

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ**

Διδακτορική διατριβή

**ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ TAF10 ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ**

Αντιγόνη Κουσκούτη

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2005

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Μοριακής Βιολογίας Θηλαστικών του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας υπό την επίβλεψη του Ι. Ταλιανίδη, Ερευνητή Α΄ στα πλαίσια του διατμηματικού προγράμματος «Μοριακής Βιολογίας και Βιοϊατρικής» του τμήματος Βιολογίας και της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας.

Συμβουλευτική Επιτροπή

Ι. Ταλιανίδης, Ερευνητής Α΄ (IMBB)

Ι. Παπαματθαϊάκης, Καθηγητής Α΄ Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)
(Υπεύθυνος Καθηγητής)

Γ. Χαλεπάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Εξεταστική Επιτροπή

Ι. Ταλιανίδης, Ερευνητής Α΄ (IMBB)

Ι. Παπαματθαϊάκης, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Γ. Χαλεπάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Χ. Σαββάκης, Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ν. Πανόπουλος, Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Δ. Αλεξανδράκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Χ. Δελιδάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)

Δ. Καρδάσης, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ι. Ταλιανίδη για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω αυτή τη διατριβή, την επιστημονική του βοήθεια και την υποστήριξη και την ενθάρρυνση. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου τη Νίτσα, τον Κώστα, την Αγγελική, τον Παντελή και την Εύη, τη Γιάννα, τον Gergely, την Καλλιόπη, τη Μαριάννα και την Ειρήνη για την άριστη συνεργασία. Ειδική μνεία οφείλω στην Ειρήνη Κυρμιζή για τη βοήθειά και την κατανόηση της, υπήρξε πολύτιμη φίλη. Ευχαριστώ τη Τζένη, το Νίκο και την Carine που βρέθηκαν κοντά μου, τις φίλες μου Χρύσα, Φωτεινή και Άντα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς και επταμελούς επιτροπής τους διδακτορικού.

Αφιερώνω αυτό το διδακτορικό στους γονείς μου και την αδελφή μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία απαρτίζεται από δυο διακριτές ενότητες, στο πρώτο μέρος της αναγνωρίζεται ο πρώτος μεταγραφικός παράγοντας που υπόκειται σε μεθυλίωση λυσίνης από ένζυμο που ήταν γνωστό ότι ενεργοποιεί τη μεταγραφή μέσω μεθυλίωσης ιστονών, ενώ στο δεύτερο μέρος αναλύονται οι τροποποιήσεις που χαρακτηρίζουν τα ενεργά γονίδια και γίνεται μια προσπάθεια διερεύνησης της λειτουργίας τους ως «μνήμη» των κυττάρων για μαρκάρισμα των χρωματινικών περιοχών, ανάλογα με τη μεταγραφική ενεργότητά τους. Αναλυτικότερα:

A. Η πρώτη ενότητα περιλαμβάνει την αναγνώριση του TAF10 ως υπόστρωμα μεθυλίωσης από τη SET9. Η SET9 ήταν γνωστό ότι μεθυλιώνει την ιστόνη 3 και αυτή η τροποποίηση παρουσιάζεται σε μεταγραφικά ενεργά γονίδια, αν και οι ιστόνες που βρίσκονται πακεταρισμένες σε νουκλεοσώματα δεν μπορούν να μεθυλιωθούν από το ένζυμο. Στην εργασία αυτή φαίνεται ότι το TAF10 μόνο-μεθυλιώνεται από τη SET9, η τροποποίηση εκείνη έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη αλληλεπίδραση με RNA πολυμεράση II και μπορεί να ενισχύσει την επαγόμενη από ορισμένους μόνο ενεργοποιητές μεταγραφή. Πειράματα συμπληρωματικότητας σε κύτταρα F9 στα οποία το ενδογενές γονίδιο TAF10 έχει αδρανοποιηθεί έδειξαν ότι η μεθυλίωση του παράγοντα δεν είναι απαραίτητη για τη βιωσιμότητα των κυττάρων, αλλά χρειάζεται για το μέγιστο της μεταγραφής ορισμένων μόνο εκ των γονιδίων που ρυθμίζονται από τον παράγοντα.

B. Η δεύτερη ενότητα περιλαμβάνει την ανάλυση των τροποποιήσεων ιστονών στον υποκινητή και την κωδική περιοχή τριών μεταγραφόμενων ηπατικών γονιδίων, σε κύτταρα που τα γονίδια εκείνα εκφράζονται, σε κύτταρα που έχουν σταματήσει στη μίτωση και σε κύτταρα των οποίων η μεταγραφή έχει σταματήσει λόγω παρουσίας α-αμανιτίνης. Η μεταγραφική ενεργοποίηση συσχετιζόταν με εντοπισμένη ακετυλίωση ιστονών, H3-K4 και K79 δι-μεθυλίωση και H3-K4 τρι-μεθυλίωση καθώς επίσης και με αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στο 5' άκρο της κωδικής περιοχής. Η μόνο-μεθυλίωση της H3-K4 παρατηρήθηκε σε τμήματα που βρίσκονται στο μέσο της κωδικής περιοχής των γονιδίων. Οι ακετυλάσες CBP, PCAF και οι παράγοντες αναδιαμόρφωσης χρωματίνης Brg-1, SNF2H και FACT εντοπίστηκαν στο 5' άκρο της κωδικής περιοχής, η ακετυλάση του συμπλόκου επιμήκυνσης της μεταγραφής Elp3, καταρροϊκά της περιοχής με τα υπερακετυλιωμένα νουκλεοσώματα, ενώ η

σύνδεση εκείνη των παραγόντων ήταν ειδική για κάθε γονίδιο. Τόσο οι ακετυλάσες όσο και οι παράγοντες αναδιαμόρφωσης χρωματίνης και η RNA-πολυμεράση II αποσυνδέονταν από τη χρωματίνη κατά τη μίτωση και τη διακοπή της μεταγραφής με α-αμανιτίνη, ενώ οι τροποποιήσεις παρέμεναν σταθερές στα κύτταρα που εκφράζονταν τα γονίδια αλλά και κατά τη διακοπή της μεταγραφής. Στα μιτωτικά κύτταρα οι τιμές των τροποποιήσεων των ιστονών παρέμεναν σταθερές στα πατρικά νουκλεοσώματα και ξαναδημιουργούνταν στο μέγιστο αμέσως μετά την έξοδο από τη μίτωση και την είσοδο στην επόμενη G1 φάση. Η εργασία αυτή δείχνει ότι οι τροποποιήσεις ιστονών μπορεί να λειτουργούν ως χαρακτηριστικά γνωρίσματα της χρωματίνης για το μαρκάρισμα των περιοχών και τη μετάδοση του μεταγραφικού δυναμικού στις επόμενες κυτταρικές γενιές.

SUMMARY

SET9 is a member of the SET domain-containing histone methyltransferase family that can specifically methylate histone-3 at lysine 4 position. Although nucleosomal histones are poor substrates for SET9, the active enzyme can stimulate activator-induced transcription. In the first part of this study, it is shown that SET9 can monomethylate the TBP-associated factor TAF10 at a single lysine residue located at the loop-2 region within the putative histone-fold domain of the protein. Methylated TAF10 has an increased affinity for RNA polymerase II, pointing to a direct role of this modification in preinitiation complex formation. Reporter assays and studies on TAF10-null F9 cells expressing a methylation-deficient TAF10 mutant revealed that SET9-mediated methylation of TAF10 potentiates transcription of some, but not all TAF10-dependent genes. This gene specificity correlated with SET9 recruitment. The promoter-specific effects of SET9-methylated TAF10 may have important implications regarding the biological function of SET domain-containing lysine methylases, whose primary targets have been presumed to be histones.

In the second part various histone modifications are examined across the promoter and the coding regions of constitutively active hepatic genes in G0/G1-enriched, mitotically arrested and α -amanitin-blocked cells. Gene activation correlated with localized histone hyperacetylation, H3-K4 tri- or di-methylation and H3-K79 dimethylation and localized nucleosome remodeling at the promoter and the 5' portion of the coding regions. Nucleosomes at more downstream locations were mono-methylated at H3-K4. CBP, PCAF, Brg-1, SNF2H and FACT were recruited to the coding regions in a gene-specific manner, in a similarly restricted promoter-proximal pattern. Elongator, however, associated with the more downstream regions. While all factors were dissociated from the chromatin after transcriptional inactivation by α -amanitin, the histone modifications remained stable. In mitotic cells, histone modifications on parental nucleosomes were preserved and were re-generated in a transcription-dependent manner at the newly-deposited nucleosomes, as the cells entered the next G1 phase. The findings suggest that histone modifications may function as molecular memory bookmarks for previously active locations of the genome, thus contributing to the maintenance of active chromatin states through cell division.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
Δομή της χρωματίνης	10
Μεταγραφική ρύθμιση	11
Ο κώδικας των ιστονών.....	12
Ακετυλάσες ιστονών (Histone Acetyltransferases-HATS).....	144
Αποακετυλάσες ιστονών (Histone Deacetylases-HDACS)	1919
Μεθυλάσες ιστονών (Histone Methyltransferases-HMTS)	20
Μεθυλάσες των αμινοξέων λυσίνης των ιστονών	21
Παράγοντες αναδιαμόρφωσης χρωματίνης με την κατανάλωση ATP	23
Διαβάζοντας τον κώδικα των ιστονών	24
Το σύμπλοκο TFIID.....	28
Λειτουργίες των TAFIIs	28
Περιοχές ομολογίας TAFIIs με τις ιστόνες	29
Σύμπλοκα που περιλαμβάνουν TAFIIs	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	34
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
Ο παράγοντας TAF10 μεθυλιώνεται in vitro και in vivo από τη SET9 και ενσωματώνεται στο σύμπλοκο του TFIID.	37
Ο ανθρώπινος παράγοντας TAF10 που δεν μεθυλιώνεται μπορεί να υποκαταστήσει την αγρίου τύπου πρωτεΐνη και να διασώσει το φαινότυπο εμβρυϊκών κυττάρων καρκινώματος.....	41
Η μεθυλίωση του TAF10 αποτελεί μέρος του μηχανισμού δράσης της SET9 για την ενίσχυση της μεταγραφής	45
Η μεθυλίωση του TAF10 από τη SET9 έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη αλληλεπίδραση με την RNA-πολυμεράση II.....	46
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	53

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	54
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	57
Εντοπισμένες τροποποιήσεις ιστονών στο 5΄ άκρο της κωδικής περιοχής ενεργών ηπατικών γονιδίων, οι οποίες παραμένουν και μετά από μεταγραφική και μιτωτική αδρανοποίηση.....	57
Αλλαγές στη δομή της χρωματίνης στη 5΄ κωδική περιοχή, οι οποίες εξαρτώνται από την παρουσία μεταγραφής.....	64
Στρατολόγηση των ακετυλασών ιστονών και των ενζύμων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης στην 5΄ κωδική περιοχή των ενεργών γονιδίων, που είναι ειδική για κάθε γονίδιο.....	64
Πιθανός ρόλος των τροποποιήσεων ιστονών στη πρόσδεση ενζύμων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης και ακετυλασών με τη χρωματίνη	67
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	75
Εντοπισμένες τροποποιήσεις ιστονών και αναδιαμορφωμένη χρωματίνη στην κωδική περιοχή των ενεργών γονιδίων	75
Πολλαπλές τροποποιήσεις νουκλεοσωμάτων διακοσμούν τις περιοχές της ενεργής χρωματίνης.....	77
Ρόλος της μεταγραφής στη δημιουργία των τροποποιήσεων των ιστονών	79
Μνήμη πρόσφατης μεταγραφικής ενεργότητας.....	81
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	100

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Δομή της χρωματίνης

Η πολυπλοκότητα των ευκαρυωτικών οργανισμών καθορίζεται από τα πολυάριθμα διαφοροποιημένα κύτταρα που τα απαρτίζουν, ενώ η ταυτότητα του κάθε τύπου κυττάρων διαμορφώνεται από το διαφορετικό σύνολο των γονιδίων που εκφράζονται. Ένας από τους κύριους μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων επιτελείται στο επίπεδο της μεταγραφής.

Η γενετική πληροφορία είναι κωδικοποιημένη στο DNA, το οποίο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ξεπερνά τα 2m σε μήκος. Μέσα στον πυρήνα, η πληροφορία εκείνη βρίσκεται σε συμπαγή μορφή, καθώς το DNA υπόκειται σε διαδοχικό πακετάρισμα με πρωτεΐνες, με τελικό αποτέλεσμα την κατά εκατό χιλιάδες φορές σμίκρυνση του, σε σχέση με τη διάστασή του, διαμορφώνοντας έτσι μια νουκλεοπρωτεϊνική δομή που ονομάζεται χρωματίνη (Chakravarthy et al., 2005). Σε πρώτο επίπεδο οργάνωσης 1.67 υπερελικωμένες στροφές DNA, συνολικού μήκους 147bp, τυλίγονται γύρω από ένα δίσκο-πρωτεϊνών που απαρτίζεται από τις ιστόνες, αποτελώντας έτσι τον πυρήνα του νουκλεοσώματος. Το νουκλεόσωμα αποτελείται από δυο ετεροδιμερή των ιστονών H2A-H2B και ένα σταθερό τετραμερές των ιστονών H3-H4 (Luger et al., 1997; Richmond and Davey, 2003). Τα άκρα των ιστονών είναι ιδιαίτερα ευέλικτα και προεξέχουν από τη συμπαγή δομή του νουκλεοσώματος, φαίνεται όμως πως συμβάλλουν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νουκλεοσωμάτων (Luger et al., 1997) και στη δημιουργία των δευτερευόντων χρωματινικών δομών. Το κάθε νουκλεόσωμα συνδέεται με το διπλανό του με 10-60bp DNA που ονομάζεται linker, και η συστοιχία εκείνη των νουκλεοσωμάτων διαμορφώνει μια χρωματινική ίνα διαμέτρου 10nm. Η ιστόνη συνδέσμου, όπως έχει ονομαστεί η H1, βρίσκεται σε περιοχές linker DNA ανάμεσα στα νουκλεοσώματα και συντελεί στην περαιτέρω συμπύκνωση της συστοιχίας των νουκλεοσωμάτων σε μια ίνα διαμέτρου 30nm. Ακολουθεί μια σειρά πακεταρίσματος σε δευτερεύουσες χρωματινικές δομές, που καταλήγουν στη δημιουργία υπερδομών, όπως εκείνες των μεταφασικών χρωμοσωμάτων. Το πακετάρισμα του ευκαρυωτικού γονιδιώματος στον πυρήνα καθιστά το DNA δυσπρόσιτο για αναγνώριση των *cis* ρυθμιστικών στοιχείων και πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων σε αυτό.

Η χρωματίνη είχε θεωρηθεί παλαιότερα ως ένα ακίνητο αντικείμενο, που αναδομούνται μόνο κατά τη διαδικασία του διπλασιασμού και προφανώς, της μεταγραφής. Η εικόνα εκείνη της χρωματίνης έχει πλέον αντικατασταθεί από μια σύγχρονη, σύμφωνα με την οποία η χρωματίνη αποτελεί ένα ιδιαίτερα εύπλαστο υλικό που υφίσταται διαμερισματοποίηση στον πυρήνα, συμμετέχει ενεργά σε όλες τις διαδικασίες στις οποίες εμπλέκεται το DNA και αποτελεί δυναμικό υλικό της κυτταρικής μηχανής. Η ενεργή συμμετοχή της χρωματίνης στη μεταγραφή διαμορφώνεται τόσο από τη θέση αλλά και την ταυτότητα των ίδιων των νουκλεοσωμάτων καθώς έχει βρεθεί ότι οι ποικιλομορφίες των ιστονών και οι τροποποιήσεις που φέρουν παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες που τις συσχετίζουν με συγκεκριμένες λειτουργίες, αλλά και από την ενεργή συμμετοχή των παραγόντων αναδιαμόρφωσης και τροποποίησης χρωματίνης, όπως και των μεταγραφικών παραγόντων, παράμετροι για τις οποίες παρατίθενται πληροφορίες στις σελίδες που ακολουθούν.

Οι ενζυμικές ενεργότητες που μπορούν να προκαλέσουν αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μπορούν να διαχωριστούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες: εκείνες που με την κατανάλωση ATP, μπορούν και αλλάζουν τη σύνδεση DNA-ιστονών και εκείνες που αλλάζουν την αλληλεπίδραση DNA-ιστονών μέσω τροποποιήσεων των ουρών των ιστονών, παραδείγματα των οποίων θα αναφερθούν στη συνέχεια.

Μεταγραφική ρύθμιση

Ένας από τους κύριους μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων επιτελείται στο επίπεδο της μεταγραφής, μια πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία μεγάλα πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα στρατολογούνται διαδοχικά στις ρυθμιστικές αλληλουχίες του γονιδίου, όπως τους υποκινητές και τους ενισχυτές, με τελικό αποτέλεσμα, την έναρξη της μεταγραφής από την RNA-πολυμεράση II (Lemon and Tjian, 2000).

Οι παράγοντες που συμμετέχουν στην ενορχήστρωση της μεταγραφικής εκκίνησης από την RNA-πολυμεράση II είναι το TFIIA, TFIIIB, TFIIID που

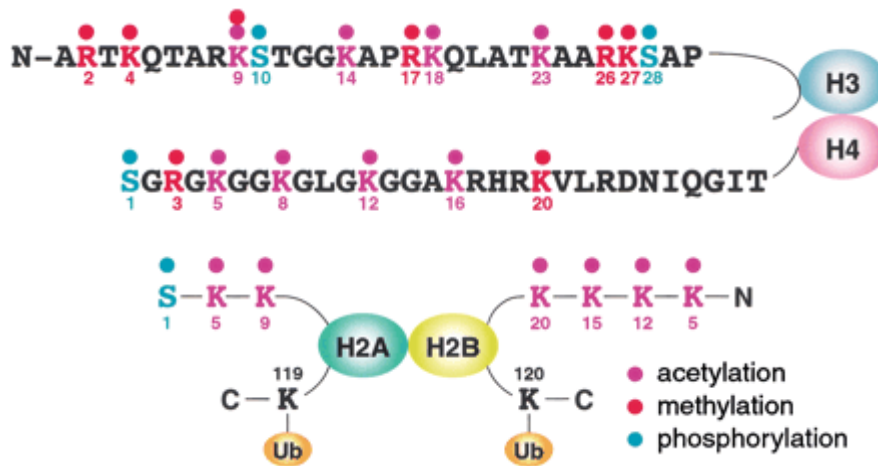
αναγνωρίζουν τις αλληλουχίες πρόσδεσης κοντά στον υποκινητή, όπως το TATA, το BRE (αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το TFIIB), τον εκκινητή (initiator-INR) και το DPE (downstream promoter element). Η πρόσδεση των TFIIE, TFIIIF, TFIIH και του διαμεσολαβητή (Mediator), που θεωρείται ότι μεταβιβάζει τα σήματα ανάμεσα στους παράγοντες του ενισχυτή και της βασικής μεταγραφικής μηχανής, όπως επίσης και των συμπλόκων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης επιφέρουν τελικά την χρονικά και τοπικά ελεγχόμενη μεταγραφή των γονιδίων (Lemon and Tjian, 2000; Orphanides and Reinberg, 2002).

Ο κώδικας των ιστονών

Η ιδέα ότι η χρωματίνη γενικότερα και ειδικά οι ουρές των ιστονών με τις τροποποιήσεις που φέρουν μπορεί να εμπεριέχουν κωδικοποιημένη πληροφορία που μεταβιβάζεται από κάθε κύτταρο στο θυγατρικό του, διαμορφώνοντας έτσι των κώδικα επιγενετικής (epigenetic code) ή την υπόθεση του κώδικα των ιστονών (histone code hypothesis) (Turner, 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Turner, 2002). όπως ονομάζεται, έχει προταθεί παλαιότερα, με αφορμή την μελέτη της ακετυλίωσης των αμινοτερματικών άκρων των ιστονών (Turner, 1998). Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών, στις οποίες περιλαμβάνονται η ακετυλίωση, η μεθυλίωση, η σουμοϋλίωση και η ουβικουΐτινιλίωση των αμινοξέων λυσίνης, η φωσφορυλίωση των καταλοίπων σερίνης-θρεονίνης αλλά και η μεθυλίωση αργινινών (Σχήμα 1) (Zhang and Reinberg, 2001; Kouzarides, 2002; Turner, 2000; Shii et al., 2003) θεωρείται ότι όχι μόνο συμμετέχουν στην οργάνωση της δομής του νουκλεοσώματος, αλλά και ότι εμπεριέχουν από μόνες τους ή σε συνδυασμό μεταξύ τους την πληροφορία για το μεταγραφικό δυναμικό μιας χρωματινικής περιοχής, το οποίο και μεταβιβάζουν στην επόμενη θυγατρική γενιά (Strahl and Allis, 2000; Turner, 2002). Οι τροποποιήσεις εκείνες των ιστονών δημιουργούνται από συγκεκριμένες ενζυμικές ενεργότητες και κάποιες τουλάχιστον από εκείνες αναγνωρίζονται από μη ιστονικές-πρωτεΐνες ή σύμπλοκα πρωτεϊνών.

Ενδείξεις ότι οι επιγενετικές αλλαγές μπορούν να μεταβιβάζονται κατά την ανάπτυξη σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς ήλθαν από πειράματα στον οργανισμό της

Drosophila melanogaster. Κατά τα πειράματα εκείνα χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά στοιχεία (Polycomb response element, PRE) του γονιδίου Fab-7, τα οποία ρυθμίζονται κατά την ανάπτυξη από τις πρωτεΐνες Polycomb (PcG) και trithorax (trxG), λειτουργώντας άλλοτε ως ενισχυτές και άλλοτε ως καταστολείς της έκφρασης των υποκείμενων γονιδίων (Lyko et al., 1999). Το ρυθμιστικό εκείνο στοιχείο PRE του Fab-7 τοποθετήθηκε πριν τη θέση πρόσδεσης (UAS) του ενεργοποιητή GAL4 ελέγχοντας έτσι την έκφραση του γονιδίου lacZ και mini-white και εντέθηκε στο γονιδίωμα της *Drosophila*. Η έκφραση των διαγονιδίων ελεγχόταν από το χρώμα των ματιών της *Drosophila*, το οποίο σε συνθήκες που δεν εκφραζόταν ο GAL4 ήταν κίτρινο, υποδηλώνοντας ότι χωρίς την έκφραση του ενεργοποιητή δεν παρουσιαζόταν έκφραση των γονιδίων της ένθεσης και το PRE του Fab-7 λειτουργούσε ως καταστολέας. Όταν οι μύγες εκείνες διασταυρώθηκαν με άτομα που εκφράζουν τον ενεργοποιητή GAL4 μετά από έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία (heat-shock promoter), διαπιστώθηκε ότι όταν στα έμβρυα επαγόταν η έκφραση του ενεργοποιητή GAL4 για 30 min τα άτομα εκείνα εκφράζανε τα γονίδια της ένθεσης, ακόμα και ως ενήλικα (Cavali et al., 1998). Αρκούσε δηλαδή μια παροδική έκφραση του ενεργοποιητή κατά την εμβρυϊκή ηλικία για να επαχθεί η μόνιμη έκφραση των διαγονιδίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι μάλλον οι επιγενετικές πληροφορίες είχαν μεταβιβαστεί κατά τη διαφοροποίηση, αν όμως η ενεργοποίηση εκείνη συνέβαινε σε μετέπειτα στάδια ανάπτυξης, η έκφραση των διαγονιδίων ήταν παροδική. Ιδιαίτερα όμως σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα θηλυκά άτομα τα οποία ενεργοποιήθηκαν με την παροδική έκφραση του ενεργοποιητή μπορούσαν να μεταβιβάσουν εκείνη την πληροφορία ακόμα και στους απογόνους τους (Cavali et al., 1998). Οι ερευνητές σε επόμενη μελέτη (Cavali et al., 1999) έδειξαν με πειράματα ανοσοσοφθορισμού, ότι η επαγωγή της έκφρασης του ενεργοποιητή GAL4 σε έμβρυα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ακετυλίωσης της H4 στην περιοχή με την ένθεση, ακόμα και σε λάρβες, ενώ δεν επιβεβαιώθηκε με την τεχνική εκείνη αν η υπερακετυλίωση της H4 μεταβιβάζεται.



Σχήμα 1. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών (Zhang and Reinberg., 2001)

Ακετυλάσες ιστονών (Histone Acetyltransferases-HATS)

Η ακετυλίωση των ιστονών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ανακαλύφθηκε εδώ και αρκετά χρόνια και η ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των ενζύμων που τη δημιουργούν έχει αποκαλύψει μια μεγάλη ποικιλομορφία τους σε διαφορετικούς οργανισμούς. Ακετυλάσες ιστονών (Histone Acetyltransferases-HATS) ονομάζονται οι παράγοντες εκείνοι που διαθέτουν την ενζυμική ενεργότητα μεταφοράς μιας ομάδας ακετυλίου από το ακέτυλο-συνένζυμο-A (acetyl-CoA) στη ε-αμινομάδα των αμινοξέων λυσίνης που συνήθως βρίσκονται στη βασική περιοχή του N-τελικού άκρου των ιστονών. Το σύνολο των ενζύμων HATS διακρίνονται σε δυο κατηγορίες : τύπου A (Brownell et al., 1996a), που βρίσκονται στον πυρήνα και τύπου B που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (Ruiz-Carrilo et al., 1975; Allis et al., 1985). Οι HATS τύπου B θεωρείται ότι καταλύουν την ακετυλίωση των νέο-συντιθέμενων πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα, ενώ οι HATS τύπου A θεωρείται ότι συμμετέχουν στη πυρηνική ακετυλίωση των ιστονών που σχετίζεται και με τη μεταγραφή.

Η ακετυλοτρανσφεράση τύπου B, HAT1 ανακαλύφθηκε στον σακχαρομύκητα (Kleff et al., 1995) και ακετυλιώνει τη λυσίνη 5 και 12 της ιστόνης 4 (H4) in vitro, αμινοξέα που ήταν γνωστό ότι βρίσκονται ακετυλιωμένα στη νεοσυντιθέμενη H4 (Chicoine et al., 1986). Το ένζυμο HAT1 αποτελεί μέρος ενός πολυπαραγοντικού συμπλόκου, ανάμεσα στις υπομονάδες του οποίου συμπεριλαμβάνονται και οι

πρωτεΐνες HAT2 και CAF1 που έχουν συνδεθεί με την αναδιαμόρφωση και τη συνάθροιση των συστατικών της χρωματίνης αντίστοιχα (Parthun et al., 1996; Kaufman et al., 1995). Παρά τον ιδιαίτερο ρόλο που έχει προσδοθεί στη HAT1, μεταλλαγή της ή της HAT2 δεν παρουσίασαν προβλήματα στην ενσωμάτωση της H4 στη χρωματίνη (Parthun et al., 1996) γεγονός που δείχνει ότι η δράση της μπορεί και αντικαθίσταται από άλλα ένζυμα όταν η HAT1 απουσιάζει ή δεν μπορεί να δράσει.

Από τα καλύτερα μελετημένα παραδείγματα ακετυλασών αποτελούν εκείνα της οικογένειας GNAT, όνομα το οποίο προκύπτει από τα αρχικά Gcn5-συσχετιζόμενες N-Ακετυλοτρανσφεράσες (Gcn5-related N-acetyltransferase). Τα μέλη της ομάδας εκείνης έχουν προκύψει μετά από την κατάταξη των ενζύμων με βάση την ομοιότητα των περιοχών ομολογίας και του μοτίβου των αμινοξέων που αναγνωρίζουν για ακετυλίωση. Τα ένζυμα που είναι ιδιαίτερα γνωστά και υπάγονται σε αυτή την κατηγορία είναι το Gcn5 και το ομόλογό του στα θηλαστικά PCAF, η Elp3 και Hpa2.

Το Gcn5 ήταν η πρώτη πρωτεΐνη που αναγνωρίστηκε ως ακετυλάση τύπου A που σχετίζεται με τη μεταγραφή στον οργανισμό *Tetrahymena thermophila* (Brownell et al., 1996b). Όταν πραγματοποιήθηκε αντίδραση ακετυλίωσης σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με πυρηνικά εκχυλίσματα φάνηκε ότι μια πρωτεΐνη παρουσίαζε ενεργότητα ακετυλίωσης έναντι ελευθέρων ιστονών (Brownell et al., 1995), η οποία ταυτοποιήθηκε ως ομόλογη του συν-ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα, Gcn5 (Georgakopoulos et al., 1992). Πρωτεΐνες ομόλογες του Gcn5 έχουν ταυτοποιηθεί και σε άλλους οργανισμούς, όπως στον άνθρωπο (Candau et al., 1996), το ποντίκι (Xu et al., 1998), *Schizosaccharomyces pombe* και *Drosophila melanogaster* (Smith et al., 1998) κα. Οι λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης Gcn5 έχουν χαρακτηριστεί και αναλυθεί και οι κυριότερες είναι η bromodomain, η περιοχή αλληλεπίδρασης με το Ada2 και η περιοχή ενζυμικής ενεργότητας HAT (Candau et al., 1997). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη Gcn5 έχει δείχτει ότι *in vitro* μπορεί να ακετυλιώνει ισχυρά την ιστόνη 3 (H3) και την ιστόνη 4 (H4) ασθενώς, όταν εκείνες βρίσκονται ελεύθερες, ενώ τα κύρια αμινοξέα που υπόκεινται σε ακετυλίωση είναι η λυσίνη 18 για την H3 και οι λυσίνες 8 και 16 για την H4 (Kuo et al., 1996). Παρόλο που η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη μπορεί και ακετυλιώνει ελεύθερες ιστόνες, δεν μπορεί να ακετυλιώνει ιστόνες νουκλεοσωμάτων (Kuo et al., 1996), παρά μόνο όταν βρίσκεται στο σύμπλοκο SAGA ή ADA.

Στα θηλαστικά, ποντίκι και άνθρωπο υπάρχουν δυο ακετυλοτρανσφεράσες που είναι ομόλογες του Gcn5 του σακχαρομύκητα, το hGcn5 και ο παράγοντας που προσδένεται με το p300/CBP, PCAF. Οι πρωτεΐνες hGcn5 και PCAF παρουσιάζουν ισχυρό βαθμό ομολογίας και έχει βρεθεί ότι όμοια με το Gcn5 του σακχαρομύκητα το hGcn5 μπορούν και λειτουργούν ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές (Candau et al., 1996). Στον άνθρωπο υπάρχουν δυο μορφές του hGcn5 ως αποτέλεσμα της εναλλακτικής συρραφής των εξωνίων του και η πρώτη μορφή της πρωτεΐνης που κλωνοποιήθηκε δεν έφερε το απομακρυσμένο N-τελικό άκρο, και αργότερα έγινε γνωστή ως short- hGcn5 (Xu et al., 1998). Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη short- hGcn5 παρουσιάζει ενεργότητα ακετυλίωσης της H3 και ασθενώς της H4 ενώ η πλήρης πρωτεΐνη με το N-τελικό άκρο μπορεί και ακετυλιώνει και νουκλεοσώματα (Xu et al., 1998).

Ο παράγοντας PCAF ή P/CAF ταυτοποιήθηκε και απομονώθηκε με αφορμή την ομολογία που παρουσίαζε ως προς το Gcn5 και βρέθηκε να προσδένεται στο p300/CBP και να λειτουργεί ως συνενεργοποιητής στη μεταγραφική ενεργοποίηση. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη μπορεί και ακετυλιώνει τόσο ελεύθερες όσο και νουκλεοσωμικές ιστόνες (Schiltz et al., 1999), κυρίως τη λυσίνη 14 της H3 και λιγότερο τη λυσίνη 8 της H4 (Yang et al., 1996). Ιδιαίτερα σημαντικό είναι ότι το PCAF αλληλεπιδρά με το p300/CBP στην ίδια περιοχή στην οποία προσδένεται και η πρωτεΐνη του αδενοϊού E1A και όπως φάνηκε με πειράματα παροδικής διαμόλυνσης το PCAF μπορεί και αναστέλλει τη μιτογόνο δράση της E1A, εμποδίζοντας τον κυτταρικό κύκλο μέσω ανταγωνισμού για τη θέση πρόσδεσης στο p300/CBP (Yang et al., 1996). Η δράση του PCAF κατά τη μεταγραφή έχει μελετηθεί στη μυογένεση (Puri et al., 1997), στην επαγόμενη από πυρηνικούς υποδοχείς ενεργοποίηση (Korzus et al., 1998) κ.α. Σημαντικό ρόλο επίσης διαδραματίζει η δράση του PCAF στη μεταγραφή λόγω ακετυλίωσης των μεταγραφικών παραγόντων.

Πολλές από τις πρωτεΐνες με ενεργότητα HAT μπορούν και ακετυλιώνουν τις ελεύθερες ιστόνες όταν χρησιμοποιούνται *in vitro*, ενώ κάποιες επίσης όπως το Gcn5, δεν μπορούν να ακετυλιώνουν το φυσιολογικό τους υπόστρωμα όπως είναι οι νουκλεοσωμικές ιστόνες, παρά μόνο όταν βρίσκονται σε σύμπλοκο με άλλους παράγοντες, που φαίνεται ότι είναι απαραίτητοι για την ενεργότητά τους. Στον σακχαρομύκητα υπάρχουν 4 μεγαλομοριακά σύμπλοκα που έχουν αναλυθεί εκτενώς και ακετυλιώνουν ιστόνες, τα οποία είναι το SAGA, ADA, NuA4 και NuA3. Το

σύμπλοκο SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase) είναι μεγέθους 1.8 MDa, αποτελείται από 15 τουλάχιστον υπομονάδες και εμπεριέχει 4 τουλάχιστον κατηγορίες παραγόντων που παίζουν ρόλο στη μεταγραφή: τις πρωτεΐνες Ada, τους παράγοντες Spt, μέρος των παραγόντων TAFIIs, που συνδέονται με το TBP και την πρωτεΐνη Tra1, ομόλογη εκείνης του ανθρώπου TRRAP (Grant et al., 1998a; Grant et al., 1998b; Saleh et al., 1998).

Στον άνθρωπο έχουν απομονωθεί δυο σύμπλοκα από κύτταρα HeLa, που έχουν όμοια σύσταση υπομονάδων με εξαίρεση την παρουσία διαφορετικών ακετυλασών: εκείνο που περιέχει το Gcn5 και εκείνο με ενεργότητα ακετυλάσης το PCAF (Ogryzko et al., 1998). Από τα δυο εκείνα σύμπλοκα εκείνο που περιλαμβάνει το PCAF έχει μελετηθεί περισσότερο και έχει αποδειχτεί ότι οι 11 από τις υπομονάδες που περιέχει αποτελούν πρωτεΐνες ομόλογες με εκείνες του συμπλόκου SAGA του σακχαρομύκητα (Ogryzko et al., 1998; Vassilev et al., 1998).

Μετά την ανακάλυψη των hGcn5 και PCAF ο ρόλος των ακετυλασών στη μεταγραφή ενισχύθηκε με την απόδειξη ότι δυο ακόμα γνωστοί συν-ενεργοποιητές της μεταγραφής, είναι ακετυλάσες, το p300 και το ομόλογό του CBP (CREB-binding protein) (Ogryzko et al., 1996). Οι παράγοντες p300 και CBP είναι δομικά και λειτουργικά ομόλογοι και συχνά αναφέρονται σαν μια οντότητα p300/CBP. Το p300/CBP εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση (Giordano et al., 1999) ενώ μεταλλαγές του CBP συσχετίζονται με καρκίνο και με άλλες ασθένειες (Giles et al., 1998). Ο p300/CBP ενεργοποιεί τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων αλληλεπιδρώντας με συμπαράγοντες ή με μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στο DNA όπως ο CREB, οι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών κ.α. καθώς επίσης και με την ογκοπρωτεΐνη του αδενοϊού E1A (Yang et al., 1996). Εκτός από την ενζυμική περιοχή HAT και τις περιοχές αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς παράγοντες και συν-ενεργοποιητές, ο p300/CBP διαθέτει επίσης και την περιοχή bromodomain, όπως και οι ακετυλάσες Gcn5, PCAF και TAF1(TAF250). In vitro αντιδράσεις των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών p300/CBP έδειξαν ότι μπορεί να ακετυλιώνει όλες τις ιστόνες με μικρή ειδικότητα, τόσο όταν εκείνες βρίσκονται ελεύθερες, όσο και όταν βρίσκονται πακεταρισμένες σε νουκλεοσώματα. Η ακετυλάση p300/CBP αντιπροσωπεύει μια μοναδική τάξη των ενζύμων ακετυλίωσης, αν και τα λειτουργικά μοτίβα της πρωτεΐνης σχετίζονται με τα γνωστά ένζυμα της

οικογένειας τα οποία έχει βρεθεί πως είναι απαραίτητα για την ενζυμική ενεργότητα (Martinez-Balbas et al., 1998).

Μια ακόμα ακετυλοτρανσφεράση που υπάγεται στην κατηγορία των ενζύμων GNAT είναι και η τύπου A ακετυλάση E1p3, η οποία αποτελεί υπομονάδα του συμπλόκου επιμήκυνσης της μεταγραφής (Otero et al., 1999). In vitro αντιδράσεις ακετυλίωσης έδειξαν ότι η E1p3, που έχει απομονωθεί από κύτταρα εντόμων, μπορεί και ακετυλιώνει και τις 4 ιστόνες (Wittschieben et al., 1999). Θεωρείται ότι η E1p3 διευκολύνει τη μεταγραφή, καθώς ταξιδεύοντας μαζί με το σύμπλοκο επιμήκυνσης της μεταγραφής και την RNA-πολυμεράση II μπορεί να ακετυλιώνει τις ιστόνες και να ανοίγει τη χρωματινική δομή. Ο ρόλος όμως αυτός του συμπλόκου επιμήκυνσης της μεταγραφής είχε αμφισβητηθεί, καθώς πειράματα ανοσοφθορισμού είχαν ανιχνεύσει την πρωτεΐνη μόνο στο κυτταρόπλασμα (Kim et al, 2002; Pokholok et al, 2002). Δημιουργία όμως νέων αντισωμάτων έδειξε ότι το σύμπλοκο επιμήκυνσης βρίσκεται στον πυρήνα και συνδέεται με το νέο-παραγόμενο RNA από την RNA-πολυμεράση II, εγκαθιδρύοντας το ρόλο του συμπλόκου εκείνου στη μεταγραφική επιμήκυνση (Gilbert et al, 2004).

Μια ακόμα οικογένεια ακετυλασών που έχει βρεθεί είναι εκείνη των MYST, που διαμορφώθηκε και ονομάστηκε από την ισχυρή ομοιότητα στην αλληλουχία των πρωτεϊνών MOZ, Ybf/Sas3, Sas2 και Tip60 (Borrow et al., 1996). Νεότερα μέλη της οικογένειας MYST που ανακαλύφθηκαν αργότερα αποτελούν και η Esa1 του σακχαρομύκητα, η MOF της δροσόφιλα και οι ανθρώπινες HBO1 και MORF (Neuwald et al., 1997).

Ακόμα μια ένδειξη για τον ισχυρό συσχετισμό της μεταγραφικής ενεργοποίησης και της ακετυλίωσης ιστονών πραγματοποιήθηκε όταν ανακαλύφθηκε ότι η μεγαλύτερη υπομονάδα του συμπλόκου των παραγόντων που συνδέονται με το TBP (TBP Associated factors-TAFs), TAF1-TAF250, διαθέτει ενζυμική ενεργότητα ακετυλίωσης ιστονών (Mizzen et al., 1996). Το σύμπλοκο TFIID μπορεί και προσδέεται στο DNA μέσω του παράγοντα TBP που αναγνωρίζει ειδικές αλληλουχίες, αν και έχει δείχτεί ότι ακόμα και TFIID που δεν φέρει TBP μπορεί και επάγει βασική μεταγραφή in vitro (Verrijzer and Tjian, 1996). Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης του συμπλόκου TFIID από ανθρώπινα κύτταρα έδειξε ότι μια υπομονάδα μεγέθους 250kD διαθέτει ενεργότητα ακετυλίωσης ιστονών (Mizzen et al., 1996). Περαιτέρω ανάλυση με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη TAF1 της δροσόφιλα

έδειξαν ότι μπορεί να ακετυλιώνει τη λυσίνη 14 της H3 και ασθενώς της H4 όταν εκείνες βρίσκονται ελεύθερες στην αντίδραση, όπως και το Gen5. Όμοια με τις ακετυλάσες που έχουν ήδη αναφερθεί, η TAF1 διαθέτει επίσης δυο περιοχές bromodomain, οι οποίες όμως βρέθηκαν ότι δεν είναι απαραίτητες για την ενζυμική ενεργότητα (Mizzen et al., 1996).

Οι ακετυλοτρανσφεράσες εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση όχι μόνο μέσω της ακετυλίωσης των ιστονών αλλά και των μεταγραφικών παραγόντων (Chen et al., 2001).

Αποακετυλάσες ιστονών (Histone Deacetylases-HDACs)

Η ακετυλίωση των ιστονών αποτελεί αντιστρεπτή διαδικασία καθώς η ακετυλομάδα μπορεί να απομακρυνθεί από τη δράση ειδικών ενζύμων, που ονομάζονται αποακετυλάσες ιστονών (HDACs), η ύπαρξη των οποίων ανακαλύφθηκε σύντομα μετά την παρουσία των ακετυλασών (Taunton et al., 1996). Οι αποακετυλάσες κατηγοριοποιούνται σε οικογένειες και τα ένζυμα του ανθρώπου της τάξης I, II και III είναι ομόλογα εκείνα του σακχαρομύκητα Rpd3, Hda2 και Sir2 αντίστοιχα (Thiagalingam et al., 2003). Οι αποακετυλάσες ιστονών αποτελούν τμήματα μεγαλομοριακών συμπλόκων, στα οποία κάποιες από τις υπομονάδες μπορούν να λειτουργούν ως συμπαράγοντες και να ρυθμίζουν την ενεργότητα του ενζύμου. Οι αποακετυλάσες μαζί με τις ακετυλάσες των ιστονών συμμετέχουν στην ανακύκλωση των ακετυλομάδων των ιστονών και στη ρύθμιση της δράσης διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων που τροποποιούνται από εκείνες. Η αλληλεπίδραση τους με μεταγραφικούς παράγοντες που προσδέονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες έχει ως αποτέλεσμα την εντοπισμένη δράση τους σε υποκινητές, όπου ρυθμίζουν τη μεταγραφή μέσω ρύθμισης της ποσότητας, της ενεργότητας είτε της διαθεσιμότητας του ενζύμου (Legube et al., 2003).

Μεθυλάσες ιστονών (Histone Methyltransferases-HMTs)

Η μεθυλίωση των ιστονών πραγματοποιείται από ειδικά ένζυμα, τις μεθυλάσες ιστονών, HMTs. Πρόσφατα ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων που μεθυλιώνουν τις ιστόνες σε συγκεκριμένα κατάλοιπα έχει ανακαλυφθεί και έχει συντελέσει στην διερεύνηση του μηχανισμού ρύθμισης της μεταγραφικής ενεργότητας, καθώς φαίνεται ότι η μεθυλίωση των ιστονών παρουσιάζει σημαντικές διαφορές από τις γνωστές μέχρι στιγμής μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Η μεθυλίωση των ιστονών δεν αλλάζει το συνολικό φορτίο της πρωτεΐνης και φαίνεται να είναι μια ιδιαίτερα σταθερή τροποποίηση, αφού μόλις τους τελευταίους μήνες έχουν ανακαλυφθεί η ύπαρξη ενζύμων που απομακρύνουν τη μεθυλομάδα, αλλά παρουσιάζουν εντοπισμένη και ειδική δράση (Shi et al., 2004; Cuthbert et al., 2004; Wang et al., 2004). Οι μεθυλάσες των ιστονών μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο μεγάλες οικογένειες, εκείνες που καταλύουν τη μεθυλίωση των καταλοίπων λυσίνης (Kouzarides, 2002; Sims et al., 2003; Zhang and Reinberg, 2001) και εκείνες που καταλύουν τη μεθυλίωση των κατάλοιπων αργινίνης, όπως μέλη της οικογένειας των PRMT. Τα αμινοξέα αργινίνης μπορούν να υποστούν μονο- ή δι-μεθυλίωση. Τα ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση μεθυλίωσης των αργινινών διαχωρίζονται σε δυο κατηγορίες : τύπου I, που καταλύουν τη μόνο- και ασύμμετρη δι-μεθυλίωση και τύπου II, που καταλύουν τη μόνο και συμμετρική δι-μεθυλίωση. Υπάρχουν πέντε γνωστά ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση μεθυλίωσης της αργινίνης, που παρουσιάζουν υψηλό βαθμό συντήρησης της καταλυτικής περιοχής (Zhang and Reinberg, 2001; Kouzarides, 2002), που ονομάζονται PRMT1-5.

Η μεθυλίωση των ιστονών εμπλέκεται τόσο στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργοποίησης όσο και στο μηχανισμό ελέγχου της μεταγραφικής καταστολής και της διατήρησής τους. Ο ρόλος των μεθυλασών ιστονών στη μεταγραφή χαρακτηρίζεται από έναν επιπλέον βαθμό πολυπλοκότητας καθώς ο αριθμός των μεθυλομάδων σε ένα κατάλοιπο σχετίζεται με διαφορετικές ιδιότητες.

Μεθυλάσες των αμινοξέων λυσίνης των ιστονών

Οι λυσίνες των ιστονών που υπόκεινται σε μεθυλίωση είναι η λυσίνη 4, 9, 27 και 36 και 79 στην ιστόνη 3 και η λυσίνη 20 της ιστόνης 4. Τα ένζυμα που δημιουργούν τη συγκεκριμένη τροποποίηση φέρουν τη χαρακτηριστική περιοχή SET, και τις χαρακτηριστικές περιοχές που είναι πλούσιες σε κυστεΐνες που προηγούνται, PRE-SET και έπονται, POST-SET αντίστοιχα, της περιοχής που διαθέτει την ενζυμική ενεργότητα. Τα ένζυμα που μεθυλιώνουν τις λυσίνες των ιστονών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις μεγάλες οικογένειες: την SET1, στην οποία περιλαμβάνονται και τα ένζυμα που μεθυλιώνουν την K4 της H3, την SET2, που περιλαμβάνει τα ένζυμα που μεθυλιώνουν τη K36 της H3, την RIZ και την οικογένεια SUV39, οι οποία αποτελείται από ένζυμα που μπορούν να μεθυλιώνουν της K9 και K27 της H3 (Kouzarides, 2002).

Η μεθυλίωση της K79 της H3 αποτελεί εξαίρεση καθώς το ένζυμο που ευθύνεται για την τροποποίηση, DOT1 δεν φέρει τη χαρακτηριστική SET περιοχή (Feng et al., 2002). Η μεθυλίωση της K79 συσχετίζεται με ενεργή μεταγραφή και θεωρείται ότι συμμετέχει στην παρεμπόδιση της εξάπλωσης της ετεροχρωματίνης.

Η πρώτη από τις μεθυλάσες λυσινών που βρέθηκε στα θηλαστικά και φέρει ενεργότητα μεθυλίωσης της K9 της H3 είναι Suv39h1, ομόλογη της Su(var) 3-9 της δροσόφιλας (Rea et al., 2000). Η μεθυλοτρανσφεράση Suv39h1 μεθυλιώνει την K9 της H3, τροποποίηση που είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του HP1 (Lachner et al., 2001; Bannister et al., 2001), και καθώς αυτή η δομή μπορεί να μεταδίδεται και στα γειτονικά νουκλεοσώματα με τη στρατολόγηση περισσοτέρων συμπλόκων Suv39h1-HP1, τη δημιουργία και τη διατήρηση της κατασταλτικής ετεροχρωματινικής δομής της χρωματίνης (Jenuwein, 2001; Grewal and Elgin, 2002).

Η SET9 χαρακτηρίστηκε πρόσφατα ως μεθυλάση της ιστόνης 3 στη λυσίνη 4 (H3-K4) (Wang et al., 2001; Nishioka et al., 2002) και φέρει την χαρακτηριστική επικράτεια SET αλλά στερείται των προ- και μετά- SET επικρατειών. Παρόλο που άμεση απόδειξη για την ενδογενή λειτουργία της SET9 απουσιάζει, έχει προταθεί ότι η μεθυλίωση της ιστόνης 3 από το συγκεκριμένο ένζυμο μπορεί να επάγει τη μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω αποκλεισμού της δράσης των απακετυλασών και

της κατασταλτικής μεθυλίωσης της λυσίνης 9. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μεθυλάσες, η SET9 δεν μπορεί να μεθυλίωσε την ιστόνη 3 *in vitro* όταν εκείνη βρίσκεται πακεταρισμένη σε νουκλεοσώματα, αλλά παρουσιάζει ισχυρή ενεργότητα έναντι ελευθέρου υποστρώματος ιστονών (Wang et al., 2001; Nishioka et al., 2002). Πειράματα έχουν δείξει ότι η SET9 μπορεί να ενισχύει την επαγόμενη από ενεργοποιητή μεταγραφή (Nishioka et al., 2002) γεγονός που υποδεικνύει ότι *in vivo* λειτουργεί μέσω μεθυλίωσης των ιστονών, αλλά ενδεχομένως η ενεργότητά της να ενισχύεται από κάποιον παράγοντα που δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί, ή εναλλακτικά, μπορεί η δράση του συγκεκριμένου ενζύμου να μην περιορίζεται αποκλειστικά σε υποστρώματα ιστονών, αλλά και σε κάποιον άλλο παράγοντα που διαδραματίζει θετικό ρόλο στη μεταγραφή, με τελικό αποτέλεσμα την παρατηρούμενη αύξηση της μεταγραφής. Παραδείγματα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων παραγόντων από ένζυμα που τροποποιούν τη χρωματίνη μέσω μεθυλίωσης αργινών ή ακετυλίωσης έχουν αναγνωριστεί και η λειτουργία τους έχει διερευνηθεί σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου και της μεταγραφής (Chen et al., 2001; Freiman and Tjian, 2003). Για τα ένζυμα όμως της οικογένειας των μεθυλασών λυσίνης με τη χαρακτηριστική επικράτεια SET τα μόνα γνωστά υποστρώματα μέχρι στιγμής είναι οι ιστόνες.

Πρόσφατα απομονώθηκαν στον άνθρωπο και άλλα ένζυμα που μεθυλιώνουν την K4 της H3 στα οποία συγκαταλέγονται η MLL, η ALL, η hSET1 και hSMYD3 (Milne et al., 2002; Nakamura et al., 2002; Wysocka et al., 2003; Hamamoto et al., 2004). Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν συνήθως μέρος μεγαλομοριακών συμπλόκων, τα οποία περιλαμβάνουν περισσότερες της μιας ενζυμικές ενεργότητες που τροποποιούν τη χρωματίνη.

Σε αντίθεση με την περίπτωση της ετεροχρωματίνης που αναφέρθηκε, ο πιθανός ρόλος των τροποποιήσεων ιστονών στη διατήρηση της ενεργής μεταγραφικά χρωματίνης δεν έχει διερευνηθεί. Αν οι τροποποιήσεις των ιστονών ασκούν κάποια επίδραση και στη διατήρηση της μεταγραφής, η μεθυλίωση τους αναμένεται να λειτουργεί ως γνώρισμα των ενεργών γονιδίων, κυρίως επειδή σε αντίθεση με την ακετυλίωση, η μεθυλίωση λυσινών είναι ιδιαίτερα σταθερή. Πραγματικά, πρόσφατες μελέτες στον *Saccharomyces cerevisiae* έχουν δείξει ότι η μεθυλάση ιστονών Set1 βρίσκεται στην 5' κωδική περιοχή των μεταγραφικά ενεργών γονιδίων, όπου και καταλύει την τρι-μεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3-K4) (Ng et al, 2003). Η

παρουσία της υπερμεθυλιωμένης H3-K4 στην κωδική περιοχή παραμένει για το διάστημα των πρώτων 5hr μετά την καταστολή της μεταγραφής και την αποσύνδεση της Set1 από την χρωματίνη, δείχνοντας έτσι ότι η τροποποίηση εκείνη μπορεί είναι ενδεικτική για την παρουσία πρόσφατης μεταγραφικής ενεργότητας. Επειδή όμως η τρι-μεθυλίωση της H3-K4 μειωνόταν αισθητά μετά την πάροδο 5hr το φαινόμενο έχει χαρακτηριστεί ως «μικρής διάρκειας μεταγραφική μνήμη» (short-term transcriptional memory) (Ng et al, 2003).

Σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η μεθυλίωση της H3-K4 σχετίζεται με την μεταγραφική ενεργότητα. Σε αντίθεση όμως με τον σακχαρομύκητα όπου η διπλή μεθυλομάδα της H3-K4 παρουσιάζει ευρεία κατανομή σε ολόκληρο σχεδόν το γονιδίωμα, σε κύτταρα θηλαστικών τόσο η διπλή όσο και η τριπλή μεθυλομάδα στην H3-K4 κορυφώνονται στην 5' κωδική περιοχή πολλών ενεργών γονιδίων (Santos Rosa et al., 2003; Bernstein et al., 2002; Schneider et al., 2004). Επιπρόσθετα, σημαντικά επίπεδα μεθυλίωσης της H3-K4 έχουν παρατηρηθεί και στα γονίδια της περιοχής της β-σφαιρίνης και στο HNF-4 κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης, πριν την έναρξη της μεταγραφής τους, υποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη τροποποίηση εμπλέκεται στην εγκαθίδρυση αλλά και τη διατήρηση μιας δυναμικά-ενεργής χρωματίνης (Hatzis and Talianidis, 2002; Schneider et al, 2004).

Παράγοντες αναδιαμόρφωσης χρωματίνης με την κατανάλωση ATP

Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης μπορεί να επιτελείται και από πολυπαραγοντικά σύμπλοκα, τα οποία με την κατανάλωση ATP μπορούν και αλλάζουν τη αλληλεπίδραση DNA-ιστονών. Τα σύμπλοκα εκείνα οδηγούνται στις θέσεις δράσης τους μέσα από αλληλεπιδράσεις με τους μεταγραφικούς ενεργοποιητές.

Στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχει ποικιλία συμπλόκων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης με την κατανάλωση ATP, τα οποία με βάση την καταλυτική ενεργότητα της ATP-ασης υπάγονται σε τρεις κατηγορίες: SWI/SNF, ISWI και Mi-2. Τα δύο πρώτα από τα σύμπλοκα εμπλέκονται τόσο στην μεταγραφική ενεργοποίηση όσο και

την καταστολή ενώ το τελευταίο φαίνεται να σχετίζεται μόνο με την καταστολή (Kingston and Narlikar, 1999; Narlikar et al., 2002). Το σύμπλοκο SWI/SNF στα θηλαστικά μπορεί να περιλαμβάνει την καταλυτική υπομονάδα ATPάσης Brg1 ή Btm ενώ το θηλαστικό ομόλογο του ISWI είναι το Snf2h. Και οι τρεις από τις ATPάσες που αναφέρθηκαν μπορούν να αναδιαμορφώσουν τη χρωματίνη απουσία των υπολοίπων υπομονάδων των συμπλόκων, όπως έχουν δείξει πειράματα *in vitro*, ενώ η δράση τους φαίνεται ότι πραγματοποιείται μέσω αλλαγών στο οκταμερές των ιστονών, ή απομάκρυνση διμερών H2A-H2B / ολόκληρων νουκλεοσωμάτων ή μετατόπιση νουκλεοσωμάτων πάνω στο DNA.

Τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης θεωρείται ότι δρουν στον υποκινητή των μεταγραφόμενων γονιδίων πρόσφατα όμως πειράματα τεκμηρίωσαν την παρουσία της καταλυτικής υπομονάδας Brg-1 και στην κωδική περιοχή του γονιδίου Hsp70 (Corey et al, 2003). Η παρουσία του παράγοντα Brg-1 ήταν απαραίτητη για την επιμήκυνση της μεταγραφής και τη δημιουργία ενός πλήρους μεταγράφου του γονιδίου και συσχετιζόταν με την παρουσία της RNA-πολυμεράσης II.

Ανάμεσα στα σύμπλοκα που συμμετέχουν και επηρεάζουν την επιμήκυνση της μεταγραφής από την RNA-πολυμεράση II συμπεριλαμβάνονται και οι ιστονικές chaperones (histone chaperones), όπως το FACT και οι Spts (Sims et al., 2004). Ο παράγοντας FACT των θηλαστικών αποτελεί ετεροδιμερές των Spt16 και της HMG-box πρωτεΐνης, SSRP1, που είναι καλά συντηρημένες στα θηλαστικά και φαίνεται ότι δρα μετά την μεταγραφική ενεργοποίηση (Belotserkovskaya et al., 2003). Ο παράγοντας FACT έχει ανιχνευτεί στην κωδική περιοχή των γονιδίων της δροσόφιλας (Saunders et al., 2003) και δράση του επιτυγχάνεται μέσω της αποσταθεροποίησης της δομής του νουκλεοσώματος και απομάκρυνσης του διμερούς H2A-H2B από την Spt16 υπομονάδα, όπως έδειξαν *in vitro* πειράματα (Belotserkovskaya et al., 2003).

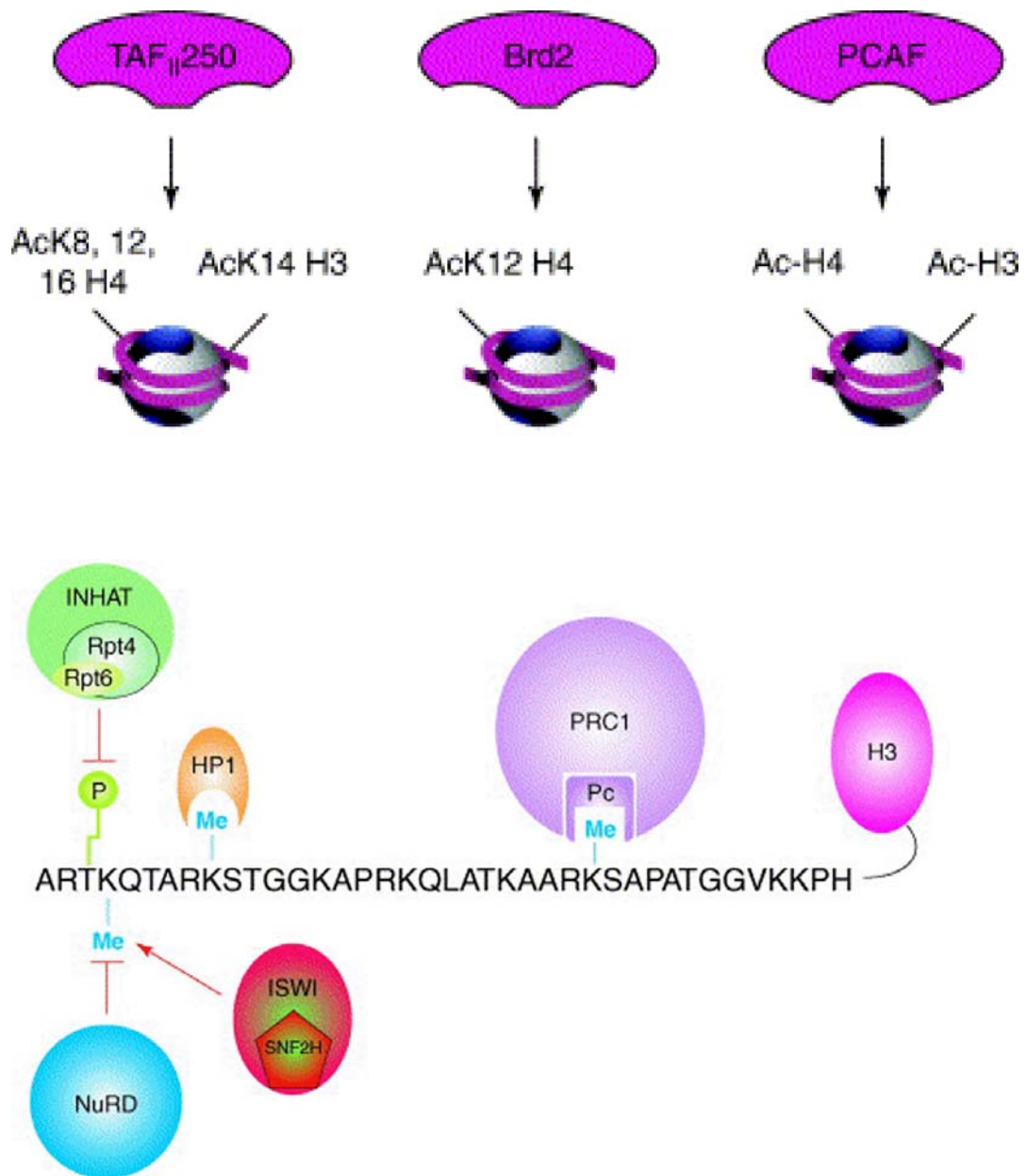
Διαβάζοντας τον κώδικα των ιστονών

Η ακετυλίωση των ιστονών αποτελείται την πιο μελετημένη από τις τροποποιήσεις και αποτέλεσε την βάση για την κατανόηση του ρόλου του συνόλου των τροποποιήσεων στη μεταγραφική ρύθμιση. Αρχικά, η υπόθεση ήταν ότι η αλληλεπίδραση DNA - ιστονών τροποποιείται ως αποτέλεσμα αλλαγής του φορτίου

των ιστονών, λόγω ακετυλίωσης (Wollfe and Hayes, 1999; Marmorstein 2001). Μόνο όμως η ακετυλίωση των ιστονών αποδείχτηκε ότι δεν επέφερε τις αναμενόμενες αλλαγές στην χρωματίνη και τη ελεύθερη προσβασιμότητα των μεταγραφικών παραγόντων στο DNA in vitro (Mutskov, 1998; Polach et al., 2000) και μετά την ανακάλυψη της μεθυλίωσης των ιστονών, τροποποίηση που δεν αλλάζει το φορτίο τους, δημιουργήθηκε η «υπόθεση του κώδικα των ιστονών».

Σύμφωνα με τον κώδικα των ιστονών οι τροποποιήσεις των αμινοτελικών άκρων των ιστονών εμπεριέχουν την πληροφορία και τα χαρακτηριστικά για τη μεταγραφική ενεργότητα μιας χρωματινικής περιοχής, καθώς οι τροποποιήσεις εκείνες αναγνωρίζονται ως επιφάνειες αλληλεπίδρασης από παράγοντες που μεταβιβάζουν την πληροφορία σε σηματοδοτικά μονοπάτια (Σχήμα 2) (Turner, 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Turner, 2002). Σε επαλήθευση, τα δομικά μοτίβα bromodomain και chromodomain έχει βρεθεί ότι αναγνωρίζουν τις ακετυλιωμένες και μεθυλιωμένες ιστόνες, αντίστοιχα (Dhalluin et al., 1999; Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Οι πρωτεΐνες που εμπεριέχουν το bromodomain είναι οι ακετυλοτρανσφεράσες Gen5/PCAF, p300/CBP TAFII 250, για τις οποίες έχει δειχτεί ότι μπορούν να αναγνωρίζουν τις ακετυλιωμένες λυσίνες σε συντηρημένες θέσεις των ιστονών, με ειδικό τρόπο (Marmorstein, 2001; Agalioti et al, 2000; Agalioti et al, 2002). Η περιοχή bromodomain περιλαμβάνεται και στην ATPάση του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI/SNF, Brg1.

Το κυριότερο παράδειγμα πρωτεϊνών που περιέχει chromodomain είναι το HP1, το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται σε K9 δι- και τριμεθυλιωμένη ιστόνη 3, ενώ σημειακή μεταλλαγή στην chromodomain επιφέρει την απώλεια πρόσδεσης στην μεθυλιωμένη ιστόνη 3 και καταστροφή της κατασταλτικής ενεργότητας του HP1 σε γονίδιο (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Η πρόσδεση του HP1 καταστέλλεται παρουσία φωσφορυλιωμένης S10-H3, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την απελευθέρωση του παράγοντα κατά τη μίτωση (Fischle et al., 2005).



Σχήμα 2. Παράγοντες που αναγνωρίζουν τις τροποποιήσεις ιστονών (Loyola and Almouzni., 2004; Margueron et al., 2005)

Το θηλαστικό ομόλογο του Isw1p, Snf2h έχει δείχτει ότι αναγνωρίζει ειδικά και με μεγάλη συγγένεια πρόσδεσης πεπτίδια που φέρουν δι- ή τρι-μεθυλιωμένη την λυσίνη 4 της ιστόνης 3 και στον σακχαρομύκητα η παρουσία της πρωτεΐνης εκείνης στην κωδική περιοχή συνδέονταν με τη μεθυλίωση της H3-K4 (Santos-Rosa et al, 2003). Η περιοχή της Snf2h που ήταν απαραίτητη για την πρόσδεση με τη μεθυλιωμένη H3-K4 δεν σχετίζεται με κάποιο δομικό μοτίβο της πρωτεΐνης, καθώς εκείνη στερείται της περιοχής chromodomain για αυτό και εικάζεται ότι η αλληλεπίδραση δεν είναι άμεση. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι τροποποιήσεις των ιστονών λειτουργούν ως επιφάνειες πρόσδεσης παραγόντων που τις αναγνωρίζουν αλλά καταστέλλοντας επίσης και την πρόσδεση παραγόντων που αναγνωρίζουν τη μη τροποποιημένη ιστόνη, όμοια όπως λειτουργεί η μεθυλίωση της H3-K4 για την πρόσδεση του συμπλόκου NuRD (Nishioka et al., 2002).

Το δομικό επαναλαμβανόμενο μοτίβο WD-40, που εμπεριέχεται στην WDR5, υπομονάδα των συμπλόκων μεθυλίωσης της K4, MLL1, MLL2 και hSET1, πρόσφατα αποδείχτηκε ότι αναγνωρίζει τη δι- ή τρι-μεθυλιωμένη K4-H3, ενώ στον σακχαρομύκητα η πρωτεΐνη Chd1, υπομονάδα του συμπλόκου ακετυλίωσης SAGA, που φέρει δυο περιοχές chromodomain φαίνεται να αναγνωρίζει την ίδια τροποποίηση (Pray-Grant et al., 2005; Wysocka et al., 2005).

Πέραν των τροποποιήσεων που φέρουν οι ιστόνες, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σαφές ότι και η ταυτότητα των ιστονών συνδέεται με τη μεταγραφική ενεργότητα, καθώς διαφορετικές ποικιλομορφίες ιστονών (histone variants) βρίσκονται στα κεντρομερή, μεταγραφικά ενεργά γονίδια ή ετεροχρωματικούς τόπους (Henikoff and Ahmad, 2005). Τα variants των ιστονών παρουσιάζουν διαφορές με τις κανονικές μορφές στον τρόπο που εναποτίθενται στην χρωματίνη, είτε στον τρόπο που λειτουργούν μετά την εναπόθεσή τους. Η H3.3 αποτελεί variant της ιστόνης 3, με την οποία διαφέρουν μόνο σε 4 αμινοξέα, αλλά η H3.3 βρίσκεται σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές και σε ευχρωματίνη, ενώ η H3 σε ετεροχρωματίνη και μεταγραφικά ανενεργές περιοχές της δροσόφιλας (Ahmad and Henikoff, 2002). Επιπλέον η H3.3 είναι εμπλουτισμένη σε τροποποιήσεις λυσινών που σχετίζονται με τη μεταγραφή, όπως η μεθυλίωση της K4, K79 και η ακετυλίωση της K9 και K14 και εναποτίθεται στη χρωματίνη μέσω ενός μηχανισμού που δεν συνδέεται με τον διπλασιασμό του DNA (McKittrick et al., 2004)

Το σύμπλοκο TFIIID

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

Λειτουργίες των TAFIIIs

Οι πρώτες ενδείξεις για τη λειτουργικότητα των TAFIIIs 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 TFIIID (Zhou et al., 1992; Pugh et al., 1991; Wiczorek et al., 1998; Chen et al., 1994), γεγονός που ενδυναμώνει την άποψη ότι κάποιοι τουλάχιστον από τους παράγοντες που συνδέονται με το TBP συμμετέχουν στην αναγνώριση της περιοχής του υποκινητή (Oelgeschlager et al., 1996)).

Επιπλέον ενδείξεις ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες TAFIIIs λειτουργούν ως μεταγραφικοί συνενεργοποιητές προέρχονται από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων θηλαστικών, κατά τα οποία βρέθηκε ότι έκφραση συγκεκριμένων υπομονάδων του TFIIID ενισχύει την ενεργοποίηση της μεταγραφής από διαφορετικούς πυρηνικούς υποδοχείς όπως ο hTAFII135 με τον υποδοχέα της βιταμίνης D3, του ρετινοϊκού οξέος και της θυρεοειδικής ορμόνης (Mengus et al.,

1997), ο παράγοντας hTAFII28 με τον υποδοχέα RXR και ο hTAFII30 με τον υποδοχέα του οιστρογόνου (May et al., 1996; Jacq et al., 1994).

Πειράματα αδρανοποίησης ή αφαίρεσης των γονιδίων των TAFIIs στον σακχαρομύκητα έχουν δείξει ότι οι παράγοντες εκείνοι δεν χρειάζονται για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του συνόλου των γονιδίων (Arone et al., 1996; Walker et al., 1997).

Πειράματα σε εμβρυικά κύτταρα καρκινώματος ποντικού F9 έχουν δείξει ότι ο παράγοντας TAF10 είναι απαραίτητος για την επιβίωση των κυττάρων και τη διαφοροποίησή τους σε ενδόδερμα, καθώς αδρανοποίηση του γονιδίου TAF10 (knockout) είχε ως αποτέλεσμα τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης (Metzger et al., 1999). Απουσία του TAF10 στα F9 κύτταρα το λειτουργικό σύμπλοκο TFIID δεν σχηματίζεται, ενώ φαίνεται ότι ο παράγοντας εκείνος είναι απαραίτητος και κατά την ανάπτυξη, καθώς ποντίκια που είναι knockout δεν είναι βιώσιμα και πεθαίνουν κατά την εμβρυογένεση την ημέρα 5.5, αμέσως μετά την εμφύτευση, λόγω αυξημένης απόπτωσης των κυττάρων της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (Mohan et al., 2003).

Περιοχές ομολογίας TAFIIs με τις ιστόνες

Ανάλυση της πρωτοταγούς δομής των TAFIIs 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 TAFIIs ετεροδιμερίζονται για να σχηματίσουν ζευγάρια όμοια με εκείνα των ιστονών H3-H4 και H2A-H2B, τα οποία δημιουργούν δομή “νουκλεοσώματος” στο TFIID (Gangloff et al., 2001; Hoffman et al., 1996).

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 (Luger et al., 1997).

Οι πρωτεΐνες του hTAFII80 (TAF6) και hTAFII32 (TAF9) παρουσιάζουν μοτίβο αναδίπλωσης όμοιο με εκείνο της ιστόνης 4 και της ιστόνης 3, αντίστοιχα (Xie et al., 1996). 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 (Ogryzko et al., 1998). Οι πρωτεΐνες hTAFII28 (TAF11) και hTAFII18 (TAF13) θεωρείται ότι δημιουργούν ετεροδιμερές μέσω ενός μη κανονικού μοτίβου αναδίπλωσης (Birck et al., 1998). 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 (Gangloff et al., 2000). Κρυσταλλογραφικά δεδομένα με ταυτόχρονη χρήση αντισωμάτων για τις υπομονάδες του συμπλόκου του TFIID του σακχαρομύκητα (Leurent et al., 2002; Brand et al., 1999) 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, δεν υπάρχει όμως πειραματική απόδειξη της παρουσίας ενός οκταμερούς όμοιου με εκείνο του νουκλεοσώματος.

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. 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.

Υπάρχουν τουλάχιστον δυο σύμπλοκα TFIID στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Brou et al., 1993), που απαρτίζονται από τις κοινές υπομονάδες hTAFII20, hTAFII28, hTAFII 32, hTAFII55, hTAFII80, hTAFII100, hTAFII135, hTAFII250 (TFIIDα) και επιπλέον τις υπομονάδες hTAFII30 και hTAFII18 που βρίσκονται στο TFIIDβ. Αποκλειστικά στα Β 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 (Dikstein et al., 1996).

Το σύμπλοκο B-TFIID δεν περιλαμβάνει κανένα από τους παράγοντες των TAFIIs του κλασικού TFIID, αλλά μια μόνο υπομονάδα TAFII170, που έχει ενεργότητα ATPάσης (Timmers et al., 1992). 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 (Willy et al., 2000).

Σε αποπτωτικά κύτταρα που οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο έχει βρεθεί το σύμπλοκο TFIID που φέρει την υπομονάδα hTAFII80δ (Bell et al., 2001). Στο σύμπλοκο του hTFIIDπ που συμμετέχει το hTAFII80δ δεν υπάρχει hTAFII32 (που αποτελεί τον παράγοντα που πιθανά 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 TFIIAαβ και TFIIAγ απουσία των υπόλοιπων hTAFIIs, (Mitsiou et al., 2000), ενώ σε διαφοροποιημένα κύτταρα δεν έχει ανιχνευτεί 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 στον υποκινητή των οποίων δεν προσδέεται TBP.

Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε ευκαρυωτικά κύτταρα δείχνουν ότι στον υποκινητή ενός γονιδίου που δεν είναι ακόμα μεταγραφικά ενεργό αλλά έχει “δεσμευτεί” για ενεργοποίηση, υπάρχει προσδεμένο TBP απουσία των παραγόντων hTAFIIs (Soutoglou et al., 2002).

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 προσδέεται στην αλληλουχία TATA. Έτσι, από τα κύτταρα HeLa απομονώθηκε ένα σύμπλοκο που περιλαμβάνει TAFIIs αλλά όχι TBP και ονομάζεται TFTC (Wieczorek et al., 1998).

Το TFTC 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* (Wieczorek et al., 1998). Από το σύμπλοκο αυτό έχει βρεθεί ότι απουσιάζει η μεγάλη υπομονάδα του TFIID, TAFII250 και οι TAFII28 και TAFII18, που θεωρείται ότι σχηματίζουν ετεροδιμερές μέσω του μοτίβου αναδίπλωσης των ιστονών. Το σύμπλοκο όμως αυτό συνδέεται με πρωτεΐνη που παρουσιάζει ενεργότητα ακετυλίωσης ιστονών GCN5 (Yanagisaga et al., 2002) και λειτουργεί ως συνενεργοποιητής στη μεταγραφική ενεργοποίηση των πυρηνικών υποδοχέων.

hTAFIIs περιλαμβάνονται και στο σύμπλοκο που παρουσιάζει ενεργότητα ακετυλίωσης ιστονών, PCAF (Martinez et al., 1998). Στο σύμπλοκο αυτό υπάρχουν οι παράγοντες hTAFII32, hTAFII20, οι οποίοι όμοια όπως το TFIID και TFTC 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 (Martinez, et al., 2001).

Πρόσφατα προτάθηκε νέα ενιαία ονομασία των παραγόντων που συμμετέχουν στο σχηματισμό του TFIID διαφορετικών οργανισμών (Tora, 2002) η οποία

στηρίζεται στην ομολογία των παραγόντων και όχι στο μοριακό βάρος της πρωτεΐνης (Σχήμα 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)

Σχήμα 3. Εννιαία ονοματολογία των TAFs (Tora 2002)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

**ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
ΤΑF10 ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ ΑΠΟ ΤΗ SET9**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μεθυλίωση των ιστονών καθώς επίσης και άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η ακετυλίωση, η φωσφορυλίωση και η ουβικιτινίωση, διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη δημιουργία μοριακών γνωρισμάτων της χρωματίνης, τα οποία αναγνωρίζονται από ρυθμιστικές πρωτεΐνες και καθορίζουν τη δυναμική μετάβαση μεταξύ μεταγραφικά ενεργής και ανενεργής κατάστασης (Fischle et al., 2003; Turner, 2002). Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός μεθυσών ιστονών έχει ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί (Kouzarides, 2002; Jenuwein, 2001).

Η SET9 χαρακτηρίστηκε πρόσφατα ως μεθυλάση της ιστόνης 3 στη λυσίνη 4 (H3-K4) (Wang et al., 2001; Nishioka et al., 2002) και φέρει την χαρακτηριστική επικράτεια SET αλλά στερείται των προ- και μετά- SET επικρατειών. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μεθυλάσες, η SET9 δεν μπορεί να μεθυλιώσει την ιστόνη 3 όταν εκείνη βρίσκεται πακεταρισμένη σε νουκλεοσώματα, αλλά παρουσιάζει ισχυρή ενεργότητα έναντι ελεύθερων υπόστρωμα ιστονών (Wang et al., 2001; Nishioka et al., 2002). Πειράματα έχουν δείξει ότι η SET9 μπορεί να ενισχύει την επαγόμενη από ενεργοποιητή μεταγραφή (Nishioka et al., 2002) γεγονός που υποδεικνύει ότι *in vivo* λειτουργεί μέσω μεθυλίωσης των ιστονών, αλλά ενδεχομένως η ενεργότητά της να ενισχύεται από κάποιον παράγοντα που δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί. Εναλλακτικά, μπορεί η δράση του συγκεκριμένου ενζύμου να μην περιορίζεται αποκλειστικά σε υποστρώματα ιστονών, αλλά και σε κάποιον άλλο παράγοντα που διαδραματίζει θετικό ρόλο στη μεταγραφή, με τελικό αποτέλεσμα την παρατηρούμενη αύξηση της μεταγραφής. Παραδείγματα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων παραγόντων από ένζυμα που τροποποιούν τη χρωματίνη μέσω μεθυλίωσης αργινών ή ακετυλίωσης έχουν αναγνωριστεί και η λειτουργία τους έχει διερευνηθεί σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου και της μεταγραφής (Chen et al., 2001; Freiman and Tjian, 2003). Για τα ένζυμα όμως της οικογένειας των μεθυσών λυσίνης με τη χαρακτηριστική επικράτεια SET τα μόνα γνωστά υποστρώματα μέχρι στιγμής είναι οι ιστόνες.

Στη παρούσα εργασία αποδεικνύεται ότι το ένζυμο SET9 μπορεί να μεθυλιώσει τον παράγοντα TAF_{II}10 (τον γνωστό μέχρι πρόσφατα ως TAF_{II}30), που αποτελεί

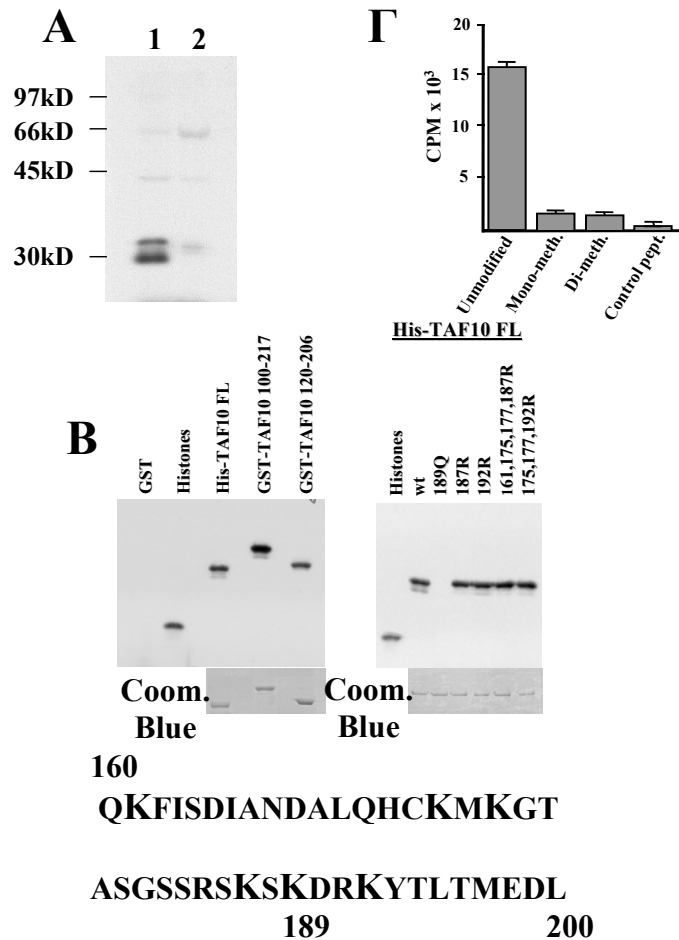
συστατικό του συμπλόκου του γενικού μεταγραφικού παράγοντα TFIIID. Η μεθυλίωση του TAF10 έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της μεταγραφής ορισμένων μόνο γονιδίων από εκείνα που ρυθμίζονται από το TAF10. Επιπλέον, ο TAF10 βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την RNA-πολυμεράση II και η αλληλεπίδραση εκείνη ενισχύεται από την παρουσία της μεθυλομάδας, γεγονός που πιθανά παρέχει το μοριακό μηχανισμό ενίσχυσης της μεταγραφής στα γονίδια που επηρεάζονται από τη μεθυλίωση του παράγοντα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο παράγοντας TAF10 μεθυλιώνεται in vitro και in vivo από τη SET9 και ενσωματώνεται στο σύμπλοκο του TFIIID.

Αρχικά, αντιδράσεις μεθυλίωσης in vitro πραγματοποιήθηκαν με ένα ελλιπές σύμπλοκο TFIIID που αποτελούταν από τις υπομονάδες TAF4, TAF5, Flag-TAF6, TAF8, TAF9, TAF10 και TAF12 που απομονώθηκε με κολώνα ανοσοσυγγένειας από κύτταρα SF9 που είχαν επιμολυνθεί με βακουλιοΐο που έκφραζε για τις επιμέρους υπομονάδες. Στις αντιδράσεις μεθυλίωσης με το ανασυνδυασμένο ένζυμο SET9 και παρουσία τριτιωμένης-S-αδενόσυλ-μεθειονίνης [^3H -S-Adenosyl-Methionine (^3H -SAM)] μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, αποκαλύφθηκε μια ραδιενεργή-μεθυλιωμένη ζώνη των 30 kD (Εικόνα 1A), που είναι χαρακτηριστική για το TAF10 (Jacq et al., 1994).

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η μεθυλιωμένη πρωτεΐνη αντιστοιχεί στο TAF10, αντιδράσεις in vitro μεθυλίωσης πραγματοποιήθηκαν με βακτηριακά εκφρασμένη και απομονωμένη πρωτεΐνη. Ολόκληρη η πρωτεΐνη TAF10, αλλά και τμήματά της που εμπεριείχαν το καρβοξυλικό άκρο της (100-217 αμινοξέα ή 120-206) εκφρασμένο μετά τη GST (Glutathione-S-transferase, GST) έδειξαν ότι μεθυλιώνονται από τη μεθυλάση SET9, με αποδοτικότητα όμοια με εκείνη έναντι ελεύθερων ιστονών (Εικόνα 1B). Η πρωτεΐνη GST-TAF10 120-206 μετά την in vitro μεθυλίωση και απομόνωση από πήκτωμα ακρυλαμίδης υπέστη σε μερική πέψη τρυψίνης. Τα πεπτίδια καθαρίστηκαν περαιτέρω με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) και ακόλουθη αποικοδόμηση κατά Edman έδειξε ότι η λυσίνη 189 είναι το μοναδικό αμινοξύ που υπόκειται μεθυλίωση (συνεργασία με το εργαστήριο του Tora L. CNRS, Strasbourg). Η επιβεβαίωση ότι το συγκεκριμένο μόνο αμινοξύ υπόκειται σε μεθυλίωση επήλθε από αντιδράσεις όπου ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ολόκληρη η πρωτεΐνη TAF10 η οποία έφερε σημειακές μεταλλαγές σε συγκεκριμένες λυσίνες (Εικόνα 1B). Το ένζυμο SET9 μπορούσε να μεθυλιώσει το υπόστρωμα που έφερε μεταλλαγή σε οποιαδήποτε λυσίνη, εκτός εκείνου που έφερε τη μεταλλαγή της λυσίνης 189 σε γλουταμίνη (Εικόνα 1B).



Εικόνα 1. Η SET9 μεθυλιώνει τον παράγοντα TAF10 in vitro.

(Α) Ελλιπές σύμπλοκο TFIIID που έχει απομονωθεί από κύτταρα που εκφράζουν τις υπομονάδες μετά από μόλυνση με βακουλοϊό και αποτελείται από TAF4, TAF5, Flag-TAF6, TAF8, TAF9, TAF10 και TAF12 (1) ή από Flag-TAF6 και TAF9 (2) υποβλήθηκαν σε αντίδραση μεθυλίωσης παρουσία 100 ng ανασυνδυασμένου ένζυμου SET9.

(Β) Αντιδράσεις μεθυλίωσης παρουσία 100 ng ανασυνδυασμένης SET9. Ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν 10 μg ελεύθερων ιστονών, 1μg της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (His-TAF10FL) ή το καρβοξυλικό τμήμα της που βρίσκεται σε σύντηξη με την GST. Οι αριθμοί στο πάνω μέρος αντιπροσωπεύουν αμινοξέα λυσίνης που έχουν μεταλλαχθεί στην His-TAF10FL πρωτεΐνη. Τα προϊόντα της μεθυλίωσης ηλεκτροφορήθηκαν και εκτέθηκαν σε αυτοραδιογραφία. Στο κατώτερο μέρος απεικονίζονται τμήματα του ηλεκτροφόρου. Στο χαμηλότερο τμήμα της εικόνας απεικονίζεται η αμινοξική αλληλουχία του TAF10 από 160-200 αμινοξέα με εντονότερες τις λυσίνες που έχουν υποστεί σημειακή μεταλλαγή.

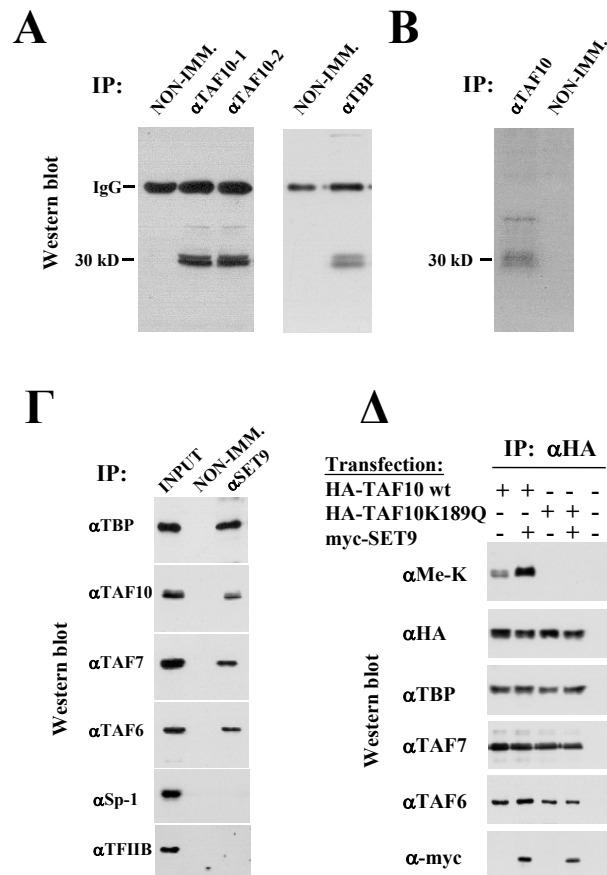
(Γ) In vitro αντιδράσεις μεθυλίωσης παρουσία 100 ng SET9 και 2 μg πεπτιδίου TAF10, που εμπεριέχει την αλληλουχία των αμινοξέων 180-195. Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι : μη τροποποιημένο πεπτίδιο, πεπτίδιο που περιλαμβάνει μια- (Mono-meth) ή δυο (Di-meth) μεθυλομάδες στη λυσίνη 189 και πεπτίδιο μάρτυρα από το καρβοξυλικό άκρο του HNF4. Οι αντιδράσεις μετρήθηκαν μετά από πρόσδεση σε φίλτρα P81 και ανάλυση σε SDS-PAGE 18%.

Όταν ένα συνθετικό πεπτίδιο που περιελάμβανε την αλληλουχία αμινοξέων 180-195 του TAF10 χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα μεθυλίωσης, φάνηκε ότι η SET9 μπορεί να μεθυλίωσε μόνο το μη τροποποιημένο πεπτίδιο αλλά όχι εκείνο που έφερε μια ή δυο μεθυλομάδες στη θέση 189 (Εικόνα 1Γ), γεγονός που υποδεικνύει ότι η SET9 μπορεί να μόνο-μεθυλίωσε τον TAF10, όμοια όπως συμβαίνει και με τη λυσίνη 4 της ιστόνης 3.

Η μελέτη της μεθυλίωσης της ενδογενούς πρωτεΐνης TAF10 πραγματοποιήθηκε σε πυρηνικά εκχυλίσματα από κύτταρα HeLa, τα οποία υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση με δυο αντισώματα που αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους της πρωτεΐνης και ακολούθησε ανάλυση κατά Western (Western blot) με τη χρήση αντισώματος έναντι όλων των μεθυλιωμένων λυσινών. Η χαρακτηριστική διπλή ζώνη του TAF10 (Jacq et al., 1994) στα 30 kD, η οποία αναγνωρίστηκε από το αντίσωμα έναντι των μεθυλιωμένων λυσινών, παρέχει μια επιπλέον ένδειξη ότι η ενδογενής πρωτεΐνη είναι μεθυλιωμένη (Εικόνα 2Α). Επιπλέον, μια όμοια ζώνη εμφανίστηκε και στην ανοσοκατακρήμιση του παράγοντα TBP, υποδεικνύοντας ότι το μεθυλιωμένο TAF10 μπορεί και ενσωματώνεται στο σύμπλοκο του TFIID. Η μεθυλίωση του ενδογενούς παράγοντα μελετήθηκε περαιτέρω με πειράματα μεταβολικής σήμανσης μέσα στον πυρήνα (in-nucleo metabolic labeling). Πυρήνες κυττάρων HeLa επώαστηκαν παρουσία $^3\text{H-SAM}$ και μετά από δημιουργία πυρηνικών εκχυλισμάτων, το διαλυτό κλάσμα των πρωτεϊνών υπέστη ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα για το TAF10. Η χαρακτηριστική διπλή ζώνη των 30 kD ήταν εμφανής στην αυτοραδιογραφία (Εικόνα 2Β).

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο της SET9 στη μεθυλίωση του παράγοντα TAF10 in vivo αναλύθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των ενδογενών πρωτεϊνών. Με τη χρήση αντισώματος ειδικού για τη SET9 σε πειράματα ανοσοκατακρήμισης σε κύτταρα HeLa βρέθηκε πως στις απομονωμένες πρωτεΐνες συνυπάρχουν και η πρωτεΐνη TAF10, μαζί με άλλες υπομονάδες του συμπλόκου TFIID (TBP, TAF6 και TAF7), γεγονός που δείχνει πως υπάρχει ειδική αλληλεπίδραση της SET9 και του TFIID in vivo (Εικόνα 2Γ).

Σε επόμενο πείραμα, το TAF10 άγριου τύπου ή εκείνο που έφερε μεταλλαγή της λυσίνης 189 σε γλουταμίνη (189Q) υπερεκφράστηκαν υπό τον επίτοπο HA παρουσία ή απουσία SET9 και ακολούθησε δημιουργία πυρηνικών εκχυλισμάτων και ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα για τον επίτοπο HA.



Εικόνα 2. Το TAF10 αλληλεπιδρά με SET9, είναι μεθυλιωμένο *in vivo* και ενσωματώνεται στο TFIIID ανεξάρτητα από τη μεθυλίωσή του.

(Α) Πυρηνικά εκχυλίσματα από HeLa υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση με μη ανοσοποιημένο ορρό ή με τα μονοκλωνικά αντισώματα 1H8 (αTAF10-1), 2B11 (αTAF10-2) ή 3G3 (αTBP) και ακολούθησε Western blot με αντίσωμα για τις μεθυλιωμένες λυσίνες.

(Β) Πυρήνες κυττάρων HeLa επώαστηκαν με ^3H -SAM και μετά από δημιουργία πυρηνικών εκχυλισμάτων ακολούθησε ανοσοκατακρήμιση με τα αντισώματα που αναφέρονται και ηλεκτροφόρηση. Απεικονίζεται αυτοραδιογραφία 13 ημερών.

(Γ) Πυρηνικά εκχυλίσματα HeLa υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση με αSET9 και Western blot με τα αντισώματα που αναφέρονται.

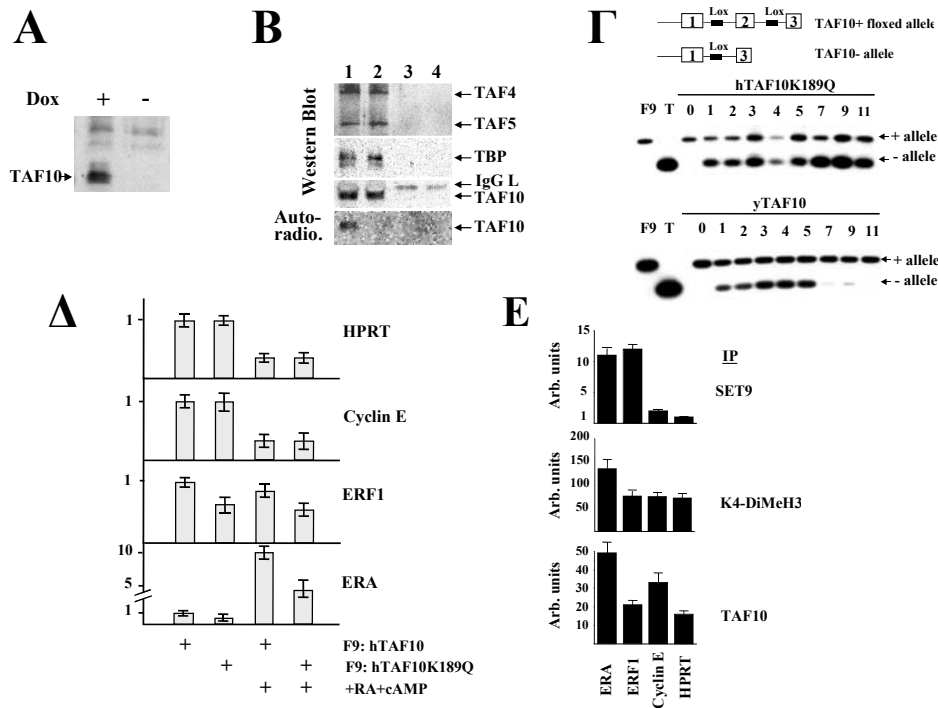
(Δ) Πυρηνικά εκχυλίσματα HEK293 που είχαν διαμολυνθεί με τους φορείς έκφρασης που αναφέρονται υπέστησαν ανοσοκατακρήμιση με αHA. Απεικονίζεται το Western blot με τα αντισώματα που απεικονίζονται.

Πειράματα Western blot με αντισώματα για το TBP, TAF6 και TAF7 έδειξαν ότι τόσο η αγρίου τύπου πρωτεΐνη TAF10 όσο και εκείνη που δεν μπορεί να μεθυλιωθεί-TAF10-K189Q μπορούν και ενσωματώνονται στο TFIIID σύμπλοκο, ανεξαρτήτως υπερέκφρασης της SET9 (Εικόνα 2Δ).

Όπως ήταν αναμενόμενο, μόνο η αγρίου τύπου TAF10 πρωτεΐνη και όχι εκείνη που έφερε μεταλλαγή (TAF10K189Q) αναγνωρίστηκε από το αντίσωμα για τις μεθυλιωμένες λυσίνες, γεγονός που δείχνει ότι δεν υπάρχει άλλη θέση που υπόκειται σε μεθυλίωση, παρόλο που τόσο η αγρίου τύπου όσο και η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη αλληλεπιδρούν με τη μεθυλάση SET9 (Εικόνα 2Δ). Σημαντικό είναι ότι η ταυτόχρονη έκφραση της SET9 με το TAF10wt είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του σήματος ανοσοϋβριδισμού με το αντίσωμα για τις μεθυλιωμένες λυσίνες. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η SET9 μπορεί να μεθυλιώσει το TAF10 in vivo και η μεθυλίωση εκείνη δεν επηρεάζει την ενσωμάτωσή του στο σύμπλοκο TFIID.

Ο ανθρώπινος παράγοντας TAF10 που δεν μεθυλιώνεται μπορεί να υποκαταστήσει την αγρίου τύπου πρωτεΐνη και να διασώσει το φαινότυπο εμβρυϊκών κυττάρων καρκινώματος.

Ο λειτουργικός ρόλος της μεθυλίωσης του TAF10 μελετήθηκε σε πειράματα συμπληρωματικότητας σε εμβρυϊκά κύτταρα καρκινώματος ποντικού (F9). Απαλοιφή του ενδογενούς γονιδίου TAF10 έχει περιγραφεί παλαιότερα με τη τεχνική ανασυνδυασμού της ρικομπινάσης Cre-lox (Metzger et al., 1999) και έχει δείχτει ότι τα εμβρυϊκά κύτταρα F9 παρουσιάζουν αυξημένη θνησιμότητα και αδυναμία διαφοροποίησης προς ενδόδερμα (parietal), ο φαινότυπος όμως αυτός μπορεί να διασωθεί με την έκφραση του ανθρώπινου παράγοντα TAF10 (Metzger et al., 1999). Κύτταρα F9 στα οποία το ένα αλληλόμορφο έχει αδρανοποιηθεί και το άλλο περιέχει το δεύτερο εξόνιο ανάμεσα σε Lox αλληλουχίες, TAF10 (L/L2) και εκφράζει για τον ενεργοποιητή του αντιστρόφου συστήματος έκφρασης της τετρακυκλίνης (rtTA) παρουσία δεοξυκυκλίνης, υπέστησαν μόνιμη διαμόλυνση με το TAF10K189Q cDNA, που δεν μπορεί να μεθυλιωθεί ή με το cDNA για το TAF10 του σακχαρομύκητα, που βρίσκονται υπό τον έλεγχο του ιδίου συστήματος έκφρασης. Η επαγόμενη από δεοξυκυκλίνη έκφραση των διαγονιδίων μελετήθηκε με ανάλυση κατά Western με αντίσωμα ειδικό για τον ανθρώπινο παράγοντα TAF10 2F4 (Figure 3A).



Εικόνα 3. Ο ρυθμός ανάπτυξης των F9 TAF10^{-/-} κυττάρων διασώζεται από τον ανθρώπινο παράγοντα TAF10 που δεν μεθυλιώνεται, αλλά η μεταγραφή των γονιδίων ERF1 και ERA παρουσιάζεται μειωμένη.

(Α) F9:hTAF10(K189Q) κύτταρα μεγάλωσαν παρουσία ή απουσία 1 μg/ml δεοξυκυκλίνης. Απεικονίζεται Western blot με αντίσωμα για hTAF10 (2F4).

(Β) Πυρήνες F9:hTAF10wt (κάθετοι 1 και 3) ή F9:hTAF10(K189Q) κυττάρων (κάθετοι 2 και 4) επώαστηκαν με ³H-SAM και μετά από παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων και ακόλουθη ανοσοκατακρήμνιση με αTAF10 (1H8) (κάθετοι 1 και 2) ή μη ανοσοποιημένο ορό (κάθετοι 3 και 4) αναλύθηκαν με Western blot με τα αντισώματα που απεικονίζονται δεξιά. Στο χαμηλότερο μέρος φαίνεται αυτοραδιογραφία 14 ημερών.

(Γ) L⁺/L2TAF10 F9 κύτταρα που φέρουν ενσωματωμένο φορέα rtTA υπέστησαν ηλεκτροδιάτρηση με γραμμικό φορέα που εκφράζει για hTAF10K189Q ή yTAF10. Τα κύτταρα μεγάλωσαν παρουσία ή απουσία δεοξυκυκλίνης και έπειτα υπέστησαν ηλεκτροδιάτρηση με το φορέα που εκφράζει για τη ρικομπινάση pSG-Cre. Η εκτομή του δευτέρου εξωνίου μελετήθηκε με PCR γενωμικού DNA. Στις καθέτους F9 και T, γενωμικό DNA από αγρίου τύπου F9 (F9) ή F9:hTAF10 (T) κυττάρων αναλύθηκε, αντιστοίχως.

(Δ) RT-PCR ανάλυση για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων που αναφέρονται πραγματοποιήθηκε σε ολικά RNAs των κυτταρικών σειρών F9:hTAF10 και F9:hTAF10(K189Q) πριν και μετά την επίδραση ρετινοϊκού οξέος (1 μM) και bt₂cAMP (250 μM) για 5 ημέρες. Οι ράβδοι αντιστοιχούν στο μέσο όρο των σημάτων από τέσσερα τουλάχιστον διαφορετικά πειράματα παρασκευής RNA.

(Ε) Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) για τη μελέτη της πρόσδεσης της SET9 και TAF10 καθώς και τη H3-K4-δι-μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων ERA, ERF1, Cyclin E και HPRT σε F9 κύτταρα, παρουσία RA+cAMP. Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν τιμές real-time PCR όταν το δείγμα χωρίς αντίσωμα λαμβάνεται ίσο με 1.

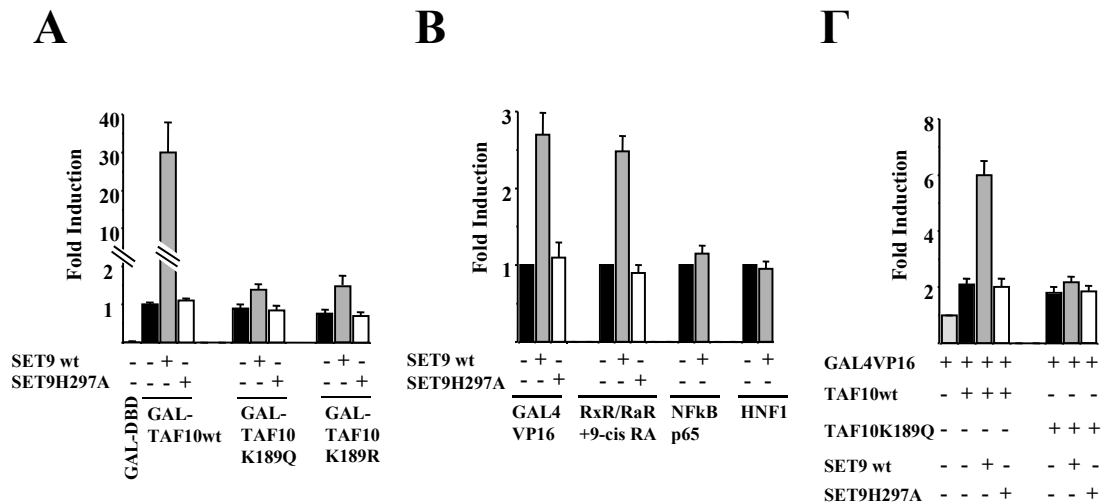
Στο σύνολο των κυττάρων που είχαν υποστεί διαμόλυνση με τον φορέα που εκφράζει για τη ρικομπινάση Cre η εκτομή του δευτέρου εξωνίου (Metzger et al., 1999) αναλύθηκε με αντιδράσεις PCR για διάστημα έντεκα ημερών. Τα προϊόντα PCR που αντιστοιχούν στο αλληλόμορφο που έχει υποστεί εκτομή (233 bp) ανιχνεύονταν για ολόκληρο το διάστημα που εκφραζόταν η Cre, από τη πρώτη μέχρι και την ενδέκατη μέρα, υποδηλώνοντας ότι ο πληθυσμός των κυττάρων που φέρει αδρανοποιημένο το ενδογενές αλληλόμορφο του TAF10 είναι βιώσιμος όταν εκείνα εκφράζουν για το TAF10K189Q (Εικόνα 3Γ). Σε πείραμα ελέγχου εξετάστηκε η παρουσία της ζώνης του δευτέρου εξωνίου TAF10 (L⁻/L²) σε κύτταρα που εκφράζουν για το TAF10 του σακχαρομύκητα, το οποίο δεν μπορεί να διασώσει το φαινότυπο κυττάρων ποντικού TAF10^{-/-} (E.S και L.T αδημοσίευτα αποτελέσματα). Όπως ήταν αναμενόμενο, η ζώνη των 233 bp του αλληλομόρφου που είχε υποστεί εκτομή δεν ανιχνεύεται μετά από διάστημα πέντε ημερών παρουσίας Cre, καθώς τα κύτταρα πεθαίνουν (Εικόνα 3Γ).

Τα διαγονίδια του ανθρωπίνου TAF10 ή TAF10K189Q που διασώζουν το φαινότυπο των κυττάρων TAF10^{-/-}, εκφράζονται σε όμοια επίπεδα και με τρόπο που ελέγχεται από την παρουσία της δεοξυκυκλίνης (Εικόνα 3B). Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι η μεθυλίωση του TAF10 παρατηρήθηκε μόνο στα κύτταρα που εκφράζουν για την αγρίου τύπου πρωτεΐνη και όχι στα κύτταρα που εκφράζουν για το TAF10K189Q, επιβεβαιώνοντας ότι η λυσίνη 189 είναι το μοναδικό αμινοξύ που υπόκειται σε μεθυλίωση *in vivo*. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης με το αντίσωμα για το TAF10 συμπεριλάμβαναν υπομονάδες του συμπλόκου TFIID, τόσο όταν εκφραζόταν το TAF10wt ή το TAF10K189Q (Εικόνα 3B), δείχνοντας ότι η καθεμία από τις πρωτεΐνες μπορεί να ενσωματώνεται στο ενδογενές λειτουργικό σύμπλοκο. Η διάσωση του φαινοτύπου των κυττάρων TAF10^{-/-} από το TAF10K189Q δείχνει ότι η μεθυλίωση του παράγοντα δεν εμπλέκεται με τη μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, όπως συνέβαινε στη περίπτωση των κυττάρων που απουσιάζει εντελώς το TAF10, τα οποία και παρουσίαζαν απόπτωση και σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στη φάση G0/G1 (Metzger et al., 1999).

Μικρές διαφορές παρουσιάστηκαν στα κύτταρα F9 TAF10^{-/-}, τα οποία εκφράζουν για TAF10wt ή TAF10K189Q, όσον αφορά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, τη μορφολογία ή την ικανότητά τους να διαφοροποιούνται σε κύτταρα ενδοδερμικής προέλευσης. Η μεταγραφή μεμονωμένων γονιδίων αναλύθηκε με αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), από δείγματα RNA των δυο

κυτταρικών σειρών, πριν και μετά την επαγωγή τους με ρετινοϊκό οξύ και cAMP. Δύο γονίδια των οποίων η έκφραση εξαρτάται από το TAF10 (A. Soldatov και L.T. αδημοσίευτα αποτελέσματα), το ERF1 (Ets-related factor) και το επαγόμενο από ρετινοϊκό οξύ ERA1, μειώθηκαν κατά δυο περίπου φορές στα κύτταρα που εκφράζουν για TAF10K189Q, τόσο πριν όσο και μετά την επαγωγή τους για διαφοροποίηση προς parietal ενδόδερμα (Εικόνα 3Δ). Αντίθετα, η έκφραση των γονιδίων όπως HPRT και κυκλίνης E (Cyclin E) δεν επηρεάστηκε, γεγονός που δείχνει ότι η μεθυλίωση του TAF10 επηρεάζει κάποια μόνο από τα γονίδια που ελέγχονται από τον παράγοντα, παρόλο που είναι γνωστό ότι το γονίδιο Cyclin E ρυθμίζεται από το TAF10.

Σε επόμενο πείραμα πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση (ChIP) για τη διερεύνηση της στρατολόγησης των παραγόντων στα γονίδια στόχους του TAF10, σε αγρίου τύπου κύτταρα F9 παρουσία ρετινοϊκού οξέος και cAMP. Στην ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης με το αSET9 ανιχνεύτηκε σημαντική ποσότητα DNA των υποκινητών των γονιδίων ERA και ERF1, ενώ αντίθετα για τα γονίδια HPRT και κυκλίνη E, το σήμα ήταν ιδιαίτερα χαμηλό, κοντά σε επίπεδα background (Εικόνα 3Ε). Η παρουσία του TAF10 και της διπλής μεθυλομάδας στη λυσίνη 4 της ιστόνης 3 (H3-K4 Dimeth) και στα τέσσερα γονίδια δείχνει ότι η επίδραση της μεθυλίωσης του TAF10 σε συγκεκριμένα γονίδια στόχους, πραγματοποιείται μέσα από τη διαφορετική στρατολόγηση του ενζύμου SET9 στις ρυθμιστικές περιοχές των συγκεκριμένων γονιδίων. Συγκρίνοντας τα σήματα ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης για το TAF10 και H3-K4 Dimeth στα γονίδια ERA και ERF1 φαίνεται ότι τα σήματα είναι σχεδόν διπλάσια μεταξύ τους (Εικόνα 3Ε). Παρά το γεγονός ότι οι διαφορές εκείνες μπορεί να οφείλονται στη διαφορετική προσβασιμότητα των επιτόπων από το αντίσωμα στα διαφορετικά προ-εναρκτήρια σύμπλοκα έναρξης της μεταγραφής, οι διαφορές εκείνες μπορεί να αντιπροσωπεύουν και διαφορετικό ποσοστό των κυττάρων στα οποία τα συγκεκριμένα γονίδια βρίσκονται ενεργά, τη δεδομένη χρονική στιγμή. Καθώς η μεθυλίωση της H3-K4 και η παρουσία TAF10 χαρακτηρίζουν ενεργούς υποκινητές (Kouzarides, 2002; Muller and Tora, 2004) και η έκφραση του γονιδίου ERA είναι μεγαλύτερη από το ERF1, η τελευταία από τις θεωρίες που προαναφέρθηκαν φαίνεται να είναι και η πιο πιθανή αιτία δημιουργίας της διαφορετικής έντασης των σημάτων.



Εικόνα 4. Ενίσχυση της μεταγραφικής ενεργότητας παρουσία της SET9, που πραγματοποιείται μέσα από τη μεθυλίωση του TAF10

HEK293 κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με τους φορείς έκφρασης που αναφέρονται και τα κατάλληλα πλασμίδια λουσιφεράσης. Οι ράβδοι αντιστοιχούν σε ενεργότητα λουσιφεράσης κανονικοποιημένη με την ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης σαν εσωτερικό πείραμα ελέγχου και εκφράζονται σε σύγκριση με GAL-TAF10wt (A), ή με τους ενεργοποιητές χωρίς SET9 (B), ή με το GAL4-VP16 (Γ).

Η μεθυλίωση του TAF10 αποτελεί μέρος του μηχανισμού δράσης της SET9 για την ενίσχυση της μεταγραφής

Για τη μελέτη του μηχανισμού ενίσχυσης της μεταγραφής από τη μεθυλίωση του TAF10 πραγματοποιήθηκαν πειράματα τεχνητής στρατολόγησης στους υποκινητές, με τη χρήση του συστήματος GAL4 (Εικόνα 4A). Το TAF10wt, TAF10K189Q και TAF10K189R εκφράστηκαν μαζί με την υπομονάδα πρόσδεσης στο DNA, GAL4 και με τη χρήση κατασκευών που φέρουν στοιχεία πρόσδεσης για το GAL4 μπροστά από το γονίδιο της λουσιφεράσης, παρατηρήθηκε ότι μπορούν και επιφέρουν αύξηση της ενεργότητας κατά 80 φορές, σε σύγκριση με το GAL4 μόνο (Εικόνα 4A). Σημαντικό όμως είναι ότι περαιτέρω έκφραση της SET9 είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της ενεργότητας του Gal4-TAF10wt κατά 30 φορές, αλλά καμία επίδραση στη περίπτωση των Gal4-TAF10K189Q και Gal4-TAF10K189R. Η αύξηση εκείνη

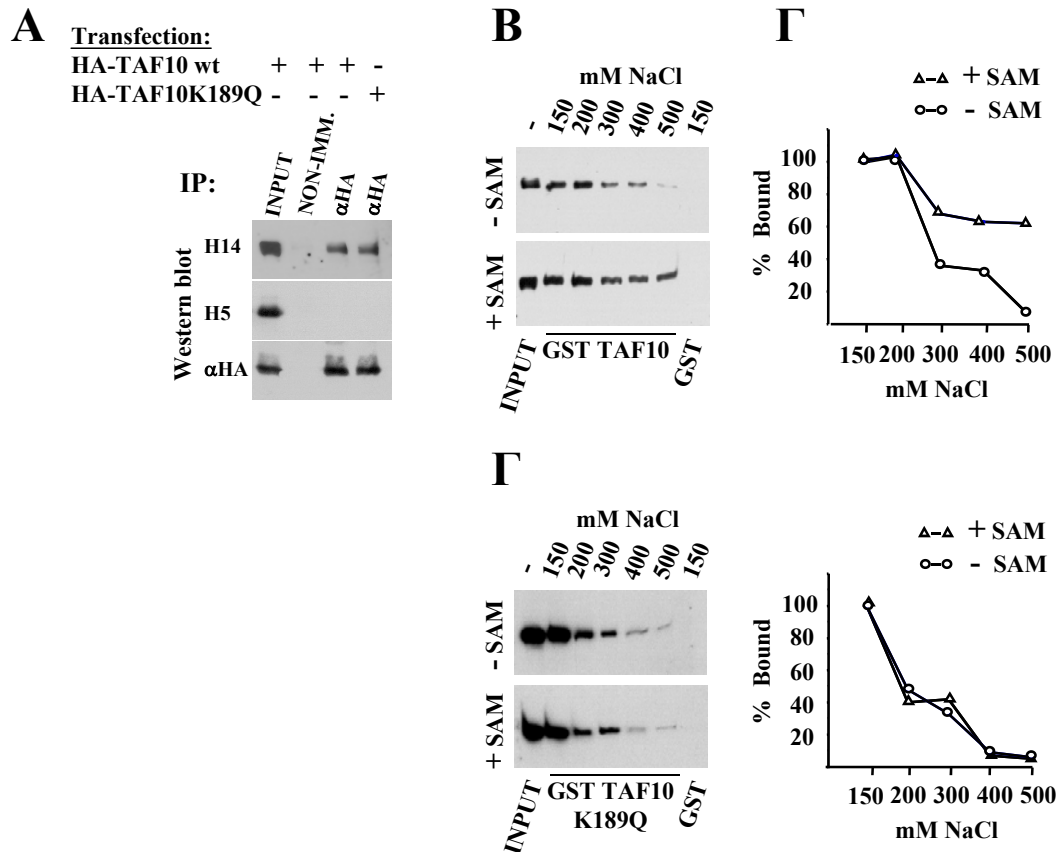
δεν πραγματοποιήθηκε και όταν εκφράστηκε μια μεταλλαγμένη μορφή της SET9, που δεν έχει ενεργότητα μεθυλίωσης (SET9H297A) (Εικόνα 4A).

Σε πειράματα μελέτης της επαγόμενης από ενεργοποιητή μεταγραφής, όπως ήταν γνωστό (Nishioka et al., 2002), η έκφραση SET9 wt αλλά όχι της ανενεργής SET9H297A είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της παρατηρούμενης από το Gal4-VP16 μεταγραφής (Εικόνα 4B). Παρόμοια δράση (αύξηση κατά 2.8 φορές) παρατηρήθηκε και στο πείραμα με την κατασκευή για το RXR/RAR αλλά όχι με το NFκB p65 ή το HNF-1, συμπεραίνοντας έτσι ότι, η δράση της SET9 είναι ειδική σε μερικούς μόνο υποκινητές. Ταυτόχρονη έκφραση TAF10wt ή TAF10K189Q με το Gal4-VP16 είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της ενεργότητας κατά 2 φορές, υποδηλώνοντας ότι η συγκέντρωση του ενδογενούς παράγοντα TAF10 αποτελεί περιοριστικό παράγοντα στα κύτταρα (εικόνα 4Γ). Η παρουσία της SET9 είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση κατά 3 φορές, επίδραση που δεν ήταν ορατή όταν εκφραζόταν η καταλυτικά ανενεργή μορφή του ενζύμου (SET9H297A) ή μεταλλαγμένος παράγοντας TAF10 που δεν μπορεί να μεθυλιωθεί (TAF10K189Q). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η μεθυλίωση του TAF10 από τη SET9 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της επαγόμενης από ενεργοποιητή μεταγραφής.

Η μεθυλίωση του TAF10 από τη SET9 έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη αλληλεπίδραση με την RNA-πολυμεράση II

Η μεθυλίωση του TAF10 από τη SET9 δεν επηρεάζει την ενσωμάτωσή του στο λειτουργικό σύμπλοκο TFIID, όπως ήδη αναφέρθηκε. Προκειμένου να μελετηθούν τα χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης που επηρεάζονται από την τροποποίηση, πραγματοποιήθηκε μελέτη των αλληλεπιδράσεων του TAF10 με διαφορετικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταγραφή. Ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα για τον επίτοπο HA από κύτταρα HEK293 που είχαν διαμολυνθεί με φορείς που έκφραζαν για HA-TAF10wt ή HA-TAF10K189Q έδειξαν ότι το TAF10 μπορεί να αλληλεπιδρά με την RNA-πολυμεράση II (Εικόνα 5A). Στις δυο διαφορετικές ανοσοκατακρήμνισεις του TAF10 ανάλυση κατά Western με αH14 έδειξε ότι

ανιχνεύτηκε RNA-πολυμεράση II που είναι φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 5 του καρβοξυλικού άκρου (Ser-5 CTD) και σχετίζεται με την έναρξη της μεταγραφής, ενώ με το αH5 δεν ανιχνεύτηκε RNA-πολυμεράση II φωσφορυλιωμένη στη σερίνη 2 (Ser-2 CTD) που σχετίζεται με την επιμήκυνση της μεταγραφής (Εικόνα 5A).



Εικόνα 5. Η μεθυλίωση του TAF10 από τη SET9 αυξάνει τη συγγένεια αλληλεπίδρασης του με την RNA-πολυμεράση II

(A) Πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων HEK293 που είχαν διαμολυνθεί παροδικά με τους φορείς έκφρασης που αναφέρονται ανοσοκατακρημνίστηκαν με αHA. Η παρουσία των διαφορετικά φωσφορυλιωμένων μορφών της RNA-πολυμεράσης II ανιχνεύτηκε με ανάλυση Western με τα αντισώματα H14 (Ser5-CTD) και H5 (Ser2-CTD).

(B, Γ) Ίδιες ποσότητες (0.5μg) των GST-TAF10wt και GST-TAF10189Q ακινητοποιήθηκαν σε κολώνα γλουταθειόνης και επώαστηκαν με 1 μg SET9, που παράχθηκε βακτηριακά, απουσία (- SAM) ή παρουσία (+ SAM) 1mM μη ραδιενεργού SAM, για 1hr στους 30°C. Η κολώνα με το ακινητοποιημένο GST-TAF10 ξεπλύθηκε με διάλυμα 500mM NaCl ώστε να απομακρυνθεί το ένζυμο SET9 και ακολούθησε επώαση με πυρηνικά εκχυλίσματα HepG2. Μετά από πλύσεις, η RNA-πολυμεράση II που αλληλεπίδρασε με το GST-TAF10 ανιχνεύτηκε με Western με το αντίσωμα H14. Τα σήματα ποσοτικοποιήθηκαν με το με το πρόγραμμα NIH-image 1.63 (δεξιά γραφήματα).

Καθώς αναμένεται ότι στα κύτταρα στα οποία υπερεκφράζεται το TAF10 μικρό σχετικά ποσοστό του είναι μεθυλιωμένο, η διερεύνηση του ρόλου της μεθυλίωσης του παράγοντα από τη SET9 για την αλληλεπίδραση με την RNA-πολυμεράση II πραγματοποιήθηκε με το σύστημα *in vitro* αλληλεπιδράσεων GST pull-down, με μη μεθυλιωμένη ή μεθυλιωμένη πρωτεΐνη TAF10 που εκφράζεται σε σύντηξη με τη GST. Η RNA-πολυμεράση II από κύτταρα HepG2, που αναγνωρίζεται από το αH14, βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με το μεθυλιωμένο όσο και με το μη μεθυλιωμένο GST-TAF10, όταν οι συνθήκες της επώασης ήταν ήπιες (150mM NaCl). Όταν όμως οι συνθήκες της αλληλεπίδρασης ήταν ιδιαίτερα αυστηρές (500mM NaCl) η αλληλεπίδραση της RNA-πολυμεράσης II ήταν εντονότερη με το μεθυλιωμένο GST-TAF10, παρά με το μη μεθυλιωμένο (Εικόνα 5B). Παρόμοιο πείραμα πραγματοποιήθηκε και με το GST-TAF10189Q, με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται διαφορά στην αλληλεπίδραση της RNA-πολυμεράσης II με την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη, ανεξαρτήτου επώασης με το ένζυμο SET9 (Εικόνα 5Γ). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η μεθυλίωση του TAF10 πιθανότατα να επηρεάζει τη συγγένεια αλληλεπίδρασης του παράγοντα με την RNA-πολυμεράση II.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ελέγχεται από μια σειρά γεγονότων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και ρυθμισμένη συνάθροιση των παραγόντων του προεναρκτηρίου συμπλόκου της μεταγραφής στους υποκινητές. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών οδηγούν σε δυναμικές αλλαγές της δομής της χρωματίνης, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν τη στρατολόγηση των μεταγραφικών συμπλόκων στις ρυθμιστικές περιοχές (Fischle et al., 2003). Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σαφές ότι οι ιστόνες, συνήθως, δεν είναι τα μόνα υποστρώματα των ενζύμων τροποποίησης της χρωματίνης, καθώς οι τροποποιήσεις ρυθμιστικών παραγόντων διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση (Gu and Roeder, 1997; Soutoglou et al., 2000; Chen et al., 2001; Freiman and Tjian, 2003). Η ακετυλίωση και η μεθυλίωση καταλοίπων αργινίνης έχειδειχτεί ότι μπορούν να επηρεάσουν διαφορετικές ιδιότητες των μεταγραφικών παραγόντων, συνδέοντας έτσι τις διαφορετικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους με συγκεκριμένες ρυθμιστικές λειτουργίες. Εκτός από τους μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στο DNA, η ενεργότητα πολλών παραγόντων που συμμετέχουν στην έναρξη και την επιμήκυνση της μεταγραφής έχει βρεθεί ότι τροποποιείται από ακετυλίωση ή μεθυλίωση αργινινών (Imhof et al., 1997; Kwak et al., 2003). Το σύμπλοκο του TFIID αποτελούσε μέχρι προσφάτως εξαίρεση, καθώς δεν υπήρχαν ενδείξεις για την τροποποίηση των υπομονάδων του από τα ένζυμα που τροποποιούν τις ιστόνες.

Στην παρούσα εργασία δείχνεται ότι ο παράγοντας που συνδέεται με το TBP, TAF10 μπορεί να μεθυλιωθεί *in vitro* και *in vivo*, από τη μεθυλάση λυσινών που χαρακτηρίζεται από την περιοχή SET, SET9. Η τροποποίηση εκείνη του παράγοντα έχει θετική επίδραση στη μεταγραφή. Η μεθυλίωση του TAF10 πραγματοποιείται σε ένα μόνο αμινοξύ, τη λυσίνη 189, η οποία βρίσκεται στη περιοχή θηλιάς 2 (loop 2) ανάμεσα στις τελευταίες δυο έλικες του μοτίβου αναδίπλωσης ιστονών. Οι αλληλεπιδράσεις των TAFs που πραγματοποιούνται μέσω του μοτίβου αναδίπλωσης ιστονών έχουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της δομής και στη σταθερότητα του TFIID (Gangloff et al., 2001; Mohan et al., 2003; Soutoglou et al., 2005). Τα

πειράματα ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν ότι τόσο το μεθυλιωμένο όσο και το μη μεθυλιωμένο TAF10 ενσωματώνονται στο λειτουργικό σύμπλοκο του TFIIID, γεγονός που δείχνει ότι η μεθυλίωση δεν αλλάζει τη σύσταση του συμπλόκου. Όπως όμως αναμένεται, η μεθυλίωση αυτή μπορεί να επιφέρει αλλαγές στην οργάνωση των υπομονάδων του συμπλόκου, με τελικό αποτέλεσμα την αλλαγή της λειτουργίας του TFIIID. Σε συμφωνία με την τελευταία υπόθεση, βρέθηκε ότι το TAF10 μπορεί και αλληλεπιδρά με την RNA-πολυμεράση II και η μεθυλίωσή του από τη SET9 πιθανά να αυξάνει τη συγγένεια της αλληλεπίδρασης εκείνης. Με αυτό τον τρόπο, η μεθυλίωση του TAF10 μπορεί να επηρεάσει τη στρατολόγηση της RNA-πολυμεράσης II στους υποκινητές, το οποίο πιθανά να αποτελεί μέρος του μηχανισμού ενίσχυσης της μεταγραφής.

Επιπλέον, στην παρούσα εργασία δείχνεται ότι οι λειτουργικές επιπτώσεις της μεθυλίωσης του TAF10 παρατηρούνται σε περιορισμένο αριθμό γονιδίων. Το TAF10 που φέρει σημειακή μεταλλαγή ώστε να μη μεθυλιώνεται μπορούσε να διασώσει το ρυθμό ανάπτυξης εμβρυϊκών κυττάρων καρκινώματος F9 από τα οποία απουσιάζει το ενδογενές TAF10, αποτέλεσμα που δείχνει ότι η μεθυλίωση του παράγοντα δεν είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή των περισσότερων γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο ή τη διαφοροποίηση σε primitive ή parietal ενδόδερμα. Σε συμφωνία με τα όσα αναφέρθηκαν, η μεθυλίωση του TAF10 είχε ως αποτέλεσμα την μεταγραφική ενίσχυση ενός μικρού συνόλου γονιδίων τα οποία ρυθμίζονται από τον παράγοντα, όπως των γονιδίων ERA και ERF1. Η εξειδίκευση αυτή μπορεί να επέρχεται από την επιλεκτική στρατολόγηση της SET9 σε μεμονωμένους υποκινητές, καθώς με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης φάνηκε ότι η SET9 στρατολογείται στους υποκινητές των γονιδίων ERA και ERF1, αλλά όχι στους υποκινητές της κυκλίνης E και της HPRT. Επιπροσθέτως, η SET9 μπορεί να ενισχύσει τη μεταγραφή που επάγεται από κάποιους ενεργοποιητές (όπως Gal4-VP16 ή RXR/RAR) αλλά όχι από άλλους (όπως NFκB ή HNF-1).

Το ένζυμο SET9 έχει ταυτοποιηθεί ως μεθυλοτρανσφεράση ιστονών, η οποία μεθυλιώνει την ιστόνη 3 στη λυσίνη 4 (H3-K4), τροποποίηση η οποία σχετίζεται με τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Παρά το γεγονός ότι έχει δειχτεί πως όταν η ιστόνη 3 βρίσκεται πακεταρισμένη σε νουκλεοσώματα δεν αποτελεί καλό υπόστρωμα για τη SET9, η μεθυλίωση της H3 δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι αποτελεί μέρος του μηχανισμού δράσης της SET9 (Nishioka et al., 2002). Από την άλλη, *in vivo*

πειράματα για τη λειτουργική μελέτη της μεθυλίωσης του TAF10 έδειξαν ότι η μεθυλίωση του παράγοντα αποτελεί μέρος του μηχανισμού ενίσχυσης της μεταγραφής από τη SET9. Υπερέκφραση του μεταλλαγμένου TAF10 που δεν μπορεί να μεθυλιωθεί μαζί με τη SET9 δεν είχε ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη μεταγραφική ενεργότητα, σε αντίθεση με την περίπτωση εκείνη που υπερεκφραζόταν η αγρίου τύπου πρωτεΐνη TAF10. Παρά το ότι ο ακριβής μηχανισμός δράσης της SET9 δεν έχει αποκαλυφθεί είναι πιθανό ότι η μεθυλίωση του TAF10 και της ιστόνης 3 αποτελούν αλληλοεξαρτώμενα-διαδοχικά γεγονότα, μέσα από τα οποία το ένζυμο μπορεί και επάγει την μεταγραφή. Θα πρέπει σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι στην περίπτωση των υποκινητών των γονιδίων της κυκλίνης E και HPRT η μεθυλίωση της K4-H3 δεν σχετίζεται με την παρουσία της SET9, υποδεικνύοντας ότι τουλάχιστον σε εκείνες τις περιπτώσεις η μεθυλίωση της ιστόνης πραγματοποιείται από κάποια άλλη μεθυλάση. Επίσης, η έκφραση του μεταλλαγμένου TAF10 στα F9 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων, όπως ERA και ERF1, αλλά όχι την απόλυτη εξάλειψη της, αποτέλεσμα το οποίο δείχνει ότι μόνη της η μεθυλίωση του TAF10 από τη SET9 ενορχηστρώνει το μέγιστο της μεταγραφικής ενεργοποίησης ενός γονιδίου, αλλά δεν διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην καθιέρωση της μεταγραφής. Τέτοιου είδους μηχανισμοί ρύθμισης μπορούν να παρέχουν στα κύτταρα τη δυνατότητα να επηρεάζουν την αποδοτικότητα της μεταγραφής, και να ρυθμίζουν τις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις ενός παράγοντα σε κάποιες συγκεκριμένες συνθήκες.

Το TAF10 αποτελεί κύριο συστατικό του συμπλόκου TFIIID που παίζει σημαντικό ρόλο στη συνάθροιση του προεναρκτηρίου συμπλόκου μεταγραφής στους υποκινητές, μέσω αναγνώρισης του υποκινητή και αλληλεπιδράσεων με την περιοχή ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων. Σε κύτταρα θηλαστικών έχουν βρεθεί περισσότερα του ενός συμπλόκων TFIIID, τα οποία διαφέρουν στη σύσταση των υπομονάδων TAF (Bell and Tora, 1999; Bell et al., 2001; Muller and Tora, 2004). Η ποικιλία δράσης των συμπλόκων TFIIID σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και γονίδια αντικατοπτρίζει και τον ιδιαίτερης σημασίας ρόλο του στον καθορισμό των ποικιλόμορφων γονιδιακών προτύπων. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι η δράση του TFIIID σε συγκεκριμένα γονίδια μπορεί να ρυθμίζεται και από τροποποιήσεις των υπομονάδων του TAF, παρέχοντας έτσι έναν επιπρόσθετο μηχανισμό πολυπλοκότητας στη ρύθμιση της μεταγραφής. Τέλος, η αναγνώριση του πρώτου μη ιστονικού παράγοντα ως υπόστρωματος της SET9 δείχνει μια ευρύτερη

δράση των ενζύμων με την χαρακτηριστική επικράτεια SET, η οποία μπορεί να υποκαθιστά ή πιθανότερα να συμβαίνει παράλληλα με την τροποποίηση των ιστονών χρωματίνης.

Μετά το πέρας της εργασίας που παρατέθηκε, μια ακόμα επιστημονική μελέτη έγινε γνωστή, στην οποία αποδεικνύεται ότι το ένζυμο SET9 μπορεί και μεθυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα p53 (Chuikov et al., 2004). Στην εργασία εκείνη φαίνεται ότι η SET9 μεθυλιώνει το p53, στο καρβοξυτελικό άκρο του, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα και σταθερότητα του παράγοντα. Η μεθυλίωση εκείνη είναι απαραίτητη για την απόκριση σε συνθήκες βλάβης του DNA. Η εργασία εκείνη έρχεται να επιβεβαιώσει το σημαντικό ρόλο της SET9, καθώς το p53 αποτελεί ένα επιπλέον υπόστρωμα, που μαζί με το TAF10 δείχνουν ότι η δράση του ενζύμου μπορεί να εμπλέκεται στη μεταγραφική ρύθμιση μέσω της μεθυλίωσης των παραγόντων που ελέγχουν τη μεταγραφή και όχι μόνο μέσω της μεθυλίωσης της H3.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

**ΟΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΠΟΥ
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΖΟΥΝ ΕΝΕΡΓΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΑΡΑΜΕΝΟΥΝ
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΙ ΜΙΤΩΤΙΚΗ
ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σε πολυκύτταρους οργανισμούς ο καθορισμός των διαφόρων κυτταρικών τύπων επιτυγχάνεται μέσα από τη διαδικασία ρύθμισης της έκφρασης των διαφορετικών συνόλων γονιδίων. Σε κάθε κυτταρικό τύπο, ένα συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης επιλέγεται κατά την κυτταρική διαφοροποίηση και διατηρείται για τις επόμενες κυτταρικές γενιές. Οι δυναμικές αλλαγές της δομής της χρωματίνης στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων έχουν εμπλακεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση και την καταστολή των γονιδίων, καθώς επίσης και τη μετάδοση των επιγενετικών πληροφοριών στις επόμενες κυτταρικές γενιές (Emerson, 2002; Fischle et al, 2003; Lachner and Jenuwein, 2002). Οι δομικές αλλαγές της χρωματίνης για την καταστολή και ενεργοποίηση των γονιδίων προκαλούνται από την τοπική και τις περισσότερες φορές, συντονισμένη δράση των ενζύμων που τροποποιούν τις αμινοτελικές ουρές των ιστονών καθώς επίσης και εκείνων που προκαλούν αναδιαμόρφωση χρωματίνης με κατανάλωση ATP (Berger, 2002; Narlikar et al, 2002). Ο ισχυρός συσχετισμός μεταξύ των διαφόρων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών και της μεταγραφικής ενεργότητας μιας περιοχής έχουν ωθήσει στη δημιουργία του κώδικα των ιστονών (histone code hypothesis) (Turner, 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Turner, 2002). Σύμφωνα με την υπόθεση του κώδικα των ιστονών, οι συνδυασμοί των διαφορετικών τροποποιήσεων των νουκλεοσωμάτων απαρτίζουν έναν «κώδικα» που αναγνωρίζεται από μη ιστονικούς παράγοντες, οι οποίοι με τη σειρά τους μπορούν ρυθμίζουν διαφορετικές λειτουργικές παραμέτρους της χρωματίνης. Οι τροποποιήσεις των ιστονών ενδεχομένως να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην εγκαθίδρυση ενός γονιδιακού προτύπου, καθώς για παράδειγμα, η μεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης 3 (H3-K9) από το Suv39h1 μπορεί να στρατολογήσει την πρωτεΐνη HP1 και να δημιουργήσει έτσι μια σταθερή-κατασταλτική δομή χρωματίνης, η οποία μπορεί να μεταδίδεται και στα γειτονικά νουκλεοσώματα με τη στρατολόγηση περισσότερων συμπλόκων Suv39h1-HP1 (Bannister et al, 2001; Lachner et al, 2001). Με αυτόν τον τρόπο, ο κώδικας της μεθυλίωσης της H3-K9 έχει εμπλακεί στη δημιουργία και τη διατήρηση της κατασταλτικής ετεροχρωματινικής δομής της χρωματίνης (Jenuwein, 2001; Grewal and Elgin, 2002).

Τα μεταγραφικά ενεργά γονίδια χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες τροποποιήσεις των ιστονών, στις οποίες περιλαμβάνονται η ακετυλίωση και η μεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3-K4), οι οποίες είναι γνωστό ότι έχουν σημαντικό ρόλο στη συνάθροιση και τη λειτουργία των συστατικών του προεναρκτηρίου συμπλόκου έναρξης στους υποκινητές κατά τη μεταγραφική ενεργοποίηση (Agalioti et al, 2000; Agalioti et al, 2002; Kouzarides, 2002; Fischle et al, 2003). Μετά την ενεργοποίηση, τα περισσότερα γονίδια παραμένουν ενεργά για πολλές κυτταρικές διαιρέσεις, εγκαθιδρύοντας έτσι ένα υποσύνολο γονιδίων που εκφράζονται σταθερά, χαρακτηριστικό για έναν κυτταρικό τύπο. Σε αντίθεση όμως με την περίπτωση της ετεροχρωματίνης που αναφέρθηκε, ο πιθανός ρόλος των τροποποιήσεων ιστονών στη διατήρηση της ενεργής μεταγραφικά χρωματίνης δεν έχει διερευνηθεί. Αν οι τροποποιήσεις των ιστονών ασκούν κάποια επίδραση και στη διατήρηση της μεταγραφής, η μεθυλίωση τους αναμένεται να λειτουργεί ως γνώρισμα των ενεργών γονιδίων, κυρίως επειδή σε αντίθεση με την ακετυλίωση, η μεθυλίωση λυσινών είναι ιδιαίτερα σταθερή. Πραγματικά, πρόσφατες μελέτες στον *Saccharomyces cerevisiae* έχουν δείξει ότι η μεθυλίωση ιστονών Set1 βρίσκεται στην 5' κωδική περιοχή των μεταγραφικά ενεργών γονιδίων, όπου και καταλύει την τρι-μεθυλίωση της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3-K4) (Ng et al, 2003). Η παρουσία της υπερμεθυλιωμένης H3-K4 στην κωδική περιοχή παραμένει για το διάστημα των πρώτων 5hr μετά την καταστολή της μεταγραφής και την αποσύνδεση της Set1 από την χρωματίνη, δείχνοντας έτσι ότι η τροποποίηση εκείνη μπορεί είναι ενδεικτική για την παρουσία πρόσφατης μεταγραφικής ενεργότητας. Επειδή όμως η τρι-μεθυλίωση της H3-K4 μειωνόταν αισθητά μετά την πάροδο 5hr το φαινόμενο έχει χαρακτηριστεί ως «μικρής διάρκειας μεταγραφική μνήμη» (short-term transcriptional memory) (Ng et al, 2003).

Σε ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η μεθυλίωση της H3-K4 επίσης σχετίζεται με την μεταγραφική ενεργότητα. Σε αντίθεση όμως με τον σακχαρομύκητα όπου η διπλή μεθυλομάδα της H3-K4 παρουσιάζει ευρεία κατανομή σε ολόκληρο σχεδόν το γονιδίωμα, σε κύτταρα θηλαστικών τόσο η διπλή όσο και η τριπλή μεθυλομάδα στην H3-K4 κορυφώνονται στην 5' κωδική περιοχή πολλών ενεργών γονιδίων (Schneider et al, 2004). Επιπρόσθετα, σημαντικά επίπεδα μεθυλίωσης της H3-K4 έχουν παρατηρηθεί και στα γονίδια της περιοχής της β-σφαιρίνης και στο HNF-4 κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης, πριν την έναρξη της μεταγραφής τους, υποδεικνύοντας ότι η συγκεκριμένη τροποποίηση εμπλέκεται στην

εγκαθίδρυση αλλά και τη διατήρηση μιας δυναμικά-ενεργής χρωματίνης (Hatzis and Talianidis, 2002; Schneider et al, 2004). Παρά το γεγονός ότι σημαντικές μελέτες έχουν δείξει τη λειτουργία του κώδικα των ιστονών (histone code) κατά την μεταγραφή, άμεση απόδειξη για τον ενδεχόμενο ρόλο της H3-K4 μεθυλίωσης ή όποιας άλλης τροποποίησης ως «σημάδι» μεταγραφικής μνήμης, απουσιάζει.

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν πληθώρα τροποποιήσεων των ιστονών στον υποκινητή και την κωδική περιοχή τριών μεταγραφικά ενεργών ηπατικών γονιδίων. Σύγκριση των αποτελεσμάτων στους πληθυσμούς των κυττάρων που βρίσκονται στη G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου ή έχουν σταματήσει στη μίτωση ή έχουν υποστεί παρεμπόδιση της μεταγραφής λόγω της παρουσίας α -αμανιτίνης έδειξε ότι τα πρότυπα κατανομής της ακετυλίωσης της ιστόνης 3 και 4 και της μεθυλίωσης της λυσίνης 4 και 79 της ιστόνης 3 είναι ιδιαίτερα σταθερά. Τα πειραματικά αποτελέσματα επίσης δείχνουν μια ειδική για κάθε γονίδιο και εξαρτώμενη από τη μεταγραφή μετακίνηση των ακετυλασών ιστονών και των παραγόντων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης στην κωδική περιοχή, η οποία έχει ως αποτέλεσμα ένα εντοπισμένο πρότυπο ακετυλίωσης ιστονών και αναδιαμορφωμένων νουκλεοσωμάτων στην περιοχή καταρροϊκά των υποκινητών. Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν πληροφορίες για το μηχανισμό δημιουργίας της ανοιχτής χρωματίνης γύρω από τους υποκινητές των ενεργών γονιδίων και το ρόλο των τροποποιήσεων ιστονών στη μετάδοση της ενεργής χρωματινικής δομής κατά τις κυτταρικές διαιρέσεις.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εντοπισμένες τροποποιήσεις ιστονών στο 5' άκρο της κωδικής περιοχής ενεργών ηπατικών γονιδίων, οι οποίες παραμένουν και μετά από μεταγραφική και μιτωτική αδρανοποίηση

Η ανάλυση των τροποποιήσεων ιστονών στον υποκινητή και την κωδική περιοχή των ενεργών γονιδίων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης (chromatin immunoprecipitation, ChIP) η οποία έφερε μικρές τροποποιήσεις. Μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων HepG2 ή HEK-293 παρασκευάστηκαν πυρήνες, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πέψη με μικροκοκκική νουκλεάση (micrococcal nuclease, MNase). Το διαλυτό κλάσμα των μονο-νουκλεοσωμάτων της χρωματίνης υποβλήθηκε σε ανοσοκατακρήμιση με διάφορα αντισώματα και ακολούθησε ανάλυση των τμημάτων DNA με real-time PCR, με ειδικούς εκκινητές για τον υποκινητή και διαφορετικές θέσεις στην κωδική περιοχή των γονιδίων της αλβουμίνης (albumin), του πυρηνικού ηπατικού παράγοντα 4 και 1 (HNF-4 και HNF-1, αντίστοιχα). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε πληθυσμό κυττάρων HepG2 που είναι εμπλουτισμένος σε κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου και εκφράζουν συνεχώς τα γονίδια που αναφέρθηκαν, σε κύτταρα HepG2 που έχουν σταματήσει στη φάση της μίτωσης μετά από επίδραση nocodazole ή σε HepG2 που έχουν υποστεί κατεργασία με τον καταστολέα της RNA-πολυμεράσης II, α-αμανιτίνη ή σε HEK 293, τα οποία δεν εκφράζουν τα προς ανάλυση γονίδια.

Προκειμένου τα αποτελέσματα από τους διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων να είναι συγκρίσιμα αλλά και να αντικατοπτρίζουν τις διαφορές των τιμών με βάση τη μεταγραφή των γονιδίων, όλες οι τιμές των διαφορετικών ανοσοκατακρήμισεων εκφράστηκαν σε σχέση με το input και σε σύγκριση με τη τιμή ενός νουκλεοσώματος-μάρτυρα, εξωτερικά της κωδικής περιοχής του αναλυόμενου γονιδίου, στα G0/G1 HepG2 κύτταρα. Τα νουκλεοσώματα που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας βρίσκονται 4-9 kb καταρροϊκά της θέσης πολυαδενυλίωσης των γονιδίων. Στα πειράματα ανοσοκατακρήμισης που αναλύονταν οι τροποποιήσεις ιστονών, το μέσο όρο των τιμών του νουκλεοσώματος-μάρτυρα σε σχέση με τη τιμή του

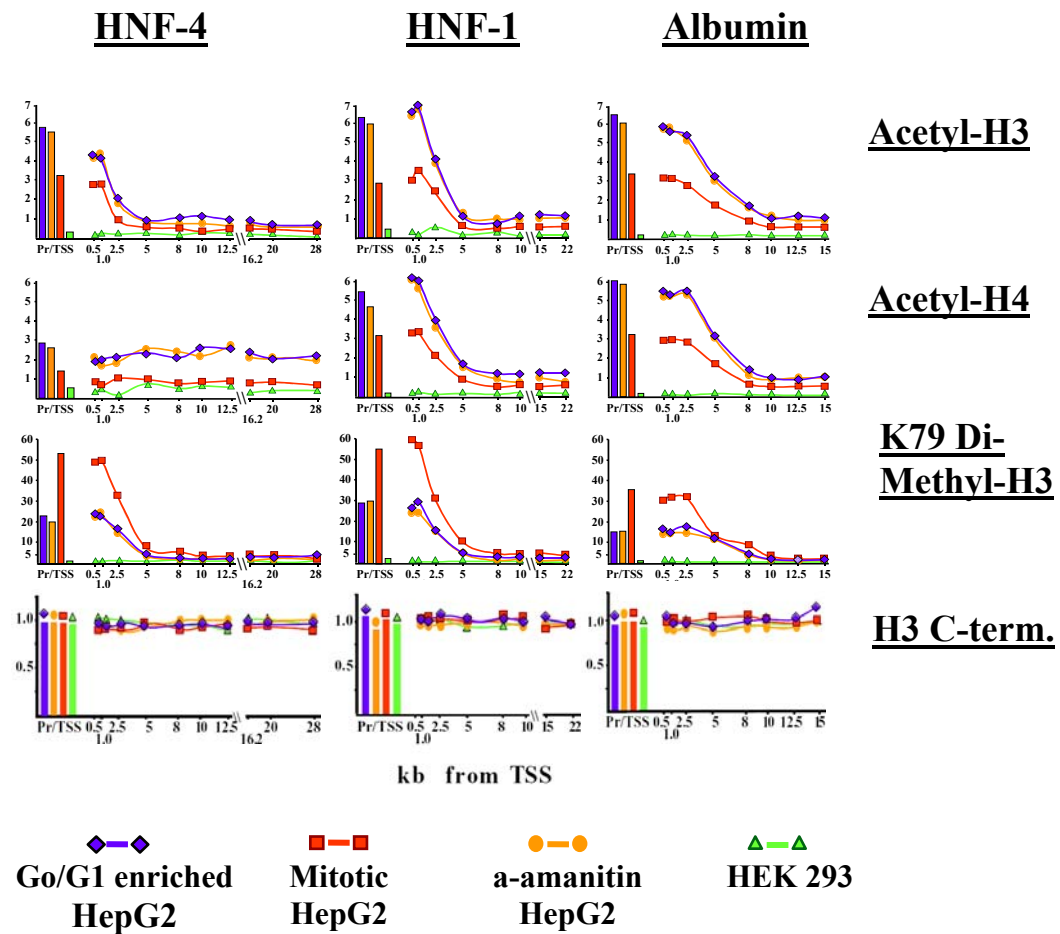
δείγματος που περιείχε μη ανοσοποιημένο ορρό ήταν : 0.95 ως 1.05 στα HEK 293 κύτταρα, 2.5 ως 2.8 στα G0/G1-εμπλουτισμένα HepG2 κύτταρα, 1.4 ως 1.7 στα μιτωτικά HepG2 και 2.4 ως 2.8 στα κύτταρα HepG2 που μεγάλωναν παρουσία α-αμανιτίνης. Οι διαφορές των τιμών στα HepG2 και HEK 293 αντιστοιχούν σε γενικές διαφορές της χρωματινικής περιοχής των κυττάρων που δεν συσχετίζονται με τη μεταγραφή.

Όπως αναμενόταν υψηλά επίπεδα ακετυλίωσης της ιστόνης 3 και 4 (H3 και H4, αντίστοιχα) παρατηρήθηκαν στο νουκλεόσωμα που βρίσκεται στο σημείο έναρξης της μεταγραφής και στα τρία γονίδια (Εικόνα 6). Με εξαίρεση την υπερακετυλίωση της H4 στο HNF-4 γονίδιο, τα νουκλεοσώματα με υπερακετυλιωμένη H3 και H4 ανιχνεύονταν για μια μεγάλη απόσταση (2.5 ως 5 kb) καταρροϊκά των υποκινητών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τόσο το πρότυπο κατανομής όσο και οι απόλυτες τιμές των ακετυλιωμένων ιστονών δεν άλλαζαν μετά από διακοπή της μεταγραφής για 5h, παρουσία α-αμανιτίνης (Εικόνα 6). Ομοίως, στα κύτταρα που είχαν σταματήσει στη μίτωση το πρότυπο κατανομής παρέμενε (Mitotic HepG2, Εικόνα 6), αλλά οι απόλυτες τιμές κυμαίνονταν από 50-65% σε σχέση με τις τιμές των G0/G1-εμπλουτισμένων HepG2. Λαμβάνοντας κανένας υπόψη ότι η τοποθέτηση των οκταμερών ιστονών γίνεται τυχαία κατά το διπλασιασμό του DNA, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η υπερακετυλίωση ιστονών του νουκλεοσώματος του υποκινητή και της 5' κωδικής περιοχής των γονιδίων είναι μια σταθερή τροποποίηση που δεν διαγράφεται από τα πατρικά νουκλεοσώματα μετά από μεταγραφική και μιτωτική αδρανοποίηση. Η υπερακετυλίωση εκείνη των ιστονών είναι ενδεικτική της πρόσφατης μεταγραφικής ενεργότητας, καθώς απουσιάζει από κύτταρα που δεν εκφράζουν τα γονίδια, HEK-293.

Όμοιο πρότυπο κατανομής παρατηρήθηκε για τη διπλή μεθυλίωση της λυσίνης 79 της ιστόνης 3 (H3-K79), μιας ακόμα τροποποίησης που σχετίζεται με ενεργά γονίδια. Στα μιτωτικά όμως κύτταρα το σήμα της μεθυλίωσης H3-K79 ήταν περίπου διπλάσιο σε σχέση με τον G0/G1 πληθυσμό, δείχνοντας έτσι ότι η συγκεκριμένη τροποποίηση μπορεί να δημιουργείται και κατά τη διάρκεια ή μετά τη S φάση (Εικόνα 6).

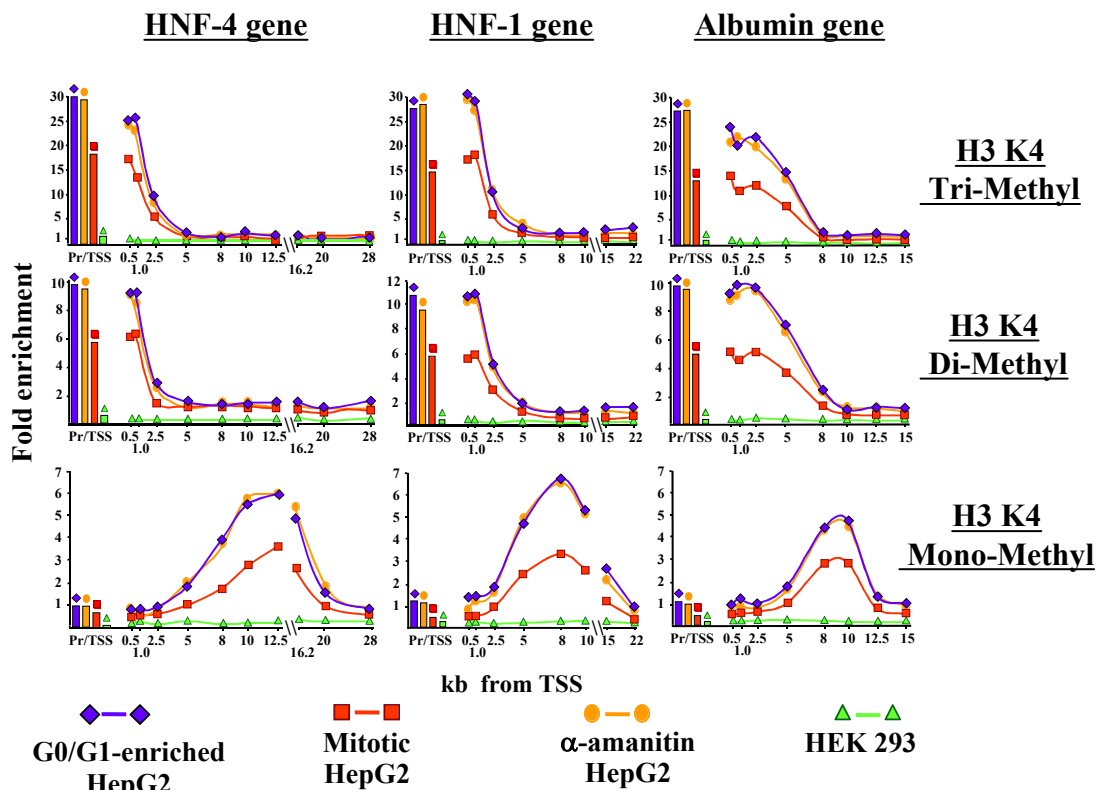
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον επίσης παρουσίασε και η μελέτη των διαφορετικά μεθυλιωμένων μορφών της λυσίνης 4 της ιστόνης 3 (H3-K4). Όμοια με το πρότυπο κατανομής των τροποποιήσεων που έχει αναφερθεί για το γονίδιο της καρβονικής ανυδράσης και το GAPDH (Schneider et al, 2004), υψηλά επίπεδα τρι- και δι-

μεθυλίωσης ανιχνεύτηκαν στην κωδική περιοχή του HNF-4, HNF-1 και της αλβουμίνης αλλά και του υποκινητή τους (Εικόνα 7).



Εικόνα 6. Κατανομή των υπερακετυλιωμένων νουκλεοσωμάτων και εκείνων που φέρουν διμεθυλομάδα στη H3-K79, στα γονίδια HNF-4, HNF-1 και αλβουμίνης.

Πειράματα ChIPs πραγματοποιήθηκαν σε HepG2 που ήταν εμπλουτισμένα σε κύτταρα G0/G1 φάσης, που είχαν σταματήσει στη G2/M μετά από κατεργασία με nocodazole ή που η μεταγραφή είχε κατασταλεί λόγω παρουσίας α-αμανιτίνης και σε HEK 293. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αναγνωρίζουν K9/K14 ακετυλιωμένη H3 (Acetyl-H3), ακετυλιωμένη H4 (Acetyl-H4) ή διμεθυλιωμένη K79. Οι τιμές αντιστοιχούν σε μετρήσεις real-time PCR του DNA που περιέχεται σε κάθε ChIP εκφρασμένο σε σχέση με τη τιμή του νουκλεοσώματος-μάρτυρα των G0/G1 HepG2 (Υ άξονας αριστερά). Pr/TSS αντιστοιχεί στο νουκλεόσωμα που βρίσκεται στο σημείο έναρξης της μεταγραφής και οι αριθμοί αντιστοιχούν σε kb από το TSS.



Εικόνα 7. Κατανομή των νουκλεοσωμάτων με μεθυλιωμένη λυσίνη 4 της ιστόνης 3 στα γονίδια HNF-4, HNF-1 και αλβουμίνης.

Τα αντισώματα που αναγνωρίζουν τις διαφορετικά μεθυλιωμένες K4 φαίνονται δεξιά ενώ η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε όπως και στην προηγούμενη εικόνα.

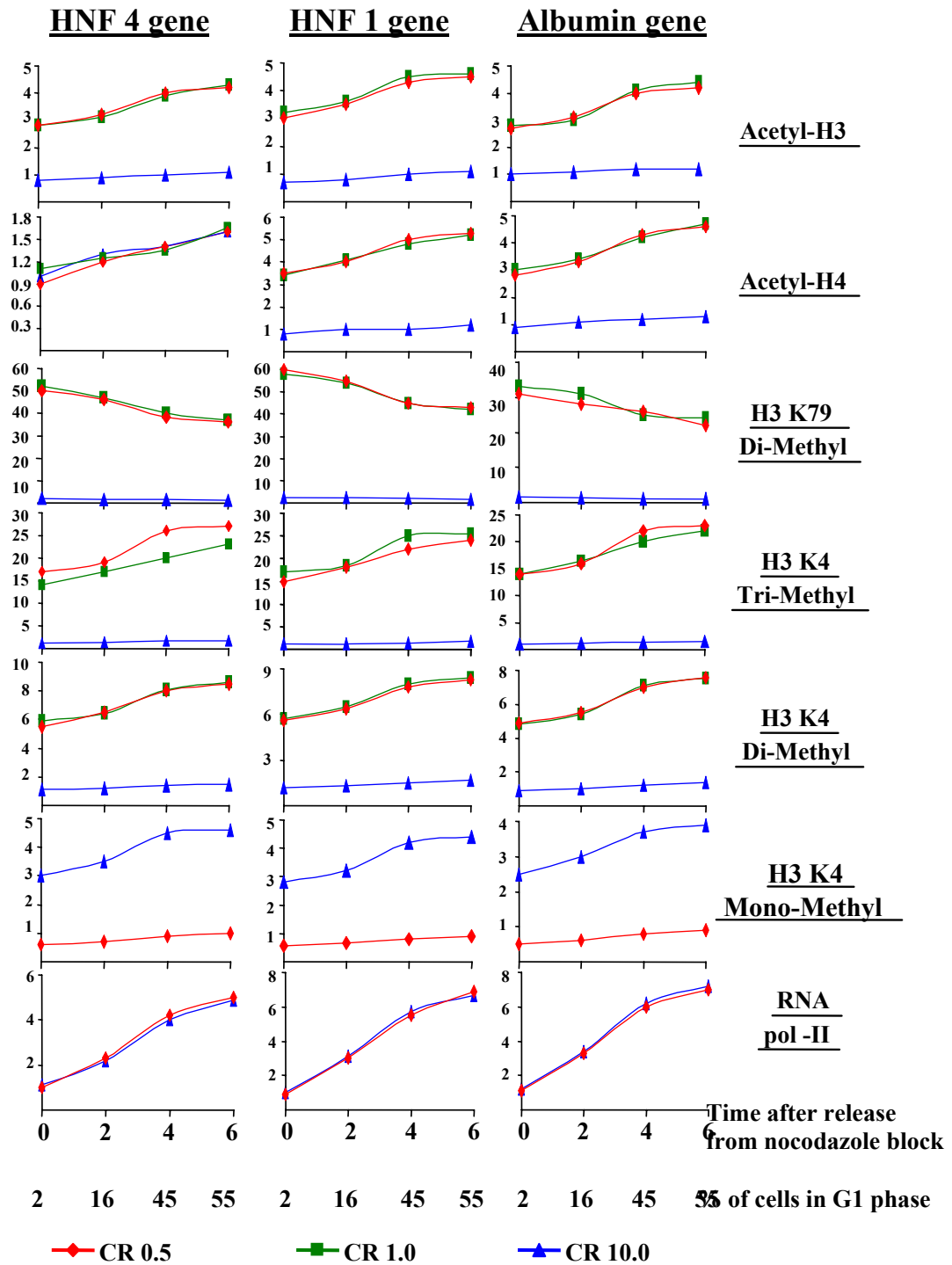
Αντιθέτως, η τροποποίηση της μόνο-μεθυλίωσης της H3-K4 παρουσιαζόταν στα νουκλεοσώματα εκείνης της περιοχής όπου η δι- και τρι-μεθυλίωση είχε μειωθεί, ενώ η υψηλότερη τιμή παρουσιαζόταν στο μέσο περίπου της κωδικής περιοχής των γονιδίων (Εικόνα 7). Και στις τρεις περιπτώσεις όμως μεθυλίωσης της H3-K4 οι τιμές μεθυλίωσης παρέμεναν σταθερές στα κύτταρα όπου η μεταγραφή είχε ανασταλεί με α -αμανιτίνη, ενώ στα μιτωτικά κύτταρα οι τιμές κυμαίνονταν περίπου στο μισό με εκείνες του G0/G1 πληθυσμού. Στα HEK-293 κανενός είδους μεθυλίωση της K4 δεν παρουσιάστηκε όμοια με την ακετυλίωση, ενώ πειράματα με το αντίσωμα για μεθυλιωμένη H3-K9 και K36 δεν έδωσαν ισχυρά σήματα.

Η διαφορά που παρατηρείται στις τιμές των κυττάρων στη G0/G1 και σε εκείνα που έχουν σταματήσει στη μίτωση δείχνει ότι οι τροποποιήσεις παραμένουν αναλλοίωτες στα νουκλεοσώματα, ενώ κατά τη διάρκεια του διπλασιασμού του DNA νέα νουκλεοσώματα που δεν φέρουν ακετυλίωση και K4 μεθυλίωση των ιστονών ενσωματώνονται και οι τροποποιήσεις των ιστονών αποκαθίστανται πλήρως όταν τα

κύτταρα μούνε στην επόμενη G1 και η μεταγραφή αποκατασταθεί. Δεδομένα που ενισχύουν την άποψη αυτή ήρθαν από πειράματα απελευθέρωσης των κυττάρων που είχαν σταματήσει στη φάση της μίτωσης. Κατά τα πειράματα εκείνα παρατηρήθηκε αύξηση της ακετυλίωσης, της μόνο-, δι- και τρι-μεθυλίωσης της K4 και μείωση για τη μεθυλίωση της K79 (Εικόνα 8). Το σημαντικό είναι ότι οι αλλαγές των τιμών των ChIPs σχετίζονται άμεσα με το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη G1 φάση και την παρουσία της RNA- πολυμεράσης II.

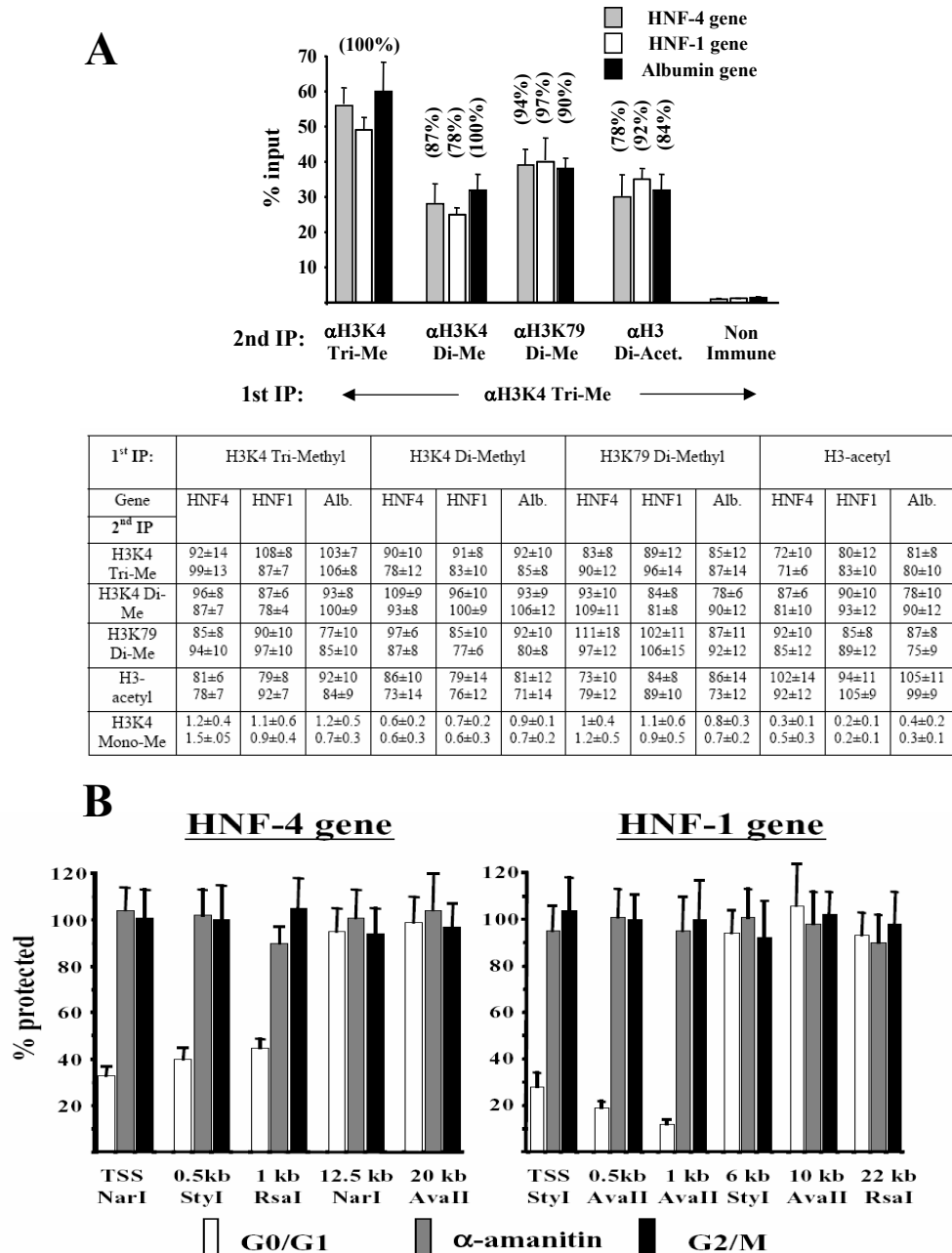
Καθώς η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο μονο-νουκλεοσωμάτων η ανίχνευση τρι- και δι-μεθυλίωσης της K4 στις ίδιες περιοχές μπορεί να είναι αποτέλεσμα παρουσίας των τροποποιήσεων στο ίδιο νουκλεόσωμα, ή να οφείλεται σε διαφορές των δυο αλληλομόρφων ή να είναι το αποτέλεσμα ή να είναι το αποτέλεσμα της παρουσίας δυο διαφορετικών πληθυσμών στο πείραμα, ενός με δι-μεθυλιωμένη K4 και ενός με τρι-μεθυλιωμένη K4 στο συγκεκριμένο νουκλεόσωμα. Προκειμένου να διερευνηθεί ποια από τις απόψεις ήταν και η αληθινή πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαδοχικής ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ReChIP). Νουκλεοσώματα με τρι-μεθυλιωμένη K4 επιλέχθηκαν στο πρώτο IP και μετά την έκλουση υποβλήθηκαν σε δεύτερο IP με αντίσωμα για τη δι-μεθυλιωμένη K4. Όπως φαίνεται στην εικόνα 9 σημαντικό σήμα ανιχνεύτηκε στο νουκλεόσωμα του 1 kb καταρροϊκά του TSS και στα τρία γονίδια, δείχνοντας έτσι ότι οι δυο τροποποιήσεις βρίσκονται στα δυο διαφορετικά μόρια ιστονών του ίδιου νουκλεοσώματος. Σημαντικό επίσης είναι ότι σημαντικά σήματα ανιχνεύτηκαν και όταν χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για ακετυλιωμένη H3 και μεθυλιωμένη K79. Μετά την κανονικοποίηση των τιμών και λαμβάνοντας υπόψη την αποδοτικότητα με την οποία μπορεί το κάθε αντίσωμα να ανοσοκατακρημνίζει κατά τη δεύτερη ανοσοκατακρήμνιση καθώς και επαναλαμβάνοντας το ReChIP με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς 1^{ου} και 2^{ου} αντισώματος φάνηκε ότι οι τιμές προσέγγιζαν το 71-100% inputs για όλα τα αντισώματα (Εικόνα 9). Συνοπτικά, σε κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G0/G1 το ένα από τα δυο μόρια H3 φέρει δι-μεθυλίωση και το άλλο τρι-μεθυλίωση της K4, το ένα τουλάχιστον από εκείνα έχει μεθυλιωμένη την K79 ενώ το ένα ή και τα δυο είναι ακετυλιωμένα.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι πολλαπλές τροποποιήσεις ιστονών διακοσμούν τα νουκλεοσώματα της 5' κωδικής περιοχής των ανθρώπινων γονιδίων που αναλύθηκαν με ChIP, οι οποίες παραμένουν μετά από μιτωτική και μεταγραφική αδρανοποίηση.



Εικόνα 8. Τροποποιήσεις ιστονών μετά από απελευθέρωση από μιτωτικό arrest

HerG2 σταμάτησαν στη φάση G2/M παρουσία nocodazole 50 ng/ml. Τα κύτταρα που είχαν αποκολληθεί ξεπλύθηκαν δυο φορές με το θρεπτικό (DMEM + 10% fetal calf serum) και συλλέχθηκαν μετά από τον χρόνο που αναγράφεται. ChIP πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των αντισωμάτων που αναγράφονται δεξιά, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε και ανάλυση FACS. Οι αριθμοί στο κάτω μέρος αντιστοιχούν στο ποσοστό των κυττάρων με 2N DNA (%G1 cells) σε σύγκριση με τον ολικό πληθυσμό (G1+S+G2/M).



Εικόνα 9. Πολλαπλές τροποποιήσεις ιστονών στο ίδιο νουκλεόσωμα και «ανοιχτή» δομή χρωματίνης στην 5' κωδική περιοχή των HNF-1 και HNF-4.

(A) Τα σύμπλοκα υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με αH3-K4 trimethyl και μετά από έκλυση ακολούθησε 2^ο IP με τα αντισώματα που φαίνονται στο κάτω μέρος. Ως input θεωρείται το συνολικό ποσό της χρωματίνης που εκλούστηκε, ενώ τα νούμερα στις παρενθέσεις αντιστοιχούν σε τιμές όπως διαμορφώνονται μετά από κανονικοποίηση με το input και την αποδοτικότητα επαν-ανοσοκατακρήμνισης του αντισώματος. Ο πίνακας αναφέρεται σε τιμές ReChIP ως ποσοστό του input στις περιοχές 0.5 και 1kb των τριών γονιδίων, λαμβάνοντας υπόψη την τιμή του δείγματος με μη ανοσοποιημένο orpό και την απόδοση του αντισώματος.

(B) Πείραμα ανίχνευσης υπερευαισθησίας σε περιοριστικές ενδονουκλεάσες των διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών. Οι ράβδοι αντιστοιχούν σε τιμές real-time PCR του άκοπου DNA σε σχέση με το δείγμα που δεν επωάστηκε με ένζυμο, του οποίου η τιμή θεωρείται αυθαίρετα ως 100% άκοπο.

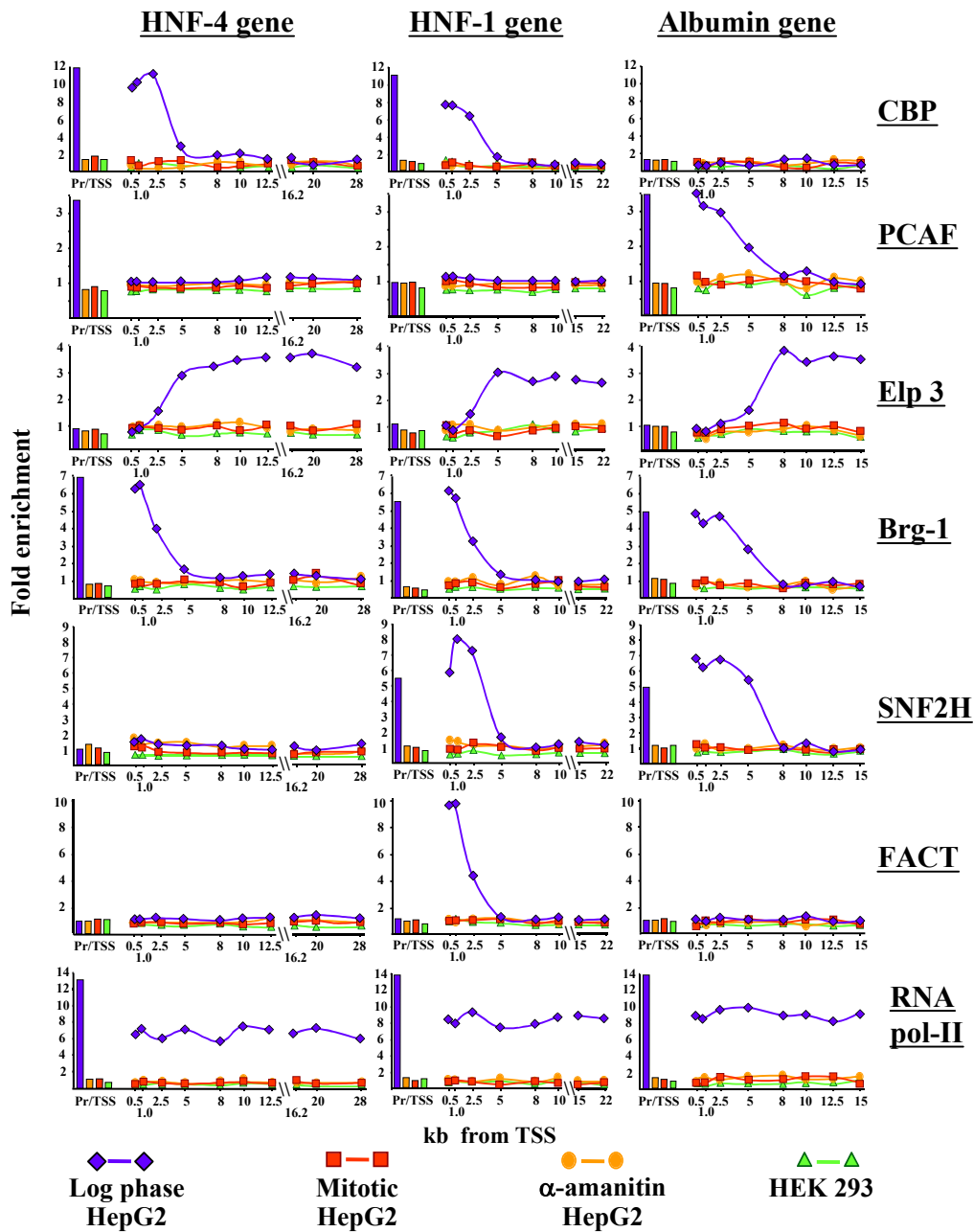
Αλλαγές στη δομή της χρωματίνης στη 5' κωδική περιοχή, οι οποίες εξαρτώνται από την παρουσία μεταγραφής

Καθώς κατά τη μεταγραφική ενεργοποίηση η υπερακετυλίωση ιστονών και η αναδιαμόρφωση χρωματίνης συμβαίνουν συνήθως παράλληλα, πειράματα ανάλυσης της δομής της χρωματίνης πραγματοποιήθηκαν στις 5' κωδικές περιοχές των γονιδίων με υπερακετυλιωμένα νουκλεοσώματα, σε σύγκριση με τις περιοχές εκείνες των γονιδίων που δεν χαρακτηρίζονται από υπερακετυλιωμένα και υπερμεθυλιωμένα νουκλεοσώματα. Το DNA που έχει πακεταριστεί σε νουκλεοσώματα δεν είναι ευαίσθητο σε πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, ενώ η αναδιαμόρφωση χρωματίνης αυξάνει συνήθως την ευαισθησία του στα ένζυμα. Για τη διερεύνηση της χρωματινικής πραγματοποιήθηκε η τεχνική υπερευαισθησίας σε περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε περιοχές των γονιδίων HNF-4 και HNF-1, σε G0/G1, μιτωτικά ή HepG2 που έχουν μεγαλώνουν παρουσία α-αμανιτίνης. Στα κύτταρα της φάσης G0/G1 σημαντικό ποσοστό του DNA των νουκλεοσωμάτων στα 0.5 και 1 kb είχε υποστεί πέψη, αλλά νουκλεοσώματα που βρίσκονται πιο εσωτερικά της κωδικής περιοχής δεν είχαν κοπεί (Εικόνα 9B), αποτέλεσμα που δείχνει ότι υπάρχει μια ευρεία περιοχή αναδιαμορφωμένης χρωματίνης καταρροϊκά των υποκινητών, η οποία περιορίζεται στο 5' άκρο της κωδικής περιοχής. Εκείνη η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης είναι αυστηρά εξαρτώμενη από τη μεταγραφή, καθώς δεν παρατηρείται όμοια ευαισθησία σε περιοριστικές ενδονουκλεάσες στα κύτταρα που η μεταγραφή έχει σταματήσει λόγω παρουσίας α-αμανιτίνης ή nocodazole (Εικόνα 9B) ή σε κύτταρα που δεν εκφράζουν τα γονίδια HEK-293.

Στρατολόγηση των ακετυλασών ιστονών και των ενζύμων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης στην 5' κωδική περιοχή των ενεργών γονιδίων, που είναι ειδική για κάθε γονίδιο

Προκειμένου να μελετηθούν οι παράγοντες που δημιουργούν την υπερακετυλίωση ιστονών και την αναδιαμόρφωση χρωματίνης στη 5' κωδική περιοχή των γονιδίων της αλβουμίνης, HNF-4 και HNF-1, μελετήσαμε την πιθανή πρόσδεση ενζύμων με ενεργότητα ακετυλίωσης ιστονών όπως το CBP, PCAF και της υπομονάδας του συμπλόκου επιμήκυνσης E1p3, ομόλογα των υπομονάδων του συμπλόκου αναδιαμόρφωσης χρωματίνης (Brg-1) καθώς και SNF2H και FACT/cdc68, που έχουν βρεθεί να λειτουργούν κατά την επιμήκυνση παράλληλα με την RNA- πολυμεράση II (Narlikar et al, 2002; Santos-Rosa et al, 2003; Saunders et al, 2003). Όπως ήταν αναμενόμενο, κανένας από τους παράγοντες που προαναφέρθηκαν δεν βρέθηκε στους υποκινητές ή στην κωδική περιοχή των γονιδίων σε κύτταρα που δεν εκφράζανε τα γονίδια, HEK 293. Η RNA- πολυμεράση II βρέθηκε να παρουσιάζει ομοιόμορφη κατανομή στην κωδική περιοχή των γονιδίων στα κύτταρα HepG2 της G0/G1 φάσης, ενώ δεν ανιχνεύτηκε πρόσδεσή της στα ίδια γονίδια όταν τα κύτταρα είχαν σταματήσει στη φάση της μίτωσης ή όταν η μεταγραφή είχε ανασταλεί λόγω παρουσίας α-αμανιτίνης (Εικόνα 10). Η μελέτη της παρουσίας των ακετυλασών ιστονών έδωσε κάποια απροσδόκητα αποτελέσματα, καθώς η E1p3 που έχει βρεθεί ότι συνδέεται με την RNA-πολυμεράση II βρέθηκε προσδεμένη στην κωδική περιοχή καταρροϊκά των 2.5 με 5 kb, όπου η υπερακετυλίωση ιστονών παρουσίαζε μείωση (Εικόνα 10). Επαλήθευση της κατανομής της E1p3 ήλθε από πειράματα μελέτης για τον παράγοντα του ίδιου συμπλόκου, E1p1, που παρουσίασε όμοιο πρότυπο κατανομής. Επιπλέον, οι ακετυλάσες CBP και PCAF, που ήταν γνωστό ότι δρουν στο προεναρκτήριο σύμπλοκο της μεταγραφής στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων, βρέθηκαν προσδεμένες και στη 5' κωδική περιοχή των γονιδίων, στις περιοχές που εμφανίζουν υπερακετυλίωση των ιστονών. Η σύνδεση των ακετυλασών ήταν ειδική για κάθε γονίδιο, καθώς το CBP βρέθηκε στην κωδική περιοχή των HNF-4 και HNF-1, ενώ το PCAF στο γονίδιο της αλβουμίνης (Εικόνα 10). Το Brg-1 βρέθηκε να προσδέεται και στα τρία γονίδια ενώ το SNF2H στο γονίδιο της αλβουμίνης και το HNF-1 με όμοιο πρότυπο, που περιλαμβάνει τον υποκινητή και την 5' κωδική περιοχή. Το FACT/cdc68 ανιχνεύτηκε μόνο στο γονίδιο HNF-1, με όμοιο πρότυπο κατανομής με τα προηγούμενα (Εικόνα 10). Όλοι οι παράγοντες βρέθηκαν αποσυνδεδεμένοι από τη χρωματίνη στην περίπτωση που η μεταγραφή είχε κατασταλεί λόγω α-αμανιτίνης ή τα κύτταρα είχαν σταματήσει στη μίτωση (Εικόνα 10). Ο ισχυρός συσχετισμός της κατανομής ενός ή περισσοτέρων παραγόντων που τροποποιούν ή αναδιοργανώνουν

τα νουκλεοσώματα και της αναδιαμορφωμένης χρωματίνης καταρροϊκά των υποκινητών υποδεικνύει μια συνεχή τροποποίηση και αναδιαμόρφωση σε ένα μεγάλο μέρος αλλά όχι σε ολόκληρη την κωδική περιοχή, που εξαρτάται από την RNA-πολυμεράση II.



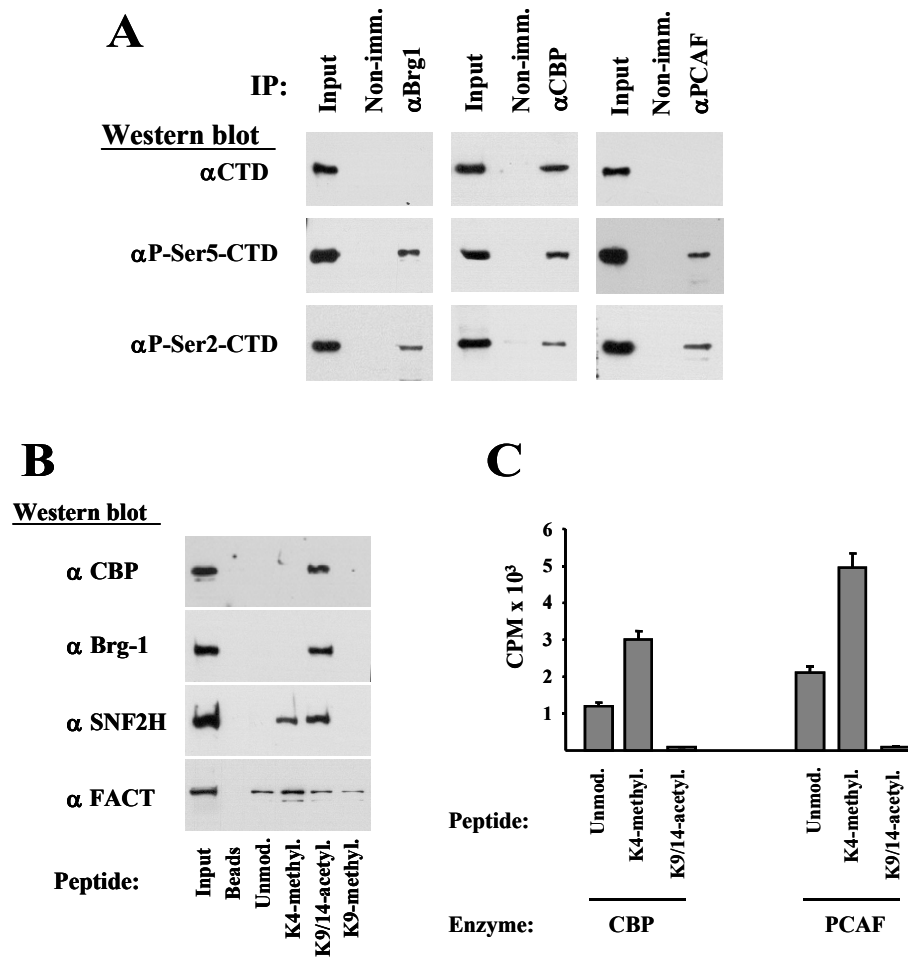
Εικόνα 10. Πρότυπα κατανομής των ακετυλοτρανσφερασών ιστονών και παραγόντων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης στα ανθρώπινα γονίδια HNF-4, HNF-1 και αλβουμίνης.

ChIPs πραγματοποιήθηκαν με τα αντισώματα που φαίνονται δεξιά, ενώ τα αποτελέσματα παρουσιάζονται όπως και στην εικόνα 6.

Με τη χρήση αντισωμάτων ειδικών για τις διαφορετικά φωσφορυλιωμένες μορφές της RNA-πολυμεράσης II βρέθηκε ότι το Brg-1, CBP και PCAF βρίσκονται σε ανοσοκατακρημνίσεις της RNA-πολυμεράσης II, τόσο εκείνης που φέρει Ser-5 του καρβοξυλικού άκρου και έχει συσχετιστεί με την έναρξη της μεταγραφής όσο και με την Ser-2 φωσφορυλιωμένη μορφή της που έχει συσχετιστεί με την επιμήκυνση της μεταγραφής (Εικόνα 11A). Το πείραμα αυτό παρέχει περαιτέρω ενδείξεις ότι το Brg-1, CBP και PCAF μπορούν και συμμετέχουν στην επιμήκυνση της μεταγραφής μέσω σύνδεση με την RNA-πολυμεράση II, πέραν της δράσης τους στους υποκινητές των γονιδίων.

Πιθανός ρόλος των τροποποιήσεων ιστονών στη πρόσδεση ενζύμων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης και ακετυλασών με τη χρωματίνη

Οι παράγοντες CBP και Brg1 περιέχουν bromodomains, περιοχές οι οποίες μπορούν και προσδένονται σε ακετυλιωμένες ουρές ιστονών με μεγάλη συγγένεια (Agalioti et al, 2002). Προκειμένου να διερευνηθεί αν και η μεθυλίωση τη H3-K4 αναγνωρίζεται και λειτουργεί ως επιφάνεια αλληλεπίδρασης με κάποιους από τους παράγοντες, πραγματοποιήθηκαν πειράματα pull-down με πεπτίδια ιστονών και πυρηνικά εκχυλίσματα HepG2 κυττάρων. Ως θετικό control του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η πρόσδεση του SNF2H σε πεπτίδια δι-μεθυλιωμένης H3-K4, που είναι γνωστό ότι είναι ειδική (Santos-Rosa et al, 2003). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το CBP και Brg1 μπορούν και προσδένονται ειδικά με K9/K14 ακετυλιωμένα πεπτίδια της H3, αλλά όχι με το H3 πεπτίδιο που δεν φέρει καμία τροποποίηση ή είναι μεθυλιωμένο στην K4 (Εικόνα 11B). Ενδιαφέρον όμως είναι ότι το SNF2H αλληλεπιδρά επίσης και με ακετυλιωμένο K9/K14-H3 πεπτίδιο. Ανάλυση για το FACT/cdc68 έδειξε ότι προσδένεται και στο μη τροποποιημένο H3 πεπτίδιο, παρόλο που η πρόσδεσή του στο H3-K4 δι-μεθυλιωμένο πεπτίδιο ήταν ισχυρότερη. Δεδομένου ότι το FACT/cdc68 έχει ισχυρή προτίμηση πρόσδεσης σε διμερή H2A/H2B (Belotserkovskaya et al, 2003), τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν δεν είναι γνωστό αν έχουν κάποια λειτουργική σημασία.



Εικόνα 11. Αλληλεπίδραση του Brg1, CBP και PCAF με την RNA-πολυμεράση II *in vivo* (A) και *in vitro* πρόσδεση των παραγόντων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης (B) και ακετυλίωση των τροποποιημένων πεπτιδίων της H3 ουράς (Γ).

(A) Ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε με τα αντισώματα για Brg-1, CBP και PCAF και η παρουσία της RNA-πολυμεράση II ανιχνεύτηκε με Western blot με αντισώματα για τη μη φωσφορυλιωμένη μορφή της RNA-pol II 8WG16 (α -CTD), H14 (α P-Ser5-CTD) και H5 α P-Ser2-CTD.

(B) Βιοτυνλιωμένα πεπτίδια το N-τελικού άκρου της H3 με τις τροποποιήσεις που φαίνονται στο κάτω μέρος προσδέθηκαν σε κολώνα στρεπταβιδίνης και επώαστηκαν με πυρηνικά εκχυλίσματα HepG2. Ακολούθησε Western blot με τα αντισώματα που φαίνονται αριστερά.

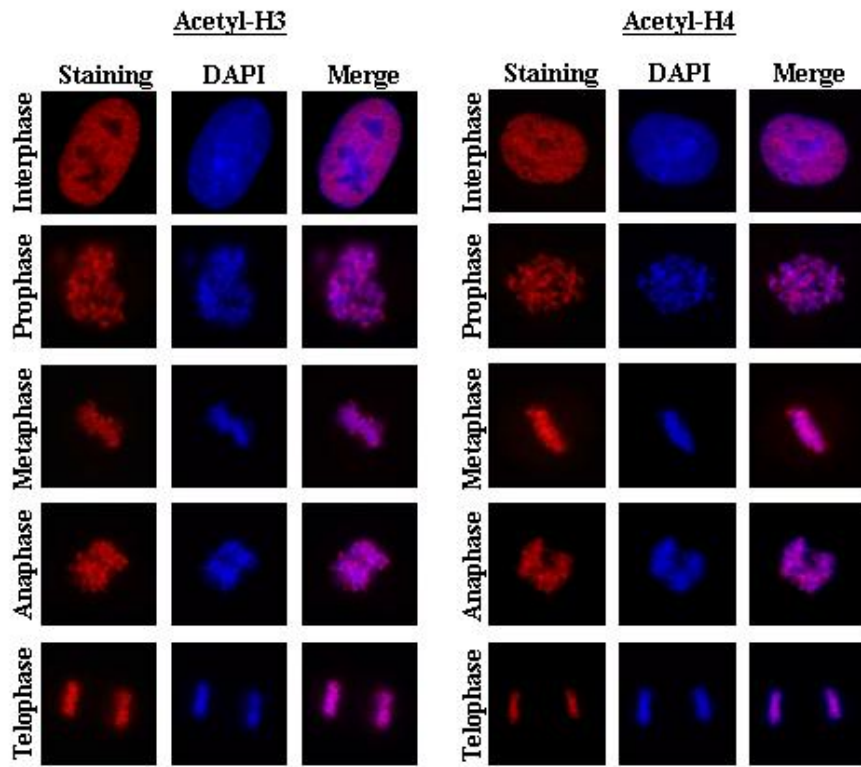
(Γ) *In vitro* ακετυλίωση των πεπτιδίων της H3 που δεν φέρει τροποποιήσεις (Unmodified), που φέρει μεθυλιωμένη την H3-K4 (K4-methyl) και ακετυλιωμένες τις K9/K14 (K9/K14-acetyl). Οι αντιδράσεις τοποθετήθηκαν σε P81 filter ή διαχωρίστηκαν σε 18% SDS-PAGE και η ακετυλίωσή τους μετρήθηκε με scintillation counting.

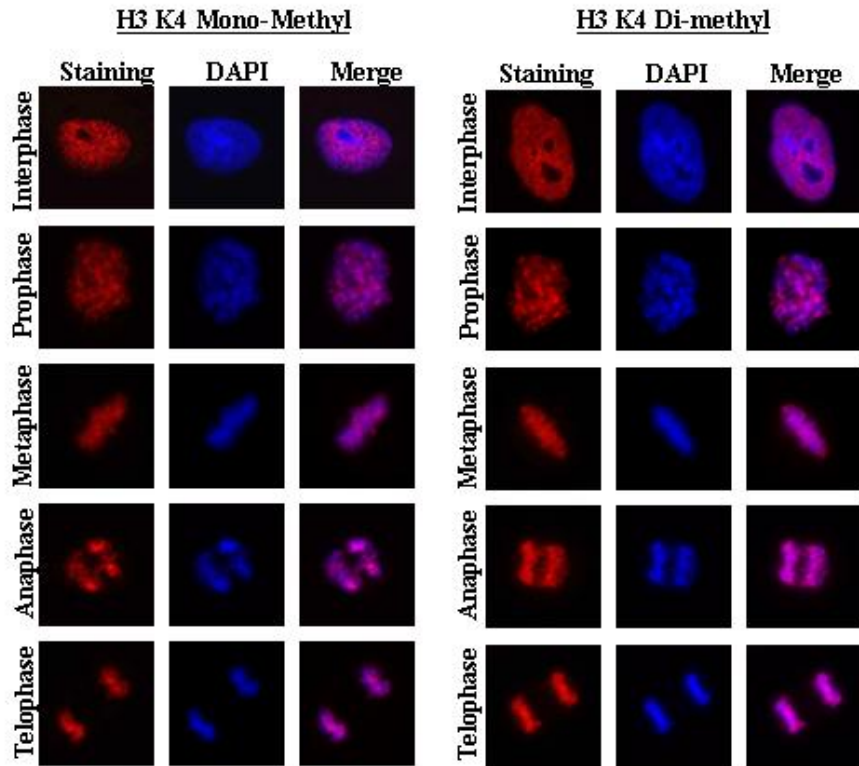
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων pull-down επιβεβαιώνουν ότι διαφορετικές τροποποιήσεις ιστονών μπορούν να σταθεροποιούν αλληλεπιδράσεις με διαφορετικές πρωτεΐνες, ενώ σύμφωνα με μια άλλη υπόθεση, οι τροποποιήσεις εκείνες μπορεί να

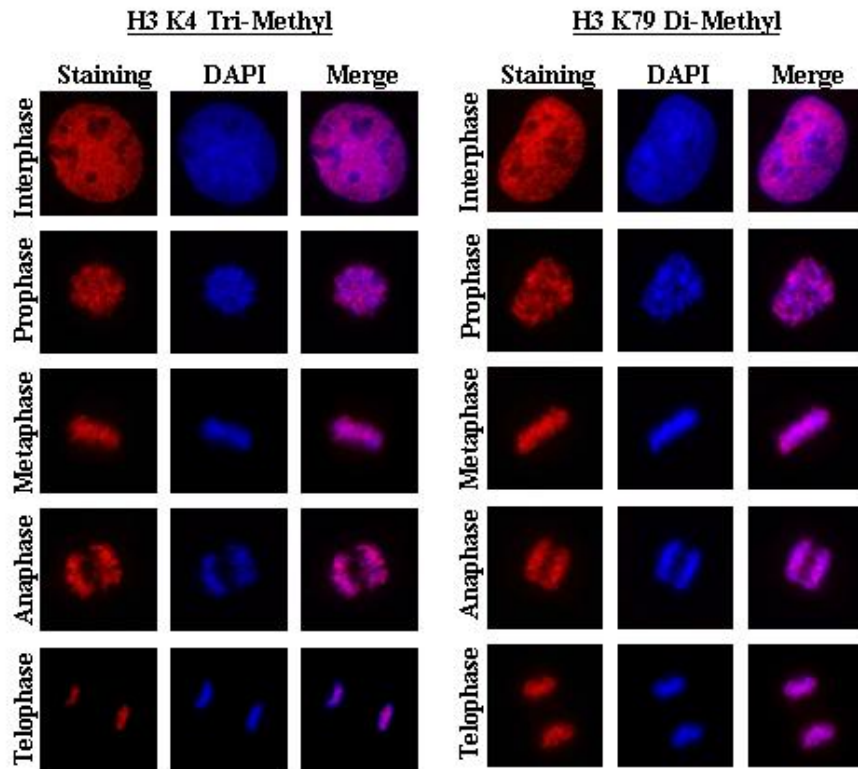
οδηγούν στη διαμόρφωση καλύτερων υποστρωμάτων για μια επόμενη τροποποίηση. Σε συμφωνία με την τελευταία υπόθεση βρέθηκε ότι τα πεπτίδια που ήταν ήδη διμεθυλιωμένα στην H3-K4 αποτελούσαν καλύτερο υπόστρωμα για ακετυλίωση από CBP and PCAF απ' ότι το μη τροποποιημένο πεπτίδιο (Εικόνα 11Γ). Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να παρέχουν τη μηχανιστική βάση για τη δημιουργία πολλαπλών τροποποιήσεων στο ίδιο νουκλεόσωμα του υποκινητή ή της 5' κωδικής περιοχής των ενεργών γονιδίων.

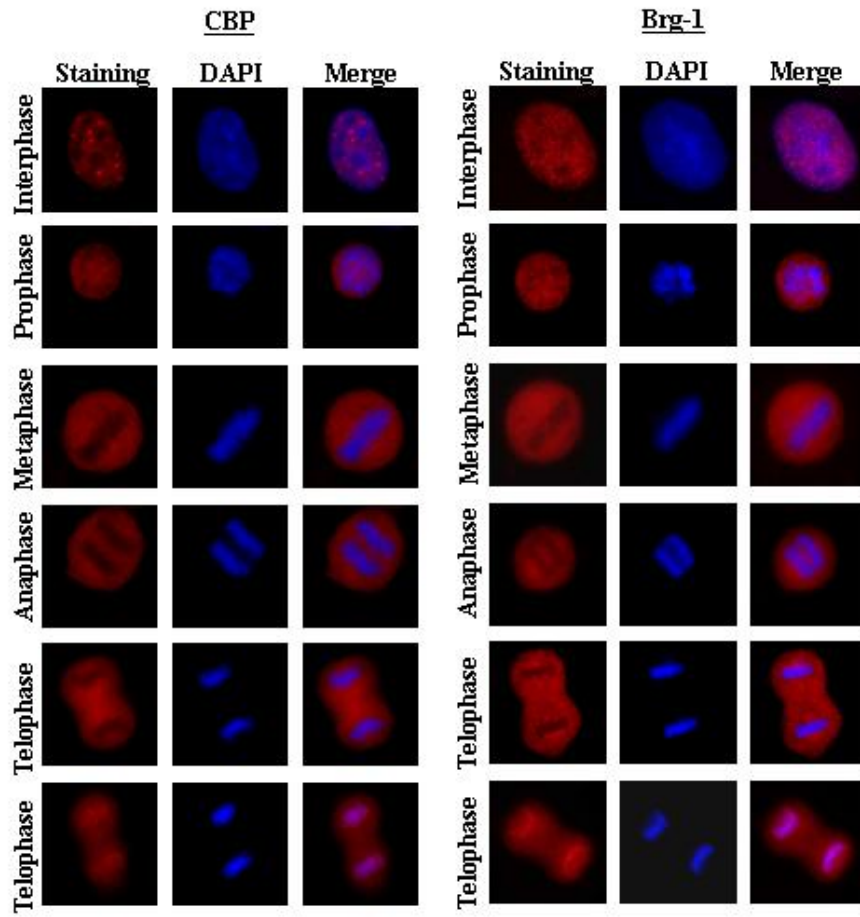
Εικόνα 12: Ανοσοφθορισμός κυττάρων HepG2 για τις τροποποιήσεις ιστονών και τις ενζυμικές ενεργότητες που τις δημιουργούν στα διάφορα στάδια της μίτωσης.

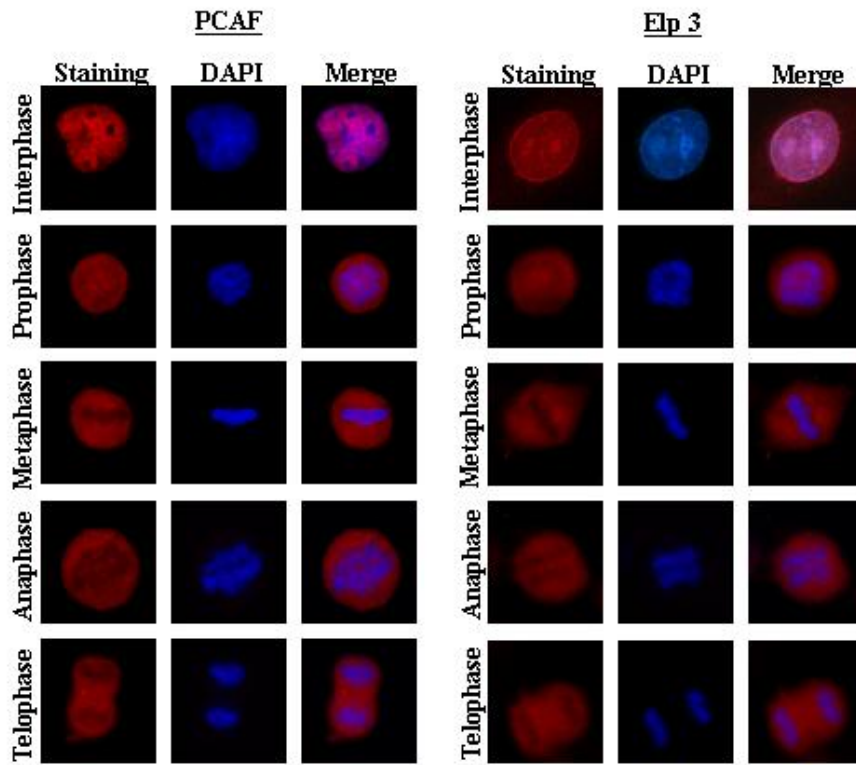
Στις εικόνες που βρίσκονται στις επόμενες σελίδες τα αριστερά εικονίδια απεικονίζουν τον ανοσοφθορισμό, τα μεσαία τον χρωματισμό του DNA με DAPI και τα δεξιά την αλληλο-επικάλυψη των δυο. Τα σήματα των παραγόντων CBP, PCAF, E1p3 και Brg1 δεν βρίσκονται στη μιτωτική χρωματίνη σε αντίθεση με τις τροποποιήσεις των ιστονών. Για τους παράγοντες CBP και PCAF δυο πληθυσμοί κυττάρων παρατηρήθηκαν στη τελόφαση.











ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η χρωματίνη υπόκειται σε δυναμική αναδιοργάνωση κατά τη φάση της μίτωσης, αλλά η πληροφορία που καθορίζει την έκφραση ενός συγκεκριμένου συνόλου γονιδίων του διαφοροποιημένου κυττάρου μεταβιβάζεται πιστά στα θυγατρικά κύτταρα. Οι τροποποιήσεις ιστονών θεωρούνται χαρακτηριστικά γνωρίσματα της χρωματίνης υπεύθυνα για τη στρατολόγηση ενεργοποιητών και καταστολέων σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος, για αυτό και θεωρούνται ότι συμμετέχουν στην επιγενετική μνήμη (epigenetic memory) (Fischle et al, 2003). Τα γεγονότα εκείνα μέσω των οποίων οι τροποποιήσεις ιστονών δημιουργούν και μεταδίδουν την κατασταλτική δομή χρωματίνης έχουν κατανοηθεί σε μεγάλο βαθμό (Jenuwein, 2001; Kouzarides, 2002). Παρά όμως το γεγονός ότι ο ρόλος των ιστονικών τροποποιήσεων στη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων έχει μελετηθεί (Fischle et al, 2003; Santos-Rosa et al, 2002), ο πιθανός ρόλος τους στην διατήρηση μιας μεταγραφικά ενεργής χρωματινικής δομής παραμένει άγνωστος.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι οι τροποποιήσεις που χαρακτηρίζουν την ενεργή χρωματίνη, όπως η ακετυλίωση της H3 και H4, η μεθυλίωση της H3-K4 και H3-K79, διατηρούνται για ένα μεγάλο διάστημα μετά τη μεταγραφική αδρανοποίηση λόγω της παρουσίας α-αμανιτίνης και κατά τη μίτωση στα πατρικά νουκλεοσώματα, τριών συνεχώς εκφραζόμενων και διαφορετικά ρυθμιζόμενων ηπατικών γονιδίων.

Εντοπισμένες τροποποιήσεις ιστονών και αναδιαμορφωμένη χρωματίνη στην κωδική περιοχή των ενεργών γονιδίων

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το αυστηρά καθορισμένο πρότυπο κατανομής των τροποποιήσεων ιστονών στην κωδική περιοχή των γονιδίων. Η ακετυλίωση ιστονών, H3-K4 δι- και τρι-μεθυλίωση καθώς και η δι-μεθυλίωση της H3-K79 παρατηρούνται στους υποκινητές και στα πρώτα 2.5 με 5 kb της κωδικής περιοχής. Οι περιοχές εκείνες παρουσιάζουν μια πιο ανοιχτή χρωματινική δομή σε σύγκριση με

περιοχές που βρίσκονται καταρροϊκά τους και σε εκείνες ακριβώς τις περιοχές εντοπίζεται και η παρουσία ακετυλασών ιστονών CBP ή PCAF, και συμπλόκων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης Brg1, SNF2H και FACT/cdc68. Η παρουσία των συγκεκριμένων παραγόντων στον υποκινητή και την 5' κωδική περιοχή εξαρτάται αυστηρά από τη μεταγραφή και πραγματοποιείται τουλάχιστον εν μέρει, με άμεσες ή έμμεσες αλληλεπιδράσεις των παραγόντων με την μορφή της RNA- πολυμεράσης II που σχετίζεται με την έναρξη και την επιμήκυνση της μεταγραφής. Αντίθετα με τις τροποποιήσεις ιστονών η αναδιαμορφωμένη χρωματίνη στην 5' κωδική περιοχή απουσιάζει κατά τη διακοπή της μεταγραφής με α-αμανιτίνη ή κατά τη μίτωση, γεγονός που σημαίνει ότι η συνεχής δράση των ενζύμων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης που συνδέονται με την RNA-πολυμεράση II είναι απαραίτητη για τη διατήρηση μιας ανοιχτής χρωματινικής δομής. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αυτά πρόσφατη εργασία έδειξε ότι η αναδιαμορφωμένη χρωματίνη και η παρουσία του Brg-1 στην κωδική περιοχή του επαγόμενου από θερμικό σοκ γονιδίου (heat shock-inducible) Hsp70, είναι απαραίτητη για την επιμήκυνση της μεταγραφής (Corey et al, 2003). Επίσης σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν είναι και εργασίες που δείχνουν ότι το Brg-1 αδρανοποιείται κατά τη μίτωση με φωσφορυλίωση και αποδεσμεύεται από τη χρωματίνη (Muchardt et al, 1996; Sif et al, 1998), ενώ πειράματα ανοσοφθορισμού που δείχνουν ότι το Brg-1 και η RNA πολυμεράση-II δεν βρίσκονται στα ίδια σημεία ενός μεσοφασικού κυττάρου (Grande et al, 1997; Reyes et al, 1997) υποδηλώνουν ότι μικρό ποσοστό μόνο του Brg-1 εμπλέκεται άμεσα στην επιμήκυνση της μεταγραφής.

Και στις τρεις περιπτώσεις των γονιδίων που αναλύθηκαν η μόνο-μεθυλίωση της H3-K4 αυξάνεται στο μέσο της κωδικής περιοχής, ακολουθώντας τις περιοχές που χαρακτηρίζονται από τις υπόλοιπες τροποποιήσεις. Παρόλο που η λειτουργική σημασία της παρατήρησης αυτής δεν είναι ξεκάθαρη, η παραμονή της τροποποίησης κατά τη μίτωση και η μεταγραφικά εξαρτώμενη δημιουργία της κατά την επόμενη G1 φάση, υποδηλώνουν πως η τροποποίηση εκείνη έχει ενεργό ρόλο στην επιμήκυνση της μεταγραφής. Υπομονάδες του συμπλόκου επιμήκυνσης της μεταγραφής βρέθηκαν συνδεδεμένες στην κωδική περιοχή καταρροϊκά όμως της τοπικής υπερακετυλίωσης, H3-K4 δι- και τρι-μεθυλίωσης και της H3-K79 μεθυλίωσης. Μέχρι πρόσφατα ο ρόλος του συμπλόκου επιμήκυνσης της μεταγραφής είχε αμφισβητηθεί, καθώς πειράματα ανοσοφθορισμού για τις υπομονάδες του παρουσίασαν κυτταροπλασματικό εντοπισμό (Kim et al, 2002; Pokholok et al, 2002). Με τη χρήση όμως νέων, ειδικών

αντισωμάτων για την υπομονάδα E1p3, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εντοπίστηκε με πειράματα ανοσοφθορισμού στον πυρήνα (Εικόνα 12). Τα αποτελέσματα αυτά μαζί με τα αποτελέσματα των ChIPs και μια πρόσφατη εργασία (Gilbert et al, 2004) ενισχύουν την άποψη ότι το σύμπλοκο επιμήκυνσης συμμετέχει στη μεταγραφική διαδικασία. Η παρουσία της E1p3 ήταν εμφανής στο τέλος της υπερακετυλιωμένης περιοχής, γεγονός που υποδηλώνει ότι, για τα γονίδια των θηλαστικών, η ενεργότητα ακετυλίωσης της E1p3 δεν είναι εκείνη που δημιουργεί την εντοπισμένη υπερακετυλίωση στη 5' κωδική περιοχή. Η πρόσδεση του συμπλόκου επιμήκυνσης στις περιοχές που το CBP, Brg1, SNF2H και FACT έχουν αποσυνδεθεί από τη χρωματίνη δείχνει ότι το σύμπλοκο αυτό πιθανότατα να διαδραματίζει κάποιο καινούριο ρόλο στη μεταγραφή. Η παρουσία του παράγοντα SNF2H και FACT σε επιλεγμένα μόνο γονίδια δείχνει ότι η λειτουργία τους κατά τη μεταγραφή πιθανό είναι να διενεργείται από περισσότερων του ενός παραγόντων. Αν και θα πρέπει να σημειωθεί ότι, τουλάχιστον θεωρητικά, η απουσία σήματος SNF2H και FACT, ή όποιου άλλου παράγοντα, μπορεί να είναι το αποτέλεσμα κάλυψης του επιτόπου, ώστε εκείνο να μην αναγνωρίζεται από το αντίσωμα ή να είναι το αποτέλεσμα μη αποδοτικής μονιμοποίησης των πρωτεϊνών σε συγκεκριμένες χρωματινικές περιοχές. Σε αυτή την περίπτωση, τα δυνατά σήματα με την τεχνική του ChIP αντιστοιχούν σε ισχυρότερη σύνδεση ή διαφορετική διαμόρφωση ή παρουσία περισσότερων μορίων πρωτεΐνης στις συγκεκριμένες θέσεις. Οποία και αν είναι η αιτία της δημιουργίας των διαφορετικών σημάτων, το τελικό αποτέλεσμα υποδεικνύει διαφορετική σύνδεση των πρωτεϊνών στις διαφορετικές περιοχές ή γονίδια.

Πολλαπλές τροποποιήσεις νουκλεοσωμάτων διακοσμούν τις περιοχές της ενεργής χρωματίνης

Η απροσδόκητη σταθερότητα του προτύπου ακετυλιωμένης H3 και H4 στα μιτωτικά κύτταρα και στα κύτταρα που η μεταγραφή έχει σταματήσει παρουσία α-αμανιτίνης, όταν δηλαδή οι ακετυλάσες ιστονών έχουν αποσυνδεθεί από τη χρωματίνη, δείχνει ότι δεν πραγματοποιείται ενεργά απο-ακετυλίωση των ιστονών, πιθανών μέσω αποκλεισμού τέτοιων ενζύμων από τις συγκεκριμένες περιοχές. Ανάλυση της ακετυλίωσης της H3 και H4 στο σύνολο του γονιδιώματος σε διάφορες

φάσης της μίτωσης έδειξε ότι η τροποποίηση εκείνη διατηρείται σε όλα τα στάδια της (Εικόνα 12). Το αξιοσημείωτο όμως είναι ότι η υπερακετυλίωση και υπερμεθυλίωση οριοθετούν διακριτές υπο-περιοχές της μιτωτικής χρωματίνης, το οποίο δείχνει ότι υπάρχουν διακριτές χρωματινικές περιοχές στις οποίες βρίσκονται τα γονίδια που ήταν ενεργά και θα ενεργοποιηθούν αμέσως μόλις τελειώσει η μίτωση. Τα ακετυλιωμένα νουκλεοσώματα χαρακτηρίζονται επίσης και από δι-μεθυλίωση της H3-K4 και K79 όπως και από τρι-μεθυλίωση της H3-K4, τροποποιήσεις οι οποίες διατηρούνται κατά τη μίτωση και κατά την παρουσία της α-αμανιτίνης. Η ταυτόχρονη αυτή παρουσία των τροποποιήσεων στο ίδιο νουκλεόσωμα πιθανότατα είναι σημαντική για τη δημιουργία ενός σταθερό γνωρίσματος της ενεργού χρωματίνης. Σύμφωνα με τη θεωρία του κώδικα των ιστονών οι διάφορες τροποποιήσεις μπορούν και αναγνωρίζονται από παράγοντες που είναι συνδεδεμένοι με τη χρωματίνη, οι οποίοι με τη σειρά τους μπορούν και μεταφράζουν-ερμηνεύουν τον κώδικα για συγκεκριμένη δράση της χρωματίνης (Agalioti et al, 2002; Turner, 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Turner, 2002). Οι διαδοχικές ανοσοκατακρημνίσεις χρωματίνης αποκάλυψαν ότι στο ίδιο νουκλεόσωμα το ένα πεπτίδιο της H3 φέρει τρι-μεθυλιωμένη την K4 και το άλλο δι-μεθυλιωμένη, ενώ ή το ένα είτε και τα δυο είναι υπερακετυλιωμένα και K79 μεθυλιωμένα. Η πολυπλοκότητα αυτή των τροποποιήσεων μπορεί να είναι απαραίτητη για τη σταθερή σύνδεση διαφορετικών ρυθμιστικών παραγόντων, καθώς παρέχει πολυάριθμες επιφάνειες αλληλεπίδρασης. Για παράδειγμα, η ακετυλιωμένη H3 αποτελεί επιφάνεια αλληλεπίδρασης για τις ακετυλάσες, οι οποίες και τη δημιουργούν, αλλά επίσης αναγνωρίζεται ως σημείο πρόσδεσης και από τους παράγοντες Brg-1 και SNF2H, πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη μεταγραφή. Το σημάδι όμως της μεθυλίωσης της H3-K4 δεν είναι γνωστό αν λειτουργεί με όμοιο με την ακετυλίωση τρόπο, καθώς παρόλο που αποτελεί επιφάνεια αλληλεπίδρασης για το SNF2H (Santos-Rosa et al, 2003, και εικόνα 11), η παρουσία του παράγοντα SNF2H μόνο σε μερικά από τα γονίδια που αναλύθηκαν δείχνει ότι η τροποποίηση αυτή μπορεί να έχει και κάποιο διαφορετικό ρόλο. Στα πειράματα *in vitro* ακετυλίωσης πεπτιδίων της H3 φάνηκε ότι εκείνα που είχαν δι-μεθυλιωμένη τη H3-K4 ήταν καλύτερα υποστρώματα προς ακετυλίωση σε σχέση με το μη τροποποιημένο πεπτίδιο. Αν και *in vivo* συμβαίνει να είναι τα νουκλεοσώματα με μεθυλιωμένη H3-K4 καλύτερα υποστρώματα προς ακετυλίωση, τότε η μεθυλίωση της K4 δεν λειτουργεί μόνο ως επιφάνεια πρόσδεσης ρυθμιστικών παραγόντων αλλά και ως εφελτήριο για τη

δημιουργία του «κώδικα» ακετυλίωσης στο ίδιο νουκλεόσωμα. Ο ταυτόχρονος εντοπισμός της H3-K4 δι- και τρι-μεθυλίωσης με την K9/K14 ακετυλιωμένη H3 και την αναδιαμορφωμένη χρωματίνη αποτελεί μια ακόμα ένδειξη ότι ένας παρόμοιος μηχανισμός πιθανά να ισχύει και *in vivo*.

Ρόλος της μεταγραφής στη δημιουργία των τροποποιήσεων των ιστονών

Συγκριτική μελέτη των σημάτων από την ανάλυση ChIP μεταξύ των κυττάρων της φάσης G0/G1 και των μιτωτικών δείχνει ότι μια δυναμική αναδιοργάνωση των νουκλεοσωμάτων πραγματοποιείται σε κάθε κυτταρικό κύκλο. Στα μιτωτικά κύτταρα τα σήματα των ακετυλιωμένων ιστονών και της K4 μεθυλιωμένης H3 είναι περίπου τα μισά σε σχέση με τα κύτταρα της G0/G1, ενώ οι τροποποιήσεις εκείνες αυξάνονταν προοδευτικά μετά τη είσοδο των κυττάρων στην επόμενη G1. Η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι κατά το διπλασιασμό του DNA τα νέα νουκλεοσώματα δεν φέρουν τροποποιήσεις στις αντίστοιχες θέσεις, ενώ τα πατρικά νουκλεοσώματα διατηρούν αναλλοίωτες τις τροποποιήσεις που δημιουργήθηκαν κατά τη μεταγραφή. Μελέτες στον σακχαρομύκητα έχουν δείξει ότι η μεθυλάση Dot1p, της H3-K79 και η Set1 (που εμπεριέχεται στο σύμπλοκο COMPASS), μεθυλάση της H3-K4 χρειάζονται το σύμπλοκο PAF1 για τη σωστή δράση τους, γεγονός που συνδέει τη μεθυλίωση των ιστονών με την επιμήκυνση της μεταγραφής (Krogan et al, 2003). Στην εργασία εκείνη είχε προταθεί ότι η μεθυλίωση της H3-K4 και H3-K79 συμβαίνουν παράλληλα και εξαρτώνται από τη δράση της RNA πολυμεράσης-II. Η μελέτη εκείνη επαληθεύεται από τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας, καθώς τα νουκλεοσώματα με τρι-μεθυλιωμένη H3-K4 ήταν και μεθυλιωμένα στη K79. Η μεθυλίωση όμως της K79 στα μιτωτικά κύτταρα είναι διπλάσια σε σχέση με τα κύτταρα της G0/G1 φάσης, αποτέλεσμα που δείχνει ότι η μεθυλίωση της K79 μπορεί να δημιουργείται και ανεξάρτητα από τη μεταγραφή, κατά την S φάση ή αργότερα. Ακόμα όμως και σε αυτή την περίπτωση, η H3-K79 μεθυλίωση περιορίζεται σε περιοχές της χρωματίνης που φέρουν και τις υπόλοιπες τροποποιήσεις που συσχετίζονται με ενεργοποίηση της μεταγραφής, καθώς η μεθυλίωση K79

παρατηρήθηκε στα νουκλεοσώματα που ήδη έχουν H3-K4 δι- και τρι-μεθυλίωση, ακετυλιωμένες ιστόνες και κάποια K79 μεθυλίωση. Αν αποκλειστεί η πιθανότητα δράσης ενός ενζύμου απομάκρυνσης της μεθυλίωσης από τη δι-μεθυλιωμένη λυσίνη K79, η διαφορά των σημάτων που αναφέρθηκε οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ενεργή και εξαρτώμενη από τη μεταγραφή ανταλλαγή νουκλεοσωμάτων συμβαίνει κατά τη G1 και την επανέναρξη της μεταγραφής (Schwartz and Ahmad, 2005). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η H3.3 variant εναποτίθεται σε περιοχές ενεργούς μεταγραφής, με ένα μηχανισμό που δεν σχετίζεται με το διπλασιασμό του DNA (Ahmad and Henikoff, 2002; Tagami et al, 2004). Σε συμφωνία με τα δεδομένα εκείνα είναι και εργασία που δείχνει ότι η H3.3 είναι εκείνη η μορφή της H3 που ως επί το πλείστον φέρει τις τροποποιήσεις εκείνες που συνδέονται με την ενεργή μεταγραφή (McKittrick et al, 2004).

Τα πειράματα της εργασίας αυτής διευρύνουν τα γνωστά μέχρι τώρα μοντέλα, προτείνοντας ότι οι τροποποιήσεις ιστονών μπορεί να λειτουργούν και ως σημάδια μνήμης, που συμμετέχουν στη μετάδοση και διατήρηση μιας χρωματινικής δομής ικανής για μεταγραφή, κατά τον κυτταρικό κύκλο. Σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό, η ακετυλίωση ιστονών, η δι- και τρι-μεθυλίωση της H3-K4 καθώς και H3-K79 μεθυλίωση δημιουργούνται σε συγκεκριμένα νουκλεοσώματα κατά τη μεταγραφή, από τη δράση των ειδικών ενζύμων. Οι τροποποιήσεις εκείνες διατηρούνται για ένα μεγάλο διάστημα μετά το τέλος της μεταγραφής και αποτελούν έτσι χαρακτηριστικό γνώρισμα μιας ειδικά διαμορφωμένης χρωματινικής δομής. Κατά το διπλασιασμό του DNA, ως αποτέλεσμα εναπόθεσης καινούριων ιστονών, μέρος των τροποποιήσεων εκείνων χάνεται, παρόλο που η H3-K79 μεθυλίωση συνεχίζει να συμβαίνει. Επειδή οι τροποποιήσεις των πατρικών νουκλεοσωμάτων παραμένουν αναλλοίωτες κατά τη μίτωση, μπορούν να λειτουργούν σαν μοριακά χαρακτηριστικά (molecular bookmarks) για τη συνάθροιση της μεταγραφικής μηχανής σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος, μετά την είσοδο των κυττάρων στην επόμενη G1 φάση. Κατά τη μεταγραφή πραγματοποιείται ανταλλαγή των νουκλεοσωμάτων μέσω ενός μηχανισμού απομάκρυνσης / αντικατάστασης (Belotserkovskaya et al, 2003; Belotserkovskaya and Reinberg, 2004) και η δράση ενζύμων που προσδένονται στον υποκινητή και την RNA-πολυμεράση II μπορεί να ξαναδημιουργήσει τις ιστονικές τροποποιήσεις. Η παράλληλη δράση των ενζύμων αναδιαμόρφωσης χρωματίνης δημιουργεί μια ανοιχτή χρωματινική δομή που εκτείνεται αρκετές εκατοντάδες βάσεων καταρροϊκά των υποκινητών.

Γιατί τα κύτταρα δημιουργούν τόσο καλά εντοπισμένες τροποποιήσεις ιστονών και ανοιχτή χρωματινική δομή στην κωδική περιοχή των ενεργών γονιδίων; Κατά τη διάρκεια επιμήκυνσης της μεταγραφής πολλοί παράγοντες συνδέονται με την RNA-πολυμεράση II, αποσταθεροποιώντας τα νουκλεοσώματα αλλά και συναθροίζοντάς τα ξανά καθώς ταξιδεύουν με την RNA-πολυμεράση II (Belotserkovskaya and Reinberg, 2004). Η μεγάλη σε έκταση περιοχή με αναδιαμορφωμένη χρωματίνη μπορεί να διευκολύνει κατά αυτόν τον τρόπο το πέρασμα της RNA-πολυμεράσης II κατά τη μεταγραφή. Η πυκνότητα όμως των μορίων της RNA-πολυμεράσης II και πιθανά και η αποδοτικότητα του ενζύμου δεν άλλαζαν στα διαφορετικά τμήματα της κωδικής περιοχής, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι η μορφή έναρξης και επιμήκυνσης της RNA-πολυμεράσης II παρουσιάζουν διαφορετικές απαιτήσεις, όσον αφορά τη δομή της χρωματίνης, για τη λειτουργία τους. Έτσι, η ανοιχτή χρωματινική δομή κοντά στους υποκινητές μπορεί να έχει ως πρωταρχικό ρόλο να διευκολύνει την απελευθέρωση των νέων μορίων RNA-πολυμεράσης II από το σημείο έναρξης της μεταγραφής κατά τους επόμενους κύκλους της διαδικασίας, αλλά από ότι φαίνεται κάτι τέτοιο δεν είναι απαραίτητο για το ταξίδι του ενζύμου στις περιοχές που ακολουθούν μέσα στο γονίδιο.

Μνήμη πρόσφατης μεταγραφικής ενεργότητας

Το πρότυπο κατανομής των τροποποιήσεων ιστονών παρουσιάζει ομοιότητες αλλά και διαφορές με εκείνο των ενεργών γονιδίων του *S. cerevisiae*. Στον σακχαρομύκητα μόνο η H3-K4 τρι-μεθυλίωση εντοπίζεται στην 5' κωδική περιοχή, ενώ η K4-δι-μεθυλίωση και η ακετυλίωση βρίσκονται διάσπαρτα σε ολόκληρο το γονιδίωμα του οργανισμού (Ng et al, 2003; Kristjahan et al, 2002; Winkler et al, 2003). Αντίθετα, στα ανθρώπινα γονίδια που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία, H3-K4 τρι- και δι-μεθυλίωση αλλά και K79 δι-μεθυλίωση, H3 και H4 ακετυλίωση περιορίζονται στο 5' άκρο της κωδικής περιοχής. Επιπλέον, παρατηρήθηκε και μονομεθυλίωση των νουκλεοσωμάτων στο μέσο της κωδικής περιοχής των γονιδίων, σε περιοχές που βρίσκονται καταρροϊκά των νουκλεοσωμάτων με τις πολλαπλές τροποποιήσεις. Στον σακχαρομύκητα η K4 τρι-μεθυλίωση διαρκεί για ένα μεγάλο

χρονικό διάστημα μετά τη μεταγραφική αδρανοποίηση, φαινόμενο το οποίο έχει περιγραφεί και ως «βραχυπρόθεσμη μνήμη» της πρόσφατης μεταγραφικής ενεργότητας (Ng et al, 2003). Στα γονίδια της παρούσης μελέτης, η μεθυλίωση της H3-K4 και K79, καθώς και η ακετυλίωση της H3 και H4 διατηρούνται σταθερές για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα κατά την παρουσία της α-αμανιτίνης, η οποία επάγει διακοπή της μεταγραφής, όπως επίσης και στα πατρικά νουκλεοσώματα κατά τη μίτωση. Ο μηχανισμός αυτός της μεταγραφικής μνήμης, όπως ονομάζεται, μπορεί να επιφέρει και διακριτές βιολογικές λειτουργίες. Οι προαναφερόμενες τροποποιήσεις μπορεί να προστατεύουν τα ενεργά γονίδια, των οποίων η έκφραση μπορεί να είναι συνεχής ή να υπόκειται στη ρύθμιση ενός περιβαλλοντικού παράγοντα, από το να μετατραπούν σε μόνιμα σιωπηλά γονίδια. Επιπλέον, μπορεί οι τροποποιήσεις αυτές να αποτελούν ένα μηχανισμό των κυττάρων ώστε εκείνα να μαρκάρουν τις περιοχές του γονιδιώματος στις οποίες η μεταγραφή πρέπει να αρχίσει αμέσως μετά το τέλος της μίτωσης, συνεισφέροντας έτσι στην πιστή διατήρηση της έκφρασης του συνόλου των γονιδίων, που είναι χαρακτηριστικό για κάθε κυτταρικό τύπο.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πλασμιδιακές κατασκευές

Τα cDNAs του γενικού μεταγραφικού παράγοντα που συνδέεται με το TBP, hTAF10, κλωνοποιήθηκε στον φορέα pET15b-6His, ενώ τα καρβοξυτελικά τμήματα που ελφράζουν για την περιοχή 100-217 και 120-206 του παράγοντα κλωνοποιήθηκαν στον βακτηριακό φορέα έκφρασης pGEX3x (Jacq et al., 1994). Το hTAF10 κλωνοποιήθηκε και στον φορέα έκφρασης pBXG1-GAL4 (Soutoglou et al., 2001). Το cDNA της hSET9 απομονώθηκε με RT-PCR από δείγμα ολικού RNA από κύτταρα HepG2 και κλωνοποιήθηκε στους βακτηριακούς φορείς έκφρασης pRSETA-6His και pGEX6P1, ενώ για τις κατασκευές έκφρασης σε ευκαρυωτικά κύτταρα το cDNA κλωνοποιήθηκε στους φορείς pMT3-HA, pCDNA3 και pCDNA3-Myc (Ktistaki and Talianidis, 1997; Hatzis and Talianidis, 2001; Jacq et al., 1994). Οι κατασκευές pBX-GAL4-VP16, 5xGal4-E1b-Luc, 3xβRARE-TK-Luc, 3xNFκB-TK-Luc, 3xAlbPE-TK-Luc έχουν περιγραφεί (Ktistaki and Talianidis, 1997; Hatzis and Talianidis, 2001). Για τη δημιουργία των κυτταρικών σειρών F9 χρησιμοποιήθηκαν οι φορείς pUHD-TAF10wt, pUHD-TAF10K189Q, pUHD-γTAF10, στους οποίους η έκφραση του wtTAF10, K189Q - TAF10 και του TAF10 του σακχαρομύκητα βρίσκονται υπό τον έλεγχο του συστήματος tet (Metzger et al., 1999). Ο φορέας pSG-Cre έχει περιγραφεί (Metzger et al., 1999).

Σημειακές μεταλλαγές στο hTAF10 και hSET9 πραγματοποιήθηκαν με το Gene Editor Mutagenesis kit (Promega), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Το ιικό σύστημα έκφρασης των υπομονάδων του TFIIID που στηρίζεται σε βακουλοϊό παραχωρήθηκε από τον Tora L, ενώ οι κατασκευές έκφρασης των ικών CBP και PCAF έχει περιγραφεί (Soutoglou et al., 2000). Η έκφραση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών TAF4, TAF5, TAF6, TAF8, TAF10 και TAF12 πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα εντόμων Sf9, και η απομόνωση των συμπλόκων έγινε με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης σε κυτταρικά εκχυλίσματα Sf9, με αFLAG-

M2 agarose (SIGMA), στηριζόμενη στην παρουσία του επιτόπου FLAG στην πρωτεΐνη TAF6, σύμφωνα με τις οδηγίες τις κατασκευάστριας εταιρείας.

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, εκτός από τους φορείς που έκφραζαν για το hTAF10, που εκφράστηκε στο στέλεχος BL21-19, στους 30C. Το στέλεχος αυτό έχει το χαρακτηριστικό ότι η έκφραση της T7 πολυμεράσης βρίσκεται κάτω από αυστηρό έλεγχο και επάγεται μόνο με την προσθήκη IPTG (συναγωνιστής της δράσης του lacI καταστολέα). Σε καλλιέργεια οπτικής πυκνότητας (OD_{600}) 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, ή 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 αποτελεί το διαλυτό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, το οποίο μετά από προσθήκη γλυκερόλης 10% μπορεί να φυλαχτεί στους -80C. 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 αντίστοιχα διαλύματα του Sonication (10 φορές ο όγκος της κολώνας) για 10 λεπτά το καθένα , στους 4°C υπό ανάδευση . Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες εκλούνται από την κολώνα με 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).

Καλλιέργειες κυττάρων και διαμόλυνση

Οι κυτταρικές σειρές HepG2, HEK 293, HeLa διατηρήθηκαν σε DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) συμπληρωμένο με 10% αδρανοποιημένο με θέρμανση ορό (fetal calf serum). Τα κύτταρα που σταμάτησαν στη φάση του κυτταρικού κύκλου G2/M επώαστηκαν με 50 ng/ml νοκοδαζολίου για 16h και εκείνα που ξεκόλλησαν με ήπια ανάδευση χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Σε πειράματα που η μεταγραφή έχει σταματήσει, τα κύτταρα HepG2 επώαστηκαν με α-αμανιτίνη 50μg/ml για 5h, πριν την ανάλυση. Ανάλυση με FACS σε κύτταρα που είχαν υποστεί χρώση με Propidium iodide έδειξε ότι 95% τουλάχιστον των κυττάρων του πληθυσμού που είχε επωαστεί με nocodazole ήταν μιτωτικά (4N DNA) και 85% τουλάχιστον του πληθυσμού των κυττάρων που είχαν έρθει σε επαφή ήταν σε G0/G1 (2N DNA). Η κυτταρική σειρά Sf 9 διατηρήθηκε σε θρεπτικό GRACE'S απουσία O2.

F9 TAF10^{La(L:L)b} που είχαν τις αλληλουχίες Ιοξεκατέρωθεν του δευτέρου εξωνίου του TAF10 γονιδίου και στα δυο αλληλόμορφα και εκφράζανε σταθερά για το αντίστροφο σύστημα της τετρακυκλίνης τον ενεργοποιητή rtTA (Metzger et al., 1999), διαμολύνθηκαν με το φορέα pUHD-TAF10wt, ή pUHD-TAF10K189Q, ή pUHD-γTAF10, στα οποία η έκφραση του TAF10, βρισκόταν υπό τον έλεγχο του συστήματος της τετρακυκλίνης. Μετά από διπλή επιλογή σε υδρομυκίνη και G418, στους κλώνους προστέθηκε δεοξυκυκλίνη σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml και η επαγόμενη έκφραση των διαγονιδίων ελέγχθηκε με ανάλυση κατά western. Τα κύτταρα εκείνα διαμολύνθηκαν έπειτα με τον φορέα pSG-Cre και η εξάλειψη του δευτέρου εξωνίου του ενδογενούς γονιδίου TAF10 μελετήθηκε με PCR (Metzger et al., 1999). In vitro διαφοροποίηση με την προσθήκη ρετινοϊκού οξέος (1 μM) ή ρετινοϊκού οξέος (1 μM) και bt2cAMP (250 μM), ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των F9 κυττάρων, καθώς και RT-PCR για την έκφραση των μεμονωμένων γονιδίων πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα γνωστά (Metzger et al., 1999).

Η παροδική διαμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης calcium phosphate-DNA (Kritis et al., 1993; Ktistaki et al., 1995).

Παρασκευή πυρηνικών εκχυλισμάτων ανοσοκατακρήμνιση

Τα κύτταρα HEK293 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 aprotinin 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. Στα κύτταρα HeLa, HepG2 μετά το ξέπλυμα με PBS προστίθεται διάλυμα A (25mM Hepes pH7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10mM KCl, 10% Γλυκερόλη, 0.1% Nonident P40, 1mM dithiothreitol, 10μg/ml aprotinin και 0.5mM PMSF), επώάζονται για 10min στον πάγο και έπειτα υπόκεινται σε μηχανική διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης με Dounce. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των πυρήνων 1000rpm, 4C για 5min και στη συνέχεια οι πυρήνες λαμβάνονται σε ίσο όγκο διαλύματος A και προστίθεται ίσος όγκος NLB-800 (25mM Hepes pH7.9, 800mM KCl, 10% Γλυκερόλη, 0.1% Nonident P40, 0.2mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 10μg/ml aprotinin και 0.5mM PMSF) (Soutoglou et al., 2001). Ακολουθεί ανάδευση για 30min, 4C φυγοκέντρηση 14000rpm για 30min, 4C και συλλογή του υπερκείμενου-πυρηνικού εκχυλίσματος, το οποίο αραιώνεται στην επιθυμητή συγκέντρωση άλατος (200-500mM KCL) με διάλυμα αραιώσης (25mM Hepes pH7.9, 2mM EDTA, 0,1% NP40, 1mM dithiothreitol, 10μg/ml aprotinin και 0.5mM PMSF). Το πυρηνικό εκχύλισμα υπόκειται σε καθαρισμό με επώαση με πρωτεΐνη G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) για 1h, 4C υπό ανάδευση και τελικά υπόκειται σε ανοσοκατακρήμνιση για 5h, 4C υπό ανάδευση, με τη χρήση του ειδικού για τον παράγοντα ή τον επίτοπο αντίσωμα (10μg) και πρόσδεση του σε πρόσδεση σε πρωτεΐνη G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech). Εναλλακτικά, το διάλυμα του πυρηνικού εκχυλίσματος καθαρίζεται με Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia) και ακολουθεί μελέτη των αλληλεπιδράσεων με προσδεμένη GST-πρωτεΐνη και πρωτεϊνών του πυρηνικού εκχυλίσματος.

Τα σφαιρίδια-αντίσωμα ξεπλένονται 4X, για 10min στους 4C με διάλυμα έκπλυσης (25mM Hepes pH7.9, 200mM KCl 2mM EDTA, 0,1% NP40, 1mM

dithiothreitol, 10μg/ml aprotinin και 0.5mM PMSF), συλλέγονται σε αποδιατακτικό διάλυμα 2XSDS loading buffer και ακολουθεί ανάλυση κατά western. Όλες οι φυγοκεντρήσεις των A- ή G-Sepharose ή GST- Sepharose πραγματοποιούνται 6000rpm/3min/4C.

Παρασκευή κυτταρικών εκχυλισμάτων και μέτρηση ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης και λουσιφεράσης

Τα κύτταρα που έχουν υποστεί παροδική διαμόλυνση ξεπλένονται με PBS τρεις φορές και μετά από φυγοκέντρηση λαμβάνονται στον κατάλληλο όγκο (100μl) 250mM Tris pH 7.5. Ακολουθούν τρεις κύκλοι γρήγορης ψύξης/απόψυξης σε -80C και 37C αντίστοιχα, και το κλάσμα των διαλυτών πρωτεϊνών λαμβάνεται μετά από φυγοκέντρηση 14000rpm/10min/4C. Σε 10 μl κυτταρικού εκχυλίσματος πρωτεϊνών προστέθηκαν 3μl 100x Mg buffer (100mM MgCl₂, 5M 2-mercaptoethanol, 1M KCl), 66μl διαλύματος ONPG (4mg/ml ONPG σε διάλυμα sodium phosphate) και διάλυμα φωσφορικού νατρίου (0.1M Na₂HPO₄ και NaH₂PO₄, pH 7.3) μέχρι τα 300μl. Τα δείγματα επώαστηκαν σε 37C μέχρι την εμφάνιση κίτρινου χρώματος και η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 500μl Na₂CO₃ ενώ η απορρόφηση πραγματοποιήθηκε στα 420nm.

Η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου luciferase έγινε με τη χρήση του luciferase assay kit (Promega) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

In vitro αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών

Οι δοκιμές pull-down πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης GST-hTAF10wt ή GST-hTAF10189Q (0.5μg) η οποία προσδέθηκε σε Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia), η οποία είχε εξισορροπηθεί σε διάλυμα 0.5% BSA/1x PBS, για 1h/4C υπό ανάδευση και ξεπλύθηκε με Sonication II για 4X

10min/4C υπό ανάδευση. Η προσδεμένη πρωτεΐνη επώαστηκε με 1μg His-SET9, παρουσία ή απουσία 1mM SAM, σε διάλυμα μεθυλίωσης. Ακολούθησε έκπλυση της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης με διάλυμα (500mM NaCl, 20mM Hepes pH 7.9, 0.1% NP-40, 5mM MgCl₂, 0.1mM PMSF, 10μg/ml aprotinin) με όμοιο τρόπο, για την απομάκρυνση της SET9 και προστέθηκαν HepG2 πυρηνικά εκχυλίσματα. Μετά από 5hr/4C με ανακίνηση, πραγματοποιήθηκαν ξεπλύματα 4X για 10min/4C διαλύματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων με NaCl (150-500mM) τα σφαιρίδια επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 2XSDS loading buffer και ακολούθησε ανάλυση κατά western.

Στις περιπτώσεις pull-down που χρησιμοποιήθηκαν πεπτίδια, 2μg βιοτυλιωμένων πεπτιδίων της H3 (Αμινοξέα 1-20, Upstate Biotechnology) προσδέθηκαν μαγνητικά σφαιρίδια αγαρόζης-στρεπταβιδίνης (Roche) και επώαστηκαν για 5h στους 4C με πυρηνικά εκχυλίσματα HepG2 (25mM Hepes pH7.9, 0.75mM MgCl₂, 400mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5mM PMSF, 2μg/ml aprotinin, 1mM DTT και 10mM NaF) που είχαν καθαριστεί νωρίτερα με τη χρήση αντιστοίχων σφαιριδίων. Ακολούθησαν ξεπλύματα σε διάλυμα όμοιο με εκείνο των εκχυλισμάτων 4X για 10min/4C και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 2XSDS loading buffer και ακολούθησε ανάλυση κατά western.

In vitro αντιδράσεις μεθυλίωσης/ ακετυλίωσης και in nucleo metabolic labeling

Οι αντιδράσεις μεθυλίωσης πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 30μl, παρουσία 100ng SET9 και 1μg μερικού συμπλόκου TFIID ή 1μg His-TAF10 ή 10μg ιστονών (APB) ή 2μg συνθετικών πεπτιδίων του TAF10 (εκχωρήθηκαν από τον Tora L), σε διάλυμα 50mM Tris pH 8.0, 20mM KCl, 4mM EDTA, 5mM dithiothreitol, παρουσία 1 μC [³ H- Me]-S-adenosyl methionine (APB). Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 30°C για τη μεθυλοτρανσφεράση hSET7/SET9 για 1h και μετά το πέρας της αντίδρασης, τμήμα τους μεταφέρθηκε σε P81 φίλτρα τα οποία ξεπλύθηκαν με διάλυμα 50mM Na₂CO₃ pH9.2 για 1h και παγωμένη ακετόνη πριν μετρηθούν σε

scintillation counter ή διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης 12% και ακολούθησε αυτοραδιογραφία.

Οι αντιδράσεις ακετυλίωσης πεπτιδίων πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα 50mM Tris pH 8.0, 0.1mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 10% γλυκερόλης παρουσία 0.25 μCi [^3H]acetyl-CoA στους 30°C για 1 ώρα. Η ακετυλοτρανσφεράση hCBP ή hPCAF 100ng είχε εκφραστεί σε κύτταρα Sf9 και στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν 100ng πεπτιδίων ιστονών (Αμινοξέα 1-20, Upstate Biotechnology) και τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης- SDS 18%.

Για την τεχνική in-nucleo metabolic labeling πυρήνες HeLa δημιουργήθηκαν από κύτταρα με τη μέθοδο διαβαθμισμένης σουκρόζης (Hatzis and Talianidis, 2002), κατά την οποία τα κύτταρα μετά από ξέπλυμα με PBS διαλυτοποιούνται σε διάλυμα Sucrose A (0.32M sucrose, 15mM Hepes pH7.9, 60mM KCl, 2mM EDTA, 0.5mM EGTA, 0.5% BSA, 0.5mM spermidine, 0.15mM spermine, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, 2 $\mu\text{g/ml}$ aprotonine) και ομογενοποιούνται με Dounce, το οποίο στη συνέχεια τοποθετείται σε falcon που περιέχει ίσο όγκο διαλύματος Sucrose B (ίδιο με A με τη διαφορά ότι δεν έχει BSA και περιέχει 30% sucrose) κατά τρόπο τέτοιο ώστε να δημιουργηθούν δύο φάσεις διαφορετικής πυκνότητας sucrose και φυγοκεντρείται 15min/4°C /3000rpm. Το ίζημα της φυγοκέντρωσης αποτελούν οι πυρήνες που επαναδιαλύονται σε διάλυμα 50mM Tris pH 8.5, 5mM MgCl₂, 4mM DTT έτσι ώστε να είναι 10⁷ πυρήνες σε τελικό όγκο 100 μl . Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 20 μCi ^3H -SAM και επώαστηκε στους 30 C για 30 min. Τα πυρηνικά εκχυλίσματα των σημασμένων πυρήνων παρασκευάστηκαν με την προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος NLB-800 (25mM Hepes pH7.9, 800mM KCl, 10% Γλυκερόλη, 0.1% Nonident P40, 0.2mM EDTA, 1mM dithiothreitol, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotonin και 0.5mM PMSF) και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση σε τελικό διάλυμα 200mM KCl, με τρόπο όμοια με όσα αναφέρθηκαν.

Δημιουργία μονονουκλεοσωμάτων και ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης

Κύτταρα HepG2 και HEK 293 μονιμοποιήθηκαν με 1% φορμαλδεΰδης για 10min και η μονιμοποίηση σταμάτησε με την προσθήκη γλυκίνης τελικής

συγκέντρωσης 125 mM. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν, ακολούθησε έκπλυση 3X με PBS, διαλυτοποίηση σε Sucrose Buffer A (0.32M Sucrose, 15 mM Hepes pH7.9, 60 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5% BSA, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine και 0.5 mM DTT) και ομογενοποίηση με Dounce για τη δημιουργία πυρήνων. Το εναιώρημα των πυρήνων τοποθετήθηκε σε σωλήνα-falcon που περιείχε ίσο όγκο διαλύματος Sucrose Buffer B, containing 30% Sucrose, 15 mM Hepes pH7.9, 60 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine and 0.5 mM DTT και φυγοκεντρήθηκε για 15 min σε 3000 rpm στους 4C. Το ίζημα της φυγοκέντρωσης, οι πυρήνες ξεπλύθηκαν και τέλος επαναδιαλύθηκαν σε Διάλυμα N (0.34 mM Sucrose, 15 mM Hepes pH7.5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine, 0.15 mM β -mercaptoethanol) σε συγκέντρωση 2×10^6 πυρήνες/ml. Στο δείγμα εκείνο προστέθηκε CaCl₂ σε τελική συγκέντρωση 3mM και 30 units μικροκοκκικής νουκλεάσης (MNase, Worthington) για 5min στους 37C. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη ίσου όγκου 2x Sonication buffer (90 mM Hepes pH7.9, 220 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% Triton X 100, 0.2% Na-deoxycholate, 0.2% SDS, 0.5 mM PMSF, 2μg/ml approtinin μίγμα αναστολέων πρωτεασών από τη Roche) και μετά από σύντομο σπάσιμο των πυρήνων με υπέρηχους (sonication) ακολούθησε φυγοκέντρωση 14000 rpm για 15 min στους 4C. Το 1/10 του υπερκείμενου-διαλυτού κλάσμα της χρωματίνης διατηρήθηκε ως input, ενώ το υπόλοιπο επώαστηκε με σφαιρίδια Protein-G Sepharose beads (APB) παρουσία 2μg με υπέρηχους διασπασμένου λ DNA και 1 mg BSA/ml για 1hr/4°C και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση (Soutoglou and Talianidis, 2002; Hatzis and Talianidis, 2002). 25μονάδες A260 της καθαρισμένης χρωματίνης ανοσοκατακρημνίστηκε με την κατάλληλη ποσότητα αντισώματος και τα ανοσοσύμπλοκα συλλέχθηκαν με προσρόφηση σε protein G-Sepharose με επώαση O/N στους 4C. Τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν δύο φορές με sonication buffer (50 mM HEPES pH7.9, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS και 0.5 mM PMSF, 2μg/ml approtinin), δύο φορές με sonication buffer που περιείχε 500mM NaCl, δύο φορές με διάλυμα (20mM Tris pH8.0, 1mM EDTA, 250mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate) και δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA. Τα ανοσοσύμπλοκα ελευθερώθηκαν από την κολώνα με επώαση σε 50mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA-1% SDS για 10min/65C, προσαρμόστηκε η συγκέντρωσή τους σε NaCl στα 200mM και ακολούθησε επώασή τους στους 65C για 5hr να

καταστραφούν οι συνδέσεις πρωτεϊνών-DNA (cross-links). Τα δείγματα κατόπιν επώαστηκαν με 10 μg RNAse A και 20 μg proteinase K/ml, εκχυλίστηκαν με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρημνίστηκαν με αιθανόλη, παρουσία glycogen.

Σε κάθε πείραμα τμήμα της χρωματίνης υπόκειται σε απο-μονιμοποίηση, ενώ το υπόλοιπο διατηρούταν στους -80°C , και μετά από καθαρισμό, τα τμήματα DNA αναλύονταν με ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη, για τον έλεγχο της πλήρους πέψης της χρωματίνης και την επιβεβαίωση ότι το μέγεθος των τμημάτων DNA είναι εκείνο ίσο με ενός μόνο νουκλεοσώματος. Ο έλεγχος ότι δεν υπήρχε μη ειδική πέψη εντός των νουκλεοσωμάτων πραγματοποιήθηκε με ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης και PCR για το καρβοξυλικό άκρο της ιστόνης 3 (Abcam), το οποίο έδινε όμοιο σήμα κατά μήκος των περιοχών που αναλύονταν.

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκε διαδοχική ανοσοκατακρήμιση (re-ChIP) η διαδικασία ήταν η ίδια μέχρι και το στάδιο των ξεπλυμάτων των προσδεμένων στα σφαιρίδια μέσω του αντισώματος τμημάτων χρωματίνης. Μετά όμως από τα ξεπλύματα ακολουθούσε έκλυση δυο φορές, με ίσο όγκο με τα σφαιρίδια, διαλύματος 10 mM DTT στους 37°C για 30 min. Το υλικό της έκλυσης αραιωνόταν 50 φορές με 1x sonication buffer και χρησιμοποιούταν για δεύτερη ανοσοκατακρήμιση, με τρόπο όμοιο με όσα αναφέρθηκαν.

Τα τμήματα DNA που ανοσοκατακρημνίστηκαν αναλύθηκαν περαιτέρω ποσοτικά με αντιδράσεις σε real-time PCR, με χρήση SYBR green στο MJ-Research Opticon Engine. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν για 40 κύκλους παρουσία 1X Taq Buffer, 1.5mM MgCl_2 , 0.1mM dNTPs, 0.5M betaine, 0.4 μM από κάθε εκκινητή, 1X SYBR green, 1u Taq και τυπικά το 1/50 του DNA που είχε προκύψει από την ανοσοκατακρήμιση. Στην περίπτωση ανάλυσης των ηπατικών γονιδίων HNF4, HNF1 και Alb από τις τιμές των PCRs των δειγμάτων ανοσοκατακρήμισης αφαιρέθηκε η τιμή του δείγματος με μη ανοσοποιημένο ορρό και ακολούθησε διαίρεση με την τιμή του input. Οι πληροφορίες στις εικόνες εκφράζονται μετά από διαίρεση με την τιμή ενός control νουκλεοσώματος, εκτός κωδικής περιοχής.

Σε πειράματα ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης σε F9, αγρίου τύπου κύτταρα διαφοροποιήθηκαν παρουσία ρετινοϊκού οξέος (1 μM) and bt_2cAMP (250 μM) για 5 ημέρες. Τα κύτταρα εκείνα μονιμοποιήθηκαν με φορμαλδεΰδη, η μονιμοποίηση σταμάτησε και ξεπλύθηκαν με παγωμένο PBS όμοια με τα όσα αναφέρθηκαν. Έπειτα τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα 25 mM Hepes, pH 7.8, 1.5 mM MgCl_2 , 10

mM KCl, 0.1% NP-40, 1 mM DTT και μίγμα αναστολέων των πρωτεασών (Roche), ακολούθησε ομογενοποίηση με Dounce και μετά από φυγοκέντρηση 5min σε 1000 rpm στους 4C, επαναδιαλύθηκαν σε sonication buffer (50 mM HEPES pH7.9, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS και 0.5 mM PMSF, 2μg/ml aprotinin). Ακολούθησε σπάσιμο της χρωματίνης με υπερήχους (sonication) και στη συνέχεια, διαδικασία όμοια με τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω. Οι τιμές των PCRs των δειγμάτων ανοσοκατακρήμνισης διαιρέθηκαν με την τιμή του input και εκφράζονται σε σχέση με την τιμή του δείγματος με μη ανοσοποιημένο ορρό, του οποίου η τιμή λαμβάνεται ίση με 1.

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για τα PCR των ανοσοκατακρήμνισεων χρωματίνης είναι:

HNF4α(TSS: +1; polyA site: 28309):

Prom/TSS:	nt -18	ως	+92
CR 0.5:	nt +492	ως	+578
CR 1.0:	nt +985	ως	1070
CR 2.5	nt +2509	ως	+2599
CR 5.0	nt +5172	ως	+5260
CR 8.0	nt +7948	ως	+8034
CR 10.0	nt +10235	ως	+10329
CR 12.5	nt +12563	ως	+12649
CR 16.2	nt +16193	ως	+16283
CR 20.0	nt +19963	ως	+20045
CR 28.0	nt + 28061	ως	+28149
Control	nt +32177	ως	+32297

HNF1α (TSS: +1; polyA site: 23764):

Prom/TSS:	nt -89	ως	-19
CR 0.5:	nt +450	ως	+535
CR 1.0:	nt +953	ως	1033
CR 2.5	nt +2513	ως	+2591
CR 5.0	nt +6056	ως	+6138

CR 8.0	nt +8137	ως	+8212
CR 10.0	nt +9820	ως	+9930
CR 15.0	nt +15649	ως	+15720
CR 22.0	nt +21978	ως	+22061
Control	nt +31801	ως	+31888

Alboumin (TSS: +1; polyA site: 17262):

Prom/TSS:	nt -20	ως	+73
CR 0.5:	nt +439	ως	+547
CR 1.0:	nt +1057	ως	+1149
CR 2.5	nt +2561	ως	+2632
CR 5.0	nt +4984	ως	+5060
CR 8.0	nt +7940	ως	+8020
CR 10.0	nt +10022	ως	+10112
CR 12.5	nt +12986	ως	+13068
CR 15.0	nt +15040	ως	+15121
Control	nt +26283	ως	+26358

Η ανάλυση των ανοσοκατακρημνίσεων χρωματίνης έγινε στα γονίδια του ποντικού ERA1 (accession number M22115), ERF (accession number U58533) και Cyclin E (accession number X5888) που είναι γνωστό ότι επηρεάζονται από το TAF10 (Metzger et al., 1999; A. Soldatov και L.Tora αδημοσίευτα αποτελέσματα) και HPRT (accession number NM_013556).

ERA1: 5' CTCCCTTTGGTCCCAGTGCTC
 3' GGGAGGACACGTGACTCTACC

ERF: 5' GCGCGGCCCTTTAAGCCAAG
 3' CCTCGCCTCTCAGAGCCTCTC

Cyclin E: 5' CGGACACAGCTTCGGGTACGG
 3' TGACCCGTCTCTCACAGCCAC

HPRT: 5' CACAGTTGTAATTCTCCTACC
 3' TGTTAAGGTGGAATAGGGATG

Τεχνική υπερευαισθησίας σε περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Restriction enzyme hypersensitivity assay)

Πυρήνες HepG2 κυττάρων δημιουργήθηκαν με τη χρήση διαβάθμισης σουκρόζης (Hatzis and Talianidis, 2002) και επαναδιαλύθηκαν σε διάλυμα αντίδρασης 1X της επιθυμητής περιοριστικής ενδονουκλεάσης σε συγκέντρωση 2×10^6 πυρήνες/ml. Με προσθήκη 5-20 units της περιοριστικής ενδονουκλεάσης τα δείγματα επώστηκαν στους 37 C για 30min, η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος 2x stop buffer (20 mM Tris pH7.5, 200 mM NaCl, 8 mM EDTA και 2% SDS) και ακόλουθη επώαση με πρωτεΐνάση K, συγκέντρωσης 0.25 mg/ml στους 42 C για 2hrs. Τα τμήματα DNA καθαρίστηκαν μετά από εκχυλίσεις με φαινόλη/χλωροφορμιο/ισοαμυλική αλκοόλη και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Τα δείγματα αναλύθηκαν ποσοτικά με αντιδράσεις real-time PCR, όμοια με τα δείγματα των ανοσοκατακρημνίσεων χρωματίνης. Οι τιμές των δειγμάτων συγκρίθηκαν με τουλάχιστον τρεις τιμές δειγμάτων που δεν είχαν υποστεί πέψη, αλλά μόνο επώαση με το διάλυμα, ή δειγμάτων που είχαν υποστεί πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση που δεν έφερε αλληλουχία πέψης στην προς ανάλυση περιοχή. Οι τιμές των δειγμάτων εκείνων τέθηκαν ως 100% άκοπη χρωματίνη.

Απομόνωση RNA από κύτταρα

Το RNA απομονώθηκε με τη μέθοδο της όξινης φαινόλης. Αρχικά τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και τοποθετούνται σε Solution D (4M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate pH7, 0.5% sarcosyl, 0.72% β-mercaptethanol). Ακολουθεί ομογενοποίηση σε ομογενοποιητή και προστίθεται κατά σειρά 1/10 του όγκου 2M οξικό αμμώνιο, 1 όγκος φαινόλης pH4 και 2 όγκοι Sevaq (χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία24/1). Το δείγμα επώζεται για 15min στον πάγο και φυγοκεντρείται σε 3000rpm/40min/4°C. Το υπερκείμενο εκχυλίζεται με ίσο όγκο ουδέτερης φαινόλης pH7.5. και φυγοκεντρείται για 3000rpm/40min/4°C. Στο

υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης και τοποθετείται σε -20°C για περισσότερο από 1hr. Κατόπιν φυγοκεντρείται για 14000rpm/20min/ 4°C , απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και η πελέτα στεγνώνεται από τα υπολείμματα της αλκοόλης και επαναδιαλύεται σε 200-300μl ενέσιμου H_2O . Μετά την πλήρη επαναιώρησή του το RNA ποσοτικοποιείται με φωτομέτρηση στα 260 nm και η ποιότητά του ελέγχεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Επώαση RNA με DNάση και αντίστροφη μεταγραφή

15-20μg RNA επωάζονται με 1 μl DNάση (10u/l χωρίς RNάση), 1x ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης (200mM Tris pH8.0, 50mM NaCl, 30 mM MgCl_2) για 1hr/ 37°C . Μετά την επώαση πραγματοποιείται εκχύλιση φαινόλης/ χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής αλκοόλης (25/24/1). Στο υπερκείμενο προστίθενται 2.5 όγκοι απόλυτης αιθανόλης και 1/10 όγκου οξικό νάτριο και αφήνεται στους -80°C για 20min. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 20min/14000rpm και η πελέτα ξεπλένεται δύο φορές με 70% αιθανόλη. Απομακρύνεται η αιθανόλη, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλύεται σε 30μl ενέσιμο H_2O .

Για την αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιείται 1μg RNA κατεργασμένου με DNάση I, στο οποίο προστίθεται 1.2μl (100ng/λ) 18-μερούς oligoDT (New England Biolabs), 2μl μείγματος των τεσσάρων dNTPs (10mM), 4μl 5x ρυθμιστικό διάλυμα MMLV RT και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 19μl με ενέσιμο H_2O . Το μίγμα επωάζεται για 5min στους 65°C και αφήνεται να κρυώσει για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος προστίθεται 1μl (200u/μl) MMLV Reverse Transcriptase (Promega) και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1hr. Για ανάλυση με RT-PCR χρησιμοποιείται 1μl της αντίδρασης για κάθε δείγμα.

Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για τα RT-PCRs χρωματίνης είναι:

HNF-4α mRNA : 5' ggagatgacttgaggccttact

3' ggggaatcgttccaaggcctc

HNF-1α mRNA : 5' gcctccctgggtctactgctcacc

3' gggcttggctgtagaggcgctg

Albumin mRNA : 5' caccttccatgcagatatatg

3' tgcagcacttctctacaaaag

Ανοσοφθορισμός σε κύτταρα

Κύτταρα HepG2 καλλιεργήθηκαν σε γυάλινες αντικειμενοφόρους, παρουσία 50ng/ml poly-D-Lysine. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3X με 1X PBS, μονιμοποιήθηκαν με methanol για 10min σε -20C και ακολούθησε 3X ξέπλυμα με 1X PBS και επώαση με 1X PBS/ 1% BSA για 30min. Ακολούθησε επώαση με τα αντισώματα σε κατάλληλες αραιώσεις σε διάλυμα 1x PBS/1% BSA. Τα πρωτεύοντα αντισώματα επώαστηκαν για 45min ενώ τα δευτερεύοντα για 30min. Ενδιάμεσα και στο τέλος έγιναν 4X πλύσεις /15min με 1x PBS/1% BSA. Στη συνέχεια έγινε χρώση με DAPI που βάφει του πυρήνες για 1min και ακολούθησαν 2-3 ξεπλύματα με 1X PBS/1% BSA. Τέλος, μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρους με 5μl Mowiol (Sigma). Όλες οι επώσεις και τα ξεπλύματα έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση. Η παρατήρηση έγινε στο συνεστιακό μικροσκόπιο Zeiss Axioscope 2 Plus.

Αντισώματα

Santa Cruz Biotechnology: Pol-II N-term. (sc-9001), Brg-1 (sc-10768), CBP (sc-369), HA, Myc, Sp1 και TFIIIB.

Covance: Pol-II CTD-Ser5-P (H-14), Pol-II CTD-Ser-2P (H5), Pol-II CTD (8WG16).
Abcam: Histone 3 (ab8580), monomethyl H3-K4 (ab8895), dimethyl H3-K4 (ab7766), trimethyl H3-K4 (ab 8580), dimethyl H3-K9 (ab7312), αPan-methyl-lysine.
Upstate Biotechnology: Acetyl-H3 (06-599), Acetyl-H4 (06-866), dimethyl H3-K79 (07-366), dimethyl H3-K36 (07-274), dimethyl H3-K4 (07-030), FACT/cdc68 (07-255) και SET9.

Sigma : Flag M2-agarose

Τα αντισώματα για το TAF10 (1H8), TAF10 (2B11), TAF10 (2F4), TBP (3G3), TAF4 (32TA), TAF5 (1TA), TAF6 (25TA), TAF7 (19TA) παραχωρήθηκαν από τον Tora L (Jacq et al., 1994; Wieczorek et al., 1998; Bell et al., 2001), το PCAF από τον Y. Nakatani και Elp1 και Elp3 από τον J. Svejstrup.

Τα δευτερεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα Western blot α -mouse και α -rabbit immunoglobulin G ήταν συνδεδεμένα με horseradish peroxidase και ήταν από την εταιρία Jackson Laboratories και Rockland αντίστοιχα, ενώ τα immunoglobulin G α -IgM της Covance. Τα δευτερεύοντα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοφθορισμού ήταν anti-mouse ή anti-rabbit AlexaFluor568 (Molecular Probes).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agalioti, T., Chen, G., and Thanos, D. (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* *111*, 381-392.

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.

Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* *9*, 1191-1200.

Allis, C. D., Chicoine, L. G., Richman, R., and Schulman, I. G. (1985). Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 8048-8052.

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.

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* *410*, 120-124.

Bell, B., Scheer, E., and Tora, L. (2001). Identification of hTAF(II)80 delta links apoptotic signaling pathways to transcription factor TFIID function. *Mol Cell* *8*, 591-600.

Bell, B., and Tora, L. (1999). Regulation of gene expression by multiple forms of TFIID and other novel TAFII-containing complexes. *Exp Cell Res* *246*, 11-19.

Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V. A., Orphanides, G., Studitsky, V. M., and Reinberg, D. (2003). FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* *301*, 1090-1093.

Belotserkovskaya R, Reinberg D (2004) Facts about FACT and transcript elongation

through chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 14: 139-146

Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12, 142-148.

Bernstein, B. E., Humphrey, E. L., Erlich, R. L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J. S., Kouzarides, T., and Schreiber, S. L. (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8695-8700.

Birck, C., Poch, O., Romier, C., Ruff, M., Mengus, G., Lavigne, A. C., Davidson, I., and Moras, D. (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, 239-249.

Borrow, J., Stanton, V. P., Jr., Andresen, J. M., Becher, R., Behm, F. G., Chaganti, R. S., Civin, C. I., Disteché, C., Dube, I., Frischauf, A. M., *et al.* (1996). The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* 14, 33-41.

Brand, M., Leurent, C., Mallouh, V., Tora, L., and Schultz, P. (1999). Three-dimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFTC. *Science* 286, 2151-2153.

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.

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 U S A* 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.

Candau, R., Moore, P. A., Wang, L., Barlev, N., Ying, C. Y., Rosen, C. A., 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.

Cavalli, G., and Paro, R. (1998). The *Drosophila* Fab-7 chromosomal element conveys epigenetic inheritance during mitosis and meiosis. *Cell* 93, 505-518.

Cavalli, G., and Paro, R. (1999). Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator. *Science* 286, 955-958.

Chakravarthy, S., Park, Y. J., Chodaparambil, J., Edayathumangalam, R. S., and Luger, K. (2005). Structure and dynamic properties of nucleosome core particles. *FEBS Lett* 579, 895-898.

Chen, H., Tini, M., and Evans, R. M. (2001). HATs on and beyond chromatin. *Curr Opin Cell Biol* 13, 218-224.

Chen, J. L., Attardi, L. D., Verrijzer, C. P., Yokomori, K., and Tjian, R. (1994). Assembly of recombinant TFIID reveals differential coactivator requirements for distinct transcriptional activators. *Cell* 79, 93-105.

Chuikov, S., Kurash, J. K., Wilson, J. R., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, G. S., McKinney, K., Tempst, P., Prives, C., Gamblin, S.J., Barlev, N. A., and Reinberg, D. (2004). Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* 432, 353-360.

Corey, L. L., Weirich, C. S., Benjamin, I. J., and Kingston, R. E. (2003). Localized recruitment of a chromatin-remodeling activity by an activator in vivo drives transcriptional elongation. *Genes Dev* 17, 1392-1401.

Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545-553.

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.

Dikstein, R., Zhou, S., and Tjian, R. (1996). Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130. *Cell* 87, 137-146.

Emerson, B. M. (2002). Specificity of gene regulation. *Cell* 109, 267-270.

Feng, Q., Wang, H., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K., and Zhang, Y. (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol* 12, 1052-1058.

Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Funabiki, H., and Allis, C. D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*.

Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 15, 172-183.

Freiman, R. N., and Tjian, R. (2003). Regulating the regulators: lysine modifications make their mark. *Cell* 112, 11-17.

Gangloff, Y. G., Romier, C., Thuault, S., Werten, S., and Davidson, I. (2001). The

histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID. *Trends Biochem Sci* 26, 250-257.

Gangloff, Y. G., Werten, S., Romier, C., Carre, L., Poch, O., Moras, D., and 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, 340-351.

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.

Gilbert C, Kristjuhan A, Winkler G, Svejstrup JQ (2004) Elongator interactions with nascent mRNA revealed by RNA immunoprecipitation. *Mol Cell* 14: 457-464

Giles, R. H., Peters, D. J., and Breuning, M. H. (1998). Conjunction dysfunction: CBP/p300 in human disease. *Trends Genet* 14, 178-183.

Giordano, A., and Avantaggiati, M. L. (1999). p300 and CBP: partners for life and death. *J Cell Physiol* 181, 218-230.

Grande MA, Van der Kraan I, De Jong L, Van Driel R (1997) Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II. *J Cell Sci* 110: 1781-1791

Grant, P. A., Schieltz, D., Pray-Grant, M. G., Steger, D. J., Reese, J. C., Yates, J. R., 3rd, and Workman, J. L. (1998). A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* 94, 45-53.

Grant, P. A., Sterner, D. E., Duggan, L. J., Workman, J. L., and Berger, S. L. (1998). The SAGA unfolds: convergence of transcription regulators in chromatin-modifying complexes. *Trends Cell Biol* 8, 193-197.

Grewal, S. I., and Elgin, S. C. (2002). Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev* 12, 178-187.

Gu, W., and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.

Hamamoto, R., Furukawa, Y., Morita, M., Iimura, Y., Silva, F. P., Li, M., Yagyū, R., and Nakamura, Y. (2004). SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol* 6, 731-740.

Hatzis, P., and Talianidis, I. (2001). Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4alpha gene expression. *Mol Cell Biol* 21, 7320-7330.

Hatzis, P., and Talianidis, I. (2002). Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol Cell* 10, 1467-1477.

Henikoff, S., and Ahmad, K. (2005). Assembly Of Variant Histones Into Chromatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 133-153.

Hoffmann, A., Chiang, C. M., Oelgeschlager, T., Xie, X., Burley, S. K., Nakatani, Y., and Roeder, R. G. (1996). A histone octamer-like structure within TFIID. *Nature* 380, 356-359.

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.

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 by the estrogen receptor. *Cell* 79, 107-117.

Jenuwein, T. (2001). Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol* 11, 266-273.

Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.

Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Kessler, N., and Stillman, B. (1995). The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication. *Cell* 81, 1105-1114.

Kim, J. H., Lane, W. S., and Reinberg, D. (2002). Human Elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1241-1246.

Kingston, R. E., and Narlikar, G. J. (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13, 2339-2352.

Kleff, S., Andrulis, E. D., Anderson, C. W., and Sternglanz, R. (1995). Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J Biol Chem* 270, 24674-24677.

Korzus, E., Torchia, J., Rose, D. W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E. M., Mullen, T. M., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279, 703-707.

Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 12, 198-209.

Kristjuhan, A., Walker, J., Suka, N., Grunstein, M., Roberts, D., Cairns, B. R., and Svejstrup, J. Q. (2002). Transcriptional inhibition of genes with severe histone h3 hypoacetylation in the coding region. *Mol Cell* 10, 925-933.

Kritis, A. A., Ktistaki, E., Barda, D., Zannis, V. I., and Talianidis, I. (1993). An indirect negative autoregulatory mechanism involved in hepatocyte nuclear factor-1 gene expression. *Nucleic Acids Res* 21, 5882-5889.

Krogan, N. J., Dover, J., Wood, A., Schneider, J., Heidt, J., Boateng, M. A., Dean, K., Ryan, O. W., Golshani, A., Johnston, M., *et al.* (2003). The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol Cell* *11*, 721-729.

Ktistaki, E., Ktistakis, N. T., Papadogeorgaki, E., and Talianidis, I. (1995). Recruitment of hepatocyte nuclear factor 4 into specific intranuclear compartments depends on tyrosine phosphorylation that affects its DNA-binding and transactivation potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 9876-9880.

Ktistaki, E., and Talianidis, I. (1997). Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* *277*, 109-112.

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.

Kwak, Y. T., Guo, J., Prajapati, S., Park, K. J., Surabhi, R. M., Miller, B., Gehrig, P., and Gaynor, R. B. (2003). Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol Cell* *11*, 1055-1066.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* *410*, 116-120.

Lachner M, Jenuwein T (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* *14*: 286-298

Legube, G., and Trouche, D. (2003). Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO Rep* *4*, 944-947.

Lemon, B., and Tjian, R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* *14*, 2551-2569.

Leurent, C., Sanders, S., Ruhlmann, C., Mallouh, V., Weil, P. A., Kirschner, D. B., Tora, L., and Schultz, P. (2002). Mapping histone fold TAFs within yeast TFIID. *Embo J* 21, 3424-3433.

Loyola, A., and Almouzni, G. (2004). Bromodomains in living cells participate in deciphering the histone code. *Trends Cell Biol* 14, 279-281.

Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.

Lyko, F., and Paro, R. (1999). Chromosomal elements conferring epigenetic inheritance. *Bioessays* 21, 824-832.

Margueron, R., Trojer, P., and Reinberg, D. (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* 15, 163-176.

Marmorstein, R. (2001). Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 422-432.

Martinez-Balbas, M. A., Bannister, A. J., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M., and Kouzarides, T. (1998). The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *Embo J* 17, 2886-2893.

Martinez, E., Kundu, T. K., Fu, J., and Roeder, R. G. (1998). A human SPT3-TAFII31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID. *J Biol Chem* 273, 23781-23785.

Martinez, E., Palhan, V. B., Tjernberg, A., Lyman, E. S., Gamper, A. M., Kundu, T. K., Chait, B. T., and Roeder, R. G. (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.

May, M., Mengus, G., Lavigne, A. C., Chambon, P., and Davidson, I. (1996). Human TAF(II28) promotes transcriptional stimulation by activation function 2 of the retinoid X receptors. *Embo J* 15, 3093-3104.

McKittrick, E., Gafken, P. R., Ahmad, K., and Henikoff, S. (2004). Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1525-1530.

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.

Metzger, D., Scheer, E., Soldatov, A., and Tora, L. (1999). Mammalian TAF(II)30 is required for cell cycle progression and specific cellular differentiation programmes. *Embo J* 18, 4823-4834.

Milne, T. A., Briggs, S. D., Brock, H. W., Martin, M. E., Gibbs, D., Allis, C. D., and Hess, J. L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 10, 1107-1117.

Mitsiou, D. J., and Stunnenberg, H. G. (2000). TAC, a TBP-sans-TAFs complex containing the unprocessed TFIIAalpha precursor and the TFIIA gamma subunit. *Mol Cell* 6, 527-537.

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., *et al.* (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261-1270.

Mohan, W. S., Jr., Scheer, E., Wendling, O., Metzger, D., and Tora, L. (2003). TAF10 (TAF(II)30) is necessary for TFIID stability and early embryogenesis in mice. *Mol Cell Biol* 23, 4307-4318.

Muchardt C, Reyes JC, Bourachot B, Legouy E, Yaniv M (1996) The hbrm and BRG-1 proteins, components of the human SNF/SWI complex, are phosphorylated and excluded from the condensed chromosomes during mitosis. *EMBO J* 15: 3394-3402

Muller, F., and Tora, L. (2004) The multicoloured world of promoter recognition complexes. *EMBO J.* 23, 2-8

Mutskov, V., Gerber, D., Angelov, D., Ausio, J., Workman, J., and Dimitrov, S. (1998). Persistent interactions of core histone tails with nucleosomal DNA following acetylation and transcription factor binding. *Mol Cell Biol* 18, 6293-6304.

Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C. M., and Canaani, E. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* 10, 1119-1128.

Narlikar, G. J., Fan, H. Y., and Kingston, R. E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.

Neuwald, A. F., and Landsman, D. (1997). GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends Biochem Sci* 22, 154-155.

Ng, H. H., Robert, F., Young, R. A., and Struhl, K. (2003). Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* 11, 709-719.

Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C. D., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev* 16, 479-489.

Oelgeschlager, T., Chiang, C. M., and Roeder, R. G. (1996). Topology and reorganization of a human TFIID-promoter complex. *Nature* 382, 735-738.

Ogryzko, V. V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R. 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.

Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.

Orphanides, G., and Reinberg, D. (2002). A unified theory of gene expression. *Cell* 108, 439-451.

Otero, G., Fellows, J., Li, Y., de Bizemont, T., Dirac, A. M., Gustafsson, C. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J. Q. (1999). Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell* 3, 109-118.

Parthun, M. R., Widom, J., and Gottschling, D. E. (1996). The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* 87, 85-94.

Pokholok, D. K., Hannett, N. M., and Young, R. A. (2002). Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo. *Mol Cell* 9, 799-809.

Polach, K. J., Lowary, P. T., and Widom, J. (2000). Effects of core histone tail domains on the equilibrium constants for dynamic DNA site accessibility in nucleosomes. *J Mol Biol* 298, 211-223.

Pray-Grant, M. G., Daniel, J. A., Schieltz, D., Yates, J. R., 3rd, and Grant, P. A. (2005). Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 433, 434-438.

Pugh, B. F., and Tjian, R. (1991). Transcription from a TATA-less promoter requires

a multisubunit TFIIID complex. *Genes Dev* 5, 1935-1945.

Puri, P. L., Sartorelli, V., Yang, X. J., Hamamori, Y., Ogryzko, V. V., Howard, B. H., Kedes, L., Wang, J. Y., Graessmann, A., Nakatani, Y., and Levvero, M. (1997). Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol Cell* 1, 35-45.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D., and Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-599.

Reyes JC, Muchardt C, Yaniv M (1997) Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J Cell Biol* 137: 263-274

Richmond, T. J., and Davey, C. A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423, 145-150.

Ruiz-Carrillo, A., Wang, L. J., and Allfrey, V. G. (1975). Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* 190, 117-128.

Saleh, A., Schieltz, D., Ting, N., McMahon, S. B., Litchfield, D. W., Yates, J. R., 3rd, Lees-Miller, S. P., Cole, M. D., and Brandl, C. J. (1998). Tra1p is a component of the yeast Ada.Spt transcriptional regulatory complexes. *J Biol Chem* 273, 26559-26565.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are trimethylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-411.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bernstein, B. E., Karabetsou, N., Morillon, A., Weise, C., Schreiber, S. L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2003). Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Mol Cell* 12, 1325-1332.

Saunders, A., Werner, J., Andrulis, E. D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D., and Lis, J. T. (2003). Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo. *Science* *301*, 1094-1096.

Schiltz, R. L., Mizzen, C. A., Vassilev, A., Cook, R. G., Allis, C. D., and Nakatani, Y. (1999). Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem* *274*, 1189-1192.

Schneider, R., Bannister, A. J., Myers, F. A., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* *6*, 73-77.

Schwartz, B. E., and Ahmad, K. (2005). Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev* *19*, 804-814.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* *119*, 941-953.

Shio, Y., and Eisenman, R. N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13225-13230.

Sif S, Stukenberg PT, Kirchner MW, Kingston RE (1998) Mitotic inactivation of human SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Genes Dev* *12*: 2842-2851

Sims, R. J., 3rd, Belotserkovskaya, R., and Reinberg, D. (2004). Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev* *18*, 2437-2468.

Sims, R. J., 3rd, Nishioka, K., and Reinberg, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* *19*, 629-639.

Smith, E. R., Belote, J. M., Schiltz, R. L., 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.

Soutoglou, E., Demeny, M. A., Scheer, E., Fienga, G., Sassone-Corsi, P., and Tora, L. (2005). The nuclear import of TAF10 is regulated by one of its three histone fold domain-containing interaction partners. *Mol Cell Biol* 25, 4092-4104.

Soutoglou, E., Katrakili, N., and Talianidis, I. (2000). Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol Cell* 5, 745-751.

Soutoglou, E., and Talianidis, I. (2002). Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* 295, 1901-1904.

Soutoglou, E., Viollet, B., Vaxillaire, M., Yaniv, M., Pontoglio, M., and Talianidis, I. (2001). Transcription factor-dependent regulation of CBP and P/CAF histone acetyltransferase activity. *Embo J* 20, 1984-1992.

Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51-61.

Taunton, J., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272, 408-411.

Thiagalingam, S., Cheng, K. H., Lee, H. J., Mineva, N., Thiagalingam, A., and Ponte, J. F. (2003). Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci* 983, 84-100.

Timmers, H. T., Meyers, R. E., and Sharp, P. A. (1992). Composition of transcription factor B-TFIID. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8140-8144.

Tora, L. (2002). A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes Dev* 16, 673-675.

Turner, B. M. (1998). Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence. *Cell Mol Life Sci* 54, 21-31.

Turner, B. M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22, 836-845.

Turner, B. M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* 111, 285-291.

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.

Verrijzer, C. P., and Tjian, R. (1996). TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem Sci* 21, 338-342.

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.

Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P., and Zhang, Y. (2001). Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell* 8, 1207-1217.

Wang, H., Huang, Z. Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., Briggs, S. D., Allis, C. D., Wong, J., Tempst, P., and Zhang, Y. (2001). Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 293, 853-857.

Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y. H., Perlin, J. R., Leonelli, L., Sonbuchner, L. S., McDonald, C. H., Cook, R. G., Dou, Y., *et al.* (2004). Human PAD4 regulates

histone arginine methylation levels via demethylination. *Science* 306, 279-283.

Wieczorek, 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.

Willy, P. J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J. T. (2000). A basal transcription factor that activates or represses transcription. *Science* 290, 982-985.

Winkler, G. S., Kristjuhan, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Svejstrup, J. Q. (2002). Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3517-3522.

Wittschieben, B. O., Otero, G., de 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.

Wysocka, J., Myers, M. P., Laherty, C. D., Eisenman, R. N., and Herr, W. (2003). Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev* 17, 896-911.

Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T. A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A. L., Roeder, R. G., Brivanlou, A. H., and Allis, C. D. (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121, 859-872.

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 P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol Cell Biol* 18, 5659-5669.

Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., McMahon, S. B., *et al.* (2002). Nuclear receptor function requires a TFTC-type histone acetyl transferase complex. *Mol Cell* 9, 553-562.

Yang, X. J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H., and Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382, 319-324.

Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15, 2343-2360.

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, 1964-1974.

Gene-Specific Modulation of TAF10 Function by SET9-Mediated Methylation

Antigone Kouskouti,¹ Elisabeth Scheer,²
Adrien Staub,² László Tora,^{2,*}
and Iannis Talianidis^{1,*}

¹Institute of Molecular Biology and Biotechnology
FORTH
711 10 Herakleion, Crete
Greece

²Institute de Genetique et de
Moleculaire et Cellulaire
CNRS/INSERM/ULP
F-67404 Illkirch Cedex
CU de Strasbourg
France

Summary

SET9 is a member of the SET domain-containing histone methyltransferase family that can specifically methylate histone 3 at lysine 4 position. Although nucleosomal histones are poor substrates for SET9, the active enzyme can stimulate activator-induced transcription. Here, we show that SET9 can monomethylate the TBP-associated factor TAF10 at a single lysine residue located at the loop 2 region within the putative histone-fold domain of the protein. Methylated TAF10 has an increased affinity for RNA polymerase II, pointing to a direct role of this modification in preinitiation complex formation. Reporter assays and studies on TAF10 null F9 cells expressing a methylation-deficient TAF10 mutant revealed that SET9-mediated methylation of TAF10 potentiates transcription of some but not all TAF10-dependent genes. This gene specificity correlated with SET9 recruitment. The promoter-specific effects of SET9-methylated TAF10 may have important implications regarding the biological function of SET domain-containing lysine methylases, whose primary targets have been presumed to be histones.

Introduction

Histone methylation, together with other site-specific modifications, such as acetylation, phosphorylation, and ubiquitination, plays an important role in the generation of specific molecular marks in chromatin, which are recognized by regulatory proteins, thus determining dynamic transitions between transcriptionally active and inactive states (Fischle et al., 2003; Turner, 2002). In recent years a number of histone methyltransferases (HMTases), which can methylate histones at specific residues, have been identified and characterized (Kouzarides, 2002; Jenuwein, 2001). Methylation of histone 3 (H3) at lysine 9 and 27 by the Suv39 family of HMTases has been implicated in heterochromatin formation and transcriptional silencing (Jenuwein, 2001). In contrast,

methylation of H3 at lysine 4 and 36 by the SET1 and SET2 family of enzymes has been demonstrated to correlate with active transcription (Kouzarides, 2002). SET9 is a recently identified H3 lysine 4 methyltransferase containing the conserved SET domain but devoid of any pre- or post-SET domains (Wang et al., 2001; Nishioka et al., 2002). Although direct evidence for the *in vivo* function of SET9 is still missing, it was proposed that SET9-mediated histone methylation may function in transcription activation by competing with histone deacetylases and by precluding H3 lysine 9 methylation. Unlike the other HMTases, SET9 cannot methylate H3 assembled into nucleosomes, although it displays a strong activity with free histone substrates (Wang et al., 2001; Nishioka et al., 2002). On the other hand, it was demonstrated that SET9 could stimulate activator-induced transcription *in vivo* (Nishioka et al., 2002). This suggests that, if SET9 indeed acts via histone methylation *in vivo*, its activity must be modulated by other, still unidentified factor(s). An alternative, rather intriguing, possibility is that histones are not the sole physiological substrates for this enzyme, implying that SET9-mediated activation may also involve modification of other proteins playing a role in transcription activation. Post-translational modifications of nonhistone proteins by other chromatin-modifying activities, such as acetyltransferases or arginine methylases, have been identified, and their role in diverse biological pathways, including transcription, is well established (Chen et al., 2001; Freiman and Tjian, 2003). However, apart from histones, no other substrates are known for the SET-domain family of lysine methyltransferases.

Here, we show that SET9 can efficiently methylate TAF10 (formerly called TAF_i30), a component of the general transcription factor complex TFIID. We present evidence that SET9-mediated methylation of TAF10 has a stimulatory effect on transcription in a promoter-specific manner. In addition, we demonstrate that TAF10 can physically interact with RNA polymerase II and that the affinity of this interaction is significantly increased by SET9-induced methylation.

Results

A partial TFIID complex composed of TAF4, TAF5, Flag-TAF6, TAF8, TAF9, TAF10, and TAF12 was purified by anti-Flag immunoaffinity column from SF9 cells coinfecting with baculovirus vectors expressing the individual proteins. An *in vitro* methyltransferase (MTase) assay using recombinant SET9 and ³H-S-adenosyl-methionine (³H-SAM) revealed a radioactive double band of about 30 kDa, characteristic of TAF10 (Figure 1A). To confirm that TAF10 can indeed be methylated by SET9, we performed the same MTase assay with purified bacterially expressed TAF10 proteins. Full-length TAF10, or the GST fusions containing the C-terminal (amino acids 100–217 or 120–206) regions of the protein were methylated by SET9 with an efficiency comparable to free histones (Figure 1B). The *in vitro*-methylated GST-TAF10 (120–

*Correspondence: talianid@imbb.forth.gr (I.T.); laszlo@igbmc.u-strasbg.fr (L.T.)

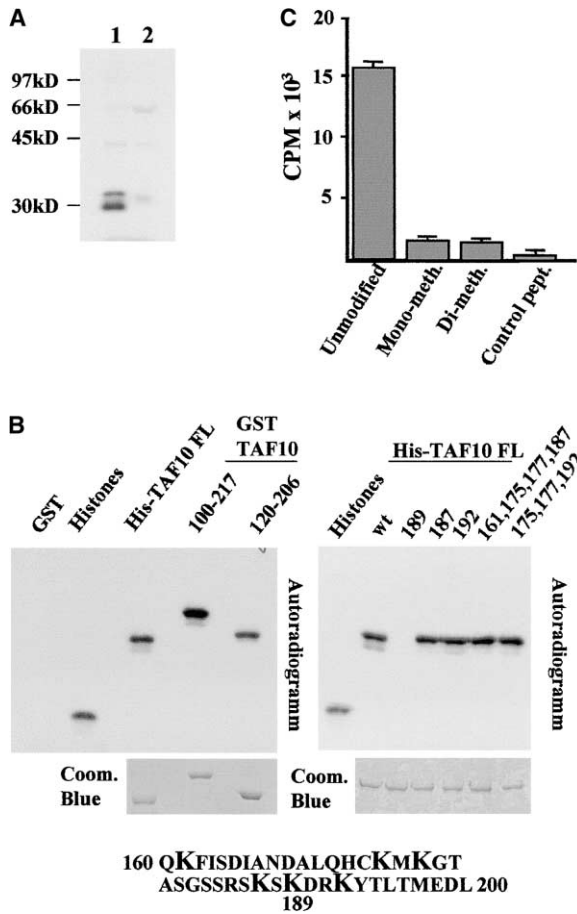


Figure 1. SET9 Methylates TAF10 In Vitro at Lysine 189
(A) Baculovirus expression system-derived partial TFIIID complex composed of TAF4, TAF5, TAF6, TAF8, TAF9, TAF10, and TAF12 (lane 1), or TAF6 and TAF9 (lane 2), were subjected to in vitro MTase reaction with 100 ng recombinant SET9.
(B) MTase assays were performed with 100 ng SET9. As substrates, 10 μ g of free histones, 1 μ g of the indicated GST-TAF10 fusions, or His-tagged full-length TAF10 proteins were used. Numbers in the right panel indicate the positions of lysine residues mutated in the full-length His-TAF10 protein. The reaction products were analyzed by SDS-PAGE followed by autoradiography. The bottom panel (Coom. Blue) depicts part of the gel stained with Coomassie blue. The TAF10 amino acid sequence between positions 160 and 200 with highlights of the mutated lysine residues is depicted at the bottom.
(C) In vitro methylation reactions were performed using 2 μ g of unmodified or lysine 189 mono- and dimethylated synthetic peptides corresponding to TAF10 (180–195 aa) and 100 ng SET9. The reaction products were analyzed by P81 filter binding assays. As control, a peptide synthesized from the C-terminal region of HNF-4 was used.

206) protein was subjected to partial trypsin digestion, followed by HPLC purification and Edman degradation of the resulting peptides. This analysis revealed lysine 189 as the site of modification (data not shown). This was further confirmed by in vitro MTase assays using mutated full-length recombinant TAF10 proteins as substrates. SET9 was able to methylate all lysine mutants except TAF10-K189Q (Figure 1B). When a synthetic peptide spanning the 180–195 amino acid region of TAF10 was used as a substrate, we observed that SET9 could methylate the unmodified peptide but not peptides that

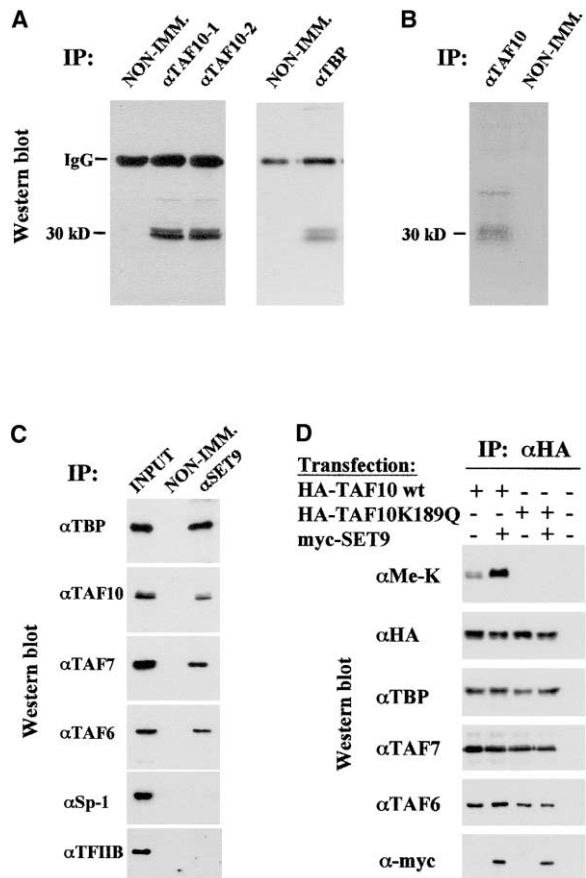


Figure 2. TAF10 Interacts with SET9 and Is Methylated In Vivo
Methylated and unmethylated TAF10 incorporate into the TFIIID complex in vivo.
(A) Nuclear extracts from HeLa cells were used for immunoprecipitations with preimmune serum or the monoclonal antibodies 1H8 (α TAF10-1), 2B11 (α TAF10-2), or 3G3 (α TBP) followed by Western blot analysis using the Pan-Methyl-Lysine antibody (Abcam).
(B) HeLa cell nuclei were incubated with 3 H-SAM and after extract preparation were subjected to immunoprecipitations with the indicated antibodies and analyzed by SDS-PAGE. An autoradiogram of a 13 days exposure is shown.
(C) Nuclear extracts from HeLa cells were immunoprecipitated with α SET9 and analyzed in Western blots with the indicated antibodies.
(D) Nuclear extracts from HEK293 cells transfected with the indicated expression vectors were immunoprecipitated with α HA. The precipitated proteins were analyzed in Western blots with the indicated antibodies.

were mono- or dimethylated at position 189 (Figure 1C). This indicates that SET9 can monomethylate TAF10, similar to histone 3.

To test whether endogenous TAF10 is methylated, nuclear extracts from HeLa cells were immunoprecipitated with two different TAF10 antibodies followed by Western blot analysis using a pan-methyl-lysine antibody. As judged by the characteristic double band signal (Jacq et al., 1994), this antibody efficiently reacted with the immunoprecipitated TAF10 (Figure 2A). Furthermore, a similar 30 kDa signal could also be observed in TBP immunoprecipitates, suggesting that TAF10 is methylated within the TFIIID complex. The in vivo methylation of TAF10 was further substantiated by in-nucleo

metabolic labeling experiments. HeLa cell nuclei were incubated with ^3H -SAM, and after salt extraction, the soluble proteins were immunoprecipitated with a TAF10 antibody. A 30 kDa double band corresponding to TAF10 could be detected by autoradiography (Figure 2B).

To address the question whether SET9 is involved in the in vivo methylation of TAF10, we first examined the interaction of the endogenous proteins. As shown in Figure 2C, an antibody against SET9 specifically immunoprecipitated endogenous TAF10 together with other components of the TFIID complex (TBP, TAF6, and TAF7), pointing to the in vivo association of SET9 with TFIID. Next, HA-tagged wild-type and K189Q mutant TAF10 proteins were overexpressed in cells alone or together with SET9, followed by nuclear extract preparations and immunoprecipitations with α HA antibody. Western blot analysis of the immunoprecipitates with antibodies against TBP, TAF6, and TAF7 revealed that both the wild-type and the methylation-deficient K189Q mutant TAF10 could efficiently incorporate into TFIID irrespective of SET9 overexpression (Figure 2D). As expected, only the wild-type but not the K189Q mutant TAF10 exhibited immunoreactivity with the pan-methyl-lysine antibody, albeit both proteins interacted with SET9 (Figure 2D). Thus, TAF10K189Q is not methylated in vivo at another position. Importantly, SET9 overexpression significantly increased the pan-methyl-lysine antibody-reactive signal in the immunoprecipitates containing wild-type TAF10 (Figure 2D). These results demonstrate that SET9 can methylate TAF10 in vivo and that methylation does not affect TAF10 incorporation into TFIID.

The functional role of TAF10 methylation in gene activation was investigated by complementation of TAF10 null mouse F9 cells by the TAF10K189Q mutant. Conditional disruption of TAF10 in F9 cells was performed using the Cre-lox strategy as previously described (Metzger et al., 1999). Inactivation of both alleles has been shown to impair cell viability, which can be rescued by conditional ectopic expression of wild-type human TAF10 (Metzger et al., 1999). Cells containing one knockout and one floxed allele of TAF10 ($L^{-}/L2$) and the reverse tetracycline-controlled rTA expression vector were stably transfected with vectors containing the TAF10K189Q cDNA or yeast TAF10 cDNA under the control of the tetracycline operator. Doxycycline-inducible expression of the transgene was verified by Western blot analysis using the human-specific TAF10 antibody 2F4 (Figure 3A). These cells were then electroporated with an expression vector containing the Cre-recombinase and the excision of exon 2, which creates a null allele (Metzger et al., 1999), was analyzed by PCR over a period of 11 days. PCR products corresponding to the excised allele (233 bp) were constantly detected from the first day after Cre treatment throughout the whole period, suggesting that the proportion of the cells in which the endogenous TAF10 allele has been inactivated is viable when they express TAF10K189Q (Figure 3C). As a negative control, we examined the disappearance of exon 2 in TAF10 ($L^{-}/L2$) cells expressing yeast TAF10, which cannot rescue the mouse TAF10 $^{-/-}$ cells (E.S. and L.T., unpublished data). As expected, the 233 bp products could not be detected after 5 days of Cre treatment (Figure 3C). TAF10 $^{-/-}$ cells rescued by wild-

type human TAF10 or TAF10K189Q expressed comparable levels of the transgenes in a doxycycline-dependent manner (Figure 3B). Importantly, TAF10 methylation could only be observed in wt TAF10-expressing cells, further corroborating the notion that TAF10 methylation occurs at lysine 189. The anti-TAF10 antibody coimmunoprecipitated several TFIID subunits from both wt TAF10 and TAF10K189Q cells (Figure 3B), showing that both proteins can integrate into endogenous TFIID complexes. The efficient rescue of the TAF10 $^{-/-}$ lethal phenotype by the K189Q mutant suggested that TAF10 methylation may not play a major role in the transcription of the cell cycle-regulated genes, the downregulation of which has been attributed to the G₀/G₁ arrest and apoptosis of cells lacking TAF10 (Metzger et al., 1999). Only minor changes were observed between F9 cells complemented by wild-type TAF10 and TAF10K189Q, in terms of cell cycle distribution, cell morphology, or the ability to differentiate toward endodermal lineages (see Supplemental Data at <http://www.molecule.org/cgi/content/full/14/2/175/DC1>). The expression of individual genes was examined by RT-PCR of RNAs prepared from the two cell lines before and after induction by retinoic acid + cAMP. The expression of two TAF10-dependent genes (A. Soldatov and L.T., unpublished data), *ERF1* and the RA-inducible *ERA1* gene, was compromised (about 2-fold reduction) in the TAF10K189Q-expressing cell line, both before and after parietal endoderm differentiation (Figure 3D). In contrast, the expression of other genes, such as *HPRT* and *cyclin E*, was not affected, suggesting that the effect of TAF10 methylation on transcription is gene specific.

To test whether this difference is due to the selective recruitment of SET9 to the different regulatory regions, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays using wild-type F9 cells induced by retinoic acid + cAMP. As shown in Figure 3E, in SET9 immunoprecipitates significant amounts of DNA corresponding to *ERA* and *ERF1* promoters could be detected, while the signal obtained for *cyclin E* and *HPRT* promoter DNA was hardly above background levels. Since TAF10 occupancy and H3-K4 methylation could be detected in all four genes (Figure 3E), these data suggest that the gene-specific effect of TAF10 methylation is mediated by differential recruitment of SET9 to the specific gene regulatory regions. Comparing the ChIP signals obtained for the *ERA* and *ERF-1* genes, we observed an about 2- and 2.5-fold difference between the two genes in α K4-DiMeH3 and α TAF10 immunoprecipitates, respectively (Figure 3E). Although potential differences in the accessibility of the epitopes for the antibodies within the context of the different PICs formed on the two genes can not be excluded, the observed difference may also reflect the different percentage of cells where these genes are in an active state at a given time point. As H3-K4 methylation and TAF10 occupancy characterize active promoters (Kouzarides, 2002; Muller and Tora, 2004) and because *ERA* is expressed at much higher levels than *ERF1* in these cells, we favor the latter explanation.

In order to gain mechanistic insight into the role of TAF10 methylation, we performed "artificial recruitment" assays using Gal4-TAF10 fusion constructs. Gal4-TAF10wt, Gal4-TAF10K189Q, and Gal4-TAF10K189R in

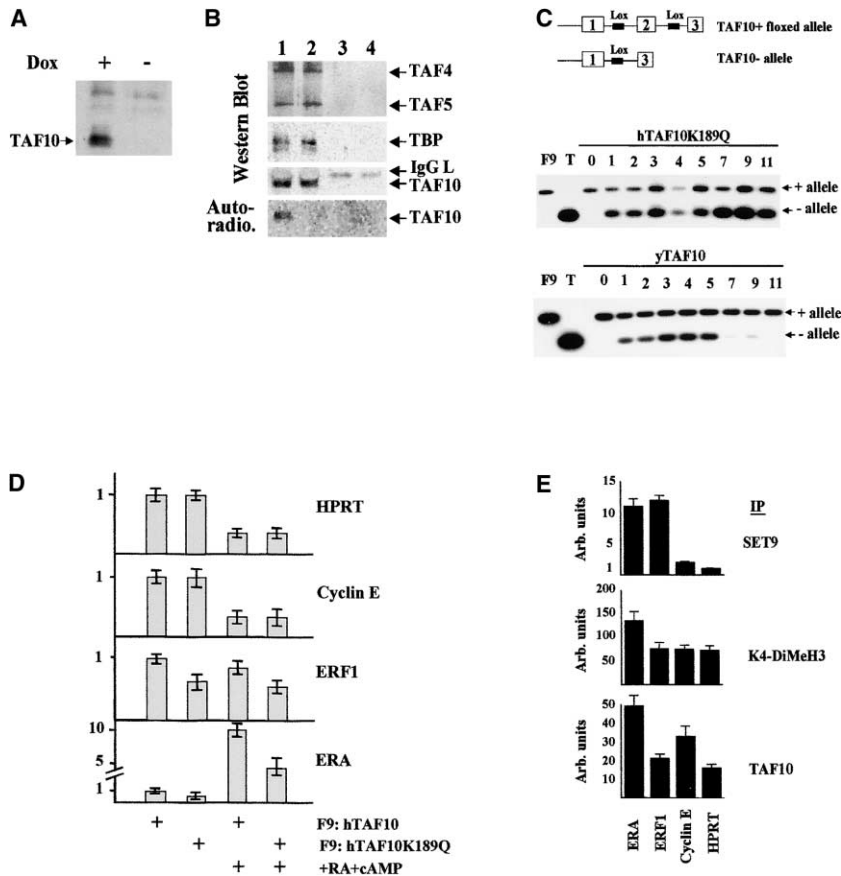


Figure 3. The Methylation-Deficient Mutant TAF10 Can Rescue the Growth Defect of TAF10 Null F9 Cells but Compromises the Expression of *ERF1* and *ERA* Genes

(A) F9:hTAF10(K189Q) cells were grown in the presence or absence of 1 μ g/ml doxycycline. Western blot analysis of whole-cell extracts was performed with TAF10 (2F4) antibody.

(B) Nuclei from F9:hTAF10wt cells (lanes 1 and 3) or F9:hTAF10(K189Q) cells (lanes 2 and 4) were incubated with 3 H-SAM and after extract preparation were subjected to immunoprecipitation with α TAF10 (1H8) (lanes 1 and 2) or control antibody (lanes 3 and 4) and analyzed by Western blots with the antibodies shown at right. At the bottom, an autoradiogram of a 14 day exposure is shown.

(C) L⁻/L2TAF10 F9 cells harboring rTA vectors were first electroporated with either pHTAF10K189Q or yTAF10 linearized constructs. The cells grown in the presence of doxycycline were subcloned and then electroporated with pSG-Cre. The excision of exon 2 was monitored by PCR analysis of the genomic DNA. In lanes F9 and T, genomic DNA from wild-type F9 (F9) or F9:hTAF10 (T) cells was analyzed, respectively.

(D) RT-PCR analysis for the expression analysis of the indicated genes was performed with total RNAs prepared from F9:hTAF10 and F9:hTAF10(K189Q) cells before and after 5 days of treatment with retinoic acid (1 μ M) and bt₂cAMP (250 μ M). Bars correspond to average signals from at least four experiments with independent RNA preparations.

(E) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis of SET9 and TAF10 occupancy and H3-K4-dimethylation of *ERA*, *ERF1*, *cyclin E*, and *HPRT* promoters in RA + cAMP-induced F9 cells. Bars represent real-time PCR values normalized to inputs and the values obtained with nonspecific antibody, which was set as one unit in each calculation.

duced transcription of a Gal4-responsive reporter about 80-fold (Figure 4A). Importantly, however, SET9 overexpression further potentiated Gal4-TAF10wt-driven transcription about 30-fold but not that of Gal4-TAF10K189Q or Gal4-TAF10K189R. No such stimulation could be observed by overexpression of a methylase-deficient point mutant of SET9 (SET9H297A) (Figure 4A). When activator-induced transcription was tested, we found, as expected (Nishioka et al., 2002), that wtSET9 but not SET9H297A could enhance Gal4-VP16-mediated activation (Figure 4B). A similar effect (about 2.8-fold induction) was observed with the RXR/RAR-responsive reporter but not with the NF κ B p65- or HNF-1-responsive reporters, suggesting that SET9 action is promoter specific (Figure 4B). Overexpression of either the wild-type

or the K189Q mutant form of TAF10 increased Gal4-VP16-dependent activation about 2-fold, suggesting that the concentration of endogenous TAF10 is limiting in the cells (Figure 4C). SET9 further increased wtTAF10-stimulated activation about 3-fold, an effect that could not be observed with SET9H297A or in cells overexpressing TAF10K189Q. These results suggest that methylation of TAF10 plays an important role in SET9-mediated enhancement of activator-induced transcription.

As shown above, methylation of TAF10 does not influence its incorporation into or the integrity of TFIID complex. Therefore, we sought to investigate other characteristics of the protein that could be influenced by this modification. As a result of a broader screen, we found that TAF10 is associated with RNA polymerase II in nu-

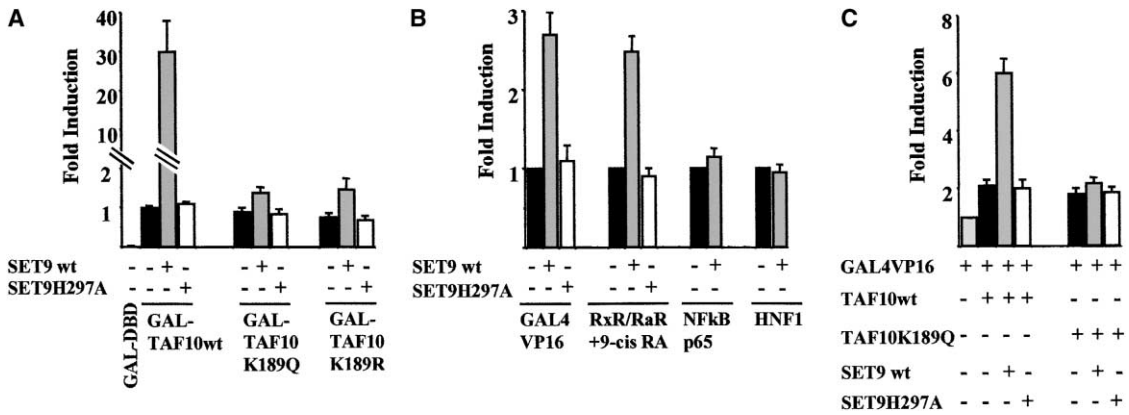


Figure 4. Involvement of TAF10 Methylation in SET9-Mediated Potentiation of Transcription

HEK293 cells were transfected with the indicated combinations of expression vectors and the appropriate luciferase reporter plasmids. Normalized luciferase activities and standard errors from four experiments are expressed as fold inductions above the activity obtained by Gal-TAF10wt (A), by the indicated activators without SET9 (B), and by Gal4-VP16 (C).

clear extracts from cells transfected with HA-tagged wtTAF10 and TAF10K189Q (Figure 5A). Western blot analysis of the two anti-HA immunoprecipitates revealed a similar immunoreactivity by the H14 antibody (raised against Ser5-phosphorylated CTD), while the H5 antibody (raised against Ser2-phosphorylated CTD) gave no signal (Figure 5A). Since it is expected that only a small proportion of the overexpressed TAF10 gets methylated in the cells, we further investigated the potential role of TAF10 methylation in the interaction with RNA pol-II by performing GST pull-down experiments with unmethylated or SET9-premethylated GST-TAF10 fusion proteins. H14-reactive RNA pol II derived from HepG2 cell extracts was efficiently pulled down in both cases at 150 mM salt concentrations. On the other hand, when the stringency of the washing conditions was increased, the interaction of RNA pol II with premethylated TAF10 was significantly stronger than with unmethylated TAF10 (Figure 5B). We also performed the same experiments with the methylation-deficient GST-TAF10K189Q bait. In this control assay, the above shown difference in interaction could not be observed (Figure 5C). This suggests that methylation may increase the affinity of the interaction of TAF10 with RNA polymerase II.

Discussion

Transcriptional activation of eukaryotic genes is controlled by a number of distinct events, including chromatin remodeling and the regulated assembly of preinitiation complexes (PIC) at promoters. Posttranslational modifications of histones lead to dynamic changes in local chromatin structure that influence the recruitment of transcription complexes into regulatory regions (Fischle et al., 2003). In recent years it has become clear that histones are not the sole substrates of the chromatin-modifying enzymes and modifications of nonhistone regulatory proteins may play an equally important role in transcription regulation (Gu and Roeder, 1997; Soutoglou et al., 2000; Chen et al., 2001; Freiman and Tjian, 2003). Acetylation and arginine methylation have been demonstrated to influence multiple properties of tran-

scription factors, linking distinct covalent modifications of nonhistone proteins to specific regulatory functions. In addition to DNA binding factors, the activity of several other components of the transcription initiation and elongation machinery has been shown to be modulated by acetylation or arginine methylation (Imhof et al., 1997; Kwak et al., 2003). In this respect, the TFIID complex was an exception, as no evidence existed so far for the potential modulation of TFIID components by histone-modifying enzymes.

Addressing this issue, we demonstrate that the TBP-associated factor TAF10 can be methylated *in vitro* and *in vivo* by the SET domain-containing histone lysine methyltransferase SET9. This modification has a stimulatory effect on transcription. TAF10 methylation occurs at a single amino acid residue (lysine 189), located in the loop 2 region between the last two α helices of its histone-fold domain. The pairwise interactions mediated by the histone-fold domains of TAFs have been shown to play a pivotal role in the establishment of the overall architecture and the stability of the TFIID complex (Gangloff et al., 2001; Mohan et al., 2003). As demonstrated by our coimmunoprecipitation assays, both methylated and unmethylated TAF10 can incorporate into TFIID, arguing against the possibility that TAF10 methylation may alter the composition of the complex. It was anticipated, however, that such a modification may induce changes in the molecular organization of the complex that should influence TFIID function. In line with this, we found that TAF10 can interact with RNA pol II and that SET9-mediated methylation of TAF10 increases the affinity of this interaction. In this way, TAF10 methylation may influence the stable recruitment of RNA pol II into promoters, which could be part of the molecular mechanism involved in the observed transcription-stimulatory effect.

Furthermore, we show gene-restricted functional consequences of TAF10 methylation. The methylation-site mutant of TAF10 could rescue the growth defect of TAF10-deficient F9 cells, suggesting that TAF10 methylation is not required for the activation of most genes regulating cell cycle progression or primitive or parietal

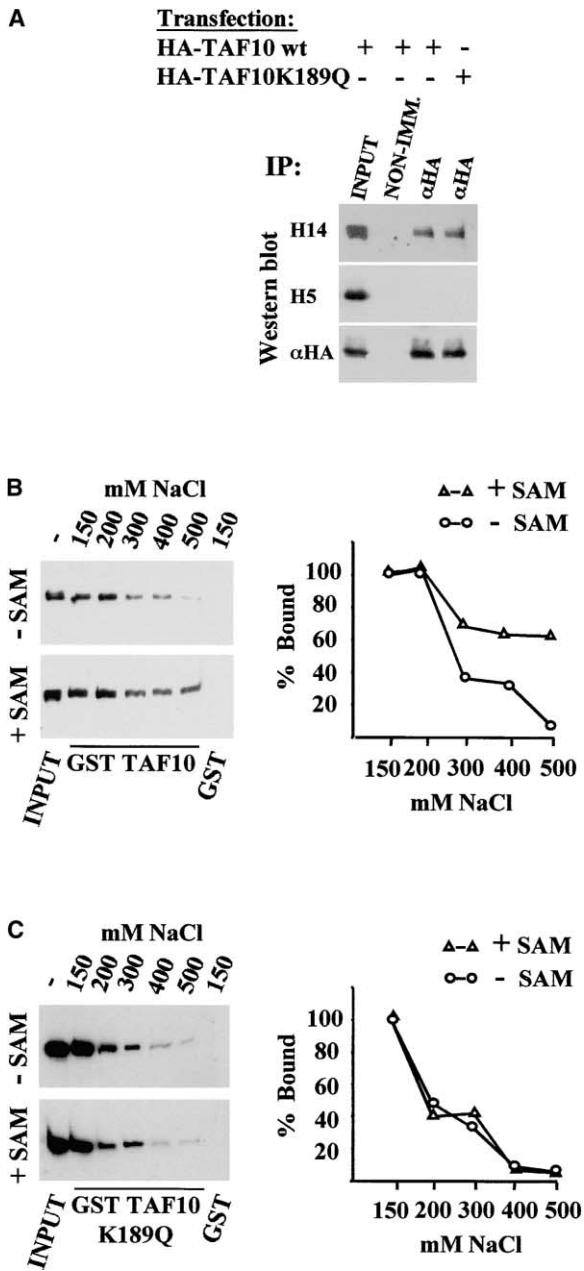


Figure 5. SET9-Induced Methylation Increases the Affinity of the Interaction of TAF10 with RNA Polymerase II

(A) Extracts from HEK293 cells transfected with the indicated plasmids were immunoprecipitated with α HA antibody, and the presence of phosphorylated forms of RNA polymerase II in the precipitates was evaluated by Western blot analysis using H14 (Ser5-CTD) or H5 (Ser2-CTD) antibodies.

(B and C) Equal amounts (0.5 μ g) of GST-TAF10wt or GST-TAF10K189Q were immobilized on glutathione agarose beads and incubated with 1 μ g of recombinant SET9, in the absence (upper panels) or presence (lower panels) of 1 mM cold SAM for 1 hr at 30°C. The beads were then excessively washed with interaction buffer containing 500 mM NaCl to remove associated SET9, followed by incubation with HepG2 nuclear extracts. After washing, GST-TAF10-associated RNA polymerase II was monitored by Western blot analysis using the H14 antibody. Serial exposures of ECL images were quantitated by the NIH-image 1.63 software. Quantitative presentations of the data are depicted in the right panels.

endoderm differentiation. Consistent with this, TAF10 methylation-dependent transcriptional enhancement was observed only in a subset of TAF10-dependent genes, including ERA and ERF1. This specificity may arise from the selective recruitment of SET9 into the individual promoters. Indeed, we demonstrate a specific in vivo recruitment of SET9 to the ERA and ERF1 promoters but not to those of cyclin E or HPRT. In addition, SET9 could potentiate transcription driven by some activators (e.g., Gal4-VP16 or RXR/RAR) but not those driven by others (e.g., NF κ B or HNF-1).

SET9 has been identified as a site-specific histone methyltransferase that methylates histone 3 at the lysine 4 position. This modification also correlates with gene activation. Although it was documented that H3 assembled into nucleosomes is a poor substrate for SET9, the role of H3 methylation in SET9 action cannot be excluded (Nishioka et al., 2002). On the other hand, evidence obtained by in vivo TAF10 replacement experiments suggests that TAF10 methylation represents an important part of the mechanism involved in SET9-dependent transcriptional enhancement. Unlike cells expressing high levels of wild-type TAF10, those overexpressing the methylation-deficient mutant of TAF10 were not responsive to SET9 in functional assays. Although the molecular details remain to be determined, it is tempting to speculate that TAF10 and histone H3 modifications may represent interdependent, sequential molecular steps in the mechanism of SET9-regulated transcription. In this respect we note that H3-K4 methylation did not correlate with SET9 occupancy on cyclin E and HPRT promoters, suggesting that, at least in these genes, the particular histone modification is catalyzed by another methylase. In F9 cells expressing the methylation-deficient mutant of TAF10, transcription of specific targets, such as *ERF1* or *ERA1*, was impaired but not erased entirely. This suggests that SET9-induced TAF10 methylation alone plays a “fine tuning,” rather than a decisive, role in the transcription of these genes. Such fine-tuning mechanisms can provide the cells with the potential to influence the efficiency of the transcription machinery in subtle ways, thus contributing to the generation of well-controlled intracellular levels of the individual gene products in a given physiological condition.

TAF10 is an integral component of TFIID, which plays an “integrator” role in the assembly of preinitiation complexes on active promoters, via core promoter recognition and selective interactions with the activation domains of transcription factors. In mammalian cells, functionally distinct TFIID complexes exist, which differ in their TAF composition (Bell and Tora, 1999; Bell et al., 2001; Muller and Tora, 2004). The gene- and cell type-specific action of the different TFIID complexes points to the hallmark role of TFIID in the specification of diverse gene expression patterns. The results of this study illustrate that gene-specific TFIID function may be modulated by posttranslational modification of its TAF component, thus providing an example for an additional level of complexity to the combinatorial network involved in transcription regulation. Finally, the identification of a nonhistone regulatory substrate for SET9 points to a more widespread function of SET domain-containing histone lysine methyltransferases, which

may operate in place of, or more likely, in addition to chromatin structure modifications.

Experimental Procedures

Recombinant Proteins and Antibodies

The cDNA fragment corresponding to full-length human TAF10 ORF was cloned into pET15b-6xHis vector, while the C-terminal fragments corresponding to the 100–217 aa and the 120–206 aa regions were cloned into pGEX3x bacterial expression vectors (Jacq et al., 1994). Recombinant proteins were expressed either as GST-fusions or 6xHis-fusions in *E. coli* BL21 cells and were purified on GST-Sephrose (APB) or talon metal affinity resin (Clontech), respectively. Viral stocks of baculovirus expression vectors encoding the different TFIID components were used to coinfect Sf9 cells, and the partial complexes were purified by affinity purification using α Flag-M2 agarose column, taking advantage of the Flag epitope-tag fused to TAF6. Point mutations were generated by the GeneEditor site-directed mutagenesis kit (Promega).

The following antibodies were used in this study: α TAF10 (1H8), α TAF10 (2B11), α TAF10 (2F4), α TBP (3G3), α TAF4 (32TA), α TAF5 (1TA), α TAF6 (25TA), α TAF7 (19TA) (Jacq et al., 1994; Wieczorek et al., 1998; Bell et al., 2001), α SET9 and K4-diMeH3 (Upstate Biotechnology), α HA, α Myc, α Sp1 and α TFIIB (Santa Cruz Biotechnology), α RNA pol-II Ser5P-CTD (H14, Covance), α RNA pol-II Ser2P-CTD (H5, Covance), α Flag (M2, Sigma), and α Pan-methyl-lysine (Abcam).

In Vitro Methyltransferase Assays

In vitro methyltransferase assays were performed in a 30 μ l reaction volume, using 100 ng purified recombinant SET9 enzyme together with 1 μ g recombinant TAF10 proteins, 10 μ g histones, or 2 μ g synthetic peptide substrates and 1 μ Ci 3 H-SAM (APB) in a reaction buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM KCl, 5 mM DTT, 4 mM EDTA. After incubation at 30°C for 1 hr the reactions were stopped, either by the addition of SDS sample buffer or by spotting onto Whatman P81 filters. The filters were washed excessively with 50 mM NaHCO₃ and counted by liquid scintillation.

Transfections and Protein Interaction Assays

HEK293 cells were transfected by the calcium-phosphate-DNA co-precipitation method as described in Hatzis and Talianidis (2001). The reporter plasmids (5xGal4-E1b-Luc, 3x β RARE-TK-luc, 3xNFkB-TK-luc, 3xAlbPE-TK-luc) and expression vectors (pHA-TAF10, GST-TAF10) have been described in Ktistaki and Talianidis (1997), Hatzis and Talianidis (2001), and Jacq et al. (1994). Reporter assays, nuclear extract preparations, GST pull-down assays, and Western blot analysis were performed as described previously (Ktistaki and Talianidis, 1997). Immunoprecipitations were performed as in Hatzis and Talianidis (2001) and Wieczorek et al. (1998), except that all washing buffers contained 200 mM NaCl. The antibodies used in this study are listed in the Supplemental Data on *Molecular Cell's* website.

For in-nucleo metabolic labeling assays, nuclei were prepared by the sucrose gradient method as described in Hatzis and Talianidis (2002). The nuclei were washed with a buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 5 mM MgCl₂, and 4 mM DTT and adjusted to 10⁷ nuclei per 100 μ l concentration in the same buffer. Reactions were initiated by the addition of 20 μ Ci 3 H-SAM followed by incubation at 30°C for 30 min. Nuclei were extracted by the addition of an equal volume of NLB (25 mM HEPES [pH 7.9], 800 mM KCl, 10% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, and 10 mM NaF) and incubating for 30 min at 4°C with constant agitation. The resulting extracts were used for immunoprecipitations and SDS-PAGE analysis.

Conditional Rescue of TAF10^{-/-} F9 Embryonic Carcinoma Cells

F9 TAF10^{LoxP} cells carrying floxed TAF10 alleles and stably expressing the reverse tetracycline activator rtTA (Metzger et al., 1999) were transfected with pUHD-TAF10wt, pUHD-TAF10K189Q, or pUHD-yTAF10 plasmids, in which the expression of wtTAF10, K189Q mutant TAF10, and yeast TAF10 is under the control of tet-operator. After double selection with hygromycin and G418, the resulting clones were treated with 1 μ g/ml doxycycline and the inducible expression of transgenes was analyzed by Western blot-

ting. These cells were then electroporated with pSG-Cre plasmid and the excision of exon 2 from the endogenous TAF10 alleles was monitored by PCR, as described previously (Metzger et al., 1999). In vitro differentiation and cell cycle analysis of F9 cells and RT-PCR assays for the analysis of the expression of individual genes were performed as described (Metzger et al., 1999). We analyzed the mouse ERA1 (accession number M22115), ERF (accession number U58533), and cyclin E (accession number X5888) genes, which have been previously shown to require TAF10 for their expression (Metzger et al., 1999; A. Soldatov and L.T., unpublished data).

Chromatin Immunoprecipitations

Wild-type F9 cells were incubated for 5 days with with retinoic acid (1 μ M) and bt₂cAMP (250 μ M) and crosslinked with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. Crosslinking was stopped by the addition of glycine to a final concentration of 0.125 M. The cells were washed with cold PBS and swelled on ice for 10 min in 25 mM HEPES (pH 7.8), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, and protease inhibitor cocktail (Roche). Following Dounce homogenization (20 strokes, pestle A), the nuclei were collected and resuspended in "sonication buffer" containing 50 mM HEPES (pH 7.9), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Nadeoxycholate, 0.1% SDS, and protease inhibitors and sonicated on ice to an average length of 200–1000 bp. After centrifugation, the soluble chromatin was subjected to immunoprecipitation as described (Soutoglou and Talianidis, 2002). The DNA in the resulting immunoprecipitates were analyzed by real-time PCR using SYBR green.

Acknowledgments

We thank L. Vandel and P. Hatzis for helpful discussions; A. Eberlin for cell cycle measurements; M. Oulad-Abdelghani for antibody preparation; and N. Katrakili and I. Kymizi for assistance. This work was supported by HFSP (RGP-0024) and the EU program (HPRN-CT-2000-00087) (to I.T. and L.T.) and by the INSERM, the CNRS, the Hôpital Universitaire de Strasbourg, the ARC, the FRM, the Ministère de la Recherche (ACI), and EU grants (HPRN-CT-2000-00088) (to L.T.).

Received: November 10, 2003

Revised: February 27, 2004

Accepted: March 1, 2004

Published: April 22, 2004

References

- Bell, B., and Tora, L. (1999). Regulation of gene expression by multiple forms of TFIID and other novel TAFII-containing complexes. *Exp. Cell Res.* 246, 11–19.
- Bell, B., Scheer, E., and Tora, L. (2001). Identification of hTAF(II)80 delta links apoptotic signaling pathways to transcription factor TFIID function. *Mol. Cell* 8, 591–600.
- Chen, H., Tini, M., and Evans, R.M. (2001). HATs on and beyond chromatin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 218–224.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C.D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 172–183.
- Freiman, R.N., and Tjian, R. (2003). Regulating the regulators: lysine modifications make their mark. *Cell* 112, 11–17.
- Gangloff, Y.-G., Romier, C., Thuault, S., Werten, S., and Davidson, I. (2001). The histone fold is a key structural motif of transcription factor TFIID. *Trends Biochem. Sci.* 26, 250–257.
- Gu, W., and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595–606.
- Hatzis, P., and Talianidis, I. (2001). Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4alpha gene expression. *Mol. Cell Biol.* 21, 7320–7330.
- Hatzis, P., and Talianidis, I. (2002). Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol. Cell* 10, 1467–1477.

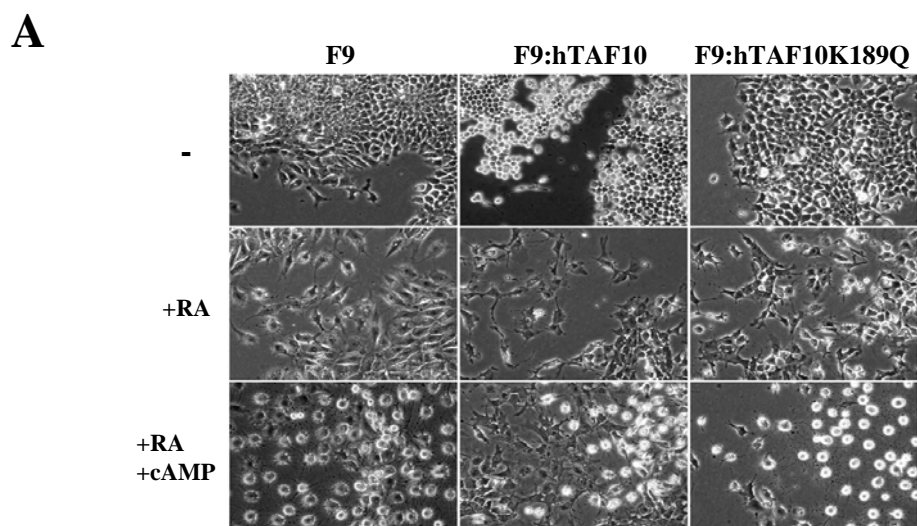
- Imhof, A., Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Wolffe, A.P., and Ge, H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr. Biol.* *7*, 689–692.
- Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P., and Tora, L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* *79*, 107–117.
- Jenuwein, T. (2001). Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol.* *11*, 266–273.
- Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *12*, 198–209.
- Ktistaki, E., and Talianidis, I. (1997). Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* *277*, 109–112.
- Kwak, Y.T., Guo, J., Prajapati, S., Park, K.J., Surabhi, R.M., Miller, B., Gehrig, P., and Gaynor, R.B. (2003). Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Mol. Cell* *11*, 1055–1066.
- Metzger, D., Scheer, E., Soldatov, A., and Tora, L. (1999). Mammalian TAF(II)30 is required for cell cycle progression and specific cellular differentiation programmes. *EMBO J.* *18*, 4823–4834.
- Mohan, W.S., Jr., Scheer, E., Wendling, O., Metzger, D., and Tora, L. (2003). TAF10 (TAF(II)30) is necessary for TFIID stability and early embryogenesis in mice. *Mol. Cell Biol.* *23*, 4307–4318.
- Muller, F., and Tora, L. (2004). The multicoloured world of promoter recognition complexes. *EMBO J.* *23*, 2–8.
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, C.D., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev.* *16*, 479–489.
- Soutoglou, E., and Talianidis, I. (2002). Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* *295*, 1901–1904.
- Soutoglou, E., Katrakili, N., and Talianidis, I. (2000). Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol. Cell* *5*, 745–751.
- Turner, B.M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell* *111*, 285–291.
- Wang, H., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Borchers, C., Tempst, P., and Zhang, Y. (2001). Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol. Cell* *8*, 1207–1217.
- Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X., and Tora, L. (1998). Function of TAFII-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature* *393*, 187–191.

Supplementary Information

Supplementary Figure

(A) Normal F9 cells (F9), or F9:hTAF10 and F9:hTAF10K189Q cells were differentiated in vitro towards primitive, or parietal endoderm by treatments with 1 μ M retinoic acid (RA), or 1 μ M RA + 250 μ M db₂cAMP (RA+cAMP) for 5 days, respectively. Representative phase-contrast microscopic images are shown at 125x magnification.

(B) Flow cytometric quantitation of the cells at the different phases of the cell cycle.



B

Cell cycle:	G ₀ /G ₁ -phase	S-phase	G ₂ /M-phase
F9:hTAF10	50%	24%	26%
F9:hTAF10K189Q	47%	29%	24%
RA+cAMP F9:hTAF10	53%	30%	18%
RA+cAMP F9:hTAF10K189Q	48%	26%	26%

Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation

Antigone Kouskouti and Iannis Talianidis*

Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas, Herakleion, Crete, Greece

We examined various histone modifications across the promoter and the coding regions of constitutively active hepatic genes in G0/G1-enriched, mitotically arrested and α -amanitin-blocked cells. Gene activation correlated with localized histone hyperacetylation, H3-K4 tri- or dimethylation and H3-K79 dimethylation and localized nucleosome remodeling at the promoter and the 5' portion of the coding regions. Nucleosomes at more downstream locations were monomethylated at H3-K4. CBP, PCAF, Brg-1, SNF2H and FACT were recruited to the coding regions in a gene-specific manner, in a similarly restricted promoter-proximal pattern. Elongator, however, associated with the more downstream regions. While all factors were dissociated from the chromatin after transcriptional inactivation by α -amanitin, the histone modifications remained stable. In mitotic cells, histone modifications on parental nucleosomes were preserved and were regenerated in a transcription-dependent manner at the newly deposited nucleosomes, as the cells entered the next G1 phase. The findings suggest that histone modifications may function as molecular memory bookmarks for previously active locations of the genome, thus contributing to the maintenance of active chromatin states through cell division.

The EMBO Journal advance online publication, 16 December 2004; doi:10.1038/sj.emboj.7600516

Subject Categories: chromatin & transcription

Keywords: active chromatin; histone modifications; transcriptional memory

Introduction

In multicellular organisms, cell type specification is achieved by the precisely regulated expression of subsets of genes. In each individual cell type, the complex pattern of gene expression is set up during cellular differentiation and is maintained through many cell generations. Dynamic changes in the structure of chromatin at gene regulatory regions have been implicated in the processes of gene repression and activation, as well as in the propagation of epigenetic infor-

mation (Emerson, 2002; Lachner and Jenuwein, 2002; Fischle *et al.*, 2003). Such structural transitions between repressed and active chromatin states are generated by the localized and, in most cases, concerted actions of histone-tail-modifying and ATP-dependent nucleosome-remodeling activities (Berger, 2002; Narlikar *et al.*, 2002). The strong correlation between the various post-translational modifications of histones and transcriptional activity has led to the proposal of the so-called 'histone code' hypothesis (Turner, 2000; Jenuwein and Allis, 2001; Turner, 2002). According to this concept, the combinations of different nucleosome modifications constitute a 'code' recognized by non-histone proteins, which regulate specific chromatin functions. Histone-tail modifications may play a pivotal role in the stabilization of gene expression patterns. For example, K9-methylated histone 3 (H3) produced by Suv39h1 can recruit HP1 proteins to generate a stable repressive structure, which could spread to neighboring nucleosomes via the recruitment of additional Suv39h1-HP1 protein complexes (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001). In this way, the H3-K9 methylation code has been implicated in both the formation and the epigenetic maintenance of repressive heterochromatin states (Jenuwein, 2001; Grewal and Elgin, 2002).

Active genes are also characterized by specific histone modification marks, including acetylation and H3-K4 methylation, which are known to play crucial roles in the ordered recruitment and the function of preinitiation complex components on promoters during transcriptional activation (Agalioti *et al.*, 2000, 2002; Kouzarides, 2002; Fischle *et al.*, 2003). Following activation, most genes remain active through many cell divisions, thus establishing a given array of stably expressed genes characteristic for a given cell type. However, unlike in the case of heterochromatin silencing, the potential role of histone modifications in the epigenetic maintenance of the active chromatin configuration is poorly understood. If such epigenetic control exists, histone methylation is predicted to serve as a molecular bookmark for active genes, mainly because, in contrast to acetylation, lysine methylation is a very stable and probably irreversible modification. Indeed, recent studies in *Saccharomyces cerevisiae* have shown that the Set1 histone methyltransferase is preferentially recruited to the 5' coding regions of transcriptionally active genes, where it catalyzes trimethylation of histone 3 at the lysine 4 residue (H3-K4) (Ng *et al.*, 2003). Hypermethylated H3-K4 within the coding regions persisted for considerable time after transcription had subsided and Set1 had dissociated from the chromatin, suggesting that the modification provides a molecular memory mark of recent transcriptional activity. Because H3-K4 hypermethylation started to decline well within the period of an individual cell cycle, the phenomenon has been termed 'short-term transcriptional memory' (Ng *et al.*, 2003). In higher eukaryotes, H3-K4 methylation also correlates with transcriptional

*Corresponding author. Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology Hellas, PO Box 1527, Vassilika Vouton, 71110 Herakleion, Crete, Greece. Tel.: +30 2810 391163; Fax: +30 2810 391101; E-mail: talianid@imbb.forth.gr

Received: 15 September 2004; accepted: 22 November 2004

activity. In contrast to yeast, where dimethylated H3-K4 displays a genome-wide distribution, in mammalian cells both di- and trimethylated H3-K4 peak at the 5' coding regions of several active genes (Schneider *et al*, 2004). In addition, significant levels of H3-K4 methylation have been observed on genes within the β -globin locus and the HNF-4 gene during differentiation, before the onset of transcription, implicating this modification in both the establishment and the maintenance of a potentially active chromatin state (Hatzis and Talianidis, 2002; Schneider *et al*, 2004). Although, a great deal of information has accumulated for the functioning of the 'histone code' during gene activation, direct evidence for the potential role of H3-K4 methylation or any other histone modification in the epigenetic memory of the active transcription is still missing.

To address this issue, we studied the pattern of a wide range of histone modifications at the promoter and the coding regions of constitutively active hepatic genes. Comparison of the results obtained in G0/G1-enriched, mitotically arrested and α -amanitin-blocked cells revealed a surprisingly stable pattern of H3 and H4 acetylation along with H3-K79 and H3-K4 methylation. We provide evidence for gene-specific and transcription-dependent translocation of histone acetyltransferases and chromatin-remodeling factors into the coding regions, which results in a localized pattern of histone acetylation and structural alterations of nucleosomes downstream of the promoters. The results provide new insights into the mechanism involved in the creation of a wider open chromatin domain around the promoters of active genes and into the role of histone modifications in the propagation of the active chromatin states during cell divisions.

Results

Localized histone modifications at the 5' portion of active hepatic genes, which persist after transcriptional and mitotic inactivation

In order to investigate the histone modification states along the promoter and coding regions of active genes, we employed a modified chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay. After crosslinking of HepG2, or HEK 293 cells, nuclei were prepared and subjected to micrococcal nuclease (MNase) cleavage. The soluble mononucleosome-sized chromatin fragments were used for immunoprecipitations (IPs) with various antibodies, followed by real-time PCR analysis of the resulting fragments with primer sets amplifying the promoter and different locations at the coding regions of the HNF-4, HNF-1 and albumin genes. All the assays were performed with G0/G1-enriched HepG2 cells, where the above genes are constitutively expressed, with HepG2 cells arrested at the G2/M phase by nocodazole treatment, with HepG2 cells treated with the RNA polymerase (pol)-II inhibitor α -amanitin and with HEK 293 cells, which do not express the studied genes.

In order to have comparable results from the different cells and to reveal transcription-dependent differences, all the values were expressed as percent of inputs and as fold increase over a single value obtained with control nucleosomes in G0/G1-enriched cells. The nucleosomes used as controls are located 4–9 kb downstream of the poly-A sites of the studied genes (see Supplementary data). In ChIP experiments studying histone modifications, the average values

obtained with the control nucleosomes relative to those obtained with the nonimmune antibody were as follows: 0.95–1.05 in HEK 293 cells, 2.5–2.8 in G0/G1-enriched HepG2 cells, 1.4–1.7 in mitotic HepG2 cells and 2.4–2.8 in α -amanitin-treated cells. The difference between HepG2 and HEK 293 cells reflects different transcription-independent global levels of modifications.

As expected, high levels of H3 and H4 acetylation were observed at the nucleosomes situated at the promoter-transcription start sites (Prom/TSS) of all three genes (Figure 1). With the exception of H4 hyperacetylation at the HNF-4 gene, both H3 and H4 hyperacetylated nucleosomes were detected over a considerable distance (2.5–5 kb) downstream of the promoters. Surprisingly, neither the pattern nor the absolute amounts of hyperacetylated histones changed at these regions after 5 h of α -amanitin treatment, when transcription was completely blocked (Figure 1). Similarly, in cells arrested at the G2/M phase of the cell cycle, the pattern remained the same (lines Mitotic HepG2 in Figure 1). The absolute values in these samples ranged between 50 and 65% of those obtained with G0/G1-enriched HepG2 cells. Taking into consideration a random deposition of new histone octamers during DNA replication, the above findings suggest that histone hyperacetylation at the promoters and the 5' coding regions of these genes is a stable modification, which is not erased from the parental nucleosomes after a transcriptional block and during mitotic inactivation. Hyperacetylation of histones is clearly dependent on previous transcriptional activity, since only background signals could be observed in HEK 293 cells, which do not express the studied genes (Figure 1).

A similar pattern was observed for dimethylated H3-K79, another characteristic H3 modification of active genes. In mitotic cells however, the methylated H3-K79 ChIP signal was about twice higher compared to those obtained with G0/G1-enriched cells, suggesting that this modification may also be generated during or after the S phase (Figure 1). Analysis of the different methylated H3-K4 modifications revealed an interesting pattern. Similar to the pattern of modifications reported for the carbonic anhydrase and GAPDH genes (Schneider *et al*, 2004), we observed high levels of localized tri- and dimethylation at the coding regions of the HNF-4, HNF-1 and albumin genes (Figure 2). However, we detected similar high signals at the promoter/TSS nucleosomes, as well. In sharp contrast to this, monomethylated H3-K4 signals appeared at the nucleosomes where tri- and dimethylation declined, peaking around the middle portion of the genes (Figure 2). In all three cases, the pattern and the absolute values of methylated H3-K4 signals remained stable in α -amanitin-treated cells, while in mitotic cells the same pattern was observed with about half of the absolute values of those obtained with G0/G1-enriched cells. Similar to acetylation, no H3 methylation was detected in HEK 293 cell-derived chromatin in any of the regions studied (Figure 2). In experiments examining H3-K9 and H3-K36 methylation, only background signals were detected in all cells (data not shown).

The observed difference in absolute values between G0/G1-enriched and mitotic cells suggests that while the modifications remain stable in parental nucleosomes, during DNA replication, newly deposited nucleosomes are not modified by acetylation and H3-K4 methylation, up until the cells

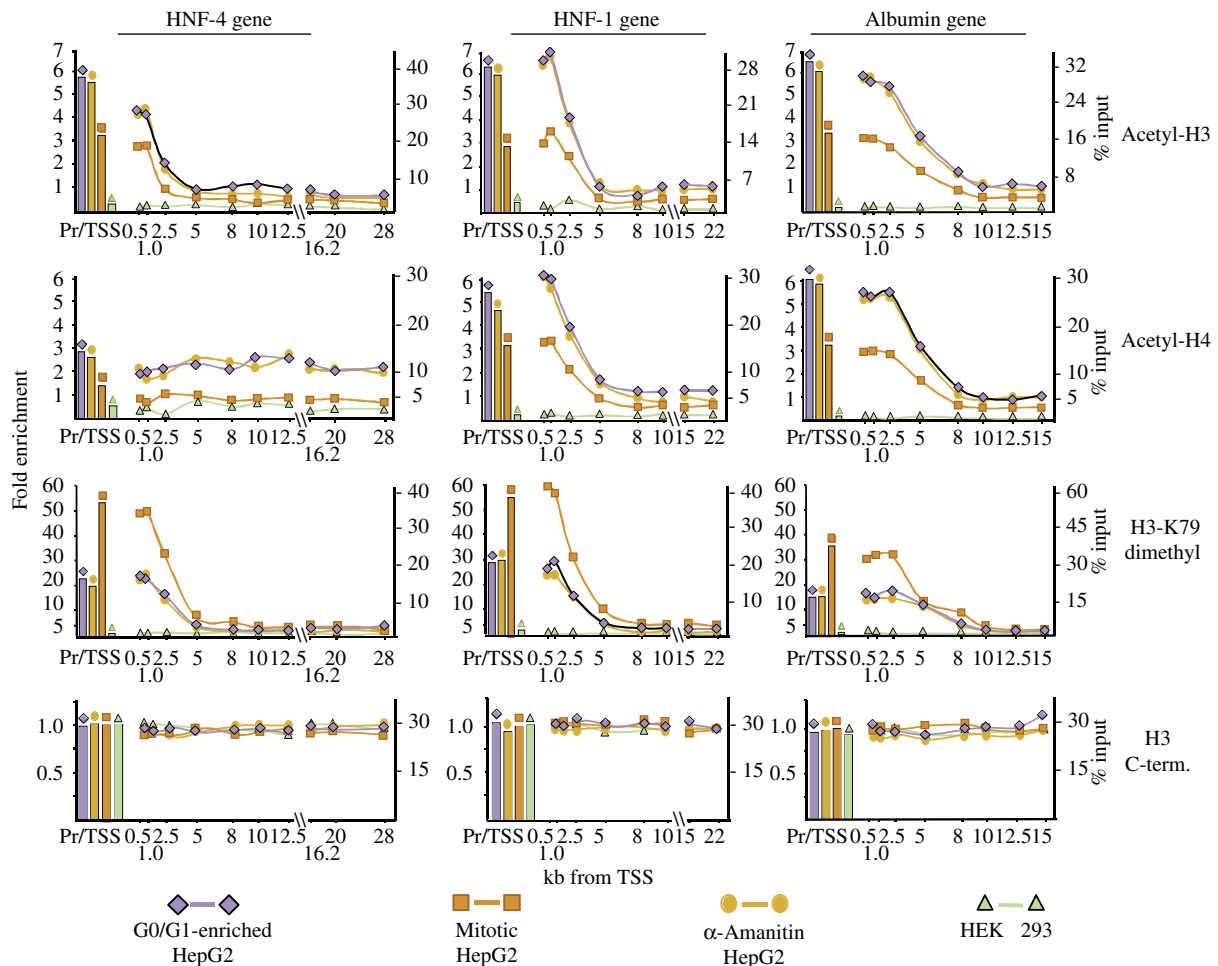


Figure 1 Distribution of acetylated and H3-K79-dimethylated nucleosomes over the human HNF-4, HNF-1 and albumin genes. ChIP assays were performed with G0/G1-enriched HepG2 cells, nocodazole-synchronized HepG2 cells (Mitotic HepG2), HepG2 cells that were treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ α -amanitin for 5 h (α -Amanitin HepG2) and HEK 293 cells, using antibodies recognizing K9/K14-diacetylated histone-3 (Acetyl-H3), K5/8/12/16-tetra-acetylated histone-4 (Acetyl-H4) or K79-dimethylated histone-3 (H3-K79 dimethyl), as indicated. The data represent real-time PCR measurements of the immunoprecipitated DNA at the corresponding regions and expressed as percent of inputs (Y-axis at right) and as fold enrichment over the values obtained by the amplification of control nucleosomes in G0/G1-enriched HepG2 cells (Y-axis at left). Pr/TSS corresponds to the nucleosome overlapping the transcription start site and numbers indicate nucleosome positions in kilobases relative to the transcription start site.

enter the next G1 phase and resume transcription of the genes. Further evidence for this was provided by time-course experiments with cells released from the mitotic block. An increase in histone acetylation, H3-K4 mono-, di- and trimethylation and a decrease in K79 dimethylation at the selected regions were observed (Figure 3). Importantly, the extent of the above changes closely correlated with the actual percentage of cells in G1 phase and RNA pol-II occupancy.

Due to the mononucleosome resolution of our ChIP assays, the detection of tri- and dimethylated H3-K4 in the same regions may be interpreted as both modifications existing on the two individual H3 molecules of the same nucleosome, as allelic variations or as signals emanating from different populations of cells containing either tri- or dimethylated H3-K4 at the corresponding nucleosome. In order to distinguish between these possibilities, we performed sequential chromatin immunoprecipitation (Re-ChIP) assays. In these assays, trimethylated H3-K4-containing nucleosomes were selected in the first IP, and after elution from the protein-G-Sepharose beads, were subjected to a second immunopurifi-

cation with antibodies against dimethylated H3-K4. As shown in Figure 4A, significant amounts of DNA corresponding to the nucleosomes located at the 1 kb region of all three genes could be detected in the second immunoprecipitates, pointing to the simultaneous presence of both tri- and dimethyl H3-K4 modifications in the same nucleosome. More importantly, similar specific signals were obtained in assays when the second IP was performed with antibodies against acetylated H3 or methylated H3-K79. After normalization of the data for the Re-ChIP efficiency of the individual antibodies and performing IPs in reverse order, we detected substantial recoveries, which were in the range of 71–100% of the inputs, in all combinations of first and second IPs (Supplementary Table 1 and Figure 4A). Taking into account the experimental errors and the double H3-K79 methylation signal observed in mitotic cells, the data suggest that in G0/G1 cells within the same nucleosome one of the histone 3 polypeptide tails is trimethylated, while the other is dimethylated at lysine 4 and at least one of them is dimethylated at lysine 79 and either one or both of them are acetylated.

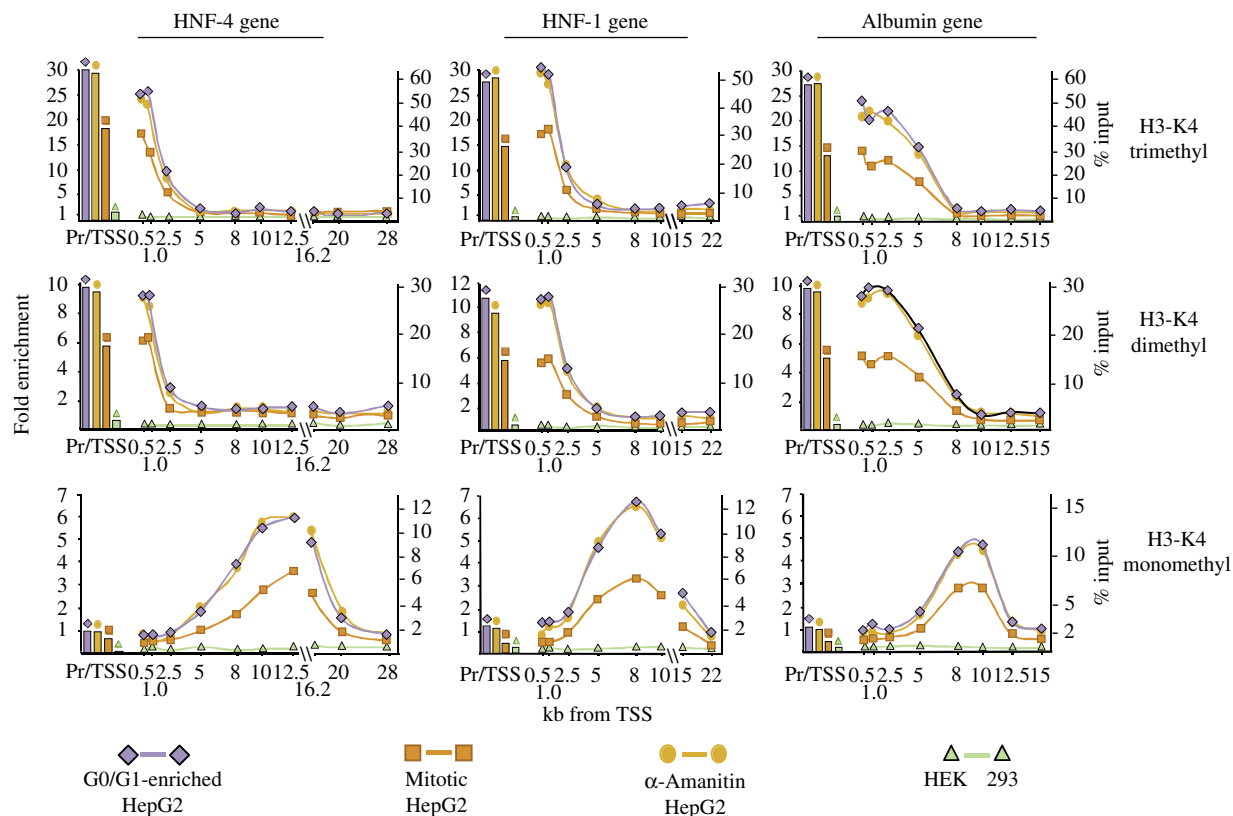


Figure 2 Distribution of the nucleosomes methylated at lysine-4 of histone 3 over the human HNF-4, HNF-1 and albumin genes. ChIP assays were performed using antibodies raised against the various methylated forms of H3-K4 as indicated at right. The results are presented as described in the legend of Figure 1.

Taken together, the results demonstrate that multiple modifications decorate most of the individual nucleosomes at the 5' coding regions of the genes, which persist after transcriptional inactivation and can also be detected in mitotic cells specifically on the studied genes by ChIP assays (Figures 1 and 2) and globally by indirect immunofluorescence staining (Supplementary Figure 3).

Transcription-dependent localized alteration of chromatin structure at the 5' coding regions of active genes

Because during gene activation histone acetylation and chromatin remodeling at the promoter regions are usually coupled processes, we investigated the potential structural alterations in nucleosomes located at the hyperacetylated 5' coding regions compared to those located at the hypoacetylated and hypomethylated further downstream regions. Nucleosomal DNA is normally refractory to cleavage by restriction enzymes, but chromatin remodeling significantly increases the extent of cleavage. Therefore, we used a restriction enzyme accessibility assay to measure chromatin remodeling on selected regions of the HNF-4 and HNF-1 genes in G0/G1, α -amanitin-treated and mitotic HepG2 cells. In G0/G1-enriched HepG2 cells, significant cleavage was observed at the 0.5 and 1 kb regions, but not at the more downstream locations (Figure 4B), pointing to the existence of an extended open chromatin domain downstream of the promoters, which is limited to the 5' portions of the coding regions. This 'remodeling' of nucleosomes is clearly tran-

scription dependent, since we could not observe any hypersensitivity for the same enzymes in α -amanitin-treated and mitotic HepG2 cells (Figure 4B), or the nonexpressing HEK 293 cell line (data not shown).

Gene-specific localized recruitment of histone acetyltransferase and chromatin-remodeling activities to the 5' coding regions of active genes

In order to identify the enzymatic activities responsible for the localized hyperacetylation and open chromatin structure at the 5' portion of the coding regions of the HNF-4, HNF-1 and albumin genes, we examined the recruitment of proteins possessing histone acetylase activities (CBP, PCAF and the Elp3 component of Elongator), the mammalian homolog of SWI/SNF remodeling complex component (Brg-1) and SNF2H and FACT/cdc68, which have been shown to function in elongation (Narlikar *et al*, 2002; Santos-Rosa *et al*, 2003; Saunders *et al*, 2003), along with RNA pol-II. As expected, none of these factors could be detected at any of the promoter or coding regions in the nonexpressing HEK 293 cells. RNA pol-II was uniformly distributed along the coding regions in G0/G1-enriched HepG2 cells and dissociated from the genes in α -amanitin and mitotic cells (Figure 5). Analysis of histone acetylases produced an unexpected pattern. The RNA pol-II associated histone acetyltransferase Elp3 (Wittschieben *et al*, 1999; Winkler *et al*, 2002) associated with the coding regions at positions downstream of 2.5 and 5 kb, where histone acetylation started to decline (Figure 5). The specificity of this distribution was confirmed by the similar pattern

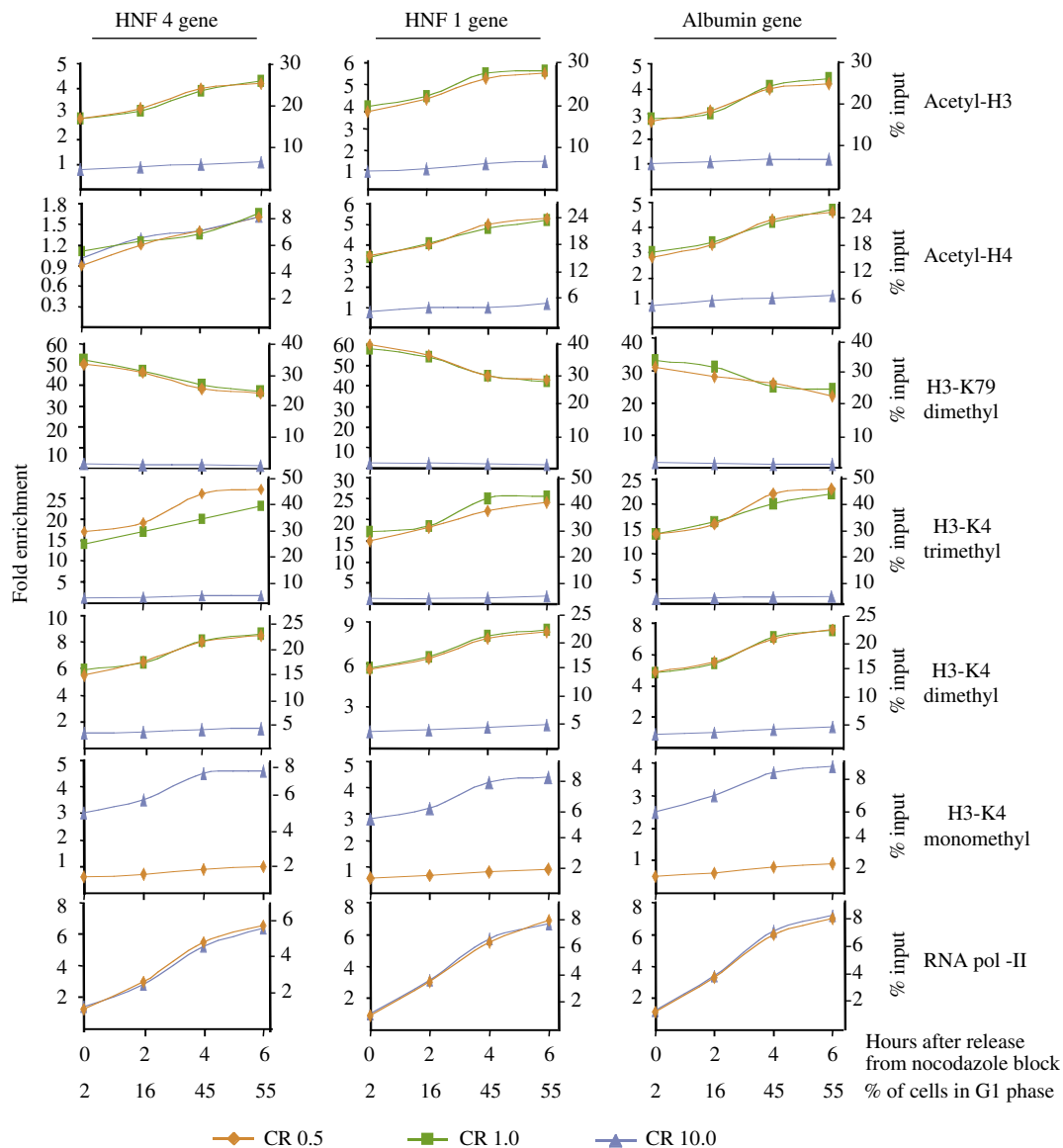


Figure 3 Histone modifications after releasing the cells from mitotic arrest. HepG2 cells were arrested at G2/M phase by treatment with 50 ng/ml nocodazole. Detached cells were collected and washed twice with normal growth medium (DMEM, containing 10% fetal calf serum), replated and collected at the indicated time points. ChIP assays were performed using antibodies indicated at right. The results are presented as described in the legend of Figure 1. Parallel cultures were fixed in ethanol and after staining with propidium iodide subjected to FACS analysis. Numbers at the bottom indicate the percentage of cells with 2N DNA content (% G1 cells) over the total cell population (G1 + S + G2/M).

obtained with Elp1, another component of the Elongator, and by peptide competition assays (data not shown). On the other hand, CBP and PCAF, which were thought to function solely in PIC formation at gene regulatory regions, were found to associate also with the 5' portion of the coding regions overlapping with the hyperacetylated segments. Interestingly, their association was gene specific. CBP could be detected only in the HNF-4 and HNF-1 genes, while PCAF could only be detected in the albumin gene (Figure 5). We also observed Brg-1 occupancy at all three genes, and SNF2H at the HNF-1 and albumin genes, in a similar distribution, which was restricted to the promoters and the 5' portions of the coding regions. FACT/cdc68 occupancy was detected only at the coding region of the HNF-1 gene and was similarly limited to its 5' segment (Figure 5). All of the above factors dissociated from the chromatin upon α -amanitin-mediated

transcriptional repression and during mitosis (Figure 5 and Supplementary Figure 3). The strong correlation between the localized distribution of one or more chromatin-modifying or -remodeling activities and the altered nucleosome structure downstream of the promoters points to a continuous RNA pol-II-dependent modification and reorganization of the chromatin over an extended segment, but not the entirety of the coding regions.

Using the specific CTD antibodies, Brg-1, CBP and PCAF efficiently co-immunoprecipitated with phosphorylated forms of RNA pol-II, including the Ser-2 phosphorylated, elongating form of the enzyme (Supplementary Figure 2). This provides further evidence for the notion that CBP, PCAF and Brg-1, besides functioning on promoters, are also involved in transcript elongation via association with the elongating RNA pol-II complex.

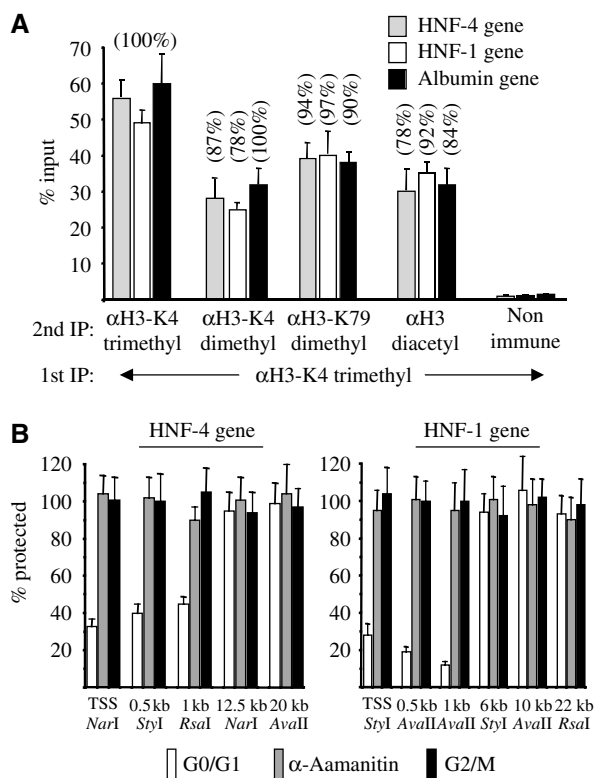


Figure 4 Evidence for the presence of multiple modifications in the same nucleosomes and the presence of an open chromatin domain restricted to the 5' coding regions of the HNF-1 and HNF-4 genes. (A) Complexes immunoprecipitated with the antibody recognizing trimethylated H3-K4 (1st IP) were eluted from the protein-G-Sepharose beads and were re-immunoprecipitated with the indicated second antibodies (2nd IP). Input values correspond to the nonimmunoprecipitated eluted chromatin. Numbers in parentheses correspond to percent recoveries of the input DNA, after normalization to the Re-ChIP efficiencies of the different antibodies (see Supplementary Table 1). (B) Restriction enzyme hypersensitivity assays with the indicated enzymes were performed using nuclei prepared from G0/G1-enriched HepG2 cells, HepG2 cells that were treated with 50 μg/ml α-amanitin (α-amanitin) and nocodazole-arrested HepG2 cells (G2/M). The bars represent average real-time PCR measurements of the protected DNA segments from three experiments, relative to the values of uncut control samples, which were set at 100%.

Potential role of histone-tail modifications in mediating association of chromatin with histone acetylases and chromatin-remodeling complexes

CBP and Brg-1 contain bromodomains, which can bind to acetylated histone tails with high affinity (Agalioti *et al.*, 2002). To test whether the H3-K4 methylation mark may represent additional interaction surfaces for these factors, we performed peptide pull-down assays using HepG2 extracts. As control, we analyzed SNF2H binding, which has been shown to specifically interact with di- and trimethylated H3-K4 peptides (Santos-Rosa *et al.*, 2003). The results presented in Figure 6 show that CBP and Brg-1 can specifically interact with the K9/K14-acetylated H3 peptides, but not with the unmodified or dimethylated H3-K4 peptide. Interestingly however, SNF2H also interacted very efficiently with the K9/K14-acetylated H3 peptides. When the binding of the FACT/cdc68 subunit was tested, we observed an interaction with the unmodified H3 peptide. Although the interaction was

somewhat higher with dimethylated H3-K4, in light of the strong preference of FACT for binding to H2A/H2B dimers (Belotserkovskaya *et al.*, 2003), the functional significance of this difference is not clear (Figure 6A). The results are in agreement with the notion that the different histone-tail modifications may stabilize interactions with individual proteins. An alternative role of the individual H3-tail modifications could be that they may create better substrates for the enzymes catalyzing another tail modification. In line with this, we found that the dimethylated H3-K4 peptide was more efficiently acetylated by CBP and PCAF than the unmodified one (Figure 6B). This finding may provide a mechanistic basis for the generation of multiple modifications of the nucleosomes located at the promoter and 5' coding regions of active genes.

Discussion

Chromatin is dynamically restructured during each mitotic cycle, yet the information governing the expression of a particular array of genes in differentiated cells is faithfully transmitted through many cell divisions. Histone modifications are considered molecular marks for the recruitment of activator and repressor proteins into specific locations of the genome, implicating their involvement in epigenetic memory (Fischle *et al.*, 2003). The molecular events by which specific histone modifications generate and propagate repressive chromatin structure have been comprehended in great detail (Jenuwein, 2001; Kouzarides, 2002). Although the function of various histone modifications in transcriptional activation is well established (Santos-Rosa *et al.*, 2002; Fischle *et al.*, 2003), their possible role in maintaining active chromatin states is less explored.

The results presented in this study demonstrate that modifications, including H3 and H4 acetylation, H3-K4 and H3-K79 methylation, which characterize active chromatin, persist over a long period of time after α-amanitin-mediated transcriptional inactivation and through mitosis on parental nucleosomes, at three differently regulated, constitutively active hepatic genes.

Localized histone modifications and open chromatin domains at the coding regions of active genes

Of particular interest is the observed highly localized pattern of histone modifications over the coding regions of the genes. Histone acetylation, H3-K4 di- and trimethylation and H3-K79 dimethylation were observed at the promoters and at the initial 2.5–5 kb of the coding regions. These segments represent a more open chromatin structure compared to the regions further downstream and coincide with the highly localized recruitment of the histone acetyltransferases CBP or PCAF, and the chromatin-remodeling complexes Brg-1, SNF2H and FACT/cdc68. Association of these factors with the promoter and 5' portions of the coding regions is transcription dependent, mediated in part by direct or indirect interactions with the initiating and elongating forms of RNA pol-II. Unlike histone modifications, restriction enzyme hypersensitivity of the nucleosomes located at the 5' coding regions was lost in α-amanitin-treated cells and in mitotic cells, suggesting that the continuous action of RNA pol-II-associated remodeling complexes is required to maintain the open chromatin conformation. In agreement with this sce-

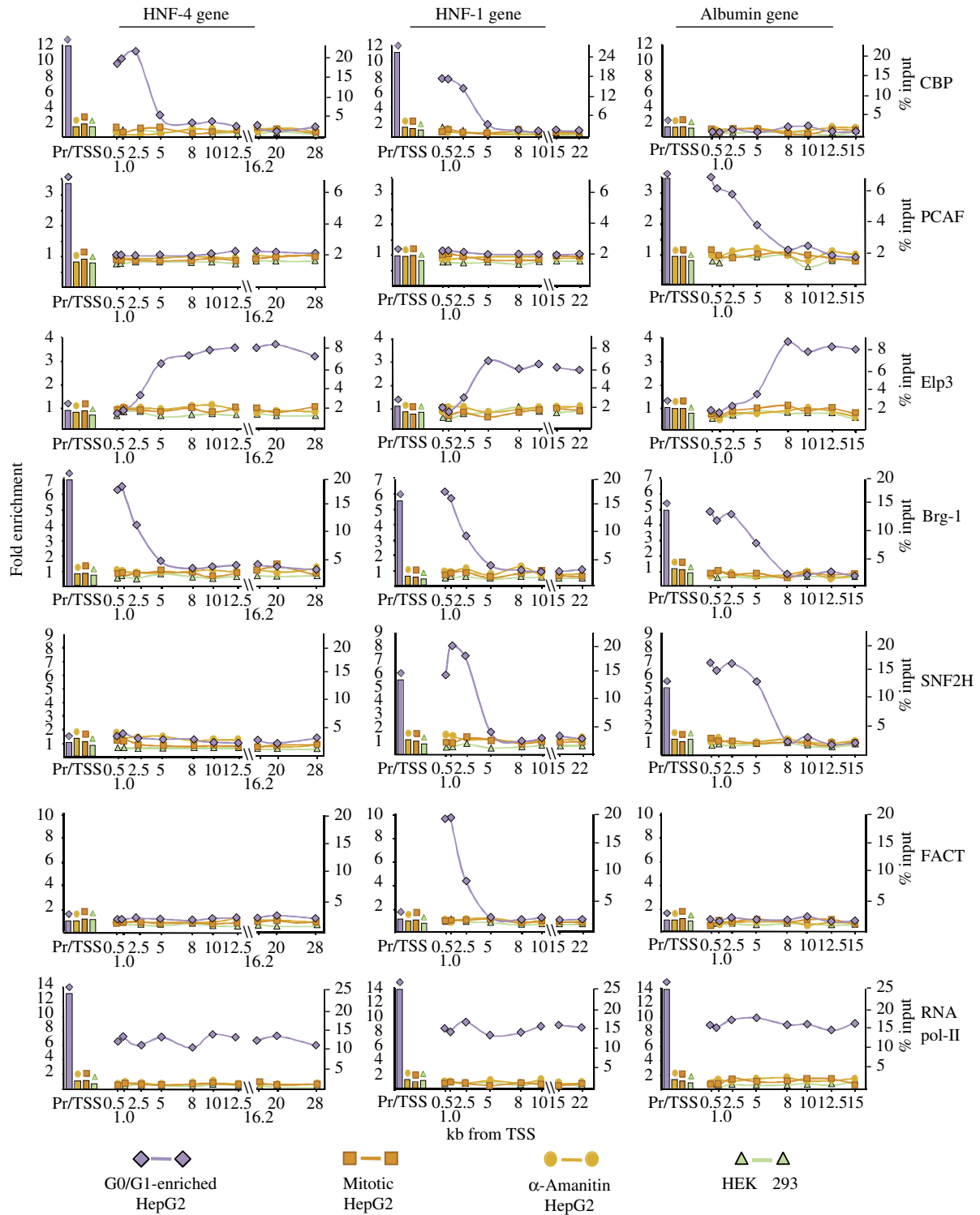


Figure 5 Distribution of histone acetyltransferases and chromatin-remodeling factors over the human HNF-4, HNF-1 and albumin genes. ChIP assays were performed using antibodies raised against the proteins indicated at right. The results are presented as described in the legend of Figure 1.

nario is the recent report demonstrating the necessity of an open chromatin structure and Brg-1 occupancy at the coding region of the heat shock-inducible Hsp70 gene for transcriptional elongation (Corey *et al*, 2003). Consistent with our results, it has been shown that Brg-1 is inactivated during mitosis by phosphorylation and excluded from mitotic chro-

matin (Muchardt *et al*, 1996; Sif *et al*, 1998). On the other hand, previous immunofluorescence studies revealed poor colocalization of Brg-1 with RNA pol-II in interphase cells (Grande *et al*, 1997; Reyes *et al*, 1997), suggesting that only a small portion of Brg-1 is involved directly in transcript elongation.

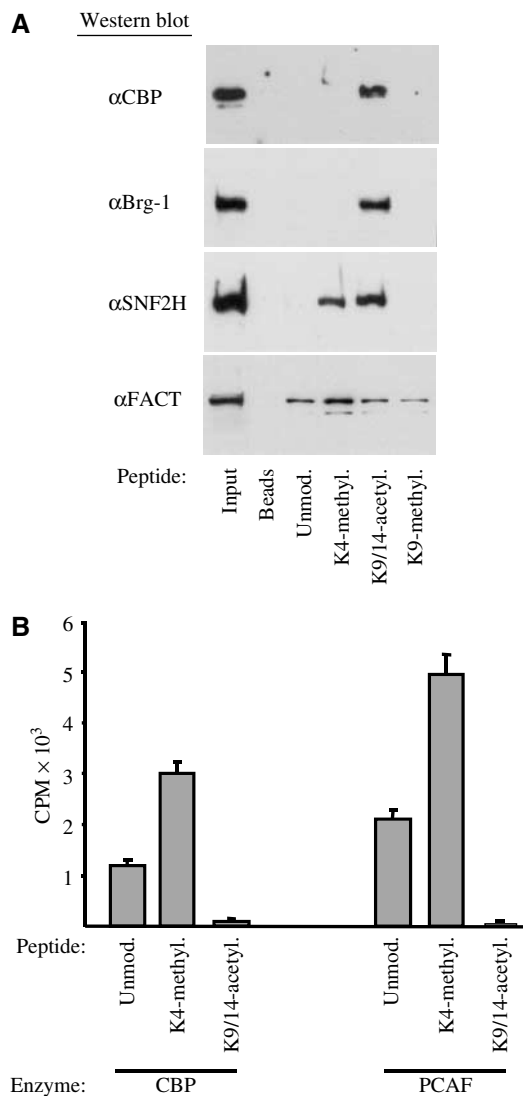


Figure 6 *In vitro* association and acetylation of modified histone-tail peptides with chromatin-remodeling factors. (A) Biotinylated histone-3-tail peptides with the indicated modifications at the specific lysine residues were immobilized to streptavidin-agarose beads and incubated with HepG2 nuclear extracts. Interacting proteins were identified by Western blot analysis using antibodies against CBP, Brg-1, SNF2H and FACT/cdc68 as indicated. (B) *In vitro* acetylation assays were performed using 100 ng of baculovirus-expressed recombinant CBP and PCAF and 100 ng of unmodified (Unmod.), K4-dimethylated (K4-methyl.) and K9/K14-diacetylated (K9/14-acetyl.) peptides. The reaction products were separated by 18% SDS-PAGE and the corresponding gel slices were excised and quantified by scintillation counting.

In all three genes we studied, we could observe H3-K4 monomethylation, peaking at the middle parts of the coding regions, downstream of the segments characterized by the other modifications. Although, the functional significance of this modification is not clear, its persistence through mitosis and its transcription-dependent re-establishment in G1-phase cells point to a role in transcript elongation. The components of the Elongator complex were found to associate with the coding regions downstream of the hyperacetylated, H3-K4- and H3-K79-methylated domains. Up until recently, the role of Elongator in transcription has been disputed mainly because of the reported cytoplasmic localization of some of its

components (Kim *et al*, 2002; Pokholok *et al*, 2002). Using newly developed, highly specific antibodies against Elp3, we observed that it was localized mainly in the nucleus of interphase HepG2 cells (Supplementary Figure 3). This, together with our ChIP results reinforces the evidence provided by a recent study (Gilbert *et al*, 2004) that Elongator is involved in transcription. Its recruitment was evident from the end of the hyperacetylated segments, which indicates that, in mammalian genes, the acetyltransferase activity of Elp3 may only partially contribute to the localized histone hyperacetylation at the 5' portion of the coding regions. The unique association of Elongator with the coding regions after the dissociation of CBP, Brg-1, SNF2H and FACT raises the possibility of novel functions of this complex in transcription. Interestingly, the occupancy of the coding regions by SNF2H and FACT was found to be gene specific, pointing to some functional redundancy. It should be noted that, in theory, the lack of FACT and SNF2H, or other ChIP signals on some genes could also be explained by gene-specific epitope masking, or a less efficient crosslinking of the proteins with certain chromatin segments. If this is the case, then the strong signals observed on other genes must reflect a more tight association, a different conformation or a more crowded presence of the proteins with the respective regions. In either case though, the results suggest differential association of these proteins with the studied genes.

Multiplicity of stable nucleosome modifications decorates the active chromatin domains

The unexpected stability of the H3 and H4 acetylation pattern in mitotic and α -amanitin-treated cells where histone acetylases dissociate from the genes points to the lack of histone deacetylase action, probably by regulated exclusion of such activities from these regions. Analysis of global H3 and H4 acetylation levels in cells at different phases of mitosis confirmed the retention of these modifications in mitotic chromatin (Supplementary Figure 3). Notably, hyperacetylation and hypermethylation were segregated to isolated subregions of mitotic chromatin, suggesting that distinct chromatin territories exist for the residence of genes that were previously active and should imminently be reactivated upon the cells exiting mitosis. Acetylated nucleosomes were also modified by di- and trimethylation at H3-K4 and dimethylation at H3-K79, which were also retained in mitotic chromatin and after transcriptional inactivation by α -amanitin. This indicates that the simultaneous presence of multiply modified histones within the same nucleosome is important for the generation of a stable epigenetic mark for active chromatin. According to the histone code concept, the various modifications may be recognized by specific chromatin-associated proteins, which 'translate' this code to a specific chromatin function (Turner, 2000, 2002; Jenuwein and Allis, 2001; Agaloti *et al*, 2002). Our sequential ChIP analysis revealed that within the same nucleosome one of the histone 3 polypeptide tails can be trimethylated at lysine 4, while the other can be dimethylated and either of them acetylated and K79-methylated. Such a multiplicity of specific modifications may be required for the stable association of several regulatory proteins possessing different interaction properties. In this regard, we demonstrate that the H3 acetylation mark can provide a specific high-affinity interaction surface for the acetyltransferases, which actually generated it, and for the

chromatin-remodeling factors such as Brg-1 and SNF2H, all involved in active transcription. It is less clear, however, whether H3-K4 methylation operates in this manner. Although H3-K4 methylation provides a high-affinity surface for SNF2H binding (Santos-Rosa *et al*, 2003; Figure 6), the gene-specific involvement of SNF2H in transcription raised the possibility that this modification may also have a different role. At least *in vitro*, using H3-tail peptides as substrates, we found that dimethylated H3-K4 tails are better substrates for histone acetylases. If such preference occurs *in vivo* in the nucleosomal context, one may speculate that H3-K4 methylation, besides functioning as a recognition surface for some proteins, could also contribute to the generation of the acetylation code within the same nucleosome. The strict correlation between H3-K4-di- or -trimethylated and H3-K9/K14-diacetylated nucleosomes at the open chromatin domains of active genes provides an additional indication for such a mechanism.

Role of transcription in the generation of histone modification marks

Comparative examination of the absolute values of our ChIP analysis in G0/G1-phase and mitotic cells supports the view that a dynamic reorganization of nucleosomes occurs during the cell cycle. In mitotic cells, the amounts of acetylated and H3-K4-methylated histones at the different nucleosomes were approximately half compared to those in G0/G1-phase samples and gradually increased when the cells were allowed to enter the next G1 phase. This suggests that during DNA replication newly deposited histones are not modified at these sites, while parental histones remain stably modified. In agreement with this is our finding that the generation of the above modifications is transcription dependent. Previous works in yeast, studying histone methyltransferases associated with elongating RNA pol-II, established that the H3-K79 methylase Dot1p and the H3-K4 methylase Set1-containing COMPASS complex require the PAF1 complex for their function, linking histone methylation to transcript elongation (Krogan *et al*, 2003). It was postulated that H3-K4 and H3-K79 methylation are coupled processes and depend on active transcription. This is in agreement with our results showing that trimethylated H3-K4 nucleosomes were also methylated at K79. On the other hand, we also noticed that the H3-K79 methylation signals were always about twice higher in cells arrested in G2/M compared to G0/G1-enriched cells, indicating that this modification can also be generated independently of transcription during or after the S phase. Such transcription-independent H3-K79 methylation, however, should preferentially occur in chromatin domains defined by the other modifications, because H3-K79 hypermethylation was observed only in nucleosomes situated at the regions in which they were acetylated and K4 di- or trimethylated. If we exclude the possible action of a so far unidentified specific histone lysine demethylase, the above difference also points to a dynamic, transcription-dependent nucleosome exchange as the cells enter the G1 phase. Recent studies have identified that the H3.3 histone variant can be deposited at active loci in a replication-independent manner (Ahmad and Henikoff, 2002; Tagami *et al*, 2004). Consistent with such preferential targeting is the finding that H3.3 is enriched in histone modifications associated with active chromatin (McKittrick *et al*, 2004).

Our observations extend current models by proposing that specific histone modifications may represent memory signals involved in the propagation and maintenance of active chromatin states during cell division. According to this model, histone acetylation, H3-K4 di- and trimethylation and H3-K79 methylation marks are generated at specific nucleosomes of active genes during transcription by an interdependent action of histone-modifying enzymes. These modifications are preserved over a long period of time after transcription subsides and thus constitute a mark for a specialized chromatin domain. During DNA replication, as a result of deposition of new histones, part of these modifications is lost, although H3-K79 methylation continues to take place. Because the histone modifications at the parental nucleosomes remain stable through mitosis, they can serve as molecular bookmarks for the assembly of the transcription machinery at specific locations of the genome, as the cells enter the next G1 phase. During transcription, nucleosomes are exchanged by a displacement/replacement mechanism (Belotserkovskaya *et al*, 2003; Belotserkovskaya and Reinberg, 2004) and the action of promoter- and RNA pol-II-associated enzymes can regenerate the histone modifications. The concurrent action of remodeling complexes then generates an open chromatin domain, which extends several hundred bases downstream of the promoters.

Why do cells generate such highly localized histone modification marks and open chromatin domains at the coding regions of active genes? During elongation, several factors associate with RNA pol-II, destabilizing nucleosome structure and reassembling nucleosomes as they are traversed by the enzyme (Belotserkovskaya and Reinberg, 2004). This extensive remodeling of nucleosomes may facilitate passage of RNA pol-II through chromatin. However, RNA pol-II density and presumably elongation efficiency were not changed at the more downstream coding regions of the genes, pointing to distinct chromatin requirements for initiating and elongating RNA pol-II. The open chromatin environment around the promoter regions may thus have as its principal role the facilitation of the efficient release of new RNA pol-II molecules from the transcription start site during reinitiation, but could be dispensable for RNA pol-II progression through the downstream regions.

Memory of recent transcriptional activity

The histone modification pattern of the genes studied here shows similarities and some fundamental differences compared to active genes in *S. cerevisiae*. In yeast, only H3-K4 trimethylation is localized to the 5' coding regions, while H3-K4 dimethylation and acetylation are uniformly distributed (Kristjuhan *et al*, 2002; Winkler *et al*, 2002; Ng *et al*, 2003). In contrast, at the mammalian genes of this study, H3-K4 tri- and dimethylation and also H3-K79 dimethylation and H3 and H4 acetylation were all restricted to the 5' portions of the genes. In addition, we observed H3-K4 monomethylation at the middle parts of the coding regions, downstream of the segments characterized by the other modifications. In yeast, H3-K4 trimethylation lasts for an extended period of time after transcriptional inactivation, a phenomenon termed as 'short-term memory' of recent transcription (Ng *et al*, 2003). At the mammalian genes of this study, H3-K4 methylation, H3-K79 methylation, H3 and H4 acetylation were also stably maintained for a significant period of time after α -amanitin-

induced transcriptional block and persisted on the parental nucleosomes through mitosis. These transcriptional memory mechanisms may have several distinct biological functions. They may be important to prevent some active genes, which need to be expressed continuously or need to be rapidly switched on and off by environmental signals, from becoming permanently silenced. In addition, they may also provide a means for the cells to 'remember' the locations of the genome where transcription must be resumed after the cells exit mitosis, thus contributing to the faithful maintenance of the gene expression pattern that is characteristic to the particular cell type.

Materials and methods

Cell culture and synchronization

HepG2 and HEK 293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal calf serum. The cells were arrested at the G2/M phase by treatment with 50 ng/ml nocodazole for 16 h. Detached cells were collected by shaking and processed for further analysis. HepG2 cells were used at the time the plates became confluent to enrich for the G0/G1-phase population. FACS analysis confirmed the presence of more than 95% mitotic cells (4N DNA content) in the nocodazole-treated cultures and about 85% of G0/G1-phase cells (2N DNA content) in the confluent cultures. In certain experiments, confluent HepG2 cells were treated with 50 µg/ml α -amanitin for 5 h, before collection for analysis.

Preparation of mononucleosomes and chromatin immunoprecipitation

To crosslink chromatin, the cells were treated with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. Crosslinking was stopped by the addition of glycine to a final concentration of 125 mM. The cells were washed with PBS and nuclei were prepared by resuspension in buffer A, containing 0.32 M sucrose, 15 mM Hepes pH 7.9, 60 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5% BSA, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine and 0.5 mM DTT, followed by dounce homogenization. The nuclear suspension was layered over an equal volume of buffer B, containing 30% sucrose, 15 mM Hepes pH 7.9, 60 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine and 0.5 mM DTT and centrifuged for 15 min at 3000 r.p.m. Purified nuclei were collected from the bottom of the gradient, washed with buffer N and resuspended in buffer N, containing 0.34 M sucrose, 15 mM Hepes pH 7.5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine and 0.15 mM β -mercaptoethanol at a 2×10^6 nuclei/ml concentration. The samples were adjusted to 3 mM CaCl_2 , and incubated with 30 U of micrococcal nuclease (MNase, Worthington) for 5 min at 37°C. The reactions were stopped by the addition of an equal volume of $2 \times$ sonication buffer (90 mM Hepes pH 7.9, 220 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2% Triton X-100, 0.2% Na-deoxycholate, 0.2% SDS, 0.5 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin and protease inhibitor cocktail from Roche) and, after centrifugation at 14 000 r.p.m. for 15 min, the soluble chromatin was precleared by incubation with protein-G-Sepharose beads and subjected to IP as described previously (Hatzis and Talianidis, 2002; Soutoglou and Talianidis, 2002). In each experiment, aliquots of chromatin were de-crosslinked and, after purification, the DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis to confirm the complete digestion of chromatin to mononucleosome-sized DNA fragments. The intact nature of the nucleosomes at the different locations of the genes was confirmed by performing IP

References

- Agalioti T, Chen G, Thanos D (2002) Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* **111**: 381–392
- Agalioti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T, Thanos D (2000) Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* **103**: 667–678

and PCR analysis with a C-terminal epitope anti-histone 3 antibody (Abcam), which gave uniform signals all over the analyzed regions (Figure 1). The nucleosome-sized resolution of the assay was confirmed by agarose gel electrophoresis of the purified DNA fragments (Supplementary Figure 1).

In Re-ChIP assays, after washing the protein-G-Sepharose beads from the primary IP, the complexes were eluted from the beads by incubation with 10 mM DTT at 37°C for 30 min. After a 50-fold dilution with $1 \times$ sonication buffer, the eluates were subjected to IP with the second antibody. After purification, the immunoprecipitated DNA was analyzed by quantitative real-time PCR using SYBR green on MJ-Research Opticon Engine. All experimental values were normalized to those obtained with a nonimmune serum, and divided by the input. The data in the figures are presented as fold change over the signal obtained with amplifications of control nucleosomes located outside the coding regions. The antibodies and the positions of the primer sets used in this study are listed in Supplementary data.

Restriction enzyme hypersensitivity assays

Nuclei were purified as described above and resuspended in the appropriate $1 \times$ restriction enzyme buffer at a concentration of 2×10^6 nuclei/ml. After addition of 5–20 U of the corresponding restriction enzyme, the samples were incubated at 37°C for 30 min. Reactions were stopped by the addition of an equal volume of $2 \times$ stop buffer, containing 20 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 8 mM EDTA and 2% SDS, followed by incubation with 0.25 mg/ml proteinase K at 42°C for 2 h. The DNA was purified by extractions with phenol/chloroform and ethanol precipitation. The samples were then analyzed by quantitative real-time PCR. The experimental values were compared to at least three control amplifications performed on mock-digested samples, and samples digested with restriction enzymes, which do not cut the corresponding segment. The data obtained with the controls were averaged and set as 100% protected.

Protein interaction and histone acetyltransferase assays

Purification of baculovirus-expressed recombinant CBP and PCAF proteins and *in vitro* histone acetyltransferase assays were performed as described by Soutoglou *et al* (2000). Preparation of nuclear extracts from HepG2 cells and co-immunoprecipitations experiments were performed essentially as described previously (Ktistaki and Talianidis, 1997; Hatzis and Talianidis, 2001). For peptide pull-down experiments, 2 µg of synthetic biotinylated histone-3-tail peptides (1–20 amino acids; Upstate Biotechnology) were coupled to streptavidin-agarose magnetic beads (Roche) and incubated with the nuclear extracts, which were precleared by incubation with plain beads. The incubation was performed in a buffer containing 25 mM Hepes pH 7.9, 0.75 mM MgCl_2 , 400 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin, 1 mM DTT and 10 mM NaF for 5 h at 4°C. After extensive washing with the same buffer, the interacting proteins were eluted by boiling the beads in SDS sample buffer and detected by Western blot analysis.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online.

Acknowledgements

We thank J Svejstrup for providing the Elp3 and Elp1 antibodies, N Katrakili for technical assistance and P Hatzis for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from HFSP (RGP-0024) and from EU (HPRN-CT-2000-00087, QLRT-2000-01513 and LSHG-CT-2004-502950).

- Ahmad K, Henikoff S (2002) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* **9**: 1191–1200
- Bannister 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 chromo domain. *Nature* **410**: 120–124

- Belotserkovskaya R, Oh S, Bondarenko VA, Orphanides G, Studitsky VM, Reinberg D (2003) FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* **301**: 1090–1093
- Belotserkovskaya R, Reinberg D (2004) Facts about FACT and transcript elongation through chromatin. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 139–146
- Berger SL (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 142–148
- Corey LL, Weirich CS, Benjamin IJ, Kingston RE (2003) Localized recruitment of a chromatin-remodeling activity by an activator *in vivo* drives transcriptional elongation. *Genes Dev* **17**: 1392–1401
- Emerson BM (2002) Specificity of gene regulation. *Cell* **109**: 267–270
- Fischle W, Wang Y, Allis CD (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 172–183
- Gilbert C, Kristjuhan A, Winkler G, Svejstrup JQ (2004) Elongator interactions with nascent mRNA revealed by RNA immunoprecipitation. *Mol Cell* **14**: 457–464
- Grande MA, Van der Kraan I, De Jong L, Van Driel R (1997) Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II. *J Cell Sci* **110**: 1781–1791
- Grewal SI, Elgin SC (2002) Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 178–187
- Hatzis P, Talianidis I (2001) Regulatory mechanisms controlling human hepatocyte nuclear factor 4 α gene expression. *Mol Cell Biol* **21**: 7320–7330
- Hatzis P, Talianidis I (2002) Dynamics of enhancer–promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol Cell* **10**: 1467–1477
- Jenuwein T (2001) Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases. *Trends Cell Biol* **11**: 266–273
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293**: 1074–1080
- Kim JH, Lane WS, Reinberg D (2002) Human Elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 1241–1246
- Kouzarides T (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 198–209
- Kristjuhan A, Walker J, Suka N, Grunstein M, Roberts D, Cairns BR, Svejstrup JQ (2002) Transcriptional inhibition of genes with severe histone h3 hypoacetylation in the coding region. *Mol Cell* **10**: 925–933
- Krogan NJ, Dover J, Wood A, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Ryan OW, Golshani A, Johnston M, Greenblatt JF, Shilatifard A (2003) The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol Cell* **11**: 721–729
- Ktistaki E, Talianidis I (1997) Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* **277**: 109–112
- Lachner M, Jenuwein T (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 286–298
- Lachner M, O’Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116–120
- McKitttrick E, Gafken PR, Ahmad K, Henikoff S (2004) Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 1525–1530
- Muchardt C, Reyes JC, Bourachot B, Legouy E, Yaniv M (1996) The hbrm and BRG-1 proteins, components of the human SNF/SWI complex, are phosphorylated and excluded from the condensed chromosomes during mitosis. *EMBO J* **15**: 3394–3402
- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108**: 475–487
- Ng HH, Robert F, Young RA, Struhl K (2003) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* **11**: 709–719
- Pokholok DK, Hannett NM, Young RA (2002) Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression *in vivo*. *Mol Cell* **9**: 799–809
- Reyes JC, Muchardt C, Yaniv M (1997) Components of the human SWI/SNF complex are enriched in active chromatin and are associated with the nuclear matrix. *J Cell Biol* **137**: 263–274
- 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**: 407–411
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bernstein BE, Karabetsov N, Morillon A, Weise C, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2003) Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Mol Cell* **12**: 1325–1332
- Saunders A, Werner J, Andrulis ED, Nakayama T, Hirose S, Reinberg D, Lis JT (2003) Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin *in vivo*. *Science* **301**: 1094–1096
- Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T (2004) Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* **6**: 73–77
- Sif S, Stukenberg PT, Kirchner MW, Kingston RE (1998) Mitotic inactivation of human SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Genes Dev* **12**: 2842–2851
- Soutoglou E, Katrakili N, Talianidis I (2000) Acetylation regulates transcription factor activity at multiple levels. *Mol Cell* **5**: 745–751
- Soutoglou E, Talianidis I (2002) Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* **295**: 1901–1904
- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**: 51–61
- Turner BM (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays* **22**: 836–845
- Turner BM (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell* **111**: 285–291
- Winkler GS, Kristjuhan A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ (2002) Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 3517–3522
- Wittschieben BO, Otero G, de Bizemont T, Fellows J, Erdjument-Bromage H, Ohba R, Li Y, Allis CD, Tempst P, Svejstrup JQ (1999) A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell* **4**: 123–128

Supplementary Information

Antibodies

The antibodies used in this study were from the following sources:

Santa Cruz Biotechnology, Pol-II N-term. (sc-9001), Brg-1 (sc-10768), CBP (sc-369).

Covance, Pol-II CTD-Ser5-P (H-14), Pol-II CTD-Ser-2P (H5), Pol-II CTD (8WG16).

Abcam, Histone 3 (ab8580), monomethyl H3-K4 (ab8895), dimethyl H3-K4 (ab7766), trimethyl H3-K4 (ab 8580), dimethyl H3-K9 (ab7312).

Upstate Biotechnology, Acetyl-H3 (06-599), Acetyl-H4 (06-866), dimethyl H3-K79 (07-366), dimethyl H3-K36 (07-274), dimethyl H3-K4 (07-030), FACT/cdc68 (07-255).

Anti-PCAF was obtained from Y. Nakatani, anti-TBP was from L. Tora, anti-Elp1 and anti-Elp3 was from J. Svejstrup.

Nucleotide positions of oligonucleotide primers used for real-time PCR amplifications.

HNF-4 α gene (TSS: +1; polyA site: 28309)

Prom/TSS:	nt -18	to	+92
CR 0.5:	nt +492	to	+578
CR 1.0:	nt +985	to	+1070
CR 2.5	nt +2509	to	+2599
CR 5.0	nt +5172	to	+5260
CR 8.0	nt +7948	to	+8034
CR 10.0	nt +10235	to	+10329
CR 12.5	nt +12563	to	+12649
CR 16.2	nt +16193	to	+16283
CR 20.0	nt +19963	to	+20045
CR 28.0	nt + 28061	to	+28149
Control	nt +32177	to	+32297

HNF-1 α gene (TSS: +1; polyA site: 23764)

Prom/TSS:	nt -89	to	-19
CR 0.5:	nt +450	to	+535
CR 1.0:	nt +953	to	+1033
CR 2.5	nt +2513	to	+2591
CR 5.0	nt +6056	to	+6138
CR 8.0	nt +8137	to	+8212
CR 10.0	nt +9820	to	+9930
CR 15.0	nt +15649	to	+15720
CR 22.0	nt +21978	to	+22061
Control	nt +31801	to	+31888

Albumin gene (TSS: +1; polyA site: 17262)

Prom/TSS:	nt -20	to	+73
CR 0.5:	nt +439	to	+547
CR 1.0:	nt +1057	to	+1149
CR 2.5	nt +2561	to	+2632
CR 5.0	nt +4984	to	+5060
CR 8.0	nt +7940	to	+8020
CR 10.0	nt +10022	to	+10112
CR 12.5	nt +12986	to	+13068
CR 15.0	nt +15040	to	+15121
Control	nt +26283	to	+26358

RT-PCR primer sets

HNF-4 α mRNA : 5' ggagatgacttgaggccttact
3' ggggaatcgttccaaggctc

HNF-1 α mRNA : 5' gcctcctgggtcctacgttcacc
3' gggcttggtgctgtagagggcgtg

Albumin mRNA : 5' caccttccatgcagatatatg
3' tgcagcacttctctacaaaag

Supplementary Table 1. Analysis of simultaneous modification of individual nucleosomes by sequential chromatin immunoprecipitation (ReChIP) assays.

ReChIP assays were performed by the indicated 1st and 2nd IP antibodies. The nucleosomal DNAs obtained after the second immunoprecipitation were amplified by Real Time PCR, using primer sets corresponding to nucleosomes located at 0.5 and 1.0 kb of the coding regions of HNF4, HNF1 and Albumin genes. The results were

first normalized to those obtained with non-immune antibody and divided by the input values (which correspond to results obtained with the eluted material after the 1st IPs). The Re-ChIP efficiencies of the different antibodies were calculated from the data (% of input) obtained in experiments using the same antibody in the first and second IP. The data from the 6 regions (0.5 and 1kb segments of three genes) were averaged. The average percentages were as follows: **56% for the H3K4 Tri-Methyl antibody, 32% for the H3K4 Di-Methyl antibody, 41% for the H3K79 Di-Methyl antibody, 38% for the Acetyl-H3 antibody and 33% for H3K4 Mono-Methyl antibody (the latter obtained on coding region 10 kb)**. Using these values all the data were normalized to 100% Re-ChIP efficiency. The numbers indicate normalized average percentages and deviations of the recovered material corresponding to the 0.5 kb segments (Numbers at the top) and the 1.0 kb segments (Numbers at the bottom), from at least 3 experiments.

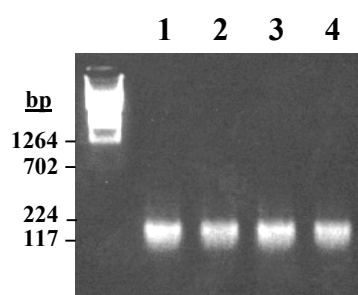
1 st IP:	H3K4 Tri-Methyl			H3K4 Di-Methyl			H3K79 Di-Methyl			H3-acetyl			
	Gene	HNF4	HNF1	Alb.	HNF4	HNF1	Alb.	HNF4	HNF1	Alb.	HNF4	HNF1	Alb.
2 nd IP													
H3K4 Tri-Me	92±14 99±13	108±8 87±7	103±7 106±8	90±10 78±12	91±8 83±10	92±10 85±8	83±8 90±12	89±12 96±14	85±12 87±14	72±10 71±6	80±12 83±10	81±8 80±10	
H3K4 Di-Me	96±8 87±7	87±6 78±4	93±8 100±9	109±9 93±8	96±10 100±9	93±9 106±12	93±10 109±11	84±8 81±8	78±6 90±12	87±6 81±10	90±10 93±12	78±10 90±12	
H3K79 Di-Me	85±8 94±10	90±10 97±10	77±10 85±10	97±6 87±8	85±10 77±6	92±10 80±8	111±18 97±12	102±11 106±15	87±11 92±12	92±10 85±12	85±8 89±12	87±8 75±9	
H3-acetyl	81±6 78±7	79±8 92±7	92±10 84±9	86±10 73±14	79±14 76±12	81±12 71±14	73±10 79±12	84±8 89±10	86±14 73±12	102±14 92±12	94±11 105±9	105±11 99±9	
H3K4 Mono-Me	1.2±0.4 1.5±0.5	1.1±0.6 0.9±0.4	1.2±0.5 0.7±0.3	0.6±0.2 0.6±0.3	0.7±0.2 0.6±0.3	0.9±0.1 0.7±0.2	1±0.4 1.2±0.5	1.1±0.6 0.9±0.5	0.8±0.3 0.7±0.2	0.3±0.1 0.5±0.3	0.2±0.1 0.2±0.1	0.4±0.2 0.3±0.1	

Supplementary Figure 1. Analysis of the DNA after Mnase digestion and the expression of HNF-4, HNF-1 and albumin genes.

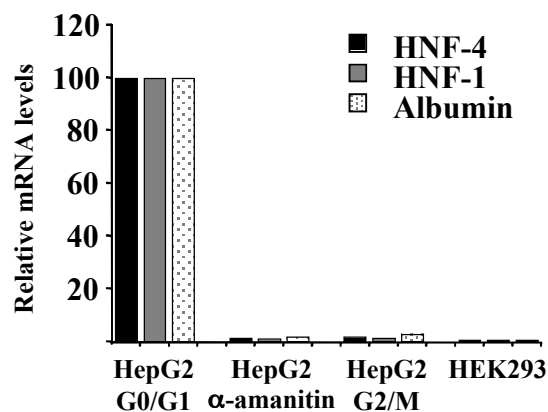
(A) Part of the input samples after crosslinking and MNase digestion, were de-crosslinked, extracted with phenol-chlorophorm, precipitated with ethanol. The DNAs were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. Order of samples: lambda BstEII marker; 1, G0/G1 enriched HepG2; 2, α -amanitin treated HepG2; 3, Nocodazol-arrested HepG2; 4, HEK 293.

(B) Total RNAs, extracted from 2×10^6 cells, were analyzed by RT-PCR. Real-time PCR values are expressed as percentage of those detected with RNAs from G0/G1-enriched HepG2 cells.

A.



B.

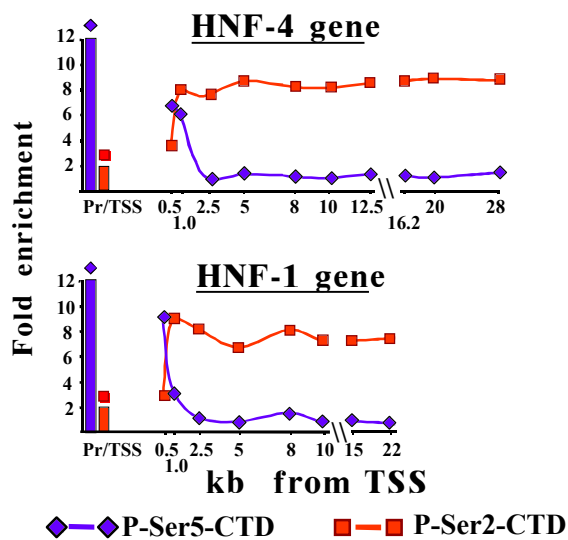


Supplementary Figure 2. Association of Brg-1, CBP and PCAF with initiating and elongating forms of RNA pol-II.

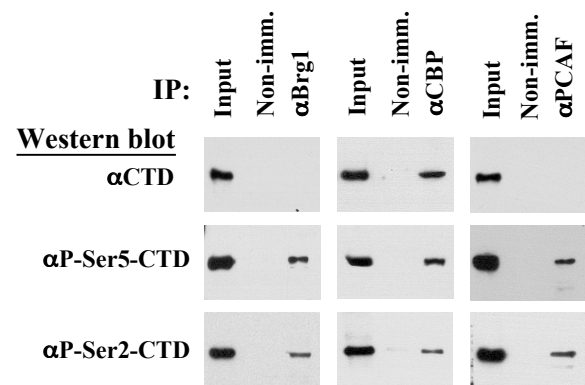
(A) Chromatin immunoprecipitation assays were performed with the antibodies H14 (P-Ser5-CTD) and H5 (P-Ser-2-CTD), raised against phosphorylated CTD peptides.

(B) HepG2 nuclear extracts were immunoprecipitated with the antibodies α Brg1, α CBP and α PCAF and the presence of the different CTD-phosphorylated forms of RNA pol-II in the precipitates was detected by western blot analysis using antibodies raised against non-phosphorylated CTD, 8WG16 (α CTD), and H14 (α P-Ser5-CTD), or H5 (α P-Ser-2-CTD) as indicated.

A.



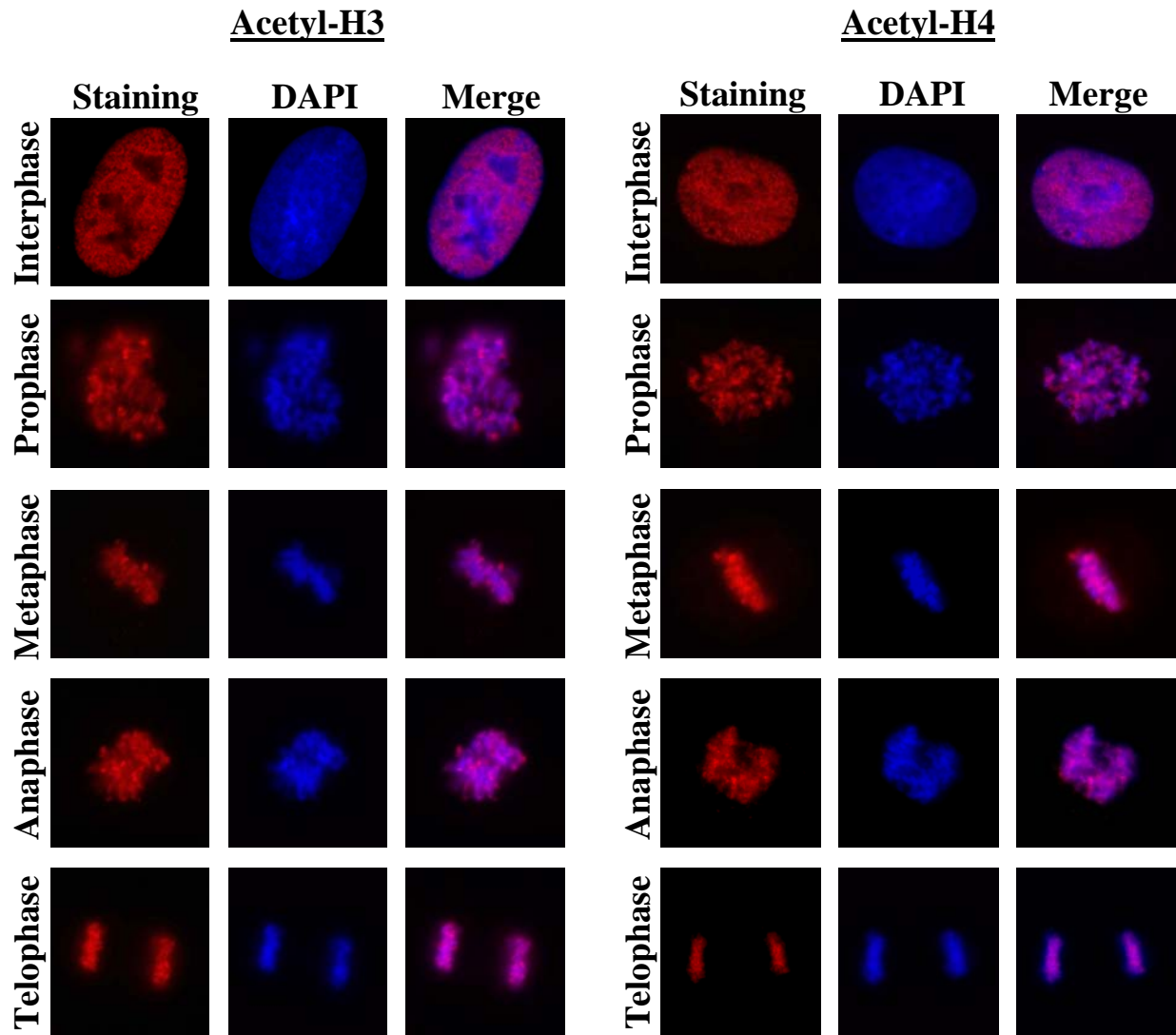
B.



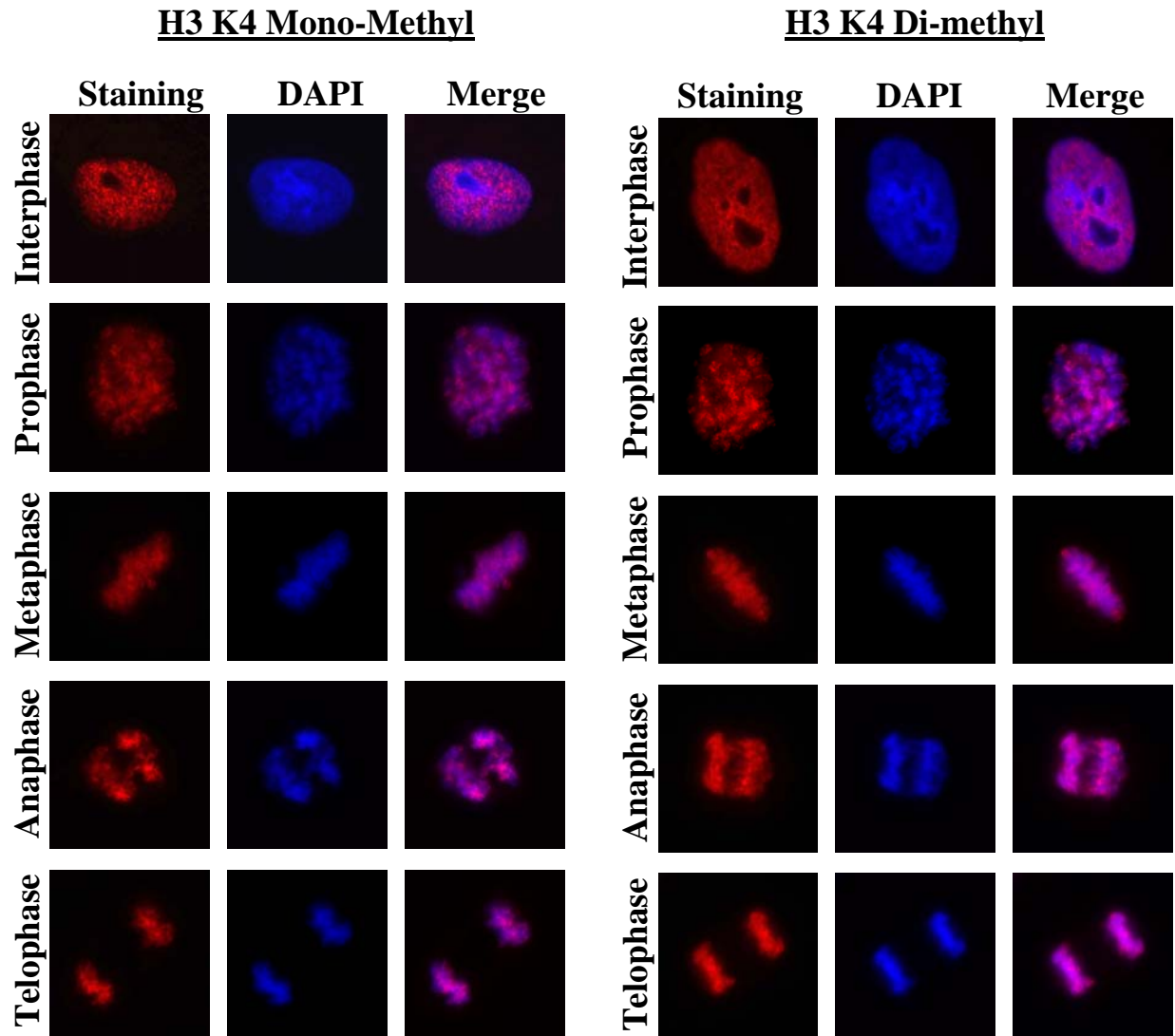
Supplementary Figure 3. Immunocytological examination of histone modifications and chromatin modifying activities at the different stages of mitosis.

HepG2 cells grown on glass cover slips were fixed for 10 min at -20°C and immunostained with the indicated antibodies. Fluorescence images of representative cells at the interphase and various stages of the mitotic phase are shown. Left panels correspond to immunofluorescence stainings using Alexa Red 568 secondary antibodies, middle panels show DNA stainings with DAPI, while panels at the right are merged images of the former two pictures. Note that, immunofluorescence signals obtained by antibodies against the factors (CBP, PCAF, Elp3 and Brg1) were excluded from mitotic chromatin, while those obtained with histone modification state antibodies overlapped with it. In the case of CBP and Brg1 staining two populations of telophase cells were observed. In some cells they were excluded, in others they were partially associated with mitotic chromatin. Representative images of both populations are shown.

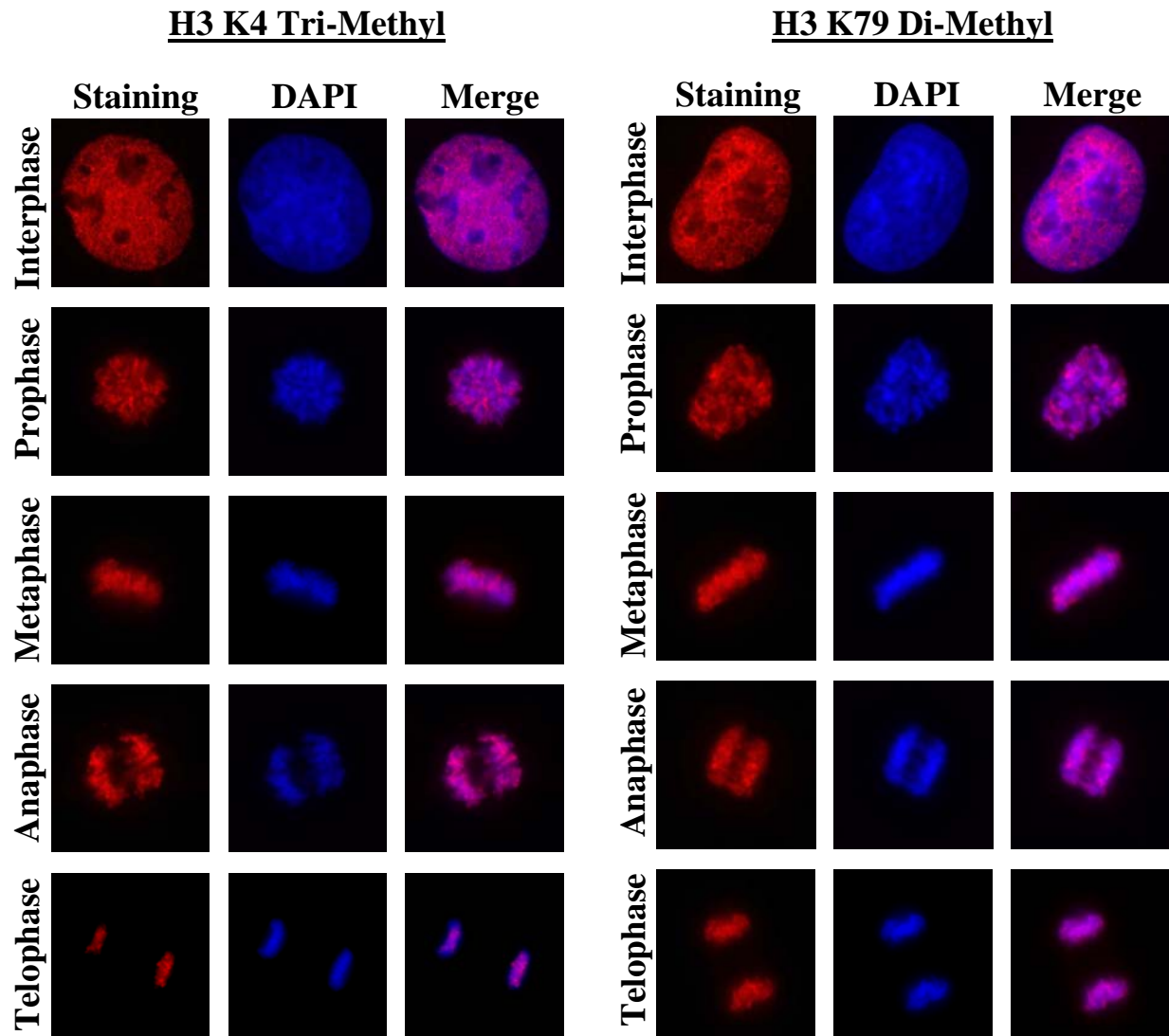
Supplementary Figure 3a



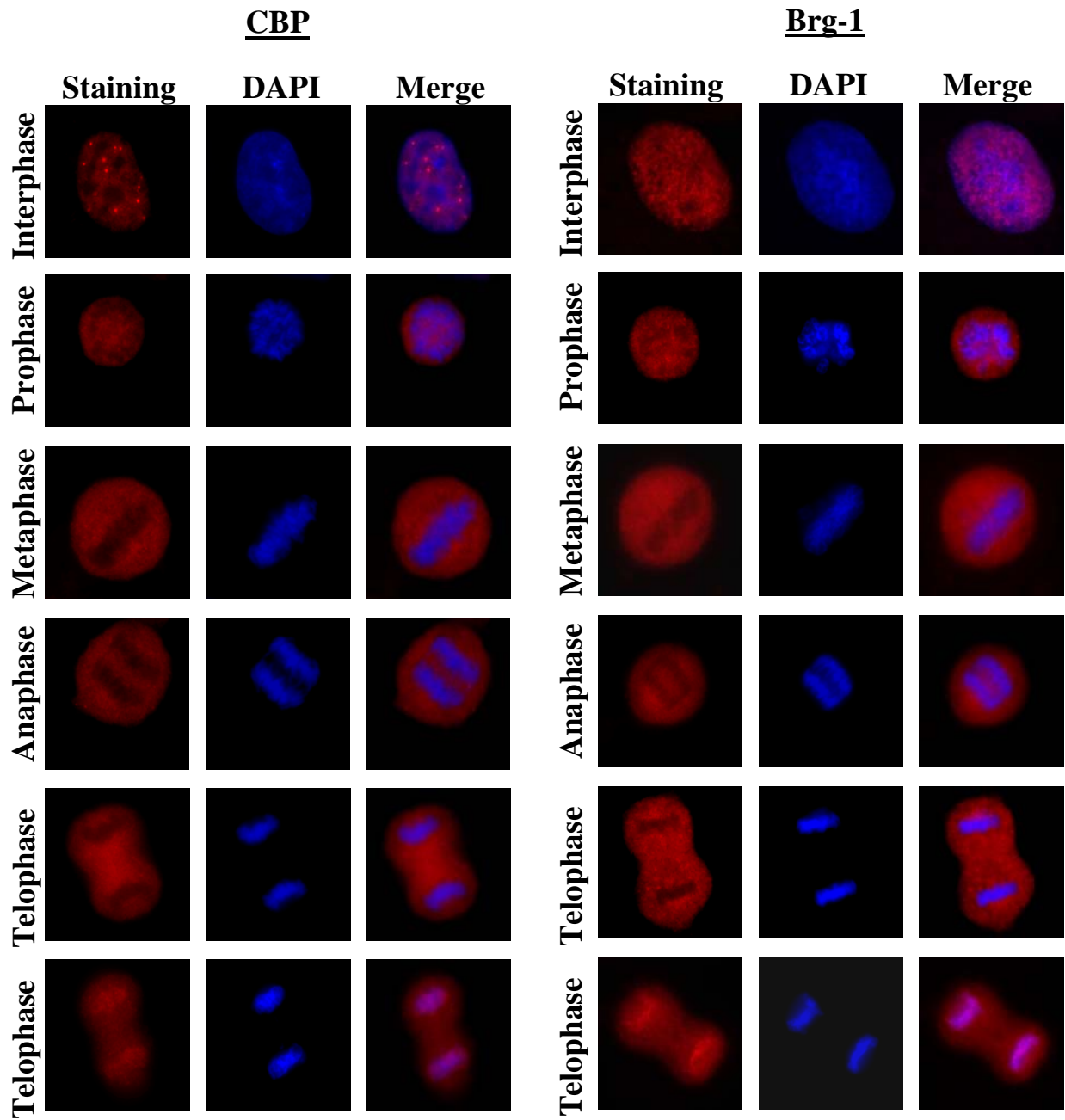
Supplementary Figure 3b



Supplementary Figure 3c



Supplementary Figure 3d



Supplementary Figure 3e

