

ALEXANDRE BOUDREAU

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION D'UNE NOUVELLE SOUS-UNITÉ
DU COMPLEXE HISTONE ACÉTYLTRANSFÉRASE NUA4**

Mémoire
Présenté
À la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

Département de biologie cellulaire et moléculaire
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL

JANVIER 2001

© Alexandre Boudreault, 2001



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-62051-4

Canada

RÉSUMÉ

Chez les organismes eucaryotes, l'ADN est empaqueté dans une structure appelée chromatine. La sous-unité de base de cette structure est le nucléosome qui est constitué d'un cœur protéique d'histones autour duquel s'enroule l'ADN. Les histones sont modifiées par acétylation et cette activité est associée à la régulation de la transcription de l'ARN. Chez la levure, le complexe histone acétyltransférase NuA4 est nécessaire à l'expression de certains gènes spécifiques et à l'entrée des cellules en mitose. Ces travaux présentent l'identification et la caractérisation d'une nouvelle sous-unité de ce complexe : la protéine Epl1. Il est également démontré que la protéine Epl1 est essentielle à la croissance cellulaire comme plusieurs autres sous-unités de NuA4 et que des mutations dans EPL1 engendrent des défauts transcriptionnels spécifiques. Ces travaux confirment donc davantage le rôle déterminant de la reconfiguration chromatinienne par NuA4 dans la régulation transcriptionnelle.

AVANT-PROPOS

Je tiens à remercier le Dr Jacques Côté et les autres membres du laboratoire pour avoir fait de mon séjour au laboratoire une période très agréable dont je garderai plusieurs bons souvenirs. Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Jacques Côté pour son appui tout au long de ma maîtrise. Sa passion pour la recherche, ses innombrables connaissances et sa grande disponibilité ont été précieux tout au long de la réalisation des travaux présentés dans ce mémoire. Je tiens également à remercier Julie Savard pour ses nombreux conseils, Luc Galameau pour son aide inestimable en informatique, Amine Nourani pour m'avoir inculqué les connaissances de base sur la levure et pour son soutien moral, Dominique Cronier pour son aide durant l'été 2000 et pour m'avoir encouragé durant la rédaction de ce mémoire, et mon complice Stéphane Allard pour ses précieux conseils et sa philosophie de vie. Finalement, je remercie le CRSNG de m'avoir accordé une bourse me permettant de réaliser cette maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
RÉSUMÉ	I
AVANT-PROPOS	II
TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LE TEXTE	IX
 CHAPITRE I : INTRODUCTION	 1
1.1 Les modifications de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes	 1
1.1.1 Structure de la chromatine	1
1.1.2 La chromatine et le contrôle de la transcription	2
1.2 Remodelage de la chromatine ATP-dépendant	3
1.2.1 Le groupe SWI2/SNF2	4
1.2.2 Le groupe ISWI	5
1.3 L'acétylation des histones	6
1.3.1 L'acétylation des histones et l'activation de la transcription .	7
1.3.2 Mécanismes d'action de la régulation transcriptionnelle par l'acétylation des histones	 8
1.3.3 Les histone acétyltransférases de type B	9
1.3.4 Les complexes histone acétyltransférase de type A	10

	Page
1.3.4.1 Les complexes SAGA et ADA	10
1.3.4.2 Le complexe PCAF	13
1.3.4.3 Le complexe NuA3	14
1.3.4.4 Le complexe NuA4	15
1.3.4.5 Le complexe TIP60	17
1.3.4.6 Le complexe MSL	18
1.4 La déacétylation des histones	19
1.5 Autres modifications post-traductionnelles des histones impliquées dans la régulation transcriptionnelle	21
1.5.1 La phosphorylation des histones	21
1.5.2 La méthylation des histones	22
1.6 Les mécanismes de recrutement des complexes de modification de la chromatine.....	23
1 7 But du projet	25
 CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	 26
2.1 Protocoles et réactifs	26
2.2 Constructions plasmidiques	26
2.3 Souches de levure	28
2.4 Essais HAT	29
2.5 Western blots	30
2.6 Séquençage des peptides par spectrométrie de masse	30
2.7 Purifications du complexe NuA4	30
2.8 Immunoprécipitations	31
2.9 Délétion du gène EPL1 et dissection de tétrades	31
2.10 Tests de complémentation	32
2.11 Mutagénèse de EPL1	32
2.12 Northern blots	32

	Page
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS	34
3.1 Epl1 est une sous-unité stable du complexe NuA4.....	34
3.1.1 Identification de la sous unité de 105 kDa du complexe NuA4 par spectrométrie de masse	34
3.1.2 Purifications partielles du complexe NuA4 à partir de souches de <i>S. cerevesiae</i> exprimant HA-Epl1	37
3.1.3 Immunoprécipitation du complexe NuA4 avec un anticorps reconnaissant HA-Epl1	42
3.2 L'extrémité N-terminale de Epl1 est essentielle à la croissance cellulaire	44
3.2.1 Délétion du gène EPL1 par recombinaison homologue chez <i>S. cerevesiae</i>	44
3.2.2 Tests de complémentation de la souche $\Delta epl1$ par l'expression de protéines Epl1 partielles	46
3.3 L'expression de certains gènes spécifiques requiert Epl1	49
3.3.1 Production et analyses préliminaires de mutants <i>epl1</i>	49
3.3.2 Caractérisation de l'effet des mutations dans EPL1 sur la transcription de certains gènes spécifiques <i>in vivo</i>	52
3.4 Le complexe Piccolo NuA4 contient l'extrémité N-terminale de Epl1	54
3.4.1 Identification d'une nouvelle sous-unité du complexe Piccolo NuA4 par spectrométrie de masse	54
3.4.2 Visualisation de la forme de Epl1 tronquée dans Piccolo NuA4 par Western blot.	55
3.4.3 Immunoprécipitation du complexe Piccolo NuA4 avec un anticorps reconnaissant HA-Epl1	56

	Page
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	58
4.1 NuA4, un complexe histone acétyltransférase essentiel chez la levure	58
4.1.1 Les sous-unités de NuA4 essentielles à la croissance cellulaire chez <i>S. cerevesiae</i>	58
4.2 NuA4 et le contrôle épigénétique de la transcription	59
4.2.1 Les mécanismes de contrôle épigénétique de l'expression génique	59
4.2.2 Les liens entre le complexe NuA4 et le contrôle épigénétique de la transcription	61
4.3 Epl1 et la régulation de la transcription	62
4.3.1 E(Pc) chez la drosophile	62
4.3.2 EPC chez l'humain	64
4.3.3 Epl1 chez la levure	65
4.4 Les domaines protéiques de Epl1	66
4.4.1 Hypothèses sur le rôle du domaine EPcA de Epl1	66
4.4.2 Rôle de la portion C-terminale de Epl1	67
4.5 Conclusion	67
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 68
 ANNEXE A : Article "Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription"	 87

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Plasmides utilisés dans le cadre de ce projet	28
Tableau 2. Souches de <i>S. cerevisiae</i> utilisées dans le cadre de ce projet.....	29
Tableau 3. Caractéristiques des mutants <i>epl1</i>	51

LISTE DES FIGURES

Figure 1. <i>Epl1</i> est une sous-unité du complexe NuA4	35
Figure 2. Comparaison des homologues de <i>Epl1</i> chez la drosophile, E(Pc), et chez l'humain, EPC	36
Figure 3. Schéma de la purification partielle du complexe NuA4 chez <i>S. cerevisiae</i>	37
Figure 4. <i>Epl1</i> coélue avec l'activité HAT sur H4/H2A et avec 3 autres sous-unités de NuA4 lors de la seconde étape de la purification partielle du complexe	40
Figure 5. <i>Epl1</i> coélue avec l'activité HAT sur H4/H2A et avec 3 autres sous-unités de NuA4 lors de la troisième étape de la purification partielle du complexe	40
Figure 6. <i>Epl1</i> est associée de façon stable aux autres composantes du complexe NuA4	43
Figure 7. Méthodologie employée pour déterminer si un gène est essentiel à la croissance cellulaire chez <i>S. cerevisiae</i>	44
Figure 8. <i>Epl1</i> est un gène essentiel à la croissance cellulaire chez la levure	45
Figure 9. Méthodologie employée pour déterminer si l'expression d'une protéine partielle peut compléter la délétion du gène essentiel codant pour cette protéine chez <i>S. cerevisiae</i>	46
Figure 10. Représentation schématique des trois différentes portions de <i>Epl1</i> testées pour la complémentation	47

Figure 11. Seule la portion N-terminale de Epl1 est essentielle à la croissance cellulaire	48
Figure 12. Méthodologie employée pour créer des mutants epl1	50
Figure 13. Les mutants epl1 expriment des courts fragments N-terminaux de Epl1 et une faible proportion de la protéine Epl1 complète	52
Figure 14. La transcription de certains gènes spécifiques est diminuée chez les deux mutants epl1	53
Figure 15. La sous-unité de 60 kDa du complexe Piccolo NuA4 est une portion de l'extrémité N-terminale de Epl1	55
Figure 16. La portion N-terminale de Epl1 est une sous-unité stable du complexe Piccolo NuA4	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LE TEXTE

ADA : adaptor

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

Arp : actin related protein

ATP : adénosine triphosphate

Eaf : Esa1 associated factor

E(Pc) : Enhancer of Polycomb

Epl1 : Enhancer of Polycomb like 1

Esa1 : Essential Sas2 related protein 1

GCN : General controle nonderepressible

H : histone

HAT : histone acétyltransférase

HDAC : histone déacétylase

HMT : histone méthyltransférase

MSL : male specific lethal

NuA3 : nucleosomal acetyltransferase of histone H3

NuA4 : nucleosomal acetyltransferase of histone H4

Pc : Polycomb

PcG : Polycomb group genes

PCAF : p300/CBP associated factor

PCR : polymerase chain reaction

PEV : position effect variegation

SAGA : Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase

SAS : something about silencing

SON : short oligonucleosome

SPT : suppressor of Ty

SWI/SNF : switching mating type/sucrose non fermentor

TAF : TBP associated factor

TBP : TATA box binding protein

Tip60 : Tat interacting protein (60 kDa)

Ts : thermosensible

WT : wild type

Autorisation de co-auteur(s) pour un article inclus dans le mémoire ou la thèse

NOM de L'ÉTUDIANT-E Alexandre Boudreault

NOM DU PROGRAMME maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire

TITRE DU MÉMOIRE Identification et caractérisation d'une

OU DE LA THÈSE nouvelle sous-unité du complexe histone
acétyltransférase NuA4

Par la présente, le(s) soussigné(s), co-auteur(s) d'un article intitulé :

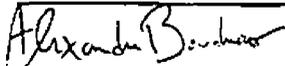
Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription

faisant partie du mémoire de maîtrise ou de la thèse de doctorat en titre qui est présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval, autorise(nt) l'insertion de l'article dans ce mémoire ou cette thèse et l'éventuel microfilmage selon les règles de la Bibliothèque nationale du Canada (Service des thèses canadiennes).

SIGNATURE

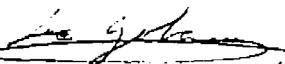
NOM EN CARACTÈRES D'IMPRIMERIE

DATE



Alexandre Boudreault

05/01/00



Luc GALARNEAU

05/01/00



Jacques Côté

05/01/01

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 LES MODIFICATIONS DE LA CHROMATINE ET LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES

On sait depuis de nombreuses années que l'ADN des organismes eucaryotes est fortement condensé dans le noyau sous forme de chromatine. Cependant, ce n'est que récemment que l'on a réalisé que les constituants de la chromatine sont largement impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. De nombreux efforts sont maintenant déployés afin de mieux comprendre comment la structure de la chromatine est modifiée afin de contrôler la transcription des gènes. Il n'est pas surprenant de constater la vigueur du domaine de recherche sur les modifications de la chromatine puisque l'élucidation des mécanismes de la régulation génique est essentielle à la compréhension de nombreux phénomènes comme la différenciation cellulaire, le développement embryonnaire ou le cancer.

1.1.1 La structure de la chromatine

Au microscope électronique, la fibre de chromatine déroulée ressemble à un collier de perles dont les perles sont les nucléosomes et le fil intercalaire est l'ADN. Le nucléosome est constitué d'un cœur protéique d'histones autour duquel 146 pb d'ADN font 1.7 tours (pour une revue de littérature récente sur la structure du nucléosome et de la chromatine voir Workman and Kingston, 1998). La formation de la fibre de chromatine permet le premier degré de compaction de l'ADN et le second degré de compaction est obtenu par l'enroulement de cette fibre de chromatine sur elle-même. La structure solénoïdale ainsi formée a un diamètre de 30 nm et on compte approximativement 6 nucléosomes par tour de solénoïde.

Les constituants du cœur protéique du nucléosome, les histones, sont des protéines très riches en acides aminés basiques. Les séquences en acides aminés de ces protéines sont extrêmement conservées chez tous les organismes eucaryotes. On retrouve cinq types principaux d'histones : H1, H2A, H2B, H3 et H4. Le cœur protéique du nucléosome contient 2 exemplaires de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 qui lie l'ADN qui entre et qui sort du nucléosome permet la formation de la structure solénoïdale.

1.1.2 La chromatine et le contrôle de la transcription

Il a fallu de nombreuses années avant que le rôle des histones dans le contrôle de la transcription ne soit investigué. La chromatine ayant un rôle structural bien défini, il ne vint pas immédiatement à l'esprit des scientifiques qu'elle puisse également être dynamiquement impliquée dans la régulation de la transcription. C'est en 1986 que Knezetic et Luse ont démontré que la transcription *in vitro* est inhibée lorsque l'ADN gabarit est reconstitué en polynucléosomes (Knezetic and Luse, 1986). Ce fut la première démonstration que la structure chromatiniennne pouvait inhiber la transcription. Lorch démontra ensuite que l'incorporation de la boîte TATA dans le nucléosome bloque la transcription (Lorch *et al.*, 1987). Workman démontra également que la formation de nucléosomes sur un promoteur inhibe la liaison de TF_{II}D à celui-ci (Workman and Roeder, 1987). Ces résultats semblaient démontrer que la structure chromatiniennne inhibe l'activation de la transcription en empêchant la formation du complexe de pré-initiation. Par la suite, Grunstein a utilisé une souche de *S. cerevisiae* exprimant l'histone H4 sous le contrôle du promoteur GAL pour pouvoir inhiber la formation de nucléosomes *in vivo*. Lorsque les cellules étaient transférées dans un milieu contenant du glucose, l'arrêt de la synthèse de H4 empêchait la formation de nouveaux nucléosomes. Les expériences effectuées avec cette souche ont montré que la diminution du nombre de nucléosomes augmente le taux de transcription du gène inductible PHO5 (Han *et al.*, 1988). Il s'agissait de la première démonstration de l'inhibition de la transcription par la structure chromatiniennne *in vivo*. Grunstein a également démontré que la délétion de la portion N-terminale de l'histone H4 diminue l'activation de la transcription des gènes

GAL1 et PHO5 (Durrin *et al.*, 1991). Ceci a permis d'affirmer que les histones sont impliquées à la fois dans la répression et l'activation de la transcription. Ces résultats ont donc constitué les premières preuves du rôle dynamique de la chromatine dans la régulation de l'expression génique chez les eucaryotes.

Des mécanismes de modification de la chromatine reliés à la régulation de la transcription ont été caractérisés durant la dernière décennie. Ces modifications sont regroupées en deux classes : les modifications impliquant un remodelage de la chromatine ATP-dépendant et les modifications covalentes des histones. Le remodelage ATP-dépendant et l'acétylation des histones ont été plus largement caractérisés. Il est maintenant clair que ces activités de modifications jouent un rôle primordial dans la régulation transcriptionnelle comme en témoigne leur forte conservation chez tous les organismes eucaryotes étudiés.

1.2 LE REMODELAGE DE LA CHROMATINE ATP-DÉPENDANT

Le remodelage de la chromatine ATP-dépendant fut la première activité de modification de la chromatine reliée au contrôle de la transcription (pour des revues de littérature récentes sur le remodelage de la chromatine ATP-dépendant voir Workman and Kingston, 1998 et Vignali *et al.*, 2000). Ce remodelage est effectué par des complexes multiprotéiques de haut poids moléculaire contenant une sous-unité ATPase essentielle à leur activité. Le mécanisme du remodelage effectué par ces complexes est encore mal compris. Toutefois, on sait que ces complexes augmentent l'accessibilité de l'ADN nucléosomal aux enzymes de restriction et à la DNase I. De plus, ces complexes facilitent la liaison des facteurs de transcription à leur site de liaison sur l'ADN nucléosomal. En somme, ils semblent affaiblir les liens histones/ADN. On sait également que la modification de la structure induite par ces complexes est préservée même après que les complexes aient quitté le nucléosome (Côté *et al.*, 1998).

Les complexes de remodelage ATP-dépendant ont été classés en deux groupes principaux selon la nature de leur sous-unité ATPase : le groupe SWI2/SNF2 et le groupe imitation SWI (ISWI). Un troisième groupe de complexes contenant une ATPase apparentée à Snf2 et contenant également une activité histone déacétylase a également été décrit récemment (pour une revue de littérature récente sur les complexes de remodelage ATP-dépendant voir Vignali *et al.*, 2000).

1.2.1 Le groupe SWI2/SNF2

Le groupe SWI2/SNF2 comprend les complexes SWI/SNF et RSC chez la levure, le complexe Brahma chez la drosophile (Shen *et al.*, 2000) et les complexes humains BRM et BRG1 (également appelés complexes SWI/SNF humains) (Kwon *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996). Ils contiennent tous une sous-unité ATPase hautement conservée sur toute la longueur de la protéine appartenant à la sous-famille Swi2/Snf2 et contiennent également plusieurs autres sous-unités conservées.

Le complexe SWI/SNF chez la levure a été le premier complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant caractérisé. Plusieurs sous-unités de ce complexe avaient initialement été identifiées génétiquement comme étant impliquées dans la régulation des gènes HO (gènes SWI) et SUC2 (gènes SNF) (pour une revue de littérature récente voir Imbalzano, 1998). La relation entre ce complexe et la structure de la chromatine a d'abord été suggérée car des mutations dans des gènes codant pour des protéines chromosomales suppriment les phénotypes des mutants *swi* ou *snf* chez la levure. Par exemple, l'inactivation du gène *SIN2*, un des 2 gènes codant pour l'histone H3, supprime les défauts de croissance et transcriptionnels causés par des mutations dans les gènes de *Swi1*, *Swi2* ou *Swi3*, trois sous-unités de SWI/SNF (Kruger *et al.*, 1995). De plus, la délétion d'un des clusters codant pour les histones H2A et H2B supprime le défaut transcriptionnel du gène *SUC2* résultant d'une mutation dans les gènes de *Swi2*, *Snf5* ou *Snf6*, également des sous-unités de SWI/SNF (Hirschhorn *et al.*, 1992).

Des analyses *in vitro* ont démontré que le complexe SWI/SNF facilite la fixation de l'activateur transcriptionnel Gal4 à l'ADN nucléosomal (Côté *et al.*, 1994). L'activité de remodelage de ce complexe est totalement dépendante de la présence d'ATP qui est hydrolysé par Swi2, la sous-unité ATPase du complexe. De plus, il a été démontré que l'activité ATPase de Swi2 est dépendante de l'ADN (Laurent *et al.*, 1993).

Le complexe RSC chez la levure est hautement apparenté à SWI/SNF. Il contient plusieurs sous-unités homologues à des sous-unités de SWI/SNF telle la sous-unité ATPase Sth1, l'homologue de Swi2/Snf2 (Cairns *et al.*, 1996b). De plus, les deux complexes ont deux sous-unités communes : les protéines apparentées à l'actine Arp7 et Arp9 (Cairns *et al.*, 1998). Cependant RSC est beaucoup plus abondant que SWI/SNF dans la cellule et il est essentiel à la croissance cellulaire, contrairement à SWI/SNF (Cairns *et al.*, 1996b).

1.2.2 Le groupe ISWI

Les membres du second groupe de complexes de remodelage ATP-dépendant contiennent une sous-unité ATPase apparentée à la protéine ISWI. Celle-ci est homologue à Swi2/Snf2 exclusivement dans le domaine ATPase (Elfring *et al.*, 1994). Les complexes ACF, NURF et CHRAC purifiés chez *Drosophila* sont les membres du groupe ISWI les mieux caractérisés (Ito *et al.*, 1997; Tsukiyama and Wu, 1995; Varga-Weisz *et al.*, 1997). Ces complexes possèdent tous une activité de remodelage similaire à SWI/SNF, mais sont plus petits et contiennent moins de sous-unités que celui-ci. Un complexe nommé RSF contenant une ATPase apparentée à ISWI a également été caractérisé chez l'humain (LeRoy *et al.*, 1998). Finalement, trois complexes ISWI ont été purifiés chez la levure. Les deux premiers complexes identifiés contiennent respectivement les sous-unités ATPase Iswi1 et Iswi2 (Tsukiyama *et al.*, 1999) et le dernier complexe purifié contient l'ATPase Ino80 (Shen *et al.*, 2000).

Le complexe INO80 est constitué de 12 sous-unités et il est beaucoup plus gros que les autres complexes ISWI purifiés (Shen *et al.*, 2000). Outre l'ATPase Ino80, il contient l'actine (Act1) et trois protéines apparentées à celle-ci : Act3/Arp4, Arp5 et Arp8. De plus, il contient les protéines Rvb1 et Rvb2 qui sont apparentées à l'hélicase RuvB bactérienne. Ces deux sous-unités qui permettent au complexe d'exercer une activité 3'-5' hélicase (Shen *et al.*, 2000) ont récemment été reliées au contrôle de la transcription (Lim *et al.*, 2000). En plus d'engendrer des défauts transcriptionnels, les mutations dans la sous-unité catalytique du complexe INO80 cause une hypersensibilité aux agents induisant des dommages à l'ADN (Ebbert *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2000). Ceci suggère qu'en plus d'être impliqué dans la transcription, le complexe INO80 pourrait être impliqué directement ou non dans la réparation de l'ADN.

1.3 L'ACÉTYLATION DES HISTONES

Certains résidus lysine spécifiques des portions N-terminales des histones peuvent être modifiés post-traductionnellement par acétylation. Cette modification qui neutralise la charge positive des résidus lysine change la charge globale de l'extrémité N-terminale. Chaque histone possède des lysines pouvant être acétylées qui sont totalement conservées chez tous les eucaryotes. Par exemple, l'histone H4 peut être acétylée à 4 positions : K5, K8, K12 et K16. L'acétylation des histones est catalysée par des enzymes appelées histone acétyltransférases (HATs). Ces enzymes utilisent l'acétyl CoA pour transférer un groupement acétyl sur le groupement ϵ -amino des lysines. Cette réaction est réversible et il existe une autre catégorie d'enzymes appelées histones déacétylases (HDACs) catalysant l'enlèvement du groupement acétyl sur les lysines acétylées. Les HATs sont divisées en deux grandes catégories : les HATs de type A qui acétylent les histones nucléosomales dans le noyau et les HATs de type B qui acétylent les histones dans le cytoplasme avant la formation du nucléosome.

1.3.1 L'acétylation des histones et l'activation de la transcription

Dès 1966, Allfrey avait observé que la transcription s'accompagnait souvent de l'acétylation des histones (Allfrey, 1966). On savait également que l'euchromatine qui est transcriptionnellement active est hyperacétylée (Hebbes *et al.*, 1994) alors que l'hétérochromatine qui est transcriptionnellement inactive est hypoacétylée (Braunstein *et al.*, 1993). Cependant, il fallut attendre le clonage de la première HAT de type A, p55 chez *Tetrahymena*, pour démontrer la relation directe entre l'acétylation et la transcription (Brownell and Allis, 1995). Le clonage de p55 permit de découvrir qu'elle était homologue à l'adaptateur transcriptionnel Gcn5 chez *S. cerevisiae* (Brownell *et al.*, 1996). Gcn5 avait été identifiée initialement par criblages génétiques chez la levure comme une protéine interagissant avec l'activateur transcriptionnel Gcn4 (Georgakopoulos and Thireos, 1992) et avec le domaine d'activation transcriptionnelle de l'activateur VP16 du virus herpes simplex (Marcus *et al.*, 1994). La démonstration subséquente que l'adaptateur transcriptionnel Gcn5 acétylait les histones H3 et H4 *in vitro* (Kuo *et al.*, 1996) et que l'activité HAT de Gcn5 est nécessaire à son rôle de co-activateur transcriptionnel *in vivo* (Candau *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997) permirent de démontrer directement l'implication de l'acétylation des histones dans l'activation de la transcription. Finalement, il a été démontré que Gcn5 acétyle l'histone H3 au niveau de promoteurs de gènes dépendants de Gcn5 *in vivo* (Kuo *et al.*, 1998).

Par la suite, on découvrit que plusieurs autres co-activateurs transcriptionnels connus possédaient une activité histone acétyltransférase. En effet, p300 et CBP, deux adaptateurs transcriptionnels homologues intégrant les signaux de plusieurs activateurs tels CREB, Jun, Myb, Fos et MyoD se sont révélés être des histones acétyltransférases (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996). Il a également été démontré que SRC-1 et ACTR, deux co-activateurs des récepteurs hormonaux, possèdent une activité HAT (Chen *et al.*, 1997; Spencer *et al.*, 1997). La sous-unité TAF_{II}250 du complexe TFIID qui se fixe sur la boîte TATA lors de l'initiation de la transcription possède également une activité HAT (Mizzen *et al.*, 1996). La découverte que plusieurs acteurs importants de l'activation de la transcription possèdent une activité histone

acétyltransférase suggère que cette activité est fondamentale à la régulation de l'expression génique chez les eucaryotes.

1.3.2 Mécanismes d'action de la régulation transcriptionnelle par l'acétylation des histones

L'acétylation des histones facilite l'activation de la transcription par plusieurs mécanismes. On peut séparer ses effets en deux catégories : la première comprend les effets structuraux qui induisent une décondensation de la chromatine et rendent l'ADN nucléosomal plus accessible, alors que la deuxième catégorie regroupe les effets spécifiques de l'acétylation sur les liaisons de certaines protéines régulatrices aux portions N-terminales des histones.

Plusieurs travaux ont démontré que l'acétylation des histones provoquait une décondensation de la chromatine (pour une revue de littérature voir Workman and Kingston, 1998). Lorsque l'on traite des mononucléosomes avec de faibles concentrations de trypsine, il est possible d'enlever les portions N-terminales des histones qui sont plus accessibles à la protéase. Les analyses du mononucléosome trypsinisé ont démontré que la dégradation des portions N-terminales des histones n'affectait presque pas la structure du nucléosome. Cependant, le mononucléosome trypsinisé est plus accessible aux protéines comme la DNase I et les protéines liant l'ADN. D'autres études effectuées avec des polynucléosomes trypsinisés ont démontré que ceux-ci ne formaient pas de fibres de 30 nm *in vitro*. Ces résultats semblent donc démontrer une implication des portions N-terminales des histones dans la régulation de la liaison des protéines à la chromatine de même que dans la formation de la fibre de 30 nm. Les résultats obtenus avec des nucléosomes hyperacétylés ressemblent énormément à ceux obtenus avec les nucléosomes trypsinisés. En effet, l'hyperacétylation des histones n'induit pas de changements structuraux importants dans le nucléosome, mais rend l'ADN nucléosomal plus accessible à la DNase I et aux facteurs de transcription. De plus, l'acétylation décroît le surenroulement induit par la formation des nucléosomes. Il a également été démontré que l'acétylation des portions N-terminales diminue l'affinité de celles-ci pour

l'ADN. On suppose que la modification de leur charge nette est responsable de cette diminution d'affinité. Tous ces résultats laissent croire que l'acétylation des portions N-terminales des histones décondense la chromatine, ce qui permet d'augmenter l'accessibilité de l'ADN nucléosomaux aux activateurs et à la machinerie transcriptionnelle.

L'acétylation permet également de contrôler la fixation de certaines protéines régulatrices aux portions N-terminales des histones. Par exemple, on sait que le répresseur transcriptionnel Tup1 se fixe aux histones H3 et H4 non-acétylées, alors qu'il ne se fixe pas à ces histones lorsqu'elles sont acétylées (Watson *et al.*, 2000). De plus, il a été démontré que les portions N-terminales des histones acétylées sont reconnues spécifiquement par les bromodomaines (Dhalluin *et al.*, 1999). Ces domaines protéiques sont présents sur plusieurs protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle et dans les modifications de la chromatine (Haynes *et al.*, 1992). En somme, il est fort probable que l'acétylation des histones soit impliquée dans une forme de signalisation permettant de contrôler la régulation de la transcription.

1.3.3 Les histone acétyltransférases de type B

Les HATs de type B sont responsables de l'acétylation des histones dans le cytoplasme avant leur incorporation dans les nucléosomes. Elles ont suscité beaucoup moins d'intérêt que les enzymes de type A. On sait depuis longtemps que les histones H3 et H4 nouvellement synthétisées sont acétylées avant d'être incorporées dans le nucléosome (Ruiz-Carrillo *et al.*, 1975) et qu'elles sont ensuite déacétylées après la formation de la chromatine (Jackson *et al.*, 1976). L'histone H4 nouvellement synthétisée est diacétylée sur K5/K12 et il semble que l'acétylation d'au moins un de ces deux sites est nécessaire à la reconnaissance du dimère H3/H4 par le facteur d'assemblage de la chromatine CAF1 (Ma *et al.*, 1998). L'enzyme de type B responsable de l'acétylation de la lysine 12 de H4 dans le cytoplasme chez la levure est Hat1. Hat1 forme un hétérodimère avec Hat2 qui augmente l'affinité de Hat1 pour H4 (Parthun *et al.*, 1996).

1.3.4 Les complexes histone acétyltransférase de type A

Les expériences effectuées *in vitro* avec des histone acétyltransférases du groupe A recombinantes ont démontré que la majorité d'entre elles acétylent les histones libres mais sont incapables d'acétyler les histones sous forme de chromatine. La découverte que la majorité des HATs de type A sont présentes dans des complexes multiprotéiques de haut poids moléculaire *in vivo* a pu expliquer ces résultats. En effet, les complexes HAT peuvent acétyler les histones libres et les histones nucléosomales, alors que leurs sous-unités catalytiques seules peuvent seulement acétyler les histones libres. Chez la levure, 4 complexes multiprotéiques HAT ont été identifiés et caractérisés. Il s'agit des complexes SAGA, ADA, NuA3 et NuA4 (Grant *et al.*, 1997). Ces 4 complexes peuvent stimuler la transcription *in vitro* à partir d'ADN de HIV-1 sous forme de chromatine (Steger *et al.*, 1998). Chez l'humain, les complexes HAT homologues aux complexes SAGA et NuA4, les complexes PCAF et TIP60, ont été caractérisés (Ikura *et al.*, 2000; Ogryzko *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1996). La conservation des sous-unités des complexes HAT de la levure à l'humain est assez frappante et sous-tend un rôle important pour l'activité de ces complexes. Un complexe HAT nommé MSL essentiel au mécanisme de compensation de dosage du chromosome mâle a également été caractérisé chez la drosophile (Smith *et al.*, 2000).

1.3.4.1 Les complexes SAGA et ADA

Chez la levure, les complexes SAGA et ADA acétylent les histones H3 et H2B nucléosomales et partagent plusieurs sous-unités dont l'histone acétyltransférase Gcn5 (Grant *et al.*, 1997). Il a été déterminé que la sous-unité catalytique de ces complexes est essentielle à la transcription adéquate de plusieurs gènes chez la levure (Holstege *et al.*, 1998). SAGA contient plusieurs sous-unités qui ne sont pas retrouvées dans ADA et il est beaucoup plus gros que ADA. Le poids moléculaire apparent du complexe SAGA est de 1.8 MDa alors que celui de ADA est de 0.8 MDa. SAGA et ADA contiennent des membres de la famille de protéines Ada (Grant *et al.*, 1997). Les gènes ADA ont été

identifiés et clonés lors d'un criblage sélectionnant les mutants résistants à la surexpression de Gal4-VP16. La surexpression de cette protéine chimère contenant le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 et le domaine d'activation de la transcription de la protéine VP16 du virus herpes simplex est toxique chez la levure. La sélection de mutants résistants à la surexpression de cette protéine de fusion permettait d'identifier des adaptateurs transcriptionnels ou co-activateurs transcriptionnels essentiels à l'activation de la transcription par Gal4-VP16. Les adaptateurs transcriptionnels ainsi sélectionnés facilitent l'activation de la transcription par les activateurs en agissant d'intermédiaire entre le facteur de transcription et la machinerie de la transcription basale. Cinq gènes ADA ont été identifiés : ADA1, ADA2, ADA3, ADA4 et ADA5. Ada2 et Ada3 ont été retrouvées dans SAGA et ADA, alors que Ada1 et Ada5 ont été retrouvées uniquement dans SAGA. De plus, le gène ADA4 s'est révélé être identique à GCN5. SAGA contient donc les produits des 5 gènes ADA, alors que le complexe ADA contient seulement Ada2, Ada3 et Ada4/Gcn5. Bien qu'aucun des gènes ADA ne soit essentiel à la croissance cellulaire chez la levure, leur délétion ralentie la croissance.

Le complexe SAGA contient les produits d'une autre famille de gènes, soit les gènes SPT (suppressor of Ty). Ces gènes ont été identifiés dans un criblage effectué pour repérer des mutations pouvant supprimer le défaut de transcription engendré par l'insertion d'un élément δ du transposon Ty1 dans un promoteur (Winston *et al.*, 1987). Par exemple, l'insertion d'un élément δ de Ty1 entre la boîte TATA et la séquence activatrice en amont du promoteur du gène HIS4 fait en sorte que la transcription débute uniquement à partir de l'élément δ . L'ARNm ainsi produit n'est pas traduit et la souche contenant cette insertion est auxotrophe pour l'histidine. Des mutations dans les gènes SPT permettent à la machinerie transcriptionnelle de débiter la transcription au site normal d'initiation sur le promoteur du gène HIS4 et ainsi d'éliminer l'auxotrophie pour l'histidine. Les produits des gènes SPT identifiés lors des criblages incluent TBP (TATA-box binding protein), des histones et des protéines probablement impliquées dans les modifications de la structure de la chromatine. Les protéines Spt3, Spt7, Spt8 et

Spt20 ont été identifiées comme étant des sous-unités du complexe SAGA (Grant *et al.*, 1997). Il s'est également avéré que le gène SPT20 est identique au gène ADA5.

SAGA partage plusieurs sous-unités avec un autre complexe impliqué dans l'activation de la transcription : le complexe TFIID. Ce complexe reconnaît et lie la boîte TATA à l'intérieur du promoteur et initie la liaison séquentielle des autres facteurs généraux de transcription. Plusieurs TBP-associated factors (TAF_{II}s), originellement retrouvés dans le complexe TFIID, ont été identifiés comme étant des sous-unités du complexe SAGA. Il a été démontré que TAF_{II}90, TAF_{II}68/61, TAF_{II}60, TAF_{II}25/23 et TAF_{II}20/17 font partie de SAGA et que TAF_{II}68 est essentielle à l'activité HAT du complexe de même qu'à sa capacité d'activer la transcription *in vitro* (Grant *et al.*, 1998a). La présence de TAF_{II}s dans SAGA suggérait également une interaction possible entre le complexe et TBP. Il a effectivement été démontré que SAGA interagit avec TBP et que cette interaction dépendait de Spt8 (Stern *et al.*, 1999). Tous ces résultats ont laissé suggérer que le complexe SAGA pourrait agir comme le complexe TFIID dans l'initiation de la transcription et que les deux complexes pourraient être redondants, i.e. que l'initiation de la transcription pourrait se faire avec l'un ou l'autre des deux complexes. La découverte que la transcription de 70 % des gènes chez *S. cerevisiae* requiert au moins une des TAFs communes à SAGA et TFIID et le fait que les sous-unités HAT de ces deux complexes, Gcn5 et TAF_{II}145, soit fonctionnellement redondantes appuient cette hypothèse (Lee *et al.*, 2000).

La dernière sous-unité du complexe SAGA identifiée est la protéine essentielle à la croissance cellulaire Tra1 (Grant *et al.*, 1998b; Saleh *et al.*, 1998). L'orthologue humain de Tra1, TRRAP, interagit avec c-Myc et E2F et est essentielle à leur activité oncogénique (McMahon *et al.*, 1998). Tra1 et TRRAP sont homologues aux membres de la superfamille ATM qui inclue la sous-unité catalytique de la DNA-PK et les protéines ATM, ATR et FRAP. Les membres de cette superfamille sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans la recombinaison de l'ADN. Les membres de la famille ATM contiennent tous un domaine kinase apparenté à celui des phosphatidyl inositol-3 (PI3) kinases. Malgré le fait que Tra1 et TRRAP

contiennent un tel domaine d'homologie, elles ne contiennent pas les motifs conservés du site catalytique et aucune activité kinase ne leur a été attribuée.

Étant donné que le complexe ADA est plus petit que SAGA et que les sous-unités de ADA identifiées étaient également présentes dans SAGA, il avait été proposé que ADA était un sous-complexe de SAGA. Cependant, il a été démontré que ADA contient une sous-unité qui n'est pas dans le complexe SAGA, soit la protéine Ahc1 (ADA HAT complex component 1) qui n'a pas de fonction connue (Eberharter *et al.*, 1999). La délétion du gène AHC1 détruit le complexe ADA alors qu'elle laisse le complexe SAGA intact. Ces résultats démontrent que ADA est un complexe distinct de SAGA et non un sous-complexe formé lors de la purification.

1.3.4.2 Le complexe PCAF

Le complexe PCAF est l'homologue humain du complexe SAGA chez la levure. Sa sous-unité catalytique nommée PCAF a été clonée grâce à son homologie avec l'histone acétyltransférase Gcn5 (Yang *et al.*, 1996). La protéine PCAF interagit avec les co-activateurs transcriptionnels p300/CBP. La protéine adénovirale E1A qui induit la progression du cycle cellulaire en interagissant avec p300/CBP et Rb inhibe l'interaction p300/CBP-PCAF. Conformément à cette compétition, l'expression exogène de la protéine PCAF dans les cellules HeLa inhibe la progression du cycle cellulaire et empêche l'activité mitogénique de la protéine E1A. Également, l'expression exogène de PCAF dans les myoblastes stimule l'expression de p21 par l'activateur MyoD et provoque l'arrêt du cycle cellulaire. Cependant, il a aussi été démontré que la protéine PCAF est essentielle à la différenciation myogénique (Puri *et al.*, 1997). La protéine PCAF interagit également avec des récepteurs hormonaux nucléaires (Blanco *et al.*, 1998) et avec les co-activateurs SRC1 et ACTR qui possèdent également une activité HAT (Spencer *et al.*, 1997) (Chen *et al.*, 1997).

Le complexe PCAF acétyle l'histone nucléosomale H3 et est constitué de plus de 20 sous-unités dont plusieurs sont des homologues des sous-unités du complexe SAGA (Ogryzko *et al.*, 1998; Vassilev *et al.*, 1998). En plus de la protéine PCAF qui est homologue à Gcn5, le complexe contient les homologues humains de Ada2, Ada3, Spt3 et Tra1. De plus, il contient plusieurs TBP-associated factors (TAFs) également retrouvés dans le complexe SAGA: TAF_{II}31, TAF_{II}30, TAF_{II}20 et TAF_{II}15. Cependant, le complexe PCAF contient deux protéines reliées aux TAFs qui n'ont pas été retrouvées dans SAGA: PAF65 α et PAF65 β . Les sous-unités PAF65 α , TAF_{II}31, TAF_{II}20 et TAF_{II}15 contiennent des domaines homologues aux histones H4, H3 et H2B. Conséquemment, la présence d'une structure ressemblant à l'octamère d'histones dans le complexe P/CAF a été suggérée. La présence d'une telle structure dans le complexe SAGA a également été proposée.

1.3.4.3 Le complexe NuA3

Le complexe NuA3 présent chez la levure a un poids moléculaire apparent de 0.5 MDa et acétyle uniquement l'histone nucléosomale H3. Il est composé de 5 sous-unités dont deux ont été identifiées (John *et al.*, 2000). Sa sous-unité catalytique, Sas3, n'est pas essentielle à la croissance cellulaire et fait partie de la famille des histone acétyltransférases MYST qui contient également Sas2, Esa1, MOF, MOZ et Tip60 (Reifsnnyder *et al.*, 1996). L'autre sous-unité de NuA3 identifiée est TAF_{II}30 qui est également présente dans les complexes TF_{II}D, TF_{II}F et SWI/SNF. Contrairement à la majorité des TAFs, TAF_{II}30 n'est pas essentielle à la croissance cellulaire. De plus, bien qu'elle soit présente dans au moins 4 complexes impliqués dans la régulation de la transcription, TAF_{II}30 n'est pas essentielle à la transcription basale ou à la transcription induite par certains activateurs (Cairns *et al.*, 1996a). De plus, le complexe SWI/SNF purifié à partir d'une souche Δ TAF_{II}30 est intact et catalytiquement actif. Finalement, la délétion de TAF_{II}30 réduit très modestement l'activité HAT de NuA3 et laisse le complexe intact (John *et al.*, 2000). Le rôle de TAF_{II}30 dans ces différents complexes reste donc incertain.

Il a été démontré *in vivo* et *in vitro* que la sous-unité catalytique de NuA3 interagit avec Spt16 (John *et al.*, 2000). L'homologue de Spt16 chez les mammifères est une composante de FACT, un complexe hétérodimérique facilitant la transcription en aidant l'élongation par l'ARN polymérase II sur un gabarit nucléosomal (Orphanides *et al.*, 1999). Chez la levure, Spt16 est associée avec Pob3 dans le complexe CP qui est l'équivalent de FACT (Brewster *et al.*, 1998). Cet hétérodimère est associé à la chromatine et co-purifie avec l'ADN polymérase α (Wittmeyer *et al.*, 1999). Par conséquent, l'interaction de NuA3 avec Spt16 suggère que ce complexe pourrait être impliqué dans l'élongation de la transcription ou dans la réplication de l'ADN.

1.3.4.4 Le complexe NuA4

Le complexe NuA4 présent chez la levure a un poids moléculaire apparent de 1.3 MDa et acétyle principalement l'histone H4 et faiblement l'histone H2A (Allard *et al.*, 1999). Il est le seul complexe connu chez la levure pouvant acétyle l'histone H4 nucléosomale. Les 4 lysines de la portion N-terminale de l'histone H4 peuvent être acétylées par NuA4. La sous-unité catalytique de ce complexe est Esa1 qui fait partie de la famille d'histone acétyltransférases MYST (Reifsnnyder *et al.*, 1996). Esa1 est essentielle à la croissance cellulaire et son inactivation mène à un arrêt du cycle cellulaire en G₂/M (Clarke *et al.*, 1999). NuA4 est par conséquent le seul complexe HAT connu dont l'activité est essentielle à la croissance cellulaire chez la levure.

La protéine essentielle Tra1 retrouvée dans le complexe SAGA est également une sous-unité du complexe NuA4 (Allard *et al.*, 1999). De plus, NuA4 contient la protéine Eaf3 (Esa1 associated factor-3) dont l'homologue Msl3 chez la drosophile est essentielle au mécanisme de compensation de dosage (Eisen *et al.*, 2000). Chez la drosophile, Msl3 est présent dans le complexe histone acétyltransférase MSL. La composition et la fonction de ce complexe seront discutées plus en détails à la section 1.3.4.6.

NuA4 contient une protéine homologue à l'actine, Act3/Arp4, ainsi que l'actine elle-même (Act1) (Galarneau *et al.*, 2000). La protéine Act3 est essentielle à la croissance cellulaire (Harata *et al.*, 1994) et il a été démontré qu'elle interagissait avec les histones libres et le nucléosome (Harata *et al.*, 1999) (Galarneau *et al.*, 2000). De plus, un lien a été établi entre Act3 et le contrôle épigénétique de la transcription (Jiang and Stillman, 1996). Bien que Act1 et Act3 possèdent des domaines ATPase, aucune activité ATPase n'a été détectée avec le complexe NuA4 purifié, suggérant plutôt un rôle structural pour ces deux sous-unités. Plusieurs autres protéines reliées à l'actine ont été identifiées comme étant des sous-unités de complexes de remodelage de la chromatine chez la levure. Arp7 et Arp9 sont présentes dans les complexes de remodelage ATP dépendant SWI/SNF et RSC (Cairns *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 1998). De plus, Act1, Act3/Arp4, Arp5 et Arp8 sont présentes dans le complexe de remodelage de la chromatine INO80 (Shen *et al.*, 2000).

Une autre sous-unité de NuA4 identifiée est Yng2/Eaf4. Yng2 est l'homologue du suppresseur de tumeur humain ING1 (Loewith *et al.*, 2000). ING1 est réprimé ou muté dans un grand nombre de cancers humains et il a été démontré qu'il coopère avec p53 dans le contrôle de la croissance cellulaire (Garkavtsev *et al.*, 1998). L'homologie entre Yng2 et ING1 est plus importante dans le PHD finger, un domaine protéique retrouvé dans plusieurs facteurs de transcription et autres protéines impliquées dans la régulation de la structure de la chromatine. Ce domaine contient la séquence Cys₄-His-Cys₃ et on soupçonne qu'il chélate deux ions Zn²⁺. La délétion du gène YNG2 chez la levure résulte en plusieurs phénotypes comme une croissance plus lente et une morphologie anormale qui peuvent être complémentés par l'expression de l'homologue humain ING1 (Loewith *et al.*, 2000). Ce résultat suggère que la fonction des 2 protéines a été conservée durant l'évolution. Conformément à cette hypothèse, il a été démontré que Yng2 est essentielle à l'activation de la transcription au promoteur de p21 par p53 humain chez *S. cerevisiae* (A. Nourani, résultats non publiés).

Il a été démontré que le complexe NuA4 est nécessaire à l'expression normale de certains gènes spécifiques *in vivo*. La transcription des gènes HIS4, LYS2 et PHO5 chute drastiquement dans des mutants *esa1* ou *act3*, alors que l'expression des gènes CYC1 et HIS3 est normale dans ces mutants (Galarneau *et al.*, 2000). De plus, la transcription des gènes PHO5, HIS4 et TRP4 est diminuée dans une souche $\Delta eaf3$ (Eisen *et al.*, 2000).

1.3.4.5 Le complexe TIP60

Le complexe TIP60 est l'homologue humain du complexe NuA4 chez la levure. La sous-unité catalytique de ce complexe, la protéine Tip60, a d'abord été isolée de par son interaction avec la protéine Tat de HIV-1 (Kamine *et al.*, 1996). La détermination subséquente que Tip60 est une histone acétyltransférase a permis de constater que sa spécificité est identique à celle de *Esa1*, son orthologue chez la levure (Yamamoto and Horikoshi, 1997). Des expériences de cotransfections ont suggéré que Tip60 agit comme co-activateur ligand-dépendant de plusieurs récepteurs hormonaux nucléaires (Brady *et al.*, 1999) et qu'elle est impliquée dans l'activation de la transcription du gène de la superoxyde dismutase Mn-dépendante (Creaven *et al.*, 1999).

Le complexe TIP60 comporte plusieurs similarités avec NuA4, mais également plusieurs différences importantes. Tout comme *Esa1*, Tip60 acétyle seulement les histones libres et doit être dans le complexe TIP60 pour acétyle les histones nucléosomales. De plus, tout comme NuA4, le complexe TIP60 acétyle les histones H4, H2A et H3 libres, mais seulement les histones H4 et H2A nucléosomales. En plus de son activité HAT, le complexe TIP60 possède des activités ATPase, hélicase et de liaison à l'ADN (Ikura *et al.*, 2000). Aucune activité ATPase n'a été décelée pour le complexe NuA4, alors que la présence d'activité ADN hélicase et de liaison à l'ADN n'ont pas été investiguées.

Le complexe TIP60 est constitué d'au moins 14 sous-unités. Mis à part l'homologue de *Esa1*, il contient les homologues humains de *Act1*, *Act3*, *Tra1* et *Eaf3* (Ikura *et al.*, 2000) (P. Nakatani, communication personnelle). L'homologue de *Act1*

présent dans TIP60 est la β -actine et l'homologue de Act3 dans TIP60 est la protéine BAF53. La β -actine et BAF53 ont également été retrouvées dans le complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant SWI/SNF humain (Zhao *et al.*, 1998). La seule différence entre NuA4 et TIP60 au niveau des sous-unités connues est la présence de Tip49a et Tip49b dans le complexe TIP60 (Ikura *et al.*, 2000). Les homologues de ces protéines chez la levure, Rvb1 et Rvb2, ont été retrouvés dans le complexe de remodelage ATP-dépendant INO80 (Shen *et al.*, 2000), mais ne sont pas présentes dans le complexe NuA4. Ces protéines ont une homologie de séquence avec l'hélicase RuvB bactérienne qui est impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN. Il a été déterminé que Tip49a et Tip49b forment un complexe stochiométrique qui est responsable de l'activité ATPase du complexe TIP60.

Des expériences effectuées par transfection dans des cellules HeLa ont suggéré que le complexe TIP60 pourrait être impliqué dans la réparation de l'ADN et dans l'induction de l'apoptose. Ces expériences ont été effectuées avec un mutant dominant négatif de Tip60 n'ayant pas d'activité HAT. Les transfectants stables exprimant le mutant Tip60 réparaient leur ADN beaucoup moins rapidement que les transfectants exprimant Tip60 WT suite à une irradiation aux rayons γ . De plus, l'induction de l'apoptose par irradiation aux rayons γ était fortement réduite dans les cellules exprimant Tip60 mutant par rapport aux cellules exprimant Tip60 WT (Ikura *et al.*, 2000).

1.3.4.6 Le complexe MSL

Un seul complexe histone acétyltransférase a été caractérisé chez *D. melanogaster* et il est associé au mécanisme de compensation de dosage (pour une revue de littérature récente sur la compensation de dosage chez *Drosophila* voir Lucchesi, 1998). Chez la drosophile, les gènes présents sur le chromosome X unique du mâle sont transcrits deux fois plus afin d'obtenir une expression équivalente à celle obtenue avec les deux chromosomes X présents chez la femelle. Ce mécanisme a été relié à l'acétylation. En effet, le chromosome X du mâle est acétylé sur la lysine-16 de l'histone H4, alors que cette modification est presque absente sur les chromosomes X de la femelle et sur les

autres chromosomes. Le complexe HAT responsable de cette modification a été purifié et nommé complexe MSL. Il est constitué d'au moins 5 sous-unités protéiques et d'un ARN non-codant qui sont tous requis pour la compensation de dosage (Smith *et al.*, 2000). La délétion d'un des gènes codant pour les sous-unités du complexe MSL est létale pour les mâles et produit donc une progéniture entièrement constituée de femelles. Il a été démontré que le complexe MSL acétyle spécifiquement la lysine-16 de l'histone H4. Deux des sous-unités du complexe MSL sont des homologues des sous-unités du complexe NuA4 chez la levure. La sous-unité catalytique du complexe MSL, Mof, est homologue à Esa1 et la sous-unité Msl3 du complexe MSL est l'homologue de Eaf3 dans NuA4 (Eisen *et al.*, 2000).

La détection d'un ARN non-codant dans le complexe MSL est intéressante puisqu'il s'agit du premier ARN retrouvé dans un complexe modifiant la chromatine. Il a récemment été déterminé que Mof et Msl3 interagissent avec l'ARN roX2 dans le complexe MSL via leurs chromodomaines, un domaine protéique important pour la fonction de nombreuses protéines impliquées dans la régulation de la structure chromatienne (Akhtar *et al.*, 2000). Ce résultat suggérant que le chromodomaine est un domaine d'interaction avec l'ARN laisse supposer que d'autres complexes HAT comme NuA4 pourraient contenir des ARN non-codant.

1.4 LA DÉACÉTYLATION DES HISTONES

Les histone déacétylases (HDACs) peuvent enlever les groupements acétyles qui ont été couplés aux lysines par les HATs. Tout comme ces dernières, elles sont retrouvées dans des complexes de haut poids moléculaire et sont impliquées dans la régulation de la transcription. Plusieurs HDACs ont été caractérisées et elles ont généralement été associées à la répression de la transcription.

Chez la levure, deux complexes HDACs ont été caractérisés, soit les complexes HDA et HDB. Rpd3 est la sous-unité catalytique du complexe HDB et Hda1 est la sous-unité catalytique du complexe HDA (Carmen *et al.*, 1996; Rundlett *et al.*, 1996). Rpd3

forme également un complexe beaucoup plus gros que le complexe HDB avec le répresseur Sin3 qui est appelé complexe Sin3/Rpd3 (Kasten *et al.*, 1997). Ceci explique le fait que Rpd3 et Sin3 régulent négativement les mêmes gènes. Il n'a pas encore été déterminé si HDB est un sous-complexe du complexe Sin3/Rpd3 ou si les complexes sont distincts. Trois autres HDACs ont été identifiées chez la levure : Hos1, Hos2 et Hos3 (Rundlett *et al.*, 1996). Chez l'humain, il y a maintenant 8 HDACs identifiées (HDAC1 à 8). De plus, les deux homologues humains de Sin3, mSin3A et mSin3B, interagissent avec HDAC1 et HDAC2 dans des complexes multiprotéiques (Laherty *et al.*, 1997).

Plusieurs études ont relié la déacétylation des histones avec la répression de la transcription. Chez la levure, le complexe Sin3/Rpd3 interagit avec Ume6, un répresseur transcriptionnel qui se fixe à une séquence de répression présente au niveau de plusieurs promoteurs (Kadosh and Struhl, 1997). Ce résultat suggère que le complexe Sin3/Rpd3 est recruté à certains promoteurs par Ume6 pour réprimer la transcription. Chez les mammifères, Mad/Max est un hétérodimère réprimant la transcription en se liant à des séquences d'ADN spécifiques. La répression par Mad se fait via une interaction avec mSin3A ou mSin3B (Ayer *et al.*, 1995). Les récepteurs de l'acide rétinoïque et de l'hormone thyroïdienne sont des répresseurs transcriptionnels lorsqu'ils ne sont pas liés à leur ligand. Cette répression est médiée par les corepresseurs SMRT et N-CoR (Chen and Evans, 1995; Horlein *et al.*, 1995) qui interagissent directement avec mSin3A/B (Nagy *et al.*, 1997). Finalement, la répression transcriptionnelle induite par les complexes mSin3/HDAC est bloquée par les inhibiteurs des déacétylases tels le butyrate de sodium et la Trichostatine A.

1.5 AUTRES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES IMPLIQUÉES DANS LA RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE

En plus d'être acétylées, les portions N-terminales des histones peuvent également être modifiées par phosphorylation, méthylation, ubiquitination et ADP ribosylation (Bradbury, 1992). Ces modifications sont également très spécifiques et des résultats récents suggèrent que la phosphorylation et la méthylation des histones pourraient être impliquées dans le contrôle de la transcription.

1.5.1 La phosphorylation des histones

La majeure partie de la sérine-10 de l'histone H3 est phosphorylée durant l'entrée en mitose (Hendzel *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 1998) et une mutation de cette sérine nuit à la condensation et à la ségrégation des chromosomes mitotiques chez *Tetrahymena* (Wei *et al.*, 1999). La phosphorylation de H3 avait aussi été reliée à l'activation transcriptionnelle par les facteurs de transcription c-fos et c-jun (Mahadevan *et al.*, 1991). La phosphorylation de la sérine-10 de H3 a lieu tout près de la lysine-14 qui est acétylée par Gcn5. Il a été démontré récemment que la phosphorylation de la sérine-10 de H3 facilite l'acétylation subséquente de la lysine-14 par Gcn5, PCAF et p300 (Lo *et al.*, 2000). De plus, un résidu de Gcn5 a été identifié comme étant en partie responsable de la reconnaissance de la phosphosérine-10. La mutation de ce résidu (R164A) dans Gcn5 ne modifie pas l'activité HAT sur H3 non-phosphorylée, mais inhibe l'augmentation d'activité HAT sur H3 phosphorylée (Lo *et al.*, 2000). *In vivo*, la transcription de certains gènes dépendants de Gcn5 est diminuée dans le mutant R164A, alors que l'expression d'autres gènes dépendants de Gcn5 n'est aucunement affectée par cette mutation. Finalement, il a été démontré qu'une mutation par laquelle la sérine-10 de l'histone H3 est remplacée par une alanine diminue la transcription des mêmes gènes que la mutation R164A dans Gcn5 (Lo *et al.*, 2000). Par conséquent, ces résultats démontrent que la phosphorylation de la sérine-10 de H3 est nécessaire à la transcription de certains gènes *in vivo* et que l'effet de modulation transcriptionnelle de cette phosphorylation

résulte de la stimulation de l'acétylation de la lysine-14 par l'histone acétyltransférase Gcn5.

1.5.2 La méthylation des histones

Le premier lien direct entre la méthylation des histones et la transcription provient de la découverte d'une histone méthyltransférase (HMT) arginine spécifique interagissant avec le récepteur d'hormone stéroïdienne GRIP-1, un co-activateur transcriptionnel (Chen *et al.*, 1999). Cette enzyme appelée CARM-1 (coactivator associated arginine methyltransferase-1) méthyle spécifiquement l'histone H3. La transfection de CARM-1 stimule l'activation transcriptionnelle par le co-activateur GRIP-1. Une activité HMT qui méthyle préférentiellement la lysine-4 de l'histone H3 a également été identifiée chez *Tetrahymena* (Strahl *et al.*, 1999). Cette activité méthyltransférase est présente dans le macronuclei qui est transcriptionnellement actif et absente du micronuclei qui est transcriptionnellement inactif. Récemment, une nouvelle HMT a été identifiée chez l'humain (Rea *et al.*, 2000). La protéine SUV39H1 méthyle spécifiquement la lysine-9 de l'histone H3. Cette protéine est l'homologue de Su(var)3-9 chez *Drosophila* dont la délétion supprime le position-effect variegation (Tschiersch *et al.*, 1994). Il a été possible de situer le motif catalytique de cette HMT dans le domaine SET, un domaine protéique initialement retrouvé dans les protéines modulant le position-effect variegation et les protéines des groupes Polycomb et Trithorax. Il a également été démontré que la phosphorylation de la sérine-10 sur H3 empêchait la méthylation subséquente de la lysine-9 par SUV39H1 (Rea *et al.*, 2000).

Ces résultats nous portent à croire que plusieurs modifications post-traductionnelles spécifiques des histones sont impliquées dans la régulation de la transcription. La découverte qu'une modification comme la phosphorylation peut stimuler une autre modification ou en inhiber une autre a amené certains auteurs à proposer que les modifications post-traductionnelles des histones se font de manière séquentielle ou en combinaison pour constituer un code qui est décrypté par d'autres protéines (Strahl and Allis, 2000).

1.6 LES MÉCANISMES DE RECRUTEMENT DES COMPLEXES DE MODIFICATION DE LA CHROMATINE

Les complexes modifiant la chromatine caractérisés à ce jour régulent l'expression des gènes de manière spécifique. C'est-à-dire qu'ils sont requis pour la transcription d'un nombre restreint de gènes. Par conséquent, il a été suggéré que ces complexes sont recrutés spécifiquement aux promoteurs des gènes dont ils régulent l'expression. Les candidats idéals pour le recrutement de ces complexes sont les facteurs de transcription. Puisque ceux-ci se fixent à des séquences d'ADN spécifiques sur les promoteurs, ils pourraient recruter spécifiquement les complexes de modification à ces mêmes promoteurs. Plusieurs résultats ont appuyé le modèle du recrutement par les facteurs de transcription. Chez la levure, il a été démontré que les complexes histone acétyltransférase SAGA et NuA4 interagissent avec l'activateur transcriptionnel Gcn4 et avec le domaine d'activation de la transcription de VP16 (Utley *et al.*, 1998) et il a également été démontré que le complexe histone déacétylase Sin3/Rpd3 interagit avec le répresseur Ume6 (Kadosh and Struhl, 1997). Plusieurs interactions entre les complexes HDAC humains et des répresseurs transcriptionnels ont aussi été démontrées. Cependant, les résultats obtenus avec les récepteurs hormonaux sont probablement ceux qui appuient le plus clairement le modèle. En effet, les récepteurs hormonaux liés aux hormones interagissent avec les acétyltransférases p300/CBP (Kamei *et al.*, 1996) (Chakravarti *et al.*, 1996), alors qu'ils interagissent avec les complexes déacétylase mSin3/HDAC lorsqu'ils ne sont pas liés aux hormones (Nagy *et al.*, 1997).

Récemment, le recrutement de complexes modifiant la chromatine a été caractérisé en détails *in vivo*. L'équipe de Nasmyth a réussi à élucider les événements se déroulant lors de l'activation du gène HO chez la levure impliquant deux complexes de modification de la chromatine. L'expression de HO qui est nécessaire au changement de type sexuel chez la levure est régulée selon le cycle cellulaire et selon le type cellulaire (Nasmyth, 1983). Dans les cellules haploïdes, le gène HO est exprimé de façon transitoire en fin de G₁ alors qu'il n'est pas exprimé dans les cellules diploïdes. De plus, le gène HO est exprimé dans la cellule mère, mais pas dans la cellule fille. L'expression

de HO est entièrement dépendante des activateurs transcriptionnels Swi5 et SBF, de même que du complexe acétyltransférase SAGA et du complexe de remodelage ATP-dépendant SWI/SNF. Swi5 et SBF se lient à des séquences d'ADN spécifiques différentes sur le promoteur du gène HO. L'équipe de Nasmyth a réussi à démontrer que les 4 éléments essentiels à la transcription de HO arrivent au promoteur dans un ordre chronologique déterminé et que la fixation d'un élément au promoteur est nécessaire à l'arrivée de l'élément suivant (Cosma *et al.*, 1999). Le facteur de transcription Swi5 se fixe tout d'abord au promoteur HO et permet ensuite le recrutement du complexe SWI/SNF. L'activité de remodelage de SWI/SNF permet ensuite le recrutement du complexe SAGA qui permet finalement la fixation du facteur de transcription SBF. Les résultats d'un autre laboratoire concordent avec le modèle de Nasmyth. En effet, l'équipe de Paterson a observé un domaine de 1 kb d'acétylation sur le promoteur HO un peu avant le début de la transcription de HO (Krebs *et al.*, 1999). De plus, cette acétylation est dépendante de Swi5, SWI/SNF et SAGA, mais est indépendante de SBF. Également, ils ont démontré que Rpd3 déacétyle le promoteur HO après sa transcription. En effet, l'acétylation au niveau du promoteur HO est normalement détectée en fin G₁/début S, alors qu'elle est détectée tout au long du cycle cellulaire dans une souche Δ rpd3. L'équipe de Nasmyth a également démontré que le répresseur Ash1 qui est responsable de l'inhibition de la transcription de HO dans la cellule fille empêche le recrutement de SWI/SNF par Swi5 (Cosma *et al.*, 1999). Ces résultats ont clairement démontré que les complexes modifiant la chromatine peuvent être recrutés à des promoteurs spécifiques *in vivo* et que les mécanismes de recrutement de ces complexes sont divers. Les complexes peuvent être recrutés par des facteurs de transcription liant l'ADN ou via l'activité d'autres complexes de remodelage.

1.7 BUT DU PROJET

Le complexe histone acétyltransférase NuA4 est non seulement le seul complexe HAT essentiel connu chez *S. cerevesiae*, mais il est également le seul complexe connu chez la levure acétylant l'histone H4 nucléosomale. Il a été démontré que ce complexe est essentiel à la transcription de certains gènes spécifiques *in vivo*. La découverte d'un complexe orthologue à NuA4 chez l'humain possiblement impliqué dans la réparation de l'ADN et l'apoptose laisse supposer un rôle très important de la modification de la chromatine par NuA4 dans la régulation de l'expression génique.

L'identification et la caractérisation de toutes les sous-unités du complexe NuA4 est une étape essentielle à la compréhension de son fonctionnement dans l'activation de la transcription. Ce projet de recherche consistait à identifier et caractériser la sous-unité de 105 kDa du complexe NuA4. L'identification devait d'abord être effectuée grâce à des analyses par spectrométrie de masse. Une purification partielle du complexe NuA4 devait ensuite être effectuée avec une souche de *S. cerevesiae* exprimant la sous-unité identifiée couplée à un épitope advenant le fait qu'aucun anticorps dirigé contre la protéine identifiée ne soit disponible. La présence de la sous-unité identifiée dans NuA4 devait être confirmée par la coélution avec le complexe lors de la purification et par immunoprécipitation du complexe avec l'anticorps choisi. La délétion du gène codant pour la sous-unité identifiée devait être effectuée dans le but de déterminer si le gène est essentiel à la croissance cellulaire. Le rôle de la sous-unité dans le complexe devait être investigué à l'aide de la souche délétée ou à l'aide de mutants conditionnels, tout dépendant si le gène est essentiel ou non. Des mutants conditionnels devaient donc être créés, advenant le fait que le gène soit essentiel. Finalement, la transcription des gènes dépendants du complexe NuA4 devait être investiguée dans les mutants utilisés.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Protocoles et réactifs

L'ADN, les bactéries et les levures ont été manipulés selon les protocoles standards (Adams *et al.*, 1997; Sambrook *et al.*, 1989). Les amplifications par PCR ont été effectuées avec la polymérase *Vent* (New England Biolabs) en suivant les recommandations du fabricant. Les oligonucléotides ont été obtenus de Gibco BRL et de Research Genetics. Les sérums anti-Tral, anti-Esa1 et anti-Act3 ont déjà été décrits (Allard *et al.*, 1999; Galarneau *et al.*, 2000; Grant *et al.*, 1998b). Les anticorps monoclonaux anti-HA.11 et anti-myc provenaient de Babco. Les oligonucléosomes ont été purifiés à partir de noyaux de cellules Hela comme décrit précédemment (Utley *et al.*, 1996).

2.2 Constructions plasmidiques

Les divers plasmides utilisés dans le cadre de ce projet sont listés au tableau 1. Le gène EPL1 a été amplifié par PCR à partir d'ADN génomique de levure avec les amorces YFL024C-F (Research Genetics) et

5'-TATAACTCGAGTCATGATGAATTTTCTGGGTTATAG-3'.

L'ORF de EPL1 amplifié a été digéré avec *EcoRI* et *XhoI* et cloné dans le plasmide pBFG1 (Nourani *et al.*, 1997) digéré avec les mêmes enzymes de restriction. Cette construction a été nommée pBHE.

Le plasmide pBHE a été digéré avec *HindIII* et le fragment de 4.5 kb contenant le promoteur PGK, HA-EPL1 et le terminateur PGK a été cloné dans le plasmide pFL36 (Bonneaud *et al.*, 1991) digéré avec la même enzyme. Cette construction a été nommée pFEMEX.

Le promoteur du gène EPL1 (-1 à -600) a été amplifié par PCR à partir d'ADN génomique de levure en utilisant les amorces

5'-TATAAGAGCTCGGCTATTACAGTCTGAGGATACCTG-3' et 5'-TTACTCCATGGTTATTATCGTTATTTGCTAATG-3'. Le produit de PCR a été digéré avec *SacI* et *NcoI* et ligaturé avec le fragment de 8 kb purifié sur gel après digestion du plasmide pFEMEX avec les mêmes enzymes. Cette construction a été nommée pPHEL.

Le plasmide pPHEL a été digéré avec *SacI* et *HindIII* et le fragment de 3.7 kb contenant le promoteur EPL1, HA-EPL1 et le terminateur PGK a été inséré dans le plasmide pFL38 (Bonneaud *et al.*, 1991) digéré avec les mêmes enzymes. Cette construction a été nommée pPHEU.

Trois fragments différents du gène EPL1 ont été amplifiés par PCR à partir du plasmide pPHEL et clonés dans pBFG1 pour permettre l'expression de protéines Epl1 tronquées. Le fragment 1-380 a été amplifié avec les amorces YFL024C-F (Research Genetics) et 5'-TTTATCTCGAGTCATCTTTTCAAATTCTTAATTTTACC-3', le fragment 1-485 avec les amorces YFL024C-F et 5'-TAATTCTCGAGTCACGTAATTGGCTGTGATGTTG-3' et le fragment 486-833 avec les amorces 5'-ATAGGATCCTCTCATGTTTATGTCAAACCTACC-3' et 5'-TATAACTCGAGTCATGATGAATTTTCTGGGTTATAG-3'. Les fragments 1-380 et 1-485 amplifiés ont été clonés *EcoRI/XhoI* dans pBFG1 et le fragment 486-833 a été cloné *BamHI/XhoI* dans le même vecteur. Ces constructions ont été nommées pBNES, pBNEL et pBCE respectivement pour Epl1₁₋₃₈₀, Epl1₁₋₄₈₅ et Epl1₄₈₆₋₈₃₃.

Tableau 1. Plasmides utilisés dans le cadre de ce projet.

Plasmide	Caractéristiques	Référence
pBFG1	promoteur PGK, 2 μ , LEU2	Nourani <i>et al.</i> , 1997
pFL36	ARS/CEN, LEU2	Bonneaud <i>et al.</i> , 1991
pFL38	ARS/CEN, URA3	Bonneaud <i>et al.</i> , 1991
pBHE	HA-Epl1, promoteur PGK, 2 μ , LEU2	Ce projet
pFEMEX	HA-Epl1, promoteur PGK, ARS/CEN, LEU2	Ce projet
pPHL	HA-Epl1, promoteur EPL1, ARS/CEN, LEU2	Ce projet
pPHEU	HA-Epl1, promoteur EPL1, ARS/CEN, URA3	Ce projet
pBNES	HA-Epl1 ₁₋₃₈₀ , promoteur PGK, 2 μ , LEU2	Ce projet
pBNEL	HA-Epl1 ₁₋₄₈₅ , promoteur PGK, 2 μ , LEU2	Ce projet
pBCE	HA-Epl1 ₄₈₆₋₈₃₃ , promoteur PGK, 2 μ , LEU2	Ce projet

2.3 Souches de levure

Les différentes souches de *S. cerevisiae* utilisées dans le cadre de ce projet sont listées au tableau 2. La souche QY101 a été construite en transformant le plasmide pBHE dans la souche BY4741. La construction de la souche QY103 est décrite dans la section 2.9. La souche QY108 a été conçue ainsi : la souche 25643 a été transformée avec le plasmide pPHEU et après sporulation et dissection de tétrades, les spores ont été testés pour les phénotypes met⁺, lys⁺, ura⁺ et kan^r. La souche met⁺, ura⁺, lys⁻ et kan^r isolée a été nommée QY108. La souche QY109 a été conçue ainsi : la souche 25643 a été transformée avec le plasmide pPHL et après sporulation et dissection de tétrades, les spores ont été testés pour les phénotypes met⁺, lys⁺, leu⁺ et kan^r. La souche met⁺, leu⁺, lys⁻ et kan^r isolée a été nommée QY109.

Tableau 2. Souches de *S. cerevisiae* utilisées dans le cadre de ce projet.

Souche	Caractéristiques	Background	Référence
BMA41	MAT a/α, <i>ade2</i> , <i>ura3</i> , <i>his3</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2</i>	W303	Beaudin, <i>et al.</i> , 1993
BY4741	MAT a, <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>met15Δ0</i>	S288C	Research Genetic
25643	MAT a/α, <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , ΔEPL1 : :Kan MX	S288C	Research Genetic
QY101	MAT a, <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , plasmide pBHE	S288C	Ce projet
QY103	MAT a/α, <i>ade2</i> , <i>ura3</i> , <i>his3</i> , <i>trp1</i> , <i>leu2</i> , ΔEPL1 : :TRP1	W303	Ce projet
QY108	MAT a, <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , ΔEPL1 : :Kan MX, plasmide pPHEU	S288C	Ce projet
QY109	MAT a, <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , ΔEPL1 : :Kan MX, plasmide pPHEL	S288C	Ce projet

2.4 Essais HAT

Les essais HAT ont été effectués selon les protocoles déjà publiés (Allard *et al.*, 1999; Grant *et al.*, 1997). L'échantillon testé était incubé en présence de 0.5 μg d'oligonucléosomes et de 0.125 μCi de (³H)acétyl-CoA (4.7 Ci/mmmole) dans un tampon HAT (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 5% glycérol, 1 mM dTT, 1 mM PMSF, 10 mM butyrate de sodium) à 30°C, 30 min. Les histones étaient ensuite séparées sur un gel d'acrylamide-SDS 18% qui était coloré pour s'assurer de la quantité égale d'histones dans chaque puit, décoloré et visualisé par fluorographie après traitement avec l'Enhance (DuPont NEN) et séchage.

2.5 Western blots

Le protocole de Western blot a déjà été décrit (Allard *et al.*, 1999). L'incubation avec l'anticorps était effectuée dans une solution PBS, 1 % lait écrémé et 0.1 % Tween-20. Les dilutions d'anticorps utilisées étaient les suivantes : anti-HA : 1/1000, anti-Esa1 : 1/3000, anti-Act3 : 1/1000, anti-Tra1 : 1/2000. La détection fut effectuée avec la trousse ECL (Pharmacia).

2.6 Séquençage des peptides par spectrométrie de masse

L'immunopurification du complexe NuA4 a été décrite précédemment (Galarneau *et al.*, 2000) et l'immunopurification de Piccolo NuA4 a été effectuée similairement. Les bandes ont été coupées et ont subi une réduction sur gel, une carboxyamidométhylation et une digestion tryptique (Promega). La spectrométrie de masse et le séquençage des peptides ont été effectués selon les protocoles déjà décrits (Eisen *et al.*, 2000).

2.7 Purifications du complexe NuA4

La préparation de l'extrait cellulaire à partir de 6 litres de culture à D.O.₆₀₀ 2.5 dans du milieu YPD et le fractionnement sur Ni²⁺-NTA agarose (Qiagen), Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) ont été effectués selon les protocoles décrits précédemment (Allard *et al.*, 1999; Côté *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1997). Les fractions de MonoQ contenant le pic d'activité sur H4/H2A ont été combinées et concentrées jusqu'à 300 µl avec une colonne Centricon (Amicon). L'échantillon concentré a été fractionné sur une colonne Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia) dans du tampon A (Côté *et al.*, 1994) plus 350 mM NaCl et 20 % glycérol. Les fractions de 500 µl ont été congelées dans l'azote liquide et entreposées à -80°C. 2 µl des fractions ont été utilisés pour les essais HAT et 10 µl des fractions ont été utilisés pour les Western blots. Une première purification a été faite avec la souche QY101 surexprimant HA-Ep11 et une deuxième a été faite avec QY109 qui exprimait HA-Ep11 à un taux physiologique.

2.8 Immunoprécipitations

Les sérums anti-Esa1 et pré-immun ont été purifiés partiellement avant d'être utilisés pour les immunoprécipitations (Allard *et al.*, 1999). Un aliquote de fraction Superose 6 était dilué dans le tampon B (40 mM Hepes, pH 7.5, 0.1 % Tween-20, 0.5 mM DTT, 10 % glycérol plus des inhibiteurs de protéase) pour obtenir une concentration finale de 150 mM NaCl et incubé avec la protéine A-sépharose. Le surnageant était ensuite incubé avec l'anticorps préalablement incubé avec la protéine A-sépharose dans du tampon B plus 150 mM NaCl. Cette incubation était effectuée à 4°C durant 15 h. Les billes étaient ensuite lavées 3 fois avec du tampon B plus 150 mM NaCl et resuspendues dans le même tampon. Les essais HAT étaient effectués directement sur des quantités équivalentes de billes resuspendues et de surnageant.

2.9 Délétion du gène EPL1 et dissection de tétrades

Le gène TRP1 a été amplifié en utilisant des amorces contenant des extrémités 3' complémentaires aux extrémités de TRP1 et des extrémités 5' complémentaires à des séquences en amont et en aval du gène EPL1. Les amorces suivantes ont été utilisées : 5'-ATAAAAACATTGTAATAACATTAGCAAATAACGATAATAACGATGGGAGAGGGC CAAGAGGGAG-3' et 5'-GCCAATGCGTAGAAAGATGTTTCGAGAGGTACAAAGTTGTGCTGCTCTTAAATA AATACTACTCAG-3'. Les séquences de EPL1 sont en italiques. Le produit de PCR a été transformé dans BMA41 α/α (Baudin *et al.*, 1993) et les transformants ont été sélectionnés sur milieu *trp*-. La délétion d'un des allèles de EPL1 a été investiguée par PCR et plusieurs clones positifs ont été isolés. La délétion a été vérifiée avec trois couples d'amorces différents situées en amont et en aval de EPL1 et dans le gène TRP1. La souche hétérozygote $\Delta epl1/EPL1$ a été nommée QY103. La sporulation a été induite en transférant des cellules fraîchement poussées en milieu YPD dans une solution 1% acétate de potassium en les incubant quelques jours à la température de la pièce. La dissection des tétrades a été effectuée selon les méthodes standards (Adams *et al.*, 1997).

Comme contrôle, la même expérience a été effectuée avec la souche QY103 préalablement transformée avec le plasmide pFEMEX

2.10 Tests de complémentation

La souche QY108 a été transformée avec les plasmides pBHE, pBFG1, pBNES, pBNEL et pBCE. Les transformants ont d'abord été sélectionnés sur milieu leu-/ura- et ont ensuite été striés sur milieu leu-/ura+. À partir d'une colonie obtenue sur milieu leu-/ura+, ils ont finalement été striés sur milieu 5'-FOA.

2.11 Mutagenèse de EPL1

La mutagenèse a été effectuée selon le protocole déjà décrit (Adams *et al.*, 1997). 10 µg du plasmide pPHEL a été incubé à 37°C dans 1M hydroxylamine 24 h. Le plasmide a ensuite été purifié et transformé dans la souche QY108. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu leu-/ura-. 6000 transformants ont été repiqués sur milieu leu-/ura-. Après croissance, les boîtes ont ensuite été répliquées sur milieu leu-/ura+. Après croissance, les boîtes ont finalement été répliquées sur milieu 5'-FOA. Après croissance sur 5'-FOA, les boîtes ont été répliquées en triplicata sur milieu leu-/ura+ et incubées à 15°C, 25°C et 37°C.

2.12 Northern blots

L'ARN total de levure a été isolé par la méthode hot phénol (Schmitt *et al.*, 1990). 20 µg d'ARN furent ensuite séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1 %, 6 % formaldéhyde, transférés par capillarité sur une membrane de nylon (Hybond, Amersham) et fixés aux UV. La membrane était ensuite hybridée avec les sondes marquées dans un tampon 0.5 M phosphate de sodium, pH 6.8, 7% SDS et 1 % BSA. Les sondes d'ADN utilisées étaient les ORF de PHO5, HIS4, TRP4 et ACT1 amplifiés par PCR avec les amorces obtenues de Research Genetics. Les sondes étaient marquées

au ^{32}P par random priming avec la trousse multiprime labeling kit (Amersham) en suivant les recommandations du fabricant.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1 EPL1 EST UNE SOUS-UNITÉ STABLE DU COMPLEXE NUA4.

3.1.1 Identification de la sous-unité de 105 kDa du complexe NuA4 par spectrométrie de masse.

Lors d'études ayant précédées les travaux présentés dans ce mémoire, le complexe histone acétyltransférase NuA4 a été purifié à partir d'un extrait de *S. cerevisiae* par chromatographie et immunoaffinité (Allard *et al.*, 1999). Ces travaux ont permis d'identifier 2 sous-unités de ce complexe, soit la sous-unité catalytique Esa1 et la protéine Tra1. De plus, ces travaux ont démontré que le complexe contenait plusieurs autres polypeptides non identifiés. Afin d'identifier ces sous-unités inconnues, une nouvelle immunopurification du complexe avec une quantité de matériel plus importante a été effectuée et les bandes correspondant aux sous-unités non identifiées ont été digérées à la trypsine et analysées par spectrométrie de masse en tandem. La figure 1A présente le complexe NuA4 immunopurifié séparé sur gel de polyacrylamide. Les analyses par spectrométrie de masse ont permis d'identifier 8 nouvelles sous-unités du complexe NuA4. Cependant, seule l'identification de la sous-unité Epl1 fait l'objet de ce mémoire.

Lorsque la sous-unité de NuA4 ayant poids moléculaire apparent de 105 kDa a été analysée par spectrométrie de masse, 33 peptides correspondant à la séquence du produit du gène EPL1 (YFL024C) ont été obtenus. Les peptides ainsi obtenus couvrent 46 % de la séquence protéique de Epl1 et sont dispersés sur toute la longueur de la protéine comme on peut le constater sur la figure 1B.

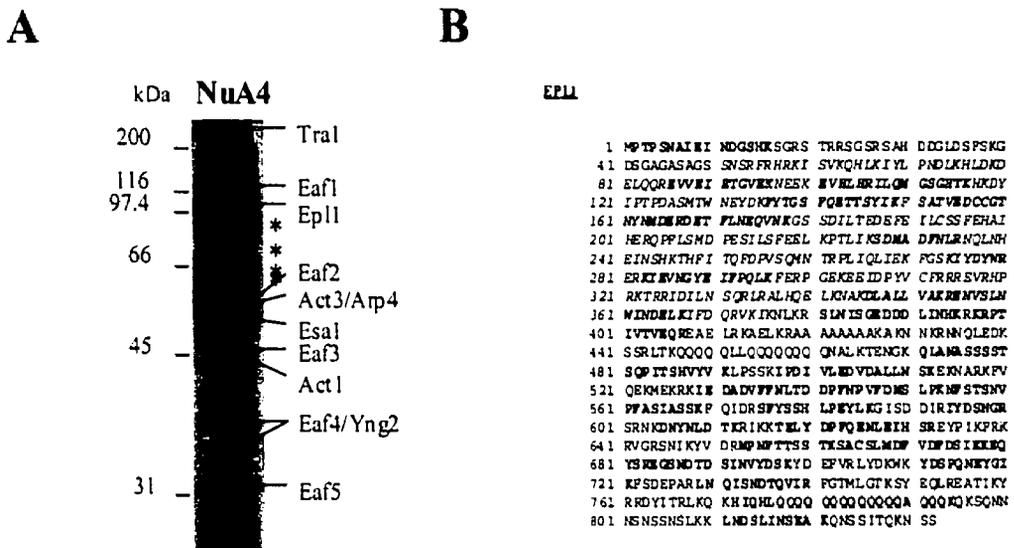


Figure 1. Epl1 est une sous-unité du complexe NuA4. (A) Migration sur gel de polyacrylamide coloré à l'argent du complexe NuA4 immunopurifié. Les bandes spécifiques correspondant aux sous-unités de NuA4 sont identifiées, les astérisques représentant les bandes non spécifiques. (B) Séquence peptidique de Epl1. Les séquences des peptides obtenus lors de l'analyse par spectrométrie de masse de la bande de 105 kDa de NuA4 sont indiquées en gras.

Le gène YFL024C code pour une protéine de 833 acides aminés lui prédisant un poids moléculaire de 96.7 kDa. Aucune fonction n'a encore été attribuée à cette protéine. Une homologie de séquence avec la protéine de *D. melanogaster* Enhancer of Polycomb (E(Pc)) lui a valu le nom de Epl1 pour Enhancer of Polycomb like 1 (Stankunas *et al.*, 1998). L'homologie avec E(Pc) est concentrée dans un domaine de 325 acides aminés appelé domaine EPcA situé dans la portion N-terminale de la protéine. En plus de ce domaine qui est 26% identique et 46% similaire, les deux homologues contiennent tous les deux des segments de répétition d'alanines et de glutamines. Un homologue humain de Epl1 appelé EPC a récemment été caractérisé (Shimono *et al.*, 2000). Une comparaison entre Epl1, Enhancer of Polycomb et EPC est illustrée à la figure 2.

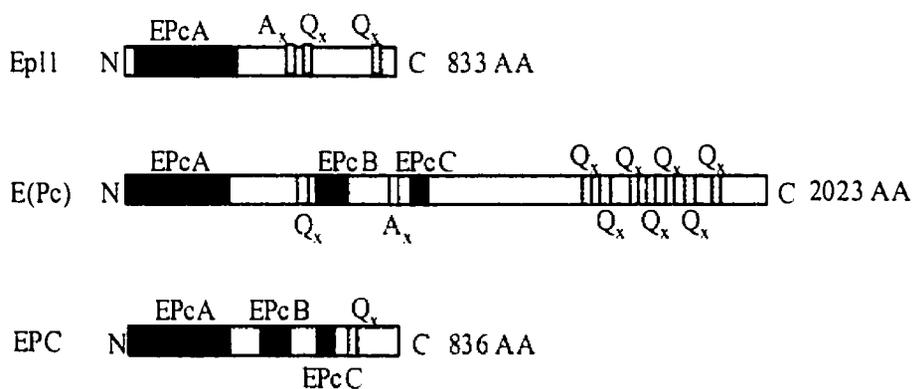


Figure 2. Comparaison des homologues de Epl1 chez la drosophile, E(Pc), et chez l'humain, EPC. Les régions d'homologie EPcA, EPcB et EPcC ainsi que les répétitions de glutamines (Q_x) et d'alanines (A_x) sont indiquées.

3.1.2 Purifications partielles du complexe NuA4 à partir de souches de *S. cerevesiae* exprimant HA-Epl1.

Afin de confirmer l'identification de Epl1 comme sous-unité de NuA4, des purifications partielles du complexe ont été effectuées avec des souches de *S. cerevesiae* exprimant Epl1 fusionnée à l'épitope HA. Étant donné qu'aucun anticorps dirigé contre Epl1 n'était disponible, l'utilisation d'une protéine de fusion HA-Epl1 était nécessaire pour visualiser la présence de Epl1 par Western blot. Les purifications partielles du complexe NuA4 ont été effectuées selon les trois étapes chromatographiques décrites précédemment (Allard *et al.*, 1999), soit fractionnements sur Ni²⁺-NTA agarose, MonoQ et Superose 6. Un schéma de la purification est illustré à la figure 3.

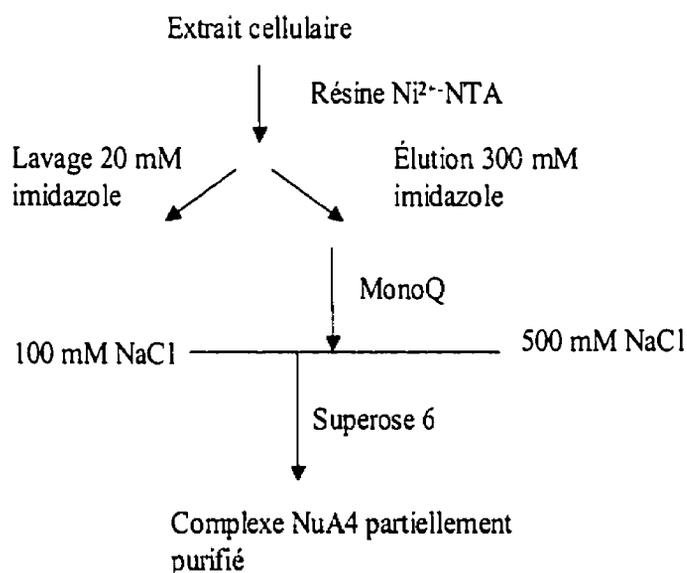


Figure 3. Schéma de la purification partielle du complexe NuA4 chez *S. cerevesiae*.

Une première purification partielle a d'abord été effectuée avec la souche QY101 portant un plasmide exprimant HA-Ep11 sous le contrôle du promoteur du gène PGK et contenant l'origine de réplication du plasmide de 2 μ m (plasmide pBHE). Étant donné que cette origine de réplication résulte en la présence de 20 à 50 copies du plasmide par cellule et étant donné l'utilisation d'un promoteur fort comme le promoteur PGK, la protéine HA-Ep11 était ainsi surexprimée dans cette souche. Lorsque des Western blots ont été effectués sur les fractions recueillies lors de la troisième étape chromatographique de cette purification (Superose 6), le Western anti-HA a démontré que la protéine Ep11 coélue avec 2 autres sous-unités du complexe NuA4, soit Esa1 et Act3. Ce résultat supportant l'identification de Ep11 comme sous-unité de NuA4 fut publié avec les résultats de spectrométrie de masse dans l'article retrouvé à l'annexe A (Galarneau *et al.*, 2000).

Lorsque des Western blots anti-HA ont été effectués sur les fractions recueillies lors de la deuxième étape chromatographique de cette purification (MonoQ), une quantité importante de Ep11 était visible dans toutes les fractions étudiées, possiblement dû à la surexpression de HA-Ep11 (résultat non présenté). Des essais d'immunoprécipitation avec l'anti-HA ont été effectués sur une fraction contenant NuA4 recueillie lors du fractionnement sur Superose 6 (3^e étape chromatographique) dans le but d'immunoprécipiter le complexe. Il a été impossible d'immunoprécipiter l'activité HAT de NuA4 avec l'anti-HA (résultat non présenté). L'hypothèse selon laquelle la surexpression de Ep11 était responsable de ce résultat négatif suggérait qu'il était préférable de refaire une nouvelle purification avec une souche exprimant HA-Ep11 à un niveau physiologique.

Une deuxième purification a donc été effectuée avec la souche QY109 exprimant HA-Ep11 à un taux physiologique. Cette souche haploïde $\Delta ep11$ est complétée (voir section 3.2) avec un plasmide exprimant HA-Ep11 sous le contrôle de son propre promoteur et contenant les séquences ARS/CEN permettant d'avoir une seule copie du plasmide par cellule (plasmide pPHEL). La vérification de l'expression de HA-Ep11 sous le contrôle de son propre promoteur a permis de démontrer que le promoteur du gène

EPL1 est un promoteur fort et que son niveau d'expression est similaire à celui du promoteur PGK (résultat non présenté). On peut donc supposer que la surexpression de HA-Epl1 lors de la première purification était exclusivement due à l'utilisation d'un plasmide avec une origine de répllication multicopie. Il a également été possible de déterminer le pourcentage de Epl1 cellulaire dans le complexe NuA4 à l'aide de cette souche. Il a déjà été déterminé que presque 100 % de Esa1 se fixe à la résine nickel et que quasiment toute la protéine Esa1 cellulaire est retrouvée dans le complexe NuA4 (Allard *et al.*, 1999). Donc, en mesurant le pourcentage de HA-Epl1 liée à la résine nickel, il était possible d'estimer la proportion de Epl1 cellulaire dans NuA4. Il a été déterminé qu'une faible proportion de Epl1 cellulaire était présente dans NuA4 (résultat non présenté).

Les essais HAT et les Western blots effectués sur les fractions recueillies lors de la deuxième étape chromatographique (MonoQ) de cette seconde purification sont présentés à la figure 4. Les essais HAT permettent de distinguer 4 différents complexes histone acétyltransférase présents chez la levure. Le pic d'activité sur l'histone H3 à la fraction 20 est dû au complexe ADA, le pic d'activité sur H3 aux fractions 32-34 est dû au complexe NuA3, le pic d'activité sur H3 à la fraction 38 est dû au complexe SAGA et le pic d'activité sur H4 et H2A aux fractions 20-24 est dû au complexe NuA4. Bien que l'activité sur H4 soit étalée entre les fractions 20 à 34, l'activité sur H2A concentrée dans les fractions 20 à 24 permet de bien situer le pic du complexe NuA4. De plus, les Western blots permettant de détecter la présence de trois sous-unités du complexe NuA4, soit Esa1, Act3 et Tra1, démontrent que NuA4 est concentré dans les fractions 20 à 24. Le Western blot avec l'anti-HA effectué sur les fractions de MonoQ démontre que Epl1 coélue avec l'activité HAT sur H4/H2A ainsi qu'avec les 3 sous-unités de NuA4 investiguées. Ce résultat supporte une fois de plus la présence de Epl1 dans NuA4 et confirme que le résultat obtenu lors de la première purification (Epl1 présente dans toutes les fractions de MonoQ étudiées) était bel et bien dû à la surexpression de Epl1.

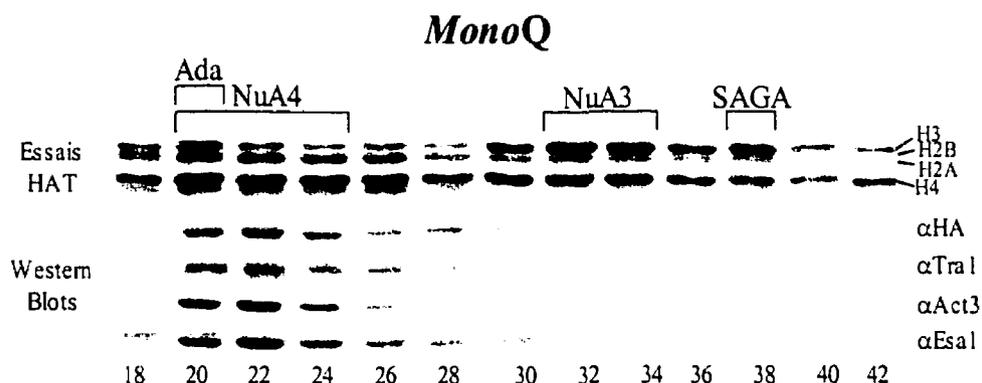


Figure 4. Epl1 coélue avec l'activité HAT sur H4/H2A et avec 3 autres sous-unités de NuA4 lors de la seconde étape de la purification partielle du complexe. La portion retenue par la résine Ni²⁺-NTA d'un extrait protéique de la souche exprimant HA-Epl1 à un niveau physiologique a été fractionnée sur une résine échangeuse d'anions MonoQ. Les fractions recueillies lors de cette seconde étape chromatographique ont été analysées par essais HAT sur nucléosomes et par Western blots.

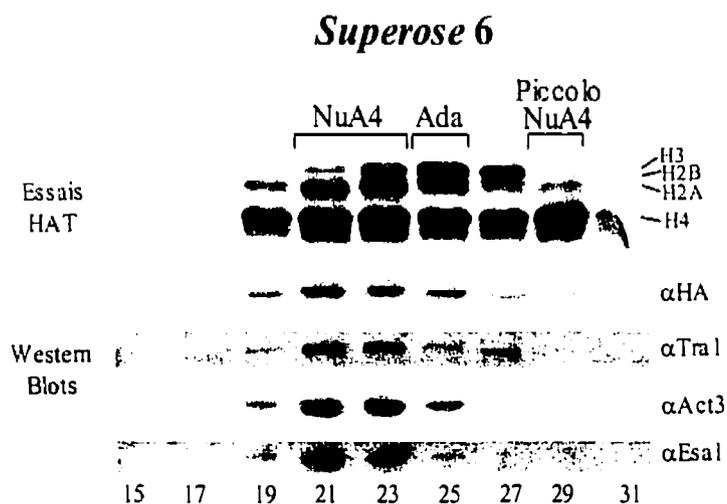


Figure 5. Epl1 coélue avec l'activité HAT sur H4/H2A et avec 3 autres sous-unités de NuA4 lors de la troisième étape de la purification du complexe. Les fractions obtenues lors de la seconde étape chromatographique contenant NuA4 ont été concentrées et déposées sur une colonne de filtration sur gel Superose 6. Les fractions recueillies lors de ce tamisage moléculaire ont été analysées par essais HAT sur nucléosomes et par Western blots.

Suite aux résultats obtenus avec la chromatographie sur résine échangeuse d'ions (MonoQ), les fractions recueillies lors de cette étape qui contenaient le complexe NuA4 (fractions 19 à 26) ont été combinées et concentrées pour subir un tamisage moléculaire sur résine Superose 6. Des essais HAT et des Western blots ont été effectués sur les fractions recueillies lors cette étape chromatographique et sont présentés à la figure 5. Étant donné que les fractions combinées contenaient à la fois les complexes NuA4 et ADA, les essais HAT permettent d'observer la séparation de ces deux complexes par tamisage moléculaire. Le complexe NuA4 de 1.3 MDa sort aux fractions 21-23 (pic d'activité sur H4/H2A), alors que le complexe ADA de 0.8 MDa sort à la fraction 25 (pic d'activité sur H3). La troisième étape chromatographique permet également d'identifier un autre complexe avec une activité sur l'histone H4 visible dans la fraction 29. Ce complexe ayant un poids moléculaire apparent de 350 kDa est appelé Piccolo NuA4. Les propriétés probablement similaires de liaison à la résine échangeuse d'ions utilisée lors de la deuxième étape chromatographique sont sans doute responsables du fait qu'il est impossible de distinguer les complexes NuA4 et Piccolo NuA4 lors de cette étape de la purification. La composition de ce complexe sera discutée plus en détails dans la section 3.4. Le Western blot effectué avec l'anti-HA permet de démontrer que Epl1 coélué encore avec l'activité sur H4/H2A et avec les 3 sous-unités de NuA4 investiguées lors de la troisième étape chromatographique de la purification. Ce résultat supporte une fois de plus le fait que Epl1 est une sous-unité du complexe NuA4.

3.1.3 Immunoprécipitation du complexe NuA4 avec un anticorps reconnaissant HA-Ep11.

Dans le but d'investiguer la stabilité de l'association entre Ep11 et les autres composantes du complexe NuA4, des expériences d'immunoprécipitation ont été effectuées. Afin d'avoir un matériel de départ le plus pur possible, les expériences ont été effectuées avec la fraction 21 recueillie lors du tamisage moléculaire (3^e étape chromatographique) de la purification à partir de la souche exprimant HA-Ep11 à un niveau physiologique. L'anticorps monoclonal anti-HA a été utilisé dans le but d'immunoprécipiter HA-Ep11 et l'anticorps monoclonal anti-myc fut utilisé comme contrôle négatif. L'anticorps polyclonal dirigé contre la sous-unité catalytique de NuA4, Esa1, a également été utilisé en utilisant son sérum pré-immun comme contrôle négatif.

Les Western blots présentés à la figure 6A démontrent que l'anti-HA immunoprécipite 3 sous-unités de NuA4, soit Esa1, Act3 et Tra1. En effet, ces trois protéines sont visibles sur les billes (colonne 3) et totalement absentes du surnageant (colonne 2) dans le cas de l'immunoprécipitation avec l'anti-HA. Par contre, aucune de ces trois protéines ne sont détectées sur les billes (colonne 5) lors de l'immunoprécipitation avec l'anti-myc, les trois protéines étant exclusivement détectées dans le surnageant (colonne 4). La figure 6B démontre que l'anti-Esa1 permet d'immunoprécipiter HA-Ep11. Le Western blot illustre bien que HA-Ep11 est présente sur les billes dans le cas de l'immunoprécipitation avec l'anti-Esa1 (puits 1 et 2), alors que HA-Ep11 est plutôt présente dans le surnageant lorsque le sérum pré-immun est utilisé (puits 3 et 4). Des essais HAT effectués sur les surnageants des quatre différentes immunoprécipitations sont montrés à la figure 6C. On peut remarquer une forte déplétion de l'activité sur H4/H2A par l'anti-HA et l'anti-Esa1 (puits 2 et 4). Aucune déplétion n'est observée lorsque l'anti-myc ou le sérum pré-immun sont utilisés (puits 3 et 5). Ces différents résultats démontrent clairement que Ep11 est associée de façon stable aux autres composantes du complexe NuA4.

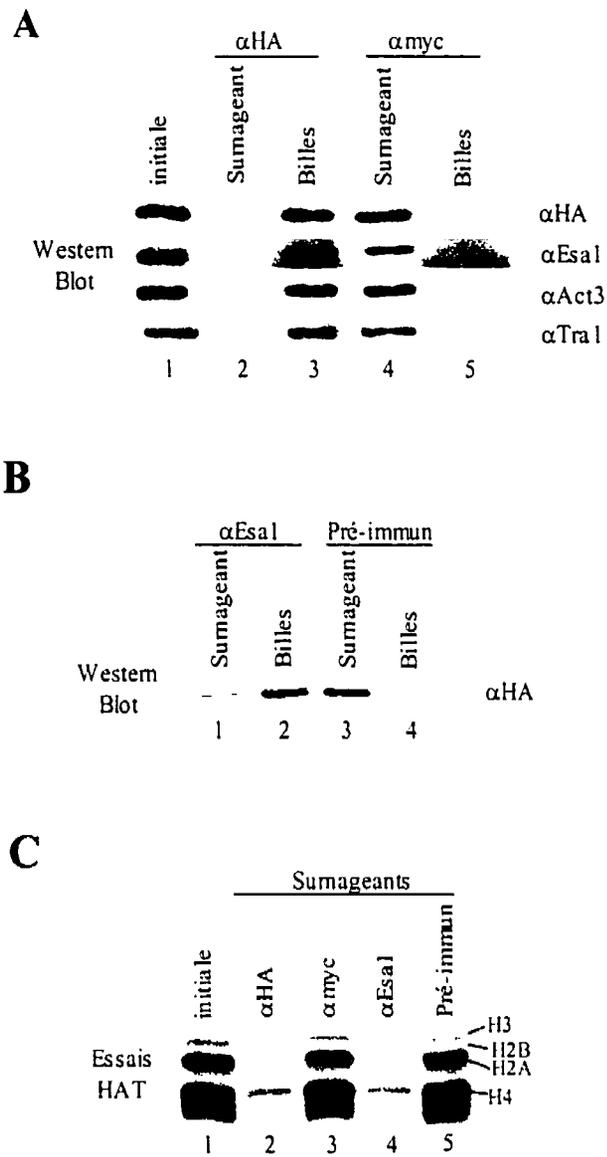


Figure 6. Epl1 est associée de façon stable aux autres composants du complexe NuA4. (A) HA-Epl1, Esal, Act3 et Tral sont co-immunoprécipitées par l'anti-HA. (B) HA-Epl1 est immunoprécipitée par l'anti-Esal. (C) Déplétion de l'activité HAT de NuA4 par l'anti-HA reconnaissant HA-Epl1.

3.2 L'EXTRÉMITÉ N-TERMINALE DE EPL1 EST ESSENTIELLE À LA CROISSANCE CELLULAIRE.

3.2.1 Délétion du gène EPL1 par recombinaison homologue chez *S. cerevisiae*.

Les premières sous-unités du complexe NuA4 identifiées, Esa1 et Tra1, sont des protéines essentielles à la croissance cellulaire chez la levure (Clarke *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1998). La délétion du gène EPL1 a été effectuée chez *S. cerevisiae* dans le but de déterminer si la sous-unité de NuA4 nouvellement identifiée était elle aussi essentielle à la croissance cellulaire. La figure 7 illustre la méthodologie employée pour déterminer si un gène est essentiel chez la levure. Sommairement, un seul des deux allèles du gène est délété dans une cellule diploïde par recombinaison homologue. La sporulation de cette cellule hétérozygote pour le gène d'intérêt est induite afin d'obtenir une tétrade contenant quatre spores, dont deux contiennent un allèle sauvage et deux sont dépourvues du gène. La tétrade est ensuite disséquée à l'aide d'un micromanipulateur afin de séparer les quatre spores. Après croissance de ces spores, il suffit de vérifier le nombre de spores viables produites par tétrade pour déterminer si le gène est essentiel ou non. Si les quatre spores produites par une tétrade sont viables, le gène n'est pas essentiel, et si seulement deux spores sur quatre sont viables, le gène est essentiel.

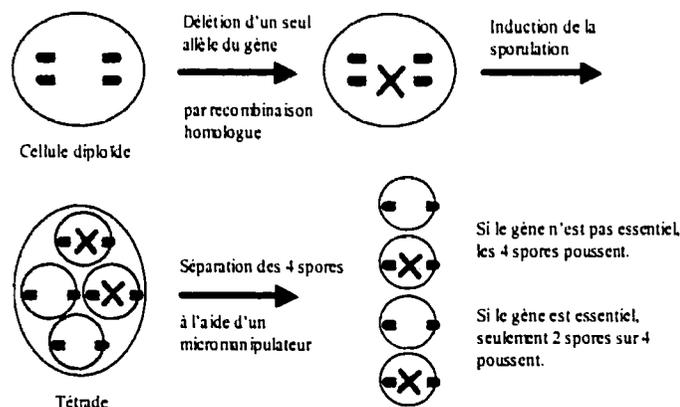


Figure 7. Méthodologie employée pour déterminer si un gène est essentiel à la croissance cellulaire chez *S. cerevisiae*.

La délétion du gène EPL1 chez *S. cerevisiae* a permis de démontrer que ce gène est essentiel à la croissance cellulaire. On peut voir sur la figure 8 la croissance des spores de quatre tétrades obtenues par sporulation de la souche QY103 ($\Delta epl1/EPL1$) (colonnes 1 à 4). Étant donné que seules deux spores sur quatre ont poussé, on peut conclure que le gène est indispensable à la croissance cellulaire. Afin de s'assurer que l'effet observé était spécifiquement dû à la délétion du gène EPL1, la même expérience a été faite en utilisant la souche QY103, mais portant également un plasmide exprimant la protéine Epl1 (plasmide pFEMEX). L'expression épisomale de Epl1 a permis la croissance des quatre spores disséquées à partir de cette souche (colonne 5), confirmant que le résultat obtenu précédemment était véritablement dû à la délétion de EPL1. L'observation au microscope des endroits où avaient été déposées les spores n'ayant pas poussé a permis de constater que les spores $\Delta epl1$ arrêtaient de croître au stade de quatre cellules (résultat non présenté). Ces résultats ont été publiés dans l'article présenté à l'annexe A (Galameau *et al.*, 2000).

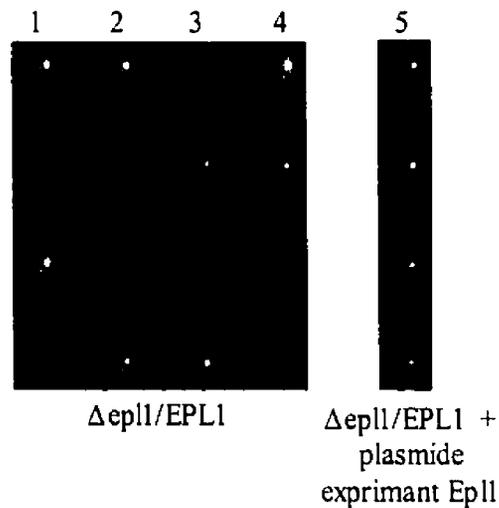


Figure 8. Epl1 est un gène essentiel à la croissance cellulaire chez la levure. Croissance des spores disséquées de quatre tétrades obtenues par sporulation de la souche hétérozygote $\Delta epl1/EPL1$ (1 à 4) et d'une tétrade obtenue par sporulation de la souche hétérozygote $\Delta epl1/EPL1$ complémentée avec un plasmide exprimant Epl1 (5).

3.2.2 Tests de complémentation de la souche Δ epl1 par l'expression de protéines Epl1 partielles .

Étant donné la taille relativement grande de la protéine Epl1 (833 acides aminés), des tests de complémentation ont été effectués avec des protéines Epl1 partielles dans le but de vérifier si la séquence entière de la protéine est essentielle à la croissance cellulaire. La méthodologie utilisée est illustrée à la figure 9. Brièvement, la souche QY108 (haploïde Δ epl1 complétementée avec un plasmide URA3 exprimant Epl1 entière (plasmide pPHEU)) est transformée avec un plasmide LEU2 exprimant une protéine Epl1 tronquée. La souche contenant les deux plasmides est ensuite étalée sur un milieu contenant du 5'-FOA. Ce produit qui est transformé en un dérivé toxique par l'enzyme Ura3 provoque l'expulsion du plasmide URA3. Par conséquent, l'étalement de la souche sur 5'-FOA fera en sorte que la cellule ne conserve que le plasmide LEU2 exprimant la protéine Epl1 tronquée. Si l'expression de cette protéine partielle est suffisante pour complémer la délétion de EPL1, la souche poussera sur 5'-FOA, sinon aucune croissance ne sera détectée.

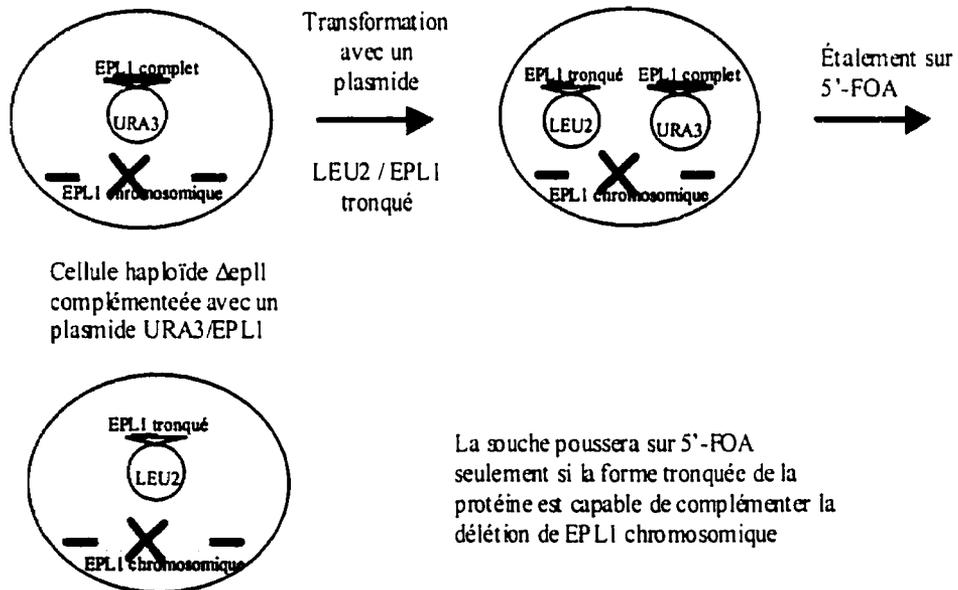


Figure 9. Méthodologie employée pour déterminer si l'expression d'une protéine partielle peut complémer la délétion du gène essentiel codant pour cette protéine chez *S. cerevisiae*.

Les trois versions de Epl1 tronquée qui ont été testées avec cette méthode sont représentées à la figure 10. La première protéine partielle appelée Epl1₁₋₃₈₀ constituée des 380 premiers acides aminés N-terminaux contient le domaine d'homologie EPcA et ne contient pas les répétitions d'alanines et de glutamines. La seconde protéine partielle appelée Epl1₁₋₄₈₅ constituée des 485 premiers acides aminés N-terminaux contient le domaine EPcA ainsi que la répétition d'alanines et la première répétition de glutamines. La troisième protéine partielle appelée Epl1₄₈₆₋₈₃₃ est constituée des 348 derniers acides aminés C-terminaux et contient la répétition de glutamines présente à l'extrémité C-terminale. Il est important de mentionner que les plasmides utilisés pour exprimer ces protéines portaient une origine de répllication multicopie. Par conséquent, ces protéines partielles étaient surexprimées.

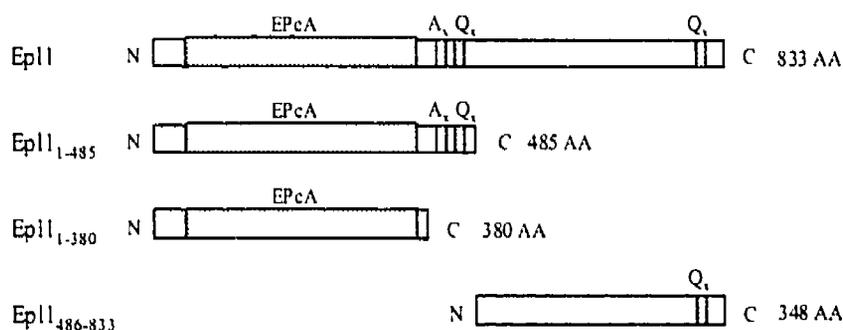


Figure 10. Représentation schématique des trois différentes portions de Epl1 testées pour la complémentation.

Lorsque ces trois protéines partielles ont été testées pour leur capacité de compléter la délétion de EPL1, les protéines partielles Epl1₁₋₃₈₀ et Epl1₁₋₄₈₅ ont permis la croissance sur 5'-FOA, alors que la version Epl1₄₈₆₋₈₃₃ n'a pas permis à la cellule de croître sur 5'-FOA. On peut voir à la figure 11, l'étalement sur 5'-FOA des souches exprimant les différentes versions de Epl1 tronquée. La production des protéines partielles a été vérifiée par Western blot avec l'anti-HA étant donné que les protéines partielles portaient un épitope HA en N-terminal (résultat non présenté). Les résultats obtenus démontrent donc que les 453 derniers acides aminés C-terminaux de Epl1 ne sont pas essentiels à la croissance cellulaire et, par conséquent, que seule la portion N-terminale de Epl1 est essentielle à la survie de la cellule. Cependant, en comparant la grosseur des colonies obtenues avec Epl1₁₋₃₈₀, Epl1₁₋₄₈₅ et Epl1 WT, on peut constater que les souches exprimant seulement Epl1₁₋₃₈₀ ou Epl1₁₋₄₈₅ poussent moins vite que la souche contenant Epl1 WT.

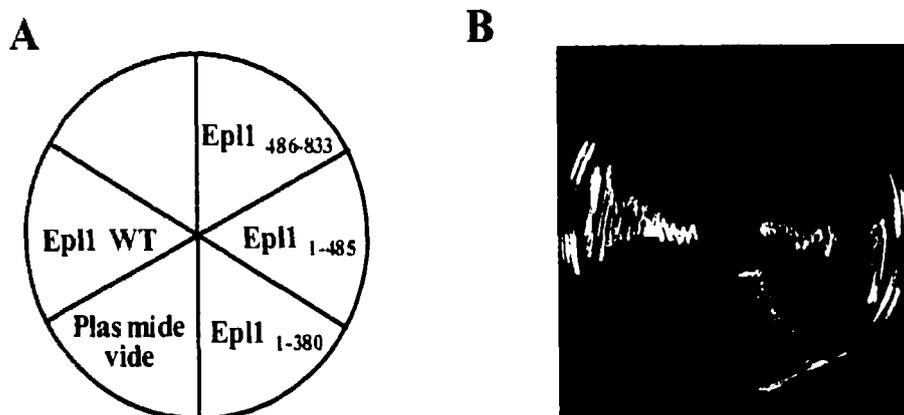


Figure 11. Seule la portion N-terminale de Epl1 est essentielle à la croissance cellulaire. (B) Croissance sur 5'-FOA des cellules haploïdes $\Delta epl1$ contenant le plasmide URA3/EPL1 ainsi que le plasmide LEU2 indiqué en (A).

3.3 L'EXPRESSION DE CERTAINS GÈNES SPÉCIFIQUES REQUIERT EPL1.

3.3.1 Production et analyses préliminaires de mutants *epl1*.

Étant donné qu'il a été déterminé que EPL1 est essentiel à la croissance cellulaire, il était nécessaire de créer des mutants *epl1* conditionnels pour investiguer le rôle de la protéine Epl1 dans le complexe NuA4. De tels mutants étaient également requis pour entreprendre des études sur le rôle de Epl1 dans la transcription. Les mutants les plus appropriés pour ce genre d'études sont les mutants thermosensibles (ts). La méthodologie employée pour obtenir de tels mutants consiste à utiliser la mutagenèse aléatoire pour obtenir une banque de mutants et à cribler cette banque pour le phénotype désiré, soit une souche poussant à 25°C et incapable de croître à 37°C. La méthodologie qui fut employée est schématisée à la figure 12. Le plasmide LEU2/EPL1 (plasmide pPHEL : HA-Epl1 sous contrôle de son propre promoteur, ARS/CEN) a été mutagénéisé par une incubation en présence d'hydroxylamine. Ce produit provoque la formation de N⁴-hydroxycytosine qui peut s'apparier avec une adénosine, résultant en des transitions C à T et G à A. Le plasmide ainsi traité fut transformé dans la souche QY108 (haploïde $\Delta epl1$ complémentée avec un plasmide URA3/EPL1 WT). 6000 clones contenant à la fois le plasmide URA3/EPL1 WT et un plasmide LEU2/*epl1* mutant ont été repiqués sur 5'-FOA. Après croissance sur 5'-FOA, les 6000 clones contenant seulement un plasmide LEU2/*epl1* mutant ont été testés pour les phénotypes thermosensible à 37°C et sensible au froid à 15°C.

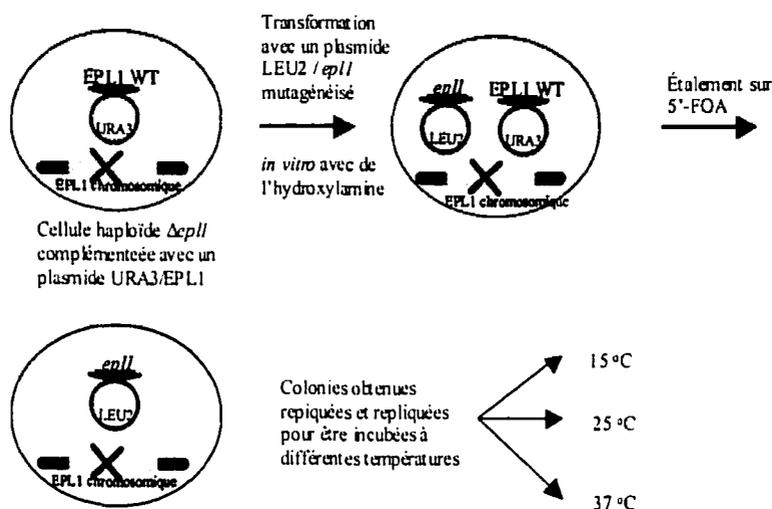


Figure 12. Méthodologie employée pour créer des mutants *epII*.

Aucun des 6000 clones testés n'était thermosensible ou sensible au froid. Cependant, deux mutants avec une croissance plus lente ont été trouvés. Des courbes de croissance de ces deux mutants ont été effectuées en milieu minimum afin de quantifier l'augmentation de la durée de leur temps de génération. Le temps de génération du mutant nommé *epII-15* est de 3.2 heures, celui du mutant nommé *epII-32* est de 3.0 heures, alors que le temps de génération du type sauvage correspondant est de 2.3 heures. Les temps de génération des mutants *epII-15* et *epII-32* sont donc respectivement 40% et 30% plus élevés que le temps de génération du type sauvage.

Les deux gènes *epII* mutants ont ensuite été séquencés afin de déterminer la nature des mutations causant le défaut de croissance. Le gène *epII-15* contient une seule mutation, soit une transition où un C a été remplacé par un T à la 536^e paire de bases. Cette mutation fait en sorte que le 84^e codon correspondant à une glutamine dans le gène sauvage est remplacé par un codon STOP (TAG). Le gène *epII-32* contient lui aussi une seule mutation, soit une transition où un C a été changé pour un T à la 466^e paire de bases. Cette mutation génère également un codon STOP (TGA) au 58^e codon qui correspond à une arginine dans le gène sauvage. Les caractéristiques des deux mutants *epII* sont résumées au tableau 3.

Tableau 3. Caractéristiques des mutants *ep11*.

Mutant	Augmentation du temps de génération	Mutation
<i>Epl1-15</i>	40 %	Gln84→ STOP
<i>Epl1-32</i>	30 %	Arg58→ STOP

Les résultats de séquençage prédisaient donc l'expression d'une petite portion de l'extrémité N-terminale de *Epl1* dans les deux mutants. Les tailles théoriques de ces deux protéines mutantes prédites par la séquence sont de 10 et 7 kDa respectivement pour *ep11-15* et *ep11-32*. Des extractions protéiques des deux souches mutantes ont été effectuées afin de vérifier l'expression des formes tronquées de *Epl1* dans les deux mutants. Étant donné que la mutagenèse avait été effectuée sur un plasmide exprimant HA-*Epl1* dont l'épitope HA est situé à l'extrémité N-terminale de la protéine, il était possible de vérifier par Western blot l'expression des protéines mutantes portant une délétion C-terminale. Le Western blot effectué avec l'anti-HA présenté à la figure 13 démontre clairement la production des fragments de tailles attendues dans les deux mutants. Cependant, le Western blot démontre également une faible production de la protéine *Epl1* entière par les deux mutants. Il n'a pas été possible de déterminer la cause de cette production de *Epl1* entière chez les mutants. Une explication possible serait la présence d'ARNt suppresseurs dans la souche de *S. cerevisiae* utilisée reconnaissant les codons STOP introduits à l'intérieur de la séquence des gènes *ep11* mutants. Ces ARNt suppresseurs pourraient permettre une faible expression de la protéine *Epl1* complète à partir des gènes *ep11* mutants. En tenant compte de ce résultat, il est impossible de déterminer si le défaut de croissance observé chez les deux mutants est dû à la diminution de la quantité de *Epl1* dans la cellule et/ou à la production d'une forme de *Epl1* tronquée. Il est donc important de prendre en considération que les effets mesurés chez ces mutants peuvent être dus à ces deux différents facteurs.

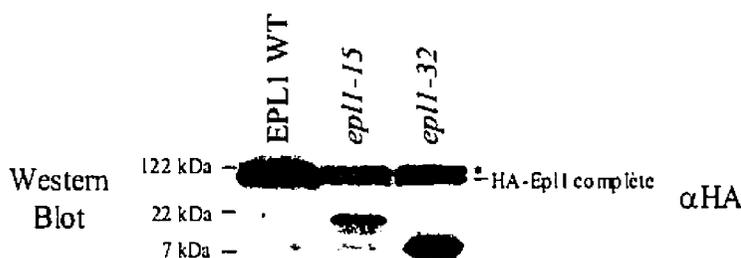


Figure 13. Les mutants *epl1* expriment des courts fragments N-terminaux de Epl1 et une faible proportion de la protéine Epl1 complète. Des Western blots ont été effectués avec l'anti-HA sur des extraits protéiques préparés à partir des trois différentes souches après migration sur des gels de polyacrylamide 18 % et 8 %. L'astérisque représente une protéine non spécifique réagissant avec l'anti-HA.

3.3.2 Caractérisation de l'effet des mutations dans EPL1 sur la transcription de certains gènes spécifiques *in vivo*.

Étant donné qu'il a été récemment démontré que des mutations dans trois sous-unités différentes du complexe NuA4 affectaient la transcription de gènes spécifiques *in vivo* (Eisen *et al.*, 2000; Galarnau *et al.*, 2000), l'effet des mutations dans EPL1 sur la transcription de ces gènes a été investigué. Des analyses de type Northern blot ont été effectuées sur des préparations d'ARN des deux mutants ainsi que du type sauvage correspondant à partir de cultures en milieu riche (YPD) et la transcription des gènes ACT1, HIS4, PHO5 et TRP4 a été investiguée.

La figure 14A démontre que la transcription des trois gènes étudiés est diminuée dans les deux mutants *epl1*. En effet, on observe une baisse importante de la quantité d'ARNm de HIS4, PHO5 et TRP4 dans les deux mutants *epl1* par rapport au type sauvage. La sonde ACT1 utilisée comme contrôle démontre bien qu'une quantité équivalente d'ARN a été déposée dans les trois puits. Les ARNm ont été quantifiées avec un appareil PhosphorImager en corrigeant avec la quantité d'ARNm d'ACT1. Les pourcentages d'ARNm dans les mutants par rapport au WT sont présentés à la figure 14B.

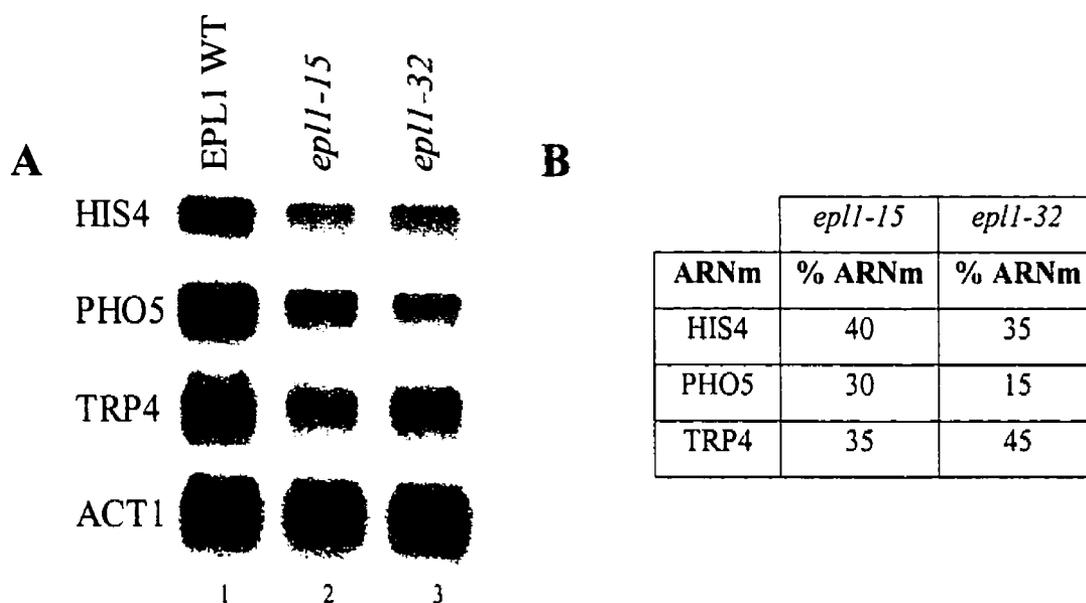


Figure 14. La transcription de certains gènes spécifiques est diminuée chez les deux mutants *epl1*. (A) L'ARN total des souches EPL1 WT, *epl1-15* et *epl1-32* poussées en milieu riche (YPD) a été extrait et une analyse de type Northern blot a été effectuée en utilisant les sondes d'ADN spécifiques aux gènes indiqués. (B) Le pourcentage d'ARNm dans les mutants par rapport au WT a été calculé en quantifiant et en corrigeant avec la quantité d'ARNm d'ACT1.

3.4 LE COMPLEXE PICCOLO NUA4 CONTIENT L'EXTRÉMITÉ N-TERMINALE DE EPL1.

3.4.1 Identification d'une nouvelle sous-unité du complexe Piccolo NuA4 par spectrométrie de masse.

La troisième étape chromatographique de la purification partielle du complexe NuA4 permet de mettre en évidence un nouveau complexe histone acétyltransférase appelé Piccolo NuA4 (voir section 3.1.2). Ce complexe de 350 kDa a été caractérisé dans le laboratoire et il a été démontré que sa sous-unité catalytique est Esa1 (J. Savard, communication personnelle). Sa petite taille et le fait qu'il partage la sous-unité catalytique de NuA4 lui ont valu le nom de Piccolo NuA4. De plus, il a été démontré que Piccolo NuA4, contrairement à NuA4, est incapable d'acétyler les histones libres (J. Savard, communication personnelle). Il s'agit donc du premier complexe connu à ce jour possédant une activité histone acétyltransférase spécifique à la chromatine. L'activité spécifique de Piccolo NuA4 est beaucoup plus grande que celle de NuA4, de sorte qu'il n'est pas possible de détecter la présence de Esa1 par Western blot dans les fractions de Superose 6 alors que l'activité détectée par essais HAT est très forte (voir figure 5).

Une immunopurification de ce complexe a été réalisée avec l'anti-Esa1 afin d'étudier sa composition en sous-unités. Une migration sur gel de polyacrylamide du complexe Piccolo NuA4 immunopurifié est présentée à la figure 15A. Seulement deux bandes spécifiques sont distinguables sur le gel. Lorsque la sous-unité de Piccolo NuA4 de poids moléculaire apparent de 60 kDa a été analysée par spectrométrie de masse, 29 peptides correspondant à la séquence protéique de Epl1 ont été obtenus. Cependant, on peut observer à la figure 15B que tous les peptides obtenus sont situés dans la portion N-terminale de la protéine. Le fait que la sous-unité analysée a un poids moléculaire apparent de 60 kDa et que tous les peptides obtenus se retrouvent dans la portion N-terminale de Epl1 suggère l'hypothèse selon laquelle la sous-unité de 60 kDa de Piccolo NuA4 serait une version tronquée de Epl1 constituée d'une portion N-terminale de la protéine.

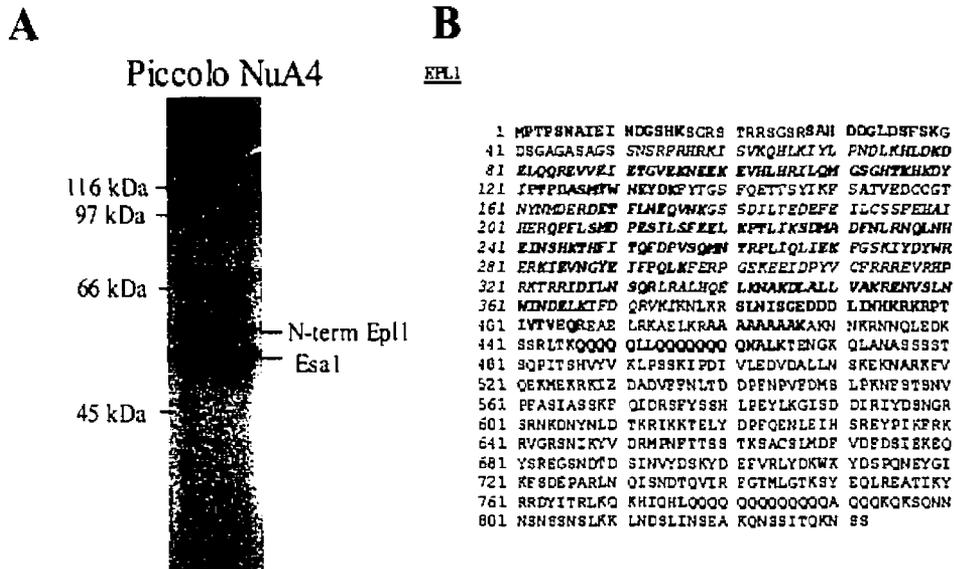


Figure 15. La sous-unité de 60 kDa du complexe Piccolo NuA4 est une portion de l'extrémité N-terminale de Epl1. (A) Migration sur gel de polyacrylamide colorée au bleu de Coomassie du complexe Piccolo NuA4 immunopurifié. Les deux bandes spécifiques sont identifiées. (B) Séquence peptidique de Epl1. Les séquences obtenues lors de l'analyse par spectrométrie de masse de la bande de 60 kDa de Piccolo NuA4 sont indiquées en gras.

3.4.2 Visualisation de la forme de Epl1 tronquée dans Piccolo NuA4 par Western blot.

Afin de vérifier cette hypothèse, des Western blots ont été effectués sur les fractions recueillies lors du tamisage moléculaire (3^e étape chromatographique) des deux différentes purifications de NuA4 avec les 2 différentes souches exprimant HA-Epl1. Puisque l'épitope HA est fusionné à l'extrémité N-terminale de Epl1, le Western blot devait révéler la présence de la forme tronquée de Epl1. Un Western blot anti-HA avait déjà été effectué sur ces fractions, cependant la portion de la membrane contenant les protéines de poids moléculaire entre 30 et 80 kDa avait été hybridée exclusivement avec l'anti-Esal et l'anti-Act3. Le Western blot anti-HA révéla effectivement la présence d'une forme plus courte de Epl1 concentrée autour de la fraction 29 dont le poids moléculaire se situe entre 50 et 60 kDa. On peut voir à la figure 16A les deux bandes obtenues avec le Western blot anti-HA effectué sur les fractions Superose 6 de la

purification de NuA4 avec la souche HA-Epl1 surexprimée (souche QY101). On observe le pic de Epl1 entière aux fractions 21-23 qui correspond au pic de NuA4 et le pic de la portion N-terminale à la fraction 29 qui correspond au pic de Piccolo NuA4.

3.4.3 Immunoprécipitation du complexe Piccolo NuA4 avec un anticorps reconnaissant HA-Epl1.

Des expériences d'immunoprécipitation ont été effectuées afin d'investiguer la stabilité de l'association entre la protéine Epl1 partielle et les autres composantes de Piccolo NuA4. Les expériences d'immunoprécipitation ont été effectuées sur la fraction 29 de la purification de NuA4 présentée à la figure 5. La figure 16B illustre les résultats obtenus. On observe une forte déplétion de l'activité HAT de Piccolo NuA4 avec les anti-HA et anti-Esa1 (puits 2 et 4), alors qu'aucune déplétion n'est visualisée avec l'anti-myc et le sérum pré-immun (puits 3 et 5). De plus, on retrouve une bonne partie de l'activité HAT sur les billes avec l'anti-HA et l'anti-Esa1 (puits 6 et 8), alors qu'aucune activité n'est détectée sur les billes avec l'anti-myc ou le sérum pré-immun (puits 7 et 9). Ces résultats démontrent clairement la stabilité de l'association entre la forme tronquée de Epl1 et le complexe Piccolo NuA4.

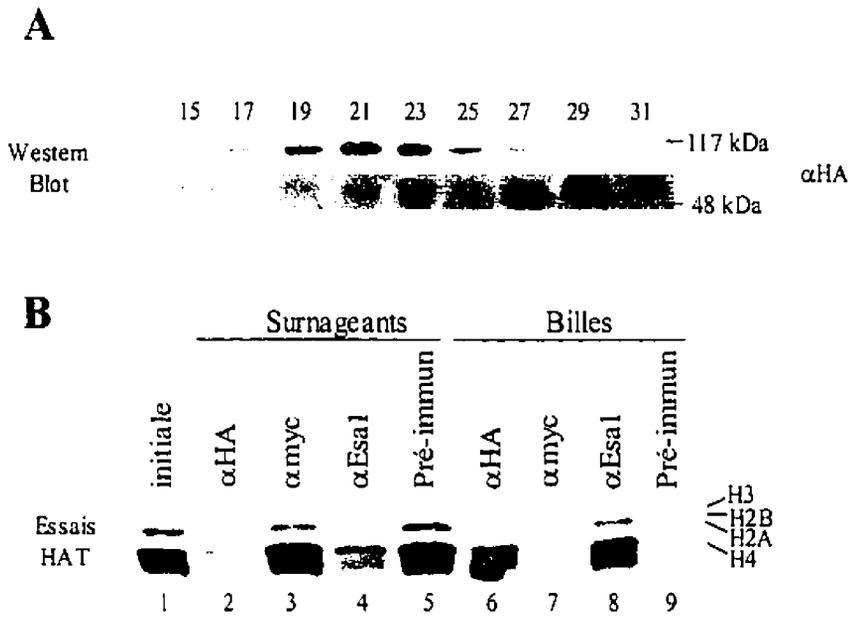


Figure 16. La portion N-terminale de Epl1 est une sous-unité stable du complexe Piccolo NuA4. **(A)** Un Western blot anti-HA a été effectué sur les fractions recueillies lors de la troisième étape chromatographique de la purification à partir de la souche surexprimant HA-Epl1. Deux bandes de tailles différentes sont visibles dans les fractions correspondant aux complexes NuA4 et Piccolo NuA4. **(B)** Immunoprécipitation de l'activité HAT de Piccolo NuA4 par l'anti-HA reconnaissant HA-Epl1.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

4.1 NUA4, UN COMPLEXE HISTONE ACÉTYLTRANSFÉRASE ESSENTIEL CHEZ LA LEVURE

L'identification d'une nouvelle sous-unité du complexe histone acétyltransférase NuA4 a été présentée dans ce mémoire. Les travaux présentés ont démontré de façon claire que la protéine Epl1 est une sous-unité stable de NuA4. De plus, il a été démontré que Epl1 est essentielle à la croissance cellulaire chez *S. cerevesiae* et qu'elle est requise pour l'activation adéquate de la transcription de gènes dépendants du complexe NuA4.

4.1.1 Les sous-unités de NuA4 essentielles à la croissance cellulaire chez *S. cerevesiae*

Le complexe NuA4 contient plusieurs sous-unités essentielles à la viabilité cellulaire chez la levure. Esa1, la sous-unité catalytique du complexe, est essentielle à l'activité HAT de NuA4 et à la croissance cellulaire, l'inactivation de cette protéine menant à une accumulation des cellules à la frontière G₂/M du cycle cellulaire (Allard *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1998). Puisque la majeure partie de Esa1 cellulaire est retrouvée dans NuA4, on peut conclure que l'activité HAT du complexe est essentielle à la viabilité cellulaire (Allard *et al.*, 1999). NuA4 est par conséquent le seul complexe HAT essentiel connu chez la levure. La protéine Tra1 également présente dans NuA4 est elle aussi essentielle à la croissance cellulaire (Allard *et al.*, 1999). Tra1 fait également partie du complexe SAGA (Grant *et al.*, 1998b). Toutefois, étant donné que la sous-unité catalytique du complexe SAGA n'est pas essentielle, on peut supposer que le caractère essentiel de Tra1 réside dans sa fonction à l'intérieur de NuA4. La protéine reliée à l'actine Act3/Arp4 est une autre sous-unité essentielle de NuA4. Il a été démontré qu'elle est requise pour l'intégrité du complexe et que des mutations dans le gène ACT3 induisaient des défauts transcriptionnels au niveau de trois gènes dépendants de Esa1 (Galarneau *et al.*, 2000). Cependant, les mutations dans ACT3 réduisent également la transcription du gène PHO84 qui n'est pas dépendant de Esa1 et il a été démontré que la majeure partie de Act3 cellulaire n'est pas dans le complexe NuA4

(Galarneau *et al.*, 2000). Il a donc été proposé que Act3 exerçait certaines fonctions à l'extérieur de NuA4. Conformément à cette hypothèse, il a récemment été démontré que Act3 fait partie du complexe de remodelage ATP-dépendant INO80 (Shen *et al.*, 2000). Toutefois, étant donné la démonstration du rôle important de Act3 dans NuA4, il est possible de suggérer que son caractère essentiel est dû en partie du moins à sa fonction dans ce complexe.

L'identification de Epl1 comme sous-unité de NuA4 permet d'augmenter à 4 le nombre de protéines essentielles à l'intérieur de ce complexe. Ces travaux démontrent donc encore une fois l'importance de la régulation de l'activation transcriptionnelle par NuA4. Puisqu'il a été démontré que Epl1 est impliquée dans l'activation de la transcription de gènes dépendants de NuA4, on peut affirmer que cette protéine joue un rôle important dans l'activation de la transcription par ce complexe.

4.2 NUA4 ET LE CONTRÔLE ÉPIGÉNÉTIQUE DE LA TRANSCRIPTION

4.2.1 Les mécanismes de contrôle épigénétique de l'expression génique

Une information épigénétique est transmissible à travers les générations mais n'est pas contenue dans une séquence d'ADN. Il existe plusieurs exemples de contrôle épigénétique de la transcription. Lors du développement chez les mammifères, l'expression de certains gènes est régulée par l'imprinting génomique (Pfeifer, 2000). Malgré le fait que deux allèles des gènes régulés par imprinting soit présents, un seul des deux allèles est exprimé. L'expression de l'allèle est dépendante de son origine parentale. Par exemple, pour un gène donné, seul l'allèle provenant de la mère sera exprimé. La compensation de dosage implique également un contrôle transcriptionnel épigénétique. Chez les mammifères, cette compensation se fait grâce à l'inactivation d'un des chromosomes X chez la femelle. À l'inverse, chez la drosophile le chromosome X unique du mâle est exprimé deux fois plus afin d'obtenir une expression équivalente à celle obtenue avec les deux chromosomes X de la femelle (Lucchesi, 1998). Le position effect variegation (PEV) est également une forme de contrôle épigénétique de la

transcription. Chez *Drosophila*, le phénomène de PEV est observé lorsqu'un gène euchromatique est transposé tout près de l'hétérochromatine (Wakimoto, 1998). Ce gène est alors réprimé dans certaines cellules et exprimé dans d'autres cellules. Cet état répressif est transmissible à travers les générations mais il est également réversible. Le PEV est aussi observé chez la levure lorsqu'un gène est placé près d'un télomère (Tartof, 1994).

Il a toujours été suggéré que les mécanismes de contrôle épigénétique de la transcription impliquent des modifications de la chromatine (Lewin, 1998). Chez les mammifères, l'imprinting génomique et l'inactivation du chromosome X sont possibles grâce à la méthylation de l'ADN (Pfeifer, 2000). En effet, les allèles réprimés par imprinting et le chromosome X inactivé sont méthylés sur l'ADN, alors que la majeure partie du génome n'est pas méthylé. Toutefois, des résultats récents ont démontré que l'imprinting de certains gènes est indépendant de la méthylation de l'ADN (Davis *et al.*, 2000). Ceci permet de supposer l'implication dans ce phénomène d'autres mécanismes telles les modifications de la chromatine. Il a également été démontré que le patron d'acétylation des histones sur le chromosome X inactivé est différent de celui sur le chromosome X actif (Keohane *et al.*, 1998). L'acétylation des histones a aussi été reliée directement au mécanisme épigénétique de compensation de dosage chez la drosophile. En effet, le chromosome X du mâle est hyperacétylé sur la lysine-16 de l'histone H4 et cette modification est nécessaire à la compensation de dosage (Lucchesi, 1998). L'acétylation de la lysine-16 est effectuée par le complexe histone acétyltransférase MSL (Smith *et al.*, 2000). De plus, il a été récemment démontré que la protéine Sir2 impliquée dans le silencing épigénétique chez la levure est une histone déacétylase (Shore, 2000). Le PEV semble également impliquer des modifications de la chromatine. Il a été récemment démontré qu'un homologue humain d'un suppresseur du PEV chez *Drosophila* possède une activité histone méthyltransférase (HMT) (Rea *et al.*, 2000). De plus, le fait qu'un autre suppresseur du PEV chez la drosophile code pour une S-adenosylmethionine synthetase permettant la formation du substrat des HMT suggère fortement que la méthylation des histones est impliquée dans ce phénomène (Larsson *et al.*, 1996).

4.2.2 Les liens entre le complexe NuA4 et le contrôle épigénétique de la transcription

Plusieurs évidences suggèrent que le complexe histone acétyltransférase NuA4 est impliqué dans le contrôle épigénétique de la transcription. NuA4 possède deux sous-unités homologues à des sous-unités du complexe MSL chez la drosophile impliqué dans la compensation de dosage. La sous-unité catalytique de NuA4 est l'homologue de Mof dans le complexe MSL qui catalyse l'acétylation de la lysine-16 sur l'histone H4 (Allard *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000). De plus, la protéine Eaf3 dans NuA4 est homologue à la sous-unité Msl3 du complexe MSL (Eisen *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Chez la drosophile, la délétion d'une de ces deux sous-unités empêche la compensation de dosage et est létale pour les mâles.

Une autre sous-unité de NuA4, Act3/Arp4, a été reliée à une forme particulière de contrôle transcriptionnel épigénétique (Jiang and Stillman, 1996). L'insertion d'un élément δ du transposon Ty1 dans le promoteur du gène HIS4 altère le site d'initiation de la transcription (promoteur his4-912 δ) empêchant la traduction de l'ARNm produit (voir section 1.3.4.1). L'utilisation d'une souche exprimant le gène ADE2 sous le contrôle du promoteur his4-912 δ permettait de visualiser la régulation de ce promoteur par la couleur des colonies de levure, l'expression de la protéine Ade2 produisant des colonies blanches alors que les colonies Ade2⁻ sont rouges. Grâce à cette souche, il a été possible d'isoler des mutants exprimant la protéine Ade2 de façon hétérogène. Ces mutants produisaient des colonies à secteurs rouges et blancs, ce qui démontrait que la capacité ou non de produire Ade2 était transmise à travers les générations mais était également réversible dans cette souche. Ces mutants portaient des mutations dans le gène ACT3 codant pour une sous-unité du complexe NuA4 (Galarneau *et al.*, 2000; Jiang and Stillman, 1996).

La découverte de la présence de Epl1 dans le complexe NuA4 renforce davantage le lien entre ce complexe et le contrôle épigénétique de la transcription. En effet, l'homologue de Epl1 chez la drosophile, E(Pc), a été relié à un autre mécanisme de contrôle épigénétique de l'expression génique. Il a été démontré que des mutations dans E(Pc) suppriment le PEV chez *Drosophila* (Sinclair *et al.*, 1998). Ce résultat suggère fortement une implication de E(Pc) dans ce mécanisme de régulation génique. L'implication probable ou démontrée de plusieurs sous-unités du complexe NuA4 dans différents mécanismes de régulation épigénétique permet de proposer que les modifications de la chromatine par ce complexe sont largement impliquées dans ce mécanisme de régulation transcriptionnelle.

4.3 EPL1 ET LA RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION

Les travaux présentés dans ce mémoire ont permis de démontrer que Epl1 est impliquée dans l'activation transcriptionnelle par le complexe NuA4 chez la levure. Cependant, puisque seule une faible proportion de Epl1 cellulaire est présente dans NuA4, on peut supposer que Epl1 possède des fonctions dans la cellule n'impliquant pas ce complexe. De plus, les caractéristiques des homologues de Epl1 chez la drosophile et chez l'humain suggèrent que cette protéine pourrait avoir d'autres fonctions dans la régulation transcriptionnelle chez la levure.

4.3.1 E(Pc) chez la drosophile

L'homologue de Epl1 chez la drosophile, E(Pc), fait partie du groupe de gènes Polycomb (PcG) (pour une revue de littérature voir Kennison, 1995). Les membres de cette famille de gènes sont requis pour la répression des gènes homéotiques durant le développement chez *Drosophila*. Plusieurs résultats suggèrent que cette répression transcriptionnelle implique des modifications de la chromatine. Par exemple, des mutations dans la sous-unité catalytique du complexe Brahma, un complexe de remodelage ATP-dépendant, suppriment les phénotypes dus à certaines mutations dans les PcG (Kennison and Tamkun, 1988; Tamkun *et al.*, 1992). De plus, il a été démontré

que le complexe PRC1, un complexe multiprotéique contenant quatre protéines Pc, inhibe le remodelage par SWI/SNF *in vitro* (Shao *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que le complexe PRC1 stabilise la chromatine et l'empêche d'être remodelée par Brahma, ce qui permettrait la répression des gènes homéotiques *in vivo*. Plusieurs interactions entre différents membres de la famille Pc ont été démontrées suggérant que les membres des Pc forment des complexes multiprotéiques différents (Shao *et al.*, 1999).

Plusieurs caractéristiques de E(Pc) en font un membre distinct des PcG. E(Pc) se distingue des autres PcG étant donné que les mutations dans ce gène n'engendrent pas de phénotype Polycomb caractéristique. Il a été inclus dans la famille Pc étant donné que des mutations dans E(Pc) augmentent drastiquement le phénotype dû à des mutations dans d'autres membres de la famille Pc (Campbell *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1994). E(Pc) est également différent des autres PcG de par le fait que des mutations dans E(Pc) suppriment le position-effect variegation (PEV) (Sinclair *et al.*, 1998). De tous les membres des PcG, seuls E(Pc) et E(z) sont des supprimeurs du PEV (Laible *et al.*, 1997; Sinclair *et al.*, 1998). Curieusement, il a été démontré que E(z) avait un rôle dans l'activation aussi bien que dans la répression de la transcription (LaJeunesse and Shearn, 1996). Finalement, E(Pc) possède des caractéristiques de liaison aux chromosomes polytènes différentes des autres Pc. Tout comme les autres membres des Pc, E(Pc) se lie à certains sites spécifiques sur les chromosomes polytènes. Toutefois, il se lie seulement à 30% des sites communs à plusieurs autres Pc, alors que les autres membres de la famille lient au moins 75% de ces sites (Stankunas *et al.*, 1998).

De par ses caractéristiques, il est évident que E(Pc) est nécessaire à la répression transcriptionnelle comme les autres membres de la famille des PcG. Cependant, ses nombreuses propriétés distinctes suggèrent un mécanisme d'action différent de celui des autres PcG. De plus, alors que des interactions entre plusieurs membres des Pc ont été rapportées, il n'a pas encore été démontré que E(Pc) interagisse avec d'autres Pc. Par conséquent, il a été proposé que E(Pc) agit indirectement sur la répression en permettant l'expression des gènes impliqués dans ce mécanisme (Stankunas *et al.*, 1998). Cette supposition reste toutefois à être démontrée.

4.3.2 EPC chez l'humain

L'homologue de Epl1 chez l'humain, EPC, a été récemment caractérisé (Shimono *et al.*, 2000). Il a été démontré qu'il interagit avec le répresseur transcriptionnel RFP (RET finger protein) et que cette interaction est dépendante du domaine EPcA et de la partie C-terminale de EPC. De plus, les deux protéines semblent être colocalisées dans le noyau. Ces travaux ont également démontré une dualité de EPC dans la régulation de la transcription. Des expériences ont été effectuées par transfection en exprimant des protéines de fusion Gal4-EPC et en utilisant un gène rapporteur sous le contrôle de divers promoteurs dans lesquels des séquences de liaison de Gal4 avaient été insérées. Ces expériences ont démontré que EPC entière et la partie C-terminale de EPC pouvaient réprimer la transcription, alors que le domaine EPcA activait fortement la transcription. Ces travaux suggèrent donc que le domaine EPcA est un domaine d'activation transcriptionnelle. Toutefois, l'interaction entre EPC et RFP et l'activité intrinsèque de répression de EPC complète suggèrent plutôt une implication de cette protéine dans la répression de la transcription.

EPC a également été retrouvée dans le complexe TIP60 (P. Nakatani, communication personnelle) qui est un complexe homologue à NuA4. Étant donné l'implication de NuA4 dans l'activation transcriptionnelle et la forte homologie entre les deux complexes, il est possible de croire que le complexe TIP60 est lui aussi impliqué dans l'activation de la transcription. Il existe au moins deux homologues de Epl1 chez l'humain et il n'a pas encore été déterminé si la protéine EPC interagissant avec RFP est la même que celle retrouvée dans le complexe TIP60. Néanmoins, tous ces résultats semblent indiqués que EPC pourrait bien être impliquée dans la répression ainsi que dans l'activation transcriptionnelle chez l'humain.

4.3.3 Epl1 chez la levure

Avant la parution des travaux présentés dans ce mémoire, aucune fonction n'avait été attribuée à la protéine Epl1 chez *S. cerevesiae*. Il est maintenant clair que Epl1 est impliquée dans l'activation transcriptionnelle chez la levure. En effet, il a été démontré que Epl1 est présente dans le complexe histone acétyltransférase NuA4 qui est requis pour l'activation transcriptionnelle spécifique de plusieurs gènes et les expériences effectuées avec les mutants *epl1* ont démontré que Epl1 est requise pour l'activation transcriptionnelle adéquate de ces gènes. Les travaux présentés dans ce mémoire constituent donc la première démonstration qu'un membre de la famille des homologues de Epl1 est nécessaire à l'activation de la transcription de certains gènes. Ceci permet donc d'affirmer que la proposition de Stankunas selon laquelle E(Pc) chez la drosophile permettrait l'activation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la répression est plausible.

Toutefois, il semble probable que Epl1 soit également impliquée directement dans la répression transcriptionnelle chez la levure. En effet, Epl1 a été retrouvée associée au complexe histone déacétylase Sin3/Rpd3 (D. J. Stillman, communication personnelle) qui est nécessaire à la répression de plusieurs gènes (Kasten *et al.*, 1997). Ce résultat est conforme avec le fait que la protéine Epl1 n'est pas uniquement présente dans le complexe NuA4. Il serait intéressant de vérifier si EPC est associée aux complexes mSin3/HDAC humains, ce qui pourrait expliquer la dualité de EPC par rapport à la transcription. Si tel était le cas, on pourrait penser que EPC permet le recrutement du complexe déacétylase à certains promoteurs spécifiques de par son interaction avec le répresseur RFP.

Il existe quelques protéines chez la levure ayant une homologie de séquence avec le ring finger du répresseur RFP humain. L'un de ces homologues est le répresseur transcriptionnel Mot2 qui est nécessaire à la répression de plusieurs gènes chez *S. cerevesiae* (Irie *et al.*, 1994). Étant donné que EPC interagit avec RFP, il serait possible que Epl1 interagisse avec Mot2 chez la levure. Puisque Mot2 régule négativement la

transcription du gène PHO84 qui est indépendant de NuA4, il serait intéressant de vérifier si la transcription de ce gène est affectée dans les mutants *epl1*.

4.4 LES DOMAINES PROTÉIQUES DE EPL1

4.4.1 Hypothèses sur le rôle du domaine EPcA de Epl1

Les travaux présentés dans ce mémoire ont démontré que seule la partie N-terminale de la protéine Epl1 contenant le domaine EPcA est essentielle à la croissance cellulaire. Ce résultat permet d'affirmer qu'une fonction importante de Epl1 est médiée par ce domaine protéique. Les résultats de Shimono *et al.* ont suggéré que le domaine EPcA est un domaine d'activation transcriptionnelle, alors que la partie C-terminale de EPC semble être impliquée dans la répression transcriptionnelle (Shimono *et al.*, 2000). Puisque seule la partie N-terminale de Epl1 contenant le domaine EPcA est essentielle à la croissance, on peut supposer que seul le rôle d'activateur transcriptionnel de Epl1 est essentiel.

Les résultats présentés ont également démontré que la partie N-terminale de Epl1 est présente dans le complexe Piccolo NuA4. La présence de ce domaine essentiel de Epl1 dans Piccolo NuA4 permet de formuler une hypothèse quant à son rôle dans le remodelage de la chromatine. Étant donné que la protéine Esa1 recombinante acétyle seulement les histones libres et que Piccolo NuA4 acétyle seulement les histones nucléosomales, on doit retrouver dans Piccolo NuA4 une ou quelques sous-unités responsables de ce changement de spécificité. Puisque Piccolo NuA4 est un petit complexe et qu'il semble contenir seulement trois sous-unités (J. Savard, communication personnelle), on peut envisager que le domaine EPcA de Epl1 pourrait permettre la forte activité du complexe sur les histones nucléosomales. Le portion N-terminale de Epl1 pourrait donc être la sous-unité de Piccolo NuA4 qui lie fortement et spécifiquement le nucléosome. Ceci pourrait également expliquer la présence de Epl1 dans plusieurs complexes modifiant la chromatine. Toutefois, il n'a pas encore été possible de confirmer cette hypothèse.

4.4.2 Rôle de la portion C-terminale de Epl1

Étant donné que la portion C-terminale de Epl1 n'est pas essentielle à la croissance cellulaire, il est clair que son rôle est beaucoup moins important que le rôle exercé par le domaine EPcA. Les travaux de Shimono *et al.* suggérant une implication de cette partie de la protéine dans la répression transcriptionnelle (Shimono *et al.*, 2000), il serait intéressant d'investiguer cette possibilité chez la levure. Il sera également intéressant de vérifier l'état du complexe NuA4 et la transcription des gènes dépendants de NuA4 dans la souche exprimant uniquement la portion N-terminale de Epl1.

Le rôle exact de l'absence de la portion C-terminale de Epl1 dans Piccolo NuA4 reste un mystère, tout comme le mécanisme permettant le clivage de la protéine Epl1. Étant donné qu'un site de clivage potentiel est présent dans la séquence Epl1, nous suggérons que Epl1 est clivée activement par une endoprotéase. Cependant, cette hypothèse reste à être confirmée.

4.5 CONCLUSION

La conservation de Epl1 dans les complexes homologues NuA4 et TIP60, son association avec le complexe Sin3/Rpd3 et le fait que Epl1 soit essentielle à la croissance cellulaire chez la levure suggèrent fortement que cette protéine a un rôle primordial à jouer dans la régulation de la transcription à travers le remodelage de la chromatine chez les eucaryotes. Nous avons clairement démontré que Epl1 est impliquée dans l'activation transcriptionnelle par le complexe NuA4 chez la levure. Toutefois, le rôle précis de Epl1 dans le complexe NuA4, le rôle des différents domaines de Epl1, l'association de Epl1 avec d'autres complexes modifiant la chromatine et le rôle possible de Epl1 dans la répression transcriptionnelle restent à être explorés. La poursuite des travaux entrepris sur Epl1 chez la levure permettra assurément de clarifier plusieurs de ces points.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, A., Gottschling, D. E., Kaiser, C. A., and Stearns, T. (1997). *Methods in yeast genetics*, C. S. H. Press, ed. Cold Spring Harbor.
- Akhtar, A., Zink, D., and Becker, P. B. (2000). Chromodomains are protein-RNA interaction modules. *Nature* *407*, 405-9.
- Allard, S., Utley, R. T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C. J., Pillus, L., Workman, J. L., and Côté, J. (1999). NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO J* *18*, 5108-19.
- Allfrey, V. G. (1966). Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc Can Cancer Conf* *6*, 313-35.
- Ayer, D. E., Lawrence, Q. A., and Eisenman, R. N. (1995). Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* *80*, 767-76.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* *384*, 641-3.
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., and Cullin, C. (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* *21*, 3329-30.
- Blanco, J. C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X. J., Walker, K. K., Chen, H., Evans, R. M., Nakatani, Y., and Ozato, K. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev* *12*, 1638-51.

Bonneaud, N., Ozier-Kalogeropoulos, O., Li, G. Y., Labouesse, M., Minvielle-Sebastia, L., and Lacroute, F. (1991). A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae/E. coli* shuttle vectors. *Yeast* 7, 609-15.

Bradbury, E. M. (1992). Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays* 14, 9-16.

Brady, M. E., Ozanne, D. M., Gaughan, L., Waite, I., Cook, S., Neal, D. E., and Robson, C. N. (1999). Tip60 is a nuclear hormone receptor coactivator. *J Biol Chem* 274, 17599-604.

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

Brewster, N. K., Johnston, G. C., and Singer, R. A. (1998). Characterization of the CP complex, an abundant dimer of Cdc68 and Pob3 proteins that regulates yeast transcriptional activation and chromatin repression. *J Biol Chem* 273, 21972-9.

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, 6364-8.

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, 843-51.

Cairns, B. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Winston, F., and Kornberg, R. D. (1998). Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF. *Mol Cell* 2, 639-51.

Cairns, B. R., Henry, N. L., and Kornberg, R. D. (1996a). TFG/TAF30/ANC1, a component of the yeast SWI/SNF complex that is similar to the leukemogenic proteins ENL and AF-9. *Mol Cell Biol* 16, 3308-16.

Cairns, B. R., Lorch, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Du, J., Laurent, B., and Kornberg, R. D. (1996b). RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* 87, 1249-60.

Campbell, R. B., Sinclair, D. A., Couling, M., and Brock, H. W. (1995). Genetic interactions and dosage effects of Polycomb group genes of *Drosophila*. *Mol Gen Genet* 246, 291-300.

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, 555-65.

Carmen, A. A., Rundlett, S. E., and Grunstein, M. (1996). HDA1 and HDA3 are components of a yeast histone deacetylase (HDA) complex. *J Biol Chem* 271, 15837-44.

Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M., and Evans, R. M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383, 99-103.

Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W., and Stallcup, M. R. (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284, 2174-7.

Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L., Nakatani, Y., and Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-80.

Chen, J. D., and Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-7.

Cheng, N. N., Sinclair, D. A., Campbell, R. B., and Brock, H. W. (1994). Interactions of polyhomeotic with Polycomb group genes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 138, 1151-62.

Clarke, A. S., Lowell, J. E., Jacobson, S. J., and Pillus, L. (1999). Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 19, 2515-26.

Cosma, M. P., Tanaka, T., and Nasmyth, K. (1999). Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 97, 299-311.

Côté, J., Peterson, C. L., and Workman, J. L. (1998). Perturbation of nucleosome core structure by the SWI/SNF complex persists after its detachment, enhancing subsequent transcription factor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4947-52.

Côté, J., Quinn, J., Workman, J. L., and Peterson, C. L. (1994). Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265, 53-60.

Creaven, M., Hans, F., Mutskov, V., Col, E., Caron, C., Dimitrov, S., and Khochbin, S. (1999). Control of the histone-acetyltransferase activity of Tip60 by the HIV-1 transactivator protein, Tat. *Biochemistry* 38, 8826-30.

Davis, T. L., Yang, G. J., McCarrey, J. R., and Bartolomei, M. S. (2000). The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet* 9, 2885-2894.

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, 491-6.

Durrin, L. K., Mann, R. K., Kayne, P. S., and Grunstein, M. (1991). Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation *in vivo*. *Cell* 65, 1023-31.

Ebbert, R., Birkmann, A., and Schuller, H. J. (1999). The product of the SNF2/SWI2 paralogue INO80 of *Saccharomyces cerevisiae* required for efficient expression of various yeast structural genes is part of a high-molecular-weight protein complex. *Mol Microbiol* 32, 741-51.

Eberharter, A., Stermer, D. E., Schieltz, D., Hassan, A., Yates, J. R., 3rd, Berger, S. L., and Workman, J. L. (1999). The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 6621-31.

Eisen, A., Utley, R. T., Nourani, A., Allard, S., Schmidt, P., Lane, W. S., Lucchesi, J. C., and Côté, J. (2000). The yeast NuA4 and *Drosophila* MSL complexes contain homologous subunits important for transcriptional regulation. *J Biol Chem* 276, 3484-91.

Elfring, L. K., Deuring, R., McCallum, C. M., Peterson, C. L., and Tamkun, J. W. (1994). Identification and characterization of *Drosophila* relatives of the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Mol Cell Biol* 14, 2225-34.

Galarneau, L., Nourani, A., Boudreault, A. A., Zhang, Y., Heliot, L., Allard, S., Savard, J., Lane, W. S., Stillman, D. J., and Côté, J. (2000). Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Mol Cell* 5, 927-37.

Garkavtsev, I., Grigorian, I. A., Ossovskaya, V. S., Chernov, M. V., Chumakov, P. M., and Gudkov, A. V. (1998). The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature* 391, 295-8.

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, 4145-52.

Grant, P. A., Duggan, L., Côté, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F., Berger, S. L., and Workman, J. L. (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev* 11, 1640-50.

Grant, P. A., Schieltz, D., Pray-Grant, M. G., Steger, D. J., Reese, J. C., Yates, J. R., 3rd, and Workman, J. L. (1998a). 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., Schieltz, D., Pray-Grant, M. G., Yates, J. R., 3rd, and Workman, J. L. (1998b). The ATM-related cofactor Tra1 is a component of the purified SAGA complex. *Mol Cell* 2, 863-7.

Han, M., Kim, U. J., Kayne, P., and Grunstein, M. (1988). Depletion of histone H4 and nucleosomes activates the PHO5 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 7, 2221-8.

Harata, M., Karwan, A., and Wintersberger, U. (1994). An essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* coding for an actin-related protein [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Oct 25;91(22):10757]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8258-62.

Harata, M., Oma, Y., Mizuno, S., Jiang, Y. W., Stillman, D. J., and Wintersberger, U. (1999). The nuclear actin-related protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Act3p/Arp4, interacts with core histones. *Mol Biol Cell* 10, 2595-605.

Haynes, S. R., Dollard, C., Winston, F., Beck, S., Trowsdale, J., and Dawid, I. B. (1992). The bromodomain: a conserved sequence found in human, *Drosophila* and yeast proteins. *Nucleic Acids Res* 20, 2603.

Hebbes, T. R., Clayton, A. L., Thorne, A. W., and Crane-Robinson, C. (1994). Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J* 13, 1823-30.

Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. P., and Allis, C. D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348-60.

Hirschhorn, J. N., Brown, S. A., Clark, C. D., and Winston, F. (1992). Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev* 6, 2288-98.

Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R., Lander, E. S., and Young, R. A. (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95, 717-28.

Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K., and *et al.* (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

Ikura, T., Ogryzko, V. V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., and Nakatani, Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* 102, 463-73.

Imbalzano, A. N. (1998). Energy-dependent chromatin remodelers: complex complexes and their components. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8, 225-55.

Irie, K., Yamaguchi, K., Kawase, K., and Matsumoto, K. (1994). The yeast MOT2 gene encodes a putative zinc finger protein that serves as a global negative regulator affecting expression of several categories of genes, including mating-pheromone-responsive genes. *Mol Cell Biol* 14, 3150-7.

Ito, T., Bulger, M., Pazin, M. J., Kobayashi, R., and Kadonaga, J. T. (1997). ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell* 90, 145-55.

Jackson, V., Shires, A., Tanphaichitr, N., and Chalkley, R. (1976). Modifications to histones immediately after synthesis. *J Mol Biol* 104, 471-83.

Jiang, Y. W., and Stillman, D. J. (1996). Epigenetic effects on yeast transcription caused by mutations in an actin-related protein present in the nucleus. *Genes Dev* 10, 604-19.

John, S., Howe, L., Tafrov, S. T., Grant, P. A., Sternglanz, R., and Workman, J. L. (2000). The something about silencing protein, Sas3, is the catalytic subunit of NuA3, a yTAF(II)30-containing HAT complex that interacts with the Spt16 subunit of the yeast CP (Cdc68/Pob3)-FACT complex. *Genes Dev* 14, 1196-208.

Kadosh, D., and Struhl, K. (1997). Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* 89, 365-71.

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1996). A CBP integrator

complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-14.

Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., Coleman, D., and Chinnadurai, G. (1996). Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology* 216, 357-66.

Kasten, M. M., Dorland, S., and Stillman, D. J. (1997). A large protein complex containing the yeast Sin3p and Rpd3p transcriptional regulators. *Mol Cell Biol* 17, 4852-8.

Kennison, J. A. (1995). The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu Rev Genet* 29, 289-303.

Kennison, J. A., and Tamkun, J. W. (1988). Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8136-40.

Keohane, A. M., Lavender, J. S., O'Neill, L. P., and Turner, B. M. (1998). Histone acetylation and X inactivation. *Dev Genet* 22, 65-73.

Knezetic, J. A., and Luse, D. S. (1986). The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro. *Cell* 45, 95-104.

Krebs, J. E., Kuo, M. H., Allis, C. D., and Peterson, C. L. (1999). Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene. *Genes Dev* 13, 1412-21.

Kruger, W., Peterson, C. L., Sil, A., Coburn, C., Arents, G., Moudrianakis, E. N., and Herskowitz, I. (1995). Amino acid substitutions in the structured domains of histones H3 and H4 partially relieve the requirement of the yeast SWI/SNF complex for transcription. *Genes Dev* 9, 2770-9.

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, 269-72.

Kuo, M. H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M. E., and Allis, C. D. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes *in vivo*. *Genes Dev* 12, 627-39.

Kwon, H., Imbalzano, A. N., Khavari, P. A., Kingston, R. E., and Green, M. R. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex [see comments]. *Nature* 370, 477-81.

Laherty, C. D., Yang, W. M., Sun, J. M., Davie, J. R., Seto, E., and Eisenman, R. N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89, 349-56.

Laible, G., Wolf, A., Dorn, R., Reuter, G., Nislow, C., Lebersorger, A., Popkin, D., Pillus, L., and Jenuwein, T. (1997). Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *EMBO J* 16, 3219-32.

LaJeunesse, D., and Shearn, A. (1996). E(z): a polycomb group gene or a trithorax group gene? *Development* 122, 2189-97.

Larsson, J., Zhang, J., and Rasmuson-Lestander, A. (1996). Mutations in the *Drosophila melanogaster* gene encoding S-adenosylmethionine synthetase suppress position-effect variegation [published erratum appears in *Genetics* 1996 Nov;144(3):1329]. *Genetics* 143, 887-96.

- Laurent, B. C., Treich, I., and Carlson, M. (1993). The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev* 7, 583-91.
- Lee, T. I., Causton, H. C., Holstege, F. C., Shen, W. C., Hannett, N., Jennings, E. G., Winston, F., Green, M. R., and Young, R. A. (2000). Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature* 405, 701-4.
- LeRoy, G., Orphanides, G., Lane, W. S., and Reinberg, D. (1998). Requirement of RSF and FACT for transcription of chromatin templates *in vitro*. *Science* 282, 1900-4.
- Lewin, B. (1998). The mystique of epigenetics. *Cell* 93, 301-3.
- Lim, C. R., Kimata, Y., Ohdate, H., Kokubo, T., Kikuchi, N., Horigome, T., and Kohno, K. (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* RuvB-like protein, Tih2p, is required for cell cycle progression and RNA polymerase II-directed transcription. *J Biol Chem* 275, 22409-17.
- Lo, W. S., Trievel, R. C., Rojas, J. R., Duggan, L., Hsu, J. Y., Allis, C. D., Marmorstein, R., and Berger, S. L. (2000). Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked *in vitro* and *in vivo* to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell* 5, 917-26.
- Loewith, R., Meijer, M., Lees-Miller, S. P., Riabowol, K., and Young, D. (2000). Three yeast proteins related to the human candidate tumor suppressor p33(ING1) are associated with histone acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol* 20, 3807-16.
- Lorch, Y., LaPointe, J. W., and Kornberg, R. D. (1987). Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* 49, 203-10.

Lucchesi, J. C. (1998). Dosage compensation in flies and worms: the ups and downs of X-chromosome regulation. *Curr Opin Genet Dev* 8, 179-84.

Ma, X. J., Wu, J., Altheim, B. A., Schultz, M. C., and Grunstein, M. (1998). Deposition-related sites K5/K12 in histone H4 are not required for nucleosome deposition in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6693-8.

Mahadevan, L. C., Willis, A. C., and Barratt, M. J. (1991). Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* 65, 775-83.

Marcus, G. A., Silverman, N., Berger, S. L., Horiuchi, J., and Guarente, L. (1994). Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *EMBO J* 13, 4807-15.

McMahon, S. B., Van Buskirk, H. A., Dugan, K. A., Copeland, T. D., and Cole, M. D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94, 363-74.

Mizzen, C. A., Yang, X. J., Kokubo, T., Brownell, J. E., Bannister, A. J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S. L., Kouzarides, T., Nakatani, Y., and Allis, C. D. (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 87, 1261-70.

Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L., and Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89, 373-80.

Nasmyth, K. (1983). Molecular analysis of a cell lineage. *Nature* 302, 670-6.

- Nourani, A., Wesolowski-Louvel, M., Delaveau, T., Jacq, C., and Delahodde, A. (1997). Multiple-drug-resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. *Mol Cell Biol* 17, 5453-60.
- Ogryzko, V. V., Kotani, T., Zhang, X., Schlitz, 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, 953-9.
- Orphanides, G., Wu, W. H., Lane, W. S., Hampsey, M., and Reinberg, D. (1999). The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* 400, 284-8.
- 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.
- Peterson, C. L., Zhao, Y., and Chait, B. T. (1998). Subunits of the yeast SWI/SNF complex are members of the actin-related protein (ARP) family. *J Biol Chem* 273, 23641-4.
- Pfeifer, K. (2000). Mechanisms of genomic imprinting. *Am J Hum Genet* 67, 777-87.
- 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 Levrero, 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, 593-9.

Reifsnnyder, C., Lowell, J., Clarke, A., and Pillus, L. (1996). Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases [published erratum appears in *Nat Genet* 1997 May;16(1):109]. *Nat Genet* 14, 42-9.

Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L. J., and Allfrey, V. G. (1975). Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* 190, 117-28.

Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B. M., and Grunstein, M. (1996). HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14503-8.

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, 26559-65.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition, C. S. H. L. Press, ed. Cold Spring Harbor.

Schmitt, M. E., Brown, T. A., and Trumpower, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 18, 3091-2.

Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J. R., Wu, C. T., Bender, W., and Kingston, R. E. (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell* 98, 37-46.

Shen, X., Mizuguchi, G., Hamiche, A., and Wu, C. (2000). A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing. *Nature* 406, 541-4.

Shimono, Y., Murakami, H., Hasegawa, Y., and Takahashi, M. (2000). RFP is a transcriptional repressor and interacts with enhancer of polycomb that has dual transcriptional functions. *J Biol Chem* 275, 39411-9.

Shore, D. (2000). The Sir2 protein family: A novel deacetylase for gene silencing and more. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14030-14032.

Sinclair, D. A., Clegg, N. J., Antonchuk, J., Milne, T. A., Stankunas, K., Ruse, C., Grigliatti, T. A., Kassis, J. A., and Brock, H. W. (1998). Enhancer of Polycomb is a suppressor of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 148, 211-20.

Smith, E. R., Eisen, A., Gu, W., Sattah, M., Pannuti, A., Zhou, J., Cook, R. G., Lucchesi, J. C., and Allis, C. D. (1998). ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3561-5.

Smith, E. R., Pannuti, A., Gu, W., Steurnagel, A., Cook, R. G., Allis, C. D., and Lucchesi, J. C. (2000). The *Drosophila* MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation. *Mol Cell Biol* 20, 312-8.

Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389, 194-8.

Stankunas, K., Berger, J., Ruse, C., Sinclair, D. A., Randazzo, F., and Brock, H. W. (1998). The enhancer of polycomb gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein conserved in yeast and mammals. *Development* 125, 4055-66.

Steger, D. J., Eberharter, A., John, S., Grant, P. A., and Workman, J. L. (1998). Purified histone acetyltransferase complexes stimulate HIV-1 transcription from preassembled nucleosomal arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 12924-9.

Sterner, D. E., Grant, P. A., Roberts, S. M., Duggan, L. J., Belotserkovskaya, R., Pacella, L. A., Winston, F., Workman, J. L., and Berger, S. L. (1999). Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol Cell Biol* *19*, 86-98.

Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41-5.

Strahl, B. D., Ohba, R., Cook, R. G., and Allis, C. D. (1999). Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 14967-72.

Tamkun, J. W., Deuring, R., Scott, M. P., Kissinger, M., Pattatucci, A. M., Kaufman, T. C., and Kennison, J. A. (1992). *brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* *68*, 561-72.

Tartof, K. D. (1994). Position effect variegation in yeast. *Bioessays* *16*, 713-4.

Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., and Reuter, G. (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J* *13*, 3822-31.

Tsukiyama, T., Palmer, J., Landel, C. C., Shiloach, J., and Wu, C. (1999). Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* *13*, 686-97.

- Tsukiyama, T., and Wu, C. (1995). Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell* 83, 1011-20.
- Utle, R. T., Ikeda, K., Grant, P. A., Côté, J., Steger, D. J., Eberharter, A., John, S., and Workman, J. L. (1998). Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* 394, 498-502.
- Utle, R. T., Owen-Hughes, T. A., Juan, L. J., Côté, J., Adams, C. C., and Workman, J. L. (1996). In vitro analysis of transcription factor binding to nucleosomes and nucleosome disruption/displacement. *Methods Enzymol* 274, 276-91.
- Varga-Weisz, P. D., Wilm, M., Bonte, E., Dumas, K., Mann, M., and Becker, P. B. (1997). Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II [published erratum appears in *Nature* 1997 Oct 30;389(6654):1003]. *Nature* 388, 598-602.
- Vassilev, A., Yamauchi, J., Kotani, T., Prives, C., Avantaggiati, M. L., Qin, J., and Nakatani, Y. (1998). The 400 kDa subunit of the PCAF histone acetylase complex belongs to the ATM superfamily. *Mol Cell* 2, 869-75.
- Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E., and Workman, J. L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 20, 1899-910.
- Wakimoto, B. T. (1998). Beyond the nucleosome: epigenetic aspects of position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell* 93, 321-4.
- Wang, L., Mizzen, C., Ying, C., Candau, R., Barlev, N., Brownell, J., Allis, C. D., and Berger, S. L. (1997). Histone acetyltransferase activity is conserved between yeast and human GCN5 and is required for complementation of growth and transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 17, 519-27.

Wang, W., Côté, J., Xue, Y., Zhou, S., Khavari, P. A., Biggar, S. R., Muchardt, C., Kalpana, G. V., Goff, S. P., Yaniv, M., Workman, J. L., and Crabtree, G. R. (1996). Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J* 15, 5370-82.

Watson, A. D., Edmondson, D. G., Bone, J. R., Mukai, Y., Yu, Y., Du, W., Stillman, D. J., and Roth, S. Y. (2000). Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes Dev* 14, 2737-2744.

Wei, Y., Mizzen, C. A., Cook, R. G., Gorovsky, M. A., and Allis, C. D. (1998). Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7480-4.

Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M. A., and Allis, C. D. (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97, 99-109.

Winston, F., Dollard, C., Malone, E. A., Clare, J., Kapakos, J. G., Farabaugh, P., and Minehart, P. L. (1987). Three genes are required for trans-activation of Ty transcription in yeast. *Genetics* 115, 649-56.

Wittmeyer, J., Joss, L., and Formosa, T. (1999). Spt16 and Pob3 of *Saccharomyces cerevisiae* form an essential, abundant heterodimer that is nuclear, chromatin-associated, and copurifies with DNA polymerase alpha. *Biochemistry* 38, 8961-71.

Workman, J. L., and Kingston, R. E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 67, 545-79.

Workman, J. L., and Roeder, R. G. (1987). Binding of transcription factor TFIID to the major late promoter during in vitro nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA polymerase II. *Cell* 51, 613-22.

Yamamoto, T., and Horikoshi, M. (1997). Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60. *J Biol Chem* 272, 30595-8.

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, 319-24.

Zhao, K., Wang, W., Rando, O. J., Xue, Y., Swiderek, K., Kuo, A., and Crabtree, G. R. (1998). Rapid and phosphoinositol-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell* 95, 625-36.

ANNEXE A

Article "Multiple links between the NuA4 histone acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription" publié dans le journal Molecular Cell

Multiple Links between the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex and Epigenetic Control of Transcription

Luc Galarneau,^{1,7} Amine Nourani,^{1,7}
Alexandre A. Boudreault,¹ Yan Zhang,^{2,5}
Laurent Héliot,^{1,6} Stéphane Allard,¹ Julie Savard,¹
William S. Lane,³ David J. Stillman,²
and Jacques Côté^{1,4}

¹Laval University Cancer Research Center
Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ)
Québec City, Qc G1R 2J6
Canada

²Department of Oncological Sciences
University of Utah Health Sciences Center
Salt Lake City, Utah 84132

³Harvard Microchemistry Facility
Harvard University
Cambridge, Massachusetts 02138

Summary

NuA4 is an essential histone H4/H2A acetyltransferase complex that interacts with activators and stimulates transcription *in vitro*. We have identified three novel NuA4 subunits: Act3/Arp4, an actin-related protein implicated in epigenetic control of transcription, Act1, and Epl1, a protein homologous to *Drosophila* Enhancer of Polycomb. Act3/Arp4 binds nucleosomes *in vitro* and is required for NuA4 integrity *in vivo*. Mutations in *ACT3* and acetyltransferase-encoding *ESA1* cause gene-specific transcription defects. Accordingly, NuA4 is localized in precise loci within the nucleus and does not overlap with the silent chromatin marker Sir3. These data along with the known epigenetic roles of Act3/Arp4 and homologs of Epl1 and Esa1 strongly support an essential role for chromatin structure modification by NuA4 in transcription regulation *in vivo*.

Introduction

Nucleosomes suppress basal transcription initiation, an effect that is reinforced or alleviated by chromatin modifying activities. Sequence-specific activator or repressor proteins determine which activities will be recruited to the regulatory regions of a gene (Struhl, 1999). These chromatin modifying activities are often multimeric protein complexes that modify histones and/or alter nucleosomal structure. These complexes can be separated in two general classes. The first class uses the energy of ATP hydrolysis to remodel nucleosome structure, acting on the histone-DNA contacts within chromatin. This

group of factors includes the SWI/SNF-related complexes (Workman and Kingston, 1998).

The second class of chromatin modifying complexes targets the core histone amino-termini and alters the number of acetyl groups linked to specific lysine residues. Hyperacetylation or hypoacetylation of histone tails is correlated with transcriptional activation or repression, respectively (Grunstein, 1997). Many protein complexes harboring histone acetyltransferase (HAT) or histone deacetylase (HDAC) activities have been identified and linked to transcription control (Struhl, 1998; Workman and Kingston, 1998).

Native nucleosomal HAT complexes have been identified in *Saccharomyces cerevisiae* (Grant et al., 1997). The transcriptional coactivator-adaptor protein Gcn5 is part of the 1.8 MDa SAGA complex and the 0.8 MDa Ada complex (Grant et al., 1997; Eberharter et al., 1999). The 1.3 MDa NuA4 (nucleosomal acetyltransferase of H4) complex is an 11-subunit complex that modifies primarily histone H4 in chromatin (and H2A to a lesser extent), producing a fully tetraacetylated isoform of H4 (Allard et al., 1999). NuA4 can be recruited *in vitro* by transcriptional activators and stimulates transcription on chromatin templates in an acetyl-CoA- and chromatin-dependent manner (Steger et al., 1998; Utley et al., 1998; Ikeda et al., 1999; Wallberg et al., 1999). We recently showed that Esa1 is the catalytic subunit of NuA4 and is required for *in vitro* transcription activation by the complex (Allard et al., 1999). The *ESA1* gene product, unlike other yeast HATs, is essential for cell viability, and temperature-sensitive mutant cells accumulate at the G2/M border at the nonpermissive temperature (Smith et al., 1998; Clarke et al., 1999). Esa1 is a member of the MYST family of proteins (Borrow et al., 1996) and is more closely related to human Tip60, a protein shown to acetylate free histones with similar specificity, and implicated as a transcriptional coactivator (Yamamoto and Horikoshi, 1997; Brady et al., 1999). Esa1 is also closely related to *Drosophila* MOF, the acetyltransferase subunit of the dosage compensation (MSL) complex that is necessary for X chromosome hypertranscription and histone H4 acetylation in males (Hilfiker et al., 1997; Smith et al., 2000). As for Gcn5 in SAGA and Ada, the presence of Esa1 in the native NuA4 complex potentiates its activity on nucleosomal histones, suggesting that other subunits might help to access chromatin substrate (Allard et al., 1999). We have also previously identified the ATM/Pi-3 kinase-related protein Tra1 as a subunit of NuA4. Tra1 is essential for cell viability, and its human homolog is required for c-Myc and E2F-mediated cell transformation (McMahon et al., 1998).

In this report, we identify three novel subunits of the purified NuA4 complex, each of which is also essential for cell viability. Act3/Arp4 is a nuclear actin-related protein that was previously shown to be involved in epigenetic control of transcription (Jiang and Stillman, 1996). Using temperature-sensitive mutants, we show that this protein is required for NuA4 integrity in the cell and that both *esa1* and *act3* mutant cells present common gene-specific transcription defects. Act3/Arp4 is also able to

⁴To whom correspondence should be addressed (e-mail: jacques.cote@crhdq.ulaval.ca).

⁵Present address: Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Jersey Medical School, Newark, New Jersey 07103.

⁶Present address: Institut Pasteur de Lille, CNRS EP560, Lille cedex 59021, France.

⁷These authors contributed equally to this work.

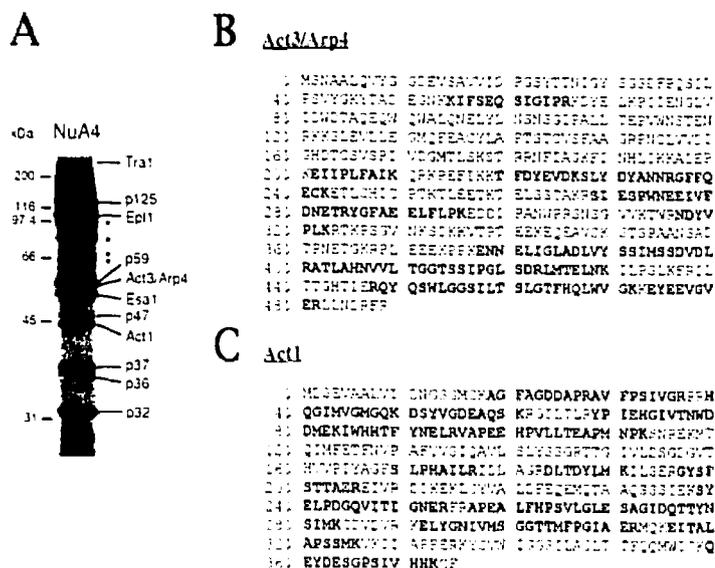


Figure 1. Identification of Act3/Arp4 and Act1 as Subunits of the NuA4 Complex

(A) Silver-stained gel of purified NuA4. CY396 strain protein extract was purified using Ni²⁺-NTA agarose, Mono Q, and Superose 6 columns followed by immunoprecipitation with anti-Esa1. Specific bands are indicated by their respective name or molecular weight. Ion trap tandem mass spectrometry of peptides from p105, p58, and p44 bands identified them as Epl1, Act3/Arp4, and Act1, respectively. Asterisks mark nonspecific bands also present in protein-A control fraction (not shown). Molecular weight standards are indicated.

(B and C) Amino acid sequence of Act3/Arp4 and Act1. Sequences obtained by the mass spectrometry analysis are shown in bold.

interact with histones and form a ternary complex with nucleosomes in vitro, suggesting that it might help the complex to access chromatin. Cellular actin, Act1, a protein recently found in mammalian SWI/SNF (Zhao et al., 1998), is also a component of the NuA4 complex. The p105 component of NuA4 was identified as Epl1, a protein homologous to Enhancer of Polycomb, E(Pc), a modifier of position effect variegation (PEV) in *Drosophila* (Sinclair et al., 1998; Stankunas et al., 1998). Finally, immunofluorescence and confocal microscopy analysis demonstrates that NuA4 is precisely localized throughout the nuclear volume but does not overlap with silent chromatin regions. Together, these facts strongly support an essential role for the NuA4 complex in the regulation of gene expression in vivo and the importance of its action on chromatin structure for epigenetic control of transcription.

Results

Actin and an Actin-Related Protein Are Stable Subunits of the NuA4 Complex

NuA4 was previously purified to homogeneity from yeast extracts using a combination of conventional and immunoaffinity chromatographic steps (Allard et al., 1999). Of its 11 subunits, only 2 have been identified, the histone acetyltransferase Esa1 and the ATM-related cofactor Tra1. To determine the identity of additional NuA4 subunits, we scaled up the purification protocol, and the immunopurified complex is shown in Figure 1A. Three bands, previously named p105, p58, and p44 based on their size, were digested with trypsin and analyzed by microcapillary reverse-phase HPLC nanoelectrospray tandem mass spectrometry.

All 17 peptides obtained from p58 correspond to sequences from the *ACT3/ARP4* gene product and cover 34% of protein (see Figure 1B, amino acids in bold). The gene is essential for cell viability and encodes a 489 amino acid protein of predicted molecular mass of 54.8 kDa (Harata et al., 1994). Act3/Arp4 is member of the

actin-related protein family (Arps, actin-related protein [Poch and Winsor, 1997]) and is localized in the nucleus (Weber et al., 1995; Jiang and Stillman, 1996; and see Figure 7). Like many proteins involved in transcription regulation and modulation of chromatin structure (*SPT* genes), *act3* nonlethal mutations can suppress the transcriptional defect caused by the insertion of a δ element in the *HIS4* promoter (*his4-12 δ*) (Jiang and Stillman, 1996). Interestingly, those *act3* mutations cause variegated suppression of the δ element-inactivated *HIS4* gene, meaning that cells with the identical genotype display distinct phenotype. The reversibility and heritability of the phenotypic states are dependent on the transcriptional states of the promoter, showing that Act3 is involved in epigenetic control of transcription. Most models link variegated expression of genes with the state of chromatin structure present on them, for example, position effect variegation (PEV) and telomere position effect (TPE) (Grunstein, 1998; Wakimoto, 1998). Interestingly, two other yeast actin-related proteins, Arp7 and Arp9, have been shown to be part of the SWI/SNF and RSC chromatin remodeling complexes (Cairns et al., 1998; Peterson et al., 1998).

The 15 peptides obtained from p44 correspond to sequences from the *ACT1* gene product, which is cellular actin (Figure 1C). The peptides cover 54% of the 375 amino acid protein, which has a predicted molecular mass of 41.7 kDa. β -actin has been shown to be a subunit of mammalian SWI/SNF and could be required for its regulation and targeting to chromatin (Zhao et al., 1998). Interestingly, the human SWI/SNF complex also contains the actin-related protein, BAF53, which is similarly required for remodeling activity and targeting to chromatin. The Wu and Nakatani labs have also recently found both actin and actin-related proteins in other chromatin modifying complexes, yeast and human, respectively (Shen et al., submitted; Ikura et al., submitted).

To demonstrate the stable association of Act3/Arp4 and Act1 with NuA4, we confirmed coelution of these proteins by Western blotting with NuA4 HAT activity

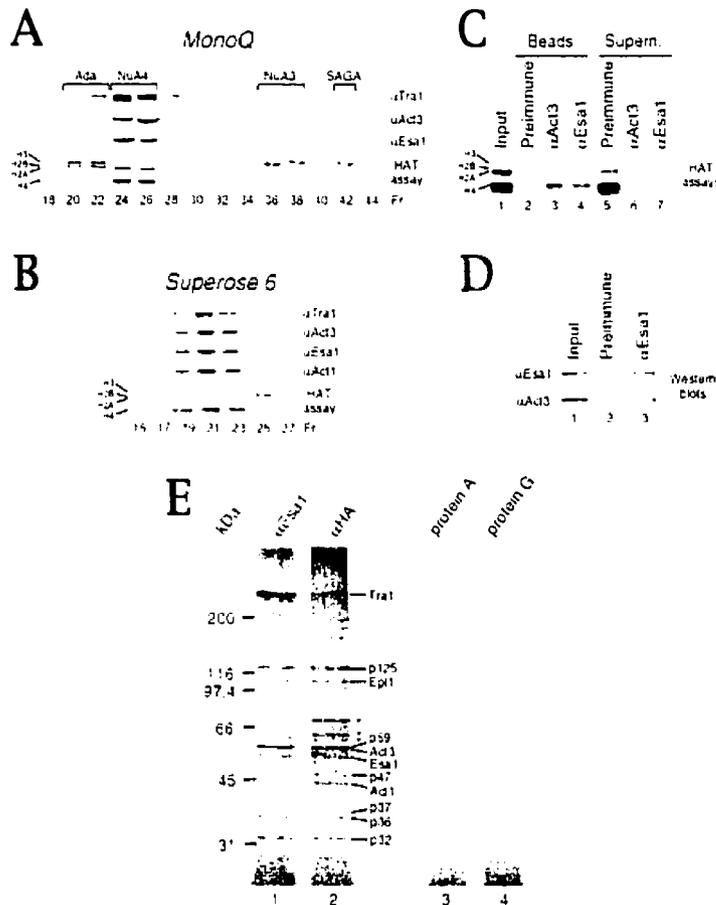


Figure 2. Act3/Arp4 and Act1 Coelute and Are Stably Associated with NuA4 Components and Histone H4/H2A Acetyltransferase Activity

(A) A nickel-agarose bound fraction from CY396 yeast strain protein extract was fractionated on Mono Q to separate indicated HAT complexes. Fractions were tested for nucleosomal HAT activity and probed in Western blots. (B) NuA4 peak fractions from the Mono Q were pooled and loaded on a Superose 6 gel filtration column. Western blots showed Tra1, Act3/Arp4, Esa1, and Act1 coelution with the 1.3 MDa NuA4 HAT activity (fractions 19–23). (C) Immunoprecipitation of NuA4 activity with anti-Act3. Superose 6 peak NuA4 fraction was incubated with preimmune serum, anti-Act3, or anti-Esa1 beads, and equivalent amounts of input, supernatant, and beads were used in nucleosomal HAT assays. (D) Esa1 and Act3/Arp4 are coimmunoprecipitated by anti-Esa1. Equivalent amounts of input material, preimmune, and anti-Esa1 beads as in (C) were probed with anti-Esa1 or anti-Act3 by Western blotting. (E) Identical NuA4 components are precipitated by antibodies against Esa1 or Act3/Arp4. The Superose 6 peak fraction of NuA4 complex from a HA-Act3-expressing strain was immunoprecipitated with anti-Esa1/protein A-Sepharose or with anti-HA/protein G-Sepharose. Silver staining of immunopurified complexes is shown. Specific NuA4 bands are indicated. Nonspecific bands present in the controls are indicated by asterisks.

over Mono Q ion exchange and Superose 6 gel filtration columns (Figures 2A and 2B). Both proteins strictly coelute with the nucleosomal histone H4/H2A-specific activity and with known NuA4 subunits, Esa1 and Tra1. The Mono Q column separates the four previously identified native nucleosomal HATs, and, as expected, Tra1 was also detected in the SAGA complex (Grant et al., 1998). NuA4 was efficiently depleted from the Superose fraction using antibodies against Esa1 and Act3/Arp4 but not with preimmune serum (Figure 2C, compare lanes 5–7 to lane 1). The HAT activity is also specifically recovered on the beads (lanes 2–4). Act3 antibodies also specifically recognize the p58 band in the anti-Esa1-purified NuA4 complex (Figure 2D). Using a HA-tagged version of Act3/Arp4, we compared the subunit composition of immunopurified complexes using Esa1 or HA antibodies (Figure 2E). Both complexes contain the same specific protein bands, including Act1. Thus, Act3/Arp4 and Act1 are true stable subunits of the NuA4 HAT complex.

Act3/Arp4 Is Required for NuA4 Integrity In Vivo

We next determined the role of Act3/Arp4 in NuA4 structure and HAT activity. Since the ACT3 gene is essential for growth in yeast (Harata et al., 1994), we used strains with conditional act3 mutations to look for any effect on the NuA4 complex. The act3-3 mutant carries a single C-to-Y substitution at position 155 and shows a growth defect at 37°C (Jiang and Stillman, 1996). The act3-12 mutation, a single G-to-S substitution at position 455,

abolishes growth at 37°C. Both mutations are predicted to be at the surface of the protein based on the transposed actin 3-D structure. Protein extracts from wild-type and mutant strains were prepared, purified over nickel-agarose and Mono Q columns, and the fractions were analyzed for nucleosome and free histone HAT activity and the presence of Esa1, Tra1, and Act3/Arp4 (Figure 3). When cells were grown at the permissive temperature, NuA4 H4-specific HAT activity was detected on both nucleosomal and free substrates and coeluted with its three subunits (top panels of Figures 3A, 3B, and 3C). Activities were comparable when corrected for the amount of Esa1, the catalytic HAT subunit (data not shown). The ratio of HAT activity on nucleosomes versus free histones was not apparently affected by the act3 mutations. On the other hand, using Ada and NuA3 HAT activities as standardization controls, the act3-3 mutant strain grown at room temperature contains less NuA4 complex than the two others (Figure 3C, top panel). Interestingly, this specific mutant strain has a pronounced slow growth phenotype at room temperature compared to the act3-12 mutant strain (data not shown). When cultures were shifted to the nonpermissive temperature for 4 hr, the wild-type strain gave similar results to those obtained at room temperature, while both act3 mutant strains completely lost their H4-specific HAT activity (Figures 3A, 3B, and 3C, lower panels). Importantly, both Ada and NuA3 HAT activities were unaffected, being useful internal controls. The

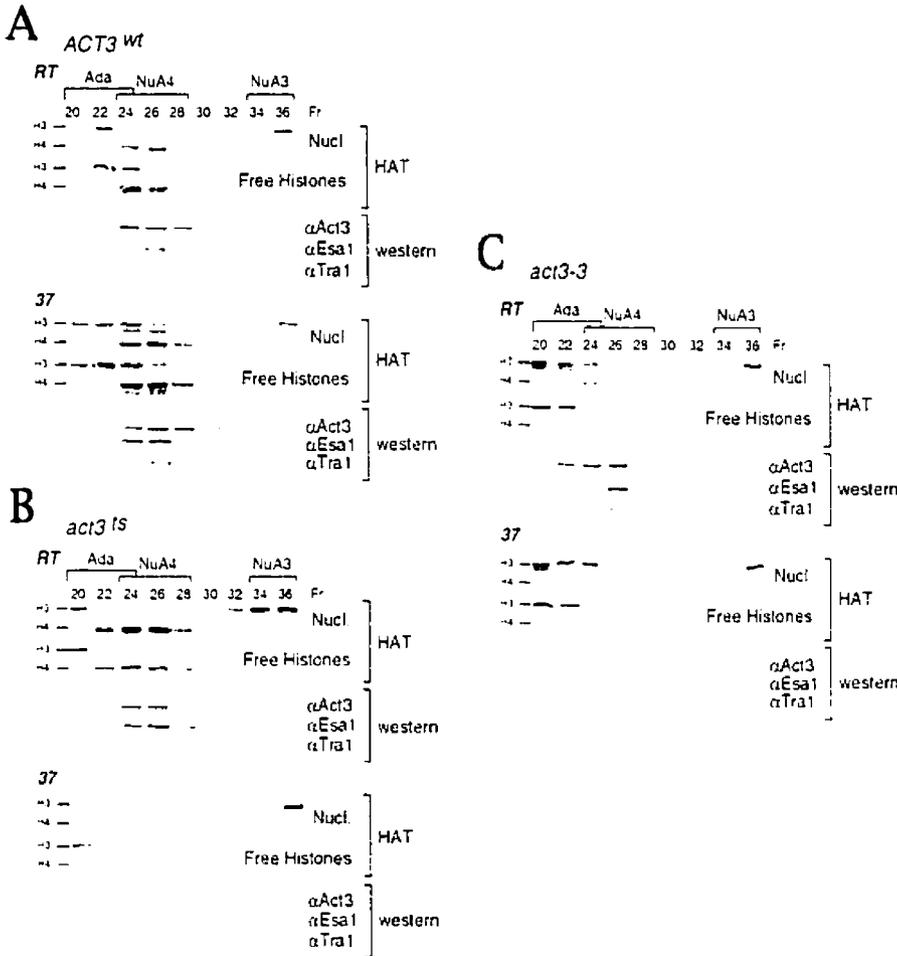


Figure 3. Mutations in *ACT3/ARP4* Disrupt the NuA4 Complex

Mono Q fractionation of wild-type (A), *act3-12* (B), and *act3-3* (C) protein extracts (nickel eluate) prepared from cells grown at room temperature or after a 4 hr heat shock at 37°C when indicated. Fractions were assayed for HAT activity on nucleosomes or free histones, and in Western blots. At room temperature, the NuA4 complex is fully active in the *act3-12* strain, while its HAT activity is significantly lower in the *act3-3* strain when compared to wild type. In both mutant strains, a complete loss of NuA4 activity and subunits is observed after growth at 37°C, while the wild type is not affected.

Western data show that the loss of NuA4 activity is in fact due to the disappearance of the complex from these fractions. Direct fractionation of the extracts by gel filtration confirmed that NuA4 activity was lost in the mutant cells at the restrictive temperature (data not shown). This clearly demonstrates the essential role of the subunit Act3/Arp4 for the NuA4 complex activity *in vivo*.

Act3/Arp4 Can Bind Histones and Nucleosomal Core Particles

Act3/Arp4 is the closest yeast homolog of the mammalian actin-related protein BAF53 (Harata et al., 1999a). BAF53 and β -actin subunits have been implicated in mammalian SWI/SNF-regulated binding to the chromatin/nuclear matrix (Zhao et al., 1998). Harata and colleagues have shown that Act3 possesses an insertion of 83 amino acids that is not present in other yeast Arps, and that this region is able to interact with histones by far-Western and two-hybrid analysis (Harata et al.,

1999b). They also found partial cofractionation of histone H2A with Act3 from yeast extracts. Interestingly, increased dosage of *ACT3* suppresses the cold-sensitive phenotype caused by a mutant histone H2A (Hirschhorn et al., 1995; Pinto and Winston, 2000). Finally, in agreement with a role in reconfiguration or maintenance of chromatin structure, episomal DNA molecules in *act3-3* mutant cells seem to have an altered chromatin structure (Harata et al., 1999b).

Esa1 alone is not able to efficiently acetylate histones in the context of chromatin, suggesting that certain subunit(s) in the native NuA4 complex are required to target its HAT activity to nucleosomal histone substrates (Ailard et al., 1999). Its protein characteristics make Act3/Arp4 a likely candidate for this role in NuA4. Using GST-histone tail fusion proteins, we detected a direct stable interaction between Act3 and a mixture of all four core histones covalently linked to agarose beads (Figure 4A, lane 8). Act3 also stably bound histone H3, H4, and H2A

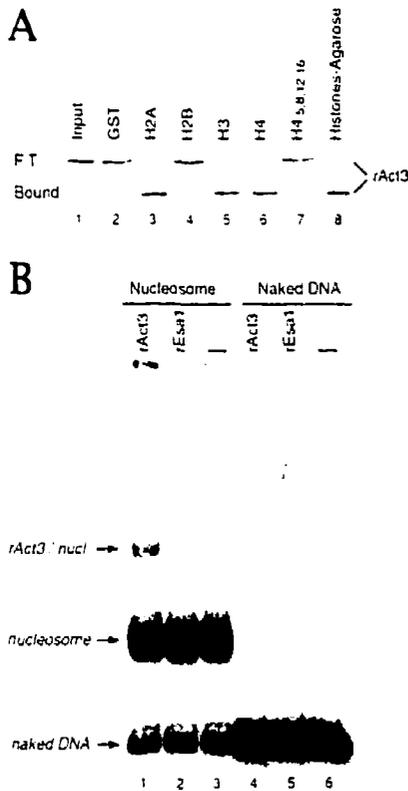


Figure 4. Binding of Act3/Arp4 to Nucleosomes

(A) Pull-down assays showing stable interaction between rAct3 and histone tails. rAct3 was incubated with GST-histone tail beads. After washes, equivalent amounts of input, flowthrough, and bound fractions were probed by Western blot. Binding was observed with mixed core histones, H2A, H3, and H4 tails (lanes 3, 5, 6, and 8) but not with GST alone, the H2B tail, or the mutant H4 tail (lanes 2, 4, and 7).

(B) Mobility shift assay of rAct3 binding to mononucleosomes. A 5S nucleosome-positioning sequence was reconstituted into mononucleosome core particles and incubated with equivalent amounts of recombinant Act3 or Esa1 (lanes 1–3). A ternary complex was detected between rAct3 and nucleosomes (lane 1), but not with the mock reconstituted DNA (lane 4) or the samples containing rEsa1 (lanes 2 and 5).

N termini, but not histone H2B or the GST control (lanes 3–6 versus 1 and 2). Interestingly, substituting the four conserved lysine residues for glutamine in the H4 tail completely eliminates the interaction with Act3/Arp4 (compare lanes 6 and 7). These four lysine residues can all be acetylated by NuA4 within a nucleosome (Allard et al., 1999; Ohba et al., 1999). We then investigated the ability of Act3 to interact with nucleosomal core particles using nucleosome-reconstituted 5S RNA gene probes in a mobility shift assay (Côté et al., 1998) (Figure 4B). When Act3 was incubated with free DNA (subjected to mock reconstitution, lanes 4–6) or nucleosomes (lanes 1–3), a slower migrating band was detected only in the presence of nucleosomes, indicating the formation of a stable ternary complex between the protein and nucleosome cores. Esa1 was unable to form a ternary complex with nucleosomes (lane 3). The use of hyperacetylated histones in the reconstitution had no apparent effect on

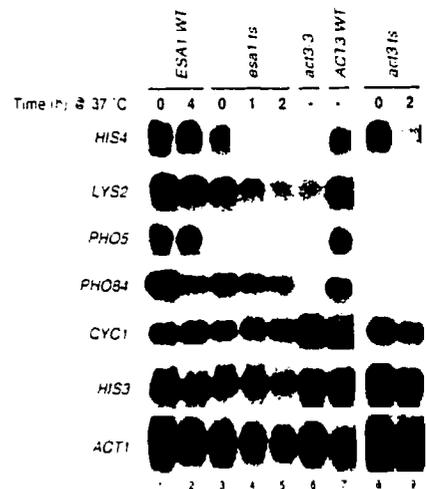


Figure 5. NuA4 Regulates Gene-Specific Transcription In Vivo

Mutations in ACT3 and ESA1 affect transcription of specific genes. *ESA1*, *esa1-Δ414* ts mutant, *ACT3*, *act3-3*, and *act3-26* ts mutant strains were grown in YPD at room temperature to an OD_{600} of 1.0 and were then shifted or not to restrictive temperature (37°C) for the time indicated. Total RNA was extracted, and a Northern blot was performed using DNA probes specific for the genes indicated on the left.

Act3 binding (data not shown). This result was surprising, as models for regulation by HATs via targeting proteins would have the protein complex only bind to under-acetylated nucleosomes. Perhaps the H4 molecules must be fully tetra-acetylated to prevent Act3 binding, or Act3 binding may also occur through other domains in the nucleosome core particle. Nevertheless, these results indicate that Act3/Arp4 is able to interact with nucleosomes, and that this could be an essential chromatin-interacting domain for the NuA4 complex, providing substrate access to Esa1 HAT activity. A mixture of Act3 and Esa1 alone is not sufficient to enable nucleosomal HAT activity, arguing that other subunits in NuA4 are required to bridge the two proteins or to provide full chromatin modifying capability (data not shown).

Specific Genes Require Both Act3/Arp4 and Esa1 for Normal Expression

It was shown previously that the *act3* mutation affects expression of not only *his4-912δ* and *his4δ-ADE2* alleles but also wild-type *HIS4* and *LYS2* genes (Jiang and Stillman, 1996). Since Act3/Arp4 is present with Esa1 in the NuA4 complex, we determined whether an *esa1* ts mutation (*esa1-Δ414*; Clarke et al., 1999) would create similar transcriptional defects. Total RNA was prepared from wild-type and mutant exponentially growing cells placed at the nonpermissive temperature for varied lengths of time. Northern analysis was then performed to evaluate the expression of several unrelated genes in rich media (Figure 5). Indirect effects due to accumulation at a specific cell cycle position are unlikely since both ts mutant strains used in this study show normal distribution at room temperature and require at least 4 hr at 37°C before cell cycle arrest is detected (FACS analysis, data not shown). As expected, *act3-26* mutant

cells showed strong defects in *HIS4* and *LYS2* gene expression (lanes 6–9), while wild-type cells demonstrated no effect at 37°C (compare lanes 1 and 2). However, in *esa1* mutant cells there was a significant decrease in *HIS4* and *LYS2* mRNA levels, which was apparent after only 1 hr at 37°C (lanes 3–5). Interestingly, both *esa1* and *act3* mutants also showed a strong defect in basal expression of *PHO5*, a gene highly regulated through specific chromatin structure over its promoter (Svaren and Horz, 1997). On the other hand, levels of *CYC1*, *HIS3*, and *ACT1* mRNA were not significantly affected by the mutations. These findings firmly link the NuA4 complex to transcription regulation of specific genes in vivo. Importantly, it is noted that *PHO84* gene expression is affected by mutations in *act3* but not *esa1* (Figure 5; mRNA decrease in *esa1* cells is only due to the heat shock; see wild-type control). A possible explanation is that less than 5% of nuclear Act3/Arp4 is associated with the NuA4 complex (data not shown). In agreement with our data, Carl Wu's lab has found Act3/Arp4, actin, and other Arps in the yeast Ari1 complex, a chromatin remodeling complex harboring ATPase activity and implicated in transcription (Shen et al., submitted). Additionally, *act3* and *esa1* mutant cells placed at the nonpermissive temperature have different cell cycle phenotypes in that *act3* cells accumulate in the S phase while *esa1* cells arrest in G2/M (data not shown; Clarke et al., 1999). Thus, while the *HIS4*, *LYS2*, and *PHO5* genes clearly require NuA4, *PHO84* expression may depend on Ari1 or another Act3-containing complex that lacks Esa1.

Results from chromatin immunoprecipitations (ChIPs) using affinity-purified anti-Esa1 antibodies suggest direct involvement of NuA4 at the *HIS4* promoter in vivo. Bound and unbound DNA fractions were analyzed by Southern hybridization using *HIS3* and *HIS4* promoter probes successively. Strikingly, anti-Esa1 pelleted significant levels of *HIS4* promoter sequences while most of *HIS3* promoter remained in the supernatant (data not shown). Preliminary genetic data also suggest that mutation of *ESA1* can provoke variegated expression of the *his4 δ -ADE2* allele, as in the case of *ACT3/ARP4* (data not shown) (Jiang and Stillman, 1996). These data support a specific and direct regulatory role of the NuA4 complex at the *HIS4* promoter, but not at *HIS3*, in agreement with the Northern analysis.

The *EPL1* Gene Product Is Also Part of NuA4 and Essential for Viability

Thirty-three unique peptides were obtained by mass spectrometry analysis from the NuA4 p105 subunit. All of these peptides correspond to sequences from the *EPL1* gene product, covering 46% of protein (Figure 6A, amino acids in bold). The gene encodes an 832 amino acid protein that has a predicted molecular mass of 96.7 kDa (Stankunas et al., 1998). The gene product has no known function, but the fact that it has an N-terminal 325 amino acid domain that is 26% identical and 46% similar to a domain in *Drosophila* Enhancer of Polycomb, *E(Pc)*, led to the yeast gene being named *EPL1* for Enhancer of Polycomb-like protein (Figure 6A, amino acids in italics). Epl1 contains alanine and glutamine repeats,

which are also present in *E(Pc)* and its mammalian homologs (Stankunas et al., 1998). To confirm stable association with the NuA4 complex, Epl1 was produced in yeast as a HA-tagged version on an episomal vector. Western analysis on Superose 6 fractions confirmed Epl1 coelution with the NuA4 subunits Esa1 and Act3/Arp4 (Figure 6B). Furthermore, immunoprecipitation of NuA4 using Esa1 or HA-Act3 as baits gave equivalent recovery of the Epl1 band, clearly showing that it is a stable subunit of the complex (Figure 2E). The *EPL1* gene was disrupted in order to determine whether the gene is essential for viability. The gene was disrupted in diploid strains as described in Experimental Procedures, and its requirement for cell growth was examined by tetrad analysis (Figure 6C). Four representative tetrads are shown, each producing only two viable spores (lanes 1–4). Microscopy analysis indicated that the spores carrying the disrupted gene stopped dividing at the 4-cell stage (data not shown). The growth defect was suppressed by episomal expression of the wild-type gene (lane 5). As for the other identified NuA4 subunits, the *EPL1* gene product is essential for growth in yeast, underscoring again the functional importance of the complex in the cell.

The *EPL1* homolog in *Drosophila*, *E(Pc)*, has striking features that suggest a fundamental role in the regulation of chromatin structure and gene expression (see Discussion), which fits well with our finding of its yeast counterpart in the NuA4 HAT complex.

NuA4 Is Precisely Localized in the Nucleus and Does Not Overlap with Silent Chromatin

The Epl1 homolog *E(Pc)* binds to about 100 sites on polytene chromosomes (Stankunas et al., 1998). This limited number of binding sites suggested that a yeast Epl1-containing complex, NuA4, might also be highly localized within the nucleus. To answer that question, we determined NuA4 localization in yeast diploid cells by immunofluorescence using standard and confocal microscopy. The use of affinity-purified Esa1 antibodies reflects NuA4 localization since all detectable cellular Esa1 is found associated with the complex in exponentially growing cells (Allard et al., 1999). Figure 7 shows representative results. Different methods of cell fixation were tested, all giving similar Esa1 staining (data not shown). Interestingly, a very precise and structured nuclear staining was obtained with Esa1 antibodies (Figure 7A). Confocal analysis also showed that these very discrete nuclear dot signals were found dispersed throughout the nuclear volume. In a striking comparison, in the same cells, HA-Act3/Arp4 is also nuclear, but its signal is much more diffuse, filling the nucleus completely. This agrees with the observation that more than 95% of cellular Act3/Arp4 is not associated with NuA4 and present in at least one other protein complex (data not shown; Shen et al., submitted). We then wanted to determine the physical relationship between the Esa1/NuA4 intranuclear localization and yeast transcriptionally silent chromatin. We used an antibody against the N-terminal of Sir3, a protein involved in silencing and an excellent marker of telomeric heterochromatin. Figure 7B shows a representative superimposed image of Esa1 (red), Sir3 (green), and DNA (blue) staining. As reported

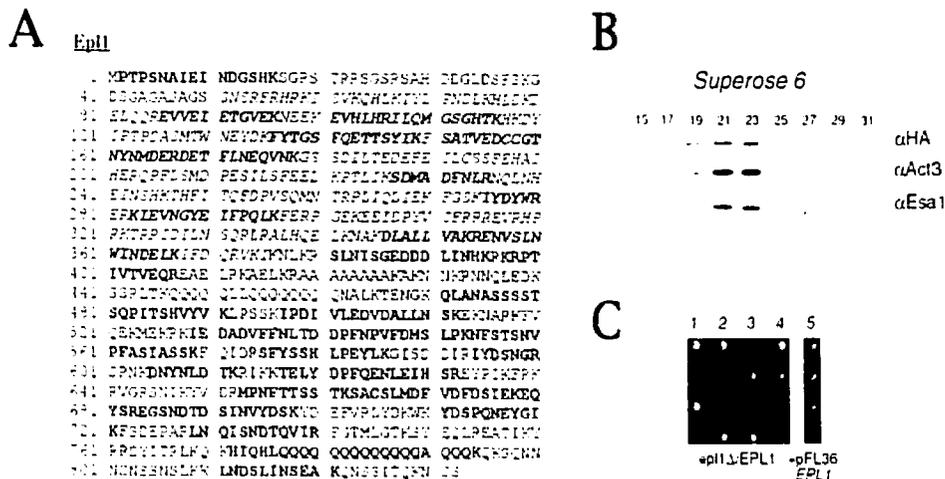


Figure 6. Epl1 Is a Component of the NuA4 Complex and Is Essential for Cell Viability

(A) Amino acid sequence of Epl1. Peptide sequences obtained by MS/MS analysis are in bold. The region homologous to *Drasophila* E(Pc) domain A (EPcA; Stankunas et al., 1998) is shown in italics.
 (B) Coelution of Epl1 with NuA4. HA-Epl1 was expressed in *S. cerevisiae* after transformation with pBFG1-Epl1 plasmid. Yeast protein extract was prepared and sequentially fractionated over Ni²⁺-agarose, Mono Q, and Superose 6 columns. Aliquots from the Superose 6 fractions were probed with anti-HA, anti-Esa1, and anti-Act3 serums to show perfect coelution of the HA-Epl1 with NuA4 subunits.
 (C) Deletion of the *EPL1* gene is lethal, and *ep1* null mutants are rescued by expression of wild-type *EPL1*. The BMA41 diploid strain was disrupted in one *EPL1* allele and submitted to sporulation and tetrad dissection. In each case, only two spores were viable after tetrad dissection (lanes 1–4). Episomal expression of *EPL1* in an *ep1*Δ/*EPL1* clone can complement the growth defect since all spores are viable (lane 5).

in the literature (Gotta et al., 1996, and references therein), Sir3 antibodies clearly stained telomeres clustered together in multiple foci at the nuclear periphery (confirmed by confocal analysis). Colocalization analysis determined that less than 5% of Esa1/NuA4 signals were in the vicinity of Sir3. The nonoverlapping localizations of Esa1 and Sir3 support the proposal that histone H4 acetylation would have a destabilizing effect on the SIR complex binding, thus disabling "heterochromatinization" (Hecht et al., 1995; Grunstein, 1998). In conclusion, the NuA4 acetyltransferase binds to a limited number of chromatin sites, and its action at these specific loci is required for cell cycle progression.

Discussion

We have identified three novel subunits of the essential NuA4 HAT complex, Act3/Arp4, Act1, and Epl1. Like the previously identified subunits Esa1 and Tra1, these proteins are all required for yeast cell viability, again highlighting the unique role of NuA4 as the only known essential HAT complex in yeast. Our data, in addition to the genetic characteristics of *ACT3/ARP4*, *ACT1*, and *EPL1*, clearly tie chromatin structure modulation by NuA4 to the control of transcription *in vivo*.

Binding of NuA4 to Chromatin

Our immunofluorescence data demonstrates very precise intranuclear localization of NuA4 (Figure 7), implying that the complex is bound to a limited number of sites on chromatin. The finding of actin and the actin-related protein Act3/Arp4 as subunits of NuA4 is novel, and our data argues for their involvement in chromatin binding.

Actin-related proteins have been found in other chromatin remodeling complexes, suggesting a central related role. Arp7 and Arp9 are subunits shared by the yeast SWI/SNF and RSC complexes (Cairns et al., 1998; Peterson et al., 1998). Multiple Arps including Arp4 and actin are also subunits of the yeast Ari1 complex (Shen et al., submitted). In addition, Arp4-related BAF53 and β-actin are components of the human SWI/SNF complex and could play a role in its signal-regulated binding to the chromatin/nuclear matrix (Zhao et al., 1998). Consistent with an important role for Act3/Arp4 in chromatin function, it was shown that increased dosage of *ACT3/ARP4* suppresses the cold-sensitive phenotype caused by a mutant histone H2A (Pinto and Winston, 2000). Interestingly, Harata and colleagues have recently demonstrated that a specific domain of Act3/Arp4 can interact with core histones and that episomal DNA molecules have a different topology in *act3* mutant cells (Harata et al., 1999b). Our data extend the physical link between histones and Act3/Arp4, demonstrating that Act3/Arp4 and nucleosomes can form a ternary complex in solution (Figure 4). Furthermore, we demonstrate that Act3/Arp4 can interact through the N-terminal domains of histones H3, H4, and H2A. Since Esa1 can only acetylate nucleosomal histones as part of the NuA4 complex, we propose that the Act3/Arp4 subunit functions by promoting the binding of NuA4 to chromatin.

NuA4 and Epigenetic Control of Transcription

The results presented here establish multiple links between the NuA4 complex and the epigenetic control of transcription. Histone modification through acetylation can be a key player in the establishment of distinct

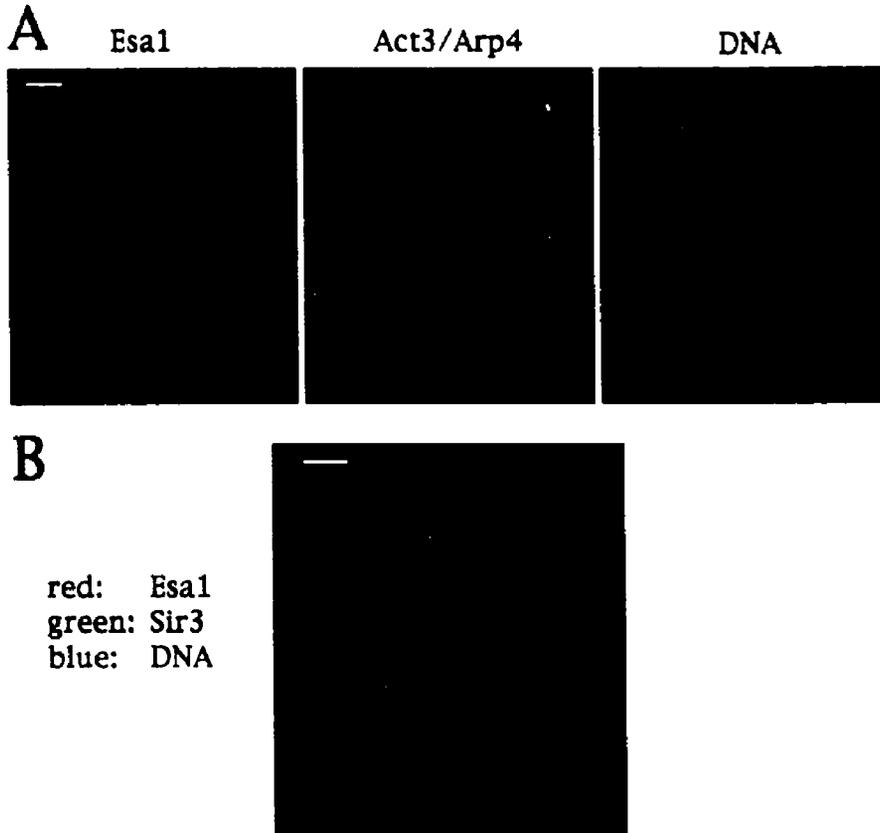


Figure 7. Immunolocalization of the NuA4 Complex

(A) NuA4 is localized in precise foci within the nucleus. Spheroblasts from a diploid strain (*ACT3/ACT3-HA*) were first incubated with anti-Esa1 (green) and anti-HA (Act3/Arp4, red). DNA staining of the same cells by DAPI is also shown (bar, 2.5 μ m).

(B) NuA4 and the silent chromatin marker Sir3 show mutually exclusive distributions in the nucleus. Superimposed images obtained with anti-Esa1 (red), with anti-Sir3 (green), and after DAPI staining (blue) are presented (bar, 2.5 μ m).

heritable states from the same genetic sequence (Lewin, 1998, and references therein). *ACT3* has been implicated in a specific form of epigenetic control of gene expression (Jiang and Stillman, 1996). Genotypically identical *act3* mutant cells show variegated expression of a δ element-inactivated *HIS4* gene promoter. This heritable but also reversible variegated expression of a gene is different from classical position effect variegation (PEV) and telomere position effect (TPE) because the phenotype is decided by the choice of transcription start sites from the natural *HIS4* site or from the δ element. The fact that Epl1 was found to be an integral member of NuA4 further supports a role for the complex in epigenetic control of transcription. The *EPL1 Drosophila* homolog, *E(Pc)*, is a member of the Polycomb group (PcG) of proteins, which are required for epigenetic silencing of homeotic loci during development, possibly through regulatory mechanisms involving chromatin (Stankunas et al., 1998). Furthermore, mutations in *E(Pc)* strongly suppress *Drosophila* PEV, which is thought to occur through spreading of repressive heterochromatin over adjacent genes (Sinclair et al., 1998). Since *E(Pc)* mutations by themselves do not result in homeotic transformation (they are enhancers of mutations in certain PcG genes) and chromatin binding sites for *E(Pc)* have limited

overlap with other PcG proteins, it has been suggested that this protein has an indirect effect on PEV and repression by PcG proteins, probably by regulating genes required for heterochromatin formation (Stankunas et al., 1998). It has also been suggested that *E(Pc)* might physically interact or modify the chromodomains of certain PcG proteins (Kennison, 1995). Interestingly, NuA4 contains two subunits harboring chromodomains, Esa1 and p47 (A. Eisen, S. A., A. N., P. Schmidt, J. S., W. S. L., J. C. Lucchesi, and J. C., unpublished data; Hilfiker et al., 1997). Finally, the NuA4 subunit Esa1 is homologous to *Drosophila* MOF, the HAT subunit of the dosage compensation complex (MSL) that is required for histone H4 acetylation and hypertranscription of the X chromosome in males (Hilfiker et al., 1997; Smith et al., 2000). Taken together, these data strongly support a role for the NuA4 complex in epigenetic control of transcription through chromatin modification.

Role of NuA4 in Transcriptional Activation

A number of reports have established that the purified NuA4 complex activates transcription from chromatin templates in vitro (Steger et al., 1998; Utley et al., 1998; Ikeda et al., 1999; Wallberg et al., 1999). We now present

in vivo data supporting a role in gene-specific transcription regulation. Normal expression of *HIS4*, *LYS2*, and *PHO5* genes requires a functional NuA4 complex (Figure 5). NuA4 can interact with Gcn4 activation domain *in vitro*, an interaction that could account for its recruitment to the *HIS4* promoter (Utley et al., 1998). On the other hand, this interaction would not be functionally sufficient since Gcn4 is also involved in the NuA4-independent *HIS3* transcription. Further studies are needed to determine the mechanism by which NuA4 affects expression of these genes and the possible interplay with other chromatin modifying activities such as the SAGA complex. It is possible that NuA4 creates a large acetylated H4-containing chromatin domain, while SAGA modifies histone H3 at the promoter region (Kuo et al., 1998). A human complex homologous to NuA4 has been recently purified by the Nakatani lab (Ikura et al., submitted). It contains close homologs of all the NuA4 subunits identified so far. The human HAT subunit is Tip60, a protein implicated as a transcriptional coactivator of HIV and nuclear hormone receptors (Yamamoto and Horiuchi, 1997; Brady et al., 1999).

In conclusion, chromatin structure modification by the NuA4 complex is important for the cell, as mutations in NuA4 components affect cell cycle progression, reduce transcription of specific genes, and cause epigenetic effects on gene expression. Identification and characterization of the remaining subunits, along with screens for conditional mutants, suppressor genes, and target promoters/transcription activators, will allow in-depth studies of the functional link between NuA4's role in transcription and its requirement for cell cycle progression.

Experimental Procedures

Strains and Reagents

The *S. cerevisiae* strains CY396 and BMA41 have been described (Baudin et al., 1993; Paterson et al., 1994). BY4741 was obtained from Research Genetics. Strains LPY3317 (*ESA1*), LPY3123 (*esa1-Δ14*), DY3460 (*ACT3:URA3*), DY3558 (*HA-ACT3*), DY1880 (*ACT3*), and DY3335 (*act3-3*) were described (Jiang and Stillman, 1996; Clarke et al., 1999). Temperature-sensitive alleles of *ACT3* were obtained using the plasmid shuffle method (Sikorski and Boeke, 1991) in DY3677 (*act3::TRP1 ade2 can1 his3 leu2 trp1 ura3*). Two clones were obtained, the *act3-ts12* allele and the *act3-ts26* allele (G455S and G187R amino acid substitutions, respectively), and were used to replace the native *ACT3* allele of DY3460, yielding strains DY4519 and DY4285. The *EPL1* ORF was cloned in pBFG1 (Nourani et al., 1997) for HA-Epl1 expression in BY4741. PCR-mediated *EPL1* deletion using *TRP1* marker followed by sporulation and tetrad dissection was according to standard protocols. For strain rescuing, *HA-EPL1* was expressed from pFL36 (Bonneaud et al., 1991). Histagged recombinant Esa1 and Act3 were produced by cloning into pET15b (Novagen) and purified following standard procedure. Bacterial strains expressing GST N-terminal histone tail fusion proteins have been described (Hecht et al., 1995). Anti-Tra1 and affinity-purified anti-Esa1 sera have been described (Grant et al., 1998; Allard et al., 1999). Anti-Act3 was produced against a region unique to Act3 (amino acids 269–387). Anti-Sir3(N), anti-actin(I), anti-Ach4, anti-HA, and anti-penta-His antibodies were purchased from Santa-Cruz, Upstate, Babco, and Qiagen. HeLa H1-depleted oligonucleosomes and free core histones were purified as described (Côté et al., 1995). Due to space restrictions, full details on strains and plasmid constructions are available upon request.

NuA4 Purification, Immunoprecipitations, and Peptide Sequencing

Partial purification of the NuA4 complex by fractionation over Ni²⁺-NTA agarose (Qiagen), Mono Q HR 5/5, and Superose 6 HR 10/

30 columns (Pharmacia) and histone acetyltransferase assay on oligonucleosomes have been described (Allard et al., 1999). For the Act3 mutant analysis, protein extract was prepared from 4 liter cultures grown at room temperature or at 37°C. Immunoprecipitation of the NuA4 complex was performed on the peak Superose 6 fraction as described (Allard et al., 1999). NuA4 105, 58, and 44 kDa SDS-PAGE excised bands were subjected to in-gel reduction, carboxyamidomethylation, and tryptic digestion (Promega). Ion trap mass spectrometry and peptide sequencing were performed as described (Sun et al., 1999).

Pulldown and Mobility Shift Assays

For pulldown assays, 100 ng of the recombinant proteins were pre-cleared before incubation with GST-histone tail fusion peptides, or histone-agarose beads (Sigma). Binding was carried out essentially as described (Utley et al., 1998) in 100 mM NaCl, and equivalent amounts of initial, bound, or free fractions were resolved on a 10% SDS-PAGE. Mononucleosome reconstitution of the 5S RNA gene probe for the mobility shift assays was described (Côté et al., 1998). Recombinant Act3 or Esa1 (25 ng) was allowed to bind to 12.5 ng of total nucleosomes (containing reconstituted or naked DNA probe) in the binding buffer for 2 hr at 4°C, and the complexes were resolved on a 4% PAGE/0.5 × TBE gel.

Northern Blot Analysis and Chromatin Immunoprecipitations

Total yeast RNA was isolated by hot phenol method (Schmitt et al., 1990). RNA (15–20 μg) was separated by electrophoresis on a formaldehyde-agarose gel, blotted, and UV-cross-linked to a nylon membrane (Amersham). Hybridization was performed in 0.5 M phosphate buffer (pH 6.8), 7% SDS, and 1% BSA. Probes used were ORFs from *HIS4*, *PHO5*, *PHO84*, *CYC1*, *HIS3*, and *ACT1* obtained by PCR and the 1.15 Kb NcoI-BglII fragment from the *LYS2* ORF. Chromatin immunoprecipitation and slot blot were performed as described (Kuo and Allis, 1999). Culture equivalent (2.5 ml) was used with αEsa1 or αAch4. The same blotted DNA fractions were probed with labeled promoter-specific fragments from *HIS3* (–269 to –2) and *HIS4* (–351 to –34).

Immunolocalization

Preparation of spheroblasts from yeast diploid cells (cross between DY3558 and W303α, *ACT3-HA/ACT3*) and immunolocalization were performed as described (Pringle et al., 1991; Gotta et al., 1999). Incubation with affinity-purified αEsa1 (1/100 dilution), αHA (1/200), and αSir3 (1/100) were done for 1 hr at 37°C or 8 hr at 4°C. Secondary antibody incubation was carried out for 1 hr with αGoat-alexa488, αMouse-alexa568 or αRabbit-alexa568 (Molecular Probes) at 10 ng/μl. The DNA was stained with DAPI (60 nM). Preparations were observed under an epifluorescence microscope (Nikon eclipse 600). The 3-D studies were performed with 0.2 μm-thick sections produced by Confocal Laser Scanning Microscopy (Bio-Rad 1024).

Acknowledgments

We are grateful to A. Clarke and L. Pillus for *ESA1* and *esa1-Δ14* ts strains; to U. Wintersberger, Y. Nakatani, F. Winston, and C. Wu for sharing results before publication; to M. Grunstein for bacterial strains expressing GST-histone tails; and to J. Workman for anti-Tra1, constant support, and encouragement. We also wish to thank R. Hancock for supporting L. N. during the course of this work; N. Marcoux, D. Pallota, and Y. Bourbonnais for their help in yeast tetrad analysis; K. Pierce for expert microcapillary HPLC/mass spectrometry; H. Brock and K. Stankunas for insights on *EPL1*; and R. Utley for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MRC) to J.C., and National Institutes of Health to D. J. S. A. N. is an MRC postdoctoral fellow and A. A. B. is a Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) graduate student. J. C. is an MRC scholar.

Received January 26, 2000; revised May 3, 2000.

References

- Allard, S., Utley, R.T., Savard, J., Clarke, A., Grant, P., Brandl, C.J., Pillus, L., Workman, J.L., and Côté, J. (1999). NuA4, an essential transcription adaptor/histone H4 acetyltransferase complex containing Esa1p and the ATM-related cofactor Tra1p. *EMBO J* 18, 5108–5119.
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., and Cullin, C. (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 21, 3329–3330.
- Bonneaud, N., Ozier-Kalogeropoulos, O., Li, G.Y., Labouesse, M., Minvielle-Sebastia, L., and Lacroute, F. (1991). A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/*E. coli* shuttle vectors. *Yeast* 7, 609–615.
- Borrow, J., Stanton, V.P., Andresen, J.M., Becher, R., Behm, F.G., Chaganti, R.S.K., Civin, C.I., Distche, C., Dubé, 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. *Nature Genet.* 14, 33–41.
- Brady, M.E., Ozanne, D.M., Gaughan, L., Waite, I., Cock, S., Neal, D.E., and Robson, C.N. (1999). Tip60 is a nuclear hormone receptor coactivator. *J. Biol. Chem.* 274, 17599–17604.
- Cairns, B.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Winston, F., and Kornberg, R.D. (1998). Two actin-related proteins are shared functional components of the chromatin-remodeling complexes RSC and SWI/SNF. *Mol. Cell* 2, 639–651.
- Clarke, A.S., Lowell, J.E., Jacobson, S.J., and Pillus, L. (1999). Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Mol. Cell Biol.* 19, 2515–2526.
- Côté, J., Utley, R.T., and Workman, J.L. (1995). Basic analysis of transcription factor binding to nucleosomes. *Methods Mol. Genet.* 6, 108–128.
- Côté, J., Peterson, C.L., and Workman, J.L. (1998). Perturbation of nucleosome core structure by the SWI/SNF complex persists following its detachment, enhancing subsequent transcription factor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4947–4952.
- Eberharter, A., Stermer, D.E., Schieltz, D., Hassan, A., Yates, J.R., III, Berger, S.L., and Workman, J.L. (1999). The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 19, 6621–6631.
- Gotta, M., Laroche, T., Formenton, A., Maillet, L., Scherthan, H., and Gasser, S.M. (1996). The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 134, 1349–1363.
- Gotta, M., Laroche, T., and Gasser, S.M. (1999). Analysis of nuclear organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* 304, 663–672.
- Grant, P.A., Duggan, L., Côté, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L., and Workman, J.L. (1997). Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev.* 11, 1640–1650.
- Grant, P.A., Schieltz, D., Pray-Grant, M.G., Yates, III, J.R., and Workman, J.L. (1998). The ATM-related cofactor Tra1 is a component of the purified SAGA complex. *Mol. Cell* 2, 863–867.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349–352.
- Grunstein, M. (1998). Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell* 93, 325–328.
- Harata, M., Karwan, A., and Wintersberger, U. (1994). An essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* coding for an actin-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8258–8262.
- Harata, M., Mochizuki, R., and Mizuno, S. (1999a). Two isoforms of a human actin-related protein show nuclear localization and mutually selective expression between brain and other tissues. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 917–923.
- Harata, M., Oma, Y., Mizuno, S., Jiang, Y.W., Stillman, D.J., and Wintersberger, U. (1999b). The nuclear actin-related protein of *Saccharomyces cerevisiae*, Act3p/Arp4, interacts with core histones. *Mol. Biol. Cell* 10, 2595–2605.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S.M., and Grunstein, M. (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80, 583–592.
- Hilfiker, A., Hilfiker-Kleiner, D., Pannuti, A., and Lucchesi, J.C. (1997). mof, a putative acetyl transferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in *Drosophila*. *EMBO J.* 16, 2054–2060.
- Hirschhorn, J.N., Bortvin, A.L., Ricupero-Hovasse, S.L., and Winston, F. (1995). A new class of histone H2A mutations in *Saccharomyces cerevisiae* causes specific transcriptional defects in vivo. *Mol. Cell Biol.* 15, 1999–2009.
- Ikeda, K., Steger, D.J., Eberharter, A., and Workman, J.L. (1999). Activation domain-specific and general transcription stimulation by native histone acetyltransferase complexes. *Mol. Cell Biol.* 19, 855–863.
- Jiang, Y.W., and Stillman, D.J. (1996). Epigenetic effects on yeast transcription caused by mutations in an actin-related protein present in the nucleus. *Genes Dev.* 10, 604–619.
- Kennison, J.A. (1995). The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu. Rev. Genet.* 29, 289–303.
- Kuo, M.H., and Allis, C.D. (1999). In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* 19, 425–433.
- Kuo, M.H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M.E., and Allis, C.D. (1998). Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev.* 12, 627–639.
- Lewin, B. (1998). The mystique of epigenetics. *Cell* 93, 301–303.
- McMahon, S.B., Van Buskirk, H.A., Dugan, K.A., Copeland, T.D., and Cole, M.D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94, 363–374.
- Nourani, A., Wesolowski-Louvel, M., Delaveau, T., Jacq, C., and Delahodde, A. (1997). Multiple-drug-resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. *Mol. Cell Biol.* 17, 5453–5460.
- Ohba, R., Steger, D.J., Brownell, J.E., Mizzen, C.A., Cook, R.G., Côté, J., Workman, J.L., and Allis, C.D. (1999). A novel H2A/H4 nucleosomal histone acetyltransferase in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell Biol.* 19, 2061–2068.
- Peterson, C.L., Dingwall, A., and Scott, M.P. (1994). Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2905–2908.
- Peterson, C.L., Zhao, Y., and Chait, B.T. (1998). Subunits of the yeast SWI/SNF complex are members of the actin-related protein (ARP) family. *J. Biol. Chem.* 273, 23641–23644.
- Pinto, I., and Winston, F. (2000). Histone H2A is required for normal centromere function in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 19, 1598–1612.
- Poch, O., and Winsor, B. (1997). Who's who among the *Saccharomyces cerevisiae* actin-related proteins? A classification and nomenclature proposal for a large family. *Yeast* 13, 1053–1058.
- Pringle, J.R., Adams, A.E., Drubin, D.G., and Haarer, B.K. (1991). Immunofluorescence methods for yeast. *Methods Enzymol.* 194, 565–602.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A., and Trumpower, B.L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 18, 3091–3092.
- Sikorski, R.S., and Boeke, J.D. (1991). In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Methods Enzymol.* 194, 302–318.
- Sinclair, D.A., Clegg, N.J., Antonchuk, J., Milne, T.A., Stankunas, K., Ruse, C., Grigliatti, T.A., Kassis, J.A., and Brock, H.W. (1998).

Enhancer of Polycomb is a suppressor of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 148, 211–220.

Smith, E.R., Eisen, A., Gu, W., Sattah, M., Pannuti, A., Zhou, J., Cook, R.G., Lucchesi, J.C., and Allis, C.D. (1998). ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3561–3565.

Smith, E.R., Pannuti, A., Gu, W., Steumagel, A., Cook, R.G., Allis, C.D., and Lucchesi, J.C. (2000). The *Drosophila* MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 312–318.

Stankunas, K., Berger, J., Ruse, C., Sinclair, D.A., Randazzo, F., and Brock, H.W. (1998). The enhancer of polycomb gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein conserved in yeast and mammals. *Development* 125, 4055–4066.

Steger, D.J., Eberharter, A., John, S., Grant, P.A., and Workman, J.L. (1998). Purified histone acetyltransferase complexes stimulate HIV-1 transcription from preassembled nucleosomal arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12924–12929.

Struhl, K. (1998). Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* 12, 599–606.

Struhl, K. (1999). Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* 98, 1–4.

Sun, Y., Liu, X., Eaton, E.N., Lane, W.S., Lodish, H.F., and Weinberg, R.A. (1999). Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF β signaling. *Mol. Cell* 4, 499–509.

Svaren, J., and Horz, W. (1997). Transcription factors vs nucleosomes: regulation of the PHO5 promoter in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 22, 93–97.

Utley, R.T., Ikeda, K., Grant, P.A., Côté, J., Steger, D.J., Eberharter, A., John, S., and Workman, J.L. (1998). Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* 394, 498–502.

Wakimoto, B.T. (1998). Beyond the nucleosome: epigenetic aspects of position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell* 93, 321–324.

Wallberg, A.E., Neely, K.E., Gustafsson, J.-A., Workman, J.L., Wright, A.P.H., and Grant, P.A. (1999). Histone acetyltransferase complexes can mediate transcriptional activation by the major glucocorticoid receptor activation domain. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5952–5959.

Weber, V., Harata, M., Hauser, H., and Wintersberger, U. (1995). The actin-related protein Act3p of *Saccharomyces cerevisiae* is located in the nucleus. *Mol. Biol. Cell* 6, 1263–1270.

Workman, J.L., and Kingston, R.E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 545–579.

Yamamoto, T., and Honkoshi, M. (1997). Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60. *J. Biol. Chem.* 272, 30595–30598.

Zhao, K., Wang, W., Fando, O.J., Xue, Y., Swiderek, K., Kuo, A., and Crabtree, G.R. (1998). Rapid and phosphoinositid-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell* 95, 625–636.