Taf145/130	TAF _{II} 111
TAF2	TAF _{II} 150	TAF _{II} 150	<i>taf-2</i> (Y37F11B.4)	<i>taf-2</i>	Taf150 or TSM1	(T38673)
TAF3	TAF _{II} 140	TAF _{II} 155 or BIP2	(C11G6.1)	<i>taf-3</i>	Taf47	
TAF4	TAF _{II} 130/135	TAF _{II} 110	<i>taf-5</i> (R119.6)	<i>taf-4</i>	Taf48 or MPT1	(T50183)
TAF4b	TAF _{II} 105					
TAF5	TAF _{II} 100	TAF _{II} 80	<i>taf-4</i> (F30F8.8)	<i>taf-5</i>	Taf90	TAF _{II} 72
TAF5b						TAF _{II} 73
TAF5L	PAF65β	Cannonball				
TAF6	TAF _{II} 80	TAF _{II} 60	<i>taf-3.1</i> (W09B6.2)	<i>taf-6.1</i>	Taf60	(CAA20756)
TAF6L	PAF65α	(AAF52013)	<i>taf-3.2</i> (Y37E11AL.8)	<i>taf-6.2</i>		
TAF7	TAF _{II} 55	(AAF54162)	<i>taf-8.1</i> (F54F7.1)	<i>taf-7.1</i>	Taf67	TAF _{II} 62/PTR6
TAF7L	TAF2Q		<i>taf-8.2</i> (Y111B2A.16)	<i>taf-7.2</i>		
TAF8	(BAB71460)	Prodos	(ZK1320.12)	<i>taf-8</i>	Taf65	(T40895)
TAF9	TAF _{II} 32/31	TAF _{II} 40	<i>taf-10</i> (T12D8.7)	<i>taf-9</i>	Taf17	(S62536)
TAF9L	TAF _{II} 31L (AAG09711)					
TAF10	TAF _{II} 30	TAF _{II} 24	<i>taf-11</i> (K03B4.3)	<i>taf-10</i>	Taf25	(T39928)
TAF10b		TAF _{II} 16				
TAF11	TAF _{II} 28	TAF _{II} 30β	<i>taf-7.1</i> (F48D6.1)	<i>taf-11.1</i>	Taf40	(CAA93543)
TAF11L			<i>taf-7.2</i> (K10D3.3)	<i>taf-11.2</i>		
TAF12	TAF _{II} 20/15	TAF _{II} 30α	<i>taf-9</i> (Y56A4.3)	<i>taf-12</i>	Taf61/68	(T37702)
TAF13	TAF _{II} 18	(AAF53875)	<i>taf-6</i> (C14A4.10)	<i>taf-13</i>	Taf19 or FUN81	(CAA19300)
TAF14					Taf30	
TAF15	TAF _{II} 68					
<i>B-TFIID</i>						
BTAF1	TAF _{II} 170/TAF-172	Hel89B	(F15D4.1)	<i>btaf-1</i>	Mot1	(T40642)

Εικόνα 3: Ενιαία ονοματολογία των γνωστών TAFIIς διαφορετικών οργανισμών.

2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η ομολογία των TAFIIs με τις ιστόνες αποτέλεσε την αφορμή για τη διερεύνηση της παρουσίας μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στους παράγοντες του TFIID, TAFIIs. Στην εργασία αυτή εξετάστηκε η πιθανή ακετυλίωση και μεθυλίωση των TAFIIs από ένζυμα που παρουσιάζουν ενεργότητα ακετυλίωσης και μεθυλίωσης ιστονών, με *in vitro* αντιδράσεις. Μετά την πιστοποίηση της παρουσίας των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στα TAFIIs πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση των αμινοξέων που ακετυλιώνονται / μεθυλιώνονται και διερεύνηση της λειτουργικότητάς τους.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Φορείς έκφρασης

Τα cDNAs των γενικών μεταγραφικών παραγόντων που συνδέονται με το TBP, hTAFIIs, παραχωρήθηκαν από τον Tora L. Για τη δημιουργία πρωτεϊνών που φέρουν τον επίτοπο ιστιδίνης (6 His) στο αμινοτελικό άκρο τους άκρο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο προκαρυωτικής έκφρασης pRSETA, B ή C . Η δημιουργία ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο τη βακτηριακή πρωτεΐνη μεταφοράς της S γλουταθειόνης πραγματοποιήθηκε με την κλωνοποίηση των cDNA μορίων στο προκαρυωτικής προέλευσης πλασμίδιο pGEX6P 1-3. Η μεθυλτρασφεράση ιστονών hSuv39h1 κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδιο έκφρασης pMT 3, υπό τον μεγάλο υποκινητή του αδενοϊού, ώστε να φέρει τον επίτοπο HA στο αμινοτελικό άκρο. Η δημιουργία πρωτεϊνών που φέρουν σημειακή μετάλλαξη για κάποιο αμινοξύ πραγματοποιήθηκε με τα αντιδραστήρια “ Gene Editor Mutagenesis kit” (Promega).

3.2 Έκφραση και απομόνωση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών από βακτήρια

Όλες οι πρωτεΐνες που καθαρίστηκαν από βακτήρια στην παρούσα εργασία ήταν σε σύντηξη με ιστιδίνες (6 X His) ή με την βακτηριακή πρωτεΐνη GST (Glutathione S Transferase). Η έκφραση όλων των πρωτεϊνών έγινε στο βακτηριακό στέλεχος *E.coli* που ονομάζεται BL21plys. Το στέλεχος αυτό έχει το χαρακτηριστικό ότι η έκφραση της T7 πολυμεράσης από την οποία εξαρτάται η μεταγραφή και επομένως και η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης , βρίσκεται κάτω από αυστηρό έλεγχο και επάγεται μόνο με την προσθήκη IPTG (συναγωνιστής της δράσης του lacI καταστολέα). Σε καλλιέργεια οπτικής πυκνότητας (OD₆₀₀) 0.6 προστίθεται IPTG τελικής συγκέντρωσης 0.2 mM. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 3 ώρες ή στους

22°C για 6 ώρες . Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά σε 5.000 rpm στους 4°C. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε Sonication buffer I (20mM Tris pH8.0, 200mM NaCl, 0.5% Triton, 5mM Imidazole, 1mM PMSF) στην περίπτωση που η πρωτεΐνη βρίσκεται σε σύντηξη με His και επαναδιαλύεται σε Sonication buffer II (1 X PBS 0.5 mg/ml BSA) στην περίπτωση της σύντηξης με GST. Ακολουθεί διάρρηξη των κυττάρων και σπάσιμο του DNA με υπέρηχους και φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές για 30 min. Το υπερκείμενο αποτελείτο πρωτεϊνικό εκχύλισμα που θεωρητικά περιέχει υπερεκφρασμένη την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει . Ακολουθεί απομόνωση της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου, Talon (Clonetech) στην πρώτη περίπτωση και Glutathione Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia) στην δεύτερη . Οι πρωτεΐνες που προσδένονται μη ειδικά στην κολώνα απομακρύνονται με 4 ξεπλύματα με τα παραπάνω διαλύματα (10 φορές ο όγκος της κολώνας) για 10 λεπτά το καθένα , στους 4°C υπό ανάδευση . Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες εκλύονται από την κολώνα μετά από προσθήκη ίσου όγκου Elution Buffer I (20mM Tris pH 8.0, 200mM NaCl, 0.5% Triton, 200mM Imidazole, 1mM PMSF) και Elution Buffer II (10 mM Glutathione, 50mM Tris pH8.0, 1 mM PMSF) αντίστοιχα . Η διαδικασία της έκλυσης επαναλαμβάνεται 5 φορές, τα προϊόντα συλλέγονται είτε συγκεντρώνονται με centricon είτε μεταφέρονται σε κατάλληλο διάλυμα (20 mM Tris pH 8.0, 50mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF 20% glycerol) με τη μέθοδο της διαπίδυσης (dialysis).

3.3 Κυτταροκαλλιέργειες και παροδική διαμόλυνση

Τα κύτταρα της σειράς HEK293 που χρησιμοποιήθηκαν , αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο MEM, τροποποιημένο κατά Dulbecco, με περιεκτικότητα σε ορό 10%. Όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 60-70% του πιάτου καλλιέργειας, θεωρήθηκε ότι ήταν έτοιμα για παροδική διαμόλυνση, με πλασμίδιο που εκφράζει για την πρωτεΐνη hSuv39H1, η οποία φέρει τον επίτοπο HA και βρίσκεται υπό τον έλεγχο του μεγάλου υποκινητή του αδενοϊού υποκινητή . Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η συγκατακρήμνιση με φωσφορικό ασβέστιο ().

Το σύστημα έκφρασης πρωτεϊνών που στηρίζεται σε βακουλιοΐο για την έκφραση του CBP, PCAF έχουν ήδη περιγραφεί (Sout α). Η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών CBP, και PCAF πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα εντόμων Sf9, που μεγαλώνουν σε GRACE' s απουσία O₂, και η απομόνωση των πρωτεϊνών έγινε σε χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου, Talon (Clontech) σύμφωνα με τις οδηγίες τις κατασκευάστριας εταιρείας. Κυτταρικά εκχυλίσματα εντόμων στα οποία έχουν εκφραστεί οι παράγοντες TAFIIs με το σύστημα του βακουλιοΐου προέρχονται από τον Tora L και η απομόνωση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης.

3.4 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

Τα κύτταρα που έχουν υποστεί παροδική διαμόλυνση ξεπλένονται με διάλυμα PBS (3X) αποκολλώνται από την επιφάνεια στην οποία αναπτύσσονται με διάλυμα N (25mM Hepes pH7.9, 60mM KCl, 15mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 250mM Sucrose, 0.5% BSA 0.3% Nonident P40, 1mM dithiothreitol, 10μg/ml approtinin και 1mM PMSF). Παρουσία του διαλύματος N πραγματοποιείται η διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και η απομάκρυνση του κυτταροπλάσματος, και οι πυρήνες των κυττάρων λαμβάνονται ως ίζημα μετά από φυγοκέντρηση σε 1000 rpm, στους 4°C για 5 λεπτά. Το πυρηνικό εκχύλισμα αποκτάται μετά τη διαλυτοποίηση των πυρήνων σε διάλυμα A και NLB-800 (Sout MolCel), ώστε να βρίσκεται σε διάλυμα τελικής συγκέντρωσης (25mM Hepes pH7.9, 150mM KCl, 10% Γλυκερόλη, 0.1% Nonident P40, 0.2mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 10μg/ml approtinin και 0.5mM PMSF). Ακολουθεί ένα στάδιο καθαρισμού του πυρηνικού εκχυλίσματος μετά από επώαση του με πρωτεΐνη A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) ανοσοκατακρήμνιση των πρωτεΐνης HA-Suv39H1 με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού για τον επίτοπο HA 8 μg/ml (Santa Cruz) πρόσδεση σε πρωτεΐνη A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) στους 4°C

Η ανοσοκατακρήμνιση των παραγόντων TAFIIs από τα κυτταρικά εκχυλίσματα Sf9 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος

ποντικού για τον επίτοπο FLAG συνδεδεμένου με αγαρόζη (Sigma) στους 4°C.

3.5 In vitro αντιδράσεις ακετυλίωσης / μεθυλίωσης ιστονών

Οι αντιδράσεις ακετυλίωσης ιστονών και των hTAFIIs πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα 50mM Tris pH 8.0, 0.1mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 10% γλυκερόλης παρουσία 0.25 μ C [³H]acetyl-CoA στους 30°C για 1 ώρα. Η ακετυλοτρανσφεράση hCBP ή hPCAF είχε εκφραστεί σε κύτταρα Sf9 και στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν 10 μ g ιστονών (Boehringer), ενώ οι αντίστοιχες ποσότητες πρωτεϊνών που είχαν εκφραστεί σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli* φαίνονται σε πηκτώμα ακρυλαμίδης. Οι αντιδράσεις διαχωρίστηκαν σε πηκτώμα 12% SDS.

Οι αντιδράσεις μεθυλίωσης πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα 50mM Tris pH 8.0, 100mM KCl, 4mM EDTA, 0.5mM dithiothreitol, παρουσία 1 μ C [³H-Me]-S-adenosyl methionine (Amersham). Οι αντιδράσεις μεθυλίωσης πραγματοποιήθηκαν σε 30°C για τη μεθυλ-τρανσφεράση hSET7/SET9 και στους 37°C για το ένζυμο hSuv39H1. Οι αντιδράσεις διαχωρίστηκαν σε πηκτώμα ακρυλαμίδης 12%.

3.6 Αντιδράσεις μεθυλίωσης σε πηκτώμα ακρυλαμίδης (In gel histone methylase assay)

Σε πηκτώμα ακρυλαμίδης-SDS 12% που περιέχει 1mg/ml ιστόνες (Boehringer) διαχωρίζονται τα δείγματα εκείνα που θεωρείται ότι έχουν ενεργότητα μεθυλ-τρανσφεράσης ιστονών, χωρίς να αποδιαταχτούν σε υψηλή θερμοκρασία. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πηκτώμα επωάζεται υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα B (50mM Tris pH 8.0, 1mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA pH 8.0) παρουσία 20% ισοπροπανόλης, και έπειτα για 30min σε διάλυμα B. Το πηκτώμα ακολούθως, επωάζεται σε διάλυμα B που περιέχει 8M ουρία με ανάδευση σε θερμοκρασία

δωματίου. Το πήκτωμα ξεπλένεται σε διάλυμα Β περιέχει 0.04 % Tween 20 και ακολούθως επώαζεται για 30 min στους 4°C και μετά από ανανέωση του διαλύματος για 12h στους 4°C, στο ίδιο διάλυμα χωρίς ανάδευση (renature). Στη συνέχεια το πήκτωμα εκπλένεται σε διάλυμα Α (50mM Tris pH 8.0, 1mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA pH 8.0 10% γλυκερόλη και 1mM PMSF) σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min και με το ίδιο διάλυμα παρουσία 1 μ C [³H-Me]-S-adenosyl methionine (Amersham) πραγματοποιείται η αντίδραση της μεθυλίωσης των ιστονών για 30 min στους 30°C. Η απομάκρυνση των μη ειδικών προϊόντων πραγματοποιείται με εκτεταμένα ξεπλύματα με διάλυμα 5% τρι-χλωρο-οξικού οξέος, τα οποία συνεχίζονται ακόμα και για 12h. Το πήκτωμα έπειτα στεγνώνεται και η ενσωμάτωση της μεθυλομάδας σε ιστόνες ανιχνεύεται με αυτοραδιογραφία.

Η αντίδραση μεθυλίωσης σε πήκτωμα ακρυλαμίδης πραγματοποιήθηκε και σε πήκτωμα που δεν περιελάμβανε ιστόνες με όμοιο τρόπο, ώστε να διερευνηθεί η ενεργότητα των πρωτεϊνών να μεθυλιώνουν τον εαυτό τους.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Μελέτη της ακετυλίωσης των hTAFIIs

Η παρουσία του μοτίβου ιστονών σε μεγάλο αριθμό παραγόντων που συνδέονται με το TBP και απαρτίζουν διαφορετικά σύμπλοκα TFIID ή σύμπλοκα που συμμετέχουν στην ακετυλίωση των ιστονών και την ενεργοποίηση της μεταγραφής, οδήγησε στη μελέτη της παρουσίας των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στα hTAFIIs .

Μελέτες των αλληλεπιδράσεων των hTAFIIs στο σύμπλοκο του TFIID έχουν δείξει ότι 9 από τους παράγοντες που βρίσκονται στο σύμπλοκο και περιλαμβάνουν μοτίβο αναδίπλωσης ιστονών, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους ώστε να δημιουργηθούν ετεροδιμερή αντίστοιχα με εκείνα των ιστονών στο νουκλεόσωμα (1). Πρόσφατα κρυσταλλογραφικά δεδομένα ανάλυσης των συμπλόκων του ανθρώπου hTFIID και TFIIc (1,2) και του σακχαρομύκητα yTFIID (3) έδειξαν ότι οι αλληλεπιδράσεις των παραγόντων με μορφή όμοια με εκείνη των ετεροδιμέρων ιστονών είναι δυνατό να συμβαίνει *in vivo*. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι συγκεκριμένα αμινοξέα του μοτίβου αναδίπλωσης ιστονών στο hTAFII28 είναι απαραίτητα για τη μεταγραφική ενεργοποίηση υποκινητών από τον πυρηνικό υποδοχέα του οιστρογόνου και της βιταμίνης D3 (4) *in vivo*, ενώ σε *in vitro* πειράματα έχει δειχτεί ότι η παρουσία ακετυλο-συνενζύμου A ενδυναμώνει τη συγγένεια πρόσδεσης του TFIID για τον υποκινητή, απουσία ιστονών (5). Όσα παραπάνω αναφέρθηκαν είχαν ως αποτέλεσμα την προσεκτική μελέτη των περιοχών ομολογίας των hTAFIIs με τις ιστόνες.

Στοιχισή των περιοχών των hTAFIIs που φέρουν ομολογία με ιστόνες με τις αντίστοιχες περιοχές των ιστονών έδειξε ότι το αμινοτελικό άκρο του hTAFII32 παρουσιάζει μεγάλο βαθμό ομοιότητας με την “ουρά” της ιστόνης 3 (Εικόνα 4). Η στοιχισή των παραπάνω πρωτεϊνών έδειξε ότι τα αμινοξέα της ιστόνης 3 που θεωρείται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία “σημαδιών” στη χρωματίνη συμμετέχοντας στην μεταγραφική ενεργοποίηση ή σίωπηση μιας περιοχής, σύμφωνα με την υπόθεση του κώδικα των ιστονών (6,7,8), παραμένουν συντηρημένα στην αντίστοιχη περιοχή του hTAFII32.

Σύμφωνα με την υπόθεση του κώδικα των ιστονών, συγκεκριμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε συγκεκριμένα αμινοξέα των ιστονών είναι τα σημάδια εκείνα που με μορφή “ορχήστρας” χαρακτηρίζουν ή / και καθορίζουν τη μεταγραφική ενεργότητα μιας χρωματινικής περιοχής.

Η ακετυλίωση των λυσινών 14, 23 και σε μικρότερο βαθμό της λυσίνης 9 της ιστόνης 3 από τις ακετυλοτρανσφεράσες θεωρείται ότι αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για το “άνοιγμα” της πακεταρισμένης δομής του νουκλεοσώματος. Μετά το άνοιγμα της δομής του νουκλεοσώματος η αλληλουχία του DNA να είναι πια προσβάσιμη και αναγνωρίσιμη από τους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες, ώστε μετά την προσέλευση των παραγόντων του προεναρκτηρίου συμπλόκου να είναι τελικά εφικτή η έναρξη της μεταγραφής (6,7,8).

Η παρουσία των αμινοξέων που υπόκειται σε ακετυλίωση στην ιστόνη 3 και στο hTAFII32 (Εικόνα 4) είχε ως αφορμή την πραγματοποίηση *in vitro* αντιδράσεων ακετυλίωσης για τους παράγοντες του hTFIID. Σε πρωταρχικά πειράματα ακετυλίωσης δοκιμάστηκε ο παράγοντας hTAFII32, που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομολογία με την ουρά της ιστόνης 3.

	4	910	14	23
hHistone-3	A	R	T	K
	Q	T	A	R
	K	S	T	G
	G	G	K	A
	P	R	K	Q
	L	A	T	K
	A	A	A	A
hTAF9	E	S	G	K
	T	A	S	P
	K	S	M	P
	D	A	Q	M
	M	A	Q	I
	L	K	D	M
	D	M	D	M
	4	910	13	23

Εικόνα 4 : Σύγκριση της αμινοτελικού άκρου του hTAFII32 (hTAF9) με την αντίστοιχη περιοχή της ιστόνης 3

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Ο γενικός μεταγραφικός παράγοντας hTAFII250, που απομονώθηκε με ανοσοκατακρήμνιση από κυτταρικά εκχυλίσματα εντόμου που είχαν μολυνθεί με βακουλοϊό. Ο παράγοντας έχει ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης ειδικά προς την λυσίνη 14 της ιστόνης 3.

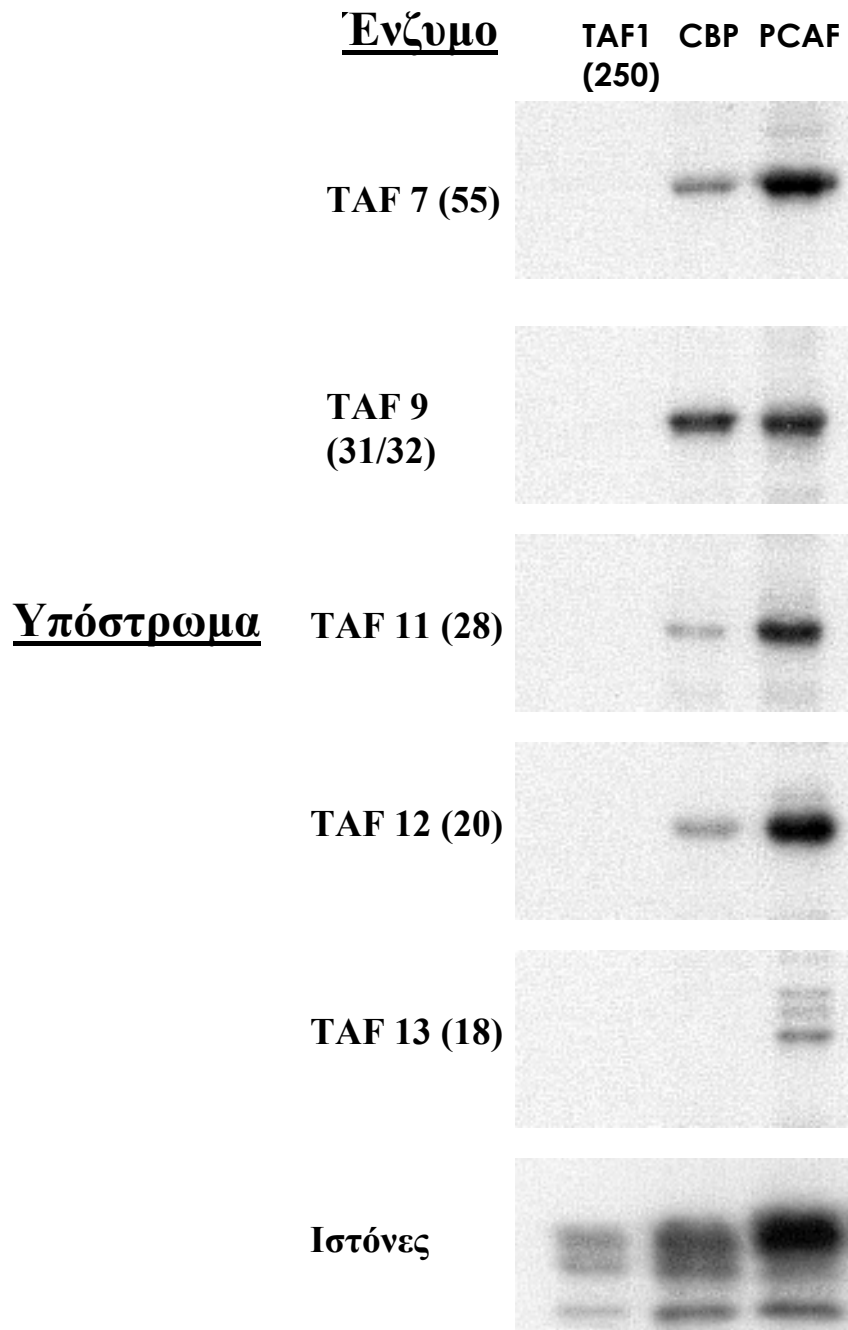
- Οι συνενεργοποιητές hCBP και hP/CAF, που έχουν ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης για την ιστόνη 3. Οι παράγοντες hCBP και hP/CAF απομονώθηκαν από κυτταρικά εκχυλίσματα εντόμων που είχαν μολυνθεί με βακουλοϊό με χρωματογραφία συγγένειας για τον επίτοπο της ιστιδίνης.

Οι παράγοντες hTAFIIs εκφράστηκαν στο βακτηριακό στέλεχος *E.coli*, BL21Plys, ως πρωτεΐνη που φέρει τον επίτοπο της ιστιδίνης και οι αντιδράσεις ακετυλίωσης διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12%.

Μετά την διαπίστωση της ακετυλίωσης του hTAFII32 (Εικόνα 5) πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις ακετυλίωσης και άλλων παραγόντων που συμμετέχουν στη δημιουργία του TFIID και παρουσιάζουν μοτίβο αναδίπλωσης ιστονών (hTAFII18, hTAFII20, hTAFII28 και hTAFII30) και hTAFII55, του οποίου η αλληλεπίδρασή του με τον παράγοντα hTAFII250 έχει βρεθεί ότι μειώνει την ενεργότητα ακετυλομεταφοράς του (9).

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν παρουσία [³ H]acetyl-CoA έδειξαν ότι οι περισσότεροι από τους παράγοντες που συνδέονται με το TBP και παρουσιάζουν μοτίβο αναδίπλωσης ιστονών αναγνωρίζονται ως υπόστρωμα και υπόκεινται σε ακετυλίωση από τους συνενεργοποιητές hCBP και hP/CAF, με εξαίρεση το hTAFII30 (Εικόνα 5 και πειραματικά δεδομένα που δεν απεικονίζονται). Από την αυτοραδιογραφία είναι εμφανές ότι το hP/CAF παρουσιάζει υψηλή ενεργότητα ακετυλίωσης των ανασυνδυασμένων hTAFII18, hTAFII20, hTAFII28 , που περιέχουν περιοχή ομολογίας με ιστόνες και του hTAFII55, ενώ η ακετυλίωση των ιδίων υποστρωμάτων από το hCBP είναι αρκετά ασθενέστερη και απουσιάζει από το hTAFII18. Από την εικόνα φαίνεται επίσης ότι η ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης της κεντρικής υπομονάδας του TFIID, hTAFII250, είναι ιδιαίτερα χαμηλή και δεν αναγνωρίζει ως υποστρώματα τους υπόλοιπους παράγοντες του συμπλόκου που εξετάστηκαν. Η ενεργότητα των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν ελέγχθηκε σε απομονωμένες ιστόνες.

Εικόνα 5: *In vitro* αντιδράσεις ακετυλίωσης των hTAFIIs από τις ακετυλοτρανσφεράσες, hTAFII250, CBP και P/CAF



Η ακετυλίωση των hTAFIIs από διαφορετικά ένζυμα μπορεί να αποτελεί ένα ακόμα στάδιο ελέγχου της συνάθροισης των διαφορετικών συμπλόκων του TBP ή / και των συμπλόκων που περιλαμβάνουν τους παράγοντες εκείνους απουσία TBP μέσα στο κύτταρο (hTFIIDα ή β, hTFTC, hP/CAF και hSTAGA). Η τροποποίηση εκείνη σε συνδυασμό με άλλες (π.χ. μεθυλίωση) είναι δυνατό να διαμορφώνει έτσι ένα είδος κώδικα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των TAFIIs που καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους καθώς επίσης και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, δημιουργώντας έτσι διαφορετικά σύμπλοκα που συμμετέχουν στη μεταγραφική ενεργοποίηση ειδικών γονιδίων στόχων.

Ο παράγοντας που συνδέεται με το TBP, hTAFII32 βρέθηκε να ακετυλιώνεται ισχυρά τόσο από το hCBP όσο και από το hP/CAF. Δεδομένου του μεγάλου βαθμού ομολογίας που παρουσιάζει η πρωτεΐνη hTAFII32 με την αμινοτελική ουρά της ιστόνης 3 (Εικόνα 4) και ότι η περιοχή εκείνη της ιστόνης είναι υπόστρωμα ακετυλίωσης από τα ένζυμα που προαναφέρθηκαν, δημιουργήθηκαν σημειακές μεταλλάξεις σε συντηρημένες λυσίνες του hTAFII32, ώστε να διαπιστωθεί η ακριβής θέση της ακετυλίωσης.

Οι σημειακές μεταλλαγές πραγματοποιήθηκαν στον hTAFII32 έτσι ώστε να δημιουργείται αντικατάσταση της λυσίνης 4 ή 9 ή 13 ή 23 με το αμινοξύ αλανίνη. Παράλληλα δημιουργήθηκαν και μεταλλαγμένου τύπου πρωτεΐνες που φέρουν αντικατάσταση σε περισσότερες από μια λυσίνες . Οι μεταλλαγές πραγματοποιήθηκαν με τη χρησιμοποίηση εμπορικού αντιδραστήριου (Promega) και επαληθεύτηκαν με ανάλυση της πρωτοταγούς δομής της αλληλουχίας το cDNA . Οι αντιδράσεις ακετυλίωσης *in vitro* επαναλήφθηκαν για την αγρίου τύπου πρωτεΐνη hTAFII32 και τις πρωτεΐνες που φέρουν τις σημειακές μεταλλάξεις στις λυσίνες (πειραματικά δεδομένα που δεν απεικονίζονται!). Η σειρά των αντιδράσεων που αναφέρθηκε δεν αποκάλυψε το στόχο ακετυλίωσης, γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι περισσότερα του ενός αμινοξέα μπορεί να υπόκεινται στη συγκεκριμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν, ή ότι ο στόχος της ακετυλίωσης δεν βρίσκεται στην ιδιαίτερα συντηρημένη ουρά της πρωτεΐνης αλλά στην κεντρική περιοχή του μοτίβου αναδίπλωσης των ιστονών.

Επιπλέον πειράματα είναι απαραίτητο να γίνουν για τον καθορισμό της θέσης ακετυλίωσης του παράγοντα hTAFII32 και την διερεύνηση της λειτουργικότητας της τροποποίησης εκείνης.

4.2 Μελέτη της μεθυλίωσης των hTAFIIs από παράγοντες που μεθυλιώνουν την ιστόνη 3

4.2.1 Μεθυλίωση από hSET7 / SET9

Σύμφωνα με την υπόθεση του κώδικα των ιστονών (6,7,8) διαφορετικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών λειτουργούν ως ορχήστρα, καθορίζοντας έτσι το μεταγραφικό “δυναμικό” της συγκεκριμένης δομής της χρωματίνης. Η “υπογραφή” που αφήνουν διαφορετικές ενζυμικές ενεργότητες πάνω στις ιστόνες διατηρείται κατά το διπλασιασμό του DNA και την κυτταρική διαίρεση, ώστε να καθορίζεται η τύχη των θυγατρικών κυττάρων. Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα αποκαλύπτουν ότι η μεθυλίωση των ιστονών συμπεριλαμβάνεται στην “ορχήστρα” των τροποποιήσεων που καθορίζουν το δυναμικό μεταγραφής και μάλιστα λειτουργούν ως το αποτύπωμα που μεταβιβάζεται κατά τις κυτταρικές διαιρέσεις στην επόμενη γενιά (10, 11, 12, 13, 14, 15).

Μετά τη διαπίστωση της ακετυλίωσης των παραγόντων hTAFII18, hTAFII20, TAFII28, TAFII32 και TAFII55 από ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανότητα παρουσίας και άλλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στις υπομονάδες του TFIID, κατά τρόπο όμοιο όπως συμβαίνει στις ιστόνες των νουκλεοσωμάτων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από την κυτταρική σειρά Sf9 που είχαν μολυνθεί με βουκολοϊό (16) για τις υπομονάδες :

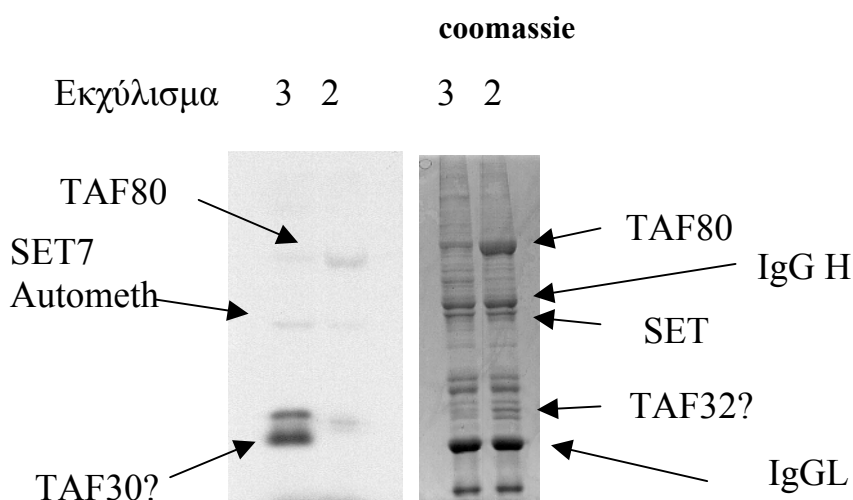
- TAF6 (hTAFII80) , εκχύλισμα 1
- TAF6 (hTAFII80) και TAF9(hTAFII32), εκχύλισμα 2
- TAF4 (hTAFII135), TAF5 (hTAFII100), TAF6 (hTAFII80), TAF7 (hTAFII55), TAF8 (TBN) , TAF9 (hTAFII32), TAF10(hTAFII30), TAF12 (hTAFII20), το οποίο θα αναφέρεται ως TAF mix, εκχύλισμα 3.

Τα κύτταρα Sf9 που χρησιμοποιήθηκαν μολύνθηκαν με βακουλοϊό που εκφράζει για διαφορετική υπομονάδα του TFIID ώστε στο ίδιο κυτταρικό εκχύλισμα να βρίσκονται οι υπομονάδες εκείνες που σχηματίζουν

ετεροδιμερή με τρόπο αντίστοιχο με εκείνο των ιστονών, TAF6- TAF9, TAF4- TAF12, TAF8- TAF10 (εξαιρεση αποτελεί το εκχύλισμα 1). Η έκφραση των παραγόντων μαζί με την πρωτεΐνη που ετεροδιμερίζεται στο σύστημα του βακουλοϊού θεωρείται ότι προσομοιάζει καλύτερα τις συνθήκες και τη διαμόρφωση των πρωτεϊνών *in vivo*. Για την απομόνωση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση από τα κυτταρικά εκχυλίσματα με αντίσωμα ειδικό για τον επίτοπο Flag (SIGMA) που εκφράζεται στο αμινοτελικό άκρο του TAF6 (hTAFII80).

Για τον έλεγχο της πιθανής μεθυλίωσης των hTAFIIs χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη hSET7 / SET9 (13), η οποία εκφράστηκε σε προκαρυώτικα κύτταρα και απομονώθηκε με χρωματογραφία συγγένειας για τον επίτοπο ιστοιδίνης που εκφράζεται στο αμινοτελικό άκρο της. Η hSET7 / SET9 είχε απομονωθεί και χαρακτηριστεί από κύτταρα HeLa (13), έχει τη δομή που χαρακτηρίζει τις μεθυλοτρανσφεράσες ιστονών και παρουσιάζει ενεργότητα μεθυλίωσης της λυσίνης 4 στην ιστόνη 3, “αποτύπωμα ” που έχει βρεθεί ότι χαρακτηρίζει τις μεταγραφικά ενεργές περιοχές της χρωματίνης (17, 18). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν τα προϊόντα ανοσοκατακρήμνισης από το εκχύλισμα 2 και 3 που αναφέρθηκαν παραπάνω, παρουσία [³H- Me]-S-adenosyl methionine (Amersham) και οι αντιδράσεις διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% (Εικόνα 6).

ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΑΠΟ SET7



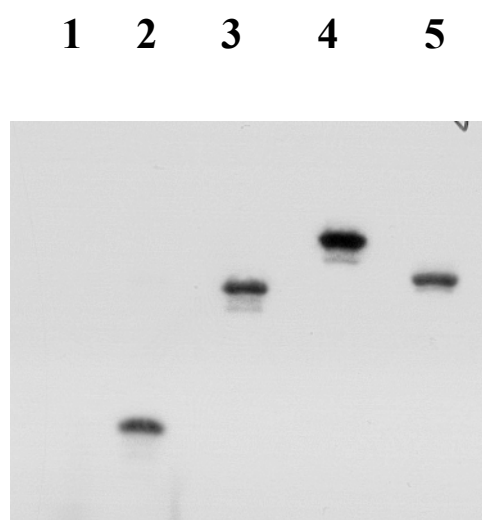
Εικόνα 6: Αυτοραδιογραφία και πήκτωμα ακρυλαμίδης (Coomassie) των αντιδράσεων μεθυλίωσης των hTAFIIs από την hSET7 / SET9

Όπως φαίνεται από την αυτοραδιογραφία και σε σύγκριση με το πήκτωμα της ακρυλαμίδης όπου αναλύθηκαν οι αντιδράσεις, φαίνεται ότι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους μικρότερου του 31.5 kDa μεθυλιώνεται από το hSET7 / SET9, ενώ η πρωτεΐνη 80kDa και 32kDa που μεθυλιώνονται αχνά ίσως οφείλονται σε ενδογενή ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης του TAF6 (hTAFII80, η πιθανή ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης θα αναπτυχθεί αναλυτικότερα). Στην Εικόνα 6 επίσης απεικονίζονται η ελαφριά και η βαριά αλυσίδα του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοκατακρήμνιση.

Η παρουσία έντονα μεθυλιωμένης πρωτεΐνης με μοριακό βάρος κοντά στα 30kDa μας οδήγησε στην επανάληψη των *in vitro* αντιδράσεων, με υπόστρωμα την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη TAF10(hTAFII30) που είχε εκφραστεί σε προκαρυωτικά κύτταρα και απομονωθεί με Talon (Clonetech) μέσω του επιτόπου της ιστοδίνης.

Η αντίδραση της μεθυλίωσης από την hSET7 / SET9 για την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη TAF10(hTAFII30) έδειξε ότι η πρωτεΐνη αυτή μεθυλιώνεται ισχυρά. Προκειμένου να αναγνωρισθεί το αμινοξύ της πρωτεΐνης που υπόκειται σε μεθυλίωση, πραγματοποιήθηκε η έκφραση διαφορετικών τμημάτων της σε σύζευξη με την βακτηριακή πρωτεΐνη GST (Εικόνα 7) .

<u>ENZYMO</u>	<u>ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ</u>
SET7+	1. GST
	2. Histones
	3. His-TAF10 FL
	4. GST-TAF10 100-217
	5. GST-TAF10 120-206



Εικόνα 7: Μεθυλίωση του TAF10(hTAFII30) από hSET7

Στις αντιδράσεις που μεθυλίωσης που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα:

- η βακτηριακή GST ως αρνητικός μάρτυρας μεθυλίωσης από την hSET7 / SET9,

- το τετραμερές των ιστονών ως θετικός μάρτυρας της ενεργότητας της hSET7 / SET9,

- η πρωτεΐνη του TAF10 (hTAFII30) που έχει εκφραστεί με τον επίτοπο της ιστιδίνης ,

- η πρωτεΐνη TAF10 (hTAFII30) από την οποία απουσιάζουν τα 100 πρώτα αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου (100-216), φέρει τον επίτοπο GST στο N-άκρο,

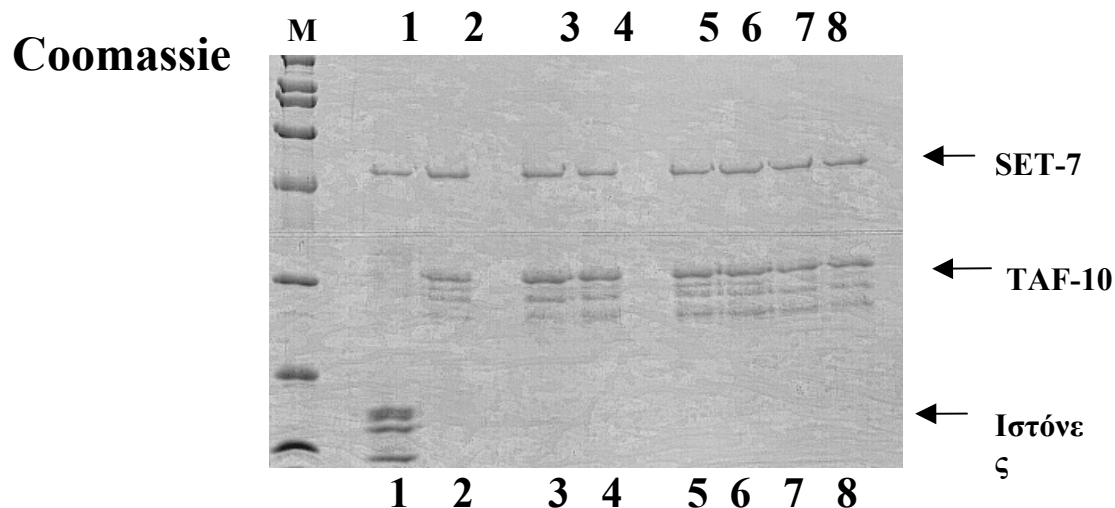
- η πρωτεΐνη TAF10 (hTAFII30) από το αμινοξύ 120-206, που περιλαμβάνει μόνο την περιοχή με το μοτίβο αναδίπλωσης ιστονών και φέρει τον επίτοπο GST στο N-άκρο.

Οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν εκφράστηκαν στο στέλεχος *E.coli* που BL21Plys και απομονώθηκαν με χρωματογραφία συγγένειας.

Στην αυτοραδιογραφία που παρουσιάζεται στην εικόνα 7 είναι εμφανές ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη TAF10 (hTAFII30) μεθυλιώνεται από την hSET7 / SET9 στην περιοχή ομολογίας με τις ιστόνες, δεν είναι όμως εμφανές αν η μεθυλίωση περιορίζεται στο συγκεκριμένο μόνο κομμάτι.

Η περιοχή της πρωτεΐνης TAF10 (hTAFII30) που παρουσιάζει ομολογία με τις ιστόνες, εμπεριέχει μια σειρά αμινοξέων που έχουν διατηρηθεί σε μεγάλο βαθμό, όπως έδειξε στοίχιση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας του TAF10 (hTAFII30) διαφορετικών οργανισμών. Ανάμεσα στα αμινοξέα του μοτίβου των ιστονών, που έχουν διατηρηθεί αμετάβλητα στην πρωτεΐνη TAF10 (hTAFII30) διαφορετικών οργανισμών (19), υπάρχει μια σειρά λυσινών στην έλικα 2 (α2) και τη θηλιά 2 (L2) , για τις οποίες δημιουργήθηκαν μεταλλάξεις. Αναλυτικότερα, οι λυσίνες 161, 175, 177, 187, 189 και 192 υπέστησαν μεταλλαγή (Promega) σε αργινίνη, ώστε να δημιουργηθούν μόρια που φέρουν σημειακές μεταλλάξεις για καθένα από τα αμινοξέα που αναφέρθηκαν, αλλά και μόρια που παρουσιάζουν περισσότερα από ένα μεταλλαγμένα αμινοξέα. Επιπλέον, ολόκληρη η πρωτεΐνη TAF10 (hTAFII30) που είχε υποστεί μεθυλίωση, απομονώθηκε μετά από το διαχωρισμό σε

πήκτωμα SDS-ακρυλαμίδης, απομακρύνθηκε από το πήκτωμα, υπέστη σε πέψη με τρυψίνη και σε ακόλουθη ανάλυση σε φασματογράφο μάζας (συνεργαζόμενο εργαστήριο Tora L), για την αναγνώριση των αμινοξέων που μεθυλιώνονται από τη TAF10 (hTAFII30).



1.Histones

2.TAF10 wt

3.TAF10/189Q

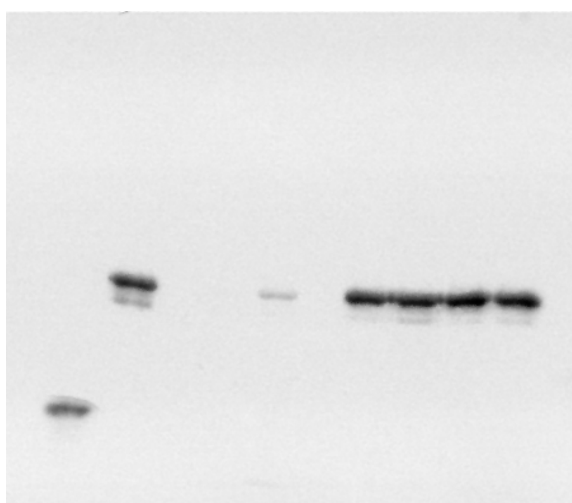
4.TAF10/ 189R

5.TAF10/ 187R

6.TAF10/ 192R

7.TAF10/ 161,175,177,187R

8.TAF10/ 175,177,192R



Αυτοραδιογραφία

Εικόνα 8: 12% SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία των αντιδράσεων μεθύλιωσης του αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών TAF10 (hTAFII30) από τη μεθυλοτρανσφεράση hSET7 / SET9.

Ανάλυση φασματοσκοπίας μάζας των πεπτιδίων που προέκυψαν από την πέψη της μεθυλιωμένης πρωτεΐνης TAF10 (hTAFII30) έδειξε ότι το μοναδικό

αμινοξύ που μεθυλιώνεται από την hSET7 / SET9 είναι η λυσίνη 189. Η λυσίνη 189 συμπεριλαμβάνεται στην περιοχή του μοτίβου αναδίπλωσης ιστονών και είναι μια ιδιαίτερα συντηρημένη θέση όπως έδειξε η στοίχιση των πρωτεϊνών TAF10 διαφορετικών οργανισμών (19).

Η αντιδράσεις μεθυλίωσης του αγρίου τύπου πρωτεΐνης και των μεταλλαγμένων για συγκεκριμένες θέσεις λυσίνης TAF10 επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της ανάλυσης φασματοσκοπίας μάζας (Εικόνα 8). Στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη his-hSET7 / SET9 που απομονώθηκε από βακτηριακά κύτταρα. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν:

1. Ιστόνες (θετικός μάρτυρας της αντίδρασης μεθυλίωσης)
2. Η αγρίου τύπου πρωτεΐνη TAF10 (hTAFII30)
3. Η πρωτεΐνη TAF10 (hTAFII30) που φέρει αντικατάσταση στο αμινοξύ 189 από λυσίνη σε γλουταμίνη (189Q) ή
4. Η πρωτεΐνη TAF10 (hTAFII30) που φέρει αντικατάσταση στο αμινοξύ 189 από λυσίνη σε αργινίνη (189R)
5. Η πρωτεΐνη TAF10 (hTAFII30) που φέρει αντικατάσταση στο αμινοξύ 187 από λυσίνη σε αργινίνη (187R)
6. Η πρωτεΐνη TAF10 (hTAFII30) που φέρει αντικατάσταση στο αμινοξύ 192 από λυσίνη σε αργινίνη (192R), και
- 7 και 8. Η πρωτεΐνη TAF10 (hTAFII30) που φέρει αντικατάσταση στις θέσεις 161, 175, 177 και 187 ή 175, 177 και 192 σε αργινίνη (161,175,177,187R), και (175,177,192R). Όλες οι πρωτεΐνες TAF10 εκφράστηκαν με τον επίτοπο της ιστιδίνης στο N-άκρο και απομονώθηκαν από βακτηριακά κύτταρα

Στην αυτοραδιογραφία του πηκτώματος στο οποίο διαχωρίστηκαν οι αντιδράσεις της μεθυλίωσης φαίνεται ότι η λυσίνη 189 είναι το μόνο αμινοξύ που αναγνωρίζεται και μεθυλιώνεται από το hSET7 / SET9 (η παρουσία μικρού βαθμού μεθυλίωσης της πρωτεΐνης hTAFII30/189R μπορεί να οφείλεται σε μη ειδική μεθυλίωση άλλων λυσινών, η οποία καταστέλλεται όταν η λυσίνη 189 μεταλλαχθεί σε γλουταμίνη).

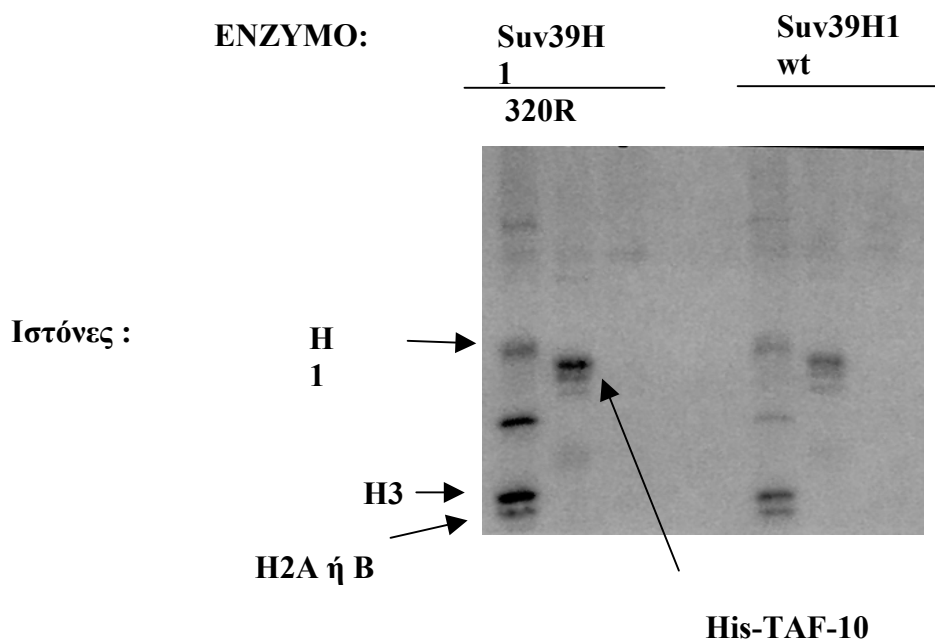
Η λειτουργικότητα της μεθυλίωσης του TAF10 δεν έχει ακόμα διερευνηθεί με *in vivo* πειράματα. Είναι όμως πιθανό ότι η μεθυλίωση ενός συντηρημένου αμινοξέος που βρίσκεται σε μια περιοχή της πρωτεΐνης που συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις με τα άλλα hTAFIIs, να επηρεάζει τις

αλληλεπιδράσεις εκείνες (για παράδειγμα με το TAF8) ώστε να δημιουργηθούν εναλλακτικές μορφές συμπλόκων που περιλαμβάνουν TAFIIs στο κύτταρο (TFIIDβ, TFTC και hP/CAF). Η μεθυλίωση εκείνη είναι δυνατό να συμμετέχει άμεσα και στις αλληλεπιδράσεις του TAF10 με πυρηνικούς υποδοχείς, όπως με τον υποδοχέα οιστρογόνου η της βιταμίνης D3, υπόθεση που θα διερευνηθεί αναλυτικά στο μέλλον.

4.2.2 Μεθυλίωση από SUV39H1

Η μεθυλίωση του TAF10 (hTAFII30) από τη μεθυλοτρανσφεράση hSET7 / SET9, ειδική για τη λυσίνη 4 της ιστόνης 3 αποτέλεσε το έναυσμα για τον έλεγχο μεθυλίωσης της πρωτεΐνης και από άλλα ένζυμα που έχει βρεθεί να μεθυλιώνουν ειδικά την ιστόνη 3. Το ένζυμο SUV39H1 αποτελεί μεθυλοτρανσφεράση ειδική για την λυσίνη 9 της ιστόνης 3 και η τροποποίηση αυτή θεωρείται υπεύθυνη για τη μεταγραφική σιώπηση της χρωματίνης και τη δημιουργία των συμπυκνωμένων δομών της ετεροχρωματίνης (10, 11) . Η παρουσία της μεθυλομάδας στη λυσίνη 9 έχει βρεθεί επιπλέον να λειτουργεί ως σημάδι που επιφέρει τη μεταγραφική σιώπηση ευχρωματινικών περιοχών, το οποίο απουσιάζει από το μεταγραφικά ενεργό γονίδιο (12).

Οι αντιδράσεις για τη διερεύνηση της πιθανής μεθυλίωσης του TAF10 (hTAFII30), πραγματοποιήθηκαν με πρωτεΐνη που έχει εκφραστεί με τον επίτοπο των 6 ιστιδινών σε βακτηριακά κύτταρα και έχει απομονωθεί με χρωματογραφία συγγένειας. Ως θετικός μάρτυρας των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν οι ιστόνες. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις απομονώθηκε από HEK293 κύτταρα, τα οποία είχαν υποστεί παροδική διαμόλυνση με το φορέα έκφρασης pMT3-HA-SUV39H1 pMT3-HA-SUV39H1/320R με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης, με αντίσωμα ειδικό για τον επίτοπο HA. Η πρωτεΐνη SUV39H1/320R φέρειαντικατάσταση του αμινοξέος 320 από ιστιδίνη σε αργινίνη, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία αυξημένης ικανότητας μεθυλίωση της λυσίνης 9 (10). Οι αντιδράσεις μεθυλίωσης του TAF10 (hTAFII30) διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% και τα αποτελέσματα εμφανίστηκαν σε αυτοραδιογραφία (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: 12% SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία των αντιδράσεων μεθυλίωσης του TAF10 (hTAFII30) από τη μεθυλοτρανσφεράση HA-SUV39H1/320R και HA-SUV39H1.

Οι αντιδράσεις μεθυλίωσης που απεικονίζονται στην εικόνα 9 δείχνουν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας TAF10 (hTAFII30) μεθυλιώνεται από τη

μεθυλοτρανσφεράση SUV39H1, και μάλιστα σε αντιστοιχία με την ιστόνη 3, το ένζυμο που φέρει αργινίνη στη θέση 320, παρουσιάζει μεγαλύτερη ενεργότητα.

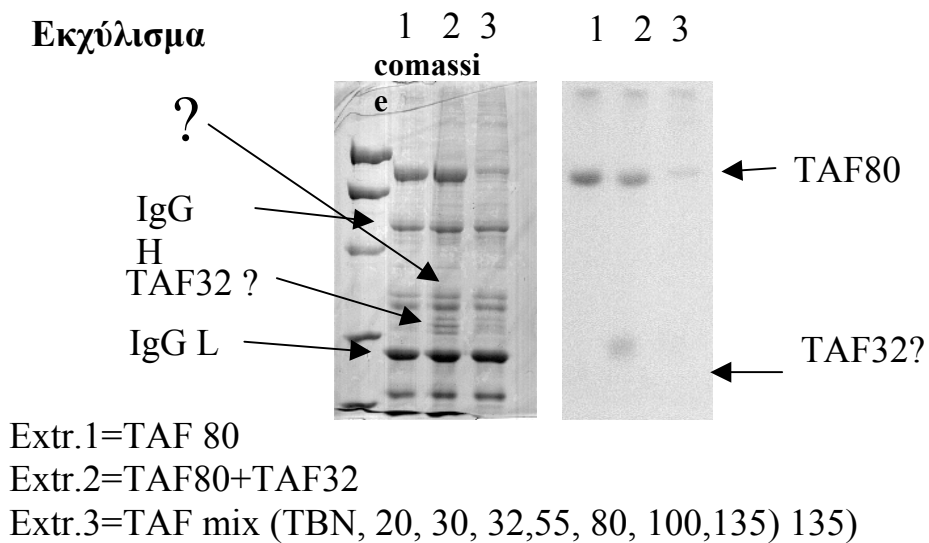
Η θέση του αμινοξέος και ο ρόλος της μεθυλίωσης του TAF10 από το SUV39H1 δεν έχουν διερευνηθεί ακόμα, αλλά είναι πιθανό η τροποποίηση εκείνη να εμπλέκεται στην απομάκρυνση ή τη διάσπαση των συμπλόκων που συμμετέχουν στη μεταγραφική ενεργοποίηση TFIIDβ, TFTC και hP/CAF, καθώς η ενεργότητα του SUV39H1 έχει συνδεθεί με τη παροδική (12) ή μόνιμη μεταγραφική καταστολή της χρωματίνης (10, 11). Εναλλακτικά, η τροποποίηση αυτή να επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με τους μεταγραφικούς παράγοντες ή / και τους πυρηνικούς υποδοχείς που αλληλεπιδρά, συμβάλλοντας έτσι στη δημιουργία των διαφορετικών συμπλόκων στα οποία συμμετέχει το TAF10 .

4.3 Μελέτη της ενδογενούς ενεργότητας μεθυλοτρανσφεράσης του TAF6 (hTAFII80)

Οι αντιδράσεις μεθυλίωσης των hTAFIIs που έχουν εκφραστεί σε κύτταρα Sf9 με το σύστημα του βακουλοϊού από τη μεθυλοτρανσφεράση hSET7 / SET9 έδειξαν ότι υπάρχει μικρή μεθυλίωση της πρωτεΐνης TAF6 (hTAFII80) και TAF9(hTAFII32). Παράλληλα, μας γνωστοποιήθηκε ότι ο παράγοντας TAF6 (μη δημοσιευμένες πληροφορίες, Imhof) παρουσιάζει ενεργότητα μεθυλίωσης του εαυτού του και του παράγοντα με τον οποίο αλληλεπιδρά, ώστε να σχηματίσουν ετεροδιμερές όμοιο με εκείνο της ιστόνης 3-ιστόνης4, TAF9. Ο παράγοντας TAF6 παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την ιστόνη 4 και θεωρείται ότι με το σχηματισμό ετεροδιμερούς με το TAF9, συμμετέχει στη δημιουργία της δομής που μοιάζει με νουκλεόσωμα, μέσα στο TFIID (2,3). Μελέτη της πρωτοταγούς δομής του TAF6 όμως, αποκάλυψε ότι από την πρωτεΐνη απουσιάζει η χαρακτηριστική περιοχή αναγνώρισης και μεταφοράς της μεθυλομάδας που συναντάται σε όλες τις μεθυλοτρανσφεράσες ιστονών SET. Ο έλεγχος της παρουσίας ενεργότητας

μεθυλοτρανσφεράσης στην πρωτεΐνη TAF6 πραγματοποιήθηκε με *in vitro* αντιδράσεις αυτό-μεθυλίωσης της πρωτεΐνης που είχε εκφραστεί σε ευκαρυωτικό σύστημα (Εικόνα 10), και με αντίδραση μεθυλίωσης που πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (Εικόνα 11).

Auto-meth.



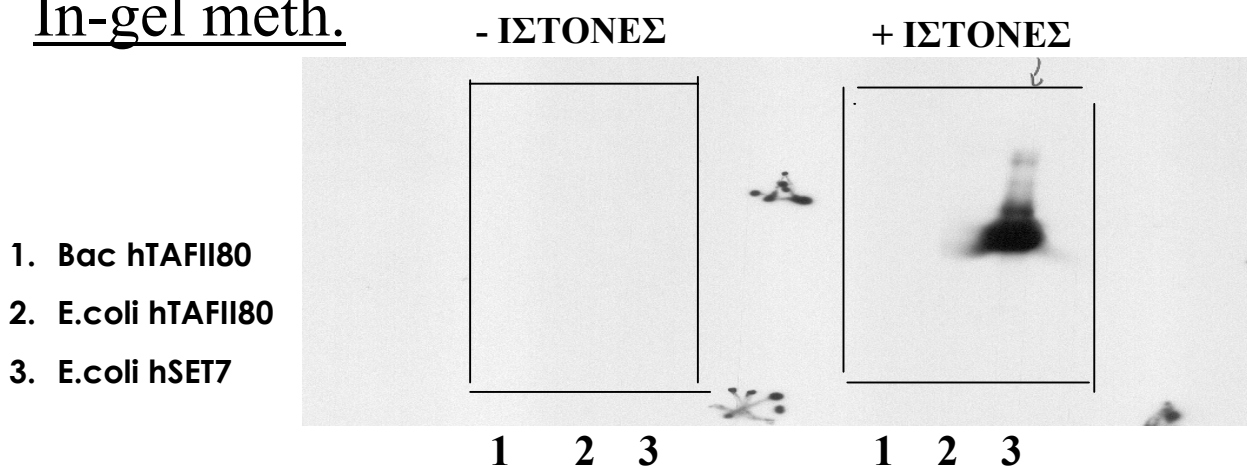
Εικόνα 10: Πήκτωμα διαχωρισμού (12%) και αυτοραδιογραφία των αντιδράσεων αυτό-μεθυλίωσης του TAF6 (hTAFII80) / μεθυλίωσης των hTAFIIs που έχουν απομονωθεί από ευκαρυωτικά κύτταρα.

Σε εκχυλίσματα από κύτταρα Sf9 που έχουν μολυνθεί με βακουλοϊό ώστε να εκφράζουν για hTAFII80 (εκχύλισμα 1), hTAFII80 και hTAFII32 (εκχύλισμα 2) και hTAFII135, hTAFII100, hTAFII80, hTAFII55, TBN, hTAFII32, hTAFII30, hTAFII20, το οποίο θα αναφέρεται ως TAF mix, (εκχύλισμα 3) πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα ειδικό για τον επίτοπο FLAG του hTAFII80. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία [³H- Me]-S-adenosyl methionine στους 30°C και διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα 12%.

Η επώαση του παράγοντα hTAFII80 με [³H- Me]-S-adenosyl methionine έδειξε ότι η πρωτεΐνη εκείνη μπορεί να υπόκειται σε αυτό-μεθυλίωση, και επιπλέον μεθυλιώνει και τον παράγοντα hTAFII32. Το σήμα της μεθυλίωσης των πρωτεϊνών hTAFII80 και hTAFII32 είναι ανάλογο της ποσότητας της πρωτεΐνης που έχει απομονωθεί, γι' αυτό και στο εκχύλισμα 3 η μεθυλίωση των δυο πρωτεϊνών είναι πολύ ασθενέστερη. Όπως είναι εμφανές από το πήκτωμα διαχωρισμού κατά την απομόνωση των παραγόντων ανοσοκατακρημνίζεται και μια μη ειδική πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 31.5-45kDa.

Για την επιβεβαίωση της ενδογενούς ενεργότητας μεθυλοτρανσφεράσης στο hTAFII80 πραγματοποιήθηκε αντίδραση αυτο-μεθυλίωσης και μεθυλίωσης ιστονών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (Εικόνα 11).

In-gel meth.



Εικόνα 11: Αντίδραση αυτό-μεθυλίωσης και μεθυλίωσης ιστονών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης.

Κατά την αντίδραση μεθυλίωσης σε πήκτωμα ακρυλαμίδης (In Gel Histone Methylase Activity) οι πρωτεΐνες που θεωρείται ότι έχουν ενδογενή ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης, διαχωρίζονται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης που έχει πολυμεριστεί παρουσία ιστονών, ώστε να ανιχνευτεί η ενεργότητα μεθυλίωσης των ιστονών. Παράλληλα, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης που δεν περιέχει ιστόνες για να ανιχνευτεί η ενεργότητα αυτό-μεθυλίωσης. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες “στερεώνονται” στο πήκτωμα, αποδιατάσσονται σε διάλυμα ουρίας και μετά τη επαναδιάταξή τους, επωάζονται με [³ H- Me]-S-adenosyl methionine.

Στις αντιδράσεις μεθυλίωσης που πραγματοποιήθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης για τον παράγοντα TAF6 (hTAFII80) χρησιμοποιήθηκε:

1. hTAFII80 το οποίο είχε εκφραστεί με το σύστημα του βακουλίου
2. hTAFII80 το οποίο είχε εκφραστεί σε βακτηριακά κύτταρα *E.coli*
3. hSET7/ SET9 που είχε εκφραστεί σε *E.coli*, ως θετικός μάρτυρας.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στην εικόνα 11, ο παράγοντας hTAFII80 δεν παρουσιάζει ενεργότητα μεθυλίωσης του εαυτού του ή των ιστονών. Ενδιαφέρον είναι ότι ακόμα και όταν ο παράγοντας hTAFII80 είχε εκφραστεί σε ευκαρυωτικά κύτταρα δεν παρουσίασε ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης, σε αντίθεση με τις αντιδράσεις αυτο-μεθυλίωσης που πραγματοποιήθηκαν με την ίδια πρωτεΐνη (Εικόνα 10). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην επίδραση της ουρίας που επιφέρει μερική αποδιάταξη των πρωτεϊνών και πιθανή μείωση / απώλεια της ενεργότητας τους, ή στην απομάκρυνση ενός παράγοντα απαραίτητου για την ενεργότητα της πρωτεΐνης, ο οποίος απομακρύνεται κατά το διαχωρισμό στο πήκτωμα.

Η πιθανή ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης στον hTAFII80 θα πρέπει να εξακριβωθεί και να διαπιστωθούν υποστρώματα – στόχοι και πιθανή λειτουργικότητα τους *in vivo*.

5. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ

- Αναγνώριση της θέσης/ θέσεων ακετυλίωσης του hTAFII32 , μελέτη των *in vitro* αλληλεπιδράσεων του με τους μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρά (p53, HNF4 και hTAFII80) και επίδραση της ακετυλίωσης στις αλληλεπιδράσεις αυτές. Η λειτουργικότητα της ακετυλίωσης του hTAFII32 θα διερευνηθεί με πειράματα παροδικής διαμόλυνσης σε HEK293 κύτταρα: η πρωτεΐνη αγρίου τύπου και πρωτεΐνη στην οποία έχουν αντικατασταθεί τα αμινοξέα που υπόκεινται σε ακετυλίωση θα απομονώνονται με ανοσοκατακρήμνιση (με την έκφραση ειδικού επιτόπου θα είναι δυνατός ο διαχωρισμός των hTAFII32 από τον αντίστοιχο ενδογενές παράγοντα των κυττάρων) ώστε να μελετηθεί η ενσωμάτωση του hTAFII32 στο TFIIDα και β, TFTC και STAGA. Με πειράματα παροδικής διαμόλυνσης θα εξεταστεί επίσης η ικανότητα του αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων ως προς τη θέση ακετυλίωσης hTAFII32 να ενεργοποιούν την μεταγραφή υποκινητών που υπόκεινται στον έλεγχο των μεταγραφικών παραγόντων p53 και HNF4.

- Αναγνώριση της θέσης μεθυλίωσης hTAFII30 από το SUV39H1, δημιουργία κυτταρικών σειρών HeLa που εκφράζουν για την αγρίου τύπου πρωτεΐνη και πρωτεΐνη που φέρει αντικατάσταση του αμινοξέος μεθυλίωσης από hSET7 και SUV39H1, με ειδικό επίτοπο HA. Απομόνωση με ανοσοκατακρήμνιση για τον επίτοπο HA του παράγοντα hTAFII30 wt καθώς και των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών ώστε να μελετηθεί η ενσωμάτωσή τους στα σύμπλοκα TFIIDβ, TFTC και STAGA. Έλεγχος της αλληλεπίδρασης του hTAFII30 wt και των mutants να αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα του οιστρογόνου και της βιταμίνης D3 *in vitro* και *in vivo* πειράματα ελέγχου της μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων στόχων των υποδοχέων, στις κυτταρικές σειρές που εκφράζουν για το HA- hTAFII30. Με πειράματα *in vitro* μεταγραφής θα διερευνηθεί η ικανότητα του συμπλόκου TFIIDβ να ενεργοποιεί τη μεταγραφή, σε παρουσία / απουσία της μεθυλίωσης του hTAFII30. Παράλληλα, σε κυτταρική σειρά που έχει αφαιρεθεί το ενδογενές γονίδιο hTAFII30 και παρουσιάζει φαινότυπο lethal θα διερευνηθεί η ικανότητα του παράγοντα hTAFII30 από τον οποίο απουσιάζει η θέση μεθυλίωσης, να αναστρέψει το φαινότυπο αυτό.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Weil, P. A., Luse, D. S., Segall, J., and Roeder, R. G. (1979). Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* **18**, 469–484.
2. Matsui, T., Segall, J., Weil, P. A., and Roeder, R. G. (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* **255**, 192–196.
3. Davison, B. L., Egly, J. M., Mulvihill, E. R., and Chambon, P. (1983). Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences. *Nature* **301**, 680–686.
4. Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P. A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* **56**, 549–561.
5. Roeder, R. G. (1991). The complexities of eukaryotic transcription initiation: Regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 402–408.
6. Zawel, L., and Reinberg, D. (1995). Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 533–561.
7. Zhou, Q., Lieberman, P. M., Boyer, T. G., and Berk, A. J. (1992). Holo-TFIID supports transcriptional stimulation by diverse activators and from a TATA-less promoter. *Genes Dev.* **6**, 64–74.
8. Pugh, B. F., and Tjian, R. (1991). Transcription from a TATAless promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev.* **5**, 1935–1945.
9. Wiczeorek, E., Brand, M., Jacq, X., and Tora, L. (1998). of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription RNA polymerase II. *Nature* **393**, 187–191.
10. Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P., and Tora, L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation estrogen receptor. *Cell* **79**, 107–117.
11. Chen, J. L., Attardi, L. D., Verrijzer, C. P., Yokomori, Tjian, R. (1994). Assembly of recombinant TFIID differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell* **79**, 93–105.
12. Oelgeschlager, T., Chiang, C. M., and Roeder, R. G. (1996). Topology and reorganization of a human TFIID–promoter complex. *Nature* **382**, 735–738.
13. Mengus, G., May, M., Carre, L., Chambon, P., and Davidson, I. (1997). Human TAF(II)135 potentiates transcriptional activation by the AF-2s of the retinoic acid, vitamin D3, and thyroid hormone receptors in mammalian cells. *Genes Dev.* **11**, 1381–1395.
14. May, M., Mengus, G., Lavigne, A.-C., Chambon, P., and Davidson, I. (1996). Human TAFII28 promotes transcriptional stimulation by activation function 2 of the retinoid X receptors. *EMBO J.* **15**, 3093–3104.
15. Jacq X, Brou C, Lutz Y, Davidson I, Chambon P, Tora L.(1996) Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell.* **79**(1):107-17.
16. Dikstein, R. *et al.* (1996) TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the base transcription factor RAP74. *Cell* **84**, 781–790
17. Pham, A.D. and Sauer, F. (2000) Ubiquitinactivating/ conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* **289**, 2357–2360

18. Mizzen, C.A. *et al.* (1996) The TAFII250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* **87**, 1261–1270
19. Apone, L. M., Virbasius, C. M., Reese, J. C., and Green, M. R. (1996). Yeast TAF(II)90 is required for cell-cycle progression through G2/M but not for general transcription activation. *Genes Dev.* **10**, 2368–2380.
20. Walker, S. S., Shen, W. C., Reese, J. C., Apone, L. M., and Green, M. R. (1997). Yeast TAF(II)145 required for transcription of G1/S cyclin genes and regulated by the cellular growth state. *Cell* **90**, 607–614.
21. Sekiguchi, T., Nohiro, Y., Nakamura, Y., Hisamoto, N., and Nishimoto, T. (1991). The human CCG1 gene, essential for progression of the G1 phase, encodes a 210-kilodalton nuclear DNA-binding protein. *Mol. Cell Biol.* **11**, 3317–3325.
22. Gangloff YG, Romier C, Thuault S, Werten S, Davidson I. (2001) The histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID. *Trends Biochem Sci.* **26**(4):250-7. Review.
23. Hoffmann A, Chiang CM, Oelgeschlager T, Xie X, Burley SK, Nakatani Y, Roeder RG. (1996) A histone octamer-like structure within TFIID. *Nature.* **380**(6572), 356-9.
24. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* **389** (6648), 251-60.
25. Xie, X. *et al.* (1996) Structural similarity between TAFs and the heterotetrameric core of the histone octamer. *Nature* **380**, 316–322
26. Ogryzko VV, Kotani T, Zhang X, Schiltz RL, Howard T, Yang XJ, Howard BH, Qin J, Nakatani Y. (1998) Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* **94**(1), 35-44.
27. Catherine Birck, Olivier Poch, Christophe Romier, Marc Ruff, Gabrielle Mengus, Anne-Claire Lavigne, Irwin Davidson, and Dino Moras (1998) Human TAF_{II}28 and TAF_{II}18 Interact through a Histone Fold Encoded by Atypical Evolutionary Conserved Motifs Also Found in the SPT3 Family *Cell* **94**, 239
28. Gangloff YG, Werten S, Romier C, Carre L, Poch O, Moras D, Davidson I. (2000) The human TFIID components TAF(II)135 and TAF(II)20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAF(II)68 heterodimerize to form histone-like pairs. *Mol Cell Biol.* **20**(1):340-51
29. Werten S, Mitschler A, Romier C, Gangloff YG, Thuault S, Davidson I, Moras D. (2002) Crystal structure of a subcomplex of human TFIID formed by TBP-associated factors hTAF4 (hTAF_{II}135) and hTAF12 (hTAF_{II}20). *J Biol Chem*
30. Leurent C, Sanders S, Ruhlmann C, Mallouh V, Weil PA, Kirschner DB, Tora L, Schultz P. (2002) Mapping histone fold TAFs within yeast TFIID. *EMBO J.* **21**(13), 3424-33.
31. Brand M, Leurent C, Mallouh V, Tora L, Schultz P. (1999) Three-dimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFTC. *Science.* **286**(5447):2151-3.
32. Brou, C., Chaudhary, S., Davidson, I., Lutz, Y., Wu, J., Egly, J. M., Tora, L., and Chambon, P. (1993). Distinct TFIID complexes mediate the effect of different transcriptional activators. *EMBO J.* **12**, 489–499.
33. Metzger D, Scheer E, Soldatov A, Tora L. (1999) Mammalian TAF(II)30 is required for cell cycle progression and specific cellular differentiation programmes. *EMBO J.* **18**(17):4823-34.

34. Dikstein, R., Zhou, S., and Tjian, R. (1996). Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFIII130. *Cell* **87**, 137–146.
35. Timmers, H. T. M., Meyers, R. E., and Sharp, P. A. (1992). Composition of transcription factor B-TFIID. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8140–8144.
36. Willy PJ, Kobayashi R, Kadonaga JT. (2000) A basal transcription factor that activates or represses transcription. *Science*. **290**(5493):982-5.
37. Bell B, Scheer E, Tora L. (2001) Identification of hTAF(II)80 delta links apoptotic signaling pathways to transcription factor TFIID function. *Mol Cell*. **8**(3):591-600.
38. Mitsiou DJ, Stunnenberg HG. (2000) TAC, a TBP-sans-TAFs complex containing the unprocessed TFIIAalpha precursor and the TFIIA gamma subunit. *Mol Cell*. **6**(3):527-37.
39. Soutoglou E, Talianidis I. (2002) Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science*. **295**(5561):1901-4.
40. Wiczorek, E., Brand, M., Jacq, X., and Tora, L. (1998). Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature* **393**, 187–191.
41. Yanagisawa J, Kitagawa H, Yanagida M, Wada O, Ogawa S, Nakagomi M, Oishi H, Yamamoto Y, Nagasawa H, McMahon SB, Cole MD, Tora L, Takahashi N, Kato S. (2002) Nuclear receptor function requires a TFTC-type histone acetyl transferase complex. *Mol Cell*. **9**(3):553-62.
42. Ernest Martinez, Tapas K. Kundu, Jack Fu, and Robert G. Roeder A Human SPT3-TAF_{II}31-GCN5-L Acetylase Complex Distinct from Transcription Factor IID J Biol Chem, Vol. 273, Issue 37, 23781-23785, September 11, 1998
43. Ernest Martinez, Vikas B. Palhan, Agneta Tjernberg, Elena S. Lyman, Armin M. Gamper, Tapas K. Kundu, Brian T. Chait, and Robert G. Roeder (2001) Human STAGA Complex Is a Chromatin-Acetylating Transcription Coactivator That Interacts with Pre-mRNA Splicing and DNA Damage-Binding Factors In Vivo *Mol. Cell. Biol.* **21**: 6782-6795.
44. Graham FL, van der Eb AJ. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human Adenovirus 5. *Virology*. **54**(2):536-9.
45. Soutoglou E, Papafotiou G, Katrakili N, Talianidis I. (2000) Transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor-1 requires synergism between multiple coactivator proteins. *J Biol Chem*. **275**(17):12515-20.
46. Soutoglou E, Katrakili N, Talianidis I. (2000) Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol Cell*. **5**(4):745-51
47. James E. Brownell, Jianxin Zhou, Tamara Ranalli, Ryuji Kobayashi, Diane G. Edmondson, Sharon Y. Roth, and C. David Allis (1996) Tetrahymena Histone Acetyltransferase A: A Homolog to Yeast Gcn5p Linking Histone Acetylation to Gene Activation *Cell* **84**: 843.
48. Anne-Claire Lavigne, Yann-Gaël Gangloff, Lucie Carré, Gabrielle Mengus, Catherine Birck, Olivier Poch, Christophe Romier, Dino Moras, and Irwin Davidson (1999) Synergistic Transcriptional Activation by TATA-Binding Protein and hTAF_{II}28 Requires Specific Amino Acids of the hTAF_{II}28 Histone Fold *Mol. Cell. Biol.* **19**: 5050-5060
49. Shelly K. Galasinski, Tricia N. Lively, Alexandra Grebe de Barron, and James A. Goodrich (2000) Acetyl Coenzyme A Stimulates RNA Polymerase II Transcription and Promoter Binding by Transcription Factor IID in the Absence of Histones *Mol. Cell. Biol.* **20**: 1923-1930

50. Jenuwein T, Allis CD. (2001) Translating the histone code. *Science*. **293**(5532):1074-80. Review.
51. Rice JC, Allis CD. (2001) Code of silence. *Nature*. **414**(6861):258-61.
52. Grunstein M. (1998) Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell*. **93**(3):325-8. Review.
53. Geronze A, Weissman JD, Singer DS. (2001) TAFII55 binding to TAFII250 inhibits its acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(22):12432-7.
54. Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. **406**(6796):593-9.
55. NBannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromodomain. *Nature*. **410**(6824):120-4.
56. Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE, Kouzarides T. (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*. **412**(6846):561-5.
57. Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Borchers C, Tempst P, Zhang Y. (2001) Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell* **8**(6):1207-17.
58. Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D. (2002) Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev*. **16**(4):479-89.
59. Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y. Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J Biol Chem*. **276**(27):25309-17.
60. Frontini M, Imbriano C, diSilvio A, Bell B, Bogni A, Romier C, Moras D, Tora L, Davidson I, Mantovani R. (2002) NF-Y recruitment of TFIID, multiple interactions with histone fold TAF(II)s. *J Biol Chem*. **277**(8):5841-8.
61. Noma K, Allis CD, Grewal SI. (2001) Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science*. **293**(5532):1150-5.
62. Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. **419**(6905):407-11.
63. Gangloff YG, Sanders SL, Romier C, Kirschner D, Weil PA, Tora L, Davidson I. (2001) Histone folds mediate selective heterodimerization of yeast TAF(II)25 with TFIID components yTAF(II)47 and yTAF(II)65 and with SAGA component ySPT7. *Mol Cell Biol*. **21**(5):1841-53.