



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle de l'activité de l'histone acétyltransférase GCN5 au sein des complexes ATAC et SAGA chez l'homme

Anne Riss

► **To cite this version:**

Anne Riss. Caractérisation fonctionnelle de l'activité de l'histone acétyltransférase GCN5 au sein des complexes ATAC et SAGA chez l'homme. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ048 . tel-00868785

HAL Id: tel-00868785

<https://theses.hal.science/tel-00868785>

Submitted on 2 Oct 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ÉCOLE DOCTORALE VIE ET SANTÉ

IGBMC CNRS UMR7104

THÈSE présentée par :

Anne RISS

soutenue le : **12 septembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : **Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie**

**Caractérisation fonctionnelle de
l'activité de l'histone acétyltransférase
GCN5 au sein des complexes ATAC et
SAGA chez l'homme**

THÈSE dirigée par :
M. TORA Laszlo

DR, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Mme LEGUBE Gaëlle
M. BERGER Imre
M. SCHULTZ Patrick

CR, LBCMCP Toulouse
DR, EMBL Grenoble
DR, IGBMC Strasbourg

En raison du caractère confidentiel des informations contenues dans la Partie 3
de ce manuscrit, il est demandé au Jury et à l'Université
de ne pas diffuser le présent document.

Tableau annexe : Composition en sous-unités des complexes SAGA et ATAC contenant les HATs GCN5 et PCAF.

	Complexe SAGA			Complexe ATAC	
	ySAGA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	dSAGA <i>Drosophila melanogaster</i>	hSAGA <i>Homo sapiens</i>	dATAC <i>Drosophila melanogaster</i>	hATAC <i>Homo sapiens</i>
Module HAT	yGcn5	dGCN5	hGCN5/hPCAF	dGCN5	hGCN5/hPCAF
	yAda2	dADA2b	hADA2b	-	-
		-	-	dADA2a	hADA2a
	yADA3	dADA3	hADA3	dADA3	hADA3
	ySgf29	dSGF29	hSGF29	dSGF29	hSGF29
Module DUB	yUbp8	Nonstop	USP22	-	-
	ySgf73	CG9866	ATXN7	-	-
	ySgf11	dATXN7L3	hATXN7L3	-	-
	ySus1	dE(y)2	ENY2	-	-
Autres	Tra1	dTra1	TRRAP		
	ySpt3	dSPT3	hSPT3	-	-
	ySpt8	-	-	-	-
	yTAF5	dTAF5L/WDA	hTAF5L	-	-
	yTAF6	SAF6	dTAF6L	-	-
	yTAF9	dTAF9	dTAF9	-	-
	yTAF10	dTAF10	dTAF10	-	-
	yTAF12	?	dTAF12	-	-
	yAda1	dADA1	hADA1	-	-
	ySpt7	?	hSPT7	-	-
	ySpt20	dSPT20	hSPT20	-	-
	-	-	-	dATAC1	hZZZ3
	-	-	-	dATAC2	hATAC2
	-	-	-	dATAC3	-
	-	-	-	HCF	-
	-	-	-	WDS	WDR5
	-	-	-	D12	YEATS2
	-	-	-	CHRAC14	-
-	-	-	NC2β	NC2β	
-	-	-	CG10238	MBIP	

Les complexes ATAC et SAGA contenant GCN5/PCAF chez différents organismes (chez la levure, la drosophile et l'homme).

ATAC et SAGA sont deux complexes multiprotéiques contenant l'enzyme à activité histone acétyltransférase (HAT) GCN5 (en rouge). L'homologue de GCN5 est PCAF et il peut également faire partie de façon exclusive de ces complexes. Ces enzymes se retrouvent au sein d'un module dit « module HAT » en vert dans le tableau. Les complexes partagent des sous-unités communes (ADA3 et SGF29) mais possèdent en grande majorité des sous-unités spécifiques (ADA2a ou ADA2b et en noir dans le tableau).

? : présence de la sous-unités non démontrée

- : absence de la protéine dans le complexe.

Remerciements

J'aimerais remercier les membres du Jury, Dr Gaelle Legube, Dr Imre Berger et Dr Patrick Schultz pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

J'aimerais remercier Laszlo de m'avoir acceptée dans son équipe et de m'avoir donné ma chance. Je te remercie pour les conseils et le temps consacré quand j'étais perdue avec les manips, merci aussi pour les moyens que tu m'as apporté pour les réaliser. La thèse ce n'est pas seulement la science et ce qui s'y rapporte, mais c'est aussi une étape où on apprend à passer de l'éternel étudiant naïf et timide au jeune chercheur ambitieux et vacciné. Je te suis reconnaissante de m'avoir donné des responsabilités, de m'avoir fait rencontrer des collaborateurs et dirigée vers les bonnes personnes.

Merci aux membres de l'équipe, au présent et au passé pour votre aide, les conseils, les discussions et les bons moments passés ensemble : la clique du DUB Cheng-Yi, Didier, Jacques, Guillaume, Matthieu et David, my friends from the lonely evenings in the lab Akos and Nikolas, my two shining girls Monica and Anamika, mes compagnons de combat sous le drapeau « ATAC » Meritxell, Marjorie, Krishanpal et Arnaud, et aussi Laure, Anne, Sarina, Eli ainsi que les « extérieurs » à l'équipe qui pourtant étaient souvent là n'est-ce pas Thomas ;)

Une pensée particulière à Zita, merci de m'avoir encadrée à mon arrivée au laboratoire et d'avoir toujours été disponible pour moi, même après ton départ de l'équipe.

Merci également à Maria-Elena et à son équipe pour les discussions, les conseils et l'entraide.

I would like to thank also Andree Schram and Marc Timmers, Sally Fujiyama and Shigeaki Kato, Philipp Tropberger and Robert Schneider, Simon Trowitzsch, Grigory Sharov, Khalid Ouararhni, Christophe Papin and Ali Hamiche but also Judit and Gabor Osz-Papai for sharing knowledge, advises or technical materials.

Merci aussi aux membres des plateformes et services de l'institut pour leur apport non négligeable à notre travail de tous les jours : Pascal et Jean-Marie pour les peptides (et les bonnes blagues), Isabelle pour les baculovirus, Gabrielle et Dominique pour la radioactivité, Didier, Karim et Edouard de la plateforme de biologie moléculaire, Betty et les filles de culture cellulaire, Gilles pour les anticorps.

J'aimerais également penser à Jean-Luc Imler et à Bernard et Christine Thisse qui m'ont appris les bases du métier et conseillée avant mon entrée en Master et en thèse.

Je remercie aussi la Région Alsace, le consortium Epidiacan et l'ARC pour avoir supporter financièrement mon travail.

Franchir cette étape n'a pas toujours été facile et je pense qu'il me faut aussi remercier ici les gens extérieurs à la vie de laboratoire qui ont su m'apporter du courage au cours de ces dernières années.

Merci donc à tous mes amis pour leur humour et amitié sans faille : Judith, Michelle, la clique de Rosheim, la clique de la primaire, du collège-lycée, celle de la prépa mais aussi

celle de la fac, ainsi que les jeunes et moins jeunes, Dédé mon chauffeur, et ceux qui habitent plus ou moins loin (il n'y aura pas assez de place pour vous mettre tous ! Rendez-vous le 15 !). Merci aussi aux collègues devenues des amies : Angèle, Fernande.

Merci aussi à mon meilleur ami Cédric d'avoir été là que ce soit dans la joie ou dans les pleurs. Quand ce n'était pas toi qui avais besoin d'une épaule c'était moi, savoir qu'on a quelqu'un sur qui compter fait beaucoup !

Merci aussi aux membres de ma famille qui m'ont entourée depuis ma naissance : tata Mariette et tata Marie-Paule, tata Céline et Parinou pour ma dose de sucre et de bêtise quotidienne...

J'aimerais également remercier les « sensei » Thierry et Sylvain ainsi que les membres du club de Karaté Taijitsu de Strasbourg pour m'avoir appris à me battre autant physiquement que psychologiquement.

Une pensée toute particulière à Hélène. Malgré nos différences, qui aurait pu croire que deux sœurs comme nous s'entendraient aussi bien ? Merci de m'avoir apporté ta part de folie, de confiance et de « coaching » au cours de ces années. Je suis très contente que nous soyons toutes deux diplômées la même année !

Enfin un grand merci à ceux sans qui tout cela n'aurait été possible : maman et papa. Merci d'avoir financé mes études, de m'avoir nourrie de bons petits plats, permis de découvrir le monde et de m'avoir appris autant de choses. Mais aussi merci de m'avoir laissé choisir ma voie et surtout de m'avoir poussée et encouragée à accomplir mes rêves. Papouni, même si tu as été parfois maladroit, tu as su être à mes côtés et m'apporter beaucoup d'amour. Mamounette, il me faudrait une thèse pour dire tout ce que tu as fait pour moi ! Alors je dirais juste : tu es la meilleure !

A vous trois, merci d'être ma famille.

Avant-propos

Chez les eucaryotes, l'ADN localisé dans le noyau est associé à des protéines basiques, nommées histones, pour former la chromatine. La compaction de la chromatine constitue un obstacle majeur à la transcription en limitant l'accès de la machinerie transcriptionnelle. Afin de moduler la décondensation de la chromatine, les histones vont subir des modifications post-traductionnelles, dont l'acétylation. GCN5 (General Control Nonderepressible 5) est la première enzyme à activité histone acétyltransférase (HAT) identifiée ; elle fait partie du complexe SAGA (Spt Ada Gcn5 Acetyltransferase).

Au cours de ma thèse, nous avons montré que GCN5 fait partie d'un second complexe chez l'homme : le complexe ATAC (ADA Two A Containing).

Ma thèse s'articule autour de deux objectifs principaux. Dans un premier temps, je me suis intéressée à l'identification d'un complexe ATAC chez l'homme. Nous avons pu déterminer la composition en sous-unités de ce dernier et caractériser son activité sur les histones suite à un stress au TPA. Ces travaux ont mené à une publication qui sera présentée Partie 2. Dans un second temps, j'ai démontré que les sous-unités des complexes ATAC et SAGA agissent sur la régulation de l'enzyme GCN5. Les résultats obtenus seront utilisés en vu d'une publication. D'autres travaux sur ce thème seront également présentés. Cela constituera la Partie 3 de ce manuscrit.

Durant ma thèse, j'ai pu effectuer des expériences pour deux publications qui seront présentées brièvement dans ce rapport. Tout d'abord, le rôle de la protéine SPT20 dans le complexe SAGA suite au stress du réticulum endoplasmique, qui sera décrit dans la Partie 1. D'autre part, comment le complexe ATAC joue spécifiquement un rôle dans la mitose en acétylant une protéine non histone sera présenté dans la Partie 4.

Dans un souci de clarté, la Discussion et les Perspectives de chacune de ces études figureront à la suite des résultats au sein de leurs parties respectives. Chaque partie présentera donc les résultats publiés (ou en considération pour une publication) qui seront suivis de données non publiées et enfin, d'une section Discussion et Perspectives. Les protocoles des expériences présentées et les matériels utilisés (vecteurs, anticorps, peptides...) pour ces quatre études sont regroupés dans une section Matériels et Méthodes à la fin du rapport.

Ces quatre parties seront précédées d'une introduction générale présentant des données globales sur la transcription et la chromatine, l'acétylation des histones et les cofacteurs HAT, avant de présenter plus en détail l'état des connaissances sur les complexes SAGA et ATAC.

Table des Matières

Avant-propos.....	1
Liste des Figures	10
Liste des Tableaux	13
Résumé du travail de thèse.....	17
Introduction	22
A. Introduction à l'introduction	22
1. Un peu d'histoire... ..	22
2. Principes fondamentaux de la biologie moléculaire.....	23
B. La transcription par l'ARN Polymérase II.....	25
1. Les promoteurs	25
2. La machinerie transcriptionnelle de base et la transcription	25
C. La chromatine	27
1. Structure de la chromatine.....	27
a. Histones et nucléosomes	27
b. Compaction de la chromatine	29
2. Chromatine et transcription	31
3. Influence des modifications post-traductionnelles des histones.....	33
a. Les modifications des histones	33
b. L'hypothèse du code histone.....	36
D. Acétylation et décompaction de la chromatine.....	37
1. Comment l'acétylation influence la décompaction de la chromatine.....	37
2. Les enzymes et complexes HAT	37
3. Aparté : Acétylation et dégradation des protéines.....	39
E. GCN5 et PCAF, des enzymes à activité HAT	41
1. GCN5 : une enzyme à activité acétyltransférase	41
a. Découverte et caractérisation de l'enzyme GCN5	41
b. GCN5 est fortement conservée au cours de l'évolution	42
c. Structure de GCN5 et importance de ses domaines.....	43
i. Le domaine AT :	43

ii. Le bromodomaine	44
iii. Le domaine d'homologie PCAF	44
d. Une version courte de la protéine GCN5 est présente chez les métazoaires	45
2. PCAF : la protéine homologue de GCN5	45
3. GCN5 et PCAF acétylent les histones	47
4. GCN5 et PCAF acétylent des substrats de type non-histone.....	47
F. Les complexes multiprotéiques contenant GCN5	50
1. Le complexe SAGA.....	50
a. Mise en évidence de l'existence de SAGA chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
b. Le complexe SAGA chez les métazoaires : un seul et même complexe	51
c. Composition du complexe et caractéristiques.....	53
i. Un complexe multi-fonctionnel	53
ii. Fonction des principaux domaines structuraux retrouvés au sein de SAGA	54
iii. Structure et organisation du complexe SAGA	55
Structure globale :	55
Implication structurale des sous-unités au sein du complexe SAGA	56
d. SAGA et la régulation de la transcription.....	60
i. Recrutement de SAGA par les activateurs de la transcription	60
ii. Coopération entre SAGA et les complexes de remodelage	61
2. Les autres complexes contenant Gcn5 chez la levure	62
a. Le complexe ADA de levure	62
b. Le complexe SLIK	63
G. Découverte d'un second complexe contenant GCN5 chez les métazoaires : le complexe ATAC	64
1. Deux gènes codant pour ADA2 chez les eucaryotes supérieurs.....	64
2. ADA2a and ADA2b s'incorporent dans deux complexes différents	65
a. Découvertes chez la drosophile.....	65
i. Mise en évidence d'un complexe dATAC	65
ii. Activité d'acétylation des histones de dATAC	67
b. Qu'en est-il d'un tel complexe ATAC chez les mammifères ?	67
3. Spécificité d'action des complexes ATAC et SAGA	71
a. Spécificité de l'activité acétyltransférase d'ATAC et SAGA.....	71
i. Chez la drosophile	71
ii. La question de la spécificité chez l'homme	72

b. Rôles spécifiques d'ATAC et SAGA au cours de la régulation transcriptionnelle des gènes	73
--	----

Partie 1 : hSPT20 est une sous-unité de hSAGA et joue un rôle sur les gènes régulant la réponse au stress du réticulum endoplasmique 77

A. Problématique	78
B. Résumé de la publication.....	79
1. hSPT20 est une sous-unité du complexe hSAGA	79
2. Est-ce que hSPT20 peut être trouvé dans d'autres complexes ?	79
3. hSPT20 est recruté aux promoteurs des gènes induits par un stress ER	80
4. hSPT20 n'est pas recruté sur des gènes induits par d'autres stress	80
5. En absence de hSPT20, la structure du complexe hSAGA est déstabilisée et l'expression des gènes ER diminuée.....	80
C. Publication 1	81
D. Discussion et perspectives.....	82
1. SAGA : un complexe conservé au cours de l'évolution ?	82
2. Comment SAGA est-il recruté dans la réponse au stress ER ?	82
3. Comment SAGA agit-il sur les gènes ER ?.....	83
4. Existe-t-il un module DUB libre actif dans la cellule ?.....	83
5. hSAGA entre t'il dans la voie de signalisation de p38 MAPK ?	84

Partie 2 : Purification et caractérisation d'un nouveau complexe Histone AcétylTransférase, hATAC 85

A. Problématique	86
B. Résumé de la publication.....	86
1. Purification et composition du complexe hATAC	86
2. hATAC et hSAGA acétylent le même substrat d'histone H3K14 sur des peptides mimant les queues d'histones H3	88
a. Les complexes acétylent préférentiellement la lysine 14 de l'histone H3 sur des peptides.....	88
b. Les complexes présentent la même activité sur H3 dans le cas de protéines d'histones	88
c. ATAC2 ne présentent pas d'activité d'acétylation dans ces tests <i>in vitro</i>	88
3. ATAC2 a-t-elle une activité HAT au sein du complexe hATAC ?.....	89

4.	Les enzymes GCN5 et PCAF existent de façon exclusive dans les complexes	89
5.	L'absence de hATAC ou hSAGA dans les cellules induit une diminution des niveaux d'histones H3K9 et H3K14 acétylées, sans affecter l'acétylation de H4.....	90
6.	L'absence de hATAC dans les cellules HeLa conduit à une diminution du niveau de H3S10 phosphorylée	90
7.	ATAC et SAGA régulent différents gènes inductibles au stress.....	90
a.	Chez la drosophile, dATAC et dSAGA sont recrutés différemment sur les chromosomes polytènes suite à un stress au TPA.....	90
b.	Chez l'homme, hATAC est recruté sur les gènes d'expression immédiate, et non hSAGA.....	91
c.	Les gènes d'expression immédiate ne sont plus exprimés après traitement au TPA en absence de hATAC	91
d.	L'absence de hATAC dans les cellules perturbe l'acétylation des histones H3 des gènes IE	92
C.	Publication 2	92
D.	Résultats non publiés	93
1.	Estimation de la taille du complexe hATAC.....	93
2.	hATAC2 ne semble pas présenter d'activité HAT	95
a.	Activité de hATAC2 sur les histones.....	95
b.	ATAC2 a-t-elle besoin d'un partenaire pour exprimer son activité ?.....	96
3.	ATAC joue t'il un rôle dans le stress du réticulum endoplasmique comme SAGA ?	98
E.	Discussion et perspectives.....	99
1.	Pourquoi une telle disparité dans la taille du complexe hATAC ?.....	99
2.	La composition en sous-unités du complexe hATAC soulève encore des interrogations	100
3.	Apparition du complexe ATAC au cours de l'évolution.....	101
4.	Les différences entre les complexes ATAC humain et de drosophile.....	103
5.	La problématique ATAC2	104
6.	Pourquoi les cellules contiennent deux complexes contenant la même enzyme GCN5 ?	105
7.	SAGA est-il spécifique du stress endoplasmique par rapport à ATAC ?.....	106

Partie 3 : Les sous-unités des complexes hATAC et hSAGA régulent l'activité de l'enzyme GCN5..... 109

A. Problématique	109
B. Résultats obtenus en vue d'une publication	110
1. L'enzyme GCN5 a besoin d'un environnement multiprotéique pour exprimer son activité.....	110
2. Les protéines ADA2a et ADA2b agissent sur GCN5 au sein du module HAT	112
3. L'intégration de GCN5 dans le module HAT influe sur son activité, mais n'est pas encore suffisante pour obtenir l'activité du complexe endogène, que se soit sur des peptides ou des protéines histones	114
4. Le module rHAT ATAC est plus actif sur les histones H4 que rHAT SAGA.....	117
5. Quelles sont les résidus des octamères acétylés par ces différents contextes protéiques ?	118
6. Les modules rHAT et les complexes endogènes ne sont plus capable d'acétyler les histones dans le contexte du nucléosome dans les tests <i>in vitro</i> utilisés.....	120
7. Les sous-unités des complexes permettent le recrutement de l'enzyme sur la chromatine pré-modifiée	122
8. La sous-unité SGF29 permet un meilleur recrutement de GCN5 sur le substrat histone	124
C. Résultats non utilisés pour une publication	126
1. Construction de modules et agrandissement des complexes en utilisant des protéines recombinantes	126
a. Construction de modules rHAT partiels	126
b. Agrandissement du complexe hSAGA à partir du module rHAT	128
i. ADA1 et TAF12 interagissent avec le module HAT mais ne semblent pas agir sur l'activité de GCN5	128
ii. Il n'y a pas d'interaction entre les modules HAT et DUB	130
iii. Est-il possible de relier les modules rHAT et rDUB par d'autres protéines ? ..	131
iv. Les modules rHAT et rTAF n'interagissent pas	134
c. Agrandissement du complexe hATAC à partir du module rHAT	135
i. Il existe une très faible liaison entre hATAC2 et hWDR5.....	135
ii. ATAC2 et WDR5 ne semblent pas interagir avec le module HAT	137
2. K9 et K14 sont les cibles des complexes ATAC et SAGA, qu'en est-il des autres lysines ?.....	138
3. Existe-t-il une différence d'activité entre les enzymes GCN5 et PCAF ?.....	140

a.	Qu'en est- il de l'activité des enzymes recombinantes ?	140
b.	Comparaison des complexes ATAC et SAGA selon leur composition en GCN5 ou PCAF	142
4.	Les pré-modifications des histones peuvent-elle influencer le recrutement et donc l'activité des enzymes HAT ?	146
a.	Expériences sur des peptides pré-acétylés	146
i.	Activité de GCN5 et PCAF recombinantes sur des peptides H3 acétylés	146
ii.	Activité des modules recombinants HAT sur des peptides H3 acétylés	147
iii.	Activité des complexes endogènes sur des peptides H3 acétylés	149
b.	Expériences sur des peptides H3K9 diméthylés et H3S10 phosphorylés	151
c.	Expériences sur le peptide H3K4 triméthylé	153
5.	L'enzyme GCN5 peut-elle acétyler des sous-unités du complexe ?	154
D.	Discussion et perspectives.....	156
1.	Comprendre l'activité de GCN5 : bilan des résultats obtenus.....	156
2.	Comment expliquer la différence d'action d'ADA2a et ADA2b sur l'enzyme ? ...	158
a.	Rôles d'ADA2a et ADA2b selon les différentes espèces	158
b.	Localisation d'ADA2a et ADA2b dans la cellule.....	158
c.	Construire des mutants d'ADA2a/b	159
d.	Obtenir la structure des modules pour comprendre l'influence des protéines ADA2 160	
3.	Comprendre la structure des complexes	161
a.	Dans le cas de hSAGA	161
b.	Dans le cas de hATAC	163
4.	Pourquoi une telle différence d'activité entre des substrats octamères et nucléosomes ?	164
a.	Le rôle de GAL4VP16 dans le recrutement des complexes sur les nucléosomes	165
b.	Le rôle des pré-modifications dans le recrutement des complexes.....	165
c.	L'acétylation a-t-elle lieu avant l'incorporation de l'histone dans le nucléosome ? 166	
d.	Quel est le rôle des protéines chaperons ?	167
e.	L'interaction des complexes avec les nucléosomes serait-elle beaucoup plus difficile ?	168
f.	Qu'en est-il des niveaux de compaction supérieur ?.....	169
5.	Spécificité de substrat dans le cas de cibles de type non-histone	170
6.	Quelles lysines sont vraiment les cibles d'ATAC et SAGA ?	170

7. Les pré-modifications sont importantes pour l'activité et la spécificité des complexes ATAC et SAGA	172
a. L'efficacité d'acétylation des histones natives et recombinantes est différente ..	172
b. Interdépendance entre les pré-modifications des histones	172
c. Considérations expérimentales pour la compréhension du rôle des pré-modifications	173
d. La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 a son importance	174
e. L'acétylation de la lysine 14 permettrait l'acétylation du résidu 9 de H3	175
8. Le rôle de l'acétylation des sous-unités des complexes ATAC et SAGA.....	176
9. A plus long terme, applications contre le cancer	177
Partie 4 : hATAC joue un rôle dans la progression de la mitose en acétylant la cycline A	179
A. Problématique	180
B. Résumé de la publication.....	180
C. Contribution apportée au papier	183
D. Publication 3	184
E. Discussion et perspectives.....	185
1. L'importance des sous-unités de hATAC	185
2. Le paradoxe d'une AT entraînant une diminution d'acétylation.....	185
3. Acétylation et dégradation ?	186
Conclusion	187
Matériels et Méthodes	189
A. Caractérisation d'anticorps polyclonaux.....	189
1. Synthèse d'un peptide/épitope antigénique	189
2. Obtention de sérums de lapin par injection de peptides	191
3. Purification de l'anticorps par chromatographie d'affinité	191
B. Expression de protéines	192
1. Préparation des extraits nucléaires de cellules HeLa.....	192
2. Surexpression de protéines dans des cellules d'insectes	193
C. Immunoprécipitation	195
1. Immunoprécipitation de protéines	195
2. Immunoprécipitation de la chromatine.....	196
D. Analyse des protéines sur gel	197

1. Electrophorèse SDS-Page.....	197
2. Western blot.....	197
3. Coloration au Bleu de Coomassie	198
4. Gel à l'argent	198
E. ADN et ARN	199
1. Préparation de l'ADN plasmidique	199
a. Obtention de cellules compétentes.....	199
b. Transformation de cellules compétentes.....	199
c. Extraction de l'ADN plasmidique	200
2. Analyse des niveaux d'ARN	200
3. Transfection d'ARNsi.....	200
4. Extraction phénol-chloroforme.....	201
F. Tests d'activité d'acétylation.....	201
1. Préparation des substrats	201
a. Les peptides	201
b. Les protéines d'histones.....	202
i. Préparation de dimères H2A/H2B, de tétramères H3/H4 et d'octamères natifs	202
ii. Polynucléosomes	203
iii. Octamère et nucléosomes recombinants	204
Les histones recombinantes	204
Octamères recombinants	205
Nucléosomes recombinants	205
2. Test sur des peptides.....	205
3. Test sur des protéines	206
4. Production et utilisation de GAL4VP16 pour les tests d'acétylation.....	206
Références bibliographiques	208

Liste des Figures

Figure 1 : Illustration schématique du noyau cellulaire.	23
Figure 2 : Représentation du schématique du dogme de la biologie moléculaire.	24
Figure 3 : Illustration schématique des éléments du promoteur.	25
Figure 4 : Formation séquentielle du complexe de pré-initiation de l'ARN Polymérase II. ...	26
Figure 5 : Structure tridimensionnelle des histones et du nucléosome.	28
Figure 6 : Représentation schématique des différents niveaux de compaction de la chromatine.	30
Figure 7 : Euchromatine et hétérochromatine en microscopie électronique.	31
Figure 8 : Induction de la transcription par des activateurs et des co-activateurs.	32
Figure 9 : Localisation des principales modifications post-traductionnelles des histones.	34
Figure 10 : Distribution des principales modifications d'histone le long des gènes et leurs effets sur la transcription.	35
Figure 11 : Similarité de séquence entre GCN5 et PCAF selon les espèces.	42
Figure 12 : Représentation tridimensionnelle de la reconnaissance du substrat par le domaine AT.	43
Figure 13 : Structure du bromodomaine de GCN5 en présence du substrat.	44
Figure 14 : Superposition des structures tridimensionnelle des domaines AT de GCN5 et PCAF.	46
Figure 15 : Superposition des structures tridimensionnelles des bromodomains de GCN5 et PCAF.	46
Figure 16 : GCN5 et PCAF acétylent différents substrats non-histones.	48
Figure 17 : Structure tridimensionnelle de certains domaines trouvés au sein des protéines du complexe SAGA.	55
Figure 18 : Superposition des structures tridimensionnelles des complexes SAGA humain et de levure.	56
Figure 19 : Localisation des domaines et des sous-unités sur la structure du complexe ySAGA.	56
Figure 20 : Représentation schématique du complexe SAGA humain et de levure.	58
Figure 21 : Recrutement et activité de SAGA sur la chromatine.	60
Figure 22 : L'acétylation de la chromatine par SAGA permet le recrutement de SWI/SNF...	62

Figure 23 : Comparaison des séquences protéiques d'ADA2a et ADA2b chez l'homme.....	64
Figure 24 : Arbre phylogénétique des homologues ADA2.....	65
Figure 25 : Les complexes contenant GCN5 au cours de l'évolution.....	69
Figure 26 : Estimation de la taille du complexe hATAC par gel filtration.....	94
Figure 27 : ATAC2 ne montre pas d'activité sur les octamères ou les polynucléosomes.....	95
Figure 28 : ATAC2 interagit avec GCN5 et SGF29 mais ne montre pas d'activité sur les peptides H3 et H4.....	97
Figure 29 : hSAGA est recruté spécifiquement sur les gènes ER après traitement à la thapsigargine.....	99
Figure 30 : L'enzyme GCN5 a besoin d'être au sein des complexes ATAC et SAGA pour agir pleinement sur les peptides H3 et H4.....	111
Figure 31 : Les sous-unités du module HAT agissent sur l'activité de GCN5.....	113
Figure 32 : L'activité de GCN5 au sein du module rHAT augmente, mais ce n'est pas suffisant pour atteindre l'activité du complexe endogène.....	115
Figure 33 : Confirmation du profil d'activité de GCN5 au sein des différents contextes sur des protéines histones.....	116
Figure 34 : Le module rHAT ATAC acétyle plus efficacement l'histone H4 que le module rHAT SAGA.....	118
Figure 35 : Les modules rHAT et les complexes endogènes acétylent les lysines 9 et 14 de l'histone H3 au sein des octamères recombinants.....	119
Figure 36 : Les enzymes ne peuvent acétyler les nucléosomes recombinants.....	121
Figure 37 : GAL4VP16 permettrait un meilleur recrutement des complexes sur les nucléosomes mais ce n'est pas suffisant.....	122
Figure 38 : L'activité de GCN5 est meilleure sur des tétramères H3/H4 natifs que recombinants.....	123
Figure 39 : SGF29 permet un meilleur recrutement de GCN5 sur les octamères H3K4me3.....	125
Figure 40 : ADA2b interagit avec GCN5, l'interaction avec ADA2a nécessite ADA3.....	127
Figure 41 : ADA1 et TAF12 interagissent avec le module rHAT mais ne semblent pas agir sur l'activité du module.....	129
Figure 42 : Il n'y a pas d'interaction directe entre les modules rHAT et rdUb.....	131
Figure 43 : Les protéines ADA1, TAF12, TAF6L, TAF9, SPT7L et SPT20 ne permettent une interaction entre les modules rHAT et rDUB.....	132
Figure 44 : Les modules rTAF et rHAT ne semblent pas interagir.....	134
Figure 45 : Il n'existe qu'une très faible interaction entre ATAC2 et WDR5.....	135

Figure 46 : Confirmation d'une trop faible interaction entre ATAC2 et WDR5.....	136
Figure 47 : WDR5 interagit faiblement avec le module rHAT.....	137
Figure 48 : Il n'est pas possible de purifier ATAC2 avec le module rHAT.	138
Figure 49 : Les lysines 4, 23, 27, 36 et 37 sur des peptides ne sont ni acétylées par ATAC ni SAGA.....	139
Figure 50 : GCN5 et PCAF acétylent toutes deux préférentiellement la lysine 14 de l'histone H3.....	141
Figure 51 : GCN5 et PCAF recombinantes acétylent les protéines histones de la même manière.....	142
Figure 52 : GCN5 et PCAF au sein des complexes ATAC et SAGA acétylent préférentiellement les peptides H3.....	143
Figure 53 : GCN5 et PCAF, au sein des complexes ATAC et SAGA acétylent les mêmes lysines.....	145
Figure 54 : L'activité de GCN5 et PCAF ne semble pas être modifiée par des peptides acétylés.....	147
Figure 55 : Les peptides pré-acétylés ne recrutent pas plus efficacement les modules rHAT.....	148
Figure 56 : Les peptides acétylés ne semblent pas mieux recruter les complexes ATAC ou SAGA.....	150
Figure 57 : La double modification H3K9Me2S10P entraîne une diminution de l'acétylation du peptide par les modules rHAT.	151
Figure 58 : Les complexes ATAC et SAGA n'acétylent pas le peptide pré-modifié H3K9me2S10p.....	152
Figure 59 : Il n'est pas possible de visualiser une différence de reconnaissance des peptides H3 et H3K4Me3 par ATAC ou SAGA.....	153
Figure 60 : GCN5 et PCAF peuvent s'autoacétyler et acétyler des sous-unités des complexes ATAC et SAGA.....	155
Figure 61 : La conformation du substrat change en présence de pré-modification.....	166

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les différents types de modifications des histones.	34
Tableau 2 : Familles des enzymes HAT et leurs substrats.	38
Tableau 3 : Composition des complexes de type SAGA contenant GCN5 ou PCAF.	52
Tableau 4 : Comparaison en sous-unités des complexes SAGA humain et de levure.	53
Tableau 5 : Compositions du complexe dATAC de drosophile et homologues humains putatifs.	68
Tableau 6 : Composition des complexes hATAC et hSAGA chez l’homme.	70
Tableau 7 : Sous-unités des complexes ATAC et SAGA acétylées.	176
Tableau 8 : Liste des peptides produits pour ATAC et SAGA.	190
Tableau 9 : Anticorps utilisés au laboratoire.	192
Tableau 10 : Vecteurs pour l’obtention de protéines surexprimées en cellules d’insecte disponibles.	194
Tableau 11 : Plasmides gateway disponibles pour les sous-unités d’ATAC.	195
Tableau 12 : Liste des peptides mimant les queues d’histones.	202
Tableau 13 : Poids moléculaire et extinction molaire des histones.	204

Abréviations

A

Ac : acétylation
AcétylCoA : acétyl-coenzyme A
ACTR : ACTivin Type Receptor
Ada : Adaptator
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
Ahc : ADA HAT complex Component 1
ARN : Acide RiboNucléique
ASF1 : Anti Silencing Function 1
AT : AcétylTrasnférase
ATAC : ADA Two A Containing
Atac1 : ATAC component 1
ATF6 : Activating Transcription Factor 6
ATXN : Ataxine

B

BLAST : Basic Alignment Search Tool
BRE : TFIIB Responsive Element
BRG1 : Brahma Related Gene 1

C

CBB : Coomassie Brillant Blue
CBP : CREB Binding Protein
Cdk : Cycline dependent kinase
CENP-A : CENtromere Protein A
ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation
ChIP seq : Chromatine
 ImmunoPrécipitation and high-throughput
 sequencing
CHRAC : Chromatin accessibility
 complex
Cpm : Coup Par Minute
CRP2BP : Cysteine Rich Protein 2
 Binding Protein
CTD : Carboxy Terminal Domain

D

Da : Dalton
DCE : Downstream Core Element
DMEM : Dulbecco's Modofied Eagle
 Medium
DNTB : DiNitroThiocyanoBenzène
DPE : Downstream Promoter Element
DSB : Double Strand Break
DTT : DiThioThreitol
DUB : DéUBiquitination

E

EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic
 Acid
EGF : Epidermal Growth Factor
Elp3 : Elongation protein 3
EN : Extrait Nucléaire
ENY2 : Enhancer of Yellow 2
ER : Endoplasmic Reticulum
ERSE : ER Stress Element
Esa1 : Essential SAS2 related
 acetyltransferase

G

GABP : GA-Binding Protein
GAPDH : GlycerAldehyde-3-Phosphate
 DeHydrogenase
GCN5 : General Control Nonderepressible
 5
GNAT : Gcn5-related-N-Acetyltransferase
GTF : General transcription Factor

H

H3K9 : lysine 9 de l'histone H3
HAT : Histone AcétylTrasnférase
Hbo1 : Histone acetyltransferase binding
 to ORC
HCF : Host Cell Factor

HD : Homology Domain
HDAC : Histone DéACétylase
HeLa : Helene Lane
HEK293T : Human Embryonic Kidney
 293T
HFD : Histone Fold Domain
HMG-17 : High Mobility Group 17
Hpa2 : Histone and other protein
 acetyltransferase 2

I

IE : Immediate Early genes
IF : ImmunoFluorescence
Inp: input
Inr : initiateur
IP : ImmunoPrécipitation
IRF-2 : Interferon Regulatory Factor 2
ISWI : Imitation of SWITCH

J

JNK : c-Jun N-terminale Kinase

K

K : lysine
KD : Knock-Down
KO : Knock-Out

L

LB : Luria Bertani

M

MAPK : Mitogen Activated Protein
 Kinase
MBIP : MUK(MAPK Upstream Kinase)
 Binding Inhibitory Protein
Me1/2/3 : Mono/Di/Triméthylation
MEF : Mouse Embryonic Fibroblast
MLL : Mixed Lineage Leukemia
MLP : Muscle LIM Protein
MOF : Male absent On the First

MORF : MORtality Factor
MOZ : MONocyte leukemia Zinc finger
MSL : Male Specific Lethal
MTE : Motif Ten Element
MudPIT : MUltiDimensional Protein
 Identification Technology
MultiBac : Multigene Baculovirus
MYST : MOZ Ybf2/Sas3 Sas2 Tip60

N

NC2 : Negative Cofactor 2
NFY : Nuclear Factor Y
NLS : Nuclear Localization Signal
NP40 : Nonidet P-40
NuA4 : Nucleosome acetyltransferase of
 histone H4
NURF : Nucleosome Remodeling Factor

P

P : phosphorylation
Page : PolyAcrylamide gel Electrophoresis
Pb : paire de base
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCAF : p300/CPB Associated Factor
PCR : Polymerase Chain Reaction
PCV : Packed Cell Volume
PHD : PlantHomeoDomain
PIC : PreInitiation Complex
PMSF : Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride
Pol II : Polymérase II

R

Rpm : rotation par minute
Rsk2 : Ribosomal S6 Kinase 2
RT : Reverse transcription
Rtt109 : Regulator of Ty1 Transposition

S

SAGA : Spt Ada Gcn5 Acetyltransferase
SANT : SWI3, ADA2, N-CoR, TFIIB
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SF-1 : Steroidogenic Factor-1
SGF : SAGA Associated Factor
Si : small interfering
SIRT2 : SIRTuine 2
SLIK : SAGA-LIKE
SM : Spectrométrie de Masse
SN : SurNageant
Spt : Suppressor of TY
SRC1 : Steroid Receptor Coactivator 1
STAGA : SPT3-TAF9-GCN5
 Acetyltransferase
Sus1 : SI gene upstream of ySa1
SWI/SNF : SWItching/Sucrose Non
 Fermenting

T

TAF : TBP Associated Factors
TAP : Tandem Affinity Purification
tBOC: t-ButylOxyCarbonyl
TBP : TATA-Binding-Protein
TF : Transcription Factor
TFTC : TBP-free-TAF-containing
TIP60 : Tat Interacting Protein 60 kDa
TPA : 12-O-TetradecanoylPhorbol-13-
 Acetate
Tris : Tri-hydroxy-méthyl-amino-méthane
TRRAP : Transformation/transcription
 domain-Associated Protein
TSS : Transcription Start Site

U

UBAP2L : UBiquitin Associated Protein 2
 Like
USP : Ubiquitin Specific Peptidase
UV : Ultra Violet

V

VP16 : herpes Virus Protein 16
Vps75 : Vacuolar Protein Sorting 75

W

WB : Western Blot
WD40 : Tryptophane Aspartic acid repeat
 every 40 residues
WDR5 : WD40 Repeat protein 5
Wds : will die slowly
WT : Wild Type

Y

YEATS : Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5

Z

Zn : doigt de zinc
ZZZ3 : ZZ-type Zinc finger

Résumé du travail de thèse

Caractérisation fonctionnelle de l'activité de l'histone acétyltransférase GCN5 au sein des complexes ATAC et SAGA chez l'homme

L'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II dans le noyau des cellules eucaryotes est un processus régulé par de nombreux facteurs. Pour que la machinerie transcriptionnelle puisse accéder aux promoteurs des gènes, la chromatine est modifiée par des coactivateurs. Ces derniers peuvent être des complexes qui catalysent des modifications post-traductionnelles sur des histones.

L'acétylation des histones est une des modifications les plus étudiées. La protéine GCN5 (General Control Nonderepressible 5) est une enzyme possédant une activité histone acétyltransférase (HAT). Elle fait partie du complexe SAGA (Spt Ada Gcn5 Acetyltransferase) qui acétyle les histones H3.

Il existe cependant un second complexe contenant GCN5 : le complexe ATAC (Ada Two A Containing). Ce complexe contient des sous-unités communes au complexe SAGA en plus de GCN5, mais également des sous-unités qui lui sont spécifiques. Chez la drosophile, il a été montré que le complexe dATAC présente une seconde protéine à activité HAT nommée ATAC2. En outre, contrairement au complexe SAGA, le complexe dATAC acétyle de préférence les histones H4.

Chez l'homme, la spécificité de l'activité du complexe hATAC n'est pas aussi évidente et demande plus d'investigation. Par ailleurs, la question de la présence de deux complexes contenant la même sous-unité catalytique au sein des cellules de métazoaires reste à être élucidée. L'objectif de ma thèse a été de comprendre le fonctionnement et la spécificité d'action du complexe HAT ATAC chez l'homme, par rapport au complexe SAGA.

J'ai tout d'abord travaillé sur la caractérisation protéique de ce complexe hATAC. Ce dernier a été purifié par immunoprécipitation (IP) grâce à un anticorps dirigé contre la sous-unité connue et spécifique d'ATAC : ADA2a. Les protéines ainsi co-précipitées ont été ensuite identifiées par spectrométrie de masse. Afin de confirmer ces résultats, des anticorps spécifiques aux sous-unités potentielles du complexe ont ensuite été générés. Après avoir effectué des IPs et des analyses par western blot (WB), il m'a été possible de valider la présence des protéines identifiées par spectrométrie de masse dans hATAC. En parallèle, le

complexe hSAGA a aussi été purifié afin de comparer la composition des deux complexes. A présent, nous savons quelles sont les sous-unités communes aux deux complexes mais, également celles qui sont spécifiques à hATAC.

Le but a ensuite été de connaître quelle est la spécificité de substrat de hATAC, c'est-à-dire quelles sont les protéines acétylées par ce complexe, et comparer cela à hSAGA. Nous savons que hATAC contient GCN5 et ATAC2 et que ces dernières possèdent des domaines particuliers pour l'acétylation des histones. Le complexe aurait donc la capacité d'acétyler les histones. L'activité des complexes purifiés a ainsi été étudiée *in vitro* sur des peptides correspondant à la partie N-terminale des queues des histones H3 et H4 mais, également sur des queues d'histones mutées. Nous avons pu montrer que les deux complexes possèdent la même activité *in vitro* sur les peptides : ils acétylent préférentiellement les histones H3. Afin d'être proche des conditions physiologiques, j'ai testé l'activité des complexes sur des dimères d'histones H3-H4, des mononucléosomes et des polynucléosomes. Ici, encore, hATAC et hSAGA ont la même spécificité de substrats.

J'ai aussi appliqué ces expériences avec les enzymes recombinantes GCN5 et ATAC2. D'après mes résultats, il semblerait que hATAC2 ne possède pas d'activité HAT. L'enzyme ayant peut-être besoin de ses partenaires pour fonctionner, j'ai étudié cette protéine au sein du complexe hATAC. Pour cela, j'ai reproduit les expériences sur les peptides mais, en utilisant des complexes contenant la protéine GCN5 inactivée ; ces derniers ne présentent plus d'activité. Nous avons ainsi montré que dans les conditions expérimentales que j'ai appliquées hATAC2 ne posséderait pas d'activité HAT *in vitro* et, que les complexes hATAC et hSAGA ne présentent pas de différences de spécificité sur les histones. Nous avons alors voulu savoir s'il existait une spécificité d'action des complexes au niveau des gènes.

En collaboration avec Shigeaki Kato (Institute of Molecular and Cellular Biosciences, Japon), un membre de son équipe, Sally Fujiyama, a observé le recrutement du complexe dATAC sur les loci activement transcrits des chromosomes polytènes de drosophile après traitement avec du TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Par contre, ce n'est pas le cas du complexe dSAGA. Mon objectif a été d'étudier si ce phénomène est aussi observable dans les cellules humaines. La transcription des gènes d'expression immédiate (nommés immediate early genes IE) est induite par traitement par le TPA. J'ai cherché s'il y avait recrutement de hATAC au niveau de ces gènes après ce type de stress. Pour cela, j'ai traité des cellules HeLa avec le TPA, et effectué des précipitations de la chromatine à partir de ces cellules grâce à des anticorps spécifiques de hATAC ou hSAGA. L'analyse des résultats montre que hATAC est recruté au niveau des gènes IE après traitement, et que ce n'est pas le

cas de hSAGA. Afin de confirmer ces données, j'ai effectué des knock-down (KD) des sous-unités de hATAC et de hSAGA. Après KD de hATAC et traitement TPA, on observe une réduction de la transcription des gènes IE. Dans les mêmes conditions, le KD de hSAGA ne présente aucun changement. Nous avons ainsi pu montrer pour la première fois une différence fonctionnelle entre les deux complexes : ATAC est recruté au niveau des promoteurs des gènes IE après traitement par le TPA, tandis que SAGA ne l'est pas.

L'ensemble de ces travaux ont été publié dans le journal « Cellular et Molecular Life Sciences » (voir Partie 2 de ce manuscrit).

Par la suite, nous avons voulu approfondir l'étude de la composition du complexe et l'activité au niveau de la chromatine (voir Partie 3).

Chez les vertébrés, il existe une protéine homologue de GCN5 nommée PCAF (p300/CPB Associated Factor). Grâce à des IPs contre ADA2a et GCN5, j'ai pu montrer que nous avons deux types de complexes hATAC : soit l'un contenant GCN5 (G-ATAC), soit contenant PCAF (P-ATAC). Afin de découvrir de nouvelles sous-unités, mais aussi de comprendre ces deux types de complexes, j'ai purifié ces derniers, ainsi que GCN5-SAGA (SAGA) et PCAF-SAGA (SAPA). Les complexes ont ensuite été analysés grâce à une nouvelle technique de spectrométrie de masse : MudPit. En outre, après des tests d'acétylations sur des peptides ou des nucléosomes, il semblerait que PCAF et GCN5 présentent la même activité. J'ai cherché alors à comprendre leur activité au sein des complexes, mais également au sein de sous-modules, afin de découvrir si les protéines voisines ont une incidence sur les enzymes.

Dans le but de comprendre comment les sous-unités des complexes hATAC ou hSAGA agissent sur la spécificité de substrat, j'ai purifié des modules HAT recombinants à partir de cellules d'insectes infectées par des baculovirus: GCN5-ADA2a-ADA3-SGF29 pour ATAC, GCN5-ADA2b-ADA3-SGF29 pour SAGA. Ces modules ont été testés sur les peptides et les histones. Nous observons que les niveaux d'acétylation par GCN5 sont augmentés par rapport à ceux obtenus avec l'enzyme recombinante seule ; cela suggère que les partenaires de GCN5 influencent effectivement son activité enzymatique. Cependant, l'activité des modules n'est pas encore comparable à celle des complexes endogènes : bien que la présence des protéines du module HAT augmente le niveau d'acétylation, d'autres protéines sont encore nécessaires pour obtenir une totale efficacité. Par ailleurs, j'obtiens des résultats différents selon la présence d'ADA2a ou ADA2b : l'efficacité d'acétylation de GCN5 est moindre en présence d'ADA2a qu'avec ADA2b. L'étude des domaines des

protéines ADA2a/b, l'étude de leur interaction avec l'enzyme et leur structure pourraient apporter des explications quant à une telle influence sur GCN5.

GCN5 a donc besoin d'un environnement multiprotéique pour exprimer pleinement son activité. Afin de comprendre comment cet environnement peut influencer la spécificité de substrat, les sous-modules et complexes endogènes ont également été testés sur des peptides prémodifiés. En effet, les domaines des protéines pouvant jouer un rôle sur la reconnaissance des modifications sur les histones, des tests sur des peptides contenant des lysines préalablement acétylées, méthylées ou phosphorylées ont été effectués. De plus, nous avons aussi considéré l'activité de GCN5 sur des histones natives ainsi que sur des octamères et nucléosomes recombinants. Nous avons alors remarqué que, bien que hATAC et hSAGA acétylent tous deux préférentiellement H3, hATAC acétyle plus fortement H4 que hSAGA. Il en est de même pour les sous-modules HAT.

En conclusion, j'ai étudié la composition du complexe hATAC, l'activité du complexe sur les histones et j'ai pu montrer qu'il existe une différence fonctionnelle entre hATAC et hSAGA. Par la suite, j'ai poursuivi la caractérisation de ces complexes HAT afin de comprendre le rôle des enzymes au sein des complexes et leurs fonctions. Pour cela, j'ai voulu comprendre le rôle des sous-unités, comment elles influencent l'activité de l'enzyme, et ainsi identifier les protéines qui permettent la spécificité de hATAC par rapport à hSAGA. En effet, l'activité d'acétylation de GCN5 augmente en présence des protéines du module HAT (ADA2a/b, ADA3 et SGF29). D'autres partenaires doivent encore être identifiés pour expliquer les niveaux d'acétylation des complexes endogènes et comprendre la structure de ces derniers. En outre, nous avons observé une différence d'activité selon la présence d'ADA2a ou ADA2b au sein du module HAT. Cela expliquerait la formation d'un complexe spécifique ATAC ou SAGA dans les cellules et demande de plus amples investigations.

En parallèle de ce travail sur la régulation de GCN5 au sein des complexes ATAC et SAGA, j'ai effectué des expériences de WB et des tests d'acétylation de peptides pour deux publications portant d'une part sur le recrutement de SAGA sur les gènes suite au stress du réticulum endoplasmique et, d'autre part, sur le rôle du complexe ATAC dans la régulation du cycle cellulaire (Parties 1 et 4 de ce manuscrit).

Introduction

Introduction

A. Introduction à l'introduction

1. Un peu d'histoire...

Les bases de la génétique ont été posées par le moine Johann Gregor Mendel en 1865 lorsqu'il publia ses résultats obtenus sur des manipulations sur des pois : il met en évidence qu'il existe des « unités héréditaires », celles-ci sont transmises de génération en génération et existent sous deux versions (les allèles) récessives ou dominantes (Ellis et al., 2011). Durant la même période, Charles Darwin propose qu'il existe des « caractéristiques héréditaires ». Mais, il faudra attendre près de cinquante ans pour que ces théories et travaux sur la génétique soient repris par de nombreux scientifiques. Et c'est en 1903 que Wilhelm Johannsen a donné un nom à ces particules héréditaires, les « gènes ».

Les premières observations de chromosomes ont été effectuées par Flemming dans les années 1880 ; cependant, c'est au cours du XX^{ème} siècle que va se développer la majeure partie des études cytologiques. Cela n'a pas empêché plusieurs scientifiques dont Sutton et Boveri de proposer que les gènes sont portés par les chromosomes dans les années 1900. L'attribution de la théorie chromosomique revient à Thomas Hunt Morgan avec son travail sur *Drosophila melanogaster*, grâce auquel il propose que l'information génétique est reliée aux chromosomes et que les gènes sont disposés de façon linéaire sur ceux-ci (Morgan, 1910b) (pour une revue (Morgan, 1910a)).

Mais, c'est dans les années 1940 que sera démontré que l'ADN est la molécule constitutive des gènes, par des découvertes fondamentales. Tout d'abord, les expériences d'Avery, McLeod et McCarty montrent que l'acide nucléique est porteur de l'information génétique (Avery et al., 1944). Puis, l'identification de la structure en double hélice de l'ADN a été réalisée par James Watson, Francis Crick et Rosalind Franklin (Watson and Crick, 1953). Enfin, dans les années 90s, la première carte du génome humain a été révélée par le Généthon et aujourd'hui, les génomes de très nombreux organismes ont été séquencés.

Il a ensuite été démontré que l'ADN, support de l'information génétique, est exprimé dans un premier temps sous forme d'ARN messenger lors de la transcription, puis en protéines

dans un deuxième temps lors de la traduction (Crick, 1970; Jacob and Monod, 1961). Les mécanismes de la réplication et de la transcription de l'ADN, ainsi que de la traduction en protéines, furent et sont déterminants dans la régulation du génome. L'identification des enzymes impliquées dans ces processus a permis d'expliquer une partie de ces mécanismes : découverte des ARN polymérases (pour une revue (Vannini and Cramer, 2012)) et du ribosome (pour une revue (Melnikov et al., 2012)), etc.

2. Principes fondamentaux de la biologie moléculaire

Chez les eucaryotes, l'information génétique est donc portée par l'ADN dans le noyau cellulaire, au sein du cytoplasme délimité par la membrane plasmique (Figure 1).

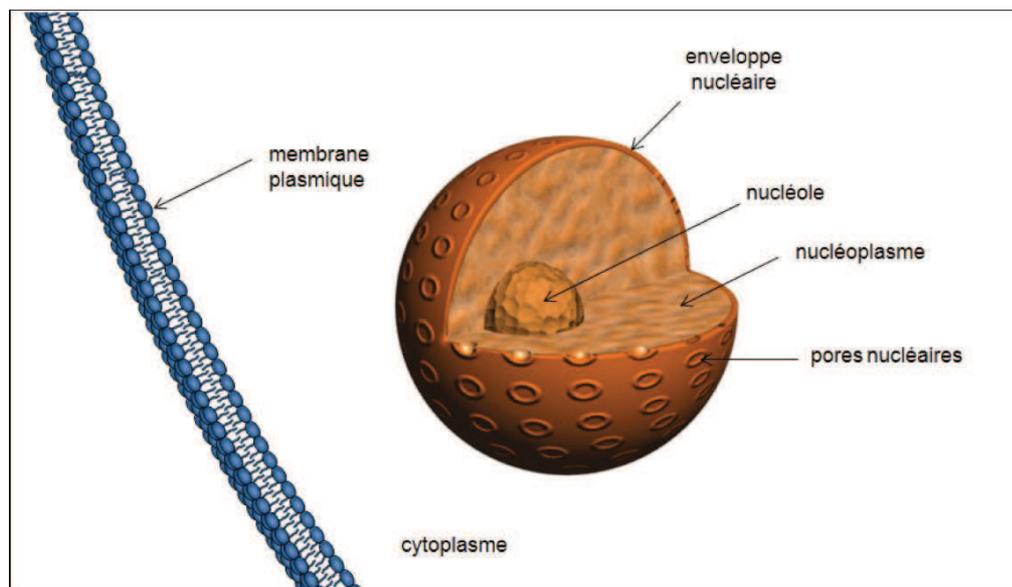


Figure 1 : Illustration schématique du noyau cellulaire.

Chez l'homme, on dénombre jusqu'à 34000 gènes présents dans toutes les cellules de l'organisme. Ce matériel génétique est visible par microscopie électronique ou coloration comme étant une masse granulaire : il s'agit de la chromatine. Lors de la division cellulaire, celle-ci s'organise en chromosomes afin de partager le patrimoine génétique entre les deux cellules filles. Comme nous le verrons plus loin, le chromosome est constitué d'une double hélice d'ADN et de protéines. Afin de transmettre de façon exacte l'information génétique, cet ADN peut être répliqué afin d'obtenir deux copies identiques.

Cet ADN peut être transcrit en ARN par des enzymes nommées ARN polymérase. Certains gènes vont coder pour des ARN ayant une fonction de structure ou enzymatique, mais la majorité va donner des ARN dits messagers, ayant une durée de vie temporaire dans la cellule. L'ARN messager constitue une matrice pour la synthèse d'une séquence d'acides aminés, la protéine. Il s'agit de l'étape de traduction effectuée par le ribosome (Figure 2).

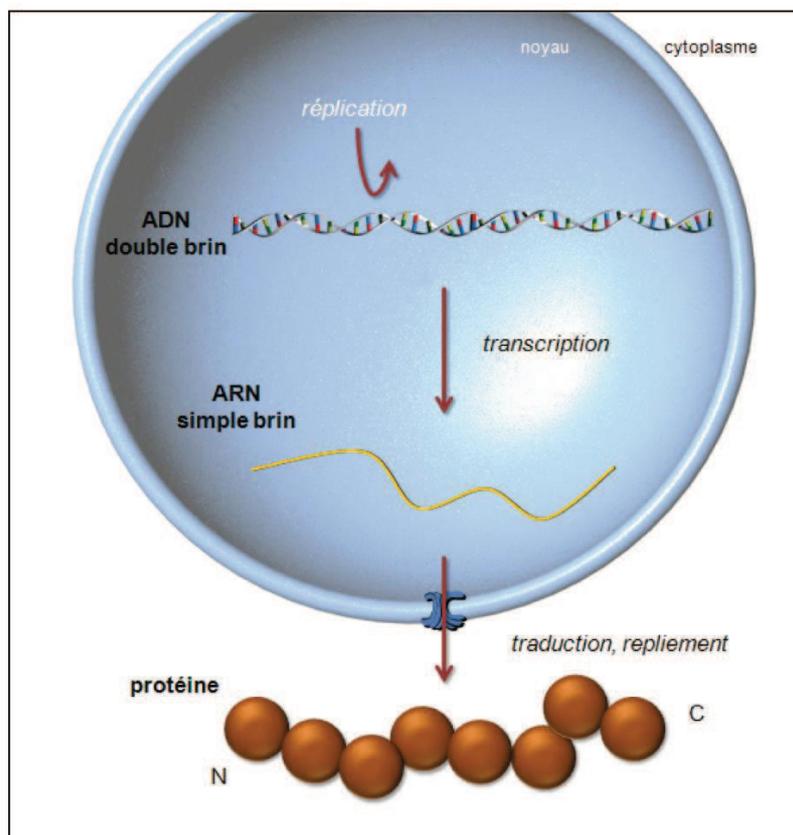


Figure 2 : Représentation schématique du dogme de la biologie moléculaire.

L'information génétique contenue dans la séquence en ADN est transmise sous forme d'un ARN messager (transcription). Celui-ci servira de matrice pour la synthèse d'une séquence en acides aminés (traduction) qui se repliera en une structure tridimensionnelle, la protéine.

Il existe donc différents supports moléculaires dans l'expression de l'information génétique. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons à la première étape de l'expression des gènes : la transcription de l'ADN en ARN. Chez les eucaryotes, il existe trois types d'ARN polymérase selon le type d'ARN transcrit. L'ARN polymérase I transcrit les gènes codant pour les ARN ribosomiques (ARNr) ; l'ARN polymérase II transcrit les gènes codant pour les protéines ; l'ARN polymérase III transcrit les gènes codant pour les ARN de transfert (ARNt) ainsi que l'ARNr 5S et l'ARN U6. Notons que chez les plantes, l'ARN polymérase IV a aussi été caractérisée (Herr et al., 2005). Je me focaliserai ici à la transcription par l'ARN polymérase II et certains facteurs responsables de sa régulation.

B. La transcription par l'ARN Polymérase II

1. Les promoteurs

En amont de la séquence codante se situe une séquence spécifique nommée promoteur. Le promoteur comprend des éléments spécifiques et conservés tels que la boîte TATA, l'élément initiateur INR, l'élément MTE (Motif Ten Element) ou le DPE (Downstream Promoter Element) (Figure 3). Il existe différentes combinaisons de ces éléments selon le promoteur et tous ne sont pas présents en même temps (pour une revue (Baumann et al., 2010)).

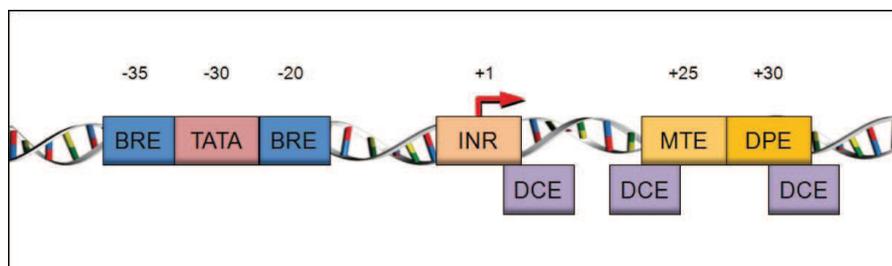


Figure 3 : Illustration schématique des éléments du promoteur.

Le promoteur contient différents éléments dont les plus communs sont la boîte TATA, l'élément Initiateur (INR), l'élément BRE (TFIIB Responsive Element), DCE (Downstream Core Element), DPE (Downstream Promoter Element) et MTE (Motif Ten Element). Les chiffres représentent la distance des séquences par rapport au site de départ de la transcription dit TSS (flèche rouge).

L'ARN Pol II n'est pas capable de se lier directement au promoteur et nécessite la reconnaissance de ce dernier par les GTFs (General Transcription Factors) ; ceci va permettre la formation du complexe fonctionnel de préinitiation (PIC) de la transcription contenant la Pol II (Li et al., 2007).

2. La machinerie transcriptionnelle de base et la transcription

L'étude de la transcription à partir d'une matrice d'ADN nue a permis de définir les facteurs généraux de la transcription (GTFs) requis pour initier la transcription basale à partir d'un promoteur de base. Celui-ci va servir de plate-forme pour l'assemblage du PIC, constitué de la Pol II et des GTFs : TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF et TFIIH.

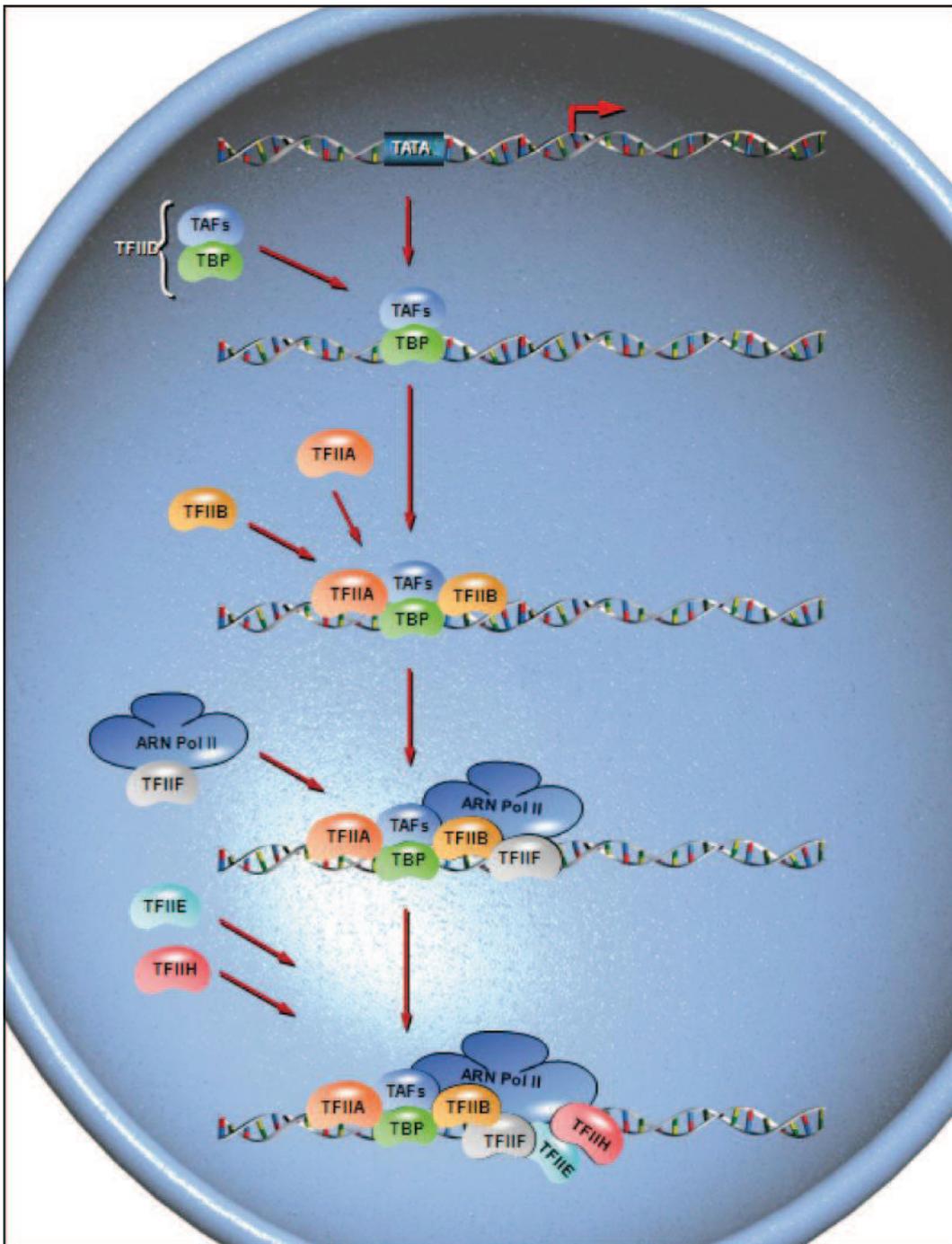


Figure 4 : Formation séquentielle du complexe de pré-initiation de l'ARN Polymérase II.

L'assemblage séquentiel des différents facteurs généraux de la transcription avec l'ARN Polymérase II sur le promoteur entraîne la formation d'un complexe dit de pré-initiation (PIC). TBP et TFIID permettent la liaison au promoteur, cette interaction est complétée par TFIIA et TFIIB puis l'ARN Pol II est recrutée avec TFIIF. Enfin, TFIIIE et TFIIH viennent s'ajouter.

La polymérase II est un complexe de 550 kDa composé de 12 sous-unités. Les GTFs sont des complexes multiprotéiques constitués de 1 à 15 polypeptides. Par exemple, TFIID renferme la protéine TBP (TATA-Binding-Protein) ainsi que 14 TAFs (TBP Associated Factors). Les modèles de formation du PIC indiquent que le complexe TFIID semble être le

premier recruté au promoteur grâce à l'interaction entre TBP et la boîte TATA. On observera ensuite la fixation séquentielle des différents GTFs et de la Pol II (Figure 4). La formation du PIC sur le promoteur de base va définir le site d'initiation ainsi que le sens de la transcription (pour une revue (Sikorski and Buratowski, 2009)).

Lors de la formation du PIC, l'ADN, sous forme double brin, est ouvert entre les positions -9 et +2 grâce aux hélicases de TFIIF. L'ARN Pol II peut alors transcrire un premier brin de quelques nucléotides. Afin de stabiliser l'assemblage du PIC sur l'ADN et éviter une transcription avortée, le domaine CTD (Carboxy Terminal Domain) de l'ARN Pol II est hypophosphorylé ce qui conduit au recrutement du Médiateur, un complexe protéique co-activateur. L'activité kinase de TFIIF est alors stimulée et l'enzyme phosphoryle près d'une centaine de positions du domaine CTD. L'affinité de l'ARN Pol II pour les GTFs est ainsi perturbée ce qui permet à l'ARN Pol II de poursuivre une phase d'élongation sur le gène. L'ARN produit s'allonge alors et subit en même temps une étape de maturation co-transcriptionnelle comme par exemple l'épissage : l'ARN est clivé afin d'enlever les introns et les exons sont ligés entre eux. Notons que la phosphorylation du CTD module l'activité de l'ARN Pol II ; elle est essentielle dans ces différentes phases de la transcription. Ainsi, il existe une différence entre la phosphorylation de la sérine 2 et la sérine 5 du motif répété : la sérine 5 est phosphorylée entre l'initiation et l'élongation de la transcription, tandis que la sérine 2 l'est lors de l'élongation. La phase de terminaison consiste en la reconnaissance du signal de polyadénylation et des structures spécifiques au niveau du terminateur. Le transcrit est clivé et polyadénylé, et l'ARN Pol II est recyclée pour un nouveau cycle de transcription (pour une revue (Svejstrup, 2004)).

C. La chromatine

1. Structure de la chromatine

a. Histones et nucléosomes

L'un des principaux objectifs de l'étude de la transcription est de comprendre la régulation de l'accessibilité de la machinerie de transcription à l'ADN. Chez les eucaryotes, l'ADN est associé à des protéines basiques, les histones, pour former la chromatine (Figure 5). Le premier niveau d'organisation de la chromatine est le nucléosome : 147 paires de bases

s'enroulent autour d'un octamère constitué de deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4 dites canoniques (pour des revues (Kornberg and Lorch, 1999; Kouzarides, 2007)). Les histones sont constituées d'un domaine globulaire et d'une région plus flexible et plus chargée positivement à l'extrémité N-terminale. Ces protéines sont très conservées au cours de l'évolution. Les histones forment des hétérodimères spécifiques (H3-H4 et H2A-H2B) grâce à leurs domaines de type histone (HFD : Histone Fold Domain) qui s'assemblent entre eux pour former un octamère. Dans les génomes eucaryotes, on retrouve cette structure tous les 200 ± 40 pb. L'ADN qui se trouve entre deux octamères d'histone est appelé ADN « linker » (pour une revue (Zlatanova et al., 2009)).

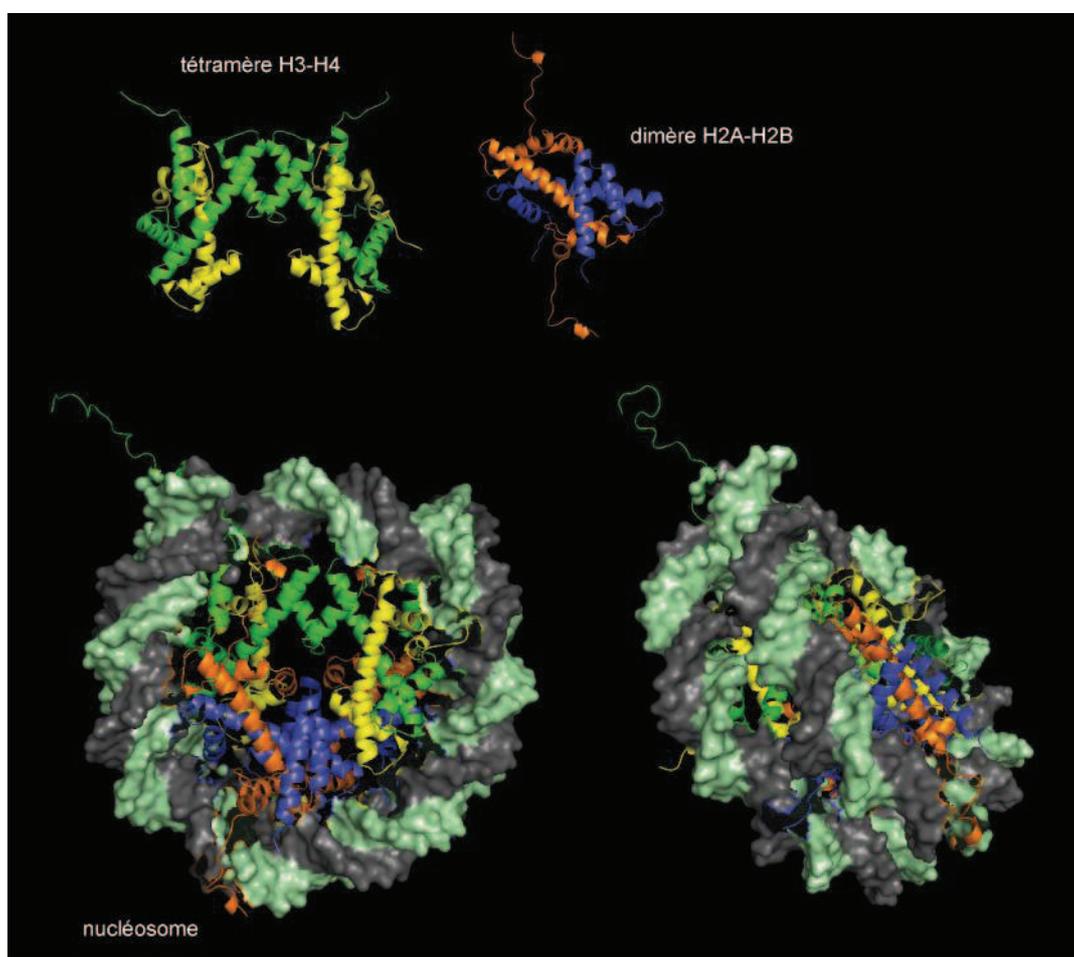


Figure 5 : Structure tridimensionnelle des histones et du nucléosome.

La partie centrale du nucléosome (en bas de l'image), est constitué par les domaines globulaires des huit histones disposées en un tétramère (H3-H4) (en haut à gauche) et de deux dimères (H2A-H2B) (un dimère en haut à droite). La queue N-terminale des histones est positionnée à l'extérieur de la structure. La double hélice d'ADN (en gris et vert clair) s'enroule autour de l'octamère d'histone.

En vert : histone H3, en jaune : H4, en orange : H2A, en bleu : H2B.

Références PDB : 1AOI et 3AFA.

Figure adaptée de (Khorasanizadeh, 2004).

L'histone H1, quant à elle, va permettre de stabiliser les niveaux d'organisation structuraux supérieurs, le nucléosome étant le premier niveau d'organisation de la chromatine. Elle s'associe à l'ADN « linker », protège le nucléosome des nucléases et joue un rôle également dans l'espacement des nucléosomes en créant une région d'interaction entre deux nucléosomes voisins (pour une revue (Woodcock and Ghosh, 2010)).

Notons qu'il existe des variants d'histones, présents chez presque tous les eucaryotes. On les trouve pour H3, H2A et H2B mais pas pour H4 (Grove and Zweidler, 1984) (pour une revue (Li and Reinberg, 2011)). Celles-ci peuvent être spécifiques du type cellulaire ou organe. La différence de séquence entre les histones variants et les histones canoniques varient de quelques acides aminés à de plus larges domaines. Ainsi pour H3, nous avons quatre types différents : la forme canonique dite aussi H3.1, le variant spécifique des centromères CENP-A (CENTromeric Protein A), l'histone H3.2 ayant un rôle dans la répression et l'histone H3.3 présent dans les régions transcriptionnellement actives.

Les isoformes de H2A sont H2A.X en réponse aux cassures d'ADN double brin, MacroH2A impliqué dans la répression de la transcription, H2A.Z et H2A.Bbd (H2A Barr body deficient) pour une transcription active. Il existe aussi trois variants pour H2B : spH2B (human Sperm Specific H2B), TSH2B (human Testis Sperm specific H2B) et H2BFWT (H2B Family member W Testis specific), exprimés dans les cellules germinales des vertébrés mâles.

b. Compaction de la chromatine

La compaction de l'ADN en chromosomes s'effectue en plusieurs niveaux par le repliement de la chromatine en différentes structures hiérarchisées (Figure 6) (pour une revue (Woodcock and Ghosh, 2010)). Nous avons vu que le premier niveau est le nucléosome. Les nucléosomes espacés par l'ADN « linker » forment une fibre de 10 nm visible en microscopie électronique. Cet état de la chromatine permet la transcription. Le second niveau est la fibre de 30 nm : plusieurs nucléosomes sont compactés sous forme solénoïde ou en zigzag (Tremethick, 2007). Enfin, cette fibre est elle-même repliée en une fibre de 100 à 300 nm de diamètre. Lors de la division cellulaire, la fibre atteint un niveau de condensation extrême sous forme de chromosome. Ce mode de repliement permet ainsi de compacter près de 3 milliards de paires de bases soit environ 2 mètres d'ADN au sein du noyau cellulaire.

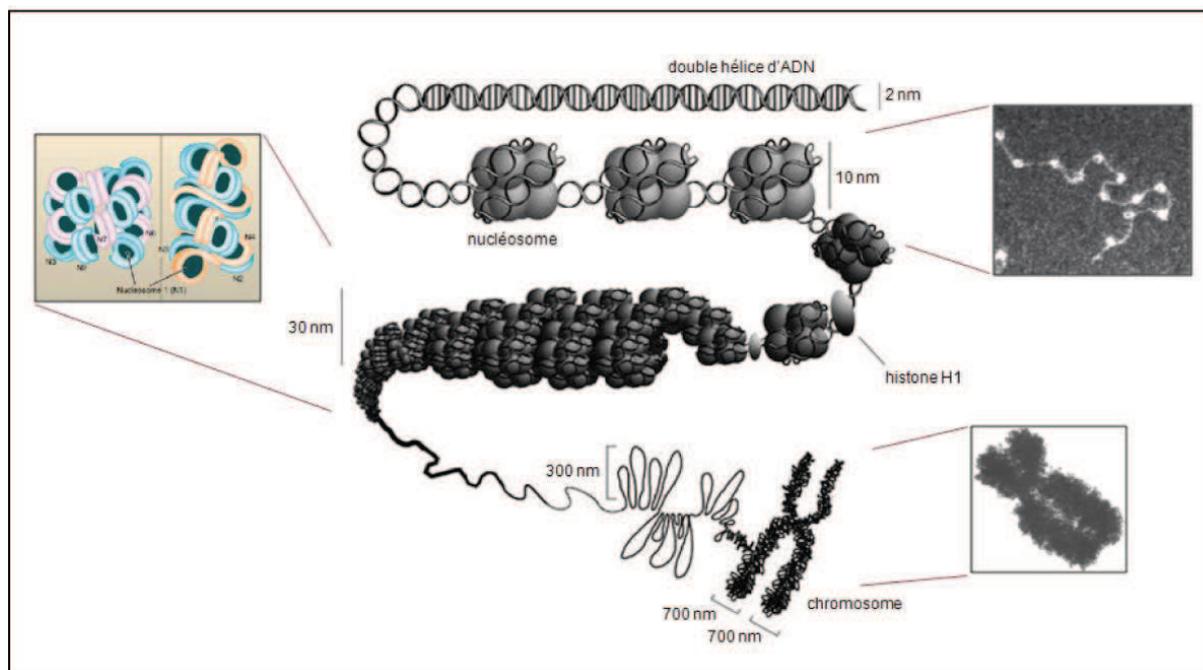


Figure 6 : Représentation schématique des différents niveaux de compaction de la chromatine.

Les différents niveaux de compaction sont représentés de l'ADN nu (en haut) à la forme la plus condensée, le chromosome (en bas). Le diamètre de chaque fibre chromatinienne est indiqué à chaque étape. La photographie, en haut à droite, correspond à la structure en « collier de perle » en microscopie électronique. L'image à gauche illustre la formation de la fibre de 30 nm avec à gauche le modèle de formation solénoïde et à droite le modèle en zigzag. La photographie, en bas à droite, montre un chromosome en microscopie électronique.

Figure adaptée de (Joëlle Brodeur, 2006). Photographies et images tirées de (Bloom, 1995; Grigoryev et al., 2009; Tremethick, 2007).

De façon générale, l'analyse cytologique permet de distinguer deux types de chromatine (Figure 7). L'hétérochromatine est fortement colorée, correspond à de la chromatine condensée et contient des régions génomiques qui ne sont pas transcrites d'ordinaire. Certaines sont des zones non codantes comme les centromères ou les télomères (hétérochromatine constitutive) ou des zones non transcrites dans la cellule considérée à un temps donné (hétérochromatine conditionnelle ou facultative). Le second type de chromatine est l'euchromatine, faiblement colorée, correspondant à une structure relâchée de la chromatine correspondant à la fibre de 10 nm dans laquelle les gènes peuvent être transcrits (pour une revue (Fedorova and Zink, 2008)).

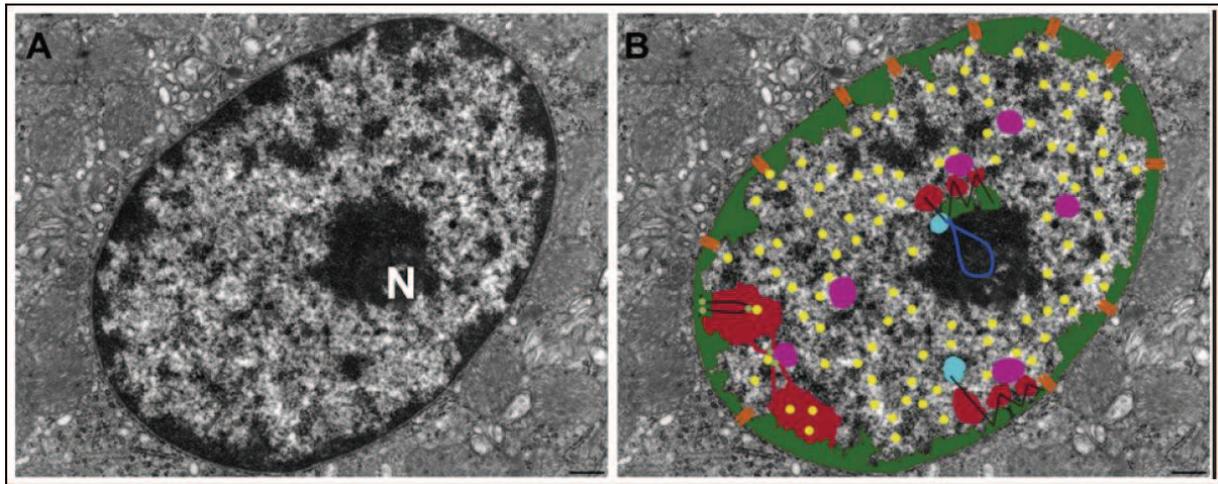


Figure 7 : Euchromatine et hétérochromatine en microscopie électronique.

A. Observation en microscopie électronique des deux états de la chromatine : euchromatine et hétérochromatine. La lettre N montre le nucléole.

B. Schématisation des différentes régions. En vert : l'hétérochromatine, en jaune : zone de transcription active. Image tirée de (Fedorova and Zink, 2008).

2. Chromatine et transcription

Il apparaît donc nettement que la compaction de la chromatine chez les eucaryotes constitue un obstacle majeur à la transcription en limitant l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN. L'initiation de la transcription fait intervenir de façon coordonnée un très grand nombre d'activateurs spécifiques, des complexes coactivateurs ainsi que les facteurs généraux de la transcription. Cela permet l'accès aux promoteurs spécifiques dans la structure compacte de la chromatine, afin d'y initier précisément la transcription par l'ARN Pol II (Figure 8). C'est la catégorie des coactivateurs, constituée de deux grandes familles, qui va particulièrement nous intéresser.

Dans un contexte chromatinien, le promoteur de base est peu accessible à la Pol II et aux GTFs indiquant que d'autres facteurs sont requis pour contrôler l'initiation de la transcription. La régulation fine du taux de transcription d'un gène, dans une condition particulière, fait intervenir des facteurs de la transcription (activateurs ou répresseurs) pouvant se lier spécifiquement à l'ADN dans la région du promoteur et/ou au niveau de séquences de régulation plus éloignées (des « enhancers » ou « silencers »).

Souvent, l'information apportée par les régulateurs est transmise à la machinerie transcriptionnelle de base par des corégulateurs (coactivateurs et corépresseurs). Ceci peut se

faire par une interaction directe entre les corégulateurs et la machinerie de base ou de façon indirecte grâce à une modification de la structure de la chromatine.

On distingue donc des complexes adaptateurs, comme le complexe Mediator qui lie les activateurs et la grande sous-unité de la Pol II et joue un rôle crucial dans la régulation de la transcription d'un très grand nombre de gènes d'une part, et d'autre part des complexes de remodelage de la chromatine (pour une revue (Malik and Roeder, 2010)).

Parmi les corégulateurs modifiant la structure de la chromatine, on distingue les complexes de remodelage ATP dépendants qui vont altérer l'association des histones à l'ADN (pour une revue (Workman and Kingston, 1998)). Le complexe SWI-SNF peut par exemple être citer : on trouve des homologues chez la levure *S. cerevisiae*, la drosophile et l'homme. Ces complexes sont formés par de nombreuses sous-unités dont une possède une activité ATPase. Trois modes de remodelage de la chromatine ont été mis en évidence : un mouvement de translation de certains octamères d'histones, l'élimination d'un octamère d'histones, ou la modification de la distance entre deux nucléosomes.

D'autres complexes corégulateurs entraînent des modifications post-traductionnelles des histones : ils participent donc à la mise en place du code des histones (voir ci-dessous).

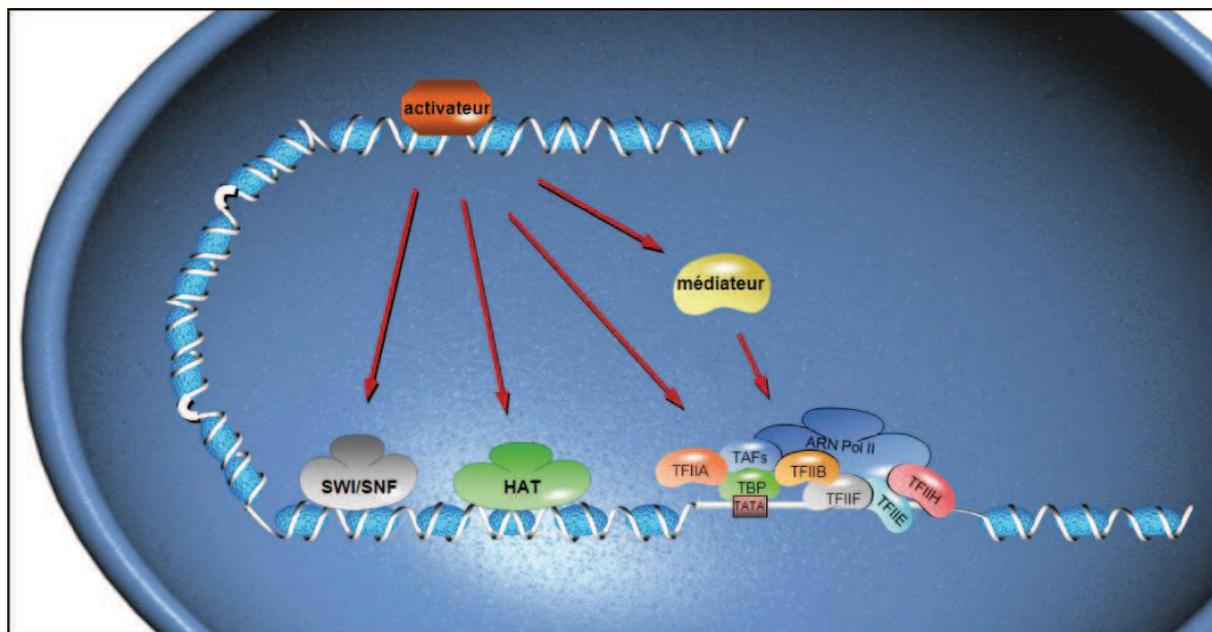


Figure 8 : Induction de la transcription par des activateurs et des coacteurs.

Afin d'initier la transcription, les activateurs (en rouge) se lient à la double hélice d'ADN (en blanc) et agissent sur les composants du PIC ou sur des complexes corégulateurs de la transcription. Ces derniers peuvent interagir directement avec le PIC comme le médiateur (en jaune), être des complexes de remodelage de la chromatine ATP dépendant (en gris) comme le complexe SWI/SNF, ou encore des complexes de modifications post-traductionnelles des histones (en vert) comme des complexes à activité histone acétyltransférase (HAT).

Figure adaptée de (Fry and Peterson, 2001).

3. Influence des modifications post-traductionnelles des histones

a. Les modifications des histones

Comme nous l'avons vu précédemment, les histones sont des protéines basiques s'associant fortement à la molécule d'ADN et constituent la partie protéique du nucléosome. La détermination de la structure tridimensionnelle des nucléosomes a permis de montrer que les extrémités N-terminales des histones sont libres et sortent à l'extérieur du nucléosome alors que la partie globulaire des histones permet l'assemblage de l'octamère autour duquel s'enroule la double hélice d'ADN (Figure 5).

De très nombreuses modifications post-traductionnelles sur différents résidus des protéines histones ont été identifiées. Bien que ces modifications puissent toucher la partie C-terminale ou la région globulaire de l'histone, la plupart d'entre elles concernent des résidus de la queue N-terminale. Toutes ces modifications sont produites par des enzymes spécifiques sur des résidus particuliers et sont réversibles. Il existe plusieurs types de modifications : acétylation (sur des lysines), méthylation (sur des arginines ou des lysines), phosphorylation (sur des sérines ou des thréonines), ubiquitylation et sumoylation (sur des lysines), ADP ribosylation, déimination et isomérisation de la proline (Tableau 1) (pour des revues (Kouzarides, 2007; Li et al., 2007; Young et al., 2010). Cette liste n'est pas exhaustive et de nouveaux types de modifications ont été découverts récemment comme la citrullination (Cuthbert et al., 2004; Hagiwara et al., 2002) ou encore la crotonylation (Tan et al., 2011). Notons que les lysines et les arginines peuvent être mono, di ou triméthylées. La diversité de la nature de ces modifications et des résidus pouvant être modifiés, ainsi que leurs combinaisons, expliquent le très grand nombre de modifications différentes (plus de soixante) observées sur les histones (Figure 9).

Dans ce dernier cas, les protéines possèdent des domaines capables de reconnaître et lier des histones modifiées de façon spécifiques. Il peut s'agir de différents types de complexes : soit des enzymes qui vont à leur tour modifier les histones pour jouer sur la compaction de la chromatine, ou alors des complexes servant pour le recrutement d'autres protéines comme l'ARN Pol II (pour une revue (Kouzarides, 2007)).

La répartition de ces différentes modifications le long du génome a pu être étudiée grâce aux techniques d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Il s'avère qu'il est possible de faire une corrélation entre le type de modification et les régions du gène, permettant ainsi d'établir une carte de ces modifications (Figure 10). Ces états peuvent être reliés à l'activation ou la répression de la transcription. Par exemple, les promoteurs actifs montrent une augmentation en histones acétylées et H3K4 triméthylées. Néanmoins, il faut considérer que les combinaisons de ces différentes modifications et leur implication dans la transcription est plus complexe qu'il n'y paraît.

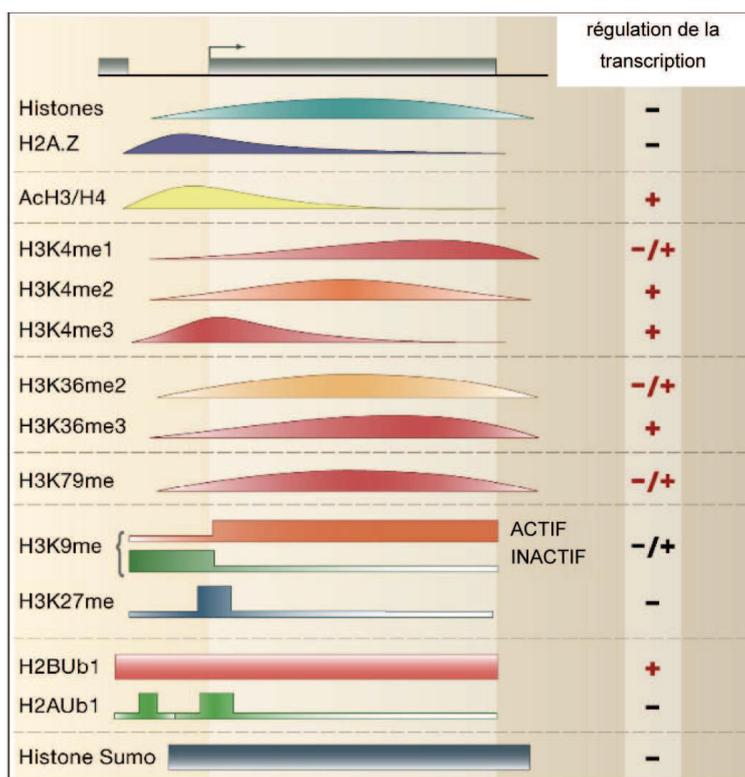


Figure 10 : Distribution des principales modifications d'histone le long des gènes et leurs effets sur la transcription.

Les principales modifications des histones sont cartographiées sur le gène. Leur effet sur la transcription est indiqué à droite (effet activateur : +, effet repressif : -).

ac : acétylation, me : méthylation, ub : mono-ubiquitination, sumo : sumoylation.

Figure tirée de (Li et al., 2007).

b. L'hypothèse du code histone

L'hypothèse du code histone propose que ces modifications post-traductionnelles vont ainsi représenter un « signal » pour les complexes de régulation. En effet, elles vont constituer des surfaces de reconnaissance pour d'autres protéines de régulation qui vont elles-mêmes faciliter ou inhiber la transcription. Différents domaines protéiques reconnaissant des résidus modifiés ont été identifiés comme les bromodomains liant les lysines acétylées ou les chromodomains liant les lysines méthylées. Les modifications vont donc permettre le recrutement de certains complexes spécifiques sur des régions du génome.

Ce « signal » peut alors être considéré comme une façon supplémentaire pour la cellule de stocker de l'information : ces modifications sont localisées sur des régions spécifiques du génome et vont permettre de répondre face aux différents stimuli. Le code correspond donc à une association de modifications sur les histones, les complexes vont « lire » ce code et être recrutés sur les gènes ce qui va entraîner une réponse de la cellule. En outre, ce code prend place à deux niveaux : premièrement pour le fonctionnement de la cellule en réponse aux stimuli (activation de la transcription) et deuxièmement pour la transmission de l'information épigénétique aux cellules filles (variégation). Le code histone apporte donc une information complémentaire à l'information génétique portée par l'ADN (Strahl and Allis, 2000).

Cependant, la complexité des liens entre les modifications des histones semble beaucoup plus importante qu'elle n'avait été établie au départ. Afin d'établir un code plus proche de la réalité, il faudrait considérer les modifications selon qu'elles prennent place à l'un ou l'autre niveau. De plus, une modification peut jouer un rôle différent et d'autres facteurs sont recrutés, selon les autres modifications situées plus ou moins loin sur le gène. Il faut donc prendre en compte non seulement le type de modification et sa localisation, mais aussi la configuration avec les autres modifications et ce en considérant plusieurs nucléosomes et non pas un seul (pour des revues (Henikoff and Shilatifard, 2011; Turner, 2007)).

D. Acétylation et décompaction de la chromatine

1. Comment l'acétylation influence la décompaction de la chromatine

L'acétylation des lysines affecte l'interaction des histones avec l'ADN : les charges basiques des lysines sont neutralisées, les contacts entre l'ADN chargé négativement et les histones sont alors perturbés, favorisant l'ouverture de la chromatine (Hong et al., 1993; Li et al., 1993). Cette décondensation de la chromatine est en accord avec l'observation d'une corrélation entre le niveau d'acétylation des histones au promoteur d'un gène et l'activation de son expression (Figure 10). L'acétylation des histones joue aussi un rôle dans l'activation de la transcription en recrutant d'autres facteurs grâce à des bromodomaines. Comme dit précédemment, ces facteurs peuvent à leur tour réguler l'expression des gènes soit en modifiant les histones ou en recrutant d'autres complexes intermédiaires (voir section F.1.d.). Ces niveaux d'acétylation sont induits et régulés par des enzymes qui vont acétyler les histones (enzymes dites HAT) ou au contraire enlever les molécules d'acétylation (enzymes dites HDAC). Je me focaliserai sur les enzymes HAT dans la suite de ce chapitre.

2. Les enzymes et complexes HAT

Il existe de nombreuses enzymes dont la capacité est d'acétyler les histones (activité HAT) et la plupart d'entre elles a été identifiée au sein de complexes multiprotéiques. Le Tableau 2 fait un résumé des différentes enzymes possédant une telle activité et les familles dans lesquelles nous pouvons les classer selon la nature de leur domaine catalytique (pour des revues (Lee and Workman, 2007; Marmorstein, 2001; Roth et al., 2001; Sterner and Berger, 2000)).

Sans entrer dans les détails, je vais décrire les trois principales familles GNAT, MYST et p300/CBP.

La famille GNAT est celle qui contient le plus de membres (la liste du tableau n'est pas exhaustive). GCN5 fut l'une des premières protéines de ce groupe à être mise en évidence et a donné son nom à cette famille d'enzyme (GNAT pour Gcn5-related-N-Acetyltransferase). Bien que le pourcentage d'identité de séquence entre ces différentes protéines ne soit pas des

plus élevés (20 %), la structure « cœur » est particulièrement bien conservée entre elles. Elles jouent un rôle fonctionnel dans l'activation de la transcription ou dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que dans la réponse aux cassures d'ADN. Nous nous intéressons ici aux enzymes capables d'acétyler les histones, mais il faut noter qu'une partie des protéines de la famille GNAT peut avoir pour cible d'autres types de substrats. (pour une revue (Vetting et al., 2005)). Durant ma thèse, je me suis focalisée sur la protéine GCN5, que l'on retrouve au sein des complexes ATAC et SAGA.

Tableau 2 : Familles des enzymes HAT et leurs substrats.

Les enzymes à activité histone acétyltransférase (HAT) peuvent être classées en cinq grandes familles. Ces enzymes sont pour la plupart retrouvées au sein de complexes multiprotéiques. Les cibles histones varient selon l'enzyme.

Famille de HATs	Enzyme HAT	Complexes contenant l'enzyme	Substrat histone
GNAT	GCN5	SAGA, ATAC, ADA, SLIK	H3 > H4
	PCAF	SAGA, ATAC	H3 > H4
	Hat1	HatB	H2A, H4
	Elp3	elongator	H3
	Hpa2		H3 > H4
MYST	Esa1	NuA4	H2A, H4
	MOF	MSL	H4
	Sas2	SAS	H4
	Sas3	NuA3	H3
	MOZ/MORF		H4 > H3
	Tip60	TIP60	H4 > H2A
	Hbo1	ORC	H3, H4
p300/CBP	p300		H2A, H2B, H3, H4
	CBP		H2A, H2B, H3, H4
Facteur généraux de transcription	TAF1	TFIID	H3 > H2A
	TFIIIC		H3, H4 > H2A
	Nut1	Médiateur	H3 > H4
Co-facteur des récepteurs nucléaires	ACTR		H3 > H4
	SRC1		H3 > H4

La famille MYST doit son nom aux protéines qui la compose : MOZ Ybf2/Sas3 Sas2 Tip60. Ces quatre protéines, ainsi que les autres membres de cette famille, possèdent toutes un domaine d'homologie MYST et partagent un motif A avec la famille GNAT responsable de la reconnaissance et liaison de l'acétylcoA. Ces protéines sont impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires en plus de la transcription. TIP60, par exemple, joue un rôle dans la prolifération cellulaire et la réparation de l'ADN (Legube et al., 2004). MOF, une sous-unité

du complexe MSL participe dans la compensation du dosage du chromosome X chez la drosophile. (pour une revue (Sapountzi and Cote, 2011)).

La famille p300/CBP, quant à elle, est composée de deux protéines comme l'indique son appellation : p300 et CBP (CREB Binding Protein). Elles possèdent des séquences similaires ainsi que le motif A et le bromodomaine de la famille GNAT. Elles jouent un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation ou encore les cancers et elles peuvent interagir avec de nombreux partenaires dont PCAF de la famille GNAT (pour une revue (Goodman and Smolik, 2000)).

Toutes ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement acétyle (CH_3CO) à partir du substrat acétylcoA vers une lysine spécifique (Jiang et al., 2012; Roth et al., 2001). Elles sont considérées comme enzymes activatrices : activatrices de la transcription, mais aussi, impliquées dans d'autres fonctions cellulaires comme par exemple la croissance cellulaire, l'apoptose ou encore en réponse aux cassures de l'ADN. J'entrerais plus en détail sur ces régulations par la suite. La fonction principale de ces enzymes reste néanmoins l'activation de la transcription.

L'acétylation est donc une marque positive : elle permet l'ouverture de la chromatine, le recrutement d'autres complexes protéiques. Cela a pour conséquence l'activation de la transcription et d'autres mécanismes cellulaires. Cependant, de récentes études montrent que cette marque peut aussi être impliquée dans le processus de dégradation des protéines.

3. Aparté : Acétylation et dégradation des protéines

Il existe des cas où l'acétylation n'est pas seulement impliquée dans la régulation de la transcription.

Dans la cellule, le processus de dégradation des protéines consiste en la polyubiquitination de ces dernières par les enzymes E1, E2 et E3 ligases. La chaîne de polyubiquitine sera reconnue par le protéasome qui va alors détruire la protéine. Il arrive que l'acétylation d'une position d'une protéine empêche son ubiquitination, et va donc à l'encontre de la dégradation par le protéasome (Chen et al., 2004; Li et al., 2002). Par exemple, l'acétylation en position C-terminale de p53 perturbe l'ubiquitination de cette protéine et, par conséquent, empêche sa dégradation par le protéasome (Li et al., 2002).

Or, il a été montré que l'acétylation peut être un signal pour la dégradation des protéines. Dans le cas du facteur de transcription GATA1 par exemple, l'acétylation sur certaines lysines entraîne son recrutement sur les promoteurs afin d'activer la transcription. Lorsque la transcription doit cesser, GATA1 est acétylé sur d'autres lysines particulières par p300. Ceci (avec la phosphorylation de GATA1 par une MAPK) est un signal pour entraîner l'ubiquitination de la protéine et ainsi, sa dégradation par le protéasome (Hernandez-Hernandez et al., 2006). Dans ce cas, acétylation et phosphorylation coopèrent pour induire l'ubiquitination et la dégradation de protéines.

Chez la levure, il a été mis en évidence que l'acétylation et la dégradation peuvent être liées. L'acide aminé situé en partie N-terminale de la protéine peut être acétylé : cela constitue un signal spécial pour la dégradation (nommé degrons) (Hwang et al., 2010).

Nous verrons dans la Partie 4 que hATAC est capable d'acétyler un autre substrat que les histones, en l'occurrence la cycline A, et que cela joue un rôle dans la dégradation de cette dernière (Orpinell et al., 2010).

En conclusion, l'acétylation est une modification importante pour les cellules : elle joue un rôle important dans la compaction de la chromatine et donc dans la régulation de la transcription ; elle peut être impliquée dans les interactions entre les protéines et enfin, elle peut influencer la stabilité des protéines en empêchant leur dégradation ou, au contraire, en l'entraînant.

E. GCN5 et PCAF, des enzymes à activité HAT

De nombreuses protéines possédant une activité histone acétyltransférase ont été découvertes et la plupart d'entre elles sont présentes dans des complexes multiprotéiques, comme nous l'avons vu dans le chapitre ci-dessus. GCN5 est la première HAT identifiée et fait partie de la famille des protéines GNATs.

1. GCN5 : une enzyme à activité acétyltransférase

a. Découverte et caractérisation de l'enzyme GCN5

En 1995, Brownell et Allis mettent en évidence qu'un polypeptide de 55 kDa présente une activité HAT chez *Tetrahymena thermophila*, un protozoaire cilié. Ce polypeptide est nommé p55. Il est non seulement capable d'interagir avec la chromatine, mais aussi d'acétyler les histones *in vitro* (Brownell and Allis, 1995). Le gène codant pour p55 est ensuite isolé et la séquence en acides aminés analysée : en comparant cette séquence avec celles contenues dans les bases de données, il ressort que p55 possède 60 % de similarité avec celle de la protéine Gcn5 de la levure (Brownell et al., 1996). Cette forte conservation entre ces deux protéines suggère que celles-ci sont homologues.

Cette protéine yGcn5 de levure a en effet été découverte auparavant dans une étude montrant son implication dans l'activation de la transcription (Georgakopoulos and Thireos, 1992). Etant un homologue de p55, il ne serait pas étonnant que yGcn5 présente elle aussi une activité d'acétylation sur les histones, et c'est ce qui a été effectivement démontré (Brownell et al., 1996). De façon plus précise, yGcn5 est capable de cibler spécifiquement les lysines 9 et 14 de l'histone H3 ainsi que les lysines 8 et 16 de H4 *in vitro* (Kuo et al., 1996). L'analyse de la fonction de yGcn5 *in vivo* a permis de mettre en évidence que l'activité de l'enzyme est critique pour une activation correcte de la transcription de certains gènes spécifiques : des mutants *gcn5Δ* conduisent à des retards de croissance de la levure, correspondant à un problème d'activation de la transcription (Kuo et al., 1998).

b. GCN5 est fortement conservée au cours de l'évolution

Il existe donc une enzyme Gcn5 chez les protozoaires et la levure. Qu'en est-il des organismes supérieurs ? Suite à la découverte de yGcn5 chez la levure, plusieurs études ont été effectuées dans le but de mettre en évidence une telle enzyme chez les métazoaires.

Ainsi, Candau et collaborateurs ont recherché dans les bases de données des séquences codant pour les protéines humaines qui seraient homologues avec yGcn5 et ont pu isoler hGCN5. Ils ont alors confirmé que celle-ci correspondait bien à une version humaine de yGcn5, en montrant des similitudes entre ces protéines (entre autre interaction avec ADA2 et ADA3, des sous-unités du complexe SAGA que je présenterai plus loin dans le manuscrit) (Candau et al., 1996). De la même manière, deux années plus tard GCN5 a été mise en évidence chez la drosophile comme ayant une forte conservation de séquence et une activité spécifique sur l'histone H3 comme yGcn5 (Smith et al., 1998).

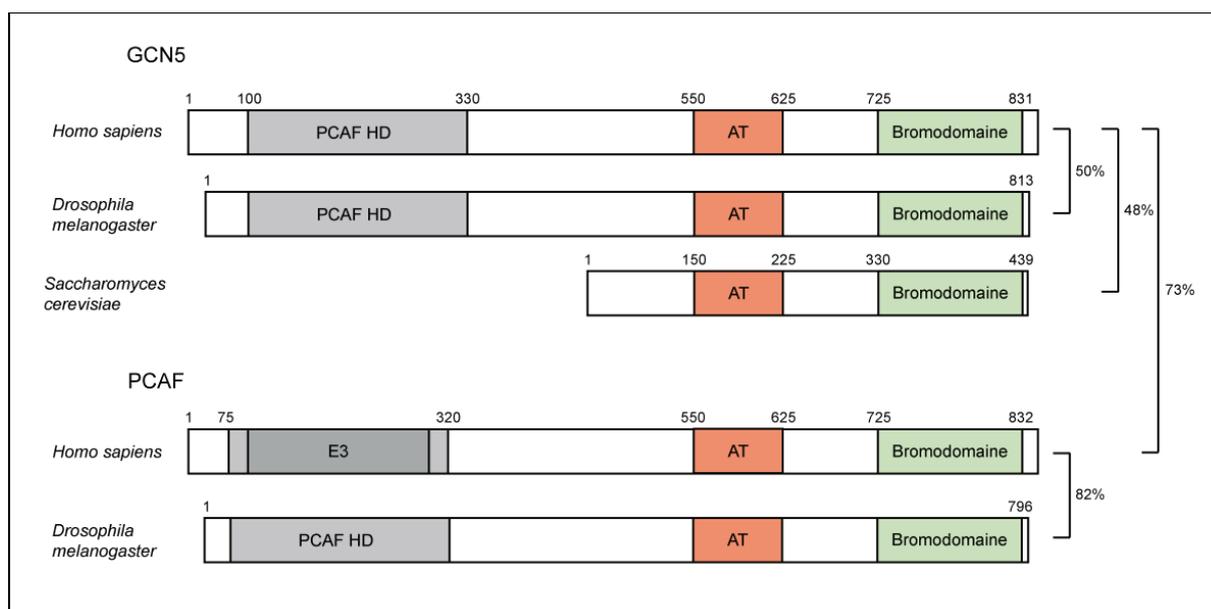


Figure 11 : Similarité de séquence entre GCN5 et PCAF selon les espèces.

Les protéines GCN5 et PCAF sont représentées de façon schématique ici dans différentes espèces. Elles présentent un domaine d'homologie (PCAF-HD), un domaine catalytique AT et un bromodomaine. Un domaine E3 ligase (E3) a été décrit uniquement dans PCAF. Chez *S. cerevisiae*, il n'existe qu'une protéine yGcn5 unique qui ne contient que le domaine AT et le bromodomaine. Le pourcentage d'identité entre les différentes protéines est indiqué à droite du schéma. Les nombres sur les protéines correspondent à la position de l'acide aminé. Figure adaptée de (Smith et al., 1998) et (Nagy and Tora, 2007).

En conclusion, l'étude des séquences protéiques de GCN5 dans les bases de données a permis de constater que celle-ci est fortement conservée au cours de l'évolution, et cela des protozoaires à la levure, jusqu'à l'homme (Brownell et al., 1996; Candau et al., 1996;

Georgakopoulos and Thireos, 1992; Nagy and Tora, 2007). Il est intéressant de remarquer cependant que la protéine chez les métazoaires possède une partie N-terminale en plus, absente chez la levure et les protozoaires (Figure 11).

c. Structure de GCN5 et importance de ses domaines

En comparant les séquences des protéines GCN5 entre elles, il s'avère que les domaines de la protéine sont très fortement conservés. Ainsi, celle-ci possède un bromodomaine en région C-terminale, le domaine acétyltransférase AT au centre de la séquence et une région N-terminale absente chez la levure (Figure 11).

i. Le domaine AT :

Comme dit précédemment, GCN5 possède une activité d'acétylation : c'est ce domaine AT qui lui permet d'acétyler les histones H3 et H4. Nous reviendrons plus en détail sur l'activité AT de GCN5 dans la suite de ce manuscrit. La conformation du substrat au sein de ce domaine varie en fonction du substrat à acétyler (Figure 12) (Poux and Marmorstein, 2003). Cela est révélateur d'une affinité différente avec ce dernier, car les surfaces de contacts entre substrat et enzyme varient.

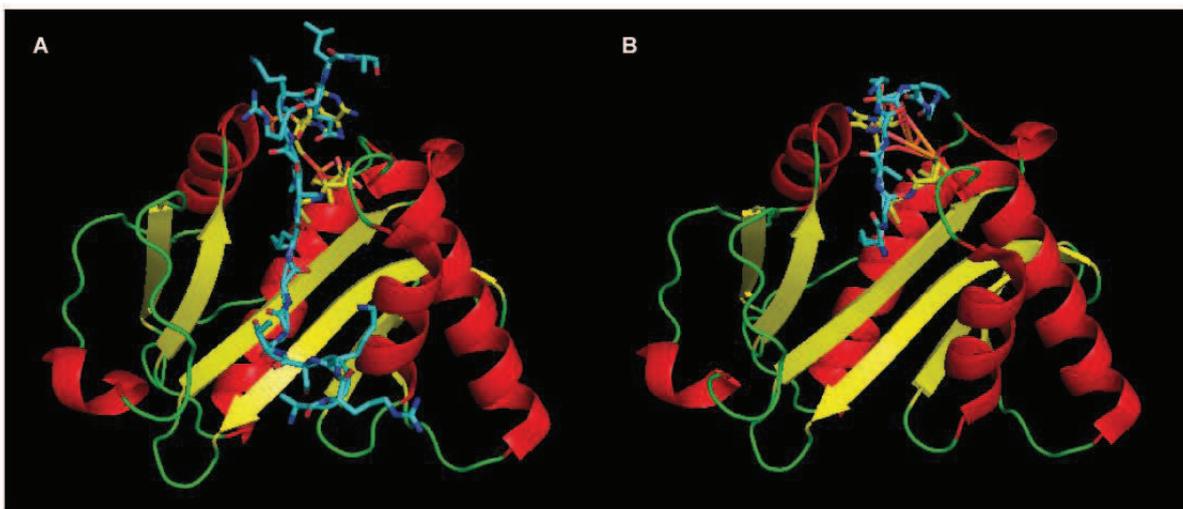


Figure 12 : Représentation tridimensionnelle de la reconnaissance du substrat par le domaine AT.

La structure du domaine AT a été déterminée avec différents peptides mimant un substrat particulier (en bleu) : en A avec l'histone H3, en B avec l'histone H4 (19 acides aminés) avec le coenzyme A (en jaune).

Références PDB : 1PU9 et 1Q2C.

Figure adaptée de (Poux and Marmorstein, 2003).

Notons que le bromodomaine, mais aussi l'environnement protéique de l'enzyme, comme nous le discuterons dans la Partie 3 de ce manuscrit, ont leur importance quant aux cibles spécifiques et la régulation de l'activité de ce domaine AT.

ii. Le bromodomaine

Le bromodomaine est très souvent retrouvé dans les protéines régulatrices de la transcription et de modification de la chromatine (pour une revue (Marmorstein and Berger, 2001; Yang, 2004)). Il est connu pour interagir avec des lysines acétylées. Dans le cas de GCN5, son bromodomaine lui permet effectivement d'être recruté sur des nucléosomes préalablement acétylés (Hassan et al., 2002) et est nécessaire pour l'interaction de l'enzyme avec les histones (Ornaghi et al., 1999). D'un point de vue structural, il a été montré que le bromodomaine de γ Gcn5 se lie aux lysines acétylées et plus particulièrement à la lysine 16 acétylée de l'histone H4 (Owen et al., 2000). Remarquons cependant que chez la drosophile, l'absence de ce domaine n'empêche pas dGCN5 d'acétyler les chromosomes, alors que le domaine AT est crucial (Carre et al., 2005).

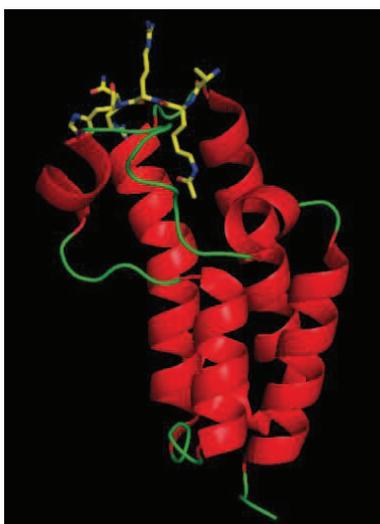


Figure 13 : Structure du bromodomaine de GCN5 en présence du substrat.

La structure tridimensionnelle du bromodomaine de GCN5 a été déterminée en présence d'une partie de l'histone H4 (15 acides aminés) acétylée sur la lysine 16.
Référence PDB : 1E6I.

iii. Le domaine d'homologie PCAF

Les protéines GCN5 chez les métazoaires possèdent un domaine en plus de celle de levure situé en partie N-terminale nommé PCAF-HD (PCAF Homologie Domain) (Figure 11). Ce domaine permet l'interaction avec p300/CBP (voir section 2 ci-après) (Xu et al., 1998).

d. Une version courte de la protéine GCN5 est présente chez les métazoaires

En recherchant dGCN5 chez la drosophile, deux polypeptides ont été découverts : un de 55 kDa et un de 98 kDa (Smith et al., 1998). La protéine de 98 kDa correspond à la protéine GCN5 homologue à celle retrouvée chez les autres métazoaires ; celle de 55 kDa est une version courte de GCN5 se rapprochant de la protéine de levure (partie N-terminale manquante). Cette dernière se retrouve aussi chez la souris et l'homme et serait due à un épissage alternatif du gène *GCN5*. En étudiant les extraits cellulaires, il s'avère que la version longue de la protéine est prédominante (Xu et al., 1998). De plus, il semblerait que la version longue de GCN5 soit plus efficace que la version courte sur les histones (Gamper et al., 2009), ce qui tend à dire que la partie N-terminale de la protéine joue un rôle dans le recrutement de l'enzyme sur le substrat. Notons que l'appellation GCN5 dans ce manuscrit renvoie toujours à la version longue de la protéine.

2. PCAF : la protéine homologue de GCN5

Les génomes des eucaryotes inférieurs et de la plupart des métazoaires codent pour une protéine de type GCN5 unique ; en recherchant des homologues à la protéine yGcn5 de levure, deux gènes paralogues ont été découverts chez les vertébrés : *GCN5* et *PCAF* (Xu et al., 1998; Yang et al., 1996). Ce dernier code pour une protéine qui serait capable d'interagir avec p300/CBP, d'où son nom PCAF pour P300/CBP Associated Factor. Les deux protéines PCAF et p300/CBP sont recrutées au promoteur où PCAF est capable d'acétyler les histones H3 et H4 (Yang et al., 1996).

GCN5 et PCAF sont très similaires et présentent 73 % d'identité ainsi que la même organisation structurale : un bromodomaine à l'extrémité C-terminale, permettant la liaison aux lysines acétylées, précédé du domaine catalytique AT (Figure 11). De même, la structure de leurs domaines est aussi très conservée (Figures 14 et 15). Une région N-terminale, permettant la liaison à p300/CBP, est conservée entre GCN5 et PCAF (PCAF-HD : PCAF homology domain). Notons que ce domaine n'est pas présent dans la protéine yGcn5 de levure.

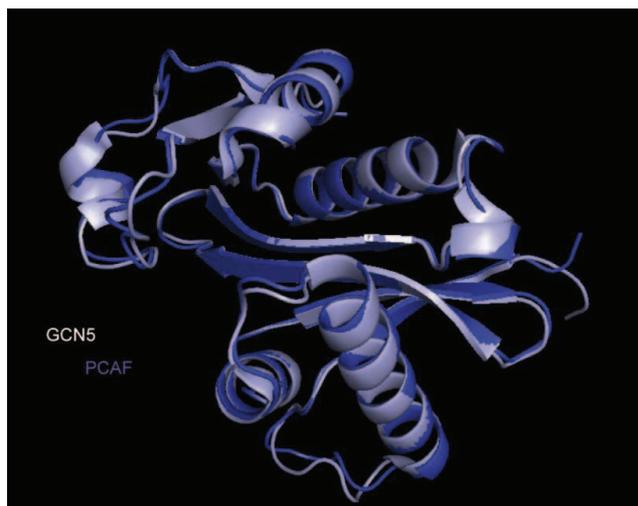


Figure 14 : Superposition des structures tridimensionnelles des domaines AT de GCN5 et PCAF.

Les structures des domaines AT de GCN5 (bleu pâle) et PCAF (bleu foncé) ont été superposées sur Pymol.

Références PDB : 1CM0 pour PCAF, 1Z4R pour GCN5.

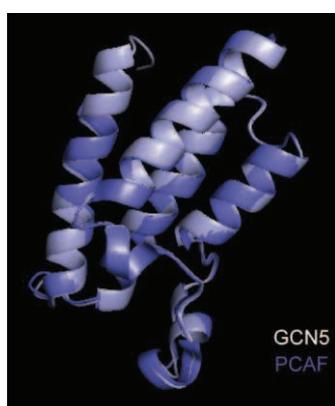


Figure 15 : Superposition des structures tridimensionnelles des bromodomaines de GCN5 et PCAF.

Les structures du bromodomaine de GCN5 (bleu pâle) et PCAF (bleu foncé) ont été superposées sur Pymol.

Références PDB : 3GG3 pour PCAF, 3D7C pour GCN5.

Les activités de GCN5 et PCAF sont partiellement redondantes mais, elles présentent également des fonctions spécifiques. En effet, leur délétion chez la souris n'induit pas les mêmes phénotypes et les profils d'expression de ces enzymes diffèrent. L'inactivation de *GCN5* chez la souris entraîne une létalité embryonnaire qui n'est pas observée chez les souris mutantes *PCAF*^{-/-} (Xu et al., 2000). L'inactivation de GCN5 entraîne une augmentation de l'expression de PCAF et inversement (Nagy et al., 2010).

Il est également intéressant de noter que GCN5 et PCAF ne sont pas toujours exprimées de la même manière selon les tissus : celles-ci sont en quantité équivalente dans le cœur, le foie, le rein et le muscle, tandis que GCN5 est prédominant par exemple dans le cerveau, le thymus, la rate et le testicule chez la souris (Xu et al., 1998).

Enfin, PCAF présente une activité enzymatique supplémentaire à celle de HAT : une activité d'ubiquitine ligase (Benkirane et al., 2010; Linares et al., 2007). En effet, la protéine présente un domaine E3 ligase au sein du domaine PCAF-HD et par cette action entre dans la voie de régulation de p53. Ainsi, PCAF peut activer p53 en acétylant cette dernière et, en

parallèle, ubiquitiner l'oncoprotéine Hmd2. Celle-ci sera dégradée et ne pourra donc plus agir pour dégrader p53.

3. GCN5 et PCAF acétylent les histones

Chez la levure, yGcn5 acétyle les lysines 9 et 14 de H3 ainsi que les lysines 8 et 16 de H4 (Kuo et al., 1996) ; mais aussi la lysine 36 de H3 (Morris et al., 2007). Il a été mis en évidence dans un premier temps que dGCN5 est nécessaire pour acétyler les chromosomes polytènes et, plus particulièrement, les positions 9 et 14 de H3 (Carre et al., 2005). Comme nous le verrons ci-après, la spécificité d'action de dGCN5 sur les histones dépend en fait de son intégration dans des complexes multiprotéiques (dSAGA ou dATAC). Chez les mammifères, GCN5 et PCAF acétylent préférentiellement les histones H3, en particulier la lysine 14 (Nagy et al., 2010; Schiltz et al., 1999; Xu et al., 1998). De plus, la double délétion GCN5/PCAF entraîne une diminution du niveau de lysine 9 des histones H3 acétylées dans des lignées cellulaires murines (Jin et al., 2011).

4. GCN5 et PCAF acétylent des substrats de type non-histone

GCN5 et PCAF ont été caractérisées comme acétylant les histones, jouant ainsi un rôle dans la décompaction de la chromatine et l'activation de la transcription. Il reste encore beaucoup à faire pour comprendre exactement l'activité des complexes HAT sur les histones. Néanmoins, qu'en est-il des substrats non-histones ?

Il a été mis en évidence, dès les années 70, que d'autres substrats que les histones peuvent être acétylés (Sonnenbichler, 1979). Depuis, plusieurs études ont montré que GCN5 et PCAF sont aussi capables d'acétyler ces derniers. Cela a pour conséquence que ces deux enzymes jouent un rôle dans différents mécanismes de la cellule (Figure 16). Je ne parlerai ici que de quelques exemples.

Ainsi, PCAF acétyle la protéine MLP (Muscle LIM Protein) lorsque celle-ci se lie aux myofilaments. Cela conduit à l'activation de la contraction des myofilaments du muscle cardiaque. En alternance avec une HDAC, l'activité de PCAF sur MLP permet la régulation de la contraction musculaire (Gupta et al., 2008).

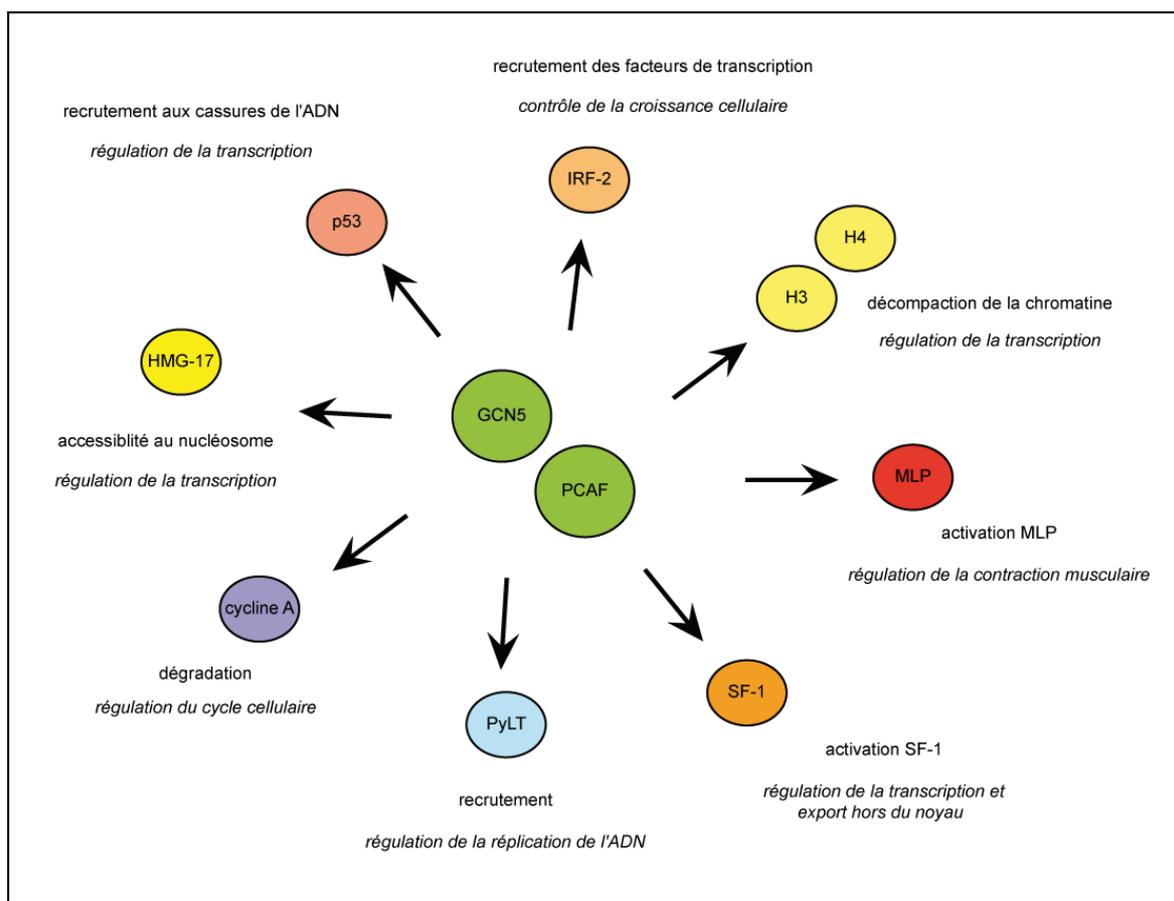


Figure 16 : GCN5 et PCAF acétylent différents substrats non-histones.

GCN5 et PCAF peuvent acétyler des substrats de type non-histone (désignés par les flèches), ce qui aura différentes conséquences pour la cellule et permet de réguler plusieurs mécanismes (en italique).

J'ai présenté précédemment que l'acétylation peut être un signal pour lancer le processus de dégradation de certaines protéines : comme nous le verrons dans la partie 4 de ce manuscrit, GCN5 et PCAF jouent aussi un rôle dans ce mécanisme, plus précisément en acétylant la cycline A (Mateo et al., 2009; Mateo et al., 2010; Orpinell et al., 2010).

De plus, la protéine suppresseur de tumeur p53 peut être acétylée *in vitro* et *in vivo*. Ceci conduit à l'activation de p53 pour se lier spécifiquement à l'ADN : les groupements acétyles vont perturber la conformation de la protéine et « libérer » le domaine de liaison à l'ADN (Gu and Roeder, 1997). Plusieurs enzymes ATs interviennent dans ce processus dont PCAF, en réponse aux cassures de l'ADN suite à une exposition aux UV (Benkirane et al., 2010; Brooks and Gu, 2011; Liu et al., 1999).

Les enzymes ATs peuvent aussi réguler l'activité des facteurs de transcription en acétylant ces derniers. Dans le cas de PCAF, celle-ci acétyle le facteur de transcription IRF-2 (Interferon Regulatory Factor) ; cela provoque le recrutement de cofacteurs et induit alors la croissance cellulaire (Masumi, 2010). GCN5, quant à elle, interagit et acétyle le facteur SF-1 (Steroidogenic Factor-1). Cela entraîne la transactivation de SF-1 : la transcription des gènes *Sf-1* et l'export de la protéine dans le cytoplasme s'en suivent alors (Jacob et al., 2001).

Concernant l'activation des sites de réplication de l'ADN, l'implication de GCN5 et PCAF a pu être démontrée sur les sites de l'origine de réplication du polyomavirus (Py) (Xie et al., 2002). Les enzymes interagissent avec l'antigène PyLT et l'acétylent ; ce dernier peut alors être recruté au niveau de l'ADN et du réplisome.

Nous avons présenté que la condensation de la chromatine est modifiée par l'acétylation de cette dernière par des enzymes telles que GCN5 et PCAF. Or, dans ce processus de décompaction, d'autres protéines associées à la chromatine sont également acétylées. Ainsi, PCAF acétyle HMG-17 afin de libérer les nucléosomes et d'agir sur la chromatine. HMG-17 (High Mobility Group 17) est une protéine qui se lie au nucléosome et, plus précisément, sur la partie N-terminale des histones et l'histone H1 ; cela a pour conséquence d'empêcher la liaison des complexes de modification avec la chromatine et donc la transcription (Crippa et al., 1992). Afin de libérer le nucléosome de la présence de HMG-17, cette dernière va être acétylée par PCAF. Cette action va avoir pour conséquence de fortement diminuer l'affinité de HMG-17 avec le nucléosome (Herrera et al., 1999) et donc de permettre la liaison des facteurs sur la chromatine.

Comme nous le verrons ci-après, GCN5 peut faire partie de complexes multi-protéiques. Il a été montré que GCN5 peut acétyler directement certaines de ces sous-unités en étant au sein même du complexe.

F. Les complexes multiprotéiques contenant GCN5

De nombreuses protéines possédant une activité histone acétyltransférase ont été découvertes et la plupart d'entre elles sont présentes dans des complexes multiprotéiques. GCN5 et PCAF ne dérogent pas à la règle et se retrouvent elles aussi au sein de complexes. Ce chapitre traitera de ces derniers.

1. Le complexe SAGA

a. Mise en évidence de l'existence de SAGA chez *Saccharomyces cerevisiae*

Il a été observé que des mutants de *GCN5*, *ADA2* et *ADA3* présentent le même phénotype transcriptionnel : ces protéines agissent donc soit dans la même voie de signalisation ou au sein d'un même complexe. Il a alors été montré qu'en effet yGcn5 peut interagir avec yAda2 et yAda3 pour former un complexe ADA/GCN5, ce dernier acétylant les histones (Horiuchi et al., 1995; Marcus et al., 1994; Pollard and Peterson, 1997).

D'autres gènes codant pour les protéines Adaptatrices ont été mutés et le mutant *ADA1* conduit également à une baisse de l'activativité transcriptionnelle. La protéine Ada1 interagit effectivement avec ADA/GCN5 (Horiuchi et al., 1997). Or, le phénotype est aussi observé pour un mutant d'*ADA5*. Ce gène correspond à *SPT20* (Marcus et al., 1996). Les protéines Spt pourraient donc s'ajouter aux autres protéines Adaptatrices du complexe ; c'est bien le cas pour Spt3, Spt7, Spt8 et Spt20 (Grant et al., 1997). Le complexe ADA/GCN5 est alors nommé SAGA pour Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase. Par la suite d'autres protéines ont été identifiées comme faisant partie de ce complexe dont des TAFs (Grant et al., 1998a) et Tra1 (Grant et al., 1998b).

yGcn5p se retrouve donc au sein d'un complexe SAGA, d'une taille de 1,8 MDa (Grant et al., 1997) comprenant ainsi une vingtaine de sous-unités. Ces dernières sont organisées en différents groupes de protéines dont le module HAT (Gcn5, Ada2, Ada3 et Sgf29) et un module de déubiquitination DUB (Ubp8, Sgf73, Sgf11 et Sus1). SAGA contient aussi un ensemble de protéines Spt (Spt3, Spt7, Spt8 et Spt20) et un sous-ensemble de TAFs également présent dans le facteur général de transcription TFIID (TAF5, TAF6, TAF9, TAF10 and TAF12), qui avec Ada1 forment un cœur structural. Enfin, le complexe présente

aussi Tra1, en lien avec les activateurs (Tableau 3) (pour une revue (Timmers and Tora, 2005)).

L'activité de yGcn5, au sein de ce complexe multi-protéique, est susceptible d'être régulée par ces différentes sous-unités. En effet, l'enzyme au sein d'un complexe acétyle les lysines 9 et 14 de l'histone H3 plus facilement, en plus de la position 18, sur les histones libres et nucléosomes (Grant et al., 1999). J'entrerai plus en détail sur la régulation de l'enzyme par ses partenaires par la suite.

b. Le complexe SAGA chez les métazoaires : un seul et même complexe

Un complexe homologue au complexe SAGA de levure a été identifié chez la drosophile. Dans ce complexe, dGCN5 est associée à différentes protéines ADA, SPT, TAFs (voir Tableau 3) indiquant une composition très similaire à celle du complexe SAGA de levure (Guelman et al., 2006; Kusch et al., 2003; Muratoglu et al., 2003; Weake et al., 2009). De plus, nous savons que dGCN5 acétyle les lysines K9 et K14 des histones H3 lorsqu'elle fait partie du complexe dSAGA.

Chez l'homme, plusieurs équipes ont identifié des complexes homologues au complexe SAGA de levure. Ces complexes ont tous une activité HAT portée par GCN5 et ont été nommés TFTC (TBP-free-TAF-containing) (Wieczorek et al., 1998) ou STAGA (SPT3-TAF9-GCN5 Acetyltransferase) (Martinez et al., 1998). Différentes méthodes ont été utilisées pour purifier et caractériser ces complexes expliquant de légères différences de composition entre TFTC et STAGA. Cependant, plusieurs données récentes indiquent que ces complexes sont en fait identiques et sont donc les orthologues de SAGA chez *S. cerevisiae* (Nagy and Tora, 2007). A l'heure actuelle, pour toutes les sous-unités du complexe de levure, on a pu identifier un homologue dans le complexe humain (à l'exception de Spt8) indiquant que ce complexe a été extrêmement bien conservé au cours de l'évolution, de la levure jusqu'aux mammifères (voir Tableau 3).

Ogryzko et collaborateurs ont purifié un complexe multiprotéique contenant PCAF. Ce complexe appelé « complexe PCAF » est composé d'une vingtaine de sous-unités parmi lesquelles ont été identifiées les protéines ADA2, ADA3, SPT3 et les mêmes TAFs que celles présentes dans TFTC ou STAGA (Tableau 3) (Ogryzko et al., 1998). De plus, ces auteurs notent que le complexe PCAF purifié est très similaire, sinon identique, aux complexes contenant GCN5. Il a été mis en évidence que le complexe PCAF acétyle préférentiellement l'histone H3 et plus faiblement l'histone H4 sur un substrat de nucléosomes.

L'ensemble de ces observations indique donc que les complexes TF2C, STAGA ou PCAF identifiés chez l'homme sont les orthologues du complexe de levure SAGA. L'activité HAT de ces complexes est portée soit par la sous-unité GCN5, soit par PCAF. Il s'agit donc d'un même type de complexe, que nous appellerons hSAGA dans ce rapport ; il peut présenter de légères variations de composition en sous-unités (GCN5 ou PCAF par exemple) probablement en rapport avec une régulation fine de leur activité.

Tableau 3 : Composition des complexes de type SAGA contenant GCN5 ou PCAF.

?: présence de la sous-unité non démontrée, -- : absence du facteur dans le complexe.

Tableau adapté de (Nagy and Tora, 2007).

Complexes 2 MDa					
Complexe	ySAGA	dSAGA	hTF2C	hSTAGA	hPCAF
Organisme	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Sous-unité HAT	yGcn5	dGCN5	hGCN5	hGCN5	hPCAF
Protéines Ada	yAda1	dADA1	hADA1	hADA1	?
	yAda2	dADA2b	hADA2b	hADA2b	?
	--	--	--	--	hADA2a
	yAda3	dADA3	hADA3	hADA3	hADA3
	yAda5/Spt20	dSPT20	hSPT20	?	?
Protéines Spt	ySpt3	dSPT3	hSPT3	hSPT3	hSPT3
	ySpt7	?	hSPT7L	hSPT7L	?
	ySpt8	?	?	?	?
TAFs	yTAF5	--	--	--	--
		dTAF5L/WDA	hTAF5L	hTAF5L	hTAF5L
	yTAF6		--	--	--
		SAF6	hTAF6L	hTAF6L	hTAF6L
	yTAF9	dTAF9	hTAF9	hTAF9	hTAF9
	yTAF10	dTAF10	hTAF10	hTAF10	hTAF10
	yTAF12	?	hTAF12	hTAF12	hTAF12
Autres	Tra1	dTra1	hTRRAP	hTRRAP	hTRRAP
	ySgf11	dSgf11	ATXN7L3	ATXN7L3	?
	ySgf29	?	hSGF29	hSGF29	?
	ySgf73	?	hATXN7	hATXN7	?
	yUbp8	Nonstop	USP22	USP22	?
	ySus1	dE(y)2	ENY2	ENY2	?
	--	--	--	--	--

c. Composition du complexe et caractéristiques

SAGA est un complexe coactivateur ; il peut en effet être recruté sur des promoteurs spécifiques par des activateurs de la transcription et il présente une activité de modification post-traductionnelle des histones.

i. Un complexe multi-fonctionnel

SAGA possède deux activités enzymatiques de modification des histones : une activité d'acétylation et une activité de déubiquitination. Dans les deux cas, les enzymes sont localisées au sein de modules structuraux dans le complexe (Tableau 4).

Tableau 4 : Comparaison en sous-unités des complexes SAGA humain et de levure.

La composition du complexe SAGA humain et de levure est connue et les sous-unités peuvent être regroupées en différents groupes selon leur fonction au sein du complexe. Les domaines portés par ces protéines sont également indiqués dans ce tableau.

	<i>S.cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	Domaines enzymatiques et d'interaction
Module HAT	Gcn5	GCN5/PCAF	AT, bromodomaine
	Ada2	ADA2b	Zn, SANT, SWIRM
	Ada3	ADA3	
	Sgf29	SGF29	Tudor
Module DUB	Ubp8	USP22	ZnF, DUB
	Sgf73	ATXN7	Zn, Sca7
	Sgf11	ATXN7L3	Zn, Sca7
	Sus1	ENY2	
Lien avec les activateurs	Tra1	TRRAP	Heat repeat, FAT, PI3K
Régulation de TBP	Spt3	SPT3	
	Spt8	-	
Cœur structural	TAF5	TAF5L	WD40
	TAF6	TAF6L	HFD
	TAF9	TAF9	HFD
	TAF10	TAF10	HFD
	TAF12	TAF12	HFD
	Ada1	ADA1	HFD
	Spt7	SPT7	bromodomaine chez la levure
	Spt20	SPT20	

Comme nous l'avons vu, l'activité d'acétylation est réalisée par GCN5 et PCAF. Ces enzymes font partie d'un cœur structural nommé module HAT, contenant l'enzyme, ADA2b, ADA3 et SGF29. Il a tout d'abord été montré que ce module était composé de GCN5, ADA2b et ADA3 et que ces protéines agissent sur l'activité de GCN5 au sein du complexe SAGA

(Gamper et al., 2009). Au cours de ma thèse, comme nous le verrons dans la Partie 3, j'ai pu purifier ce module humain sous la forme d'un tétramère : GCN5-ADA2b-ADA3-SGF29 et nommé cet ensemble module HAT. Dans la même période, Lee et collaborateurs ont aussi pu mettre en évidence que ce module est bien composé de ces quatre protéines chez la levure (Gcn5-Ada2-Ada3-Sgf29) (Lee et al., 2011).

L'activité de déubiquitination est portée par le module dit DUB. Ce dernier est composé chez l'homme des protéines USP22, ATXN7L3, ATXN7 et ENY2. USP22 est l'enzyme capable de déubiquitiner les histones H2A et H2B, avec une forte préférence pour H2B (Lang et al., 2011; Zhao et al., 2008). De façon intéressante, son partenaire ATXN7L3 est nécessaire pour l'intégration du module dans le complexe SAGA et pour l'activité de l'enzyme (Zhao et al., 2008). Récemment, des études structurales ont permis de mieux comprendre l'implication de ATXN7L3 au sein de module DUB et comment elle permet de stimuler l'activité de l'enzyme (Bonnet et al., 2010; Kohler et al., 2010; Lang et al., 2011; Samara et al., 2010).

ii. Fonction des principaux domaines structuraux retrouvés au sein de SAGA

Les protéines du complexe SAGA exercent donc des rôles fonctionnels spécifiques : GCN5 par son domaine AT décrit et USP22 par son domaine catalytique de déubiquitination peuvent modifier la chromatine.

Comme nous le verrons ci-après, plusieurs sous-unités, comme certaines TAFs, possèdent des domaines Histone Fold (HFD) ; ceci permet la formation de dimères très stables qui doivent être à la base de l'assemblage de SAGA (pour une revue (Spedale et al., 2012)). En outre, le bromodomaine de Spt7 de levure permettrait de consolider l'architecture du complexe en se liant aux sous-unités acétylées de SAGA (Hassan et al., 2002; Wu and Winston, 2002). Il en est de même pour TAF5 présentant un domaine WD40 (Durso et al., 2001). Les domaines SANT et SWIRM d'ADA2b font la liaison avec respectivement GCN5 et ADA3 chez l'homme (Gamper et al., 2009).

Les autres domaines jouent un rôle dans la liaison avec la chromatine. De nombreux doigts de zinc sont présents pour l'interaction avec l'ADN. Le bromodomaine de GCN5 reconnaît quant à lui les lysines acétylées des histones (Hassan et al., 2002), tandis que le domaine SCA7 de ATXN7 permet la liaison aux histones H2A et H2B (Bonnet et al., 2010). Le domaine Tudor de SGF29, quant à lui, peut lier les lysines méthylés, en particulier la lysine 4 di ou triméthylée de l'histone H3 comme nous le discuterons dans la partie 3 (Bian et al., 2011; Vermeulen et al., 2010).

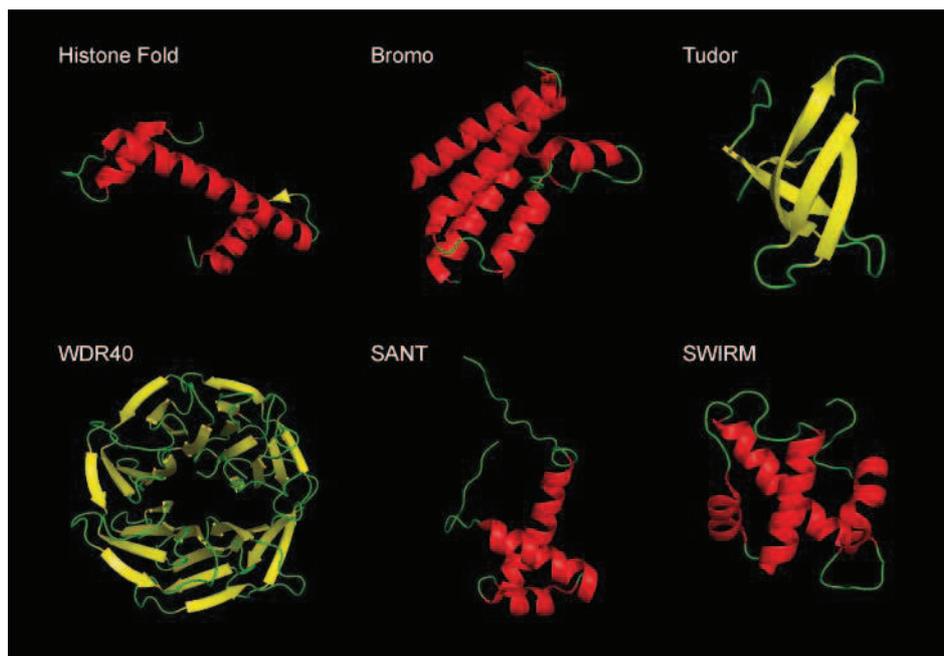


Figure 17 : Structure tridimensionnelle de certains domaines trouvés au sein des protéines du complexe SAGA.

Les sous-unités du complexe SAGA possèdent différents domaines jouant un rôle dans la structure du complexe et la reconnaissance des substrats. Les domaines Histone Fold (HFD), SANT et SWIRM permettent l'interaction avec les partenaires protéiques au sein du complexe. WDR40 sert de plateforme architecturale. Le bromodomaine reconnaît les lysines acétylées tandis que le domaine Tudor reconnaît les arginines méthylées. Références PDB : HFD : 1H3O, bromodomaine : 1F68, tudor 1G5V, WDR40 2G9A, SANT 2CU7, SWIRM 2FQ3.

Figure adaptée de (Lee and Workman, 2007).

iii. Structure et organisation du complexe SAGA

SAGA présente donc déjà deux sous-modules au sein du complexe : le module HAT et DUB. Je vais développer ici plus en détail les connaissances sur la structure du complexe.

Structure globale :

La structure tridimensionnelle à une résolution de 30 Å du complexe SAGA de levure ou humain a été déterminée par microscopie électronique suite à une purification d'affinité TAP (Tandem Affinity Purification) (Figure 18). Il en ressort que le complexe est formé de cinq domaines principaux, conservés entre la levure et l'homme (Brand et al., 1999; Wu et al., 2004).

Grâce à des expériences d'immunomarquage, il a été possible de localiser ces différents domaines : les complexes purifiés ont été incubés avec des anticorps dirigés contre certaines sous-unités ; les structures obtenues ont été comparées avec l'original, l'anticorps étant visible sur le complexe. Le domaine I contient la protéine Tra1. Les TAFs sont localisés

dans les domaines II, III et IV. Le domaine III porte les deux protéines contenant des bromodomains : yGcn5 et Spt7. Spt3 et Spt20 sont retrouvés dans le domaine V (Figure 19).

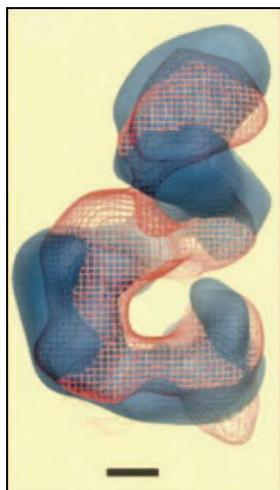


Figure 18 : Superposition des structures tridimensionnelles des complexes SAGA humain et de levure.

La structure des complexes SAGA a été déterminée chez l'homme (en rouge) et la levure (en bleu) par microscopie électronique.

Figure tirée de (Wu et al., 2004).

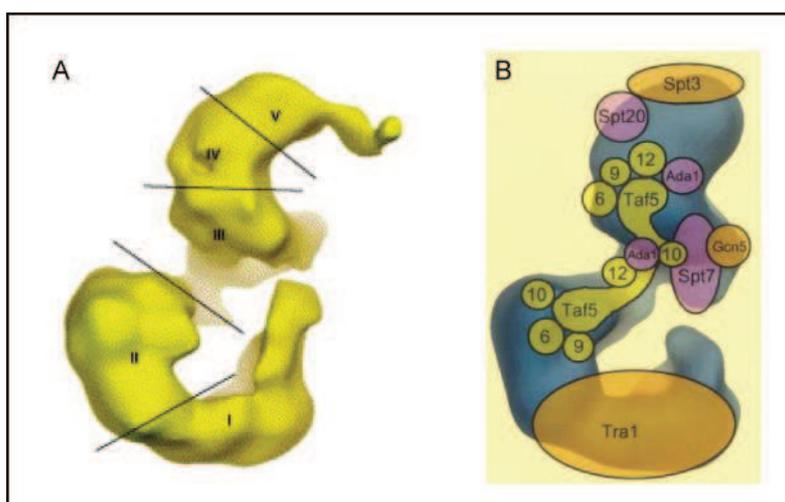


Figure 19 : Localisation des domaines et des sous-unités sur la structure du complexe ySAGA.

A. Les cinq domaines structuraux du complexe SAGA de levure ont été positionnés. Le module I (Tra1) permet les interactions avec les activateurs, le module II contient les TAFs pour l'intégrité du complexe, le module III contient le module présentant l'activité HAT, le module IV contient Ada1 et TAF6 et enfin le module V contient les Spts et permet l'interaction avec TBP chez *S. cerevisiae*.

B. La position des sous-unités a été déterminée par immunomarquage et visualisée par microscopie électronique. Figures tirées de (Timmers and Tora, 2005; Wu et al., 2004).

Implication structurale des sous-unités au sein du complexe SAGA

Les domaines des différentes protéines de SAGA sont importants pour les interactions au sein du complexe (Figure 20). Ainsi, les TAFs possèdent un domaine HFD qui permet la formation d'hétérodimères tels que SPT7-TAF10 et ADA1-TAF12. On retrouve également le

dimère TAF6-TAF9 (Gangloff et al., 2001; Gangloff et al., 2000). La localisation d'ADA1 a été déterminée et une protéine se situe dans le domaine III et l'autre dans le domaine IV. La localisation de TAF12 n'a pas été analysée mais au vue de son interaction forte avec ADA1, nous pouvons déduire qu'elle se trouve aux mêmes endroits que celle-ci.

Notons que chez TFIID, un complexe partageant certaines sous-unités avec SAGA, la protéine TAF5 a une position importante pour l'architecture du complexe (Leurent et al., 2004). Il faut également remarquer que TAF5, TAF6 et TAF9 sont présentes en deux copies dans SAGA. Elles sont retrouvées dans les domaines II, III et IV au cœur même de la structure et permettrait l'assemblage du complexe autour d'elles (Wu et al., 2004). De ce fait, la purification de SAGA par IP contre Spt7 à partir d'une souche de levure mutante pour Ada1 montre que le groupe Gcn5, Ada2, Ada3, Sgf29, Spt3, TAF12 et Tra1 est perdu (Wu et al., 2004).

La protéine Tra1 de *S. cerevisiae* (TRRAP chez l'homme) est la plus grosse des protéines du complexe avec une taille de 400 kDa. Elle permet les interactions de SAGA avec les activateurs et, au vue de sa taille, on suppose qu'elle sert d'architecture à SAGA. En effet, bien que la conservation de séquence entre Tra1 et TRRAP soit moindre, leur structure est très fortement conservée. De plus, des mutants pour les différents domaines de Tra1 montrent une perte de stabilité de SAGA : Tra1 permet plusieurs interactions avec les autres sous-unités et permet de maintenir l'architecture du complexe (Knutson and Hahn, 2011). Notons néanmoins qu'un tel mutant chez *S. pompe* n'empêche pas cette fois de former le complexe (Helmlinger et al., 2011).

Chez la levure, Spt7 est une protéine qui comme GCN5 possède un bromodomaine. Or, lorsque la protéine est au sein du complexe γ SAGA, elle ne peut lier les histones acétylées (Hassan et al., 2002). Cela suggère que Spt7 pourrait reconnaître des protéines autres que les histones, comme par exemple des facteurs de transcription ou d'autres coactivateurs. Plusieurs sous-unités de SAGA étant acétylées, Spt7 pourrait être aussi impliquée dans la structure du complexe. En effet, il a été montré que des complexes SAGA partiels peuvent se former autour de cette protéine (Wu and Winston, 2002).

Concernant les protéines acétylées, certaines sont directement acétylées par γ Gcn5 lorsque l'enzyme se trouve au sein du même complexe γ SAGA, comme l'a montré Cai et collaborateurs. Une souche de levure diploïde, pour à la fois γ Gcn5 sauvage et γ Gcn5 mutante pour son activité catalytique, a été générée. Chaque γ Gcn5 est taguée différemment. Après immunoprécipitation, il ressort que les complexes γ SAGA, avec la version mutante de γ Gcn5, ne présentent pas de sous-unités acétylées, comme pour le sauvage. L'enzyme acétyle

donc les protéines de son propre complexe et non un ySAGA voisin. Cela donne en plus une indication quant à la position des sous-unités au sein de ySAGA, ou du moins sur la flexibilité du complexe. Les protéines discutées ci-dessus correspondent à Spt7, Sgf73 et Ada3 (Cai et al., 2011).

Afin de comprendre quelles sont les interactions entre protéines au sein du complexe SAGA, Lee et collaborateurs ont pratiqué une série de délétions de plusieurs sous-unités chez *Saccharomyces cerevisiae*. Dans chaque cas, les auteurs ont immunoprécipité le complexe en ciblant une protéine en particulier ; puis, ils ont étudié la composition du complexe retenu par protéomique quantitative. De cette étude, il ressort qu'il existe quatre modules : le module DUB (Sgf11, Sus1, Ubp8 et Sgf73) et HAT (Gcn5, Ada2, Ada3 et Sgf29 que nous avons décrit précédemment, mais aussi un module SPT composé de Spt3, Sp7, Spt8, Spt20, Ada1 et Tra1 et enfin le module TAF avec TAF5, TAF6, TAF9, TAF10 et TAF12 (Lee et al., 2011).

De ces mêmes travaux, il a été mis en évidence que la délétion de Gcn5 ou Sgf29 n'affecte pas l'incorporation d'Ada2 et Ada3 dans SAGA. Par contre, lors de l'absence d'Ada2, les sous-unités Gcn5, Ada3 et Sgf29 ne sont plus rattachées à SAGA. Ada2 serait donc le lien pour l'incorporation du module HAT au sein du complexe SAGA.

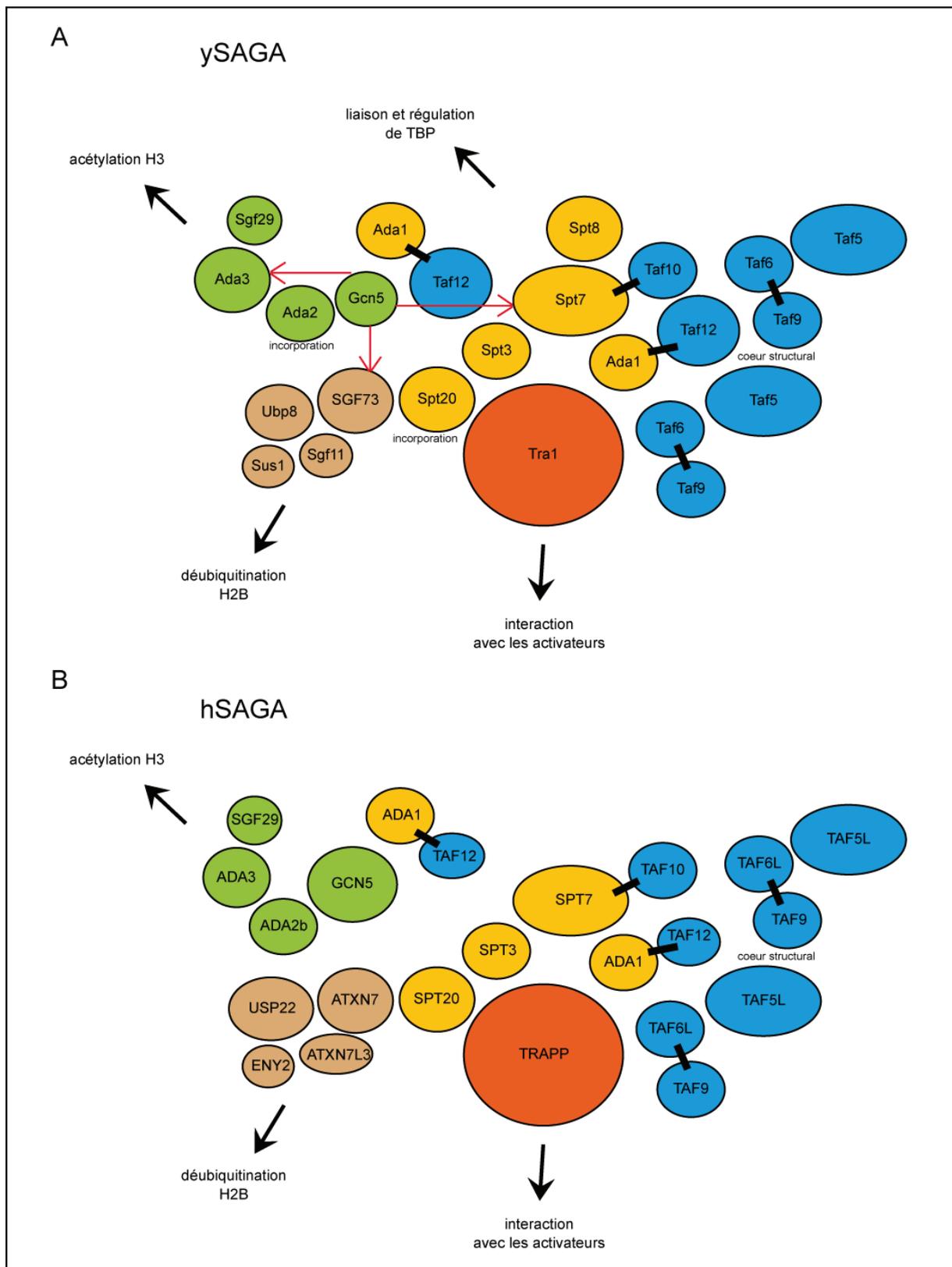
De la même manière, la délétion de Spt20 montre que le module DUB et Tra1 ne sont plus purifiés avec le complexe SAGA, sans que les autres sous-unités soient affectées. La protéine Spt20 serait par conséquent un lien pour l'intégration du DUB et de Tra1 au sein du complexe (Lee et al., 2011). Il avait déjà été montré que SPT20 présente un rôle dans l'intégrité du complexe (Nagy et al., 2009; Wu and Winston, 2002), ce rôle est affiné ici.

Figure 20 : Représentation schématique du complexe SAGA humain et de levure.

L'assemblage en sous-unités des complexes SAGA de levure (A) et humain (B) peut être plus ou moins organisé selon les différentes études protéomiques et structurales effectuées sur le complexe.

La taille des cercles est à peu près proportionnelle à celle des protéines entre elles. Les modules sont symbolisés par différentes couleurs : le module HAT est en vert, le module DUB en brun, Tra1 en orange, les protéines TAFs en bleu et les protéines Spts et Ada1 en jaune.

Les flèches rouges indiquent les cibles acétylées par Gcn5 connues. Les traits entre deux cercles indiquent les dimères formés par les interactions entre domaine HFD. Les flèches et le texte indiquent les fonctions occupées par les différents modules.



d. SAGA et la régulation de la transcription

Comme dit précédemment, SAGA contient GCN5 qui acétyle les histones, influençant ainsi la condensation de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes. Par sa composition en sous-unités, il est capable d'interagir avec d'autres protéines de la cellule. Tout d'abord, je présenterai comment ce complexe joue un rôle dans l'initiation de la transcription selon son interaction avec les activateurs de la transcription, son recrutement au niveau des gènes et son action sur les complexes de remodelage (Figure 21).

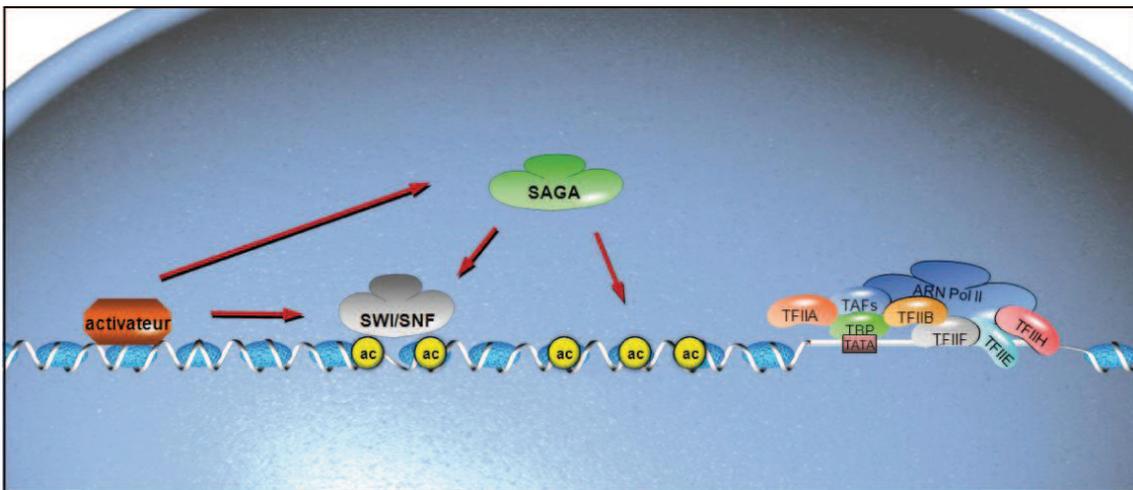


Figure 21 : Recrutement et activité de SAGA sur la chromatine.

Le complexe SAGA est recruté sur la chromatine par les activateurs où il va pouvoir acétyler les histones. Cela va permettre de décompacter la chromatine et de manière indirecte de faciliter le recrutement et l'action des complexes de remodelage.

i. Recrutement de SAGA par les activateurs de la transcription

Au début de l'émergence de l'étude des facteurs de transcription, de nombreuses études ont cherché à identifier les activateurs de la transcription et les co-activateurs capables d'interagir avec ces derniers afin de réguler l'expression des gènes.

Chez la levure, des cribles génétiques ont été effectués afin de déterminer quels co-activateurs pouvaient être la cible de l'activateur Gcn4p ou encore l'activateur du virus de l'herpès VP16. C'est de cette manière qu'a pu être mis en évidence yGcn5.

Ainsi, l'activateur de transcription Gcn4 nécessite la présence de Gcn5 pour activer la transcription des gènes de biosynthèse des acides aminés lorsque la levure se retrouve en milieu pauvre (Georgakopoulos and Thireos, 1992). De plus, il a été montré que les sous-unités de ySAGA sont aussi importantes pour la transcription des gènes régulés par ces

activateurs. γ SAGA peut ainsi interagir directement avec les activateur Gcn4, Gal4 ou encore VP16 dans le mécanisme d'activation de la transcription (Georgakopoulos et al., 1995; Utley et al., 1998; Vignali et al., 2000). Par exemple, l'activateur Gal4 recrute spécifiquement le complexe γ SAGA sur les promoteurs avant l'ARN Pol II et formation du PIC (Bryant and Ptashne, 2003).

ii. Coopération entre SAGA et les complexes de remodelage

SAGA est un complexe de modification post-traductionnelle des histones. Nous avons vu qu'il existe un deuxième type de complexes agissant sur la chromatine : les complexes de remodelage. Ces différents types de cofacteurs agissent en coordination dans la régulation de la chromatine. Qu'en est-il de SAGA et des complexes de remodelage ?

Le complexe SAGA est recruté au niveau des promoteurs des gènes via son bromodomaine. De là, il acétyle les histones grâce à GCN5 comme précédemment décrit. Chez la levure, le complexe de remodelage SWI/SNF contient une protéine, Swi2/Snf2, qui possède elle aussi un bromodomaine. La protéine, et par conséquent le complexe SWI/SNF, va alors se lier à la chromatine via les lysines acétylées par SAGA. Cela entraîne l'ouverture de la chromatine et le relâchement de SAGA par compétition (Figure 22) (Hassan et al., 2006).

Chez les mammifères, en réponse aux cassures double-brin de l'ADN (DSB), le recrutement du complexe de remodelage SWI/SNF est nécessaire et, c'est la coopération entre phosphorylation de H2A et acétylation de H3 qui va faciliter ce recrutement. En effet, le nucléosome présente un variant H2AX phosphorylé sur la sérine 139 en réponse à la lésion de l'ADN, dit γ H2AX. La protéine BRG1, sous-unité de SWI/SNF, possède un bromodomaine qui va permettre de reconnaître et de se lier aux lysines acétylées du même nucléosome. Cette acétylation est primordiale pour ce mécanisme de recrutement et elle est prise en charge en particulier par GCN5, sur les lysines 9, 14, 18 et 23 de H3 et par TIP60 pour l'acétylation de H4. Notons que dans cette situation PCAF ne joue pas de rôle ; seul GCN5 prend part à l'acétylation du nucléosome γ H2AX.

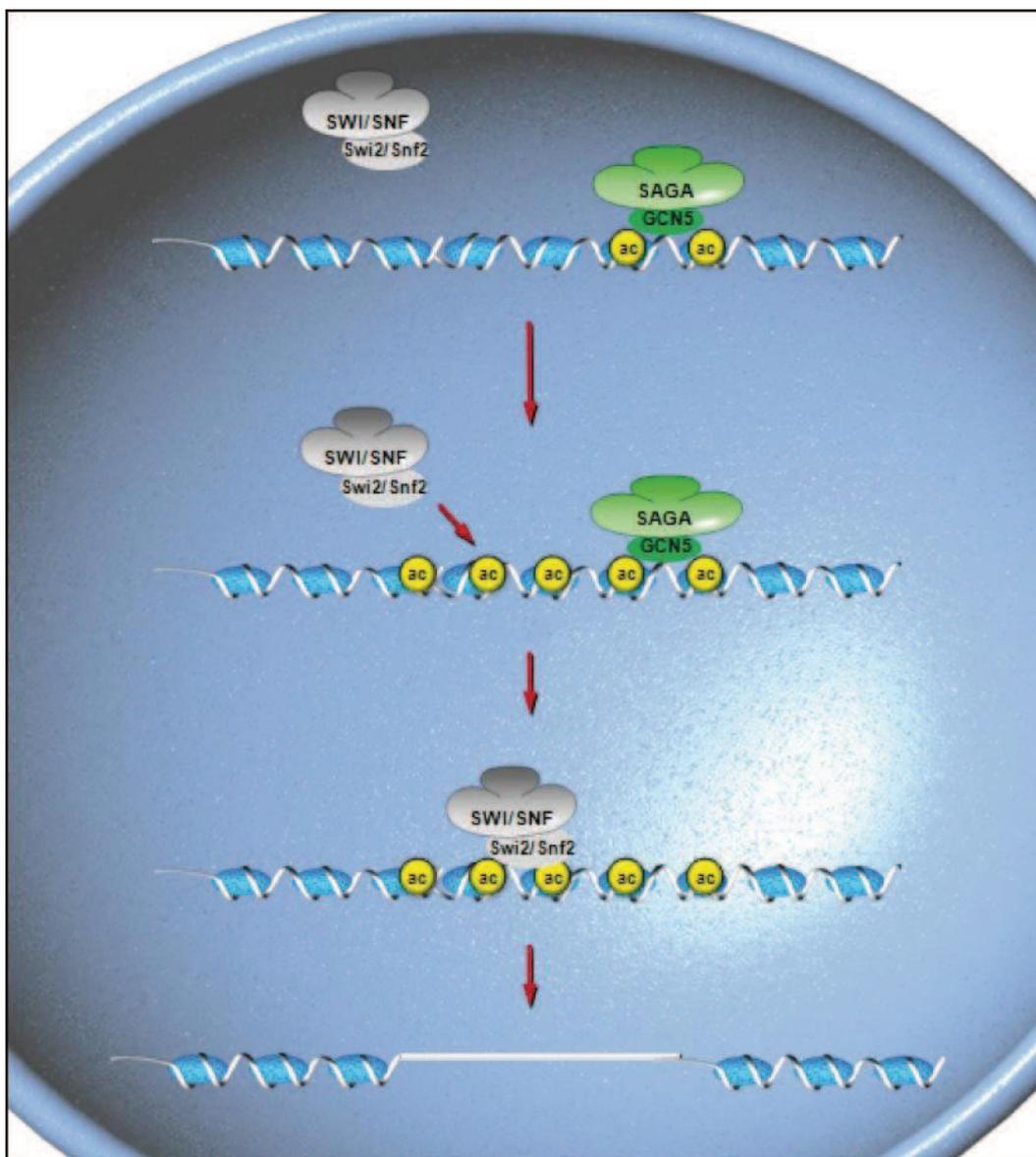


Figure 22 : L'acétylation de la chromatine par SAGA permet le recrutement de SWI/SNF.

Le complexe SAGA interagit avec les lysines acétylées de la chromatine via le bromodomaine de Gcn5 et va acétyler la chromatine. Les nucléosomes ainsi acétylés vont alors servir de plateforme pour le bromodomaine de Swi2/Snf2, une sous-unité du complexe de remodelage SWI/SNF, qui va permettre l'ouverture de la chromatine. Figure adaptée de (Hassan et al., 2006).

2. Les autres complexes contenant Gcn5 chez la levure

a. Le complexe ADA de levure

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, deux complexes HAT contenant Gcn5 ont été identifiés. D'une part un complexe de grande taille précédemment décrit, le complexe SAGA, et d'autre part un complexe de petite taille, le complexe ADA qui contient les

protéines Ada2 et Ada3 associées à Gcn5. Le complexe ADA a été moins bien caractérisé et doit contenir d'autres sous-unités, pas encore identifiées, pour expliquer sa masse observée par chromatographie d'exclusion, d'environ 0,8 MDa (Eberharter et al., 1999; Grant et al., 1997). Une question était de savoir si ADA est un complexe HAT particulier ou s'il s'agit d'un sous-complexe de SAGA, pouvant correspondre à un intermédiaire dans la formation de SAGA. Néanmoins, l'identification d'une sous-unité spécifique du complexe ADA qui n'est pas retrouvée dans SAGA, la protéine Ahc1 (ADA HAT complex Component 1), a permis de confirmer l'existence du complexe HAT ADA. Ahc1 joue un rôle dans l'intégrité structurale du complexe ADA (Eberharter et al., 1999). Plus récemment, l'organisation architecturale d'ADA a été approfondie et une nouvelle sous-unité, Ahc2, a été mise à jour (Lee et al., 2011).

Une délétion du bromodomaine de Gcn5 altère l'activité d'acétylation du complexe SAGA sur les nucléosomes, alors que l'activité d'ADA n'est pas perturbée par cette même délétion. Le complexe ADA fonctionnerait donc d'une manière spécifique. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'association de sous-unités différentes dans chacun des deux complexes (Eberharter et al., 1999). De ce fait, bien qu'acétylant tous deux préférentiellement l'histone H3, ADA contrairement à SAGA n'acétyle pas la lysine en position 9 de H3 (Grant et al., 1999).

b. Le complexe SLIK

En voulant purifier les complexes HAT chez la levure, Pray-Grant et collaborateurs ont pu fractionner deux types de complexes (Pray-Grant et al., 2002). L'un d'eux correspond effectivement au complexe SAGA, par sa composition et son affinité pour les histones. Le second présente les mêmes caractéristiques mais apparaît dans d'autres fractions ; il est alors nommé SLIK pour SAGA-LIKE.

Ce complexe SLIK, contenant yGcn5, est très similaire au complexe SAGA ; il acétyle les mêmes lysines de l'histone H3 et est capable de réguler la transcription des gènes. Cependant, après des analyses par western blot et spectrométrie de masse, contrairement à SAGA il ne contient pas Spt8 et comporte une version tronquée de Spt7. Cette dernière est effectivement clivée par la protéase pep4, définissant par conséquent une version courte de Spt7 pour son incorporation dans SLIK et non SAGA (Spedale et al., 2010).

De plus, SLIK possède une sous-unité qui lui est spécifique, Rtg2, qui contrôle l'expression des gènes lors de dysfonctionnement des mitochondries. Celle-ci est essentielle à l'intégrité du complexe.

Par ailleurs, des mutants de *SPT8* ou *RTG2* ne présentent pas systématiquement les mêmes phénotypes selon les sources de carbone apportées en milieu appauvri, suggérant que SAGA et SLIK possèdent des fonctions redondantes mais aussi spécifiques (Pray-Grant et al., 2002).

G. Découverte d'un second complexe contenant GCN5 chez les métazoaires : le complexe ATAC

1. Deux gènes codant pour ADA2 chez les eucaryotes supérieurs

A la suite de l'identification du complexe ADA chez la levure, on pouvait se demander si un complexe équivalent existe aussi chez les métazoaires. La réponse à cette question est venue de l'identification de deux gènes paralogues *ADA2* chez la drosophile : *ADA2a* et *ADA2b* (Kusch et al., 2003; Muratoglu et al., 2003).

Comme GCN5, ADA2a et ADA2b sont toutes deux indispensables à la survie cellulaire puisque leur délétion chez la drosophile entraîne une létalité au stade larvaire, suggérant que leurs fonctions ne sont pas redondantes (Pankotai et al., 2005).

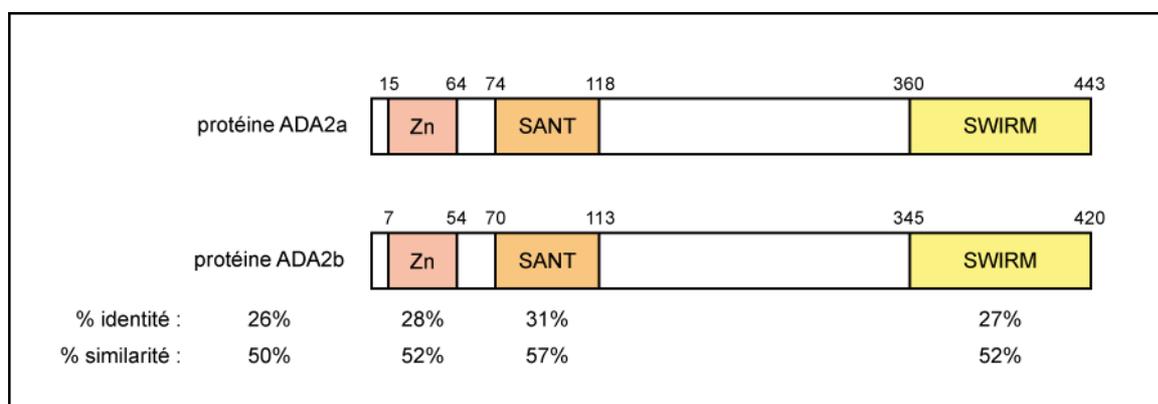


Figure 23 : Comparaison des séquences protéiques d'ADA2a et ADA2b chez l'homme.

Les protéines ADA2a et ADA2b possèdent toutes deux un doigt de zinc (Zn), un domaine SANT et un domaine SWIRM, dont les pourcentages d'identité et de similarité sont indiqués sous chaque domaine. Les pourcentages globaux entre les deux protéines sont précisés à gauche des représentations.

Figure adaptée de (Gamper et al., 2009).

Ces deux protéines présentent une forte similarité de séquence et une même organisation structurale avec un domaine ZZ (un doigt de zinc) et un domaine SANT, connu comme domaine de liaison à l'ADN et aux queues N-terminales des histones (Figure 23). Ces domaines sont retrouvés dans des facteurs de transcription et permettent la liaison à l'ADN. De plus, comme nous l'avons vu en section E.1.c.ii., ces domaines permettent l'interaction avec GCN5 et ADA3. Concernant les autres organismes, des recherches ont mis en évidence que les mammifères présentent également deux homologues d'Ada2 (Figure 24). Par contre, nous n'avons qu'une protéine Ada2 chez la levure, ou *Caenorhabditis elegans*.

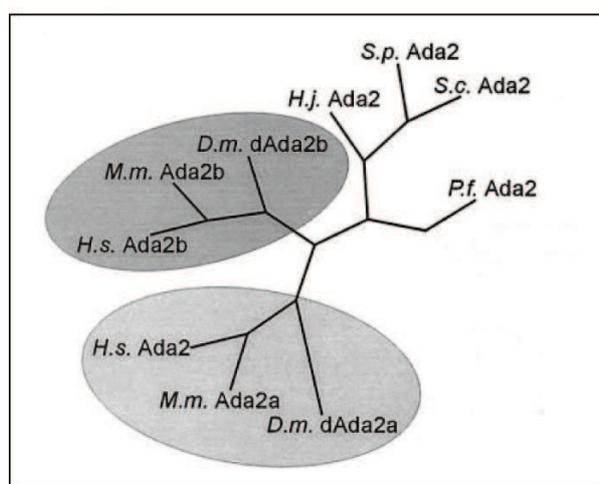


Figure 24 : Arbre phylogénétique des homologues ADA2.

Les levures ne contiennent qu'un seul gène codant pour une protéine Ada2. L'homme, la souris et la drosophile possèdent deux homologues : ADA2a et ADA2b.

D.m. : *Drosophila melanogaster*, H.j. : *Hypocrea jecorina*, H.s. : *Homo sapiens*, M.m. : *Mus musculus*, P.f. : *Plasmodium falciparum*, S.c. : *Saccharomyces cerevisiae*, S.p. : *Schizosaccharomyces pombe*.

Figure adaptée de (Kusch et al., 2003).

2. ADA2a and ADA2b s'incorporent dans deux complexes différents

a. Découvertes chez la drosophile

i. Mise en évidence d'un complexe d'ATAC

L'analyse détaillée des complexes SAGA chez la drosophile et chez l'homme a permis de montrer qu'ADA2b est une sous-unité de ce complexe, alors qu'ADA2a n'est jamais associée au complexe SAGA. Cependant, il est connu qu'ADA2a peut tout de même interagir avec GCN5 ou PCAF (Ogryzko et al., 1998). L'identification des protéines associées à

ADA2a chez la drosophile montre que GCN5 interagit avec ADA2a au sein d'un nouveau complexe HAT, différent de SAGA. Ce complexe est nommé ATAC, pour Ada Two A Containing. dATAC contient la sous-unité catalytique GCN5 ainsi qu'ADA2a et ADA3 ; ces dernières régulent l'activité HAT de GCN5. Ensemble, ces trois protéines forment une masse totale de 215 kDa. Cependant, la masse du complexe ATAC, déterminée par analyse en chromatographie d'exclusion, est d'environ 700-800 kDa ; cela indique que d'autres polypeptides y sont incorporés. L'analyse par spectrométrie de masse dite MudPIT (MUltiDimensional Protein Identification Technology) du complexe ATAC purifié par affinité a effectivement permis d'identifier deux nouvelles sous-unités de ce complexe, HCF (Host Cell Factor) et Atac1 (Guelman et al., 2006). HCF est une protéine de 160 kDa, connue comme faisant partie du complexe VP16 du virus de l'herpès. Cette protéine est fortement conservée chez les eucaryotes supérieurs (chez l'homme il s'agit de HCF1) et est un régulateur de la transcription et du cycle cellulaire. La seconde protéine, nommée Atac1 (ATAC component 1) possède une masse de 41 kDa et présente un domaine SANT et un domaine ZZ, précédemment décrits. Notons que des expériences de co-immunoprécipitations et l'analyse des complexes ATAC et SAGA purifiés, montrent que HCF et Atac1 sont des composants spécifiques d'ATAC et ne font pas partie de SAGA. dADA2a et dADA2b, au sein de complexes différents, auraient donc des fonctions spécifiques (Guelman et al., 2006). Cependant, la somme des masses des protéines GCN5, ADA2a, ADA3, HCF et dAtac1 est d'environ 400 kDa, d'autres sous-unités étaient encore à identifier.

Afin de découvrir l'identité des autres protéines formant ce complexe dATAC, l'équipe de Jerry Workman a approfondi ses données de spectrométrie de masse par de nouvelles expériences de MudPit. Ils ont alors pu mettre en évidence une dizaine de sous-unités dont celles découvertes précédemment, résumées dans le Tableau 5 (Suganuma et al., 2008). Ces nouvelles sous-unités sont la protéine WDS, dATAC2, D12, CG30390, CG10238 et CG32343 dite dATAC3. Ces dernières comportent différents domaines. La protéine WDS présente un domaine WD40, connu pour jouer un rôle dans l'architecture des complexes multiprotéiques. Les protéines CHRAC14 et NC2 β ont un domaine HFD, permettant la liaison avec d'autres protéines ayant le même domaine. La protéine CG30390, quant à elle, présente un domaine Tudor. La protéine D12 possède un domaine YEATS (Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5) de fonction encore inconnue. De façon intéressante, dATAC2 possède un domaine PHD, mais également un domaine AT comme GCN5. Elle est en effet capable d'acétyler les histones. dATAC présente donc deux enzymes HAT au sein d'un même complexe.

ii. Activité d'acétylation des histones de dATAC

Le complexe ATAC de drosophile contient donc deux enzymes HAT : dGCN5 et dATAC2. Des tests d'activité réalisés sur des octamères montrent que le complexe acétyle les histones H3 et H4, avec une forte préférence pour H3. Par contre, si l'on considère les enzymes sous forme recombinantes, dGCN5 acétyle H3 comme attendu mais dATAC2 a pour cible H4. De façon plus précise, la mutation du gène *dAtac2* conduit à une diminution de l'acétylation de H4 sur la lysine 16 dans les embryons de drosophile (Suganuma et al., 2008).

Par ailleurs, l'analyse de drosophiles mutantes pour lesquelles les gènes *dGcn5* et *dAda2a* ont été inactivés, montre des anomalies du chromosome X chez les drosophiles mâles ; ce phénotype rappelle ce qui est observé chez les drosophiles présentant une mutation de sous-unités du complexe de remodelage ATP-dépendant NURF (Nucleosome Remodeling Factor). De plus, Carre et collaborateurs ont découvert que la mutation de NURF diminue l'acétylation de la lysine 12 de l'histone H4, une cible du complexe ATAC. Ces observations suggèrent que le recrutement du complexe de remodelage NURF au niveau d'un promoteur provoque une décondensation de la chromatine permettant ainsi le recrutement du complexe dATAC qui va acétyler les nucléosomes (Carre et al., 2008).

En effet, dATAC facilite également l'activité d'autres classes de complexe de remodelage telles que les complexes de la famille ISWI et SWI-SNF (Suganuma et al., 2008). De façon intéressante, la présence d'acétylCoA et de dATAC dans des expériences de tests de déplacement de nucléosomes permet une meilleure efficacité d'action du complexe ISWI. Nous pourrions supposer que comme SAGA avec Snf2 (voir section F.1.d.ii.), le bromodomaine d'ISWI reconnaît les lysines acétylées par dATAC mais ce n'est pas le cas. L'acétylation permettrait ici uniquement de déstabiliser la chromatine pour faciliter l'action des complexes de remodelage (Suganuma et al., 2008).

b. Qu'en est-il d'un tel complexe ATAC chez les mammifères ?

Lors de mon arrivée au laboratoire, l'existence d'un tel complexe ATAC dans ces organismes n'avait pas encore été démontrée, bien que les protéines de drosophile possèdent toutes un homologue chez l'humain (Tableau 5). Chez l'homme, la seule indication au sujet de l'existence d'un complexe contenant ADA2a et GCN5 remonte à plus de dix ans : des purifications des complexes contenant GCN5 par gel filtration montraient la présence de deux complexes dont SAGA (Demeny et al., 2007) (pour une revue (Nagy and Tora, 2007)). Mais le lien entre ce second complexe et un potentiel complexe ATAC n'avait pas été émis.

Tableau 5 : Composition du complexe dATAC de drosophile et homologues humains putatifs.

Les sous-unités connues du complexe dATAC de drosophile sont à gauche dans le tableau. Les domaines présents sur ces protéines sont indiqués à droite. Les candidats homologues humains susceptibles de faire partie d'un complexe hATAC sont indiqués au milieu.

Sous-unités chez <i>D. melanogaster</i>	Candidats homologues humains (% d'identité avec la drosophile)	Domaine(s) présent sur la protéine de drosophile
dGCN5	hGCN5 (47%)	AT, bromodomaine
dAda2a		Zn, SANT, SWIRM
dAda3		
dATAC1 (CG9200)	ZZZ3 (35%)	Zn, SANT
dATAC2 (CG10414)	CRP2BP (45%) = hATAC2	AT, PHD
CG30390	SGF29 (54%)	Tudor
dATAC3 (CG32343)	GABP β 2 (46%)	Répétitions GA
HCF	HCF1 (67%)	
WDS	WDR5 (91%)	WD40
D12	Yeats domain containing 2 (32%)	YEATS
CHRAC14	Sous-unité p17 ADN polymérase ϵ (35%)	HFD
NC2 β	NC2 (68%)	HFD
CG10238 = dMBIP	MBIP (33%)	

Plusieurs équipes, dont la nôtre, ont alors essayé de purifier et caractériser un complexe ATAC chez l'homme (Nagy et al., 2010; Wang et al., 2008) ou encore chez la souris (Guelman et al., 2009). Je décrirai les résultats obtenus au laboratoire et faisant partie de mon travail de thèse dans la Partie 2 de ce manuscrit. En ce qui concerne les autres travaux effectués par les autres équipes de recherche, celle d'Ernest Martinez a pu purifier un complexe hATAC à partir de cellules HeLa grâce à des anticorps dirigés contre des sous-unités taguées (Wang et al., 2008). La présence des homologues humains résumés dans le Tableau 5 a pu être confirmée ; en plus, de nouveaux éléments tels que le cofacteur POLE4 et la kinase MAP3K7 ont été ajoutés (Wang et al., 2008). De la même manière, les protéines homologues à celles de drosophile et humaines existent chez la souris et forment elles aussi un complexe ATAC (Guelman et al., 2009). Un tableau comparant ces différents résultats est visible dans la publication (Nagy et al., 2010) jointe à ce manuscrit dans la Partie 2.

En conclusion, il existe donc deux complexes contenant GCN5 chez la drosophile, dSAGA et dATAC, et leur composition est conservée chez les mammifères. Or, nous avons vu que GCN5 possède une protéine homologue PCAF chez les vertébrés. Dans notre équipe nous avons pu mettre en évidence que ces deux enzymes sont présentes de façon exclusive au sein des complexes (Krebs et al., 2010; Nagy et al., 2010). Cela démontre la présence de

quatre complexes chez les mammifères : ATAC et SAGA, chacun contenant soit GCN5 soit PCAF (Figure 25 et Tableau 6). Bien que la composition en sous-unités du complexe ATAC soit plus ou moins similaire de la drosophile aux mammifères, la spécificité d'acétylation des histones est différente (voir section ci-après) ; cela soulève des interrogations quant à la spécificité d'action du complexe et son rôle chez l'homme comparé aux insectes.

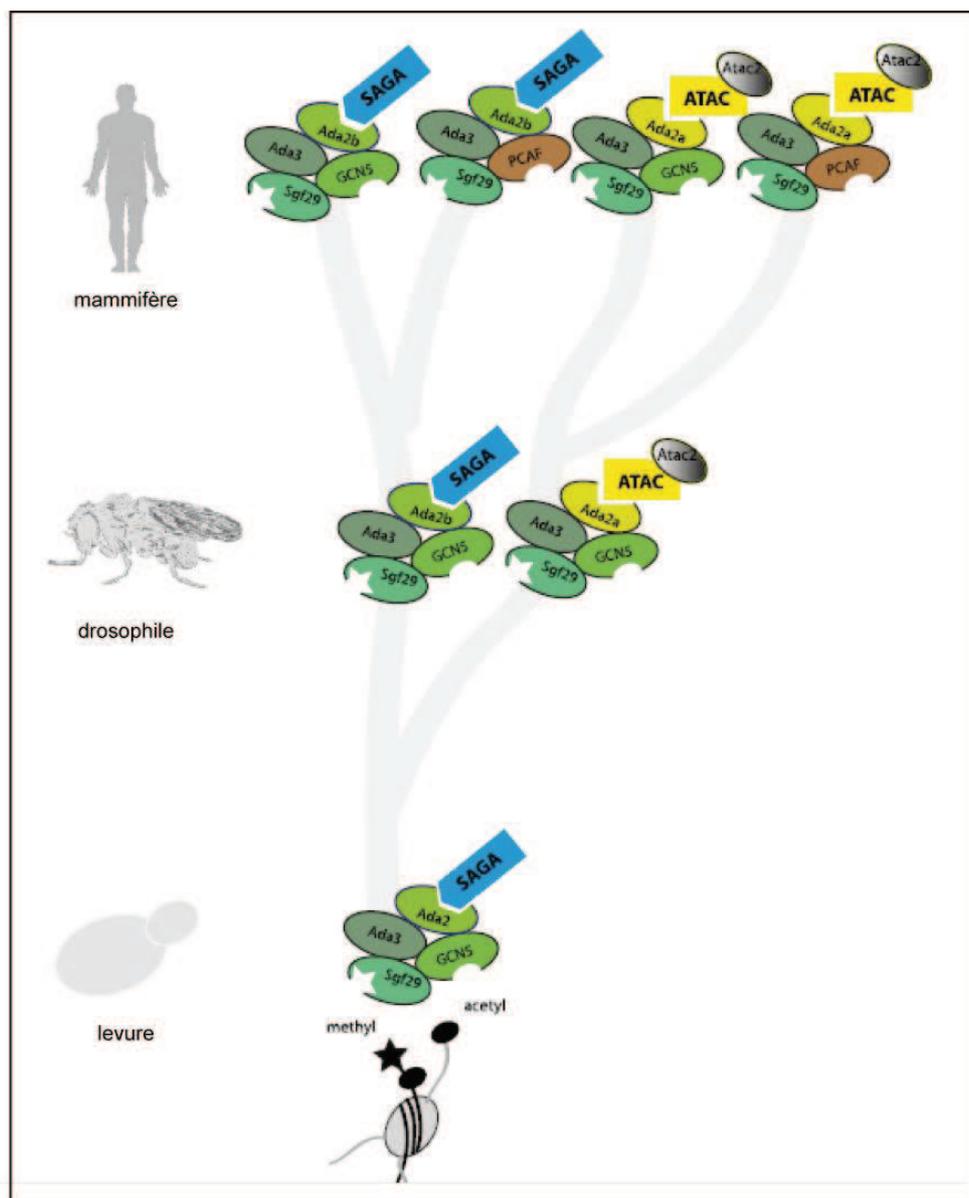


Figure 25 : Les complexes contenant GCN5 au cours de l'évolution.

Chez la levure un seul complexe contenant le module HAT (Gcn5-Ada2-Ada3-Sgf29) est trouvé. Chez la drosophile, il a pu être mis en évidence un deuxième complexe contenant un tel module mais avec ADA2a formant ainsi dATAC. L'homologue d'ADA2a est ADA2b, au sein de dSAGA. Chez l'homme, GCN5 possède une protéine homologue PCAF qui se retrouve aussi au sein de hSAGA ou hATAC.

Figure tirée de (Spedale et al., 2012).

Tableau 6 : Composition des complexes hATAC et hSAGA chez l'homme.

hATAC et hSAGA sont deux complexes multiprotéiques contenant l'enzyme HAT GCN5 (en rouge). L'homologue de GCN5 est PCAF et il peut également faire partie de façon exclusive de ces complexes. Ces enzymes se retrouvent au sein d'un module dit « module HAT » en vert dans le tableau. Les complexes partagent des sous-unités communes (ADA3 et SGF29) mais possèdent en grande majorité des sous-unités spécifiques (ADA2a ou ADA2b et en noir dans le tableau).

Compositions des complexes	
hSAGA	hATAC
GCN5/PCAF	GCN5/PCAF
ADA3	ADA3
SGF29	SGF29
ADA2b	-
-	ADA2a
TRRAP	-
ADA1	
SPT3	-
SPT7L	-
SPT20	-
TAF5L	-
TAF6L	-
TAF9	-
TAF10	-
TAF12	-
ATXN7L3	-
USP22	-
ENY2	-
ATXN7	-
-	ZZZ3
-	Yeats2
-	MBIP
-	ATAC2
-	NC2β
-	WDR5

3. Spécificité d'action des complexes ATAC et SAGA

L'identification de deux complexes HAT, ATAC et SAGA, contenant la même sous-unité catalytique pose des questions particulièrement intéressantes quant au rôle de ces complexes et leur spécificité d'action. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la régulation fine de la transcription chez les eucaryotes fait intervenir de façon coordonnée un très grand nombre de facteurs protéiques : activateurs et répresseurs, coactivateurs et corépresseurs, GTFs. Quel est donc la spécificité d'action de ces deux complexes HAT dans la régulation de la transcription ?

a. Spécificité de l'activité acétyltransférase d'ATAC et SAGA

i. Chez la drosophile

Une observation particulièrement surprenante semble différencier les fonctions des complexes SAGA et ATAC chez la drosophile. En effet, dATAC et dSAGA, bien qu'ils possèdent la même sous-unité catalytique, présentent différentes spécificités d'acétylation des histones.

Rappelons, tout d'abord, l'activité de la protéine dGCN5 isolée, obtenue par surexpression et purification : des tests d'acétylation *in vitro* utilisant des histones libres comme substrat montrent que, dans ce contexte, dGCN5 acétyle principalement l'histone H3 (sur la lysine 14) et plus faiblement l'histone H4 (sur les lysines 8 et 16) ; cependant dGCN5 est incapable d'acétyler ces histones lorsque des mononucléosomes sont utilisés comme substrat. Au sein du complexe dSAGA, l'enzyme peut préférentiellement acétyler l'histone H3, sur les lysines 9, 14, 18 et 23 et plus faiblement les histones H2B et H4 (pour une revue (Nagy and Tora, 2007)). Si l'on considère cette fois-ci le complexe dATAC de drosophile, celui-ci acétyle de façon plus ou moins équivalente les histones H3 et H4 lorsqu'il est testé sur des histones libres. Néanmoins, en opposition avec l'activité de dSAGA, dATAC acétyle préférentiellement l'histone H4 et présente une plus faible activité sur l'histone H3 lorsque des mononucléosomes sont utilisés comme substrat (Guelman et al., 2006; Suganuma et al., 2008).

Ces observations sont confirmées par des résultats obtenus *in vivo*. Ainsi, l'inactivation de *dAda2b* chez la drosophile provoque une diminution de l'acétylation des lysines 9 et 14 des histones H3. Par contre, l'acétylation de ces résidus n'est pas affectée

lorsque *dAda2a* est inactivé (Pankotai et al., 2005). De même, l'acétylation des lysines 5 et 12 des histones H4 est fortement diminuée chez les mutants *dAda2a*, ce qui n'est pas le cas chez les mutants *dAda2b* (Ciurciu et al., 2006). Par ailleurs, la surexpression de *dADA2a* chez les mutants *dAda2b*, ou vice versa, ne montre pas de compensation (Pankotai et al., 2005). En accord avec ces différences de spécificité de l'activité HAT des deux complexes, les gènes cibles de dGCN5 ne sont pas les mêmes selon la présence ou non de dADA2a ou dADA2b.

D'autre part, les différentes sous-unités spécifiques soit de dSAGA soit de dATAC peuvent permettre de recruter chacun de ces complexes sur des promoteurs différents. En accord avec cette hypothèse, des expériences d'immunomarquage sur chromosomes polytènes chez la drosophile montrent que dADA2a et dADA2b se lient soit aux mêmes loci, soit à des loci spécifiques de chaque sous-unité et donc des complexes correspondants (Muratoglu et al., 2003).

Ainsi, la spécificité de l'activité HAT de dGCN5 dépend des sous-unités avec lesquelles elle est associée, et donc de son appartenance à un complexe donné, dATAC ou dSAGA. Il est intéressant de noter que dGCN5 interagit directement avec dADA2 et dADA3, ces deux sous-unités régulant l'activité HAT de dGCN5. On peut donc imaginer que la présence de, soit dADA2a, soit dADA2b, en contact direct avec dGCN5 puisse participer, au moins en partie, à la spécificité des substrats reconnus par dATAC ou dSAGA (voir Discussion Partie 3).

ii. La question de la spécificité chez l'homme

Nous avons vu que chez la drosophile, dATAC acétyle préférentiellement H4 sur les mononucléosomes. Or, de façon surprenante le complexe ATAC chez les mammifères acétyle de façon préférentielle H3 que ce soit sur des histones libres ou des nucléosomes (Guelman et al., 2009; Nagy et al., 2010; Wang et al., 2008).

En ce qui concerne la deuxième enzyme HAT du complexe, ATAC2, elle ne semble pas présenter d'activité chez l'homme ((Nagy et al., 2010) et Partie 2)). Chez la souris, des tests d'activité sur des histones ont montré que d'une part, mGCN5 recombinante acétyle l'histone H3, tandis que mATAC2 recombinante dans les mêmes quantités que mGCN5 ne présente pas d'activité. Afin de pouvoir détecter un signal d'acétylation, les auteurs ont dû utiliser jusqu'à dix fois plus de protéines que pour mGCN5. Notons que ce signal, bien que faible, se situe sur H4 (Guelman et al., 2009). Par ailleurs, la délétion d'*Atac2* chez la souris entraîne

une diminution globale de l'acétylation des positions 9 de H3 ainsi que des lysines 5, 12 et 16 de H4. Les résidus H3K14 et H4K18 ne semblent pas être perturbés. De plus, cette délétion influe sur la survie des cellules et perturbe la progression du cycle cellulaire. Cela est également visible lors de l'évolution du développement embryonnaire murin, les embryons *Atac2*^{-/-} décédant systématiquement avant la naissance. Les effets d'un tel KO sur l'acétylation dans ces embryons confirment de plus une diminution des niveaux d'acétylation sur les lysines décrites plus haut (Guelman et al., 2009).

Chez les mammifères, les complexes ATAC et SAGA acétylent donc tous deux H3. Quel est alors l'intérêt d'avoir la même sous-unité catalytique, responsable à priori de la même activité enzymatique, dans deux complexes HAT différents ?

b. Rôles spécifiques d'ATAC et SAGA au cours de la régulation transcriptionnelle des gènes

Afin de mieux comprendre si ATAC et SAGA possèdent des rôles différents chez les mammifères, nous pouvons nous intéresser à leurs implications sur les gènes. La spécificité de recrutement de hATAC et hSAGA au niveau des gènes est peu connue et demande de plus amples investigations.

Comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit, nous avons montré au laboratoire que ces deux complexes sont recrutés de façon différentes selon le type de stress cellulaire appliqué : hATAC est recruté au niveau des gènes de réponse immédiate après traitement au TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate), mais non hSAGA ; ce dernier, quant à lui, est recruté au niveau des gènes du stress du réticulum endoplasmique après traitement à la thapsigargine (Lang et al., 2011; Nagy et al., 2010; Nagy et al., 2009).

La protéine p53 entre en jeu dans la réponse aux cassures de l'ADN suite à un traitement aux UV. Plusieurs enzymes HAT ont été mises en évidence comme prenant part à ce mécanisme, comme nous l'avions présenté dans la section E.4. PCAF permet la régulation de l'activité de p53. En ce qui concerne le complexe SAGA, des études ont montré que dADA2b chez la drosophile, mais non dADA2a, interagit avec Dmp53 (l'homologue de drosophile de p53) (Kusch et al., 2003) ; il est impliqué dans la régulation de ses gènes (Pankotai et al., 2005). En effet, chez l'homme hGCN5 avec hADA2b sont recrutés sur les promoteurs dépendants de p53 après traitement aux UV, ce qui n'est pas le cas d'hADA2a (Gamper et al., 2009). SAGA entre donc dans le mécanisme de régulation de p53 face aux cassures de l'ADN.

Dans la voie de réponse au stress osmotique, de nombreuses kinases entrent en jeu : il s'agit de cascades de signalisation MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Chez la levure, l'activation de la kinase Hog1 entraîne le recrutement de ySAGA et SWI/SNF sur les gènes de réponse au stress (Proft and Struhl, 2002). Chez la drosophile, il est connu que le stress osmotique va induire la phosphorylation de la kinase JNK (c-jun N-terminale Kinase), qui, à son tour, va phosphoryler c-jun pour induire l'expression de ses gènes. Or, dATAC est capable d'interagir avec les protéines impliquées dans cette cascade de signalisation. dATAC contient la sous-unité CG10238 appelée aussi dMoaE (Suganuma et al., 2010). L'homologue humain de celle-ci est MBIP dont le nom signifie MUK Binding Inhibitory Protein, car elle interagit en effet avec la kinase MUK qui participe à l'induction de l'activation de JNK (Fukuyama et al., 2000). Cela suggère que MBIP au sein d'ATAC joue un rôle dans cette cascade de phosphorylation. En effet, l'induction de dMoaE inhibe l'activation de JNK *in vivo*, alors que la délétion de dATAC2 facilite l'activation de celle-ci. dMoaE, au sein du complexe dATAC, est donc impliqué dans la régulation de JNK. En résumé des expériences de CHIP effectuées, en absence de stress dATAC acétyle H4K16 grâce à dATAC2 sur les promoteurs des gènes, ce qui conduit à leur transcription. Lors d'un stress osmotique, dATAC, via sa sous-unité dMoaE, recrute les kinases et entraîne l'inhibition de l'expression des gènes (Suganuma et al., 2010).

Les complexes ATAC et SAGA sont donc impliqués dans différentes voies de signalisation selon le type de stress cellulaire.

Nous pouvons également faire remarquer qu'ATAC et SAGA peuvent interagir spécifiquement avec d'autres complexes et réguler certains groupes de gènes propres à chacun.

Nous avons suggéré en section G.2.a. que dATAC et le complexe de remodelage NURF pourraient coopérer afin de décondenser la chromatine dans la compensation du dosage du chromosome X chez la drosophile mâle. Afin de confirmer un tel lien et de vérifier que ceci n'implique pas dSAGA, des mutants pour dATAC et dSAGA ont été réalisés. JIL-1 est une kinase qui phosphoryle la sérine 10 de l'histone H3 faisant partie du complexe NURF. En observant les mutants *dAda2a*, il s'avère que le recrutement de JIL-1 sur la chromatine et la proportion de H3S10P sont diminués, alors que ces états ne sont pas affectés dans le mutant *dAda2b*. Il en est de même si les chromosomes polythènes ne sont pas acétylés sur H4K12. La conclusion de cette étude est que dATAC, et non dSAGA a son importance pour la

décompaction chromatinienne des gènes contrôlés par JIL-1 au sein de NURF (Ciurciu et al., 2008).

Le Médiateur est un co-activateur transcriptionnel pouvant faire le lien entre les activateurs et l'ARN Pol II. Or, chez les mammifères, par des expériences d'immunoprécipitation, il ressort qu'ATAC peut interagir de façon stable avec le Médiateur alors qu'aucune sous-unité de SAGA ne montre de telles liaisons (Krebs et al., 2010). De façon intéressante, le complexe ATAC entrant en jeu dans ce type d'interaction, est celui contenant l'enzyme GCN5 ; le complexe contenant PCAF ne peut purifier le Médiateur. Par ailleurs, ce complexe ATAC-Médiateur, dit MECO, permet la régulation de transcription de gènes de type non-codant, en particulier des ARNsn (small nuclear) (Krebs et al., 2010).

Ces complexes peuvent donc réguler des gènes différents. Il est donc important de s'intéresser au recrutement de ceux-ci par des études génomiques à grande échelle afin de mieux comprendre leurs spécificités sur le génome. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage à grande échelle (ChIP-Seq) ont permis de définir un recrutement des complexes sur les gènes, avec des gènes spécifiques d'ATAC, spécifiques de SAGA ou alors des gènes reconnus par les deux complexes. Dans les deux cas, les complexes se lient plus particulièrement à 200 paires de bases en amont du TSS et de façon moins importante dans la région codante. En comparant avec les profils des marques des histones et de l'ARN Pol II, il a été possible d'établir que SAGA est recruté au niveau des promoteurs tandis qu'ATAC se retrouve sur les promoteurs mais aussi sur les enhancers (Krebs et al., 2011).

De plus, des cribles génétiques effectués sur des mutants *dAda2a* et *dAda2b* chez la drosophile ont mis en avant que dATAC et dSAGA régulent des groupes de gènes différents (Pankotai et al., 2010). Bien que tous deux jouent un rôle dans la métamorphose de l'insecte, ces mutants présentent des phénotypes distincts et, en particulier, dATAC active la transcription des gènes impliqués la biosynthèse de l'ecdysone, l'hormone de la mue.

Ainsi, deux complexes contenant l'enzyme HAT GCN5 existent chez l'homme : hATAC et hSAGA. A mon arrivée au laboratoire, l'existence d'un complexe hATAC n'avait pas été démontrée et mon projet principal a été de purifier et caractériser ce complexe (voir Partie 2). Par la suite, j'ai cherché à comprendre comment l'activité de GCN5, au sein de chacun des deux complexes, peut être régulée et comment les partenaires protéiques peuvent influencer l'enzyme et cela, selon le type de substrat histone (voir Partie 3).

En parallèle de ces travaux, j'ai effectué des collaborations avec des collègues de l'équipe qui m'ont amené à travailler sur la sous-unité SPT20 de hSAGA (voir Partie 1) et le rôle de hATAC dans la régulation du cycle cellulaire (voir Partie 4).

Partie 1

hSPT20 est une sous-unité de hSAGA et joue un rôle sur les gènes régulant la réponse au stress du réticulum endoplasmique

Contribution au papier :

The human SPT20-containing SAGA complex plays a direct role in the regulation of Endoplasmic Reticulum stress-induced genes.

Zita Nagy, Anne Riss, Christophe Romier, Xavier le Guezennec, Ashok R. Dongre, Meritxell Orpinell, Jiahuai Han, Henk Stunnenberg and László Tora.

[Mol Cell Biol.](#) 2009 Mar;29(6):1649-60.

Partie 1 : hSPT20 est une sous-unité de hSAGA et joue un rôle sur les gènes régulant la réponse au stress du réticulum endoplasmique

A. Problématique

Chez la levure, la protéine ySpt20 est connue comme étant une sous-unité du complexe ySAGA où elle joue un rôle dans l'intégrité structurale de ce dernier (Grant et al., 1997; Sterner et al., 1999). En outre, les gènes régulés par ySAGA sont pour la plupart des gènes inductibles au stress (Huisinga and Pugh, 2004). Il a été mis en évidence que ySPT20 est impliqué dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique (ER) (Welihinda et al., 1997; Welihinda et al., 2000). Cependant, aucun lien entre ySAGA et la régulation des gènes ER n'a été montré.

Le travail effectué au laboratoire et présenté dans cette publication a été d'établir que chez l'homme, la protéine hSPT20 fait partie du complexe hSAGA et qu'elle joue un rôle dans la régulation des gènes ER.

Contribution apportée au papier :

Afin de pouvoir détecter la protéine SPT20, j'ai purifié et caractérisé plusieurs anticorps contre hSPT20, dont celui utilisé pour cette publication (nommé 2487, cf Figure S4 dans la partie Supplemental). J'ai également effectué des western blot (WB) pour compléter les données (notamment celles de la Figure 7).

B. Résumé de la publication

Note : les figures appelées dans le texte sont celles de la publication.

1. hSPT20 est une sous-unité du complexe hSAGA

Le complexe hSAGA a été purifié à partir de cellules HeLa par immunoprécipitation (IP) (Figure 1 A). Une première IP contre TAF10 permet de purifier les complexes SAGA et TFIID. Une deuxième IP sur cet éluat contre TBP, une sous-unité de TFIID, permet de différencier les deux complexes. Les protéines contenues dans le surnageant ont été identifiées par spectrométrie de masse (Figure 1 D). Parmi celles-ci la protéine p38IP a été trouvée. Après des recherches par BLAST, il s'avère que p38IP est un homologue de ySpt20 de levure et sera donc nommée hSPT20.

Afin de confirmer que cette protéine fait partie de hSAGA, une double IP contre les sous-unités de hSAGA TRRAP et TAF10 a été réalisée et analysée par WB. Il a été possible de mettre en évidence la présence de hSPT20 grâce à un anticorps dirigé contre celle-ci (Figure 2). A l'inverse, une IP contre hSPT20 a permis de révéler les sous-unités de hSAGA par WB (Figure 3 B). Ce complexe hSAGA ainsi purifié présente d'ailleurs toujours une activité d'acétylation et de déubiquitination (Figure 3 D et E). Notons que cette IP contre hSPT20 n'a pas retenu TFIID (Figure 3 C).

Il est donc possible de confirmer que hSPT20 fait partie du complexe hSAGA.

2. Est-ce que hSPT20 peut être trouvé dans d'autres complexes ?

Pour étudier si hSPT20 fait partie d'autres complexes, l'éluat d'une IP contre hSPT20 a été déposé sur une colonne de gel filtration séparant les complexes allant de 5 kDa à 5 MDa. Un complexe est mis en évidence à 2 MDa : par sa taille et par les protéines révélées par WB, nous savons qu'il s'agit du complexe hSAGA (Figure 4 B). Notons qu'un plus petit complexe de 1 à 2 MDa a pu être élué ; il correspondrait à un complexe hSAGA partiel (Figure 4 A). hSPT20 est donc une sous-unité spécifique de hSAGA.

3. hSPT20 est recruté aux promoteurs des gènes induits par un stress ER

Le traitement de cellules HeLa par de la thapsigargine, une molécule inhibitrice de la pompe calcium-ATPase du réticulum endoplasmique, entraîne le recrutement de la polymérase II aux promoteurs des gènes régulés par ce type de stress dits ER (Endoplasmic Reticulum). Ces gènes sont *grp78*, *herpud*, *chop* et *erp70* (Figure 5 B). Par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), il est possible de montrer qu'après traitement à la thapsigargine, la protéine hSPT20 est recrutée sur les gènes ER. Il en est de même pour les protéines hSPT3 et hATXN7L3 qui font partie de hSAGA. Nous pouvons donc dire que hSAGA est recruté sur les promoteurs des gènes ER après induction au stress ER.

4. hSPT20 n'est pas recruté sur des gènes induits par d'autres stress

Il a été montré que hSPT20 interagit avec la protéine p38 MAPK (Zohn et al., 2006). Est-il possible que la protéine hSPT20 et donc hSAGA soit recrutée sur les gènes régulés par p38 MAPK ? Afin de répondre à cette question les cellules HeLa ont été traitées à l'arsénite de sodium, une molécule activatrice de p38 MAPK. Suite à cette induction, la polymérase II est recrutée sur le gène *Egr-1*, régulé par la cascade p38 MAPK. Ce n'est pas le cas de hSPT20 (Figure 6 B et C). De même, hSPT3 et hATXNL3 ne sont pas recrutées (Figure 6 D). hSAGA n'est ainsi pas recruté sur les gènes régulés par p38 MAPK et donc non impliqué dans le stress induit par l'arsénite de sodium.

5. En absence de hSPT20, la structure du complexe hSAGA est déstabilisée et l'expression des gènes ER diminuée

Après diminution de l'expression de hSPT20 par des ARN interférents (ARNsi), une IP contre la sous-unité ATXN7L3 de hSAGA est réalisée. En comparaison avec la même IP réalisée sur des extraits de cellules non traitées par l'ARNsi, nous remarquons par WB une diminution des protéines dans le complexe hSAGA retenu par IP (Figure 7 A piste 3 et 4). De plus, on observe que les gènes ER après induction à la thapsigargine sont moins exprimés dans le cas de l'ARNsi contre SPT20 (Figure 7 D). hSPT20 est donc essentiel à l'assemblage du complexe hSAGA, ce dernier étant nécessaire à l'expression des gènes ER.

C. Publication 1

Publication 1

The Human SPT20-Containing SAGA Complex Plays a Direct Role in the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Genes[∇]§

Zita Nagy,¹ Anne Riss,¹ Christophe Romier,¹ Xavier le Guezennec,² Ashok R. Dongre,³ Meritxell Orpinell,¹ Jiahuai Han,⁴ Henk Stunnenberg,² and László Tora^{1*}

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7104 CNRS, ULP, INSERM U.964, Parc d'Innovation, 1 Rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch Cedex, C.U. de Strasbourg, France¹; Department of Molecular Biology, NCMLS 274, Radboud University Nijmegen, P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands²; Clinical Discovery, Pharmaceutical Research Institute, Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 5400, Princeton, New Jersey 08543³; and Department of Immunology, IMM-32, the Scripps Research Institute, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037⁴

Received 9 July 2008/Returned for modification 3 September 2008/Accepted 16 December 2008

One of the central questions in eukaryotic transcription is how activators can transmit their signal to stimulate gene expression in the context of chromatin. The multisubunit SAGA coactivator complex has both histone acetyltransferase and deubiquitination activities and remodels chromatin to allow transcription. Whether and how SAGA is able to regulate transcription at specific loci is poorly understood. Using mass spectrometry, immunoprecipitation, and Western blot analysis, we have identified human SPT20 (hSPT20) as the human homologue of the yeast Spt20 and show that hSPT20 is a bona fide subunit of the human SAGA (hSAGA; previously called TFTC/STAGA/PCAF) complex and that hSPT20 is required for the integrity of the hSAGA complex. We demonstrate that hSPT20 and other hSAGA subunits, together with RNA polymerase II, are specifically recruited to genes induced by endoplasmic reticulum (ER) stress. In good agreement with the recruitment of hSAGA to the ER stress-regulated genes, knockdown of hSPT20 hampers ER stress response. Surprisingly, hSPT20 recruitment was not observed for genes induced by another type of stress. These results provide evidence for a direct and specific role of the hSPT20-containing SAGA complex in transcriptional induction of ER stress-responsive genes. Thus, hSAGA regulates the transcription of stress-responsive genes in a stress type-dependent manner.

The ordered assembly of a functional preinitiation complex is a prerequisite for the transcription of RNA polymerase II (Pol II). Besides the general transcription factors, the presence of transcriptional activators and cofactors is necessary to make the transcription initiation a tightly regulated process. In addition, activators and repressors have to communicate with the promoter-bound factors in the context of chromatin. To achieve this, chromatin has to be opened, a process which is carried out by ATP-dependent chromatin remodelers and promoted by enzymes catalyzing posttranslational modifications of histone tails (23, 40). One of the most widely studied reactions leading to the loosening up of the chromatin structure is histone acetylation. The activity of histone acetyltransferases (HATs) is thought to increase the accessibility of DNA for transcription factors (23, 29). The first enzyme proven to possess HAT activity was Gcn5 (10). Since then, many other HATs have been identified, most of them functioning in large multiprotein complexes (26). One of these HAT-containing complexes is the yeast SAGA (ySAGA; Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase), comprising the Gcn5 HAT and the Ubp8 deubiquitinase enzymes together with TATA binding protein (TBP)-

associated factors (TAFs), Tra1, Ada, and Spt family proteins (2). The ySAGA complex shares a high degree of similarity with the human TFTC/STAGA/PCAF complexes in subunit content, structure, and function (references 34 and 52 and references therein). The exact composition of the human complexes is still not known; however, recently, several new mammalian homologues of ySAGA subunits have been described (25, 57, 59). These reports further demonstrate that the ySAGA and human TFTC/STAGA/PCAF complexes are functionally and structurally equivalent entities and that a SAGA-type complex can be purified from species all along the evolutionary scale (34).

ySpt20 (also called Ada5) was first described as a suppressor of Ty element transposition that alters correct transcription initiation (39). ySpt20 was later shown to be a bona fide subunit of ySAGA and proved to play a role in the structural integrity of the complex, as no intact SAGA could be purified in *spt20Δ* strains (17, 44, 53). Genomewide analysis suggested that only ~10% of genes are affected when SAGA-specific subunits were deleted or inactivated by thermosensitive mutations (19, 27). Interestingly, ySAGA-dependent genes were suggested to be mostly stress inducible, while yTFIID-regulated genes seem to fulfill housekeeping functions (19). SAGA, and especially ySpt20, was found to be indispensable under endoplasmic reticulum (ER) stress conditions that trigger the unfolded protein response (UPR). It was demonstrated that *spt20Δ* yeast cells undergoing ER stress fail to carry out a proper UPR. In stressed *spt20Δ* cells, no expression of genes, which normally get induced by ER stress, was detected (47, 49). All these results hinted at the involvement of yeast Spt20 (ySpt20) in

* Corresponding author. Mailing address: Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7104 CNRS, ULP, INSERM U.964, Parc d'Innovation, 1 Rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch Cedex, C.U. de Strasbourg, France. Phone: 33 3 88 65 34 44. Fax: 33 38 65 32 01. E-mail: laszlo@igbmc.u-strasbg.fr.

§ Supplemental material for this article may be found at <http://mcb.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 29 December 2008.

the regulation of stress-induced gene transcription. However, whether or not ySAGA was directly or indirectly involved in the regulation of ER stress-induced genes has not been studied.

Until now, no human homologue of ySpt20 has been identified, and its putative role in transcriptional coactivation has not been established. In this study, we describe human SPT20 (hSPT20) as an integral component of the human SAGA (hSAGA) complex by using mass spectrometry (MS) and a variety of biochemical approaches. Moreover, we investigated the cellular role of hSPT20 in the regulation of stress-activated gene transcription. Indeed, we show that hSPT20 is recruited to the promoter of ER stress-induced genes, but not to arsenite stress-regulated genes, suggesting that hSAGA regulates the transcription of stress-responsive genes in a stress type-dependent manner.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies. (i) **SPT20 antibody 2487.** The (C)RPPKRKYLSSGRKSVFQ peptide corresponding to hSPT20 amino acids 20 to 37 was synthesized, coupled to ovalbumin, and used for generation of rabbit polyclonal antibody. The serum was purified by Sulfolink coupling gel (Pierce) as suggested by the manufacturer. The characterization of the antibody is shown in Fig. S5 in the supplemental material.

(ii) **SGF29 antibody 2461.** Polyclonal rabbit serum was developed against the peptide HATNKYEVDIDEEGKERH(C) corresponding to human SGF29 amino acids 185 to 203.

Antibodies against the following proteins have been described earlier: GNC5, 2GC2C11 (6); TAF10, 23TA1H8 (50); TRRAP, 2TRR2D5 (18); TAF5, 1TA1C2 (16); TAF6, 25TA (4); TBP, 3G3 (9); ATXN7, 3SCA1C1 (18); TAF4, 20TA1B12 (32); TAF1, Santa Cruz sc-735; USP22, 2391 (59); ATXN7L3, 2325 and 1ATX2D7 (59); SPT20 (p38IP), 4112 (60); and SPT3 (31), H2BUB (a kind gift from M. Oren).

Immunoprecipitation was carried out as described earlier (14, 28).

Cell growth condition and stress treatments. HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Medium supplemented with 1 g/liter glucose, 5% fetal calf serum, and gentamicin. Stress treatments were carried out using 250 μ M N-arsenite (Sigma), 100 nM thapsigargin (Sigma), or dimethyl sulfoxide (DMSO).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). HeLa cells were grown up to 90% confluence, washed with phosphate-buffered saline, and cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. The reaction was stopped with 0.125 M glycine, and cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline supplemented with 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), scraped, and resuspended in swelling buffer (25 mM HEPES, pH 7.8, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.1% NP-40, 1 mM dithiothreitol [DTT], 0.5 mM PMSF, protease inhibitor cocktail [PIC], Amersham). Cells were broken with a Dounce homogenizer, and the nuclear fraction was resuspended in sonication buffer (50 mM HEPES, pH 7.8, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 0.5% sodium dodecyl sulfate [SDS], 0.5 mM PMSF, PIC). The chromatin was sonicated with a Bioruptor (Diagenode) sonicator into 200- to 500-bp fragments and centrifuged to avoid any remaining cell debris. The supernatant was used for further immunoprecipitation after dilution to a final concentration of 0.1% SDS, supplementing it with sonicated salmon sperm DNA (20 μ g/ml) and bovine serum albumin (1 mg/ml). Protein A (for polyclonal rabbit antibodies)- or protein G (for monoclonal mouse antibodies)-Sepharose beads were washed and saturated with bovine serum albumin and single-stranded DNA. The precleared chromatin samples were shaken overnight at 4°C with the antibody, and then beads were added for 4 h to the samples to pull down specific protein-DNA complexes. The following washes were carried out at 4°C: twice with sonication buffer (0.1% SDS), twice with buffer A (50 mM HEPES, pH 7.8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5 mM PMSF, PIC), twice with buffer B (20 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.5 mM PMSF, PIC), and finally twice with Tris-EDTA buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA). Bound fraction of the chromatin was eluted with 200 μ l of elution buffer (50 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, 1% SDS) at 65°C, RNase A treated (5 μ g/ml), reverse cross-linked (200 mM NaCl) at 65°C overnight, and finally incubated with proteinase K. DNA was phenol-chloroform extracted and precipitated by ethanol and then used for

quantitative PCR (qPCR) analysis using a Roche LightCycler 480 with Sybr green (Qiagen) master mix.

As a negative control, we immunoprecipitated the cross-linked material with an irrelevant monoclonal antibody (anti-glutathione *S*-transferase) or preimmune serum. The background level detected in the immunoprecipitation reached 0.06% input as a maximum (data not shown), and subtracting the corresponding levels from the specific immunoprecipitation would not change the recruitment profile significantly. The ChIP experiments were repeated at least twice, and all the qPCR reactions were done in triplicates. The results from one representative experiment are shown with the standard deviation (SD).

RNA purification, reverse transcription, and qPCR. Total RNA was purified using Trizol reagent (Invitrogen), reverse transcribed by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase using random hexamers, and analyzed by the qPCR machine Roche LightCycler 480 with Sybr green (Qiagen) master mix. All the detected values represented in the manuscript have been normalized to cyclophilin B.

Small interfering RNA (siRNA) negative control (reference number D-001810-10), anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (anti-GAPDH) siRNA (reference number D-001830-10), or anti-hSPT20 siRNA (reference number L-013820-00) from Dharmacon was transfected using Lipofectamine 2000 and OptiMEM serum-free medium, following the recommendations of the supplier.

Nuclear extract (NE) preparation and size exclusion chromatography were described in reference 14. MS was performed using an LTQ-FT mass spectrometer (Thermo Electron, Bremen, Germany) essentially as described previously (59).

Deubiquitination (deUb) assay. Histones were prepared from HeLa cells by lysing the cells in 10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1.5 mM PMSF, 10 mM *N*-ethylmaleimide supplemented with 0.2 M HCl. Samples were incubated on ice for 30 min and centrifuged, and the supernatant was dialyzed first against 0.1 M acetic acid and then against water. Substrate (~2 μ g) was incubated with immunopurified complexes in 100 mM Tris-HCl, pH 8, 5% glycerol, 1 mM EDTA, 3 mM DTT for 2 h at 37°C. Samples were then divided into two; one part was analyzed using Coomassie brilliant blue-stained SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and the other was analyzed using Western blotting.

Peptide acetylation assay. Peptide (1.2 μ g; corresponding to the N-terminal tail of histone H3 at positions 1 to 20) was added to the immunopurified protein sample together with 1 μ l of H3 acetyl coenzyme A (50 μ Ci/ml; Amersham) in the reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM KCl, 5 mM DTT, 4 mM EDTA) and incubated at 30°C for 1 h. Samples were dropped on Whatman P81 nitrocellulose filters, washed three times for 10 min in ice-cold 50 mM NaHCO₃ (pH 9) buffer, and finally dried. Filters were then dropped into 5 ml of ReadySafe liquid scintillation cocktail (Beckman Coulter), and radioactivity was quantified by an LS6000SC Beckman counter.

RESULTS

Identification of hSPT20 as a new subunit of hSAGA. To find potential novel subunits in hSAGA (previously called TFTC), we analyzed by MS the hSAGA complex obtained by immunoprecipitation (IP) of TAF10 containing complexes further depleted of TFIID by anti-TBP IP (7, 50) (Fig. 1A; see Fig. S1 in the supplemental material). Apart from the subunits already described (reference 34 and references therein), a new protein was identified in the sample, with 13 peptides resulting in 19% coverage (Fig. 1B and C). This protein (called p38IP) has been reported to be an interactor of the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and was shown to be required for proper embryogenesis (60). Psi-BLAST searches and multiple alignments revealed that the protein is the closest human homologue of ySpt20, a subunit of ySAGA. Thus, this human protein is called hSPT20. Detailed multiple alignments indicate that Spt20 homologues can be identified in many species and that they all share five conserved regions on their N-terminal part (Fig. 1D; see Fig. S2 in the supplemental material).

Our Psi-BLAST searches also identified a second gene in the human genome homologous to *SPT20* that we called *hSPT20L*

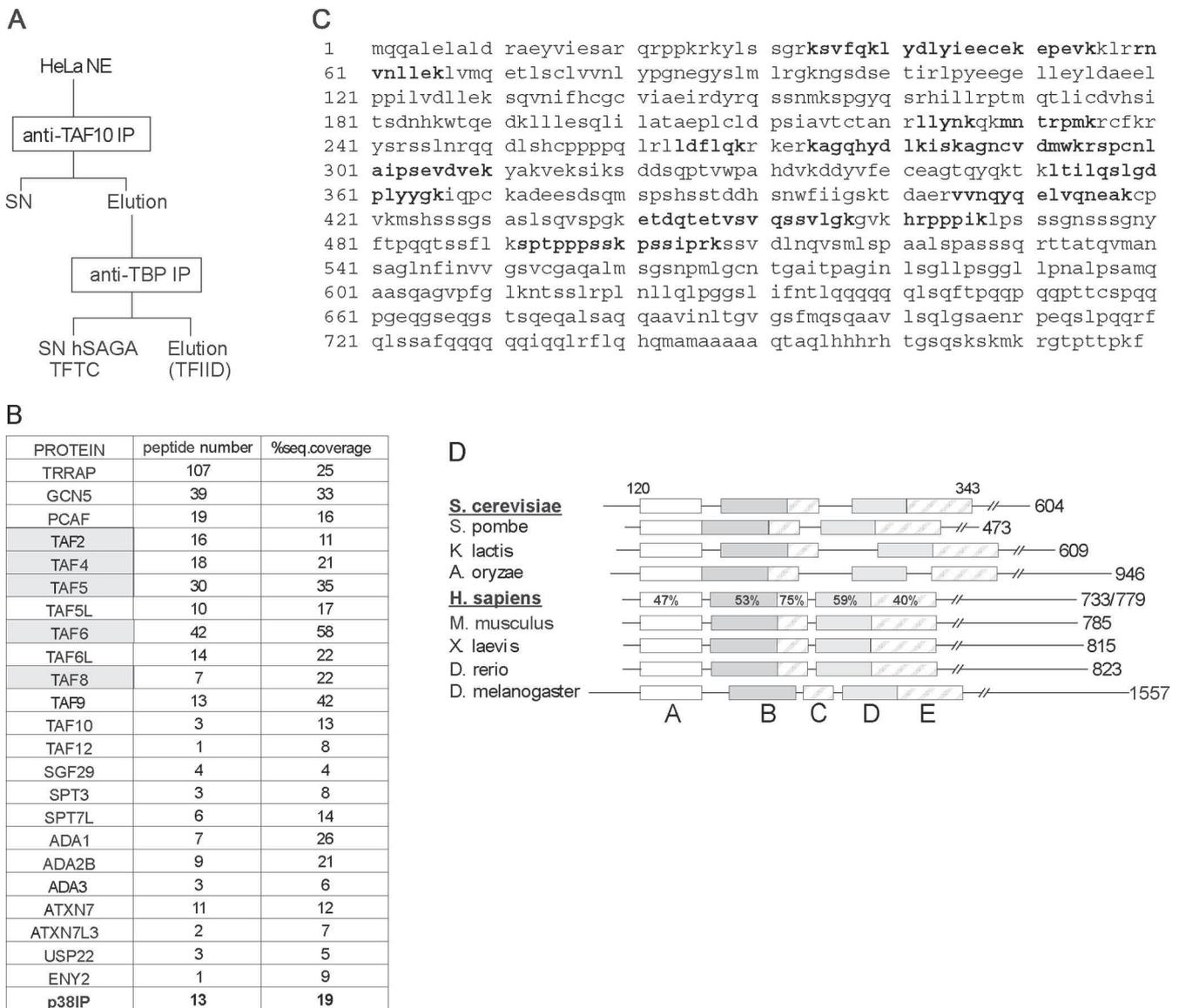


FIG. 1. The newly identified hSAGA component shares sequence similarity with ySpt20. (A) Schematic representation of purifying TFTC (hSAGA) with a TAF10 IP followed by a TBP IP. hSAGA is in the final supernatant fraction (SN hSAGA). (B) Results of an MS analysis of the hSAGA/TFTC sample, purified as shown in panel A (for silver nitrate staining, see Fig. S1 in the supplemental material), are presented. The newly identified subunit, p38IP (called SPT20 further in this study) is bold; TAFs copurifying with the complex (see text) are marked with gray shading. (C) The complete amino acid sequence of the hSPT20 (p38IP) protein identified by MS in human hSAGA preparation is shown. Bold peptides were found in the MS sample. (D) Schematic representation of the multiple alignments highlighting the sequence homology between ySpt20 and the newly identified protein. The alignment covers amino acid positions 120 to 343 in the ySpt20 sequence, as marked on the top of the figure. Five evolutionarily conserved boxes were identified (represented with different shadings); the level of similarity between the yeast and human proteins is marked as a percentage. The length of each protein is marked on the right of the figure. For the human protein, we marked the two putative splice variants (see Fig. S3 in the supplemental material). *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe*; *K. lactis*, *Kluyveromyces lactis*; *A. oryzae*, *Aspergillus oryzae*; *H. sapiens*, *Homo sapiens*; *M. musculus*, *Mus musculus*; *X. laevis*, *Xenopus laevis*; *D. rerio*, *Danio rerio*; *D. melanogaster*, *Drosophila melanogaster*. A to E labeling of the boxes refers to Fig. S2 in the supplemental material, where the detailed sequence alignments of the boxes are shown. Note that the spacing between the conserved boxes is not conserved.

(Table 1). *hSPT20L* is potentially encoding a protein highly similar to hSPT20 (see Fig. S3 in the supplemental material), but no hSPT20L peptide was identified in our MS analysis of hSAGA. In good agreement, *hSPT20L* transcript(s) could not be detected in HeLa cells or in 13 other cell lines, while *hSPT20* was highly expressed in the same cells (see Table S1 in the supplemental material).

Polyclonal antibodies raised against hSPT20 (developed in this study or previously published [60]) detected a polypeptide at the predicted molecular mass (~100 kDa) both in HeLa cell NE and in the TFTC/supernatant hSAGA (SN hSAGA) preparation (Fig. 2B, lanes 1 and 2; see Fig. S4 in the supplemental material). We previously showed that this preparation contains hSAGA and other molecular entities that are free of TBP but

TABLE 1. Description of the two genes encoding hSPT20 and hSPT20L^a

Gene	mRNA accession no.	Chromosome	Exon	Transcript length (nt)	Protein accession no.	Polypeptide length (aa)	Predicted mass (kDa) ^b
<i>SPT20</i>	NM_001014286	13	26	2,944	NP_001014308	779	85.78
	NM_017569	13	25	2,843	NP_060039	733	80.1
<i>SPT20L</i>	XM_093087	X	6	2,919	XP_093087	973	106.97
	XM_293352	X	6	2,661	XP_293352	887	95.97

^a nt, nucleotides; aa, amino acids.

^b Predictions were made using the ExPASy site (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html).

contain TAF10 (14). Hence, we purified the complex in a different way, by carrying out two consecutive IPs and then directly eluting the immunopurified hSAGA complex (Fig. 2A). We detected hSPT20 in this complex together with other hSAGA subunits (e.g., TRRAP, GCN5, and TAF10), while no TAF5 and TAF6 were copurified with the sample (Fig. 2B, lane 3; see Discussion).

Similarly, when we carried out IPs using polyclonal antibodies developed against the recently identified hSAGA subunits USP22 and ATXN7L3 (59), hSPT20 was found to be associated with these two subunits together with other components, such as TRRAP, GCN5, SGF29, and TAF10 (Fig. 3A). When proteins associated with hSPT20 were immunopurified from HeLa NE, we found that known hSAGA subunits coprecipitated with hSPT20 (e.g., TRRAP, GCN5, ATXN7, and TAF10) (Fig. 3B). In the same anti-hSPT20 IP experiment, no TFIID-specific subunits, such as TBP, TAF1, TAF4, TAF5, and TAF6, could be detected (Fig. 3C; see Discussion).

To show that our anti-hSPT20 IP protocol indeed purifies the enzymatically active hSAGA complex, we tested our purified SPT20-containing complex in HAT and deUb assays. In the HAT assay, the complex purified by an anti-SPT20 IP efficiently acetylated the synthetic H3 peptide, which is a

known substrate of hGCN5 (Fig. 3D). The efficiency was comparable to that of TFTC (SN hSAGA) that we used as a positive control in the assay. In addition, the SPT20-containing complex possessed activity similar to that of the TFTC (SN hSAGA) purification (Fig. 1A) in our in vitro deUb assay when measuring the decrease in the monoubiquitinated H2B level (Fig. 3E). In summary, our results clearly show that the hSPT20 protein described above is an integral component of the fully active hSAGA complex.

hSPT20 is present in high-molecular-mass protein assemblies. To further analyze the presence of hSPT20 in hSAGA, an anti-hSPT20 IP has been carried out and the eluted sample was then fractionated by a Superose 6 gel filtration chromatography column separating molecular entities in the 5 MDa to 5 kDa range. We could detect hSAGA subunits (TRRAP, GCN5, and TAF10) in fractions 15 to 17 corresponding to the expected size of the hSAGA complex (~2 MDa) (34) (Fig. 4A). This observation provides further evidence that hSPT20 is a component of the 2 MDa hSAGA coactivator complex.

To analyze whether hSPT20 is present also in other molecular assemblies in the nucleus, we fractionated HeLa NE on the same size exclusion chromatography column as described above. hSPT20 cofractionated with other hSAGA subunits at the molecular size range corresponding to the hSAGA together with GCN5, USP22, SGF29, and TAF10, four other subunits of the complex (Fig. 4B). We detected no significant hSPT20 in low-molecular-mass fractions. However, as a weak signal was also detected in 1- to 2-MDa-sized fractions (fractions 17 to 20), we cannot exclude that hSPT20 is also present in other, smaller-sized multiprotein complexes or simply in partially assembled hSAGA complexes.

hSPT20 is recruited to the promoter of ER stress-induced genes. In yeast it was shown that *spt20Δ* cells subjected to ER stress fail to trigger the UPR pathway. However, a direct involvement of ySpt20 in ER stress response was not demonstrated. To investigate the possible role of hSPT20 and hSAGA in the induction of ER stress-responsive genes, human HeLa cells were treated with either thapsigargin or DMSO as a control. Thapsigargin is known to deplete calcium from the ER by blocking the ATPase pump and thus leads to the accumulation of improperly folded proteins in the ER lumen (42), which is the signal for the UPR. To study the role of hSAGA in the ER stress response, first we analyzed the mRNA level of *GRP78*, *HERPUD*, *CHOP*, and *ERP70*, four ER stress-induced genes (22, 35, 38, 42). Cells responded to the thapsigargin treatment within 2 to 3 h with a prominent transcriptional upregulation of *CHOP* and *ERP70* genes and a lower but

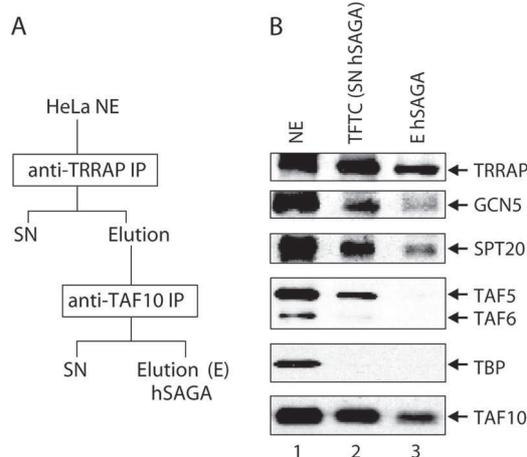


FIG. 2. SPT20 is stably associated with hSAGA independently from the preparation method used. (A) Schematic representation of purifying endogenous hSAGA from HeLa NE by means of two consecutive IPs. (B) Western blot analysis of the two hSAGA preparations (see panel A and Fig. 1A) shows that hSPT20 is present in both preparations (eluted [E] or supernatant [SN]). However, TAF5 and TAF6 are not integral components of the complex as they copurify only with the SN hSAGA (previously called TFTC) (Fig. 1A).

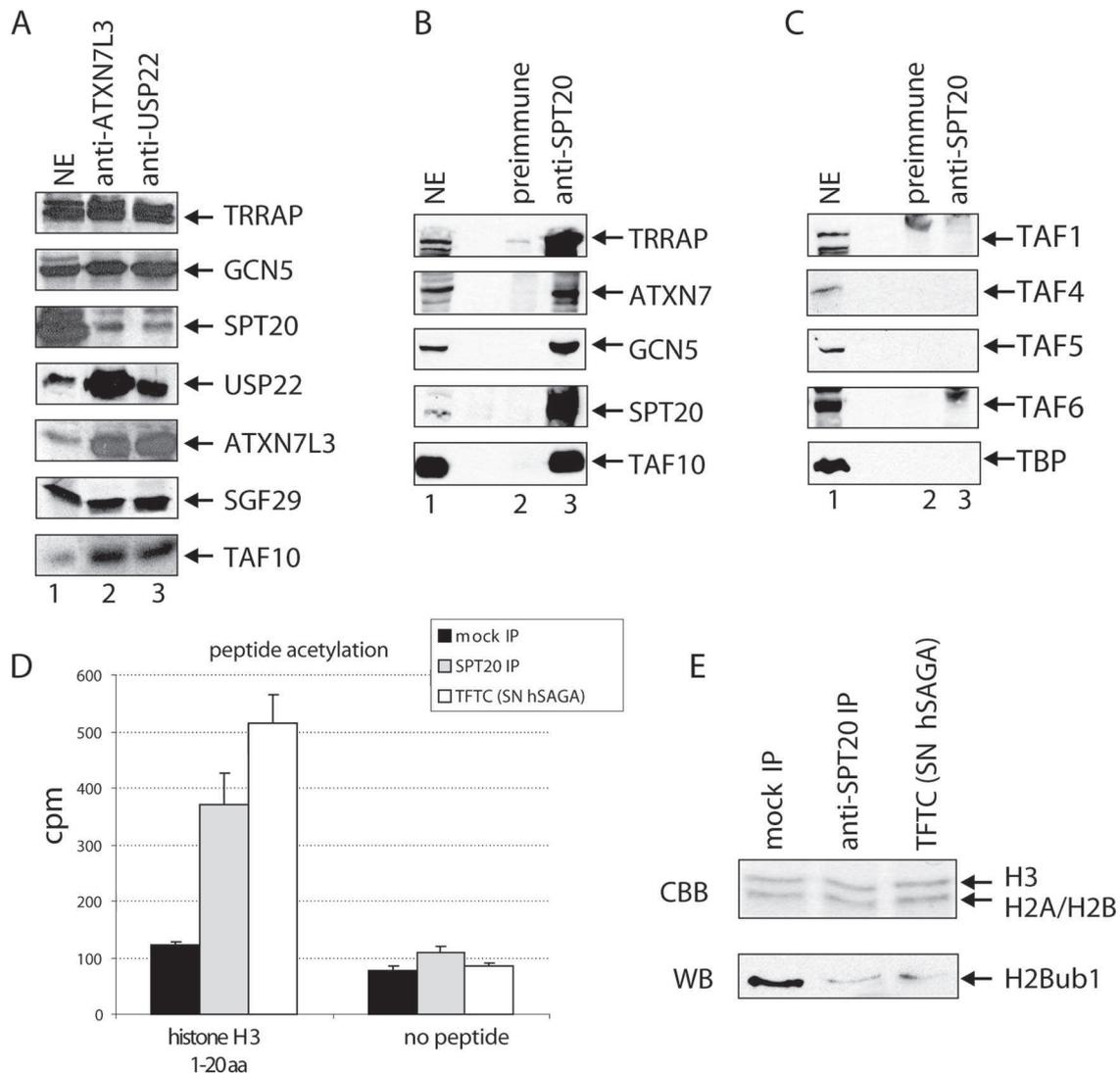


FIG. 3. The newly identified protein is a bona fide hSAGA subunit. (A) hSPT20, together with other hSAGA subunits, is present in the anti-ATXN7L3 and anti-USP22 IP samples. Proteins from HeLa NEs were immunoprecipitated with the indicated rabbit polyclonal antibodies and eluted with the corresponding peptides. Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by Western blotting using the indicated antibodies. (B) Immunoprecipitation of hSPT20 results in the coprecipitation of hSAGA subunits. (C) No TFIID-specific proteins copurify with hSPT20. IPs were carried out with purified rabbit polyclonal serum developed against hSPT20 or with the preimmune serum as a control. In this negative control IP, we could not detect any of the proteins tested (lane 2 in panels B and C). (D) The anti-SPT20 IP sample is active in the acetylation assay. Acetylation of a synthetic histone H3 tail peptide was measured by liquid scintigraphy. Both the SN hSAGA (TFTC) purification and the anti-SPT20 IP possessed similar HAT activities in the test. (E) The complex purified by an anti-SPT20 IP deubiquitinated histones. Core histones purified from HeLa cells were subjected to a deUb assay by different complexes (as indicated). Both the anti-SPT20 immunoprecipitated sample and the SN hSAGA (TFTC) preparation efficiently deubiquitinated H2B, as shown on the Western blot (WB). The Coomassie brilliant blue (CBB)-stained loading control of histones is also presented.

significant upregulation of *GRP78* and *HERPUD* mRNA levels (Fig. 5A). Meanwhile, the mRNA level of *hSPT20* did not change upon thapsigargin treatment (Fig. 5A).

Next we analyzed the recruitment of Pol II and several hSAGA subunits, including hSPT20, to the promoters of *GRP78*, *HERPUD*, *CHOP*, and *ERP70* by using ChIP experiments. As a control, we analyzed the presence of these proteins at the promoter of *GAPDH* and also at a noncoding region. For the ChIP, primers were designed to amplify a region close to the transcriptional start site of the investigated genes (see Table S2 in the supplemental material). The amplified se-

quences also contained an ER stress-response element that was previously shown to be bound by several transcription factors (3, 15). A clear increase in the Pol II level on the promoter of the four ER stress-induced genes was detected after 1 h of treatment, a signal which persisted for about 3 h and started to decrease at the 4-h time point. No significant changes were detected on the control *GAPDH* promoter or at the noncoding region. A similar recruitment pattern to that observed for Pol II (Fig. 5B) was measured for three hSAGA subunits, hSPT20, hSPT3, and hATXN7L3 (Fig. 5C, D, and E). Interestingly, the recruitment kinetics of ATXN7L3 (a

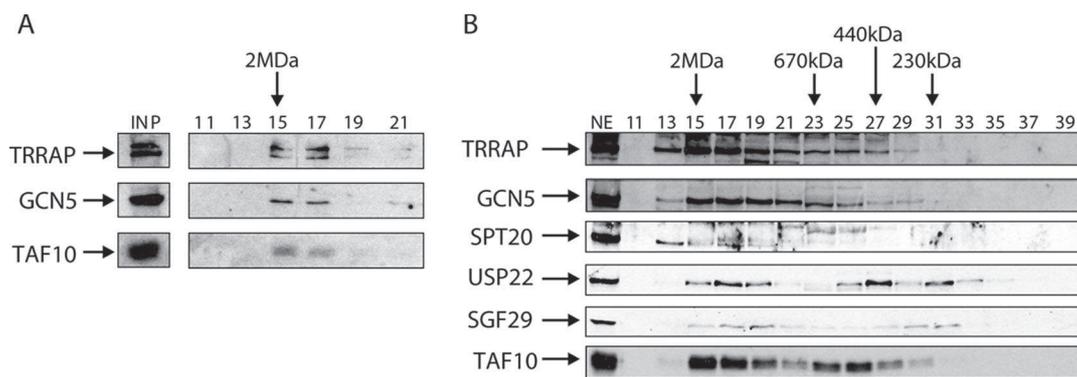


FIG. 4. hSPT20 is present in high-molecular-mass protein complexes in the cell. (A) hSPT20 copurifies with other hSAGA components that fractionate at the 2-MDa size range. An anti-SPT20 sample was separated on a Superose 6 size exclusion column. Fractions 11 to 21 are shown, where hSAGA subunits were detected by Western blot analysis. Fraction numbers are marked on the top of the figure together with the 2-MDa-molecular-mass marker elution pattern; INP, input. (B) hSPT20 elutes at the 1- to 2-MDa size range in size exclusion chromatography. HeLa cell NE was fractionated on a Superose 6 size exclusion column, and odd number fractions were analyzed by Western blotting with the indicated antibodies. Fraction numbers are indicated together with the elution profiles of known molecular mass proteins.

subunit of the deUb module of the complex) was somewhat different from the other two hSAGA components tested. While hSPT20 and hSPT3 reached their maximum occupancy already at 1 h, ATXN7L3 seemed to peak slightly later at the promoter of the tested ER stress-regulated genes, suggesting that a “free” form of the deUb module may also exist in the cells in addition to the full hSAGA complex (compare Fig. 5C and D with E; see Discussion). Alternatively, the complex may change conformation, which could lead to a more efficient cross-linking of ATXN7L3 to the DNA at later time points. The control DMSO treatment had no significant effect on the recruitment of any of these transcription factors (not shown). Increased occupancy of hSAGA subunits and Pol II at these genes was not due to an increase in the corresponding protein levels, as they remained unchanged upon thapsigargin treatment (see Fig. S5 in the supplemental material). These results together indicate that the transcriptional coactivator hSAGA complex is recruited to ER stress-induced genes and probably plays a direct role in their induction.

hSPT20 is not recruited to the promoter of other stress-induced genes. Evidence has suggested that hSPT20/SAGA may play a role not only in the UPR, but also in other stress-induced responses in the cell (see the introduction). Moreover, the hSPT20 protein was shown to interact with the p38 MAPK (60). Thus, we decided to test whether hSPT20 is implicated in the induction of known p38 MAPK-regulated genes at the transcriptional level. To this end, HeLa cells were treated with Na-arsenite, a known p38 MAPK cascade inducer, and were harvested at 30 min, 1 h, and 2 h after induction (Fig. 6A). Time course experiments showed a strong induction in the expression of the *EGR-1*, an immediate early gene induced by the p38 MAPK pathway (33) (Fig. 6A), while the mRNA level of *SPT20* itself did not change (Fig. 6A). The protein levels of neither Pol II nor the tested hSAGA subunits changed due to the treatment (see Fig. S5 in the supplemental material). The ChIP experiments showed a highly increased occupancy of the *EGR-1* promoter by Pol II already at 30 min (Fig. 6B). On the other hand, we could not detect any increase in the recruitment of SPT20 at the tested time points at this promoter (Fig. 6C). These results show that the increased mRNA level of a

p38 MAPK-induced gene and the higher Pol II occupancy at the promoter of this gene do not correlate with an increased recruitment of hSAGA when monitored with the presence of the SPT20 subunit. When we investigated the presence of other hSAGA subunits at the promoter of the Na-arsenite-induced *EGR-1* gene, we failed to show a significant recruitment of SPT3, and the increase in the occupancy level for ATXN7L3 was also very small compared to that of the ER stress-induced genes (compare Fig. 5E and 6D). Altogether, the data strongly suggest that hSAGA does not play a direct role in the transcriptional stimulation of the Na-arsenite-induced genes.

SPT20 knockdown leads to the decrease of correctly assembled hSAGA complex and to consequent defects in the ER stress-induced gene expression. To further test the involvement of hSPT20 and the hSAGA complex in different stress responses, we have knocked down the expression of hSPT20 and analyzed the effect of the decrease of this SAGA subunit on the integrity of the complex. To this end, HeLa cells were transfected with siRNAs against either GAPDH, as a control, or hSPT20. Forty-eight hours after transfection, cells were harvested and NEs were prepared. In these extracts, we observed an ~70% decrease in the hSPT20 and a 95% decrease in the GAPDH control protein levels by Western blot analysis (Fig. 7A), indicating that the knockdowns were efficient. Interestingly, in these NEs we have not observed any change in the expression level of the other hSAGA subunits tested (Fig. 7A). Next, we attempted to isolate hSAGA complexes from these NEs by anti-ATXN7L3 IP. While we were able to immunopurify comparable amounts of ATXN7L3 from both extracts, the presence of the tested core SAGA subunits (such as TRRAP, GCN5, SGF29, and TAF10) showed a serious decrease in the complexes isolated from the SPT20 knockdown sample compared to SAGA immunopurified from the control sample (Fig. 7A, compare lanes 3 and 4). This result shows that the integrity of the hSAGA complex requires hSPT20. Interestingly, however, the anti-ATXN7L3 IP copurified equal amounts of USP22 from both extracts (another subunit of the deUb module of SAGA), indicating that the integrity of the deUb module

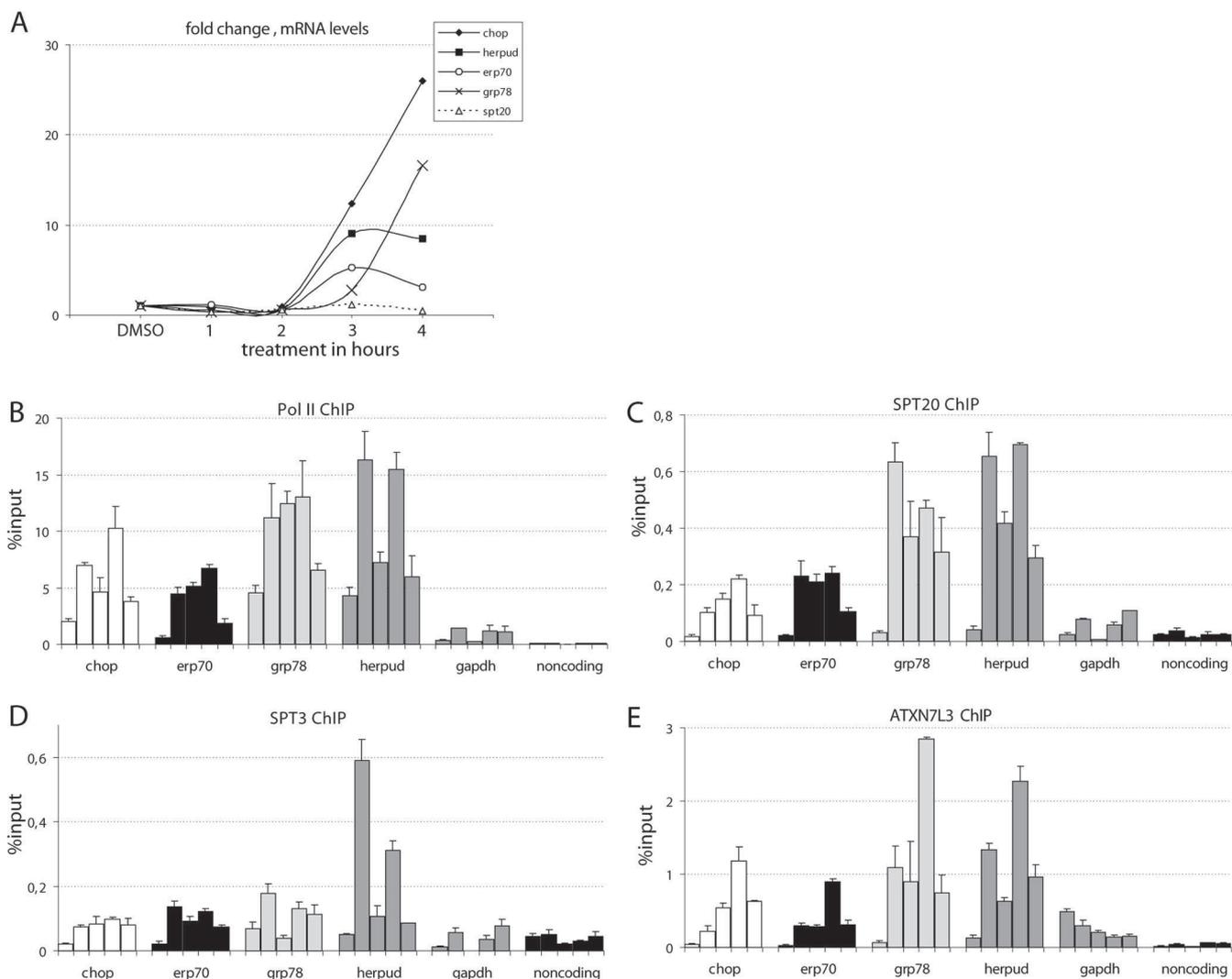


FIG. 5. hSPT20/hSAGA is recruited to the promoter of ER stress-responsive genes after thapsigargin induction. (A) qPCR analysis of reverse transcribed RNA shows a significant activation of the four ER stress-responsive genes. mRNA levels were normalized to cyclophilin B and are presented as change compared to the control DMSO-treated sample. Samples were analyzed 1, 2, 3, and 4 h after treatment. (B to E) Time course ChIP results obtained with RNA Pol II (B), SPT20 (C), SPT3 (D), and ATXN7L3 (E) antibodies are shown as a percentage of input genomic DNA. Different shadings represent the promoter sequences of the corresponding ER stress-inducible genes analyzed by qPCR (indicated below the axis). The results obtained in five different conditions (nontreated sample; 1 h, 2 h, 3 h, and 4 h of thapsigargin treatment) are represented from left to right for each promoter. The promoter of *GAPDH* and a noncoding sequence serve as controls. Similar results were obtained in two biological replicates. Results obtained in a representative experiment are shown with the SD calculated from qPCR triplicates for each time point.

is independent of the cellular levels of SPT20. This observation may further suggest that the deUb module may exist also in a "free" form (see Discussion).

Next we wanted to analyze how the disintegration of hSAGA in the absence of SPT20 influences the regulation of the previously tested stress-regulated genes. Thus, we performed RNA interference knockdown of SPT20 and treated the cells with different stress agents. We observed, as above, an ~70% decrease in the level of the *hSPT20* mRNA (Fig. 7B) and hSPT20 protein (Fig. 7C) compared to that of the control siRNA-transfected cells. Following thapsigargin treatment in SPT20 siRNA knockdown cells, the transcriptional activation of the genes *GRP78*, *HERPUD*, *CHOP*, and *ERP70* was significantly reduced (to about 50%) (Fig. 7D). In contrast, the

induction of the *EGR-1* expression was only weakly affected in SPT20 knockdown cells after Na-arsenite treatment (Fig. 7D). Altogether, these results show that the hSPT20-containing hSAGA is recruited to the promoters and that the complex is essential for the induction of the specific ER stress-regulated genes. In contrast, hSAGA does not seem to be present and required for the regulation of genes induced by Na-arsenite.

DISCUSSION

In this study, we identify hSPT20 as an integral component of the hSAGA-type complexes and show that hSPT20 is required for the integrity of the hSAGA complex. In addition, we show that hSPT20 is recruited to the promoter of ER stress-

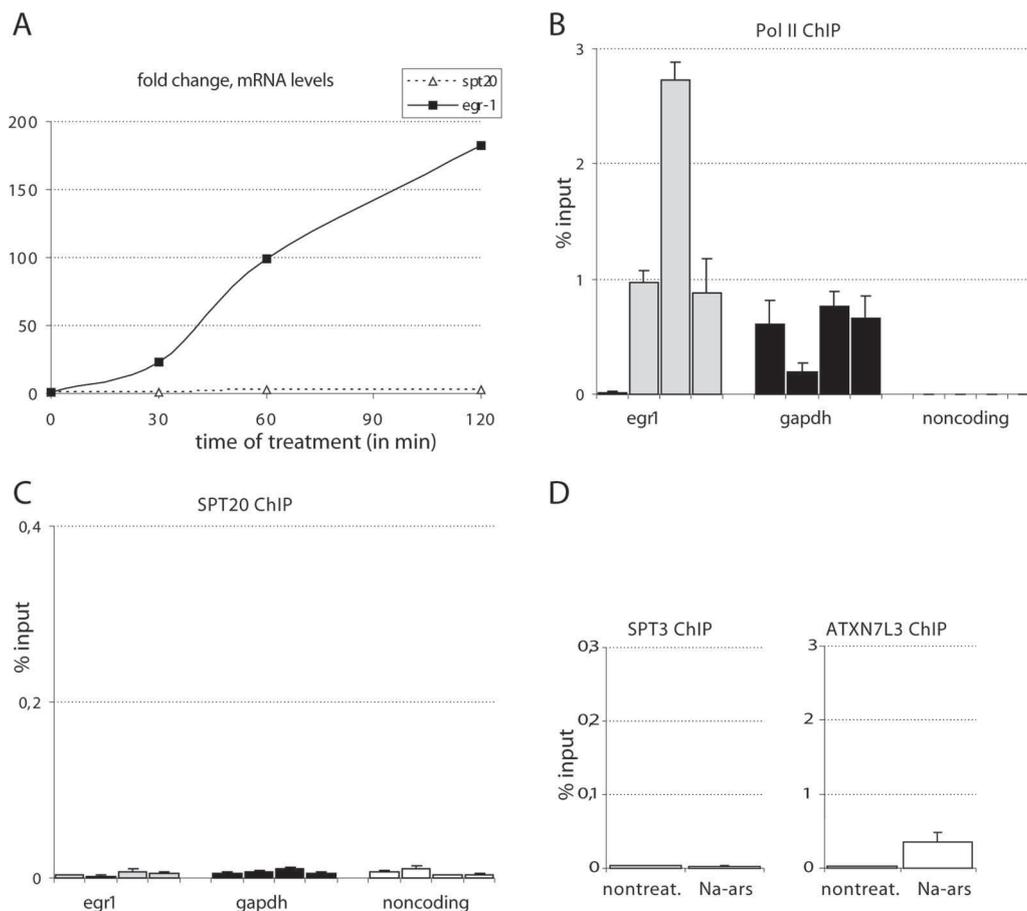


FIG. 6. hSPT20 occupancy of a p38MAPK-induced gene does not increase after Na-arsenite induction. (A) mRNA quantification by RT qPCR shows that Na-arsenite efficiently induces the expression of *EGR-1*. mRNA levels normalized to cyclophilin B are shown as change compared to the nontreated sample on the figure at the indicated times (in minutes). (B to C) Time course ChIP results obtained with RNA Pol II (B) and SPT20 (C) antibodies are shown. Different shadings mark the different promoter sequences analyzed by qPCR, as indicated below the axis. The results obtained at four time points (nontreated sample; 30 min, 1 h, and 2 h of Na-arsenite treatment) are shown from left to right for each promoter. The promoter of *GAPDH* and a noncoding sequence serve as controls (see text). The amplified fragment of the *EGR-1* promoter contains the cyclic AMP response element known to play a positive role in the upregulation of the gene (33). Similar results were obtained in two biological replicates. Results of a representative experiment are shown with error bars calculated from qPCR triplicates for each time point. (D) ChIP results obtained with antibodies raised against the indicated hSAGA subunits after 1 h of Na-arsenite treatment on the *EGR-1* promoter.

induced genes and is also necessary for their activation but not for that of a Na-arsenite stress-regulated gene. These results indicate that hSAGA plays a role in ER stress response and provide the first experimental evidence for the direct involvement of hSAGA in the transcriptional regulation of a group of stress-inducible genes in mammalian cells. Indeed, our siRNA experiments showed that hSPT20 knockdown impaired the induction of ER stress-responsive genes but not those induced by the Na-arsenite stress.

Evolutionary conservation of SAGA-type complexes. Although results from recent years suggested that the SAGA, TFTC, STAGA, or PCAF coactivator complexes isolated from several different species are highly conserved both in structure and function (2, 34), differences still remained between them, especially in their respective polypeptide compositions. Some subunits of ySAGA were not identified in the corresponding human complexes. However, since during the last year five new subunits have been identified in TFTC/STAGA, SPT20 (this work), USP22, ATXNL3, ENY2 (57, 59), and SGF29 (25), the

differences between the metazoan and yeast complexes seem to disappear. In addition to the structural and functional similarities between the yeast and human complexes (reference 34 and references therein), these identifications led us to the conclusion that the 2-MDa multifaceted complexes are almost identical. Our observation that hSPT20 is required for the integrity of the hSAGA complex, as is ySpt20 for the ySAGA complex, further underlines this conserved similarity between the yeast and mammalian complexes. The only remaining difference between the yeast and human complexes is that no homologue of ySpt8 has been found in the human complexes. This may suggest that the human complex is more similar to yeast SLIK (*SAGA like*) or SALSA (*SAGA altered Spt8 absent*) (37, 43) also lacking Spt8. This latter complex was reported to contain a variant of ySpt7 lacking its bromo domain (43). In this respect, it is interesting to note that human SPT7L does not contain a bromo domain either (14).

Another difference between the human TFTC and the other human complexes (STAGA, GCN5, and PCAF complexes)

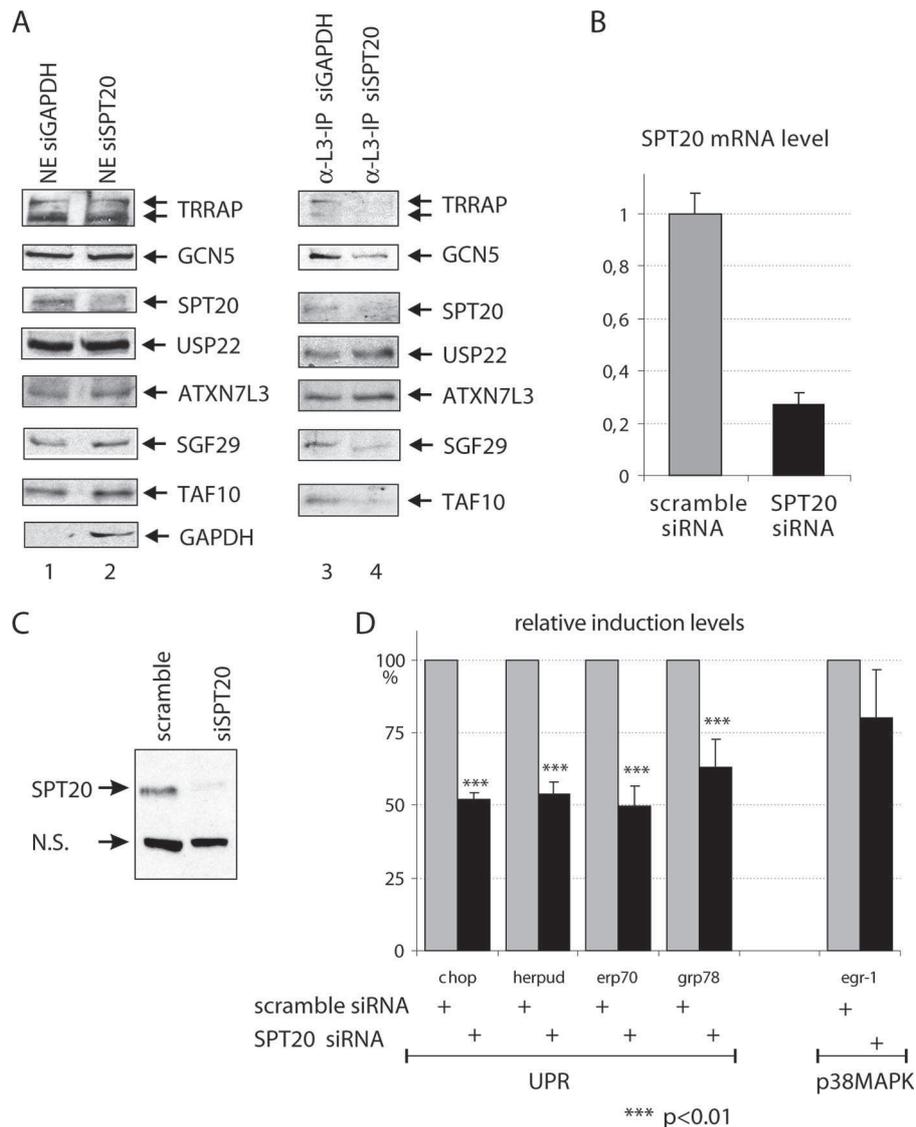


FIG. 7. In vivo knockdown of hSPT20 results in impaired SAGA assembly and defective ER stress response but has no significant effect on p38MAPK signaling. (A) HeLa cells were transfected with siRNAs against either GAPDH (as a control) or SPT20. Forty-eight hours after transfection, cells were collected and NEs were prepared. The presence of the different proteins in these extracts was detected by Western blot analysis as indicated (lanes 1 and 2). From these extracts, an anti-ATXN7L3 IP was carried out and the coimmunopurified proteins tested by Western blot as indicated (lanes 3 and 4). (B and C) The anti-SPT20 siRNA transfection leads to a ~70% decrease in the level of hSPT20 mRNA (B) and an ~65% drop in protein level (C) as judged by reverse transcription-qPCR or Western blot analysis quantified by densitometry, respectively. (D) In anti-SPT20 siRNA-treated cells, the induction of the four tested ER stress-induced genes is significantly affected, while no significant effect in the Na-arsenite-induced stress response could be detected. Results are represented as percent relative induction levels compared to the control (scramble) siRNA-treated sample (100% induction) in each case. Average results of five independent experiments are shown with the SD. *P* values are marked above the bars with asterisks.

was the presence of TAF2, TAF4, TAF5, and TAF6 in TFIIIC preparations (31, 50) (Fig. 1B). Here we clearly demonstrate by coimmunoprecipitation, using antibodies against newly identified hSAGA-specific subunits that TAF4, TAF5, and TAF6 are not associated with hSAGA (Fig. 2B and 3C). Several other IP experiments further indicate that a TAF core, probably containing the seven-TAF complex (14, 51), copurifies with the hSAGA (data not shown). These TAFs are not integral components of the 2-MDa complex. This suggests that all the human and probably metazoan 2-MDa SAGA-type complexes containing either the GCN5 or the highly homolo-

gous PCAF HAT subunits are similar, and thus we can call all these complexes SAGA for simplicity (36).

hSAGA and ER stress. Cells subjected to ER stress change their metabolic pathways, reach a translational attenuation, and upregulate the expression of molecular chaperones (5, 58). In *spt20Δ* yeast cells, the UPR is defective due to the lack of this induced gene expression (47–49). The transcriptional stimulation of the ER stress-responsive genes requires the recruitment of the general transcription factors and Pol II to their promoters. Increase of positive histone marks and consequent changes in the occupancy of promoters by Pol II can be de-

tected within a few hours after thapsigargin treatment in human cells (15). The acetylation level of histone H3 on K9 and K14 increases tremendously (15), which strongly suggests the requirement of hGCN5 (or PCAF) for these promoters. In good agreement, our present results show that the hSAGA complex is recruited to the ER stress-regulated promoters, thus bringing the hGCN5 (or PCAF) HAT in vicinity of the transcription initiation sites for chromatin remodeling. The signaling pathway leading to the regulated occupancy of hSAGA at specific sites on the genome is not yet well understood. One of the exciting questions is how the hSAGA complex gets recruited only to a set of promoters but not to all active genes. Sequence-specific activators are likely playing an active role in the process. In the case of ER stress-responsive genes, one of the sequence-specific transcription factors binding to and having a positive effect on the expression of many ER stress-inducible genes is NFY. NFY was shown to bind directly and constitutively to the ER stress-response element sequences in promoters of the induced genes (46, 54) and was also reported to interact with GCN5 (13). A dominant negative version of NF-YA was reported to lead to defects in the transcription of genes normally associated with H3K4me3 and H3K9-14ac active marks in HeLa cells (11). Thus, all these data together with our results show that both NFY and SAGA are indispensable for normal stimulation of ER stress-responsive genes. The reported contact between NFY and GCN5 suggests that in vivo hSAGA might be recruited to the ER-responsive sequences via an interaction with NFY.

Interestingly, after a rapid recruitment of the two hSAGA core subunits (hSPT20 and SPT3) (Fig. 5C and D), ATXN7L3, a subunit of the deUb module (21, 59), continues to accumulate for up to 3 h of treatment (Fig. 5E). Moreover, SPT20 knockdown does not seem to influence the formation of the deUb module (Fig. 7A). Thus, our time course analysis and IP experiments from SPT20 knockdown cells suggest that the "full" hSAGA complex and the deUb module, composed of the USP22 enzyme, ATXN7L3, and ENY2, may exist in the cells independently. It is conceivable that the putative "free" deUb subcomplex is additionally recruited to the promoters. Further experiments will be needed to investigate the existence, role, and substrate specificity of the SAGA-independent deUb module.

hSAGA and the p38 MAPK pathway. The proper adaptation to extracellular stimuli requires regulation of gene expression by the MAPKs (20, 56). The classical model system for analyzing MAPK signaling in yeast is the observation of osmotic stress-induced changes. ySAGA mutants show growth defects in high osmolarity conditions (8). Directed phosphorylation taking place on transcription activators mediated by Hog1 (the yeast homologue of p38 MAPK) and its strong binding to chromatin together lead to osmotic stress response (1, 8). ySAGA and the Mediator complex are essential for the proper upregulation of osmotic stress-induced genes. Hog1 was recently shown to interact with the elongating RNA Pol II via SAGA (55). Although the ySAGA subunit interacting with Hog1p was not identified, one could imagine that it would be ySpt20, as their human homologues (hSPT20/p38IP and the p38 MAPK) were shown to have direct contact (60).

While the mammalian SPT20 (p38IP) was shown to interact with the p38 MAPK, when hSPT20 was knocked down by

siRNA in human cells, no impairment in the activation of the p38 MAPK pathway was detected (24, 41), which is in good agreement with our observations (Fig. 6C and 7D). Moreover, if hSPT20 (p38IP) acted upstream of p38 MAPK, one would expect hSPT20 to have a cytoplasmic localization. In contrast, by using immunofluorescent imaging techniques, we have detected hSPT20 (p38IP) exclusively in the nucleus, similarly to all of the tested hSAGA-specific subunits (see Fig. S6 in the supplemental material). In addition, the C-terminal end of SPT20, which has been reported to interact with p38 MAPK, is not conserved through evolution. From the evolutionary conservation observed among all SPT20 homologues, one would expect that the functionally important regions of the SPT20 proteins reside in their N-terminal conserved half (Fig. 1C). The fact that we failed to detect p38 MAPK in our hSAGA or anti-SPT20 IP samples even after p38 MAPK induction (data not shown) suggests that if hSPT20 and p38 MAPK interact in vivo, this interaction is dynamic and is not strong enough to resist our stringent copurification assays. However, we cannot exclude the possibility that the interaction takes place under special conditions in certain cell types.

Stimuli activating the MAP kinase cascades elicit a rapid phosphorylation of H3 on serine 10. This modification, restricted to rapidly inducible genes poised for transcription, correlates with gene induction, suggesting a role in their activation of transcription (30). Data show that kinase and HAT enzymes function independently on the histone H3 tail, leading to phosphoacetylation (45). The signal leading to enhanced acetylation and phosphorylation of the same H3 histone tails is presently unclear (12). Our results show no significant recruitment of hSPT20, hSPT3, and ATXN7L3 to the *EGR-1* promoter after induction of the *EGR-1* gene by Na-arsenite; thus, hSAGA does not seem to play any direct role in the activation of this immediate early gene. Our new findings support the theory that GCN5, as a subunit of hSAGA, plays no role in the induced histone acetylation at the promoter of Na-arsenite-responsive genes.

In conclusion, our results clearly show that in human cells, hSAGA functions in stress-induced transcriptional regulation in a stress type-dependent manner. SPT20 has primordial function in the assembly of the hSAGA complex and in ER stress response but seems dispensable for the p38 MAPK pathway stimulated by Na-arsenite. Its direct role in ER stress-induced cellular response opens novel directions of research in many diseases, as ER stress has been implicated in immune response, diabetes, obesity, and neurodegeneration (58).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to M. Brand for purifying the original TFTC fraction, to R. Mantovani for advice, to R. Roeder for the SPT3 antibody, to G. Duval for generating antibodies, and to D. Devys, F. Coin, A. Krebs, and M. E. Torres Padilla for critically reading the manuscript. We also thank the IGBMC cell culture facility for providing cells.

Z.N. and M.O. were supported by a fellowship from the European Community grant (HPRN-CT-00504228). Z.N. was supported by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), and A.R. was supported by a fellowship of the Alsace Region. This work was supported by funds from CNRS, INSERM, Université Louis Pasteur, the FRM, the Fonds National de La Science ACL, ANR (05-BLAN-0396-01; Regulome), and European Community (HPRN-CT 00504228, STREP LSHG-CT-2004-502950, and EUTRACC LSHG-CT-2007-037445) grants.

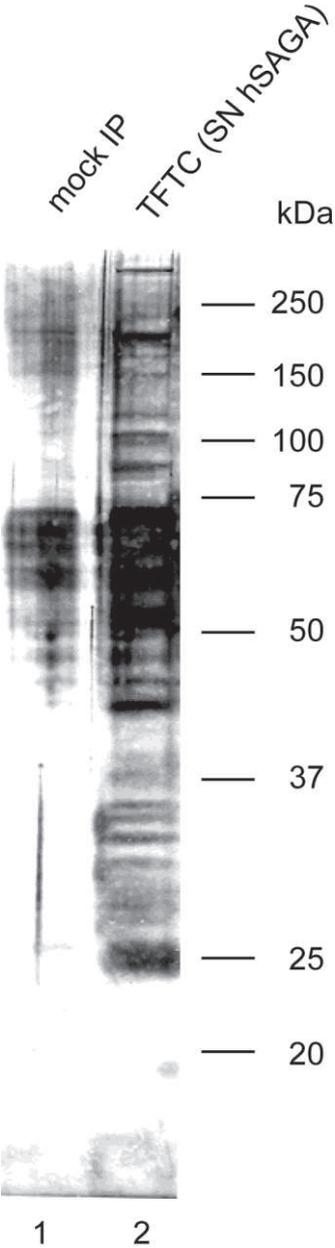
REFERENCES

1. Alepuz, P. M., E. de Nadal, M. Zapater, G. Ammerer, and F. Posas. 2003. Osmostress-induced transcription by *Hog1* depends on a *Hog1*-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J.* **22**:2433–2442.
2. Baker, S. P., and P. A. Grant. 2007. The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene* **26**:5329–5340.
3. Baumeister, P., S. Luo, W. C. Skarnes, G. Sui, E. Seto, Y. Shi, and A. S. Lee. 2005. Endoplasmic reticulum stress induction of the *Grp78/BiP* promoter: activating mechanisms mediated by *YY1* and its interactive chromatin modifiers. *Mol. Cell. Biol.* **25**:4529–4540.
4. Bell, B., E. Scheer, and L. Tora. 2001. Identification of *hTAF(II)80* delta links apoptotic signaling pathways to transcription factor *TFIID* function. *Mol. Cell* **8**:591–600.
5. Bernales, S., F. R. Papa, and P. Walter. 2006. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**:487–508.
6. Brand, M., J. G. Moggs, M. Oulad-Abdelghani, F. Lejeune, F. J. Dilworth, J. Stevenin, G. Almouzni, and L. Tora. 2001. UV-damaged DNA-binding protein in the *TFTC* complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation. *EMBO J.* **20**:3187–3196.
7. Brand, M., K. Yamamoto, A. Staub, and L. Tora. 1999. Identification of TATA-binding protein-free *TAFII*-containing complex subunits suggests a role in nucleosome acetylation and signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**:18285–18289.
8. Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter, and M. C. Gustin. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**:1760–1763.
9. Brou, C., S. Chaudhary, I. Davidson, Y. Lutz, J. Wu, J. M. Egly, L. Tora, and P. Chambon. 1993. Distinct *TFIID* complexes mediate the effect of different transcriptional activators. *EMBO J.* **12**:489–499.
10. Brownell, J. E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D. G. Edmondson, S. Y. Roth, and C. D. Allis. 1996. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast *Gcn5p* linking histone acetylation to gene activation. *Cell* **84**:843–851.
11. Ceribelli, M., D. Dolfini, D. Merico, R. Gatta, A. M. Vigano, G. Pavesi, and R. Mantovani. 2008. The histone-like NF-Y is a bifunctional transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **28**:2047–2058.
12. Clayton, A. L., C. A. Hazzalin, and L. C. Mahadevan. 2006. Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. *Mol. Cell* **23**:289–296.
13. Currie, R. A. 1998. NF-Y is associated with the histone acetyltransferases *Gcn5* and *P/CAF*. *J. Biol. Chem.* **273**:1430–1434.
14. Demény, M. A., E. Soutoglou, Z. Nagy, E. Scheer, A. Janoshazi, M. Richardot, M. Argentini, P. Kessler, and L. Tora. 2007. Identification of a small TAF complex and its role in the assembly of TAF-containing complexes. *PLoS ONE* **2**:e316.
15. Donati, G., C. Imbriano, and R. Mantovani. 2006. Dynamic recruitment of transcription factors and epigenetic changes on the ER stress response gene promoters. *Nucleic Acids Res.* **34**:3116–3127.
16. Dubrovskaya, V., A. C. Lavigne, I. Davidson, J. Acker, A. Staub, and L. Tora. 1996. Distinct domains of *hTAFII100* are required for functional interaction with transcription factor *TFIIF* beta (*RAP30*) and incorporation into the *TFIID* complex. *EMBO J.* **15**:3702–3712.
17. Grant, P. A., L. Duggan, J. Cote, S. M. Roberts, J. E. Brownell, R. Candau, R. Ohba, T. Owen-Hughes, C. D. Allis, F. Winston, S. L. Berger, and J. L. Workman. 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.
18. Helmlinger, D., S. Hardy, S. Sasorith, F. Klein, F. Robert, C. Weber, L. Miguet, N. Potier, A. Van-Dorselaer, J. M. Wurtz, J. L. Mandel, L. Tora, and D. Devys. 2004. Ataxin-7 is a subunit of *Gcn5* histone acetyltransferase-containing complexes. *Hum. Mol. Genet.* **13**:1257–1265.
19. Huisinga, K. L., and B. F. Pugh. 2004. A genome-wide housekeeping role for *TFIID* and a highly regulated stress-related role for *SAGA* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* **13**:573–585.
20. Johnson, G. L., and R. Lapadat. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by *ERK*, *JNK*, and *p38* protein kinases. *Science* **298**:1911–1912.
21. Köhler, A., M. Schneider, G. G. Cabal, U. Nehrbass, and E. Hurt. 2008. Yeast Ataxin-7 links histone deubiquitination with gene gating and mRNA export. *Nat. Cell Biol.* **10**:707–715.
22. Kokame, K., K. L. Agarwala, H. Kato, and T. Miyata. 2000. Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* **275**:32846–32853.
23. Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**:693–705.
24. Kunze, D., S. Fuessel, A. Meye, M. P. Wirth, and U. Schmidt. 2006. Functional analyses of *C13orf19/P38IP* in prostate cell lines. *Oncol. Rep.* **15**:1599–1604.
25. Kurabe, N., K. Katagiri, Y. Komiyama, R. Ito, A. Sugiyama, Y. Kawasaki, and F. Tashiro. 2007. Deregulated expression of a novel component of *TFTC*/STAGA histone acetyltransferase complexes, rat *SGF29*, in hepatocellular carcinoma: possible implication for the oncogenic potential of *c-Myc*. *Oncogene* **26**:5626–5634.
26. Lee, K. K., and J. L. Workman. 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:284–295.
27. Lee, T. L., H. C. Causton, F. C. Holstege, W. C. Shen, N. Hannett, E. G. Jennings, F. Winston, M. R. Green, and R. A. Young. 2000. Redundant roles for the *TFIID* and *SAGA* complexes in global transcription. *Nature* **405**:701–704.
28. Leurent, C., S. L. Sanders, M. A. Demeny, K. A. Garbett, C. Ruhlmann, P. A. Weil, L. Tora, and P. Schultz. 2004. Mapping key functional sites within yeast *TFIID*. *EMBO J.* **23**:719–727.
29. Li, B., M. Carey, and J. L. Workman. 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**:707–719.
30. Mahadevan, L. C., A. C. Willis, and M. J. Barratt. 1991. Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* **65**:775–783.
31. Martinez, E., T. K. Kundu, J. Fu, and R. G. Roeder. 1998. A human *SPT3-TAFII31-GCN5-L* acetylase complex distinct from transcription factor *IID*. *J. Biol. Chem.* **273**:23781–23785.
32. Mengus, G., M. May, L. Carre, P. Chambon, and I. Davidson. 1997. Human *TAF(II)135* potentiates transcriptional activation by the *AF-2s* of the retinoic acid, vitamin D3, and thyroid hormone receptors in mammalian cells. *Genes Dev.* **11**:1381–1395.
33. Mignacca, R. C., H. J. Lee, E. M. Kwon, and K. M. Sakamoto. 1996. Mechanism of transcriptional activation of the immediate early gene *Egr-1* in response to *PIXY321*. *Blood* **88**:848–854.
34. Nagy, Z., and L. Tora. 2007. Distinct *Gcn5/P/CAF*-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* **26**:5341–5357.
35. Oyadomari, S., and M. Mori. 2004. Roles of *CHOP/GADD153* in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* **11**:381–389.
36. Pijnappel, W. W., and H. T. Timmers. 2008. Dubbing *SAGA* unveils new epigenetic crosstalk. *Mol. Cell* **29**:152–154.
37. Pray-Grant, M. G., D. Schieltz, S. J. McMahon, J. M. Wood, E. L. Kennedy, R. G. Cook, J. L. Workman, J. R. Yates III, and P. A. Grant. 2002. The novel *SLIK* histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway. *Mol. Cell. Biol.* **22**:8774–8786.
38. Reddy, R. K., C. Mao, P. Baumeister, R. C. Austin, R. J. Kaufman, and A. S. Lee. 2003. Endoplasmic reticulum chaperone protein *GRP78* protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J. Biol. Chem.* **278**:20915–20924.
39. Roberts, S. M., and F. Winston. 1996. *SPT20/ADA5* encodes a novel protein functionally related to the TATA-binding protein and important for transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:3206–3213.
40. Saha, A., J. Wittmeyer, and B. R. Cairns. 2006. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:437–447.
41. Schmidt, U., S. Fuessel, M. Haase, K. Kraemer, A. Meye, and M. P. Wirth. 2005. Quantification of *C13orf19/P38IP* mRNA expression by quantitative real-time PCR in patients with urological malignancies. *Cancer Lett.* **225**:253–260.
42. Schröder, M., and R. J. Kaufman. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* **74**:739–789.
43. Sterner, D. E., R. Belotserkovskaya, and S. L. Berger. 2002. *SALSA*, a variant of yeast *SAGA*, contains truncated *Spt7*, which correlates with activated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:11622–11627.
44. Sterner, D. E., P. A. Grant, S. M. Roberts, L. J. Duggan, R. Belotserkovskaya, L. A. Pacella, F. Winston, J. L. Workman, and S. L. Berger. 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.
45. Thomson, S., A. L. Clayton, and L. C. Mahadevan. 2001. Independent dynamic regulation of histone phosphorylation and acetylation during immediate-early gene induction. *Mol. Cell* **8**:1231–1241.
46. Ubeda, M., and J. F. Habener. 2000. *CHOP* gene expression in response to endoplasmic-reticular stress requires *NFY* interaction with different domains of a conserved DNA-binding element. *Nucleic Acids Res.* **28**:4987–4997.
47. Welihinda, A. A., W. Tirasophon, S. R. Green, and R. J. Kaufman. 1997. Gene induction in response to unfolded protein in the endoplasmic reticulum is mediated through *Ire1p* kinase interaction with a transcriptional coactivator complex containing *Ada5p*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:4289–4294.
48. Welihinda, A. A., W. Tirasophon, and R. J. Kaufman. 1999. The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr.* **7**:293–300.
49. Welihinda, A. A., W. Tirasophon, and R. J. Kaufman. 2000. The transcriptional co-activator *ADA5* is required for *HAC1* mRNA processing in vivo. *J. Biol. Chem.* **275**:3377–3381.
50. Wiczorek, E., M. Brand, X. Jacq, and L. Tora. 1998. Function of *TAF(II)*-

- containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature* **393**:187–191.
51. **Wright, K. J., M. T. Marr II, and R. Tjian.** 2006. TAF4 nucleates a core subcomplex of TFIID and mediates activated transcription from a TATA-less promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:12347–12352.
 52. **Wu, P. Y., C. Ruhlmann, F. Winston, and P. Schultz.** 2004. Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Mol. Cell* **15**:199–208.
 53. **Wu, P. Y., and F. Winston.** 2002. Analysis of Spt7 function in the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA coactivator complex. *Mol. Cell. Biol.* **22**:5367–5379.
 54. **Yoshida, H., T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi, and K. Mori.** 2001. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6 α and 6 β that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* **21**:1239–1248.
 55. **Zapater, M., M. Sohrmann, M. Peter, F. Posas, and E. de Nadal.** 2007. Selective requirement for SAGA in Hog1-mediated gene expression depending on the severity of the external osmotic stress conditions. *Mol. Cell. Biol.* **27**:3900–3910.
 56. **Zarubin, T., and J. Han.** 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* **15**:11–18.
 57. **Zhang, X. Y., M. Varthi, S. M. Sykes, C. Phillips, C. Warzecha, W. Zhu, A. Wyce, A. W. Thorne, S. L. Berger, and S. B. McMahon.** 2008. The putative cancer stem cell marker USP22 is a subunit of the human SAGA complex required for activated transcription and cell-cycle progression. *Mol. Cell* **29**:102–111.
 58. **Zhao, L., and S. L. Ackerman.** 2006. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**:444–452.
 59. **Zhao, Y., G. Lang, S. Ito, J. Bonnet, E. Metzger, S. Sawatsubashi, E. Suzuki, X. Le Guezennec, H. G. Stunnenberg, A. Krasnov, S. G. Georgieva, R. Schule, K. I. Takeyama, S. Kato, L. Tora, and D. Devys.** 2008. A TFIIIC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol. Cell* **29**:92–101.
 60. **Zohn, I. E., Y. Li, E. Y. Skolnik, K. V. Anderson, J. Han, and L. Niswander.** 2006. p38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of E-cadherin during mouse gastrulation. *Cell* **125**:957–969.

Supplementary information

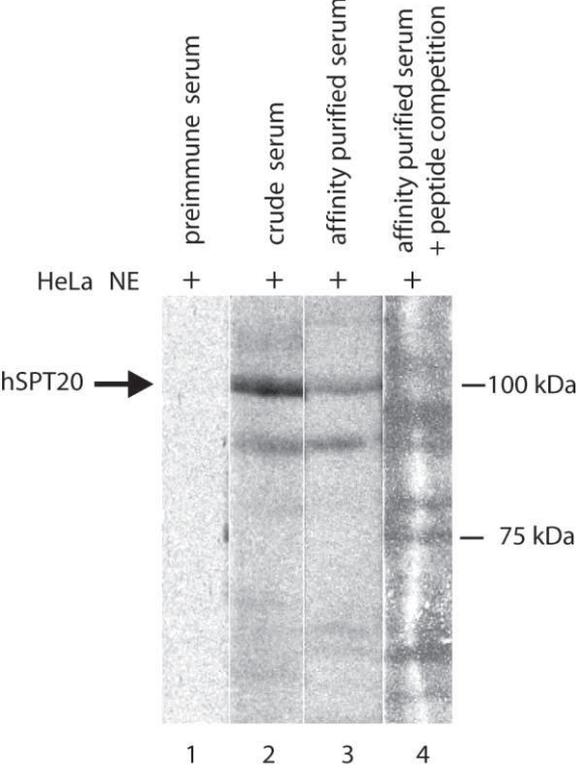
Suppl. Figure 1. A mock IP and TFTC/hSAGA (see Figure 1A, purified as described in Wiczorek et al; 1998) that was analysed by MS-MS mass spectrometry was separated on a 10% SDS-PAGE and stained with silver nitrate.



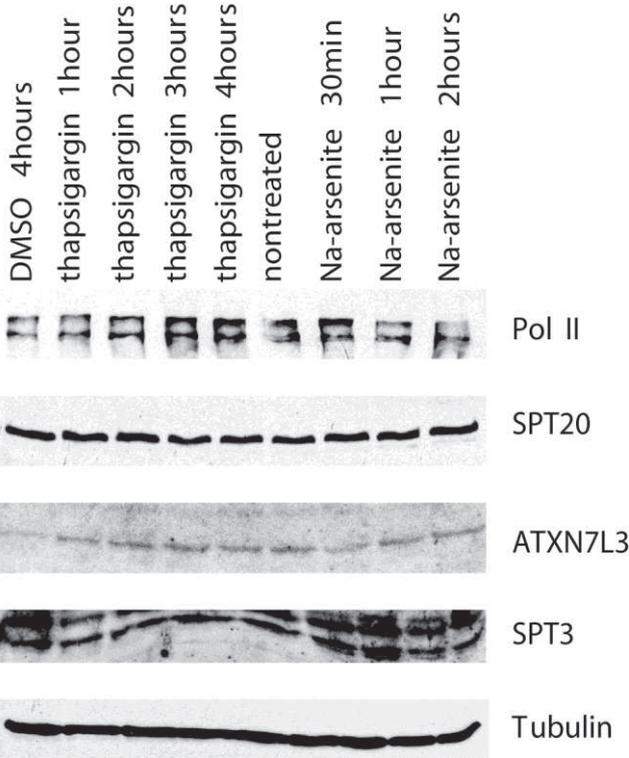
Suppl. Figure 3. Multiple alignments of hSPT20 and hSPT20L proteins. Both SPT20 and SPT20L open reading frames are predicted in the data banks to encode two different splice variants. XP_093087 and XP_293352 represent putative SPT20L splice variants and NP_001014308 and NP_060039 represent variants of SPT20. Level of conservation is increasing with darker shading.

XP 093087 : MGKQTMKDYFLSTSSSEORVHAGDLGROYRISIRLFFFRANKAKNGCGDPLLTPOREDPKAAWATGDIQKELAPFAMEVHRHLAQDSEKLEKEDIQRELGELWTQLL
 XP 293352 : -----MASSRVPARAADP-EYQRVSLAPRKEKQAP-GICGVQRVTRADAQTARSR-----
 NP 001014308 : -----
 NP_060039 : -----
 XP 093087 : PTPQLPSSGIPVETDVYARCERYIYTVIGGLCFMYAFKVKQVVECKCGQQRKACRDVKGPRRRRPLRYRCFOKPSNRLGRRDAKSGHDDDPGALF SVTMDR
 XP 293352 : -----RDAKSDHDDDPGSRDVKPGPRRRRPLRYRCFOKPSNRLGRRDVKPGHDDDPGALF SVTMDR
 NP 001014308 : -----MOO-----
 NP_060039 : -----MOO-----
 XP 093087 : DLEALDRNENIIEIAQOPPRRRYSPRAGKTIQEKLYDIYVEECCKEPEDPQELRSNVNILLEKIVRESLIPCLLVNLYPGNQGYVMLQREDCSFAETIRLPIYEE
 XP 293352 : DLEALDRNENIIEIAQOPPRRRYSPRAGKTIQEKLYDIYVEECCKEPEDPQELRSNVNILLEKIVRESLIPCLLVNLYPGNQGYVMLQREDCSFAETIRLPIYEE
 NP 001014308 : ALEIALDRNENIIEIAQOPPRRRYSPRAGKTIQEKLYDIYVEECCKEPEVK-KLRNVNILLEKIVMOETLISCLLVNLYPGNEGYVMLRKGNGSDSETIRLPIYEE
 NP_060039 : ALEIALDRNENIIEIAQOPPRRRYSPRAGKTIQEKLYDIYVEECCKEPEVK-KLRNVNILLEKIVMOETLISCLLVNLYPGNEGYVMLRKGNGSDSETIRLPIYEE
 XP 093087 : RALLDYLDABEELPPALGDVIDKASVNIPIHSGCVIIEVRDYROSSNMOPPGYOSRHILLRPTMOTIADIVKMMTRDQKMSOEDKLESOLILATAPPLICLDPSVA
 XP 293352 : RALLDYLDABEELPPALGDVIDKASVNIPIHSGCVIIEVRDYROSSNMOPPGYOSRHILLRPTMOTIADIVKMMTRDQKMSOEDKLESOLILATAPPLICLDPSVA
 NP 001014308 : GELLEYLDABEELPPALVLLIEKSOVNIPIHSGCVIAEIRDYROSSNMKSPGYOSRHILLRPTMOTIADIVHISITSDNHKWTQEDKLESOLILATAPPLICLDPSIA
 NP_060039 : GELLEYLDABEELPPALVLLIEKSOVNIPIHSGCVIAEIRDYROSSNMKSPGYOSRHILLRPTMOTIADIVHISITSDNHKWTQEDKLESOLILATAPPLICLDPSIA
 XP 093087 : VACTANRLLYNKQKMNTPMKRCLQRYSWFKVQPCQSDCPPPELRVSTSGQK-ERKVGQPCENIAKAGSCVDTWKGRPCDLAVPSEVDVEKIAKGYQSVTA
 XP 293352 : VACTANRLLYNKQKMNTPMKRCLQRYSWFKVQPCQSDCPPPELRVSTSGQK-ERKVGQPCENIAKAGSCVDTWKGRPCDLAVPSEVDVEKIAKGYQSVTA
 NP 001014308 : VTCANRLLYNKQKMNTPMKRCLQRYSWFKVQPCQSDCPPPELRVSTSGQK-ERKVGQPCENIAKAGSCVDTWKGRPCDLAVPSEVDVEKIAKGYQSVTA
 NP_060039 : VTCANRLLYNKQKMNTPMKRCLQRYSWFKVQPCQSDCPPPELRVSTSGQK-ERKVGQPCENIAKAGSCVDTWKGRPCDLAVPSEVDVEKIAKGYQSVTA
 XP 093087 : ADPQLVMPAEOEVEDPGEALEAGCOAWDTKPSIMOSFNLDPLCGKTRPRKARQK-SOKSPWQPFDDHSACLRPESETDAGRVSQAOESVQSKVKGPGKMSHS
 XP 293352 : ADPQLVMPAEOEVEDPGEALEAGCOAWDTKPSIMOSFNLDPLCGKTRPRKARQK-SOKSPWQPFDDHSACLRPESETDAGRVSQAOESVQSKVKGPGKMSHS
 NP 001014308 : DSOPTVMPAHDVKDDVVECEAGTQKTKLILLOSIGDPLYYGKIQCKADEESDQMSFSPSHSSTIDHNSWFIIGSKTDAERVNYQELLVQNEAKCFVKMSHS
 NP_060039 : DSOPTVMPAHDVKDDVVECEAGTQKTKLILLOSIGDPLYYGKIQCKADEESDQMSFSPSHSSTIDHNSWFIIGSKTDAERVNYQELLVQNEAKCFVKMSHS
 XP 093087 : SSGPASVSQLSWKTPEQDDPPVMQSSVSGKGEKHPHRTQLPSSSG-----KISS-----ASRPCAAQPPTKFIKIA
 XP 293352 : SSGPASVSQLSWKTPEQDDPPVMQSSVSGKGEKHPHRTQLPSSSG-----KISSAAAAAAGAAAPSHSQKPSVPIKASRRRPAAGRPTRFVKIA
 NP 001014308 : SSGSASLSQVSPGKETDTEITVSVQSSVVGKVKHRRPPIKLPSSSGNSSSGNYFTPQQTSSFLKSPTPPSSKPSIPRKSVDLNOVSMLSPAALSPASSQRT
 NP_060039 : SSGSASLSQVSPGKETDTEITVSVQSSVVGKVKHRRPPIKLPSSSGNSSSGNYFTPQQTSSFLKSPTPPSSKPSIPRKSVDLNOVSMLSPAALSPASSQRT
 XP 093087 : PAIQIRTSSTGLKAINVEGPVQGAQLSSFKPVQAPSGGAPAGTSGDLOSQSGPDPDARPGAVOASSPAPLOFFINTPEGLRPTILOVPOGSAVILTGPOOQ
 XP 293352 : PAIQIRTSSTGLKAINVEGPVQGAQLSSFKPVQAPSGGAPAGTSGDLOSQSGPDPDARPGAVOASSPAPLOFFINTPEGLRPTILOVPOGSAVILTGPOOQ
 NP 001014308 : TATQVMANSAGLNFINVSVCGAQAEMSGSNPMLGNTGAIIPAGINISGLLPSGGILPNALPSAVQAASQAGVPEFKNTSSLRPILNLLQLPGSSIFNTLQOQ
 NP_060039 : TATQVMANSAGLNFINVSVCGAQAEMSGSNPMLGNTGAIIPAGINISGLLPSGGILPNALPSAVQAASQAGVPEFKNTSSLRPILNLLQLPGSSIFNTLQOQ
 XP 093087 : SHQL--VSLQOQLOOPTAAHPPOPGSALGLSTQGAFFPAQQLLKFKEKVGLOMSQENPGGVRFMIIACSGLELLEILMAYGHIQDLDQVAPAMERGGWKR
 XP 293352 : SHQL--VSLQOQLOOPTAAHPPOPGSALGLSTQGAFFPAQQLLNLN-VNLTGAGSLOPQPO-AAVSLIGSAQVPOQVQLPF-VLQOQPOPLILLQPOPOQOI
 NP 001014308 : QOQISOFTPOOPOOPTICSPQPGEGSEQGSTSQEALSAQQAAV-INLTVGVSFWQSOAA--VLSQLGSAEN-----RPEOSLPQORFQLSSAFQOQ
 NP_060039 : QOQISOFTPOOPOOPTICSPQPGEGSEQGSTSQEALSAQQAAV-INLTVGVSFWQSOAA--AVAILAASNG-----YCSSSSTNSSTSSATSSAYRQOP
 XP 093087 : IFAGEVKEIKAOATGRIYVDTKIINKNSYCWHSVEEDNESGPRIEKVIASFIALDGA
 XP 293352 : QLOTPLEVLOQP-----VFIATGAVQLVQPHPGVQAGSQLVGQRKGGKPTPPAP-----
 NP 001014308 : QOQIQLEFLOHQ-----VAMAAAAQATAQLHHRHTGSQSKMKRGTPTTPKF-----
 NP_060039 : VKK-----

Suppl. Figure 4. Characterization of the polyclonal anti-hSPT20 antibody raised in this study. Comparison of the detection of SPT20 by preimmune (lane 1) and immune sera (crude or purified) using western blot analysis detection on HeLa cell nuclear extract (NE). In lane 4 a 1000 fold excess of peptide, against which the antibody was raised, has been preincubated with the antibody for 30 min prior to using it for the WB.

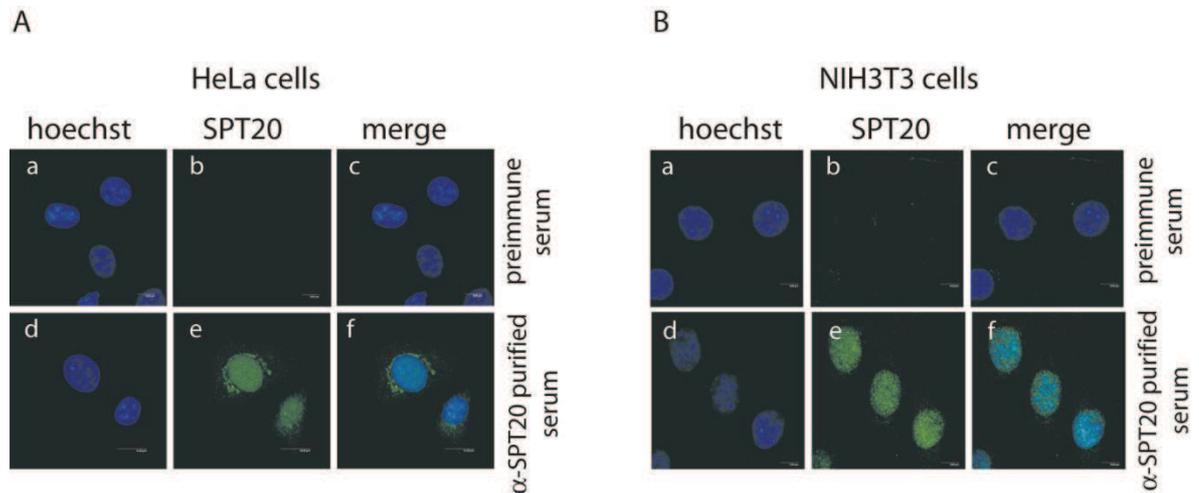


Suppl. Figure 5. Western blot analysis of the proteins used for ChIP assays after different stress treatments. None of the proteins show clear change in expression level after the treatments that we used along our ChIP assays.



Suppl. Figure 6. hSPT20 is a nuclear protein. Immunofluorescent staining of human HeLa (A) and mouse NIH3T3 cells (B) with preimmune serum or affinity purified (ap) polyclonal anti-SPT20 antibody.

Cells were fixed with 2% PFA, washed with PBS and permeabilized with PBS 0.1% tritonX-100. Blocking was carried out using 10% inactivated FCS, the primary (#2470) and secondary (F(ab') fragment of goat anti rabbit- IgG labelled with alexa fluor 488, invitrogene N°A11070) antibodies were also diluted in this solution. For the washing steps we used PBS 0.1% tritonX-100. DNA was stained with Hoechst, and then samples mounted with glycerol/propyl gallate. Microscopy was performed with a Leica TCS AOBS RS (Leica Lasertechnik GmbH) confocal scanning microscope adapted to an inverted microscope. Samples were scanned using a 63x Leitz objective (oil) and a zoom ranging from 2.5-3. Hoechst was excited with UV; alexa488 was excited with 488 laser line. The image format is 1024x1024.



Supplementary Table I. Expression pattern of the two SPT20 orthologues in human cell lines

Cell line	description	Expr. of <i>hSPT20</i>	Expr. of <i>hSPT20L</i>
HeLa	Cervix, epithelial adenocarcinoma	+	-
MCF7	Breast adenocarcinoma	+	-
Jurkat	T lymphocyte	+	-
Jar	Placenta	+	-
Caco2	Colon, carcinoma	+	-
HGT1	Stomach, gastric cancer	+	-
293T	Adenovirus transformed human embryonic kidney	+	-
BeWo	Placenta, choriocarcinoma	+	-
22Rv1	Prostate carcinoma	+	-
HEK	embryonic kidney	+	-
Ovcar 3	Ovary, adenocarcinoma	+	-
PA1	Ovary, teratocarcinoma	+	-
NTER A2	Testis fibroblast, carcinoma	+	-
HL60	Promyeloblast, acute leukemia	+	-

Supplementary Table II. Localization of the oligonucleotides used in our ChIP and RT-qPCR assays. The position of primers amplifying the promoter region (PL and PR) is shown as distance from the transcription start site (TSS). Primers used for the RT qPCR reactions were designed to contain an intron, their position shows the distance from the ATG start codon. A schematic representation of the genes is also shown for better understanding.

gene	PL	PR	ATG	RT L	RT R	remark
CHOP	+13	+192	+181/1	-112	+40	ERSE +93
HERPUD	+128	+333	+410/1	+848	+1045	ERSE +223
ERP70	+76	+292	+243/1	+1405	+1582	ERSE +127
GRP78	-57	+289	+205/1	+1315	+1472	ERSE +23
EGR-1	-195	-90	+271/1	+566	+688	SRE -117, CRE -170, -66
GAPDH	-52	+96	+42			



Primers used for RT qPCR

CHOP RT L: ACAGTGTCCCGAAGGAGAAAGG

CHOP RT R: GCCAAAATCAGAGCTGGAACCT

HERPUD RT L: GGTTGGGGTCTTCAGTTTCAGG

HERPUD RT R: CTACTCCTCCCTGAGCAGATTC

ERP70 RT L: TGACGGGTCCCTTGTTGTTCT

ERP70 RT R: AGAGTGGGGAGGATGTCAATG

GRP78 RT L: GGAGCAGGAGGAATTCCAGTCA

GRP78 RT R: GGAACACAGTGGTGCCTACCAA

CyclophilinB RT L: CTTCCCCGATGAGAACTTCAAACCT

CyclophilinB RT R: CACCTCCATGCCCTCTAGAACCTT

SPT20 RT L: GCAGTCACCTGCACTGCAAACA

SPT20 RT R: TCAGCTGAGGAGGAGGTGGACA

EGR-1 RT L: ACCTGACCGCAGAGTCTTTTCC

EGR-1 RT R: CAGGGAAAAGCGGCCAGTATAG

XBP1splice R AAGCCAAGGGGAATGAAGTGAG
XBP1splice L ATCTGAAGAGTCAATACCGCCAGAA

Primers used in the ChIP experiments

CHOP P L: GTCTCTGACCTCGGGAGCGCC
CHOP P R: CCTAGCGAGAGGGAGCGACG
HERPUD P L: CTGCAACGACAGTTCACGTCTCT
HERPUD P R: GGTTGCATCAGCCCGTGCCC
ERP70 P L: CTCCGAGCCCTAACGTGAGGTGCC
ERP70 P R: CCCAGGCTCCGCCTCTCCTGC
GRP78 P L: CAGGTCTAGAAATACAGGCCGC
GRP78 P R: TGCCTCGGGGTCAGAAGTCGC
EGR-1 P L: CTAGGGTGCAGGATGGAGGTG
EGR-1 P R: TATGGGAAGCAGGAAGCCCTAA
GAPDH P L: CACGTAGCTCAGGCCTCAAGAC
GAPDH P R: CTGTCTGAACAGGAGGAGCAGAG
noncoding L: TGGAACTTCTGGAAGACACTGGAA
noncoding R: TACACCACTCAAGGGAAACTGGAA

Primers used for SPT20 and SPT20L detection

SPT20L1for: GCACCCAACTTCCCTCAAGC
SPT20L1rev: CCAGTGGAGCCTGTCCTCAA
SPT20L2for: GATGAGCATCCAGGAAAATCCA
SPT20L2rev: CAGATGACCATAGGCCATGAGG
SPT20q1for: GCAGTCACCTGCACTGCAAACA
SPT20q1rev: TCAGCTGAGGAGGAGGTGGACA
SPT20q2for: TCCAGCTTCCAGGTGGTTCA
SPT20q2rev: TCCCCTGGCTGTTGAGGACT

D. Discussion et perspectives

1. SAGA : un complexe conservé au cours de l'évolution ?

Jusqu'à récemment, plusieurs complexes contenant GCN5 avaient été identifiés : SAGA, TFTC, STAGA (cf Introduction). Ceux-ci étaient conservés en terme de structure et de fonction entre eux, mais aussi, en comparaison avec le complexe ySAGA de la levure. Les dernières études sur la composition des complexes (dont celle-ci) tendent à déduire qu'il n'existerait en fait qu'un seul et même complexe de 2 MDa, hSAGA.

Dans cette publication, nous avons montré que la protéine hSPT20 fait partie du complexe hSAGA. De plus, hSPT20 est indispensable à la structure du complexe. Ces observations rappellent celles trouvées chez la levure. Le complexe SAGA est donc fortement conservé au cours de l'évolution. Cependant, une différence existe entre la levure et les métazoaires : les complexes humains ne contiennent pas d'homologues de ySpt8. Ces complexes hSAGA seraient donc plus proches des complexes de levure de type SLIK (SAGA like) ou SALSA (SAGA altered Spt8 absent).

2. Comment SAGA est-il recruté dans la réponse au stress ER ?

En réponse à un stress de type ER, la polymérase II et les facteurs de transcription sont recrutés sur les gènes. En outre, après plusieurs heures de traitement à la thapsigargine, il s'avère que la quantité de marques actives sur les histones augmentent (Donati et al., 2006). GCN5 acétyle les histones H3 sur les positions 9 et 14 or, justement, ces marques font partie de celles augmentant après un stress ER. Cela concorde bien avec le fait que hSAGA est recruté sur les promoteurs des gènes ER.

Par ailleurs, le facteur de transcription recruté en réponse au stress ER est NFY (Yoshida et al., 2001). Or, il est connu que NFY interagit avec GCN5 (Currie, 1998) et que la délétion de NFY entraîne une diminution d'expression des gènes présentant H3K9 et K14 acétylées (Ceribelli et al., 2008). Nous pouvons donc supposer que NFY est le facteur de transcription que va recruter le co-activateur SAGA au niveau des promoteurs des gènes ER après stress ER, où GCN5 va acétyle les histones H3 sur K9 et K14.

3. Comment SAGA agit-il sur les gènes ER ?

SAGA est donc recruté sur les gènes ER après un stress à la thapsigargine et joue un rôle dans l'expression de ces gènes. Quel est l'action du complexe sur ces gènes ? Au laboratoire des travaux ont été effectués et ont permis de montrer que c'est l'activité de déubiquitination de USP22 au sein de SAGA qui agit sur l'expression des gènes (Lang et al., 2011). Pour plus de détails, des expériences de ChIP-qPCR révèlent que le niveau de H2B ubiquitinée ne varie pas même après traitement à la thapsigargine, suggérant une forte activité de déubiquitination après induction. Guillaume Lang a alors créé une lignée cellulaires shATXN7L3 (une sous-unité du module DUB) et a montré que, dans cette lignée, SPT20, et donc SAGA, est toujours recruté sur ces gènes après induction. Cependant, l'expression des gènes *herpud* et *erp70* diminue, tandis que le niveau de H2Bub sur ces gènes augmente. L'activité de déubiquitination du module DUB au sein du complexe SAGA est donc nécessaire à l'activation des gènes ER par acétylation après induction à la thapsigargine (Lang et al., 2011).

4. Existe-t-il un module DUB libre actif dans la cellule ?

Le module DUB comprend les protéines USP22, ATXN7, ATXN7L3 et ENY2. USP 22 est l'enzyme et a besoin de ses partenaires pour pouvoir être active (Lang et al., 2011). Dans les résultats obtenus pour cette publication, nous voyons que lorsque la structure du complexe hSAGA est bouleversée, celle du DUB n'est pas perturbée (Figure 7). Une telle observation a aussi été faite chez la levure : la délétion de Spt20 ne perturbe pas l'intégrité des modules DUB et HAT (Lee et al., 2011). Le complexe SAGA est composé de différentes parties comme nous l'avons vu en Introduction ; il n'est donc pas à exclure que les modules fonctionnels se forment avant d'être intégrés dans le complexe. Mais un tel module peut-il agir seul en dehors de ce complexe ?

Afin de répondre à cette question, Jacques Bonnet, de notre équipe, a purifié les protéines sur colonne de gel filtration après une IP contre USP22. Il a pu mettre en évidence deux fractions : une correspondant au complexe SAGA et une fraction contenant un complexe beaucoup plus petit comprenant au moins USP22 et ATXN7L3. Or, USP22 a besoin d'ATXN7 pour fonctionner et cette protéine n'a pas été détectée dans la fraction « DUB libre ». Par conséquent, ce sous-module correspondrait plutôt à un assemblage du module avant son intégration dans SAGA plutôt qu'à un sous-complexe catalytiquement actif.

5. hSAGA entre t'il dans la voie de signalisation de p38 MAPK ?

Chez la levure, en réponse à un stress osmotique, la protéine Hog1 phosphoryle les activateurs de la transcription et se lie également à la chromatine (Alepuz et al., 2003; Brewster et al., 1993). Or, Hog1 est l'homologue de la protéine humaine p38 MAPK. Nous savons que p38 MAPK interagit avec hSPT20 (Zohn et al., 2006), il n'est donc pas surprenant que Hog1 interagit avec la polymérase II via ySAGA (Zapater et al., 2007), peut-être grâce à ySpt20, lors de la transcription.

Cependant, nous avons mis en évidence que chez l'homme l'absence de hSPT20 ne provoque pas de perturbation dans la voie de signalisation de p38 MAPK. La localisation de hSPT20 dans le cytoplasme, et donc en amont de cette voie de signalisation, pourrait expliquer cela ; or, ce n'est pas le cas : hSPT20 est localisée dans le noyau des cellules HeLa et murines (Figure S6).

De plus, nous n'avons pas retrouvé p38 MAPK dans les éluats des IP dirigées contre hSPT20. Ceci pourrait s'expliquer par les lavages à forte concentration en sel : si la liaison entre ces deux protéines est très dynamique, il n'est pas possible de la mettre en évidence par IP. En outre, nous ne pouvons exclure que cette interaction joue peut-être un rôle dans d'autres conditions cellulaires.

Partie 2

Purification et caractérisation d'un nouveau complexe Histone AcétylTransférase : hATAC

Ce travail a conduit à la publication en co-premier auteur avec Zita Nagy du papier :

The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes.

Anne Riss, Zita Nagy, Sally Fujiyama, Arnaud Krebs, Meritxell Orpinell, Pascal Jansen, Adrian Cohen, Henk G. Stunnenberg, Shigeaki Kato and Làszlò Tora.

Cell. Mol. Life Sci. (2010) 67:611–628

Partie 2 : Purification et caractérisation d'un nouveau complexe Histone AcétylTransférase, hATAC

A. Problématique

Lors de mon arrivée au laboratoire, l'existence d'un complexe humain HAT ATAC n'avait pas encore été démontrée.

Il était connu que GCN5, l'enzyme HAT, fait partie du complexe SAGA (Nagy and Tora, 2007). Or, des données indiquaient que cette enzyme peut être retrouvée dans un second complexe chez la drosophile : le complexe dATAC (Guelman et al., 2006; Suganuma et al., 2008). Chez l'homme en revanche, l'existence d'un tel complexe n'avait pas encore été mise en évidence. Les complexes HAT, étant généralement très conservés au cours de l'évolution, il était très probable qu'un complexe de type ATAC puisse exister chez les mammifères.

Notre objectif a été de vérifier tout d'abord l'existence d'un tel complexe chez l'homme. Nous avons alors entrepris de purifier ce complexe par immunoprécipitation (IP) contre la protéine ADA2a, celle-ci étant spécifique de dATAC. L'existence de ce complexe prouvée, nous avons cherché à identifier précisément les sous-unités qui le constituent et caractériser son activité enzymatique sur des substrats de type histone. SAGA, étant le premier complexe identifié comme contenant GCN5, les expériences sur hATAC ont été effectuées en comparaison à chaque fois avec hSAGA.

B. Résumé de la publication

Note : les figures appelées dans le texte sont celle de la publication.

1. Purification et composition du complexe hATAC

Chez la drosophile, plusieurs sous-unités du complexe ATAC ont été mises en évidence. Grâce au programme BLAST (Basic Alignment Search Tool), nous avons recherché

dans des banques de données s'il existe des homologues de ces sous-unités chez l'homme. En parallèle, un complexe a été purifié à partir d'extraits de cellules humaines HeLa par co-IP grâce à un anticorps dirigé contre la protéine hADA2a, qui est supposée être spécifique du complexe ATAC humain. Les protéines retenues ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse. En utilisant ces résultats et ceux obtenus par bioinformatique, une liste de sous-unités susceptibles de faire partie du complexe hATAC a pu être établie (Figure S2).

Afin de démontrer expérimentalement que ces protéines sont des sous-unités du complexe humain, une IP contre ADA2a a été effectuée sur des extraits nucléaires de cellules HeLa et les protéines retenues identifiées par WB (Figure 1 A).

Afin de confirmer ces résultats, des IP contre ces protéines identifiées par WB ont été effectuées : les sous-unités potentielles sont à chaque fois retrouvées dans l'éluat (Figure 1 B). Nous pouvons affirmer que le complexe ATAC humain existe et que les protéines YEATS2, ZZZ3, ATAC2, MBIP et WDR5 sont des nouvelles sous-unités du complexe ATAC humain. Les protéines GCN5, ADA2a, ADA3 et SGF29 sont également des constituants de ce complexe.

Dans le même temps, nous nous sommes intéressées à la protéine NC2 β (Negative Cofactor 2). Celle-ci est connue comme faisant partie d'un facteur de transcription hétérodimérique appelé Negative Cofactor 2 (NC2) (Goppelt and Meisterernst, 1996). Deux protéines contenant des domaines Histone Fold sont présentes dans ce facteur : NC2 α et NC2 β . La protéine NC2 β a été mise en évidence comme faisant partie du complexe ATAC de la drosophile et probablement du complexe humain, ce qui n'est pas le cas de NC2 α . L'équipe du Dr Thomas Oelgeschläger (Oxford, UK) a pu me fournir des anticorps dirigés contre NC2 α et NC2 β , ainsi que les peptides correspondants afin de réaliser des IP contre ATAC et ces protéines. L'expérience montre que la protéine NC2 β fait partie de deux complexes différents : le complexe ATAC humain et le complexe NC2 (Figure 1 C). D'autre part, NC2 α n'est pas une sous-unité de hATAC, comme l'anticorps dirigé contre NC2 α n'a pas co-immunopurifié aucune de ces protéines (Figure 1 C piste 3).

2. hATAC et hSAGA acétylent le même substrat d'histone H3K14 sur des peptides mimant les queues d'histones H3

a. Les complexes acétylent préférentiellement la lysine 14 de l'histone H3 sur des peptides

Les complexes hATAC et hSAGA ont été purifiés à partir de cellules HeLa et leur concentration normalisée selon leur composition en GCN5. Afin de mesurer leur activité, ils ont été incubés avec des peptides mimant les queues d'histones H3 et H4 avec de l'acétylCoA radioactif. Après utilisation de peptides mutants pour certaines lysines, il s'avère que les deux complexes acétylent préférentiellement la lysine 14 de l'histone H3 dans ces expériences *in vitro* (Figure 2 A et B).

b. Les complexes présentent la même activité sur H3 dans le cas de protéines d'histones

Afin d'être dans des conditions plus physiologiques, les complexes ont été testés sur des dimères H3/H4, des octamères mais également des mono et polynucléosomes. Les complexes acétylent tous deux les histones H3 *in vitro* mais sans grande différence de spécificité (Figure 2 E et F). En outre, nous remarquons que l'efficacité d'activité est nettement réduite dans le contexte des nucléosomes par rapport aux octamères (comparer E et F). Nous pouvons noter cependant que cette activité est un peu meilleure sur les polynucléosomes que sur les mononucléosomes où le signal n'est pas visible du tout.

c. ATAC2 ne présentent pas d'activité d'acétylation dans ces tests *in vitro*

Chez la drosophile, il a été montré que la protéine dATAC2 peut présenter une activité d'acétylation sur les histones H4 (Guelman et al., 2009). Après avoir surexprimé la protéine ATAC2 humaine, nous avons étudié son activité sur des peptides H3 et H4 en comparaison avec GCN5. Dans ces expériences *in vitro*, même en utilisant une forte quantité d'ATAC2, il n'est pas possible de détecter une activité.

3. ATAC2 a-t-elle une activité HAT au sein du complexe hATAC ?

Nous n'avons pas pu voir d'activité avec la protéine ATAC2 recombinante. Nous avons alors supposé que l'enzyme avait peut-être besoin d'un environnement multiprotéique pour exprimer son activité. Nous avons donc voulu vérifier s'il était possible de voir son activité dans le contexte du complexe hATAC entier. Ce complexe contenant aussi GCN5, à l'activité HAT, il faut considérer des complexes dont l'activité de GCN5 est annihilée afin de visualiser uniquement l'activité d'ATAC2. Nous avons alors utilisé des lignées cellulaires mutantes pour l'activité catalytique de GCN5, en comparaison avec une lignée sauvage. Les complexes ATAC ont été purifiés par une double IP contre ADA2a et GCN5 à partir d'extraits nucléaires de ces deux lignées (Figure 3 A).

Nous avons alors utilisé les complexes ainsi purifiés contenant uniquement GCN5 mutée (G-ATAC h/h) sur des peptides mimant la région N-terminale des histones H3 ou H4, comparés aux complexes G-ATAC issus de la souche sauvage (dite WT) (Figure 3 C). Les complexes WT présentent l'activité déjà démontrée sur des peptides H3 et H4. Néanmoins, le complexe G-ATAC muté n'est plus actif : la protéine ATAC2, même dans le contexte d'un complexe entier ne présente pas d'activité sur les peptides. Dans le cas du complexe WT, l'activité d'acétylation observée provient donc uniquement de GCN5.

4. Les enzymes GCN5 et PCAF existent de façon exclusive dans les complexes

Afin de purifier un complexe hATAC contenant GCN5 mutée pour l'expérience précédente, nous avons donc réalisé une première IP contre la sous-unité ADA2a (Figure 3 A). Après visualisation de l'éluat par WB, il s'avère que la protéine PCAF est présente dans cette fraction, en plus de GCN5 (Figure 3 B piste 3). Nous nous sommes alors demandé si ces deux enzymes homologues étaient présentes toutes deux au sein d'un même complexe, ou s'il existait deux types de complexes (un contenant uniquement GCN5, l'autre contenant uniquement PCAF). Une seconde IP contre GCN5 sur ces complexes hATAC purifiés a alors été effectuée (Figure 3 A) et nous pouvons dire par analyse WB que hATAC contient soit GCN5 (G-ATAC) soit PCAF (P-ATAC) (Figure B comparer pistes 5 et 7).

De plus, nous pouvons faire remarquer que ces deux types de complexes présentent le même profil d'activité sur les peptides H3 et H4 (Figure 3 C, comparer G-ATAC wt et P-ATAC).

Notons également que dans les lignées mutantes pour l'activité catalytique de GCN5, la quantité de protéine PCAF est doublée dans les extraits nucléaires (Figure 3 B comparer pistes 1 et 2).

5. L'absence de hATAC ou hSAGA dans les cellules induit une diminution des niveaux d'histones H3K9 et H3K14 acétylées, sans affecter l'acétylation de H4

Afin d'étudier les complexes dans un contexte plus *in vivo*, nous avons étudié les niveaux d'histones acétylés dans les cellules HeLa après avoir perturbé l'expression des complexes en utilisant des ARN interférents. Les résultats montrent une diminution de H3K9 et H3K14 acétylées, sans toutefois de perturbation pour H4 acétylée (Figure 4). Notons que ces niveaux sont les mêmes que ce soit avec des ARN contre hATAC ou hSAGA : comme pour les expériences *in vitro*, *in vivo* nous n'observons pas de différence entre les deux complexes.

6. L'absence de hATAC dans les cellules HeLa conduit à une diminution du niveau de H3S10 phosphorylée

Chez la drosophile, le complexe dATAC joue un rôle dans la voie de signalisation pour la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (voir Introduction et (Ciurciu et al., 2008)). En parallèle de l'expérience d'ARN interférents contre hATAC et hSAGA vue en section 5, nous avons alors regardé ce qu'il en était de cette modification dans les cellules HeLa. Une forte diminution du niveau global de cette dernière est en effet observée dans le cas d'une perturbation du complexe hATAC (Figure 4). Or, cette diminution est moindre dans le cas d'une perturbation de hSAGA.

7. ATAC et SAGA régulent différents gènes inductibles au stress

- a. Chez la drosophile, dATAC et dSAGA sont recrutés différemment sur les chromosomes polytènes suite à un stress au TPA

N'ayant pas pu mettre en évidence de spécificité d'action sur les substrats histones, nous avons cherché à trouver des différences entre ATAC et SAGA d'un point de vue

fonctionnel. En collaboration avec Sally Fujiyama de l'équipe de Shigeaki Kato (Institute of Molecular and Cellular Biosciences, Japon), le recrutement des sous-unités de dATAC et dSAGA sur des chromosomes polytènes de drosophile a été étudié par immunofluorescence. Sans condition de stimulation, le signal des protéines sur les chromosomes est faible et ne colocalise pas avec celui de la polymérase II active (Figure 5 A, C et E). Après stimulation par du TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), un agent toxique qui entraîne l'activation de la voie de signalisation de la kinase PKC (Protein Kinase C) et par conséquent l'activation des gènes d'expression immédiate, le complexe dATAC est recruté sur les loci activement transcrits, ce qui n'est pas le cas de dSAGA.

b. Chez l'homme, hATAC est recruté sur les gènes d'expression immédiate, et non hSAGA

dATAC, et non dSAGA, est recruté sur les chromosomes polytènes chez la drosophile après traitement TPA. Il a alors fallu confirmer cette différence sur des cellules humaines. Pour cela, les cellules HeLa ont été traitées avec le TPA. Ce dernier induit la transcription des gènes d'expression immédiate (nommés immediate early genes IE), composés de *c-fos*, *egr1* et *fra1*. Après précipitation de la chromatine grâce à des anticorps spécifiques de hATAC ou hSAGA, il est mis en évidence que hATAC est recruté au niveau des gènes IE après traitement (Figure 6 C) comme pour l'ARN Pol II (Figure 6 B) ; ce n'est pas le cas de hSAGA (Figure 6 E).

c. Les gènes d'expression immédiate ne sont plus exprimés après traitement au TPA en absence de hATAC

Afin de confirmer ces derniers résultats, l'expression des gènes IE a été mesurée après traitement au TPA et perturbation des complexes hATAC et hSAGA : les niveaux d'ARN messagers pour les gènes IE sont diminués en absence du complexe hATAC, cependant ces niveaux ne sont pas perturbés en l'absence de hSAGA (Figure 7).

d. L'absence de hATAC dans les cellules perturbe l'acétylation des histones H3 des gènes IE

Nous avons mis en évidence qu'après réduction de l'expression de hATAC par des ARN interférents, on observe une diminution globale de l'acétylation de H3K9 et H3K14 dans les cellules HeLa (section 5) et que l'expression des gènes IE est perturbé (section 7 c). Y-a-t-il une corrélation entre ces deux observations ? Pour répondre à cette question, des expériences de ChIP avec un anticorps dirigé contre H3K9K14 acétylées sur des cellules HeLa traitées avec TPA et avec des ARN interférents contre hATAC et hSAGA ont été effectuées (Figure 8). Comme attendu, la quantité d'acétylation sur les gènes IE augmente effectivement après traitement au TPA. Cependant, cette augmentation n'est plus observée en absence de hATAC, ce qui confirme la corrélation entre activité d'acétylation et spécificité d'ATAC sur les gènes IE. Notons que dans le cas de l'absence de hSAGA, les niveaux ne sont pas perturbés comme pour hATAC, mais l'augmentation d'acétylation après traitement au TPA est moins importante que dans le cas des cellules non traitées.

C. Publication 2

Publication 2

RESEARCH ARTICLE

The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes

Zita Nagy · Anne Riss · Sally Fujiyama · Arnaud Krebs · Meritxell Orpinell · Pascal Jansen · Adrian Cohen · Henk G. Stunnenberg · Shigeaki Kato · László Tora

Received: 21 July 2009 / Revised: 23 October 2009 / Accepted: 30 October 2009 / Published online: 21 November 2009
© Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland 2009

Abstract Histone acetyl transferases (HATs) play a crucial role in eukaryotes by regulating chromatin architecture and locus-specific transcription. The GCN5 HAT was identified as a subunit of the SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) multiprotein complex. Vertebrate cells express a second HAT, PCAF, that is 73% identical to GCN5. Here, we report the characterization of the mammalian ATAC (Ada-Two-A-Containing) complexes containing either GCN5 or PCAF in a mutually exclusive manner. In vitro ATAC complexes acetylate lysine 14 of histone H3. Moreover, ATAC- or SAGA-specific knock-down experiments suggest that both ATAC and SAGA are involved in the acetylation of histone H3K9 and K14 residues. Despite their catalytic similarities, SAGA and ATAC execute their coactivator functions on distinct sets

of inducible target genes. Interestingly, ATAC strongly influences the global phosphorylation level of histone H3S10, suggesting that in mammalian cells a cross-talk exists linking ATAC function to H3S10 phosphorylation.

Keywords ADA2a · GCN5 · ATAC2 · Histone acetyltransferase · Immediate early gene · PCAF · H3S10P

Introduction

Post-translational modifications of histones are known to play fundamental roles on the biology of the cell [1]. One of these modifications, the acetylation of lysine residues, has immediate effects on gene regulation, affects the folding of chromatin fibers, and also plays a role in the interaction between histones and other proteins [2–5]. Histone acetylation in general is a mark of active transcription, although the different lysine residues seem to be important for distinct biological processes. For example, it has been reported that histone H3 K9/K14 acetylation defines distinct chromatin regions permissive for gene expression [3, 6]. Furthermore, histone H4K5Ac and H4K12Ac have been suggested to function as deposition marks for newly synthesized histones [7], while acetylation of H4K16 leads to global opening of the chromatin due to changes in the physico-chemical properties of the chromatin fiber [8]. The histone acetyl transferases that add the acetyl group to lysines are classified into several HAT enzyme families and have distinct substrate specificities [9, 10]. They function as co-activators/adapters of transcription, but can also acetylate non-histone substrates, thereby regulating their activity or stability [4, 11]. GCN5 is the founding member of the GNAT family of HATs.

Z. Nagy and A. Riss contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00018-009-0199-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Z. Nagy · A. Riss · A. Krebs · M. Orpinell · L. Tora (✉)
Department of Functional Genomics,
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
(IGBMC), CNRS UMR 7104, INSERM U 964,
Université de Strasbourg, BP 10142, 67404 Illkirch Cedex,
CU de Strasbourg, France
e-mail: laszlo@igbmc.u-strasbg.fr; laszlo@titus.u-strasbg.fr

S. Fujiyama · S. Kato
Institute of Molecular and Cellular Biosciences,
The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku,
Tokyo 113-0032, Japan

P. Jansen · A. Cohen · H. G. Stunnenberg
Department of Molecular Biology, NCMLS 274,
Radboud University Nijmegen, PO Box 9101,
6500 HB Nijmegen, The Netherlands

While most of the metazoan genomes code for one GCN5 type factor, vertebrates have a second gene encoding PCAF (p300/CBP associated factor), which is highly homologous to GCN5 [4, 11, 12]. GCN5 (or PCAF) is a subunit of the SAGA (Sgf-Ada-Gcn5 containing acetyltransferase) complex that is conserved from yeast to human cells [4, 13, 14]. Eukaryotic SAGA complexes harbor 19 subunits, which include TRRAP (or γ Tra1), ENY2 (or γ Sus1), USP22 (or γ Ubp8), and subunits belonging to the ADA, SPT, TAF, and SGF group of proteins [13]. Recently, a second GCN5-containing complex has been described from metazoans, called ATAC (ADA-Two-A containing) [15–18]. The ATAC complex shares a common core with SAGA, composed of GCN5-ADA3-SGF29 and either ADA2a (in ATAC) or ADA2b (in SAGA). Besides these subunits, the human ATAC complexes contain a second putative HAT, called hATAC2 (or hCSR2BP), and five other subunits; hYEATS2, hZZZ3, hMBIP, hWDR5, and hNC2 β in human cells or their *Drosophila* orthologues in dATAC. At present, the biological function of the ATAC complex is not well understood.

In vitro, yeast and human GCN5 acetylates mainly histone H3K14. However, when incorporated into the hSAGA complex, although GCN5 still shows a preference for histone H3K14, it also acetylates H3K9 and H3K18 [19, 20]. The *Drosophila* ATAC possesses different substrate specificity than dSAGA, since it mainly acetylates histone H4 [16, 17, 21]. The H4 specific activity was suggested to result from the presence of the second HAT, ATAC2, in the complex [17]. When testing the HAT activity of different hATAC preparations on free histones, the Flag-MBIP immunoprecipitated (IPed) hATAC acetylated histone H3 and H4, while the Flag-YEATS2 IPed hATAC acetylated only histone H3 [15, 18]. Thus, at present, the function of the distinct metazoan ATAC complexes is not clear, and the physiological targets of the two known subunits with enzymatic activities (ATAC2 and GCN5) await further analysis. Moreover, it is not yet well understood why metazoan cells have two different GCN5-containing HAT complexes and whether these complexes carry out redundant or specific functions.

Here, we report the identification of the endogenous human ATAC complexes. We determined the composition and the histone acetylation specificity of the hATAC complex in vitro. Importantly, we propose that the biological relevance of having two GCN5-containing HAT complexes, hSAGA and hATAC, manifests mainly in vivo. We show in both *Drosophila* salivary glands and human cells that the SAGA and ATAC HAT complexes respond to different stimuli and thus play a transcriptional coactivator function at distinct sets of target genes. We also provide evidence for ATAC playing a role in the regulation of

global histone H3 Ser10 phosphorylation suggesting a cross-talk between histone acetylation and phosphorylation on histone H3 tails.

Materials and methods

Antibodies

The anti-hADA2a monoclonal antibody (2AD2A1) was raised against the peptide MDRLGSFSNDPSDKPP(C) and its specificity tested in immunofluorescent staining (electronic supplementary material, ESM, Fig. 1). To raise polyclonal antibodies for the ATAC subunits, the following peptides were synthesized and coupled to ovalbumine: for the anti-ADA2a antibody (#2619), the MDRLGSFSNDPSDKPP(C) peptide; for the anti-hZZZ3 antibody (#2616), the (C)GNNNGRTTDLKQQSTRESW peptide; for the anti-mADA3 antibody (#2678), the LEGKTGHGPGPGPRPKSKN(C) peptide; for the anti-ATAC2 antibody (#2734), the IRSHLHRSDPHWTPEPD(C) peptide; for the anti-hYEATS2 antibody (#2783), the LSQHNDFLSDKDNNNSNM(C) peptide; for the anti-hMBIP antibody (#2786), the TRPEGIPGSGHKPNSMLR(C) peptide; for the anti-mGCN5 antibody (#2676), the MAEPSQAPTPAPAAQPRPL(C) peptide; and for the anti-mPCAF (#2760) antibody, the MAEAGGAGJPALPPAPPHG(C) peptide. The sera were affinity purified by using the Sulfolink Coupling Gel (Pierce) following the manufacturer's recommendations.

Antibodies against the following proteins have been described earlier: GNC5: 2GC2C11 [22], TAF10: 23TA1H8 [23], TRRAP: 2TRR2D5 [24], TBP: 3G3 [25], USP22: #2391 [26], SPT20 (p38IP): #4112 [27] and #2487 [13], WDR5: [28], HCF-1: N18 [29], NC2 α and NC2 β [30].

Antibodies used for detection of histone modifications on western blot were: H3 core: ab1791 Abcam; H3K9Ac: #06-942 Millipore; H3S10P: #05-598 Millipore; H3K14Ac: #07-353 Millipore; H4K5Ac: ab51997 Abcam; H4K12Ac: ab1761 Abcam; H4K16Ac: #07-329 Millipore.

Antibodies used for ChIP were: H3 core: ab1791 Abcam; H3K9/K14Ac: #06-599 Millipore.

Drosophila antibodies used for polytene chromosome staining

Primary antibodies were rabbit anti-FLAG (F-7425; Sigma–Aldrich) at 1:50, monoclonal antibody against RNA Polymerase II phosphorylated on Ser5 (H14; COVANCE) at 1:50 and rabbit anti-Ada2b [31] at 1:25 dilution. Secondary antibodies were Texas Red Goat Anti-Mouse IgM, μ chain specific (Jackson ImmunoResearch), and Alexa

Fluor[®] 488 Donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes) at 1:1,000 dilution.

Baculovirus infections and protein overexpression

Overexpression and protein preparation was done as described in [32]. For the HA-ATAC2 construct, the cDNA clone IRAUp969G0838D was purchased from ImaGENES, the coding sequence amplified with the following primers: 5' AAGAATTCGATGGATAGTAGCATCCACCTGAG 3'; 5' TCCTCGAGCTGTATTCGCATCAGCGCC 3', and then cloned to the *EcoRI* *XhoI* sites of pCDNA3 vector modified to contain an N-terminal HA tag. The tagged cDNA was further cloned to pVL1393 baculovirus transfer vector to generate recombinant virus. The hGCN5 expressing construct was described in [33].

Immunoprecipitations were carried out as described earlier [33].

Cell growth condition, stress treatments

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Medium supplemented with 1 g/l glucose, 5% FCS, phenol red, and gentamycin. Before TPA treatment, cells were serum starved O/N (0.5% FCS) and then treated with 50 ng/ml TPA during 1 h. Control treatment was carried out with DMSO.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was carried out as described in [13].

RNA purification, reverse transcription and qPCR

Total RNA was purified using Trizol reagent (Invitrogen), reverse transcribed by MMLV reverse transcriptase using random hexamers, and analyzed by the quantitative PCR (Q-PCR) machine Roche LightCycler480 with Syber Green (Quiagen) Master mix. All the detected values represented in the manuscript have been normalized to *CyclophilinB* and represent biologically independent replicates.

siRNA

Negative control (ref. number D-001810-10), anti hZZZ3 siRNA (L-013939-01), anti hATAC2 (L-008481-00), anti hADA2a siRNA (ref number L-017516-00), and anti hSPT20 siRNA (ref number L-013820-00) was purchased from Dharmacon and transfected using Lipofectamine 2000 and OptiMEM serum-free medium following the manufacturer's recommendations.

Nuclear extract preparation was described in [33].

Purification of histone H3/H4 dimers, octamers, mono- and polynucleosomes was performed as described in [34].

Fly stock and generation of transgenic flies

Fly maintenance and crosses were performed as described previously [26]. The expression constructs of FLAG-tagged D12 and CG10238 in pUAST vector were sent to bestGene (CA, USA) *Drosophila* embryo injection services for generation of transgenic flies. Dpp-Gal4 (to obtain UAS-FLAG-CG10238/dpp-Gal4 flies) and dpp.blk1-Gal4 (to obtain UAS-FLAG-D12/+;dpp.blk1-Gal4/+ flies) stocks were obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock centre.

Preparation and treatment of polytene chromosomes

Drosophila salivary glands were dissected from third instar larvae in 40% acetic acid and fixed for 5 min in 3.7% formaldehyde, 1% Triton-X 100, 1/2× PBS, and followed by 2 min in 3.7% formaldehyde, 50% acetic acid on poly-L lysine-treated slide glass. For TPA treatment, salivary glands were dissected in 0.7% NaCl, 0.1% NP-40 solution, incubated with 4 nM TPA in Schneider's *Drosophila* Medium (1×) (Invitrogen), 10% FBS for 30 min at 25°C, and then fixed. After fixation, polytene chromosomes were squashed by squeezing the slide and siliconized cover slip and were frozen in liquid nitrogen. The cover slip was removed and dehydrated for 10 min in ice-cold 50% acetone, 50% methanol solution. The slide was washed in PBS for 10 min and, for blocking, incubated in 5% skim milk, PBST (PBS with 0.1% Tween 20) for 1 h at RT. The squashed polytene chromosomes were covered overnight at 4°C with the diluted primary antibody in a humid chamber. The slides were washed three times for 5 min in PBST and incubated with the secondary antibody for 2 h at RT. Slides were washed three times for 5 min with PBST and mounted with VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame). The specimens were photographed in confocal microscopy LSM510 (Carl Zeiss MicroImaging).

Acetylation assays

Peptide acetylations were performed as described in [13, 35]. Briefly, 1.2 µg of peptide (corresponding to the N-terminal tail of H3 at positions 6–20 or the N-terminal tail of H4 from positions 1–19) was added to the immunopurified protein sample together with 1 µl of H³ Acetyl CoenzymeA (Amersham; 50 µCi/ml) in the reaction buffer (50 mM TrisHCl pH 8, 20 mM KCl, 5 mM DTT, 4 mM EDTA) and incubated at 30°C for 1 h. Samples were spotted on Whatmann P81 nitrocellulose filters, washed 3 times for 10 min in ice-cold 50 mM NaHCO₃ pH 9 buffer, and dried. Filters were then dropped into 5 ml of Ready-Safe liquid scintillation cocktail (Beckman Coulter) and

radioactivity was quantified by an LS6000SC Beckman counter.

Histone acetylation assay: histones were incubated with ^{14}C -Acetyl-CoA and ATAC complex (purified from HeLa nuclear extracts by anti-ADA2a IP followed by elution with peptide) or SAGA complex (purified from HeLa nuclear extracts by anti-USP22 IP followed by peptide) in $1\times\text{HAT}$ buffer (50 mM Tris pH 7.9, 10% glycerol, 0,1 mM EDTA, 50 mM KCl, 20 mM Sodium Butyrate, 1 mM DTT and protease inhibitors). The reactions were incubated during 1 h at 30°C, stopped by adding Laemmli buffer with 100 mM DTT and boiled for 10 min. Proteins were then loaded on a 13% SDS-PAGE and analyzed by coomassie brilliant blue staining. The gel was then incubated for 20 min in “Amplify” fluorographic reagent (GE Healthcare) and dried. Blank phosphor screen (Fuji) was placed overnight on the gel and the radioactive signal was analysed with phosphorimager scanner Typhoon 8600.

Primers used for the RT qPCR analysis

EGR-1 RT L: ACCTGACCGCAGAGTCTTTTCC;
 EGR-1 RT R: CAGGGAAAAGCGGCCAGTATAG;
 FRA-1 RT L: CAGGAACCGGAGGAAGGAACT;
 FRA-1 RT R: TGCTTCTGCAGCTCCTCAATCT;
 c-FOS RT L: GGGGCAAGGTGGAACAGTTATC;
 c-FOS RT R: TAGTTGGTCTGTCTCCGCTTGG;
 CyclophilinB RT L: CTTCCCCGATGAGAACTTCAA
 ACT;
 CyclophilinB RT R: CACCTCCATGCCCTCTAGAAC
 TTT;
 GAPDH RT L: ACAGTCCATGCCATCACTGCC;
 GAPDH RT R: GCCTGCTTACCACCTTCTTG.

Primers used in the ChIP quantification reactions

EGR-1 P L: CTAGGGTGCAGGATGGAGGTG;
 EGR-1 P R: TATGGGAAGCAGGAAGCCCTAA;
 FRA-1 P L: GTTCCCCGAAGTCTCGGAACAT;
 FRA-1 P R: GTGGTTCAGCCCGAGAACTTTT;
 c-FOS P L: TTGAGCCCGTGACGTTTACTACT;
 c-FOS P R: TTCTCAGATGCTCGCTGCAGAT;
 non-coding L: TGGAACCTTCTGGAAGACTGGAA;
 non-coding R: TACACCACTCAAGGGAACTGGAA.

Results

Composition of the endogenous hATAC complex

To isolate endogenous human ATAC complexes we carried out immunoprecipitation (IP) using a monoclonal antibody raised against ADA2a (ESM, Fig. 1) that is the defining

subunit of the complex (ADA-Two-A-Containing) [15–18]. The IP was carried out on a HeLa cell nuclear extract without overexpressing any of the putative ATAC subunits and the proteins that coprecipitated with hADA2a were resolved by SDS-PAGE and visualized by silver nitrate staining (ESM, Fig. 2a). The identification of the components of this endogenous complex by mass spectrometry indicated mostly the presence of the same polypeptides as the ones reported by Guelman and colleagues [15] (ESM, Fig. 2a, and see Table 1). To further verify the presence of all the reported subunits in our endogenous complex, we raised specific antibodies against most of the known subunits of hATAC. In addition, to carry out a comparative examination of the two human GCN5-containing complexes, we have also purified endogenous hSAGA complex by using an antibody raised against the recently identified hSPT20 subunit [13]. Consequent comparison of the two complexes by western blotting analysis revealed the similarities and differences between hSAGA and hATAC. Common subunits present in both complexes are: hGCN5, hADA3 and hSGF29 (Fig. 1a). Human ATAC specific components are: hYEATS2, a large protein containing a so-called YEATS domain with no known function; hZZZ3, a potential transcription factor with zinc finger and SANT domains; hATAC2 containing a putative acetyl transferase domain; hADA2a, a known adaptor protein affecting the activity of hGCN5 [36]; hMBIP that was shown to interact with the MAPK upstream kinase [37]; and hWDR5 also known as a subunit of the MLL complex [38] (Fig. 1a lane 2). Importantly, SAGA specific subunits such as hTRRAP, hUSP22 and hTAF10 did not copurify with hADA2a (Fig. 1a lane 2). As TBP and HCF1 were reported to interact with the anti-Flag-YEATS2 purified hATAC complex [18] (Table 1), we tested the presence of these factors in our endogenous ATAC complex preparations. In good agreement with our mass spectrometry data, neither TBP nor HCF1 could be detected in the complex by western blot analysis (data not shown).

To further confirm our results on the composition of the endogenous hATAC complex, we carried out reciprocal IPs with antibodies raised against the putative ATAC subunits, such as hGCN5, hADA3, hATAC2, hZZZ3, hMBIP, and hYEATS2. Western blot analyses of samples eluted by excess of the antigenic peptide show that besides the common subunits (hGCN5, hADA3, and hSGF29), the ATAC specific proteins (hZZZ3, hYEATS2, hATAC2, hMBIP, and hWDR5) copurify with the precipitated proteins in all the cases (Fig. 1b). On the other hand, antibodies against common subunits of SAGA and ATAC (anti-hGCN5 or anti-hADA3) also pull down hSAGA specific subunits, such as hTRRAP, hUSP22, and hTAF10 (Fig. 1b lanes 2, 3). Based on our observations, we conclude that hADA2a, hGCN5, hADA3, hSGF29, hZZZ3,

Table 1 Subunit composition of the known *Drosophila* and human ATAC complexes

<i>Drosophila</i> ATAC subunits [16, 17]	Human ATAC purified by anti-flagYEATS2 IP [18]	Human ATAC purified by anti-flagMBIP IP [15]	Human ATAC purified by anti-hADA2a IP (present work)
dGCN5	hGCN5	hGCN5	hGCN5
	hPCAF		hPCAF
dADA2a	hADA2a	hADA2a	hADA2a
dADA3	hADA3	hADA3	hADA3
dATAC1 (CG9200)	ZZZ3	ZZZ3	ZZZ3
dATAC2 (CG10414)	hATAC2 (hCSR2BP)	hATAC2 (hCSR2BP)	hATAC2 (hCSR2BP)
CG30390	hSGF29	hSGF29	hSGF29
dATAC3 (CG32343)			
HCF	HCF1		
WDS	WDR5	WDR5	WDR5
D12	YEATS2	YEATS2	YEATS2
NC2 β	NC2 β	NC2 β	NC2 β
CG10238	MBIP	MBIP	MBIP
	UBAP2L		
CHRAC14	POLE3		
	POLE4		
	MAP3K7		
	TBP		

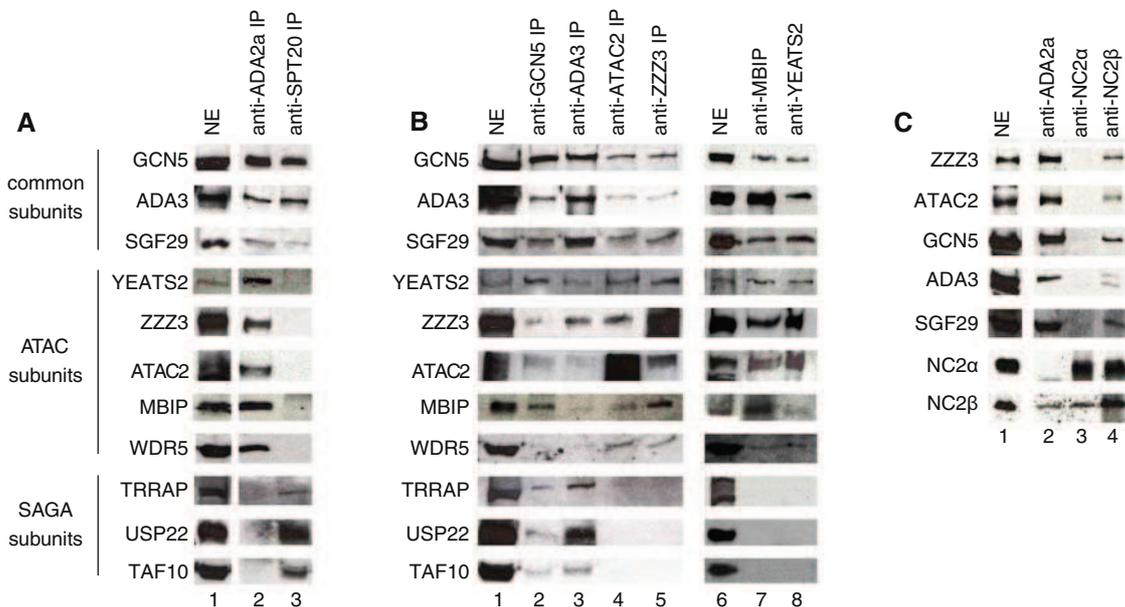


Fig. 1 Subunit composition of the endogenous human ATAC complex. **a** Comparison of an anti-ADA2a and an anti-hSPT20 IP reveals the differences in composition of hATAC and hSAGA, respectively. The two complexes were purified from HeLa nuclear extract (NE) by means of antibodies developed against hADA2a (lane 2) or hSPT20 (lane 3) and the coprecipitated proteins were detected by western blotting. **b** Different IPs demonstrate the existing

interactions between hSAGA and hATAC subunits. The common, the ATAC-specific and the SAGA-specific, subunits are marked on the left side of the figure. **c** NC2 β , but not NC2 α is a component of the hATAC complex, as it copurifies with other subunits of the complex both in anti-ADA2a (lane 2) and in anti-NC2 β (lane 4) IPs. Asterisk the heavy chain of the antibody

hATAC2, hYEATS2, hMBIP, and hWDR5 are all bona fide subunits of the endogenous ATAC complex in human cells.

As we have also obtained one peptide by mass spectrometry corresponding to the NC2 β (also called Dr1; [39–41]) in one of our ATAC purifications, and as NC2 β has been reported to be a component of the Flag-purified ATAC complexes [15, 18], we have investigated the interaction between hADA2a and the two subunits of the NC2 complex, NC2 α and NC2 β [30, 42]. Our results clearly show that only NC2 β is associated with the endogenous hATAC complex since an antibody against NC2 β coprecipitated the tested hATAC subunits and, vice versa, the anti-ADA2a IP precipitated NC2 β (Fig. 1c lanes 2, 4). In contrast, the anti-NC2 α antibody coprecipitated only NC2 β , but no ATAC subunits (Fig. 1c lane 3). Thus, NC2 β is also a bona fide subunit of the endogenous hATAC complex.

In summary, our results provide evidence for the existence of an endogenous ATAC complex containing at least ten subunits (see Table 1).

In vitro hATAC and SAGA acetylate histone H3 K14

After the purification of the endogenous ATAC complex from human cells, we aimed to test its substrate specificity and compare it to that of hSAGA. To this end, we performed in vitro acetylation assays on wild-type and mutated N-terminal histone tail peptides. In each mutant peptide, we changed one acetylatable lysine (K) residue to arginine (R) that mimics the non-acetylated form of the amino acid. First, we analyzed the substrate specificity of the two GCN5-containing complexes, ATAC and SAGA, in peptide acetylation assay. Both complexes were purified from HeLa cells by specific IPs and normalized for the content of the common subunits (ESM, Fig. 3a). Surprisingly, in this in vitro peptide acetylation test, we observed no difference between hSAGA and hATAC, as both complexes showed a preference for acetylating histone H3K14 (Fig. 2a, b).

Next, we analyzed the activity of the two ATAC-associated HAT enzymes alone. Both recombinant enzymes (flag-GCN5 and HA-ATAC2) were purified from baculovirus infected SF9 insect cells by immunoprecipitation and consecutive peptide elution (ESM, Fig. 3b). While GCN5 showed specificity toward H3K14 in these reactions (Fig. 2c), ATAC2 had no detectable activity even when ten times more enzyme was added to the reactions (Fig. 2d). Thus, our data suggest that the second putative acetyltransferase subunit of the ATAC complex is inactive in vitro on the tested histone tail peptides.

To exclude the possibility that the use of non-physiological substrates (i.e., short peptides) changes the specificity

of the enzymes in the complexes, we tested the HAT activity of ATAC and SAGA on purified full-length histone H3–H4 dimers and histone octamers containing all the four core histones. In these acetyltransferase assays, both SAGA and ATAC complexes acetylated mainly histone H3 (Fig. 2e). Similar results were obtained when we tested the acetyltransferase activity of the two complexes on mono- and polynucleosomes (Fig. 2f). Note, however, that polynucleosomes seemed to be better substrates than mononucleosomes. Our results are in good agreement with those of the Martinez group [18], and suggest that, in spite of the evolutionary conservation of the protein sequences from *Drosophila* to human, the human complex has no or very weak H4 specificity in vitro. Thus, the functional difference between the human SAGA and ATAC complexes seem not to be related to their histone substrate specificity.

ATAC complexes containing either GCN5 or PCAF exist in mouse fibroblasts

The fact that the ATAC complex contains two HATs (GCN5 and ATAC2) raised the possibility that the two enzymes may have overlapping or redundant activities within the complex. To be able to measure the activity of ATAC2 alone in the context of the intact ATAC complex, we decided to purify ATAC complexes from *Gcn5^{hat/hat}* mouse embryo fibroblasts (MEFs), in which the GCN5 catalytic activity was inactivated by double E568A and D608A mutations in the HAT domain [43]. We prepared nuclear extracts from wild-type (+/+) and *Gcn5^{hat/hat}* MEFs and carried out IPs using the above described anti-ADA2a antibody (Fig. 3a, elution 1). Surprisingly, in nuclear extracts prepared from *Gcn5^{hat/hat}* mutant MEFs, PCAF expression was significantly up-regulated (2- to 3-fold), indicating that, when GCN5 is inactivated, cells compensate the loss of its activity with that of its paralogue (see Introduction and Fig. 3b lane 2). Note that similar results were described in a different cellular system [44]. Moreover, our western blot analysis indicated that ATAC, purified by a simple anti-ADA2a IP, contained both PCAF and GCN5 (Fig. 3b lanes 3, 4). The question thus rose whether these complexes can be separated into fractions containing exclusively GCN5 or PCAF. Alternatively, a given ATAC complex might contain both GCN5 and PCAF. To decide, the ADA2a-containing complexes were re-IPed with an anti-GCN5 antibody (see Fig. 3a). When the GCN5-free supernatant of this second anti-GCN5 IP was compared to the GCN5-containing elution fraction by western blot (elution 2 on Fig. 3a), it became clear that we have separated PCAF-containing ATAC complexes (hereafter called P-ATAC) from GCN5-containing complexes (hereafter called G-ATAC)

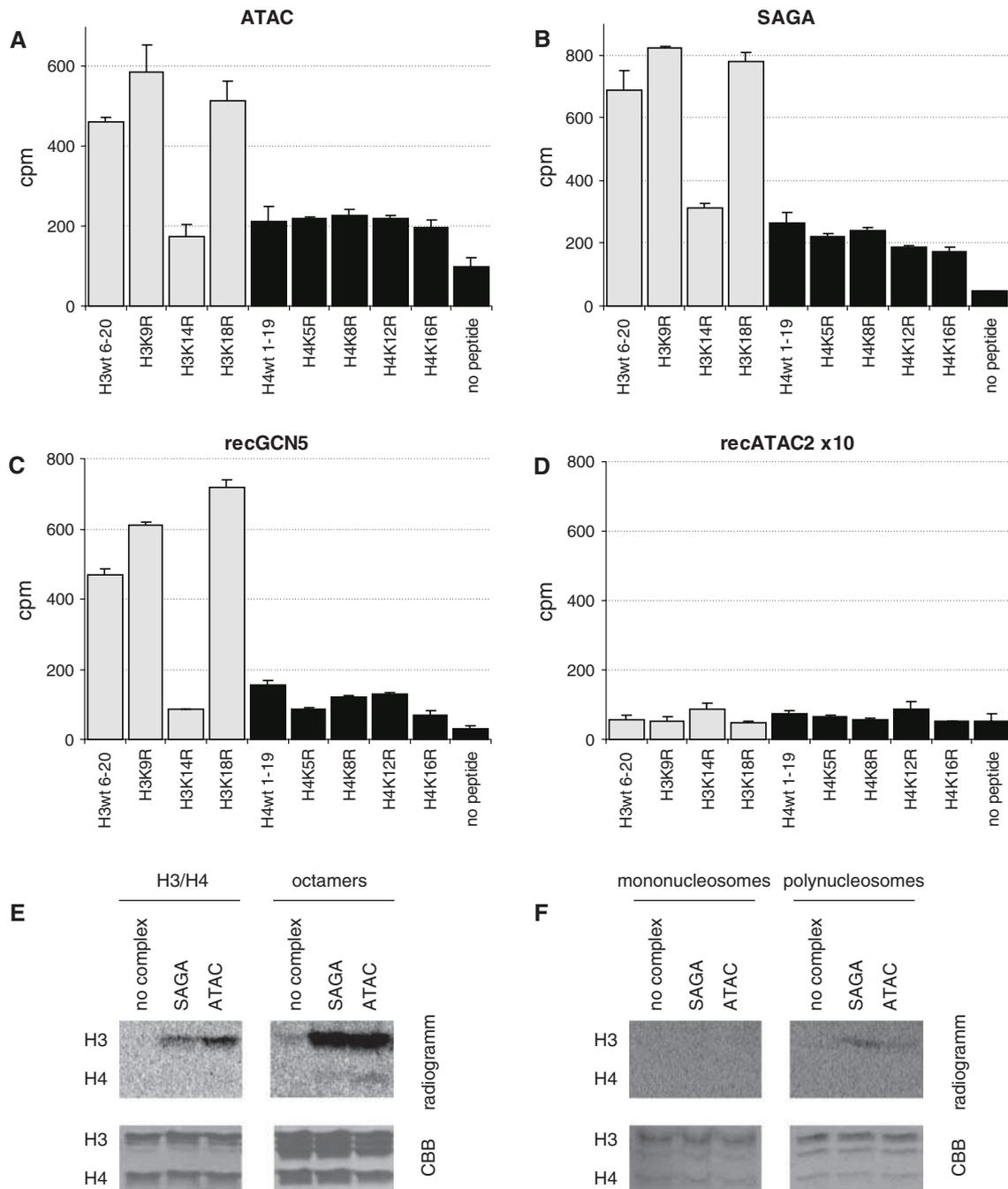


Fig. 2 Histone acetyltransferase activity of the human GCN5 containing complexes and their HAT subunits. **a–d** Acetylation activity of endogenous purified hATAC (**a**), hSAGA (**b**), recombinant (rec) GCN5 (**c**), and recombinant ATAC2 (**d**) on histone tail peptides was measured by liquid scintigraphy. Histone H3 peptides are shown in gray, histone H4 peptides and the reaction without peptide are in black. Note that, due to the described weak HAT activity of

recombinant hATAC2 [15], in (**d**), ten times more recombinant protein was used than in the reactions shown in (**c**). **e** Acetylation activity of endogenous complexes on H3–H4 dimers and histone octamers. **f** Acetylation activity of hATAC and hSAGA complexes on mono- and polynucleosomes. In **e** and **f**, upper panels show the autoradiography and lower panels the corresponding coomassie stained histones

(Fig. 3b, compare lanes 5–6 with 7–8). These results clearly demonstrate that vertebrate cells contain both G-ATAC and P-ATAC complexes and that the presence of GCN5 or PCAF in these complexes is mutually exclusive.

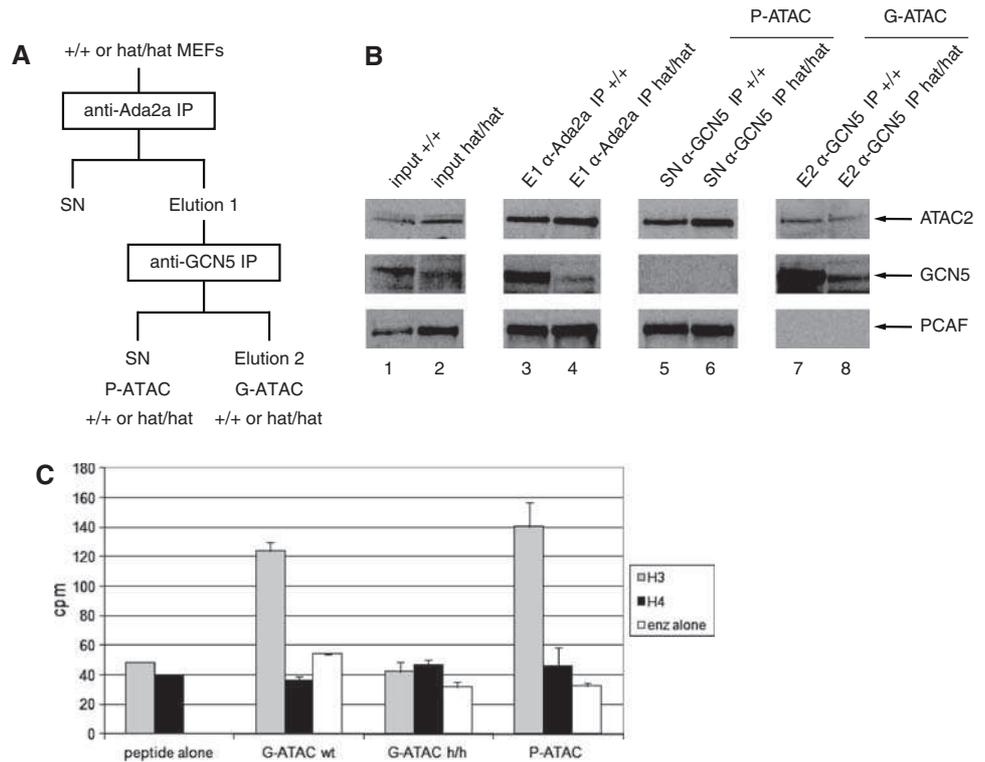
The in vitro HAT activities of the different ATAC complexes

To measure the acetyltransferase activity of ATAC2 in ATAC, we have compared the HAT activities of the above

Fig. 3 Composition of different ATAC complexes from MEFs and their HAT activity on histone tail peptides.

a Purification scheme of the separation of GCN5- (G-ATAC) and PCAF-containing (P-ATAC) ATAC complexes from wild-type (+/+) and mutant (*hat/hat*) MEFs.

b Western blot analysis of the different fractions obtained during the purification shown in (a) using the indicated antibodies. **c** Acetylation of histone H3 and H4 tail peptides using the indicated purified complexes was measured. The amount of the purified complexes was normalized to their ATAC2 content



purified GCN5- or GCN5^{hat}-containing ATAC complexes on histone tail peptides as previously (see Fig. 2). Surprisingly, in this in vitro peptide acetylation test using either the H3 (aa 6–20) or the H4 peptide (aa 1–19), we observed no activity of the G-ATAC^{hat} complex, while wild-type G-ATAC acetylated the H3 peptide as before (Fig. 3c). This result, together with the lack of activity obtained with recATAC2 on histone tails (Fig. 2d), suggests that the mammalian ATAC2 is inactive in vitro in conditions that are appropriate for the GCN5 HAT activity. Moreover, in this in vitro test, the HAT specificity of P-ATAC was similar to that of G-ATAC (Fig. 3c). Thus, our observations suggest that (1) in vertebrates at least two different ATAC complexes exist with very similar composition and in vitro substrate specificity, (2) the mouse or human ATAC2 may have non-histone substrates, and (3) that in vitro no significant differences could be determined between the HAT activities of SAGA and ATAC.

ATAC- or SAGA-specific knock-downs lead to a drop in global histone H3 acetylation on K9 and K14, but do not affect histone H4 acetylation levels

To further analyze the differences between the two human GCN5-containing complexes in vivo, we tested how the global level of post translational modifications of histones are affected in cells where either an ATAC-specific or a SAGA-specific subunit was knocked down by using

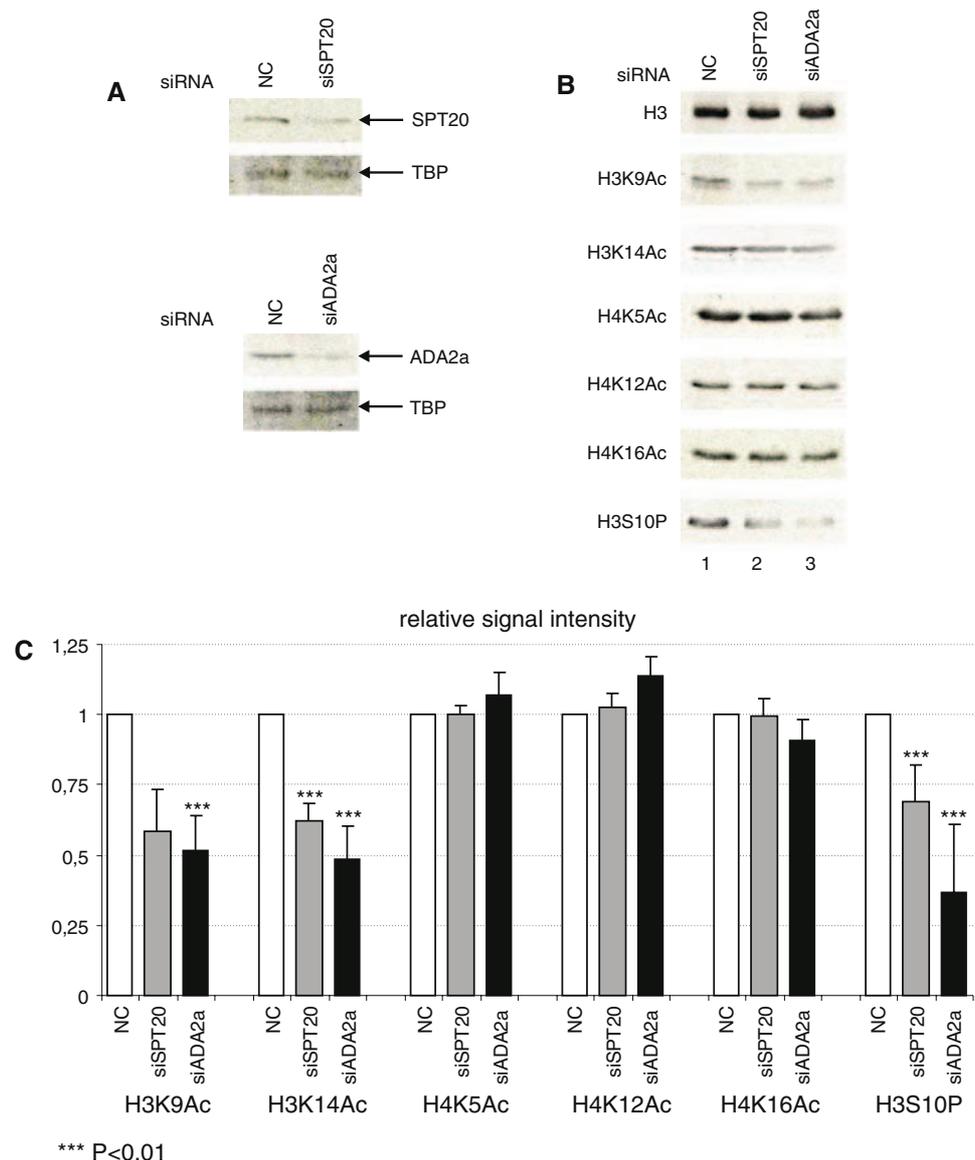
siRNAs. HeLa cells were transfected with control non-targeting siRNA (NC), anti-SPT20 siRNA (SAGA-specific) or anti-ADA2a (ATAC-specific) siRNA (Fig. 4a). At 48 h post-transfection, cell extracts were prepared and analysed by western blotting. The knock-down of SPT20 or ADA2a was efficient since we obtained a clear reduction in the respective protein levels (Fig. 4a). Next, the amount of histone content in each extract was normalized using an antibody recognizing the core domain of histone H3 (Fig. 4b upper panel). Surprisingly, compared to the control, only the H3K9Ac and the H3K14Ac marks were reduced and this reduction was of similar extent in both siADA2a and siSPT20 treated cells (Fig. 4b, c). On the other hand, the acetylation marks located on histone H4, such as K5Ac, K12Ac, and K16Ac, were unaffected in our siRNA-transfected cells. These experiments show that, similarly to the in vitro experiments, on global histone acetylation levels no significant differences could be determined between the HAT activities of SAGA and ATAC. Also, in HeLa cells, the knock-down of ATAC- and SAGA-specific subunits do not influence globally the histone H4 acetylation.

ATAC-specific knock-down leads to a drop in global histone H3 phosphorylation on serine 10

As the *Drosophila* ATAC complex was shown to influence histone H3S10 phosphorylation [45], we have also tested whether ATAC- or SAGA specific knock-downs affect

Fig. 4 Global changes of post translational histone modifications in cells deficient for ATAC or SAGA.

a Transfection of non-targeting control siRNA (NC) or siRNAs directed against SPT20 or ADA2a leads to the specific knock-down of the targeted subunit as compared in western blot. TBP served as a loading control. **b** Changes in the histone acetylation and phosphorylation marks in siRNA-transfected cells. The global levels of the given modifications were analyzed by western blot. Blotting with an antibody recognizing the core domain of histone H3 served as a loading control. **c** Histone H3 post-translational modifications are perturbed in siRNA-transfected HeLa cells. Quantification of signal intensities of four independent knock-down experiments shows global changes in H3 modifications, while H4 acetylation remains unaffected. The H3S10P signal is strikingly low in siADA2a-transfected cells



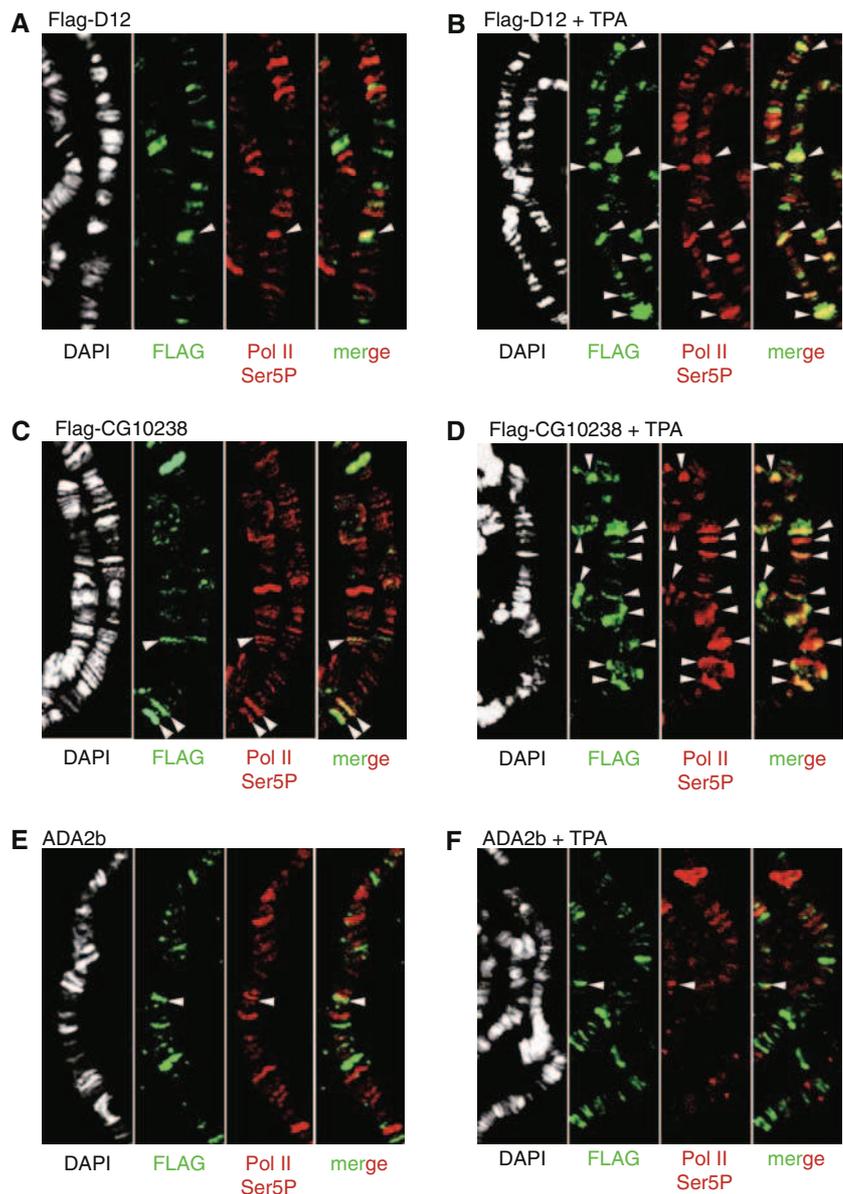
H3S10 phosphorylation in human cells. Interestingly, we found that in HeLa cells with decreased ADA2a levels the H3S10 phosphorylation mark was reduced to 36% of the control, while the effect of SAGA knock-down was much milder (70%) (Fig. 4b, c). Importantly, this result defines an evolutionarily conserved cross-talk linking ATAC HAT function to H3S10 phosphorylation.

dATAC and dSAGA regulate different inducible genes in *Drosophila* salivary glands in vivo

To explore the in vivo functional differences between ATAC and SAGA complexes, first we examined the localization of the complexes in salivary glands on polytene chromosomes of *Drosophila*. To be able to visualize the recruitment of dATAC specific subunits and compare

the function of dATAC to dSAGA, transgenic flies were generated in which two dATAC-specific subunits, D12 (homologue of hYEATS2) and CG10238 (homologue of hMBIP, see Table 1), were Flag tagged. The localization of ADA2b, a SAGA specific subunit, was followed by an anti-dADA2b antibody labeling. For detecting the polymerase, we used an antibody raised against the serine 5 phosphorylation of the CTD of the large subunit of Pol II (Pol II Ser5P), which is a marker for Pol II incorporating in a functional preinitiation complex (PIC). Interestingly, under non-stimulated conditions, all the bands stained by antibodies against Flag-D12, Flag-CG10238, or ADA2b localized to euchromatic segments giving weak DAPI signal (Fig. 5a, c, e). Although ATAC and SAGA were suggested to function in histone modification and transcriptional regulation, our in vivo results in these non-

Fig. 5 dATAC, but not dSAGA, is recruited to TPA-induced transcription sites on *Drosophila* polytene chromosomes. Polytene chromosome co-staining of non-treated (**a, c, e**) and TPA treated (**b, d, f**) samples is shown. The DAPI staining (*white*), the anti-flag (**a–d**) or the anti-ADA2b staining (**e, f**) (*green*), and the anti-RNA Pol II Ser5P staining (*red*) is shown in each *panel* together with the merged picture. A dramatic increase in RNA Pol II and flag-D12 (homologue of hYEATS2) or flag-CG10238 (homologue of hMBIP) colocalization occurs after TPA treatment (compare **a** to **b** and **c** to **d**) marked with *arrowheads*. In contrast, no increase in the colocalization was detected for ADA2b and RNA Pol II (compare **e** to **f**)



stimulated conditions showed only rare colocalization of dATAC or dSAGA with RNA Pol II. To establish the role of ATAC in transcription activation, we induced genes by a TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)-treatment and tested the recruitment of the dATAC complex to the transcriptionally active loci. Following the TPA-treatment, we observed an increased recruitment of dATAC (visualized by D12 and CG10238) to Pol II positive chromosome regions (see white arrows in Fig. 5b, d). In striking contrast to dATAC subunits, the dSAGA-specific subunit ADA2b showed no recruitment to the active bands following TPA induction (see Fig. 5f). These in vivo results suggest for the first time that SAGA and ATAC regulate different set of genes depending on the cellular stress received.

hATAC is recruited to the promoter of immediate early genes in human cells

The above-described in vivo results obtained on *Drosophila* salivary gland polytene chromosomes hinted at regulatory mechanisms in which the function of SAGA and ATAC do not overlap. In addition, our recent results showed that human SAGA is not involved in the transcription activation of immediate early (IE) genes [13]. Thus, we tested whether hATAC would participate in the regulation of IE genes following stimulation. To this end, we analyzed the recruitment of the hATAC complex to IE gene promoters after TPA treatment by chromatin immunoprecipitation (ChIP) in HeLa cells. First, we examined the mRNA level

of three IE genes (*c-FOS*, *FRA-1*, and *EGR-1*) after 1 h of TPA treatment. As a result, we obtained a 3- to 20-fold stimulation of these mRNA species compared to the control, while the expression of GAPDH mRNA remained unchanged (Fig. 6a). We also carried out a control DMSO treatment, where we obtained no significant effect on the expression of IE genes (not shown). Then, we prepared chromatin from both non-treated and TPA-induced cells and carried out ChIPs by using antibodies raised against RNA Pol II, hATAC subunits (hADA3, hZZZ3), and a hSAGA-specific subunit (hSPT20). The results showed that, together with RNA Pol II, subunits of the hATAC complex (hZZZ3 and hADA3) got recruited to the three IE promoters after TPA treatment in human cells (Fig. 6b–d). At the same time, no increase in the occupation of these loci was observed for hSPT20, which is a hSAGA specific subunit (Fig. 6e). The amount of the IPed control region (a genomic region not harboring any Pol II transcription unit) remained unchanged following the TPA treatment (Fig. 6b–e) and was close to levels obtained with negative control anti-GST ChIP (not shown). Note that TPA did not induce the expression of the tested ATAC or SAGA subunits in the cells (ESM Fig. 4). These results together with those obtained with *Drosophila* salivary gland stainings show that ATAC, but not SAGA, is recruited to TPA-induced gene promoters. Thus, our observations indicate for the first time a differential recruitment of the two HAT complexes, ATAC and SAGA, to stress-regulated genes in mammalian cells.

Knock-down of ATAC subunits leads to defects in the TPA-induced gene expression

Next, we analyzed whether the knock-down of ATAC subunits influences the regulation of the above tested TPA-regulated genes. After transfection of HeLa cells with siRNA against hZZZ3 or hATAC2, we observed a ~50% decrease in the corresponding mRNA levels (Fig. 7a) and a ~75% decrease in the protein levels of these two ATAC subunits, respectively (Fig. 7b), when compared to the control siRNA-transfected cells. To analyze the effect of the knock-down of a SAGA specific subunit, we carried out anti-SPT20 RNAi experiments in parallel. Following TPA-treatment in ZZZ3- or ATAC2-siRNA-transfected cells, the transcriptional activation of the tested IE genes was significantly reduced to ~50% of the negative control situation (Fig. 7c–e). At the same time, knock-down of SPT20 had no significant effect on the up-regulation of IE genes. This is in good agreement with our previous observations showing that SAGA is not required for IE gene induction [13]. The siRNA transfections had no effect on the GAPDH mRNA level (Fig. 7f). Altogether, these results confirm that ATAC, but not SAGA, is recruited to

the promoters and is required for the induction of the studied TPA-induced genes.

ATAC is indispensable for the correct histone H3 acetylation status of IE gene promoters both under non-induced and activated conditions

As the above results indicated that the knock-down of ATAC subunits leads to defects in the induction of IE gene expression and that the global levels of both H3K9Ac and H3K14Ac were decreased in cells deficient for either their SAGA or ATAC function (Figs. 4 and 7), we tested whether the knock-down of ATAC- and SAGA-specific subunit(s) influences the acetylation at specific gene loci. Thus, we carried ChIP experiments to test the H3 acetylation at positions K9 and K14 on histone H3 at the promoters of IE genes that we found to be regulated only by ATAC (see Figs. 6 and 7). HeLa cells were transfected either with non-targeting siRNA (NC), or siRNA against ADA2a or SPT20. At 48 h after transfection, the cells were serum starved overnight and then half of them treated with TPA for an hour as above. Chromatin was prepared and subjected to two different IPs. The anti-H3 core IP served as a control, while the IP using the anti-H3K9/K14Ac antibody highlighted the changes of this active chromatin mark at the tested genomic regions. All values obtained were normalized with those obtained at a non-coding region, where no transcriptional regulation takes place, thus the level of the histone marks remains unchanged. No significant changes were obtained in H3 levels at the tested IE gene promoters following TPA treatment (Fig. 8a). As expected, in the control siRNA-treated cells, the histone H3 acetylation level increased considerably (3- to 6-fold) at all the three IE promoters tested (see NC in Fig. 8b). Similarly, an increase in H3K9 and K14 acetylation was also observed in siSPT20-transfected cells; however, the increase was less pronounced (2-fold; Fig. 8b). Surprisingly, in siADA2a-transfected cells, the H3K9 and K14 acetylation pattern was completely deregulated before activation. In the non-treated cells, the H3K9 and H3K14 positions became highly acetylated at the promoters of these three, normally silent, genes. The fact that the presence of the positive H3K9/K14Ac histone mark at the promoter of IE genes does not correlate with the transcriptional status of the genes (Fig. 8, see also Figs. 6a and 7c–e) suggests that the H3K9 and H3K14 acetylation marks alone are not sufficient for recruiting the Pol II transcription machinery (see also Discussion). Additionally, in the siADA2a-transfected cells, following TPA induction, the H3K9/K14 acetylation dropped at the three tested promoters, when compared to the non-treated cells (Fig. 8b). This deregulated acetylation balance at the IE promoters may thus be responsible for the impaired

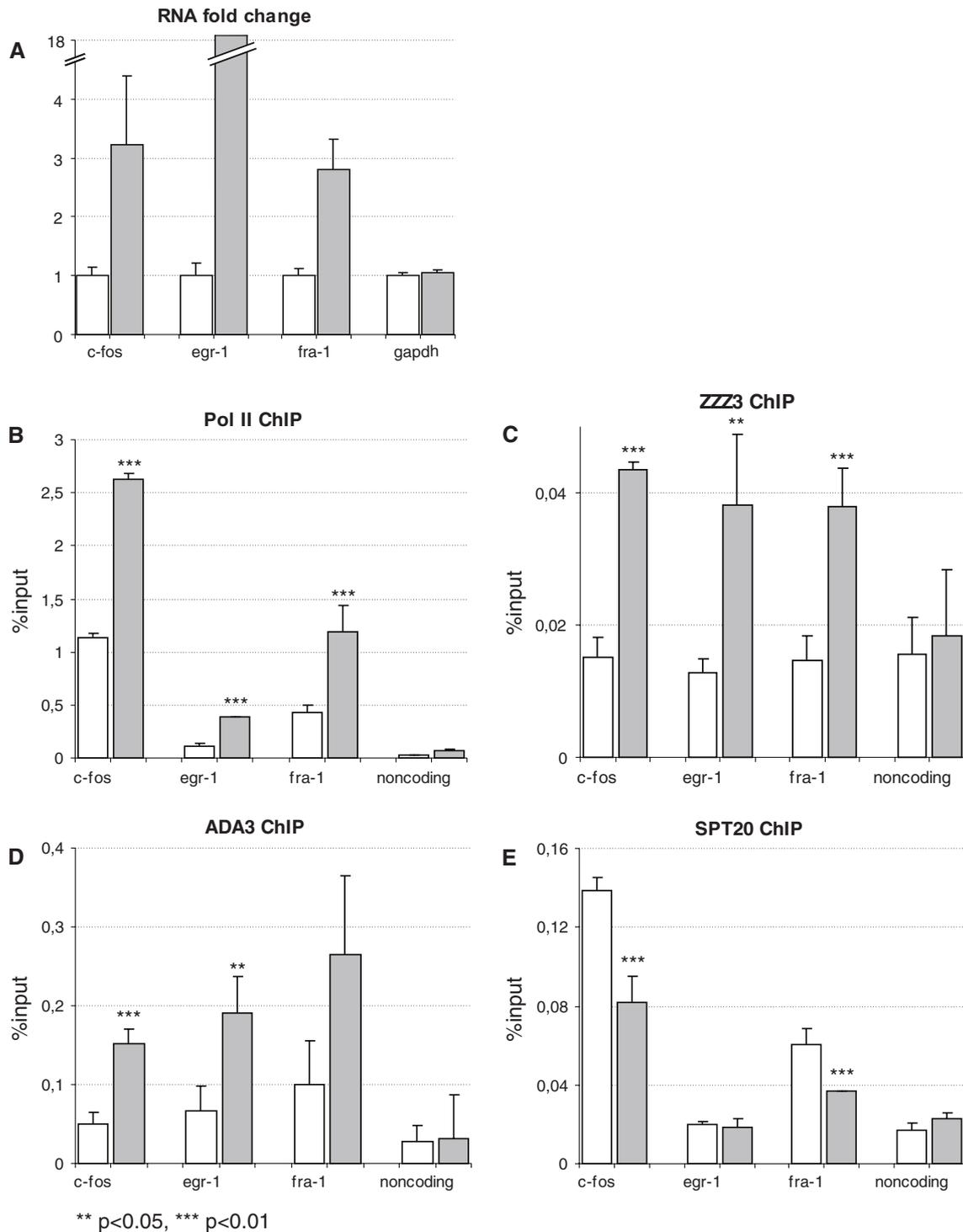


Fig. 6 hATAC subunits get recruited, together with RNA Pol II, to the promoter of immediate early genes after TPA treatment. **a** Expression level of IE genes *c-FOS*, *EGR-1* and *FRA-1*. Fold change of mRNA levels normalized by *cyclophilinB* are shown on the graph after 1 h of TPA treatment. *White bars* represent the nontreated sample, *gray bars* show the results obtained after TPA treatment. **b–e** ChIP results obtained with antibodies against RNA Pol II (**b**), ZZZ3

(**c**), ADA3 (**d**), and SPT20 (**e**) are shown on three IE gene promoters and the control non-coding region. Non-treated values (% input) are represented as *white bars*, the treated samples are shown by *gray bars*. Similar results were obtained in two biological replicates. Results obtained in a representative experiment are shown with SD values calculated from qPCR triplicates for each time point

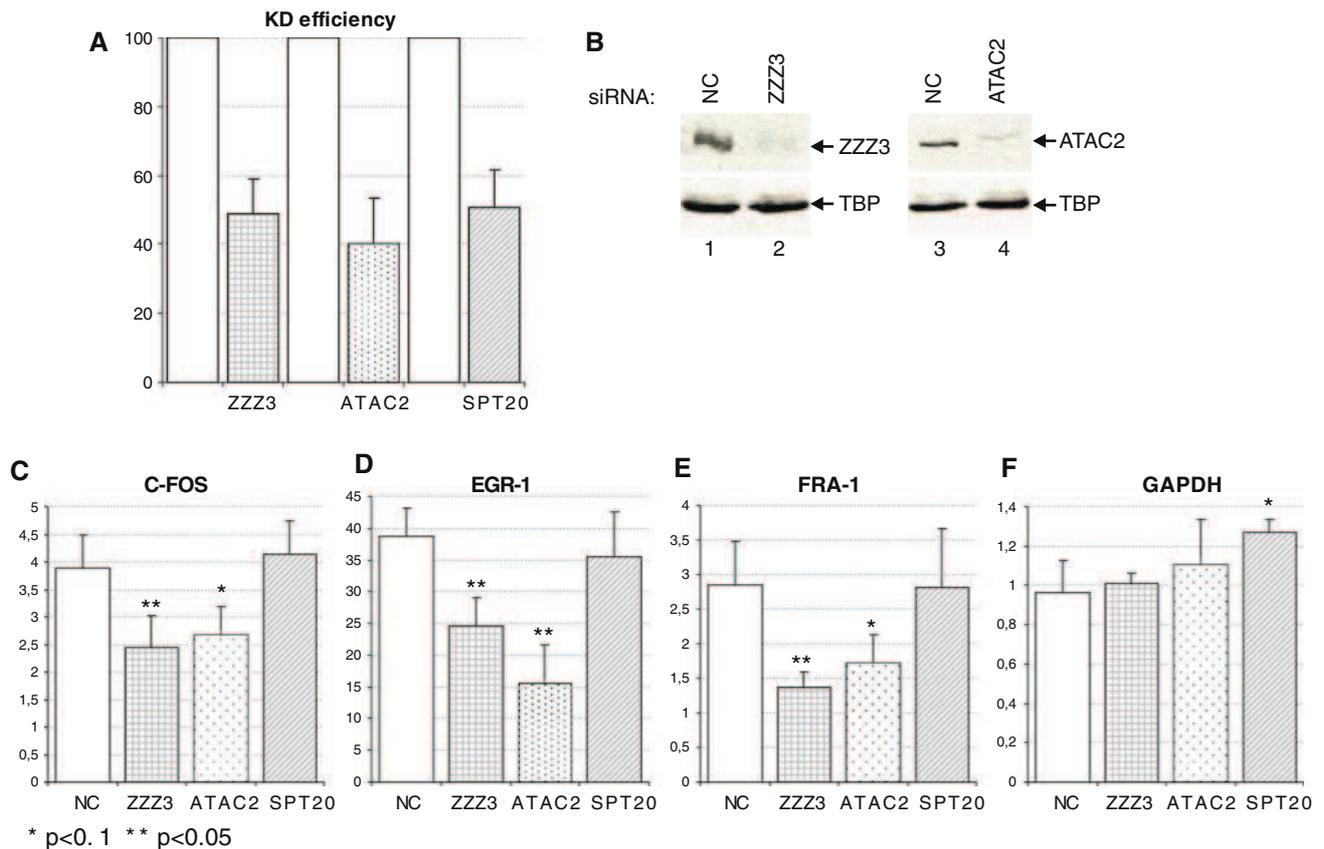


Fig. 7 hATAC but not hSAGA is indispensable for correct up regulation of IE genes after TPA treatment. **a** Knock-down efficiency of the three siRNAs (against ZZZ3, ATAC2 and SPT20) was analyzed by RT qPCR. The amount of residual mRNA is shown (bars with different patterns) compared to the negative control (NC) siRNA-transfected cells (white bars). **b** Knock-down efficiency of the siZZZ3 (lane 2) and siATAC2 (lane 4) was analyzed by western blotting and compared to negative control (NC) siRNA-transfected

cells (lanes 1, 3). As a loading control, the same blot was developed with an anti-TBP antibody. **c–f**. Induction of IE gene expression after TPA treatment in cells transfected with different siRNAs (indicated on the bottom of the graphs). Results of IE genes or GAPDH mRNA quantification are shown as fold change over the non-treated samples and represent three independent experiments. The different patterns of the bars refer to **a**

activation of the IE genes in ATAC knock-down cells (see Fig. 7c–e). In all, our observations suggest that ATAC is indispensable for the transcriptional regulation of IE genes both in non-induced and in activated situation, while SAGA is not required.

Discussion

Metazoan ATAC complexes are conserved through evolution

Although GCN5 was the first enzyme identified to link histone modification and regulation of gene expression [46], it was only during recent years that data shed light on the existence of several GCN5-containing complexes in vivo in metazoans. The first indication came from the discovery that in metazoans and in plants the yeast Ada2 protein, an adaptor having effect on the activity of GCN5

activity [36, 47], has two orthologues: ADA2a and ADA2b [31, 48, 49]. These two orthologues in plants and *Drosophila* have distinct biological functions [50, 51]. Both ADA2a and ADA2b are essential in *Drosophila* [51], and the two proteins associate with dGCN5 in the context of two different complexes. While SAGA is a well-studied transcriptional co-activator complex [4, 52], the second complex, ATAC, was long over-looked in the different studies. The first signs of its presence in metazoans emerged during the determination of size of ADA2a- and ADA2b-containing complexes [16, 31]. The genetic analysis of mutant flies also suggested that two different assemblies are at play on the genome and that the substrate specificities of SAGA and ATAC differ in vivo [21, 51]. Further analysis of the dATAC complex established that a second HAT enzyme, dATAC2, is also part of the complex that seems to acetylate histone H4 at position H4K16 during *Drosophila* embryogenesis [17]. This observation, however, contradicts the results obtained on the polytene

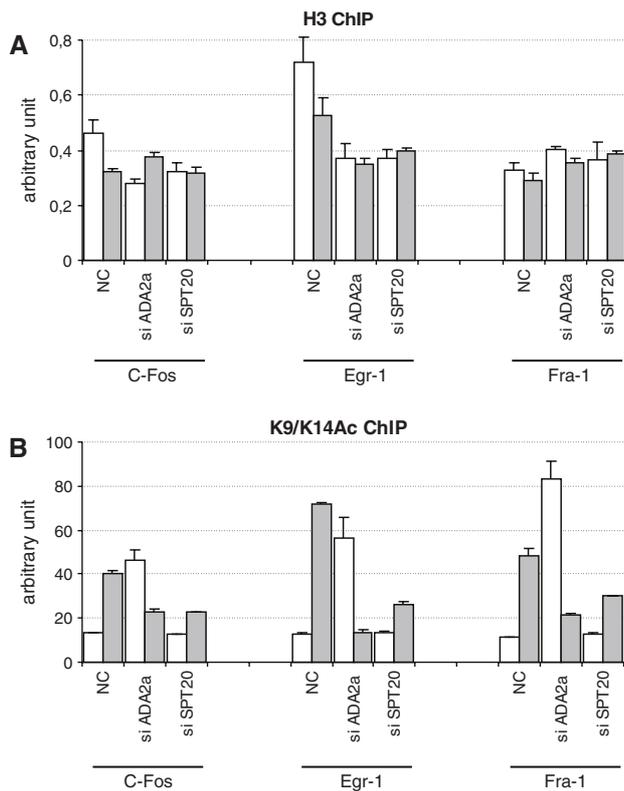


Fig. 8 Histone H3 acetylation is strongly affected in ATAC deficient cells at the promoter of IE genes. **a** ChIP results of siRNA-transfected cells obtained at the promoter of three IE genes (see Fig. 6a for indications) are represented before and after induction with TPA treatment (*white* and *gray bars*, respectively). The chromatin was immunoprecipitated with an antibody recognizing the core domain of H3. Results were normalized with those obtained at a non-transcribed region of the genome. The siRNA used for knocking down specific subunits of ATAC or SAGA is *marked on the axis*. **b** ChIP results obtained with an antibody specifically recognizing the H3K9/K14Ac signal shows perturbation at the promoter of TPA induced genes in siADA2a-transfected cells compared to the control (NC). In siSPT20-transfected cells, the response to stimulation at the acetylation level seems to be only slightly affected. Results are shown with SD values calculated from qPCR triplicates for each time point

chromosomes prepared from ADA2a mutant flies, which show a clear decrease in acetylated H4K5 and H4K12 levels, while the H4K16 hyperacetylation on the male X chromosome is not altered [21, 53]. The different results of the two systems still await a precise analysis and explanation.

Considering the high conservation of the known subunits of both dSAGA and dATAC through evolution (reviewed in [4, 54]), the identification of an ATAC-like complex in vertebrates was expected. Early publications provided evidence for the interaction between hADA2a and hGCN5 or its mammalian-specific homologue PCAF [14, 55], but results clearly showing that both ATAC and SAGA exist in human cells were lacking until the last year [15, 18]. Our present study validates the results obtained by

overexpressing one of the ATAC subunits and using it for consequent immunopurification [15, 18]. At the same time, some of the identified components of the hATAC purified by an anti-flag IP seem to be missing in our endogenous system (see Table 1). Wang and colleagues reported the presence of additional proteins in the ATAC purification associating with the Flag-tagged YEATS2 (i.e., UBAP2L, MAP3K7, POLE4, and TBP) [18]. These subunits or their *Drosophila* orthologues have not been identified in our endogenous complex or in the other reported ATAC complexes ([15, 17] and our study) (Table 1). Interestingly, dHCF1 and its human homologue were described to be components of the dATAC- and the Flag-tagged hYEATS2-containing hATAC complexes (Table 1); however, in our endogenous ATAC preparations and in that purified by Guelman and colleagues [15], no hHCF1 was identified either by mass spectrometry or by western blot analysis.

A strikingly high level of conservation exist between the human and *Drosophila* ATAC complexes in composition (see Table 1), though some differences remain. So far no human homologue of dATAC4 (GABP β 2) has been found in human ATAC preparations. Moreover, the *Drosophila* and the human ATAC complexes seem to vary both in their substrate specificity and their overall size. While the dATAC complex is clearly smaller than dSAGA [17, 31, 48], analysis of the endogenous or the Flag-purified human ATAC highlights a surprisingly large and variable size of the human complexes (from 2 MDa to about 600 kDa) ([15], and our unpublished results). These observations predict the future identification of new subunits that might be human specific, as the sum of the masses of the already identified subunits is only about 800 kDa. Alternatively, hATAC complexes may have heterogeneous stoichiometry of certain subunits or simply heterogeneous shapes possibly due to binding of ATAC to nucleic acids or to other substrates. In contrast, the human SAGA complex seems to have a well-conserved size (of about 2 MDa) and structure.

Our results together with those published recently [15, 18] point to a difference between the human and the *Drosophila* ATAC complexes. While in the case of the fly ATAC complex a strong histone H4 specific activity was documented, in the case of hATAC this activity is hardly detectable in vitro and in vivo. The in vitro observed differences between the substrate specificity of the *Drosophila* and the human ATAC complexes could be explained by eventual non-optimal conditions used in the reactions; however, the in vivo differences are more difficult to reconcile. In this respect, it is worth noting that, while the *Drosophila* ATAC2 enzyme was shown to acetylate H4K16 [17], its human homologue shows no measurable activity on histone tail peptides as substrates in vitro, neither when isolated nor in the context of the ATAC complex (see Figs. 2d and 3c). This discrepancy may be explained

by the fact that the *Drosophila* ATAC2 protein contains a canonical PHD domain on its N-terminal end, while the vertebrate ATAC2 proteins lack key residues in this domain and contain only a putative Zn finger (ESM, Fig. 5). Thus, it is possible that, while dATAC2 is able to bind to histone tails via its PHD domain, as described for the PHD domain of TAF3 [56, 57], the vertebrate proteins are unable to do so. Consequently, the human ATAC complex may bind to other histone marks than the *Drosophila* complex, for example, via Tudor, WD40, or SANT domains present in its different subunits, and thus could acetylate different histone tail residues than the *Drosophila* complex. At the same time mice lacking ATAC2 die early in development and possess decreased global histone acetylation levels. However, since mATAC2 seems also to be essential for the integrity of the mammalian ATAC complex [15], future experiments should decide whether the drop in histone acetylation levels in *Atac2* knock-out mice is due to the lack of ATAC2 as a HAT enzyme per se, or rather to the lower level of the entire ATAC complex. The mouse ATAC2 ablation in *Atac2* knock-down or knock-out systems leads to a decrease in global H3K9, H4K5, H4K12 and H4K16 acetylation levels [15]. The decrease of H3K9Ac is in agreement with our results obtained following ADA2a knock-down in human cells; however, we did not detect any change in the different histone H4 acetylations. Thus, understanding the exact biological function, the precise acetyltransferase specificity of the mammalian ATAC complexes (G-ATAC and P-ATAC), and the role of the second potential acetyltransferase, ATAC2, in these complexes still awaits further analysis.

ATAC and SAGA regulate different set of stress inducible target genes

Yeast SAGA was suggested to play a role in stress-regulated genes [58] and act as a locus-specific coactivator complex that binds close to the nucleosome-free region formed upstream of the +1 nucleosomes on expressed genes in the yeast genome [59]. Similarly, *Drosophila* SAGA subunits (TRRAP and GCN5) were detected at the inducible *hsp70* gene promoters following heat shock [60]. Human SAGA was shown to play a direct role in the up-regulation of p53-dependent genes following UV-C irradiation [36] and also in the regulation of endoplasmic reticulum stress-induced genes [13]. In contrast, hSAGA did not seem to be involved in the regulation of IE genes induced by Na-arsenite stress [13], suggesting that hSAGA is not required as a promoter-specific coactivator at every stress-regulated gene promoter.

A stimulation-specific coactivator role of ATAC can be drawn from our new results, which seems to be conserved

between *Drosophila* and human. ATAC gets recruited to TPA-induced transcription puffs on the polytene chromosomes of *Drosophila*, while these sites are deprived from dSAGA as no ADA2b, a SAGA specific subunit, was detected at the TPA-induced puffs. The same scenario stands for human cells, where hATAC subunits accumulate at the promoter of activated IE genes together with RNA Pol II after TPA induction. In agreement, the induction of the tested human IE genes was seriously compromised when cells harbored decreased level of different ATAC subunits (Fig. 7). Also, when a core ATAC subunit was knocked down by siRNA, the H3K9 and K14 acetylation marks decreased at the promoters following TPA stimulation (Fig. 8). Surprisingly, under “non-activated” conditions, the same acetylation marks were about 3- to 7-fold higher at the tested promoters than in the control cells. This increased basal histone H3 acetylation level might be the indirect result of the perturbation we observed in the global H3S10P mark (Fig. 4). It is possible that the decreased H3S10 phosphorylation makes the chromatin at the IE promoters more permissive for the recruitment of another HAT complex than ATAC, which normally would not act at these sites in the cell. Thus, our results shed light on a dual function of ATAC at the IE gene promoters. On one hand, ATAC is indispensable for the induced transcription of these genes after stress. On the other hand, the complex is also required, probably indirectly, for the maintenance of the low level of H3K9/K14Ac marks at the same promoters in basal conditions.

Our results show that, in contrast to ATAC, TPA-inducible promoters lack hSAGA, providing evidence for the different recruitment pattern of the two complexes on the genome. In good agreement with this differential coactivator recruitment model, the group of R. Roeder has shown that to UV-stress-regulated gene promoters are occupied only by SAGA, but not ATAC [36]. These observations together demonstrate that two distinct types of GCN5- (or PCAF)-containing HAT complexes with potentially different coactivator activities exist in the cells to regulate different subset of induced genes.

One distinction between IE genes and other inducible genes is that the histones at IE genes get both acetylated and phosphorylated upon induction [61]. In this respect, it is worth noting that dATAC was shown to play a role in histone H3S10 phosphorylation [45]. In ADA2a mutant flies, decreased histone acetylation led to consequent decrease in H3S10 phosphorylation by the JIL kinase [45]. Our novel observations show that the mammalian ATAC complex is also required for global H3S10 phosphorylation establishing a conserved link between ATAC function and H3S10 phosphorylation during evolution. Human cells with knock-down levels of ADA2a (hATAC subunit) also possess a strongly decreased global H3S10P level. Thus,

ATAC is acting both at global and locus-specific levels on the genome. Our results suggest that in ADA2a knock-down condition the loss of the ATAC HAT complex results in unbalanced H3 tail acetylation at the IE gene promoters, that in combination with the global decrease of the H3S10 phosphorylation makes the activation of immediate early genes deficient. Thus, our data demonstrate that ATAC plays a crucial role in the transcriptional regulation of IE genes.

During evolution, the complexity increased not only at the level of gene number and genome size but also at regulatory circuits. Our present understanding on the composition and functioning of GCN5-containing HAT complexes is a nice example for this increase. In the unicellular organism *Saccharomyces cerevisiae*, Gcn5 is the component of two complexes (ySAGA and yADA) of which the catalytic core remains exactly the same, formed by the Ada2-Ada3-Gcn5 triad [62]. In *Drosophila*, we find two genes encoding ADA2 paralogues, *ADA2a* and *ADA2b*, and, as a consequence, two different complexes, dATAC and dSAGA, have evolved [17, 21, 31]. Furthermore, in dATAC, a second potential acetyltransferase enzyme was identified that brings another activity to the complex [17]. The complexity reaches its maximum in mammalian cells, where on the top of the two ADA2 proteins, two GCN5 homologues are also present (GCN5 and PCAF). Our data suggest, together with that of Gamper and colleagues [36], that both GCN5 and PCAF form SAGA- and ATAC-type complexes and that even all the four possibilities may coexist in one cell (this study, and not shown). At the same time, our results also provide evidence that the functional differences of these complexes materialize mainly in vivo. The numerous subunits surrounding the enzymes (GCN5 or PCAF) in such complexes can on the one hand affect their activity, as shown for hADA2b in the context of hSAGA [36], while on the other hand, these subunits possibly function as interaction surfaces for different transcription activators playing roles in distinct signaling pathways during development or stress response. In vitro dissection of the interactions within the complexes might provide data that will help understanding the biological role of each subunit. However, further in vivo genetic studies are indispensable for the comprehension of function in the cellular context. In the present study, we identified the components of the endogenous hATAC complex, and we also provide evidence that SAGA and ATAC complexes do not regulate the same subset of inducible genes that could be the starting point for future more detailed genome-wide studies.

Acknowledgments We are grateful to W. Herr, B. Malecova and T. Oelgeschläger for reagents, to R. and J. Conaway for sharing unpublished results, to R. Schneider, K. Kamieniarz, J. Bonnet and

G. Lang for suggestions and help with the HAT assays, to the IGBMC core facilities, and to D. Devys, B. Malecova and T. Pankotai for critically reading the manuscript. Z.N. was supported by a fellowship from the European Community grant (HPRN-CT-00504228) and by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). A.R. and A.K. were supported by fellowships of the Alsace Region. This work was supported by funds from CNRS, INSERM, Université de Strasbourg, the FRM, and European Community (HPRN-CT-00504228, STREP LSHG-CT-2004-502950 and EUTRACC LSHG-CT-2007-037445) and INCA (2008-UBICAN) grants.

References

1. Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705
2. Hayes JJ, Hansen JC (2001) Nucleosomes and the chromatin fiber. *Curr Opin Genet Dev* 11:124–129
3. Li B, Carey M, Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* 128:707–719
4. Nagy Z, Tora L (2007) Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* 26:5341–5357
5. Shahbazian MD, Grunstein M (2007) Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76:75–100
6. Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolsheimer E, Zeitlinger J, Lewitter F, Gifford DK, Young RA (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122:517–527
7. Sobel RE, Cook RG, Perry CA, Annunziato AT, Allis CD (1995) Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1237–1241
8. Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL (2006) Histone H4–K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311:844–847
9. Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Cote J (2003) The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* 19:321–329
10. Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70:81–120
11. Sterner DE, Berger SL (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:435–459
12. Yang XJ (2004) The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res* 32:959–976
13. Nagy Z, Riss A, Romier C, le Guezennec X, Dongre AR, Orpinell M, Han J, Stunnenberg H, Tora L (2009) The human SPT20-containing SAGA complex plays a direct role in the regulation of endoplasmic reticulum stress-induced genes. *Mol Cell Biol* 29:1649–1660
14. Ogryzko VV, Kotani T, Zhang X, Schiltz RL, Howard T, Yang XJ, Howard BH, Qin J, Nakatani Y (1998) Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* 94:35–44
15. Guelman S, Kozuka K, Mao Y, Pham V, Solloway MJ, Wang J, Wu J, Lill JR, Zha J (2009) The double-histone-acetyltransferase complex ATAC is essential for mammalian development. *Mol Cell Biol* 29:1176–1188
16. Guelman S, Sugauma T, Florens L, Swanson SK, Kiesecker CL, Kusch T, Anderson S, Yates JR 3rd, Washburn MP, Abmayr SM, Workman JL (2006) Host cell factor and an uncharacterized SANT domain protein are stable components of ATAC, a novel

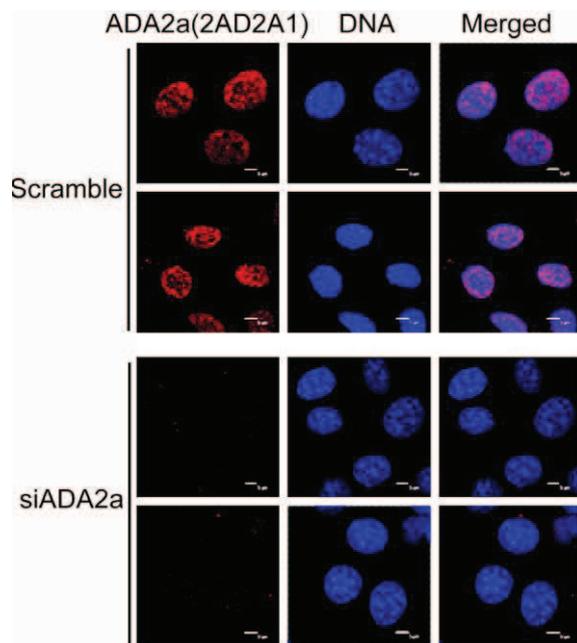
- dAda2A/dGcn5-containing histone acetyltransferase complex in *Drosophila*. *Mol Cell Biol* 26:871–882
17. Suganuma T, Gutierrez JL, Li B, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, Abmayr SM, Workman JL (2008) ATAC is a double histone acetyltransferase complex that stimulates nucleosome sliding. *Nat Struct Mol Biol* 15:364–372
 18. Wang YL, Faiola F, Xu M, Pan S, Martinez E (2008) Human ATAC Is a GCN5/PCAF-containing acetylase complex with a novel NC2-like histone fold module that interacts with the TATA-binding protein. *J Biol Chem* 283:33808–33815
 19. Brand M, Yamamoto K, Staub A, Tora L (1999) Identification of TATA-binding protein-free TAFII-containing complex subunits suggests a role in nucleosome acetylation and signal transduction. *J Biol Chem* 274:18285–18289
 20. Grant PA, Eberharter A, John S, Cook RG, Turner BM, Workman JL (1999) Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem* 274:5895–5900
 21. Ciurciu A, Komonyi O, Pankotai T, Boros IM (2006) The *Drosophila* histone acetyltransferase Gcn5 and transcriptional adaptor Ada2a are involved in nucleosomal histone H4 acetylation. *Mol Cell Biol* 26:9413–9423
 22. Brand M, Moggis JG, Oulad-Abdelghani M, Lejeune F, Dilworth FJ, Stevenin J, Almouzni G, Tora L (2001) UV-damaged DNA-binding protein in the TFIIIC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation. *EMBO J* 20:3187–3196
 23. Wieczorek E, Brand M, Jacq X, Tora L (1998) Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 393:187–191
 24. Helmlinger D, Hardy S, Sasorith S, Klein F, Robert F, Weber C, Miguet L, Potier N, Van-Dorselaer A, Wurtz JM, Mandel JL, Tora L, Devys D (2004) Ataxin-7 is a subunit of GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Hum Mol Genet* 13:1257–1265
 25. Brou C, Chaudhary S, Davidson I, Lutz Y, Wu J, Egly JM, Tora L, Chambon P (1993) Distinct TFIID complexes mediate the effect of different transcriptional activators. *EMBO J* 12:489–499
 26. Zhao Y, Lang G, Ito S, Bonnet J, Metzger E, Sawatsubashi S, Suzuki E, Le Guezennec X, Stunnenberg HG, Krasnov A, Georgieva SG, Schule R, Takeyama K, Kato S, Tora L, Devys D (2008) A TFIIIC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol Cell* 29:92–101
 27. Zohn IE, Li Y, Skolnik EY, Anderson KV, Han J, Niswander L (2006) p38 and a p38-interacting protein are critical for down-regulation of E-cadherin during mouse gastrulation. *Cell* 125:957–969
 28. Wysocka J, Myers MP, Laherty CD, Eisenman RN, Herr W (2003) Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3–K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev* 17:896–911
 29. Julien E, Herr W (2003) Proteolytic processing is necessary to separate and ensure proper cell growth and cytokinesis functions of HCF-1. *EMBO J* 22:2360–2369
 30. Malecova B, Gross P, Boyer-Guittaut M, Yavuz S, Oelgeschlager T (2007) The initiator core promoter element antagonizes repression of TATA-directed transcription by negative cofactor NC2. *J Biol Chem* 282:24767–24776
 31. Muratoglu S, Georgieva S, Papai G, Scheer E, Enunlu I, Komonyi O, Cserpan I, Lebedeva L, Nabirochkina E, Udvardy A, Tora L, Boros I (2003) Two different *Drosophila* ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Mol Cell Biol* 23:306–321
 32. Leurent C, Sanders SL, Demeny MA, Garbett KA, Ruhlmann C, Weil PA, Tora L, Schultz P (2004) Mapping key functional sites within yeast TFIID. *EMBO J* 23:719–727
 33. Demeny MA, Soutoglou E, Nagy Z, Scheer E, Janoshazi A, Richardot M, Argentini M, Kessler P, Tora L (2007) Identification of a small TAF complex and its role in the assembly of TAF-containing complexes. *PLoS ONE* 2:e316
 34. Schnitzler GR (2001) Isolation of histones and nucleosome cores from mammalian cells. *Curr Protoc Mol Biol* Ch 21, Unit 21.5
 35. Kouskouti A, Scheer E, Staub A, Tora L, Talianidis I (2004) Gene-specific modulation of TAF10 function by SET9-mediated methylation. *Mol Cell* 14:175–182
 36. Gamper AM, Roeder RG (2008) Multivalent binding of p53 to the STAGA complex mediates coactivator recruitment after UV damage. *Mol Cell Biol* 28:2517–2527
 37. Fukuyama K, Yoshida M, Yamashita A, Deyama T, Baba M, Suzuki A, Mohri H, Ikezawa Z, Nakajima H, Hirai S, Ohno S (2000) MAPK upstream kinase (MUK)-binding inhibitory protein, a negative regulator of MUK/dual leucine zipper-bearing kinase/leucine zipper protein kinase. *J Biol Chem* 275:21247–21254
 38. Wysocka J, Swigut T, Milne TA, Dou Y, Zhang X, Burlingame AL, Roeder RG, Brivanlou AH, Allis CD (2005) WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121:859–872
 39. Inostroza JA, Mermelstein FH, Ha I, Lane WS, Reinberg D (1992) Dr1, a TATA-binding protein-associated phosphoprotein and inhibitor of class II gene transcription. *Cell* 70:477–489
 40. Meisterernst M, Roeder RG (1991) Family of proteins that interact with TFIID and regulate promoter activity. *Cell* 67:557–567
 41. Thomas MC, Chiang CM (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 41:105–178
 42. Kamada K, Shu F, Chen H, Malik S, Stelzer G, Roeder RG, Meisterernst M, Burley SK (2001) Crystal structure of negative cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex. *Cell* 106:71–81
 43. Bu P, Evrard YA, Lozano G, Dent SY (2007) Loss of Gcn5 acetyltransferase activity leads to neural tube closure defects and exencephaly in mouse embryos. *Mol Cell Biol* 27:3405–3416
 44. Kikuchi H, Takami Y, Nakayama T (2005) GCN5: a supervisor in all-inclusive control of vertebrate cell cycle progression through transcription regulation of various cell cycle-related genes. *Gene* 347:83–97
 45. Ciurciu A, Komonyi O, Boros IM (2008) Loss of ATAC-specific acetylation of histone H4 at Lys12 reduces binding of JIL-1 to chromatin and phosphorylation of histone H3 at Ser10. *J Cell Sci* 121:3366–3372
 46. Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84:843–851
 47. Balasubramanian R, Pray-Grant MG, Selleck W, Grant PA, Tan S (2002) Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. *J Biol Chem* 277:7989–7995
 48. Kusch T, Guelman S, Abmayr SM, Workman JL (2003) Two *Drosophila* Ada2 homologues function in different multiprotein complexes. *Mol Cell Biol* 23:3305–3319
 49. Stockinger EJ, Mao Y, Regier MK, Triezenberg SJ, Thomashow MF (2001) Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in Arabidopsis and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression. *Nucleic Acids Res* 29:1524–1533
 50. Hark AT, Vlachonassios KE, Pavangadkar KA, Rao S, Gordon H, Adamakis ID, Kaldis A, Thomashow MF, Triezenberg SJ (2009) Two Arabidopsis orthologs of the transcriptional coactivator ADA2 have distinct biological functions. *Biochim Biophys Acta* 1789:117–124

51. Pankotai T, Komonyi O, Bodai L, Ujfaludi Z, Muratoglu S, Ciurciu A, Tora L, Szabad J, Boros I (2005) The homologous *Drosophila* transcriptional adaptors ADA2a and ADA2b are both required for normal development but have different functions. *Mol Cell Biol* 25:8215–8227
52. Baker SP, Grant PA (2007) The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene* 26:5329–5340
53. Carre C, Ciurciu A, Komonyi O, Jacquier C, Fagegaltier D, Pidoux J, Tricoire H, Tora L, Boros IM, Antoniewski C (2008) The *Drosophila* NURF remodelling and the ATAC histone acetylase complexes functionally interact and are required for global chromosome organization. *EMBO Rep* 9:187–192
54. Lee KK, Workman JL (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:284–295
55. Forsberg EC, Lam LT, Yang XJ, Nakatani Y, Bresnick EH (1997) Human histone acetyltransferase GCN5 exists in a stable macromolecular complex lacking the adapter ADA2. *Biochemistry* 36:15918–15924
56. van Ingen H, van Schaik FM, Wienk H, Ballering J, Rehmann H, Dechesne AC, Kruijzer JA, Liskamp RM, Timmers HT, Boelens R (2008) Structural insight into the recognition of the H3K4me3 mark by the TFIID subunit TAF3. *Structure* 16:1245–1256
57. Vermeulen M, Mulder KW, Denissov S, Pijnappel WW, van Schaik FM, Varier RA, Baltissen MP, Stunnenberg HG, Mann M, Timmers HT (2007) Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* 131:58–69
58. Huisinga KL, Pugh BF (2004) A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 13:573–585
59. Venters BJ, Pugh BF (2009) A canonical promoter organization of the transcription machinery and its regulators in the *Saccharomyces* genome. *Genome Res* 19:360–371
60. Lebedeva LA, Nabirochkina EN, Kurshakova MM, Robert F, Krasnov AN, Evgen'ev MB, Kadonaga JT, Georgieva SG, Tora L (2005) Occupancy of the *Drosophila* hsp70 promoter by a subset of basal transcription factors diminishes upon transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18087–18092
61. Clayton AL, Mahadevan LC (2003) MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS Lett* 546:51–58
62. Sterner DE, Grant PA, Roberts SM, Duggan LJ, Belotserkovskaya R, Pacella LA, Winston F, Workman JL, Berger SL (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

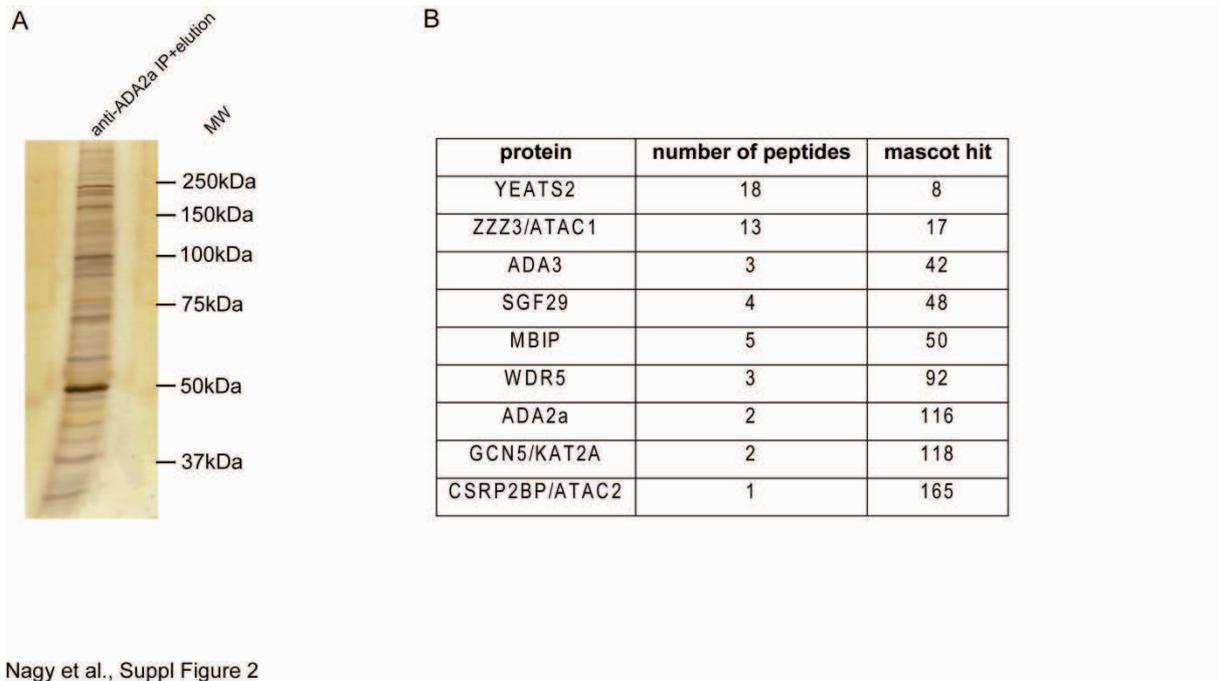
Supplemental Figures

The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different set of inducible target genes

Zita Nagy, Anne Riss, Sally Fujiyama, Arnaud Krebs, Meritxell Orpinell, Pascal Jansen, Adrien Cohen, Henk G. Stunnenberg, Shigeaki Kato and László Tora

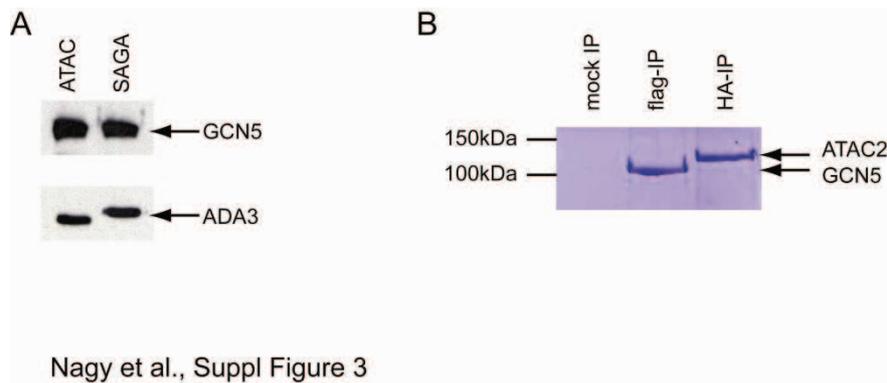


Suppl. Figure 1. Validation of the specificity of the monoclonal anti-ADA2a antibody. HeLa cells were transfected either with a negative control (scramble) siRNA or siRNA against hADA2a (Dharmacon). Immunofluorescence staining shows a specific nuclear staining in the control (scramble) situation that disappeared after transfecting anti-ADA2a siRNA into the cells.

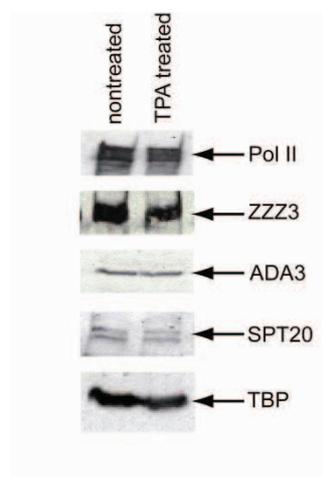


Suppl. Figure 2. Mass spectrometry analysis of the endogenous human ATAC complex.

A. HeLa nuclear extract was precipitated with an anti-ADA2a antibody and eluted from the beads by peptide competition. The resulting purified fraction was separated on SDS gel and stained by silver-nitrate. **B.** The purified sample was analysed by mass spectrometry, the identified ATAC subunits are shown with the corresponding number of peptides. The mass spectrometry was performed using an LTQ-FT mass spectrometer (Thermo Electron, Bremen, Germany).



Suppl. Figure 3. Purification of human ATAC and SAGA complexes and their recombinant HAT subunits. **A.** WB analysis of the immunopurified ATAC and SAGA complexes shows that after normalization they contained equal amounts of the common subunits GCN5 and ADA3. **B.** Coomassie brilliant blue staining of the overexpressed HAT enzymes recGCN5 and recATAC2, purified from SF9 cells.



Suppl. Figure 4. TPA treatment has no effect on the level of proteins used in the ChIP experiment. HeLa cells were treated (or not) with TPA for one hour, washed with PBS and directly boiled in Laemmli buffer. Western blot analysis of the tested proteins shows no significant change in any of the protein levels due to TPA treatment.

Suppl. Figure 5. Multiple alignment of the N-terminal part of ATAC2 proteins from different species. The alignment of approximately the first 200 amino acids of vertebrate and insect ATAC2 protein sequences was done by the ClustalW server (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>). The conserved cysteine and histidine residues from the $Cx_2Cx_{7-21}Cx_2Cx_{3-4}Hx_2Cx_{9-43}Cx_2C$ motif (x being any amino acid) of the PHD domain [1] are marked under the sequences with arrows. Note that out of the eight conserved cysteine and histidine residues (highlighted with grey boxes) in the insect PHD domain only 4 residues are present in the vertebrate sequences, suggesting that these four cysteines might form a Zinc-finger different from the insect PHD domains.

Accession numbers of the proteins aligned are the following: *Bos taurus*: XP_614126.2, *Canis familiaris* XP_534336.1, *Mus musculus*: NP_852082.1, *Macaca mulatta*: XP_001089365.1, *Danio rerio*: NP_001002699.2, *Xenopus tropicalis*: NP_001072678.1, *Homo sapiens*: NP_808779.1, *Drosophila melanogaster*: NP_609889.1, *Drosophila simulans*: XP_002079803.1, *Drosophila yakuba*: XP_002090585.1, *Drosophila erecta*: XP_001974372.1, *Drosophila willistoni*: XP_002066754.1, *Apis mellifera*: XP_394546.3, *Ciona intestinalis*: XP_002121916.1, *Drosophila ananassae*: XP_001961626

[1] Bienz, M. (2006). The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. Trends Biochem Sci 31, 35-40.

D. Résultats non publiés

1. Estimation de la taille du complexe hATAC

Afin d'estimer la taille du complexe hATAC, un extrait nucléaire de cellules HeLa a été déposé sur une colonne de gel filtration (Superose 6) et les différentes fractions obtenues ont été analysées par WB (Figure 26). En plus du signal pour GCN5, ADA3 et SGF29 (les sous-unités communes à ATAC et SAGA), le signal des protéines ZZZ3 et ATAC2 (spécifiques d'ATAC) range le complexe dans une catégorie allant de 400 kDa à 2 MDa. Cette dernière étant assez large, nous avons cherché à préciser l'expérience : deux IP indépendantes contre ADA2a et ZZZ3 ont été réalisées. Les éluats, contenant donc spécifiquement hATAC, ont été déposés sur la colonne et les fractions ont été analysées par WB (Figure 26 B et C). Encore une fois, il n'a pas été possible de définir une taille précise du complexe, celle-ci allant de 670 kDa environ à 2 MDa.

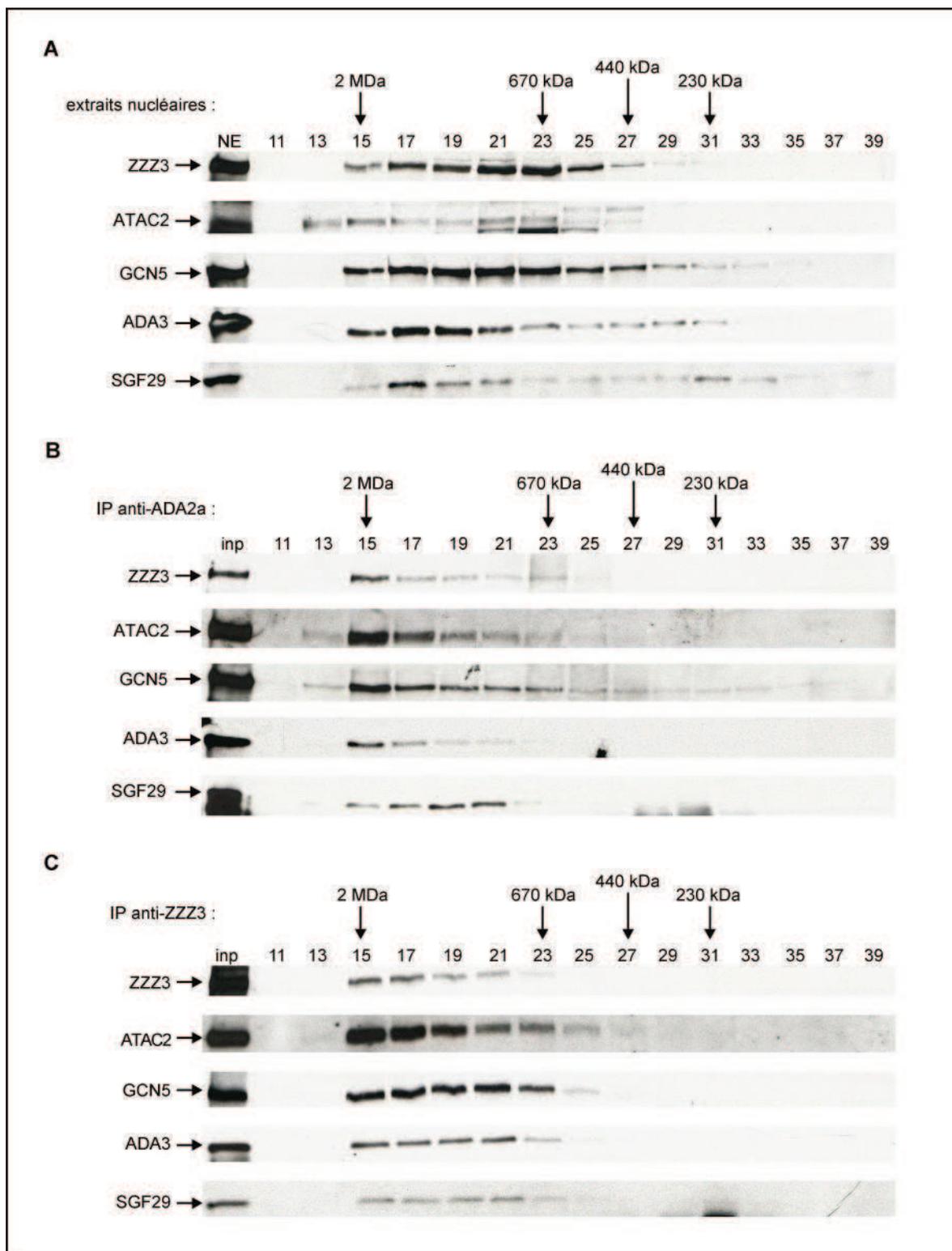


Figure 26 : Estimation de la taille du complexe hATAC par gel filtration.

La taille du complexe hATAC a été estimée en déposant des extraits nucléaires (A : EN) ou des éluats du complexe purifié par IP (B : IP contre ADA2a, C : IP contre ZZZ3) sur une colonne de gel filtration (Superose 6). Les protéines contenues dans les différentes fractions ont été visualisées par WB (fractions 11 à 39). Inp correspond à l'échantillon déposé sur la colonne.

2. hATAC2 ne semble pas présenter d'activité HAT

a. Activité de hATAC2 sur les histones

Dans la publication, nous avons montré que la protéine humaine surexprimée ATAC2, bien que possédant un domaine GNAT, ne présente pas d'activité d'acétylation (Figure 2 D) et ce même avec une forte quantité d'enzyme. Cette expérience ayant été réalisée sur des peptides, les enzymes surexprimées ont été testées cette fois-ci sur des octamères et des polynucléosomes pour être dans des conditions plus proches de celles de la cellule (Figure 27). Les enzymes recombinantes GCN5 et ATAC2 ont été normalisées en quantité par CBB, puis incubées avec les histones et de l'acétylCoA radioactif. Les histones ont été séparées sur gel SDS-Page et le signal radioactif visualisé par radiographie.

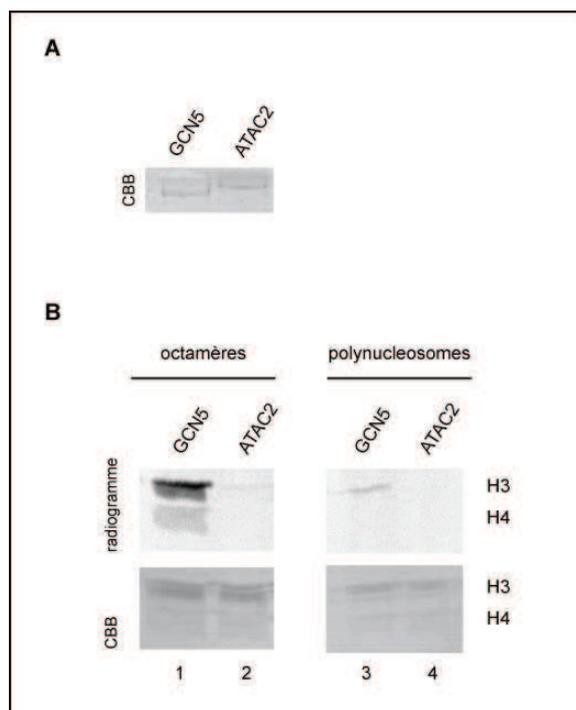


Figure 27 : ATAC2 ne montre pas d'activité sur les octamères ou les polynucléosomes.

A. Les protéines GCN5 et ATAC2 ont été purifiées à partir de cellules d'insecte. Les quantités en protéines ont été normalisées sur un gel SDS-PAGE après coloration au CBB.

B. ATAC2 a été incubée avec des octamères ou des polynucléosomes avec de l'acétylCoA radioactif. Le signal a ensuite été révélé par radiographie avec un écran PhosphorImager (image du haut, piste 2 et 4). L'activité de GCN5 a été ajoutée comme contrôle positif (piste 1 et 3).

L'image du bas montre les substrats histones sur gel coloré au CBB avant d'être exposé à l'écran.

GCN5, utilisée comme un contrôle positif, montre effectivement une bonne activité sur les octamères (piste 1) et agit plus faiblement sur les polynucléosomes (piste 3). Par contre

dans le cas d'ATAC2, normalisée en quantité sur gel avec GCN5, aucun signal d'acétylation n'est visible. Ici encore, et bien que le substrat soit au plus proche des conditions physiologiques, la protéine surexprimée ATAC2 ne semblent pas être capable d'acétyler les histones.

Notons que dans le cas de GCN5, nous observons une différence d'activité selon le type de substrat : octamères ou polynucléosomes.

b. ATAC2 a-t-elle besoin d'un partenaire pour exprimer son activité ?

hATAC2 recombinante ne montre pas d'activité sur les peptides ou les histones. Nous avons alors supposé que comme beaucoup d'enzyme, elle a besoin de partenaires protéiques pour exprimer son activité. Mais, même au sein du complexe hATAC, elle ne semble pas agir sur le substrat. Or, pour cette dernière expérience, la quantité de protéine ATAC2 est beaucoup plus faible que dans le cas de l'enzyme recombinante. Nous pouvons supposer que l'enzyme présente une activité faible et au vue des quantités utilisées pour l'expérience celle-ci n'est pas visible sur les peptides. Nous avons voulu alors travailler avec les protéines recombinantes et voir si ATAC2 en présence d'un partenaire pouvait agir sur les peptides.

Pour ce faire, des extraits de cellules d'insecte surexprimant la protéine recombinantes HA-ATAC2 et différentes autres protéines taguées (ADA2a, ADA3, SGF29, GCN5 et GCN5 mutant catalytique) ont été immunoprécipitées (Figure 28). Lorsque l'IP est dirigée contre le tag d'ATAC2, il ressort que SGF29 ainsi que les deux formes de GCN5 (sauvage et mutant catalytique) sont retenues également (Figure 28 A pistes 4 à 6). De même, une IP contre le tag de GCN5 ou SGF29 permet d'éluer ATAC2 (Figure 28 B pistes 3 à 5). Par contre, des IP contre le tag d'ADA2a ou ADA3 n'éluent pas ATAC2 (Figure 28 B pistes 1 et 2). Il est donc possible d'éluer des dimères ATAC2-GCN5 et ATAC2-SGF29. En revanche, ADA2a et ADA3 n'interagissent pas avec ATAC2.

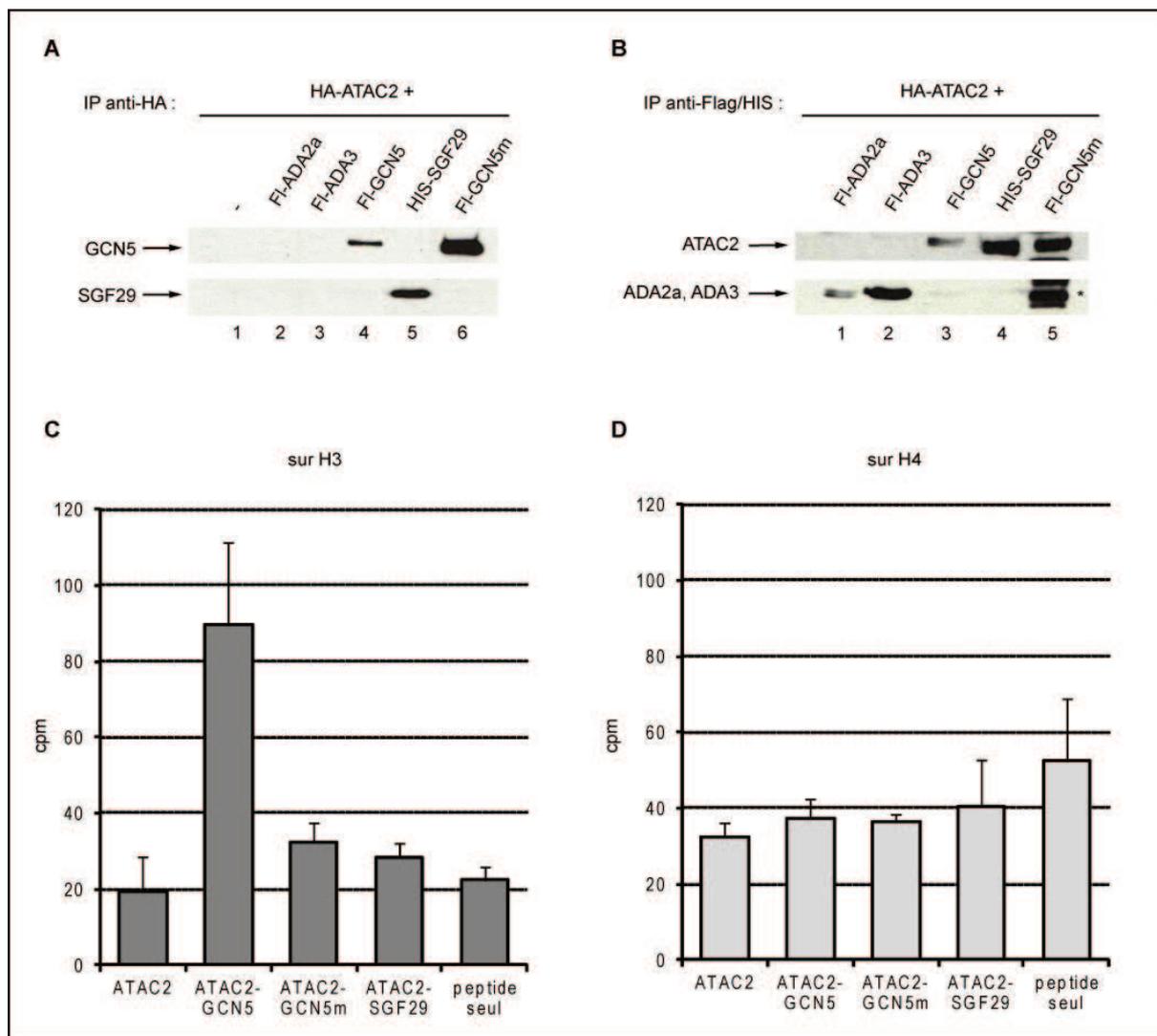


Figure 28 : ATAC2 interagit avec GCN5 et SGF29 mais ne montre pas d'activité sur les peptides H3 et H4.

Les protéines recombinantes ont été surexprimées dans des cellules d'insecte et immunoprécipitées contre un tag spécifique. Les protéines retenues par l'IP ont ensuite été visualisées par WB et l'activité de chaque paire a été testée sur des peptides mimant les queues d'histones H3 ou H4.

Les extraits contenaient HA-ATAC2 avec soit Flag-ADA2a, Flag-ADA3, Flag-GCN5 ou encore HIS-SGF29, ou le mutant catalytique de GCN5 (Flag-GCN5m).

A. IP réalisées contre le tag HA d'ATAC2. Les protéines GCN5 et SGF29 sont visualisées par WB.

- : contrôle négatif.

B. IP réalisées contre les tags Flag ou HIS d'ADA2a, ADA3, GCN5 ou GCN5m. La protéine ATAC2 a été visualisée grâce à un anticorps dirigé contre le tag HA, ADA2a et ADA3 sont visualisées grâce à un anticorps anti-Flag.

C. Protéines testées sur le peptide H3.

D. Protéines testées sur le peptide H4.

En ordonnée : coup par minute (cpm).

L'activité d'acétylation de ces duos protéiques a alors été mesurée sur des peptides mimant la queue N-terminale de H3 ou H4 (Figure 28 C et D). ATAC2 seule ou avec SGF29 ne présente pas d'activité, que ce soit sur H3 ou H4 (signal assimilable au bruit de fond du

peptide). Un signal est visible dans le cas d'ATAC2-GCN5. Or, ce signal disparaît lorsqu'ATAC2 est avec le mutant catalytique de GCN5. Le signal observé provient donc uniquement de GCN5. ATAC2 ne présente donc ici aucune activité même en présence d'un partenaire tel que GCN5 ou SGF29.

3. ATAC joue-t-il un rôle dans le stress du réticulum endoplasmique comme SAGA ?

Nos résultats mettent en évidence que hATAC et non hSAGA est recruté sur les gènes IE après un traitement au TPA. Nous avons aussi montré que hSAGA est recruté sur les gènes du stress du réticulum endoplasmique après un traitement à la thapsigargine (Partie 1, (Nagy et al., 2009)). Est-ce que ce stress est spécifique de hSAGA ou pouvons nous aussi visualiser hATAC sur ces gènes ?

Les expériences de CHIP-qPCR sur les gènes ER après traitement à la thapsigargine ont été répétées comme dans la Partie 1 mais cette fois en se focalisant sur les sous-unités de hATAC. Les résultats confirment le recrutement de l'ARN Pol II et de SAGA (via SPT20) sur les gènes ER après traitement à la thapsigargine, en particulier sur les gènes *herpud*, *grp78* et *erp70* (Figure 28 A et B). La protéine ADA3, qui est une sous-unité commune à ATAC et SAGA, est aussi recrutée mais le ratio entre cellules non traitées et traitées est plus faible (Figure 28 C). L'expérience de CHIP a enfin été effectuée contre la protéine ZZZ3 qui est spécifique d'ATAC (Figure 28 D). Dans ce cas, un recrutement aussi fort que pour SPT20 n'est pas visible, mais il n'est pas évident de conclure que hATAC n'est pas recruté (notamment pour ZZZ3 sur *herpud*).

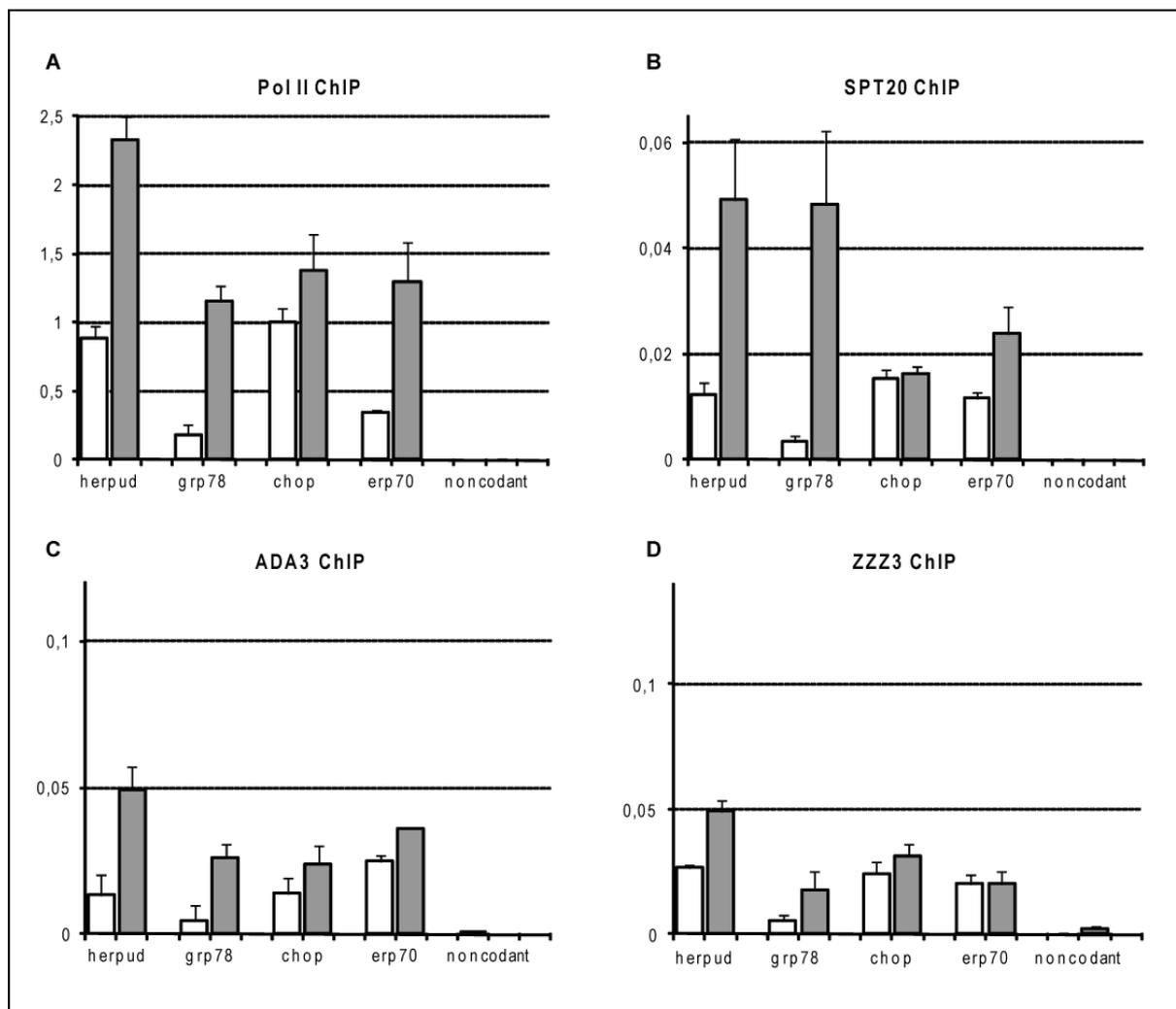


Figure 29 : hSAGA est recruté spécifiquement sur les gènes ER après traitement à la thapsigargine.

Des expériences de ChIP ont été effectuées sur des cellules HeLa non traitées (barres en blanc) ou traitées à la thapsigargine (barres en gris), avec des anticorps dirigés contre l'ARN Pol II (A), la sous-unité spécifique de SAGA SPT20 (B), la sous-unité commune d'ATAC et SAGA ADA3 (C) ou la sous-unité spécifique d'ATAC ZZZ3 (D). Les résultats ont ensuite été analysés par qPCR pour les gènes ER (*herpud*, *grp78*, *chop* et *erp70*). Non codant constitue un contrôle négatif.

E. Discussion et perspectives

1. Pourquoi une telle disparité dans la taille du complexe hATAC ?

Afin de déterminer la taille du complexe, nous avons effectué des expériences de gel filtration sur des extraits nucléaires et visualisé la présence des sous-unités de hATAC dans les fractions. La distribution de ces protéines s'avère être plutôt large, suggérant la présence

de différents complexes. Pour être certain d'observer le complexe hATAC, l'expérience a été répétée mais après purification du complexe par IP. Pourtant, là encore la distribution des protéines n'a pas permis d'établir une fraction précise, situant les complexes entre 600 kDa à 2 MDa. Dans le cas du complexe hSAGA, il est possible de purifier le complexe dans quelques fractions correspondant à 2 MDa. Pourquoi une telle disparité chez hATAC ?

La somme des masses des sous-unités connues de hATAC atteint environ 800 kDa. Si chaque protéine est présente en une copie dans le complexe, nous devrions alors avoir du signal dans les fractions 23-23 ce qui est effectivement le cas (Figure 26). Pourtant le complexe est aussi présent dans les fractions suivantes jusqu'à celle correspondant à 2 MDa. Cela suggère que d'autres sous-unités restent encore à découvrir, ou encore, que celles déjà connues sont présentes en plusieurs copies. Néanmoins, cela peut aussi signifier que le complexe peut adopter une forme particulière qui le retiendrait sur la colonne. Dans ce cas, avoir une idée de la structure tridimensionnelle globale du complexe apporterait de plus amples indications.

2. La composition en sous-unités du complexe hATAC soulève encore des interrogations

Nous avons pu déterminer la composition en sous-unités du complexe hATAC par des expériences de spectrométrie de masse et des IP. Celle-ci a été confirmée par Sebastian Guelman (Guelman et al., 2009). Cependant, d'autres sous-unités ont été mise en évidence dans le papier de Yian-Liang Wang comme UBAP2L, POLE3 et 4, MAP3K7 et TBP (Wang et al., 2008) (voir Tableau 1 de la publication). Nous n'avons pas pu trouver ces dernières dans nos résultats de spectrométrie de masse, et il n'a pas été possible de montrer que MAP3K7 et TBP ferait partie de hATAC par IP (résultats non montrés).

Comme nous l'avons discuté précédemment, d'autres protéines sont peut-être encore à associer à hATAC. Nous avons alors essayé de générer des lignées cellulaires exprimant ATAC2 taguée HA et Flag pour purifier de grande quantité de complexe pure pour de plus amples études par spectrométrie de masse. Malheureusement, ces expériences n'ont pu aboutir et nous n'avons pour le moment que des résultats issus de double IPs contre des sous-unités du complexe. A partir de ces derniers, des analyses par MudPIT ont été effectués dans notre équipe par Marjorie Fournier. La liste de sous-unités établie pour cette publication a pu être confirmée. D'autres protéines ont pu être identifiées comme des sous-unités du Médiateur qui interagit effectivement avec hATAC comme cela a été étudié au laboratoire (Krebs et al.,

2010). Quant aux autres protéines, nous supposons qu'elles peuvent interagir de façon dynamique avec hATAC, dans la régulation de certaines voies de signalisation. Par ailleurs, des études quantitatives de ces résultats de MudPIT ont aussi révélés qu'ADA2a, ADA3, SGF29, YEATS2, MBIP et WDR5 seraient présents de façon plus abondante que ZZZ3, ATAC2 ou NC2 β dans le complexe.

3. Apparition du complexe ATAC au cours de l'évolution

Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'existence d'un complexe ATAC chez l'homme. Dans le même temps, un tel complexe a aussi été caractérisé chez la souris (Guelman et al., 2009). Le complexe ATAC est donc présent chez les mammifères et les insectes. Comme nous l'avions vu dans l'Introduction, cela corrèle avec l'apparition dans ces organismes de deux gènes codant pour ADA2 : ADA2a et ADA2b.

Il a d'abord été supposé que le module GCN5-ADA2a-ADA3 pourrait faire partie d'un complexe homologue au complexe ADA de levure mais ATAC, bien que partageant certaines sous-unités avec SAGA, est un complexe spécifique des métazoaires. Il était aussi connu que dans ces espèces, GCN5 possède un homologue : PCAF. Dans cette étude, nous avons mis en évidence que le complexe ATAC est présent sous deux versions dans les cellules : une contenant l'enzyme GCN5 et l'autre contenant PCAF et cela de manière exclusive. Comme je le présenterai dans la partie suivante de ce manuscrit, il en est de même pour SAGA. D'un point de vue évolutif, les unicellulaires comme la levure possèdent un complexe SAGA. Chez les insectes, deux complexes contenant l'enzyme GCN5 sont trouvés, dATAC et dSAGA. Avec l'apparition de PCAF chez les mammifères, il faut à ce moment là considérer que ces organismes présentent quatre complexes : ATAC ou SAGA, contenant GCN5 ou PCAF. Ces observations vont de paire avec la notion de complexité des organismes au cours de l'évolution.

Néanmoins, il semblerait que les cibles de types histones ne soient pas conservées de la drosophile à l'homme, dATAC acétylant les histones H4 et hATAC acétylant les histones H3. Une telle observation est perturbante, l'action des complexes HAT étant plutôt conservée d'une espèce à l'autre (par exemple pour SAGA). De plus, d'un point de vue composition protéique, dATAC et hATAC semblent très proches. Le module HAT (GCN5-ADA2a-ADA3-SGF29) est conservé entre ces deux espèces, mais la présence de dATAC3 ou

CHRAC14, par exemple, semble être spécifique de la drosophile. Nous pouvons supposer que des protéines spécifiques du complexe de drosophile agiraient sur GCN5 en plus du module HAT, ce qui expliquerait une telle différence d'affinité. De plus, comme je l'ai décrit en sections B et D, la protéine ATAC2 semble avoir perdu sa capacité d'enzyme HAT de la drosophile à l'homme. Chez les insectes, celle-ci peut en effet acétyler les histones H4 tandis que GCN5 acétyle H3 (Suganuma et al., 2008). Cela peut expliquer la spécificité d'action de dATAC sur H4. Dans notre cas, hATAC2 n'étant pas active, le complexe cible préférentiellement H3 par l'action de GCN5. Cependant, le fait d'avoir à ce moment là deux complexes hATAC et hSAGA, ayant cette fois-ci tous deux le même substrat catalytique, tendrait plutôt à une régression d'un point de vue évolutif. Il faut alors essayer de comprendre quels avantages pourraient tirer les cellules de ces complexes en cherchant à comprendre quels sont les rôles spécifiques joués par l'un ou l'autre complexe. De ce fait, nous avons pu déjà mettre en évidence que hATAC et hSAGA sont spécifiques d'un type de stress donné (ATAC pour les gènes IE, voir les résultats de la Partie 1 et de cette Partie). De plus, des travaux à l'échelle du génome ont été effectués afin de comprendre si ces complexes peuvent se répartir de façon différente selon les gènes (Krebs et al., 2011). Il en ressort effectivement que certains gènes sont spécifiques de l'un ou l'autre complexe. Par ailleurs, bien que l'histone ciblée soit la même, nous devons aussi prendre en compte que la composition en sous-unités pourrait permettre des subtilités quant à la reconnaissance du substrat.

En conclusion de ce chapitre, ATAC a fait son apparition au cours de l'évolution suivant la complexité des organismes. Mais, il reste encore de nombreuses questions à résoudre afin de comprendre l'apparition d'un tel complexe chez les mammifères. Pour ce faire, étudier la spécificité d'action d'ATAC en comparaison avec SAGA dans différents processus cellulaires (transcription mais aussi régulation du cycle cellulaire et voies de signalisation) est nécessaire. De plus, la compréhension de l'influence des sous-unités des complexes sur l'enzyme GCN5 ou PCAF, en particulier celle d'ADA2a et ADA2b, donnerait des éclaircissements quant à l'apparition de deux complexes HAT contenant GCN5 chez les métazoaires.

4. Les différences entre les complexes ATAC humain et de drosophile

Bien que les complexes soient bien conservés au cours de l'évolution, la composition de dATAC par rapport à hATAC n'est pas tout à fait la même (voir Tableau 1 de la publication). Par exemple, alors qu'il existe un homologue humain à la protéine dATAC3 (nommé GABP β 2), ce dernier n'est retrouvé dans aucune des purifications de hATAC.

De même pour la taille du complexe : chez la drosophile, dATAC est un petit complexe de 700 kDa mais, chez l'homme sa taille varie de 600 kDa à 2 MDa. Notons que la somme des masses des protéines découvertes, faisant parties du complexe, fait 800 kDa. Cela suggère en plus que la composition en sous-unité varie, soit par d'autres sous-unités encore non identifiées, soit par plusieurs copies de la même protéine.

Cette différence en composition pourrait expliquer les nuances en terme de substrats spécifiques. Chez la drosophile, lorsque l'enzyme GCN5 est au sein de dATAC, elle acétyle les histones H4, tandis qu'au sein de dSAGA, sa cible sont les histones H3. Nos travaux et ceux d'autres équipes ont cependant montré que les deux complexes hATAC et hSAGA acétylent préférentiellement les histones H3. Quelque soit l'organisme, GCN5 recombinante acétyle toujours de préférence H3. Dans le cas de la drosophile, c'est par conséquent l'environnement multiprotéique qui permet la spécificité de GCN5 pour H4 quand celle-ci est dans dATAC. Comme dit ci-dessus, d'autres protéines spécifiques de la drosophile pourrait expliquer ce phénomène. Mais, les domaines de certaines sous-unités ne sont pas conservés d'un organisme à l'autre et pourrait également jouer un rôle dans le recrutement du complexe. Une piste sérieuse viendrait de la présence ou non des deux homologues ADA2 : ADA2a ou ADA2b. Chez la drosophile, les niveaux d'acétylation chez des mutants *dAda2a* ou *dAda2b* ont montré que ces protéines jouent un rôle dans la spécificité d'action de GCN5 sur les histones H4 et H3 respectivement. Qu'en est-il chez l'homme ? Nous verrons dans la Partie 3 de ce manuscrit qu'à la suite de la publication, j'ai cherché justement à comprendre comment ces sous-unités du complexe peuvent agir sur l'activité enzymatique de GCN5.

En outre, nous pouvons aussi faire remarquer qu'une différence supplémentaire existe par la présence d'un homologue de GCN5 : PCAF. La protéine PCAF est spécifique des vertébrés et est aussi trouvée au sein des complexes hATAC et hSAGA. Comprendre comment cette enzyme est régulée au sein des complexes et ce qu'elle permet d'apporter en plus de GCN5 chez l'homme par rapport à la drosophile, nécessite encore de plus amples travaux.

5. La problématique ATAC2

La protéine ATAC2 est aussi sujette à polémique au vue des différences de résultats obtenus entre la drosophile et les mammifères. Celle-ci possède un domaine GNAT tout comme l'enzyme GCN5. Chez la drosophile, il a été montré que cette protéine est effectivement capable d'acétyler les histones et, en particulier, l'histone H4 (voir Introduction et (Suganuma et al., 2008)). Dans notre cas, nous avons montré que la protéine humaine hATAC2, lorsqu'elle est surexprimée, ne présente pas d'activité comme GCN5 sur les histones.

Notons qu'après avoir analysé les séquences des protéines homologues dans différentes espèces, il en ressort que le domaine PHD observé chez la drosophile n'est pas entièrement conservé chez les mammifères (voir Figure 5 dans Supplemental). En effet, la séquence d'un tel domaine tel qu'il est retrouvé chez les insectes est Cys4-His-Cys3. Chez les mammifères, les deux premières et la sixième cystéines ainsi que l'histidine ne sont pas conservées. Il n'a pas été possible d'établir une fonction type pour le PHD Finger ; celle-ci varie selon la protéine où il est présent, mais il apparaît qu'il joue un rôle dans la reconnaissance de la chromatine ou l'interaction entre protéines. Nous pouvons alors supposer que la protéine hATAC2, n'ayant plus un tel domaine, ne puisse se lier à la chromatine de la même manière que dATAC2 ; ce qui changerait la spécificité du complexe pour le substrat histone. En outre, il s'avère que la protéine est essentielle pour l'intégrité du complexe chez la souris (Guelman et al., 2009). Les interactions avec les autres sous-unités du complexe ont un rôle important à jouer. Dans ce cas, le domaine PHD pourrait peut-être renforcer certaines d'entre elles pour influencer l'activité de l'enzyme chez la drosophile.

L'hypothèse qui s'est posée est que peut-être, comme pour GCN5, l'enzyme a besoin de partenaires pour influencer sur son activité. Le complexe hATAC a alors été étudié dans son ensemble en présence de GCN5 mutante sur son site catalytique. Or, même dans un tel environnement multiprotéique, hATAC2 ne semble pas avoir d'activité sur les histones. Les expériences ayant été effectuées sur ATAC2 de mammifère dans la littérature ont pu mettre en évidence une activité mais très faible, et ce uniquement si une grande quantité d'enzyme est utilisée (Guelman et al., 2009). Pour pouvoir visualiser l'activité d'ATAC2, il faudrait donc utiliser de grande quantité d'enzyme et, par conséquent, travailler avec les enzymes recombinantes. J'ai commencé à essayer de chercher des partenaires à ATAC2 pour à la fois combiner la technologie des protéines recombinantes et être dans des conditions

multi-protéiques. Ces travaux n'ont pour le moment pas pu apporter de réponse mais, restent très préliminaires.

Notons qu'une explication à la difficulté à visualiser l'activité d'ATAC2 pourrait tout simplement venir des conditions expérimentales. GCN5 est une enzyme particulièrement efficace sur les histones et même dans des conditions peu favorables (peu d'enzyme ou peu de substrat) il est possible d'apercevoir un signal. Observer une activité d'ATAC2, en revanche, semble beaucoup plus délicat et des conditions optimales sont peut-être requises. Pour le moment, j'ai essayé plusieurs conditions expérimentales (temps d'incubation différents, compositions des tampons variables...) mais je n'ai à aucun moment pu déceler une activité hors du bruit de fond.

Sur les conseils de Judit Osz-Papai (équipe Natacha Rochel, IGBMC), j'ai essayé une autre technique de visualisation de l'activité : le test colorimétrique, préalablement utilisé pour p300 (Thompson et al., 2004). L'enzyme est incubée avec le peptide et l'acétylCoA comme précédemment, mais du DNTB (DiNitroThiocyanoBenzène) est ajouté. Le DNTB va faire une réaction avec le coenzymeA formé par la réaction enzymatique, ce qui conduit à un produit visualisable et quantifiable à 412 nm au spectrophotomètre. J'ai testé cette technique avec les protéines GCN5 et ATAC2 mais sans résultat concluant.

Du coup, nous pouvons penser que soit hATAC2 ne présente vraiment aucune activité d'acétylation, soit que cette activité se révèle sur un autre type de substrat que les histones.

6. Pourquoi les cellules contiennent deux complexes contenant la même enzyme GCN5 ?

Les cellules de mammifères possèdent donc deux complexes contenant GCN5 ayant les mêmes cibles histones. Quels avantages en tirerait la cellule ?

Nous devons considérer que nos expériences ont été effectuées sur des peptides et des histones. Chaque complexe contient des sous-unités qui lui sont spécifiques, ces derniers possédant des domaines particuliers de liaison à la chromatine. Nous avons alors voulu savoir si ces protéines peuvent influencer l'activité de GCN5 et aussi jouer sur la reconnaissance du substrat. En effet, les protéines de tel ou tel complexe, pourraient influencer l'activité catalytique de GCN5 et certaines reconnaître différentes modifications d'histones ; par conséquent, elles pourraient recruter un complexe et pas l'autre sur certains états de la chromatine. C'est ce que je décrirai dans la partie suivante de ce manuscrit (Partie 3), je n'entrerai donc pas dans les détails sur ce point ici.

En outre, le substrat histone dans cette étude étant le même, nous avons suggéré que les gènes visés pouvaient être différents. En effet, hATAC et non hSAGA est recruté sur les gènes IE après traitement au TPA. Des études sur le génome ont aussi pu mettre en évidence que bien que les complexes soient recrutés sur des parties communes génomes, certaines régions sont spécifiques de l'un ou de l'autre (Krebs et al., 2011).

Enfin, nous n'avons considéré ici que des substrats de type chromatine. Or, nous savons que GCN5 et PCAF peuvent avoir pour cibles des protéines autres que les histones (voir Introduction). Ces cibles pourraient être différentes selon que l'enzyme se retrouve au sein d'ATAC ou de SAGA. Nous allons voir en Partie 4 que c'est effectivement le cas pour un exemple. Mais qu'en est-il des autres cibles potentielles ? Afin de répondre à cette question, nous pouvons déterminer quel pourrait être l'acétylome pourvu par GCN5, mais aussi, plus particulièrement, par hATAC et hSAGA. Pour ce faire, il a été mis au point des puces protéomiques (Zhu et al., 2001). Pour un exemple, ce type de puce a été utilisé pour déterminer quels étaient les substrats autres que histones du complexe HAT NuA4 de levure (Lin et al., 2009). Brièvement, la puce contenant jusqu'à 5800 protéines est incubée avec NuA4 et de l'acétylCoA radioactif. Après lavage, la puce est exposée et chaque point correspondant à un signal radioactif est visualisé par radiographie. Les histones ont été acétylées, mais aussi d'autres protéines. L'objectif serait de faire de même avec la protéine recombinante GCN5, ainsi qu'avec les complexes hATAC et hSAGA.

7. SAGA est-il spécifique du stress endoplasmique par rapport à ATAC ?

Nous avons montré que hATAC est le complexe HAT contenant GCN5 spécifique de la régulation des gènes IE après traitement TPA. Nous avons voulu savoir si hSAGA de son côté était alors spécifique du stress ER. Nous avons alors réalisé des expériences de CHIP contre SPT20 et ZZZ3 après traitement à la thapsigargine. Bien qu'il soit clairement établi que hSAGA est recruté sur les gènes après un stress ER, il n'est pas facile de conclure pour hATAC où il semblerait avoir un recrutement léger sur certains gènes.

Une récente étude a pu apporter quelques indications à cette question. Dotan Sela a en effet cherché quels pouvaient être les complexes recrutés sur les éléments de réponse au stress ER (ERSE) par la protéine ATF6 α , cette dernière étant un facteur d'activation de la transcription des gènes ER (Sela et al., 2012). Des billes avec l'ADN du promoteur contenant les éléments ERSE ont été incubées avec des extraits nucléaires de cellules HeLa avec ou sans

protéine ATF6 α recombinante. Après élution, les protéines retenues ont été analysées et identifiées par MudPIT. Il en ressort que SAGA a été retenu, comme nous pouvions nous y attendre, mais aussi le complexe Médiateur, ATAC et TRRAP-TIP60. La quantité de ces protéines augmente en présence d'ATF6 α . Ces résultats ont été confirmés par WB. En résumé de ces travaux, SAGA et le Médiateur sont recrutés par ATF6 α sur les gènes ER dans le contexte de la formation du PIC. Concernant ATAC, il semblerait être également impliqué mais, sa liaison aux éléments ERSE est moins spécifique, les auteurs ayant mis en évidence des liaisons avec les billes présentant l'ADN ne contenant pas ces éléments (Sela et al., 2012).

Partie 3

Les sous-unités des complexes hATAC et hSAGA régulent l'activité de l'enzyme GCN5

Ce travail a été effectué en vue d'une publication en premier auteur.

Partie 3 : Les sous-unités des complexes hATAC et hSAGA régulent l'activité de l'enzyme GCN5

A. Problématique

Au cours de ma thèse, nous avons ainsi montré que GCN5 fait partie d'un second complexe chez l'homme, le complexe ATAC (Partie 2 et (Nagy et al., 2010)). Ce complexe multiprotéique contient des sous-unités communes avec SAGA (ADA3 et SGF29) en plus de GCN5. D'autres sous-unités sont spécifiques à ATAC comme la protéine adaptatrice ADA2a. Nous avons pu démontrer que, comme hSAGA, hATAC acétyle les histones *in vitro et in vivo*, et préférentiellement la lysine 14 de l'histone H3. Chez les vertébrés, un paralogue de GCN5, PCAF peut se substituer à GCN5 dans les complexes ATAC ou SAGA.

L'enzyme GCN5 est donc présente à la fois dans SAGA et ATAC, il serait intéressant de comprendre l'intérêt d'avoir la même sous-unité catalytique dans deux complexes différents. Pour y répondre, nous avons considéré les types de substrats et les protéines pouvant agir sur l'activité de l'enzyme.

Au laboratoire, nous disposons de nombreux peptides, mimant les queues d'histones avec différents types de modifications, qui ont été alors utilisés comme substrats dans des tests d'acétylation *in vitro*. J'ai purifié les enzymes recombinantes GCN5 et PCAF à partir de cellules d'insectes infectées par des baculovirus contenant l'ADN codant pour les protéines à surexprimer (voir Matériels et Méthodes). En parallèle, j'ai également purifié quatre complexes HAT endogènes (SAGA et ATAC contenant soit GCN5 soit PCAF) à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa. L'activité enzymatique et la spécificité de ces quatre complexes, normalisés selon GCN5 ou PCAF, a été comparée avec l'activité des enzymes recombinantes seules dans des tests d'acétylation *in vitro*. Nous nous attendions à obtenir des différences de l'activité de SAGA et d'ATAC mais, surtout entre les complexes et les enzymes recombinantes : l'hypothèse était que GCN5 et PCAF ont besoin d'un environnement multiprotéique pour exprimer pleinement leur activité et influencer la spécificité de substrat. D'autre part, différentes sous-unités de ces complexes ont des

domaines capables de reconnaître des résidus acétylés, méthylés ou phosphorylés. Nous avons donc testé si différentes modifications sont prérequisées pour la reconnaissance et l'acétylation par ces complexes.

Afin de comprendre comment les sous-unités des complexes hATAC ou hSAGA agissent sur la spécificité de substrat, j'ai purifié des modules HAT recombinants à partir de cellules d'insecte infectées par des baculovirus exprimant : GCN5-ADA2a-ADA3-SGF29 pour ATAC, GCN5-ADA2b-ADA3-SGF29 pour SAGA. Ces modules ont été testés sur les peptides et les histones selon les conditions ci-dessus. Si notre hypothèse est vérifiée, les niveaux d'acétylation par GCN5 devraient être augmentés par rapport à ceux obtenus avec l'enzyme recombinante seule. Nous saurons, en plus, si ces protéines agissent sur la spécificité de substrat des complexes. Par ailleurs, nous nous attendions à obtenir des résultats différents selon la présence d'ADA2a ou ADA2b, ce qui expliquerait la formation d'un complexe spécifique ATAC ou SAGA dans les cellules. Ces approches permettront de mieux caractériser les interactions entre les différentes sous-unités des complexes et amèneront à une meilleure compréhension de la structure de ces derniers.

B. Résultats obtenus en vue d'une publication

1. L'enzyme GCN5 a besoin d'un environnement multiprotéique pour exprimer son activité

L'enzyme GCN5 est retrouvée au sein de deux complexes : ATAC et SAGA. J'ai voulu savoir si l'environnement multiprotéique pourrait influencer l'activité enzymatique de GCN5.

Pour ce faire, l'activité de l'enzyme seule puis, au sein des complexes, a été testée sur des peptides. La protéine recombinante GCN5 a été purifiée à partir de cellules d'insecte. Les complexes endogènes ATAC et SAGA ont été purifiés à partir de cellules HeLa : une première IP contre les sous-unités spécifiques de chaque complexe ADA2a et TAF10 a été effectuée dans un premier pour purifier soit ATAC, soit SAGA respectivement (Figure 1 A). L'IP contre TAF10 permet d'éluer SAGA mais aussi le complexe TFIID. De plus, nous avons vu en Partie 2 que les complexes peuvent contenir GCN5 ou PCAF. Afin de n'étudier que les complexes SAGA et non TFIID, et les complexes contenant l'enzyme GCN5 (G-ATAC et SAGA) et non PCAF, une seconde IP contre GCN5, est réalisée sur les éluats de la première

IP (Figure 30 A). La concentration des complexes et de l'enzyme recombinante a ensuite été normalisée selon la quantité en GCN5 par WB (Figure 30 B). L'enzyme GCN5, G-ATAC et SAGA ainsi normalisés ont ensuite été incubés avec des peptides mimant la queue N-terminale de l'histone H3 ou H4 en présence d'acétylCoA radioactif. Le signal d'acétylation obtenu sur les peptides a été détecté en coup par minute (Figure 30 C).

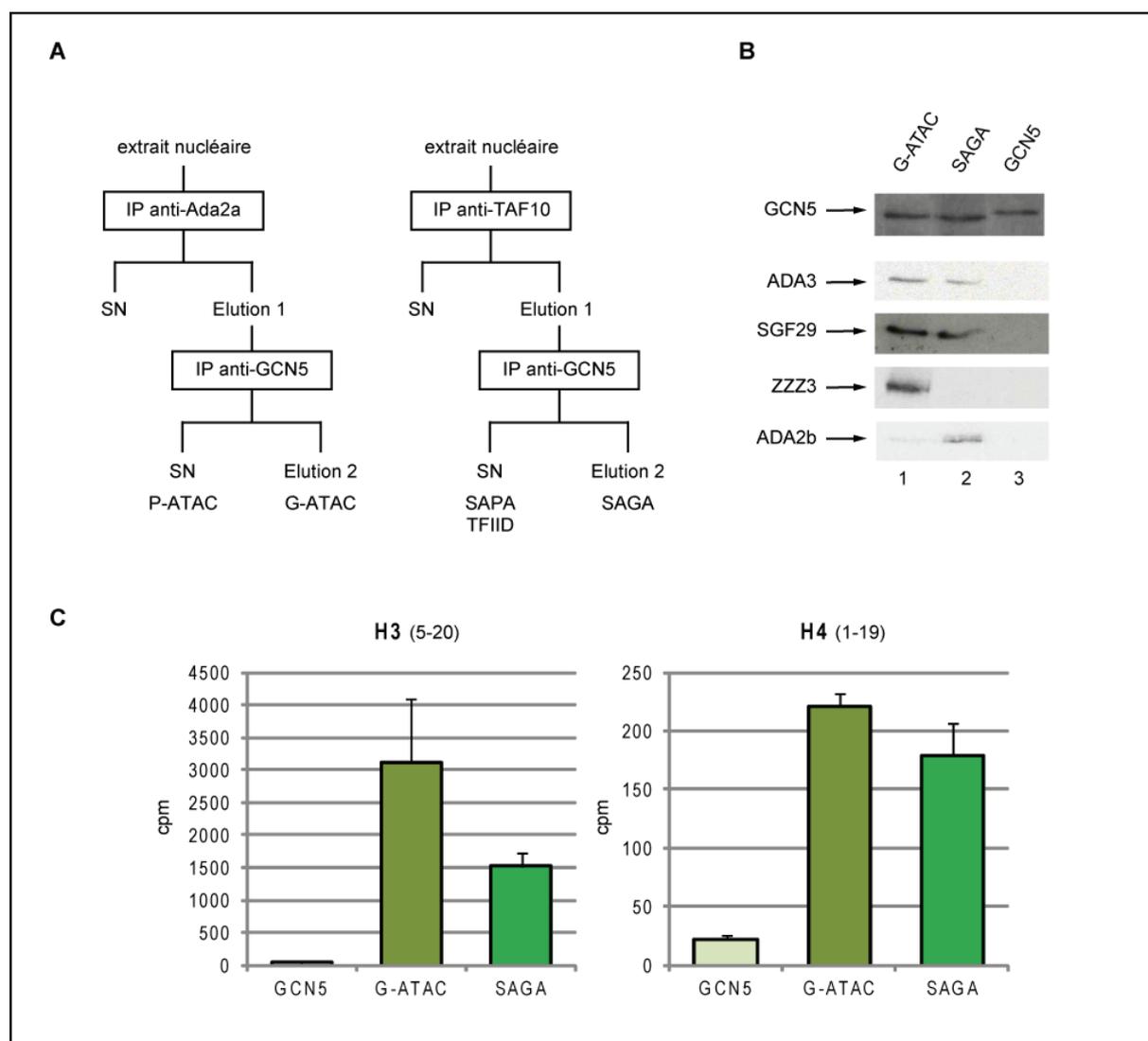


Figure 30 : L'enzyme GCN5 a besoin d'être au sein des complexes ATAC et SAGA pour agir pleinement sur les peptides H3 et H4.

A. Les complexes ATAC et SAGA contenant exclusivement GCN5 (dits G-ATAC et SAGA) ont été purifiés par double IP à partir d'extraits nucléaires de cellule HeLa selon le schéma. SN : surnageant.

B. La protéine GCN5 recombinante a été purifiée à partir d'extraits de cellules d'insecte. Les concentrations de GCN5 recombinante, G-ATAC et SAGA ont été normalisées selon la quantité en GCN5 par WB.

C. L'activité de l'enzyme GCN5 seule et au sein des complexes G-ATAC et SAGA a été mesurée sur des peptides mimant la queue N-terminale des histones H3 ou H4 (les nombres entre parenthèses indiquent les positions correspondantes). L'enzyme et les complexes ont été incubés avec les peptides et de l'acétylCoA radioactif et le signal sur les peptides mesuré en coup par minute.

En ordonnée : coup par minute (cpm).

Comme nous l'avions déjà observé en Partie 2, les enzymes acétylent préférentiellement l'histone H3 (attention à comparer les valeurs obtenues, sachant que la grandeur des ordonnées n'est pas la même entre H3 et H4 pour une meilleure visualisation). En outre, G-ATAC et SAGA acétylent de la même manière le peptide H4, mais il semblerait que G-ATAC possède une meilleure activité que SAGA sur H3. De façon intéressante, GCN5 recombinante n'est pratiquement pas active en comparaison des complexes. L'enzyme a donc besoin d'un environnement multiprotéique pour acétyler les histones.

2. Les protéines ADA2a et ADA2b agissent sur GCN5 au sein du module HAT

L'enzyme GCN5 seule acétyle difficilement son substrat et a besoin de l'environnement multiprotéique du complexe pour exprimer pleinement son activité d'acétylation sur les histones. Les sous-unités des complexes influencent donc l'enzyme.

Nous savons que GCN5 fait partie d'un module HAT composé d'ADA2 et ADA3 chez la levure (cf Introduction). Chez l'homme, ce module est composé d'ADA2a dans le complexe hATAC et d'ADA2b dans le complexe SAGA. De plus, nous savons que la protéine ADA3 est commune aux deux complexes et interagit fortement avec SGF29, une autre sous-unité commune. J'ai alors voulu savoir s'il était possible de purifier un module recombinant rHAT correspondant à celui d'ATAC (dit rHAT ATAC) contenant donc les quatre protéines GCN5-ADA2a-ADA3-SGF29 et un module HAT pour SAGA (dit rHAT SAGA) contenant GCN5-ADA2b-ADA3-SGF29. Pour ce faire, les protéines ont été surexprimées dans des cellules d'insecte selon la technique de l'infection par des baculovirus et les modules ont été purifiés par double IP contre GCN5 et ADA3. Les protéines ainsi retenues ont été visualisées sur gel SDS-Page par coloration au nitrate d'argent (Figure 31 A) et identifiées par WB (non montré). Il est donc possible de purifier des modules rHAT recombinants contenant les quatre sous-unités.

Afin de comparer l'activité de ces modules avec l'enzyme GCN5 seule, les quantités de GCN5 recombinante, rHAT-ATAC et rHAT-SAGA ont été normalisées selon la présence de GCN5 par WB (Figure 31 B). Ces derniers, ainsi normalisés, ont ensuite été testés comme précédemment sur des peptides H3 ou H4 (Figure 31 C). De même qu'avec les complexes endogènes, l'activité de GCN5 sur le substrat augmente lorsque l'enzyme est au sein des modules HAT, que ce soit rHAT ATAC ou rHAT SAGA, en particulier sur H3. Celle-ci a donc besoin de l'environnement formé par ADA2a/b, ADA3 et SGF29 pour agir sur son

substrat. Par ailleurs, de ces résultats nous pouvons aussi tirer un constat surprenant : bien que l'activité de ce module augmente par rapport à l'enzyme seule, le module rHAT ATAC est moins actif que le module rHAT SAGA (comparer rHAT ATAC et rHAT SAGA sur le peptide H3). La différence de composition entre ces deux modules est la protéine ADA2 : ADA2a dans rHAT ATAC et ADA2b dans rHAT SAGA. Ces protéines, bien qu'elles influent positivement sur GCN5, n'agissent pas de la même manière sur H3, mais sont comparables sur H4.

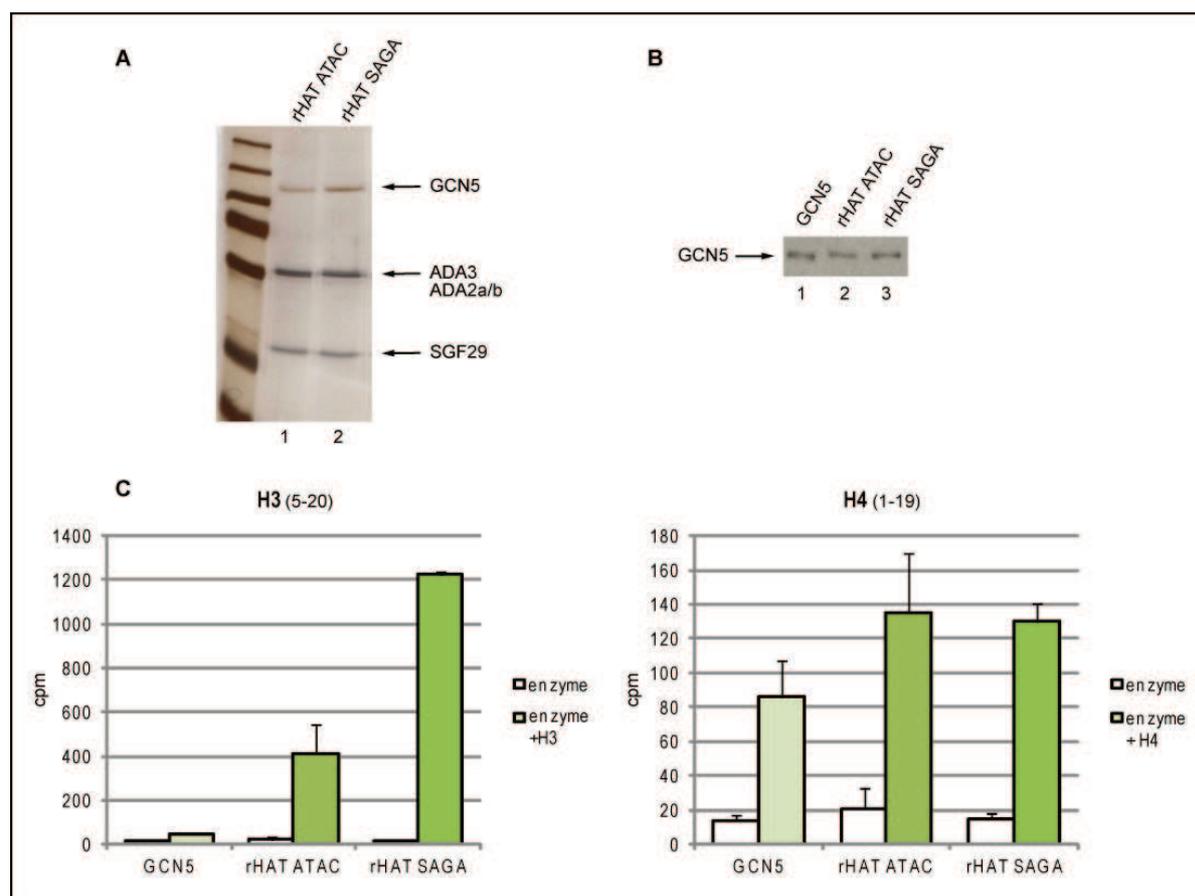


Figure 31 : Les sous-unités du module HAT agissent sur l'activité de GCN5.

A. Les modules HAT d'ATAC (rHAT ATAC, piste 1) et de SAGA (rHAT SAGA, piste 2), contenant GCN5, ADA2a ou ADA2b, ADA3 et SGF29 recombinantes, ont été purifiés à partir d'extraits de cellules d'insecte par double IP. Les protéines ont ensuite été visualisées après migration sur gel SDS-Page par coloration de ce dernier au nitrate d'argent.

B. Les modules recombinants rHAT ont été normalisés entre eux et avec l'enzyme seule selon la quantité en GCN5 par WB.

C. L'activité de GCN5, seule ou au sein des modules HAT, a été mesurée sur des peptides mimant la région N-terminale des histones H3 ou H4 (les nombres entre parenthèses indiquent les acides aminés correspondants). L'enzyme et les modules ont été incubés avec les peptides et de l'acétylCoA radioactif, puis le signal sur les peptides a été mesuré en coup par minute. Le bruit de fond correspond à l'autoacétylation de l'enzyme (enzyme). En ordonnée : coup par minute (cpm).

3. L'intégration de GCN5 dans le module HAT influe sur son activité, mais n'est pas encore suffisante pour obtenir l'activité du complexe endogène, que se soit sur des peptides ou des protéines histones

L'activité de GCN5 augmente lorsque l'enzyme est au sein du module HAT, mais est-ce que cette activité est comparable à celle des complexes entiers ?

GCN5 recombinante, les modules recombinants et les complexes endogènes ont été normalisés selon la quantité en GCN5 (Figure 32 A) et leurs activités respectives sur les peptides H3 (B) et H4 (C) comparées entre elles. Que ce soit sur les peptides H3 ou H4, dans les deux cas, l'activité de GCN5 augmente lorsque l'enzyme est au sein des modules HAT (rHAT ATAC ou rHAT SAGA). Cependant, cette activité n'est pas encore comparable à celle des complexes, dont l'activité est plus importante que celles des modules (de façon très notable pour rHAT ATAC et ATAC). Les protéines ADA2a/b, ADA3 et SGF29 agissent donc sur l'enzyme, mais d'autres sous-unités agissent aussi sur GCN5. Notons que ces expériences ont été effectuées en parallèle sur PCAF et que le même profil de résultats a été obtenu (résultats non montrés).

Ces expériences ont été réalisées sur des peptides représentant environ les vingt premiers acides aminés de l'histone H3 ou H4. Afin d'être dans des conditions plus proches de la réalité, nous avons voulu étudier l'activité de GCN5 sur la protéine histone dans son ensemble et, en particulier, dans le cadre de l'octamère.

GCN5 recombinante, les modules rHAT et les complexes endogènes (normalisés pour GCN5 comme ci-dessus) ont été incubés avec des dimères H2A/H2B, des tétramères H3/H4 ou des octamères issus de cellules HeLa en présence d'acétylCoA radioactif. Les histones ont ensuite été mises à migrer sur gel SDS-Page et le signal radioactif visualisé par radiographie (Figure 33 A). Notons que les quantités d'histones ont été harmonisées par coloration au CBB. Le signal radioactif est visible sur les tétramères H3/H4 et sur les octamères, en particulier, sur les histones H3. L'intensité des bandes obtenues pour les octamères a été mesurée par ImageQuant pour mieux pouvoir comparer les profils d'acétylation selon l'environnement protéique de GCN5 (Figure 33 B). Concernant l'histone H3, comme avant, nous observons que le complexe ATAC est un peu plus actif que SAGA. De plus, le signal pour l'enzyme seule n'est pas visible sur la radiographie. Ce signal augmente lorsque GCN5 est au sein des modules rHAT mais ce dernier n'atteint pas celui des complexes endogènes.

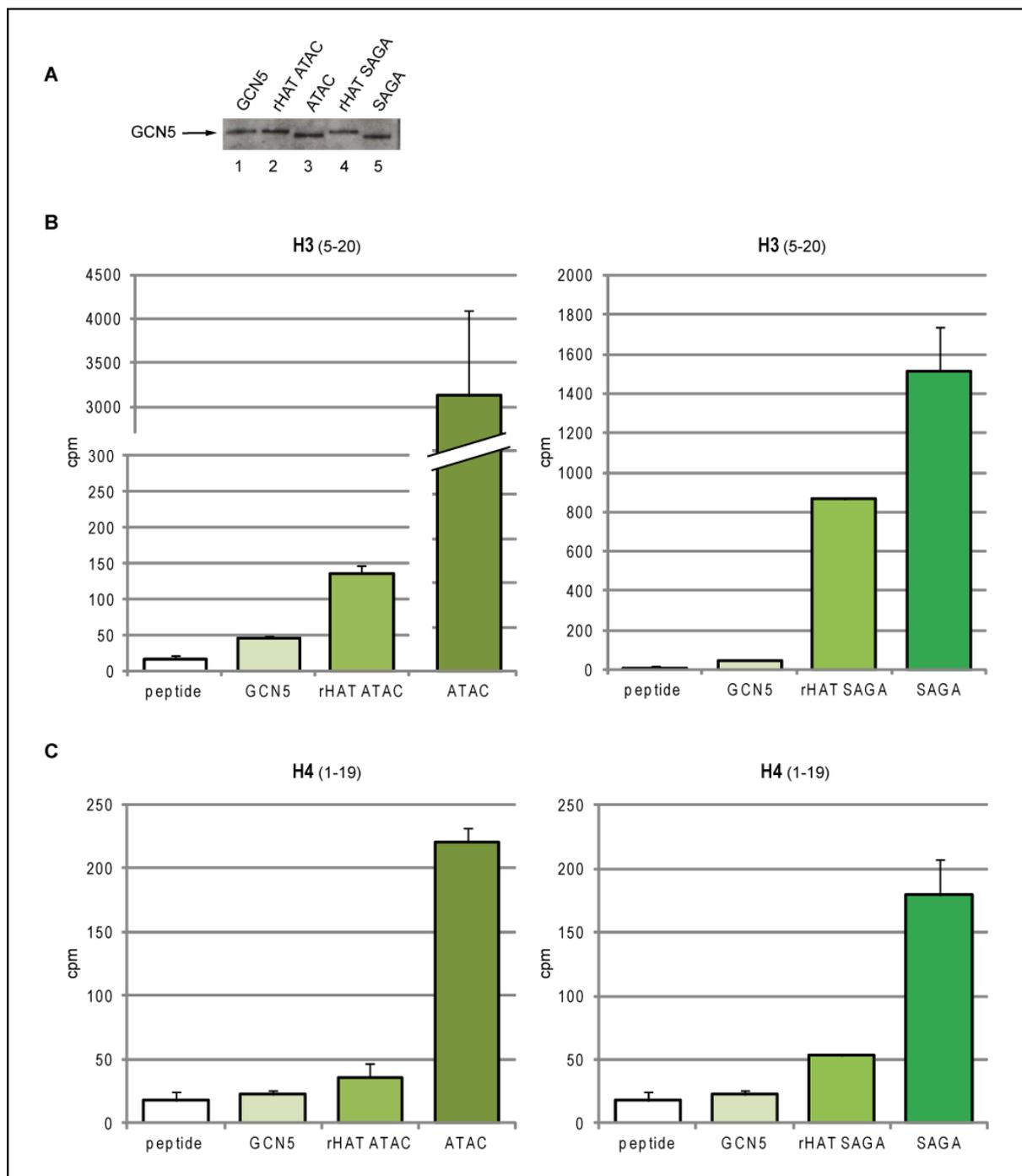


Figure 32 : L'activité de GCN5 au sein du module rHAT augmente, mais ce n'est pas suffisant pour atteindre l'activité du complexe endogène.

A. Les modules HAT recombinants (rHAT ATAC et rHAT SAGA) ont été purifiés par double IP à partir d'extraits de cellules d'insecte. Les complexes endogènes (ATAC et SAGA) ont été purifiés par double IP à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa. Les concentrations des modules, des complexes et de l'enzyme GCN5 recombinante ont été normalisées selon la quantité en GCN5 par WB.

B. L'activité de GCN5 seule et au sein du module rHAT est comparée à celle du complexe endogène sur des peptides mimant la région N-terminale de l'histone H3 (à droite pour le contexte ATAC, à gauche pour SAGA).

C. De même qu'en B, mais pour des peptides mimant H4.

Les nombres entre parenthèses indiquent les acides aminés des histones correspondants.

En ordonnée : coup par minute (cpm).

Par ailleurs, sur l'histone H3 des octamères aussi, rHAT ATAC est moins actif que rHAT SAGA. Que ce soit sur les peptides ou les octamères natifs, l'influence des sous-unités sur l'activité de GCN5 se confirme. Ce que nous pouvons noter cependant, que nous n'avions pas pu observer avec les peptides, est que le complexe ATAC semble plus actif sur les histones H4 que SAGA. En est-il de même pour les modules ? Ces derniers étant normalisés selon la quantité en GCN5 des complexes et, étant moins actif, le signal sur H4 est noyé dans le bruit de fond du radiogramme.

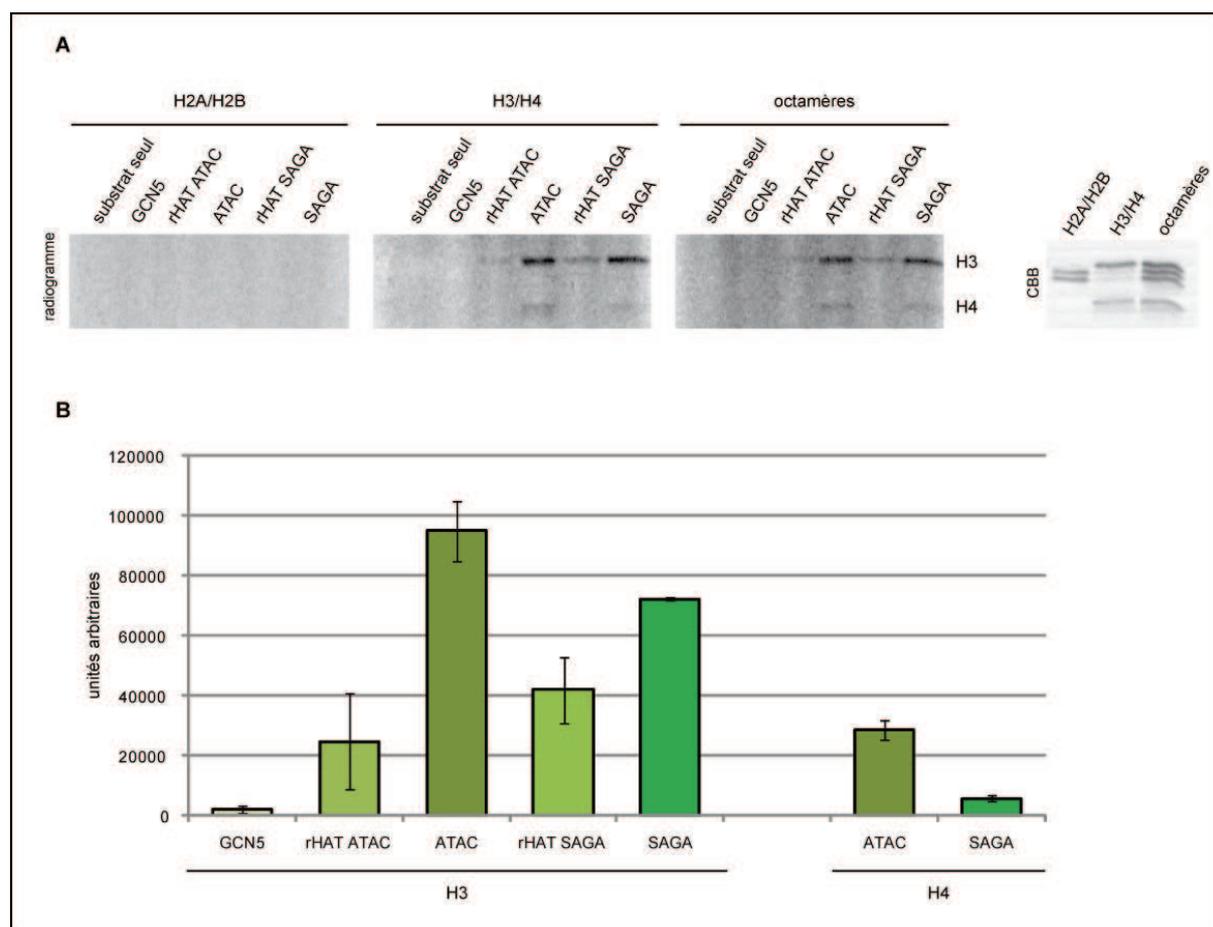


Figure 33 : Confirmation du profil d'activité de GCN5 au sein des différents contextes sur des protéines histones.

A. L'enzyme GCN5 recombinante, les modules rHAT (rHAT ATAC et rHAT SAGA) ainsi que les complexes endogènes (ATAC et SAGA) ont été purifiés et normalisés entre eux selon la quantité de GCN5 comme vu précédemment. Ils ont été incubés avec de l'acétylCoA radioactif et des dimères H2A/H2B, des tétramères H3/H4 ou encore des octamères purifiés à partir de cellules HeLa. Ces différentes purifications d'histones ont été harmonisées par CBB. Après incubation, les échantillons ont été déposés sur gel SDS-Page et le signal radioactif visualisé grâce à un écran PhosphorImager (radiogramme) à l'aide du scanner Typhoon.

B. L'intensité du signal obtenu pour l'acétylation de H3 et H4 des octamères a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageQuant.

4. Le module rHAT ATAC est plus actif sur les histones H4 que rHAT SAGA

Pour pouvoir détecter quelle est l'activité des modules rHAT ATAC et rHAT SAGA sur les histones H4 au sein des octamères, l'expérience d'acétylation a été répétée cette fois-ci avec de plus grandes quantités d'enzymes. La quantité des deux modules à utiliser pour le test est toujours normalisée selon GCN5, ici après avoir fait migrer les protéines sur gel SDS-Page et coloré celui-ci au nitrate d'argent (Figure 34A). Comme précédemment, les deux modules ont été incubés en présence des octamères (ici recombinants) avec de l'acétylCoA radioactif. Les histones ont été mise à migrer sur gel SDS-Page et le signal radioactif visualisé par radiographie (Figure 34 B). Le signal sur H3 n'est pas à interpréter, celui-ci étant saturé par l'activité de l'enzyme. Par contre, le signal sur H4 est visible et est plus important dans le cas de rHAT ATAC. La quantification de ce signal sur H4 par ImageQuant confirme que rHAT ATAC acétyle mieux ce substrat que rHAT SAGA. ADA2a influence donc GCN5 plus positivement qu'ADA2b pour l'acétylation sur H4.

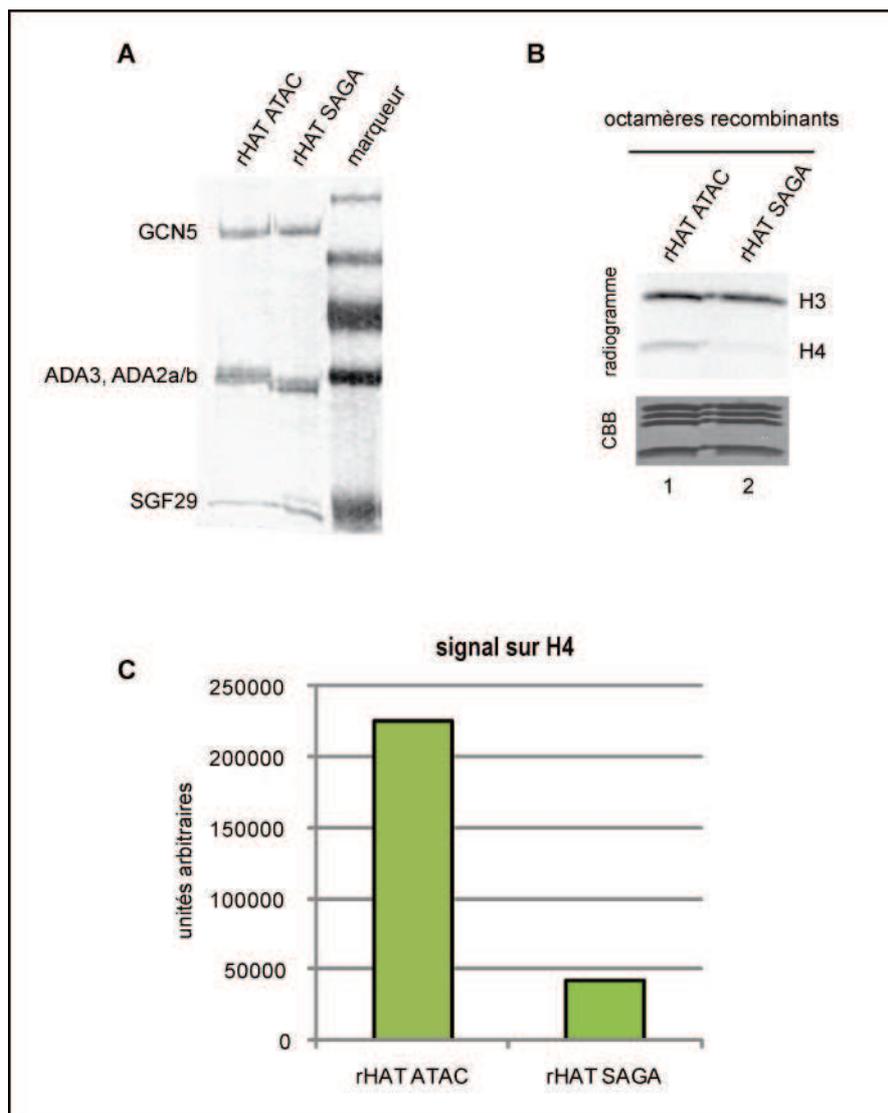


Figure 34 : Le module rHAT ATAC acétyle plus efficacement l'histone H4 que le module rHAT SAGA.

A. Les modules recombinants rHAT ATAC et rHAT SAGA ont été purifiés par double IP à partir d'extraits de cellules d'insecte et leur concentration normalisée selon la quantité de protéines par coloration d'un gel SDS-Page par du nitrate d'argent.

B. Les deux modules ont été incubés avec des octamères recombinants en présence d'acétylCoA radioactif. Les protéines ont ensuite été mises à migrer sur gel SDS-Page et le signal radioactif a été visualisé à l'aide d'un écran PhosphorImager (radiogramme).

C. L'intensité du signal radioactif obtenu sur le radiogramme pour H4 a été quantifiée par ImageQuant.

5. Quelles sont les résidus des octamères acétylés par ces différents contextes protéiques ?

Ces tests sur les octamères nous indiquent que les histones H3 sont acétylés, et que l'histone H4 est plus acétylée par ATAC que SAGA. Mais quelles sont les résidus acétylés précisément ? Peut-on trouver des différences entre les cibles ?

Les expériences d'activité d'acétylation ont été répétées avec l'enzyme recombinante, au sein des modules rHAT et des complexes endogènes en présence d'acétylCoA froid sur des octamères recombinants. Ces derniers ont été surexprimés dans les bactéries et purifiés. Ils ne possèdent donc pas de pré-modifications comme les octamères natifs issus de cellules HeLa. Après incubation, les histones ont été déposées sur gel SDS-Page et analysées par WB (Figure 35). Un anticorps dirigé spécifiquement contre la lysine 9 acétylée de H3 ainsi qu'un anticorps dirigé contre la lysine 14 acétylée de H3 ont été utilisés. Il en ressort que GCN5, au sein des différents contextes protéiques, acétyle les octamères sur la position 9 et 14 de H3. Le profil d'acétylation suit celui que nous avons observé sur l'acétylation dans son ensemble (Figure 35). GCN5 a besoin d'être au sein d'un module HAT pour agir sur le substrat, mais l'activité complète est visible seulement dans le contexte du complexe entier. De plus rHAT ATAC est moins actif que rHAT SAGA sur la lysine 14. Pour le résidu 9, nous pouvons même faire remarquer que le signal est à peine visible pour rHAT ATAC en comparaison de rHAT SAGA (Figure 35 comparer les pistes 3 et 5). Nous avons vu précédemment que rHAT ATAC acétyle mieux l'histone H4 que rHAT SAGA. J'ai utilisé alors un anticorps dirigé contre la lysine 5 acétylée de H4. Dans ce cas, le complexe ATAC a pu acétyle cette position, contrairement à SAGA où le signal est beaucoup plus faible (comparer pistes 4 et 6).

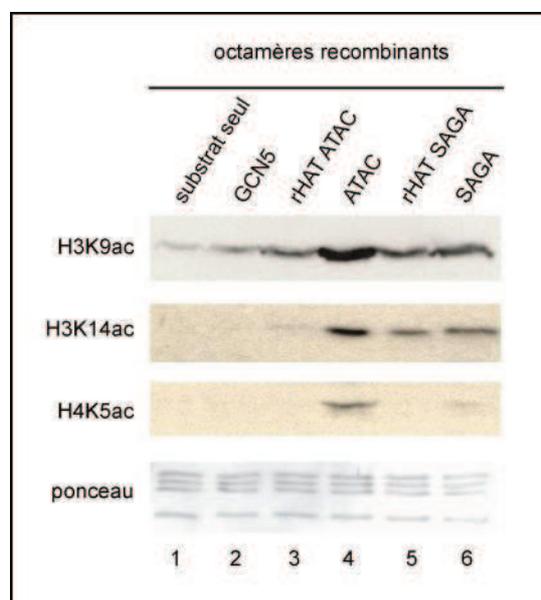


Figure 35 : Les modules rHAT et les complexes endogènes acétylent les lysines 9 et 14 de l'histone H3 au sein des octamères recombinants.

GCN5 recombinante, les modules rHAT (rHAT ATAC et rHAT SAGA) et les complexes endogènes (ATAC et SAGA) ont été normalisés entre eux selon la quantité en GCN5 comme vu précédemment. Ils ont été incubés avec des octamères recombinants, surexprimés et purifiés à partir de bactéries, en présence d'acétylCoA froid. Après migration sur gel SDS-Page, les positions acétylées ont été analysées par WB grâce à des anticorps spécifiques de H3K9 acétylée, H3K14 acétylée ou encore H4K5 acétylée.

Je tiens à préciser ici que ces résultats sont préliminaires et nécessitent plus d'investigation pour une publication, notamment pour les résidus acétylés sur H4. Afin d'avoir une idée plus précise des résidus des octamères recombinants ayant été acétylés par les différents modules et complexes, nous voulons répéter l'expérience mais analyser les résultats par spectrométrie de masse. A l'heure où je rédige ce manuscrit, ces derniers ne sont pas disponibles.

6. Les modules rHAT et les complexes endogènes ne sont plus capable d'acétyler les histones dans le contexte du nucléosome dans les tests *in vitro* utilisés

Nous avons donc pu mettre en évidence qu'il existe une régulation allostérique de l'enzyme GCN5, ses partenaires protéiques permettant d'augmenter l'acétylation des substrats. Nous avons aussi pu voir que lorsque l'enzyme est au sein du module HAT de SAGA, elle acétyle mieux H3 que dans le contexte du module HAT d'ATAC ; l'inverse est observé sur H4. Néanmoins, il n'y a pas de grande différence dans la spécificité d'acétylation de H3 des complexes endogènes.

Pour déceler si les complexes peuvent agir de manière plus ou moins spécifique sur les histones, nous avons voulu répéter les tests mais dans le contexte du nucléosome. Philipp Tropberger, de l'équipe de Robert Schneider (IGBMC), a produit des octamères et des mononucléosomes recombinants afin de réaliser ces expériences. Comme pour les octamères, les mononucléosomes ont été incubés avec les modules et complexes et de l'acétylCoA radioactif (Figure 36). Malgré des temps d'exposition plus ou moins longs, il n'est pas possible de détecter un signal sur les mononucléosomes (pistes 6 à 11) alors qu'il suffit de quelques heures pour détecter déjà un signal pour les octamères (pistes 1 à 5).

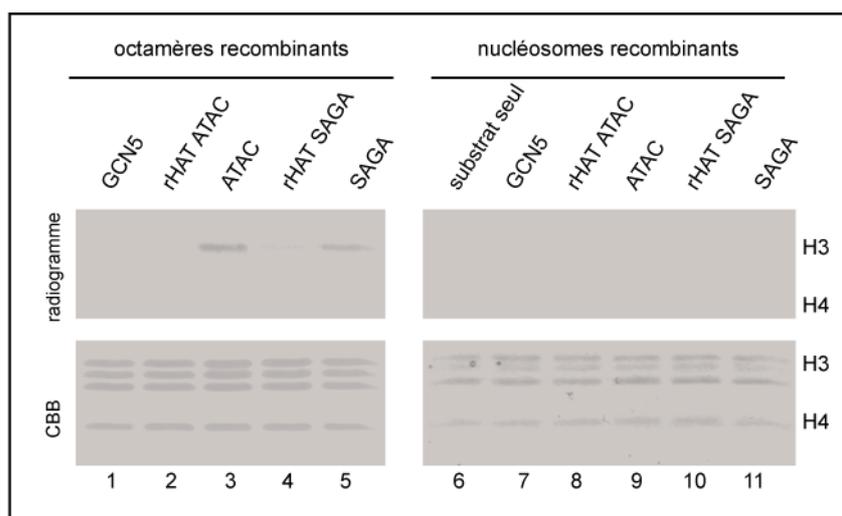


Figure 36 : Les enzymes ne peuvent acétyler les nucléosomes recombinants.

Les octamères et mononucléosomes recombinants ont été incubés avec GCN5, les modules rHAT ou les complexes endogènes en présence d'acétylCoA radioactif. Après migration des substrats sur gel-SDS Page, le signal radioactif est visualisé par radiographie (radiogramme).

L'ADN utilisé pour former les nucléosomes contient cinq répétitions du site de liaison de l'activateur de levure GAL4. Il existe une protéine chimérique GAL4VP16, composée du domaine de liaison de GAL4 et du domaine activateur de VP16, permettant le recrutement de SAGA sur la chromatine (Hardy et al., 2002). Ajouter GAL4VP16 à la réaction pourrait permettre un meilleur recrutement des complexes sur les nucléosomes recombinants et donc de pouvoir détecter un signal. La protéine GAL4VP16 a donc été surexprimée et produite à partir de bactéries, puis mise à incuber avec les nucléosomes recombinants avant d'ajouter les enzymes et l'acétylCoA radioactif à la réaction (Figure 37).

Sur les nucléosomes non incubés avec l'activateur, il n'est toujours pas possible d'apercevoir de signal (pistes 1 à 6). Pour les nucléosomes ayant été incubés avec GAL4VP16 le bruit de fond est malheureusement trop fort pour apporter une conclusion mais il semblerait y avoir un signal sur H3 pour ATAC, rHAT SAGA et SAGA (pistes 10 à 12). En vue d'une publication, cette expérience serait à reproduire dans des conditions plus optimales.

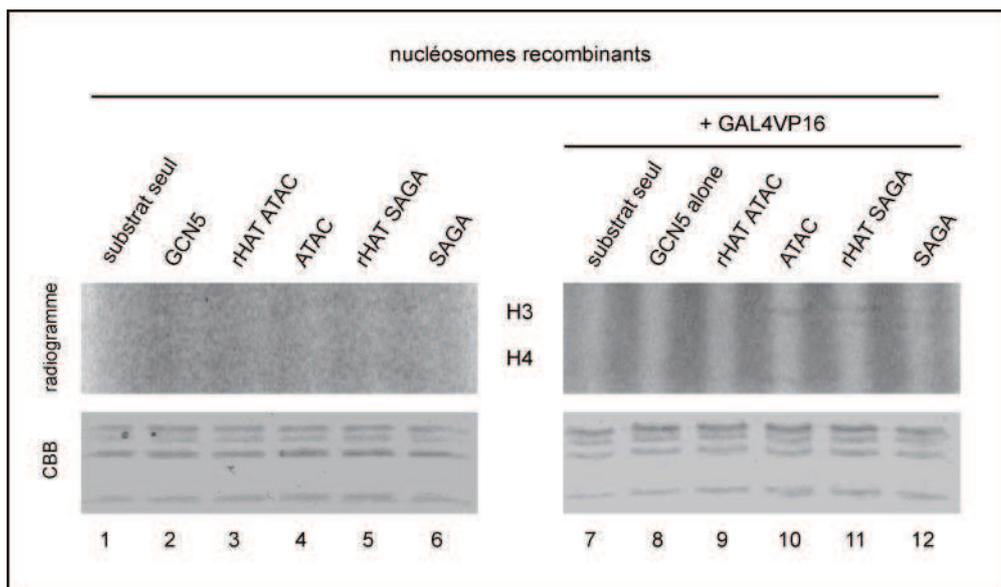


Figure 37 : GAL4VP16 permettrait un meilleur recrutement des complexes sur les nucléosomes mais ce n'est pas suffisant.

GCN5 recombinante, les modules rHAT et les complexes endogènes ont été incubés avec les nucléosomes recombinants en présence d'acétylCoA radioactif. Dans un cas, l'expérience est produite en parallèle avec une pré-incubation des nucléosomes avec GAL4VP16 (pistes 7 à 12). Les échantillons ont ensuite été déposés sur gel SDS-Page et le signal radioactif visualisé par radiographie.

7. Les sous-unités des complexes permettent le recrutement de l'enzyme sur la chromatine pré-modifiée

L'activité de l'enzyme GCN5 est donc influencée par ses partenaires protéiques, ADA2a/b, ADA3 et SGF29. Cependant, d'autres protéines des complexes ATAC et SAGA complète cette activité. Celles-ci peuvent agir sur l'enzyme de différentes manières mais nous nous sommes posé la question si certaines d'entre elles pouvaient jouer ce rôle en aidant le recrutement de l'enzyme sur la chromatine.

Pour ce faire, nous avons comparé l'activité d'acétylation obtenue sur des tétramères H3/H4 natifs (présentant déjà un certain nombre de modifications) et des tétramères recombinants (comprenant des histones non modifiées). Les tétramères ont été normalisés selon la quantité en histones sur gel SDS Page coloré au CBB (Figure 38 A). Les substrats ainsi harmonisés ont été incubés avec GCN5 recombinante, les modules rHAT ou les complexes endogènes en présence d'acétylCoA radioactif. Les échantillons ont ensuite été déposés sur gel SDS-Page et le signal radioactif visualisé par radiographie (Figure 38 A).

A première vue, les signaux sur les tétramères natifs semblent plus forts que ceux des tétramères recombinants. Pour confirmer cette impression, les signaux ont été quantifiés par ImageQuant (Figure 38 B). De façon générale, nous pouvons conclure que les tétramères pré-modifiés sont plus acétylés par les modules rHAT et les complexes que dans le cas des tétramères recombinants. D'une certaine manière, les pré-modifications doivent permettre un meilleur recrutement de l'enzyme sur son substrat.

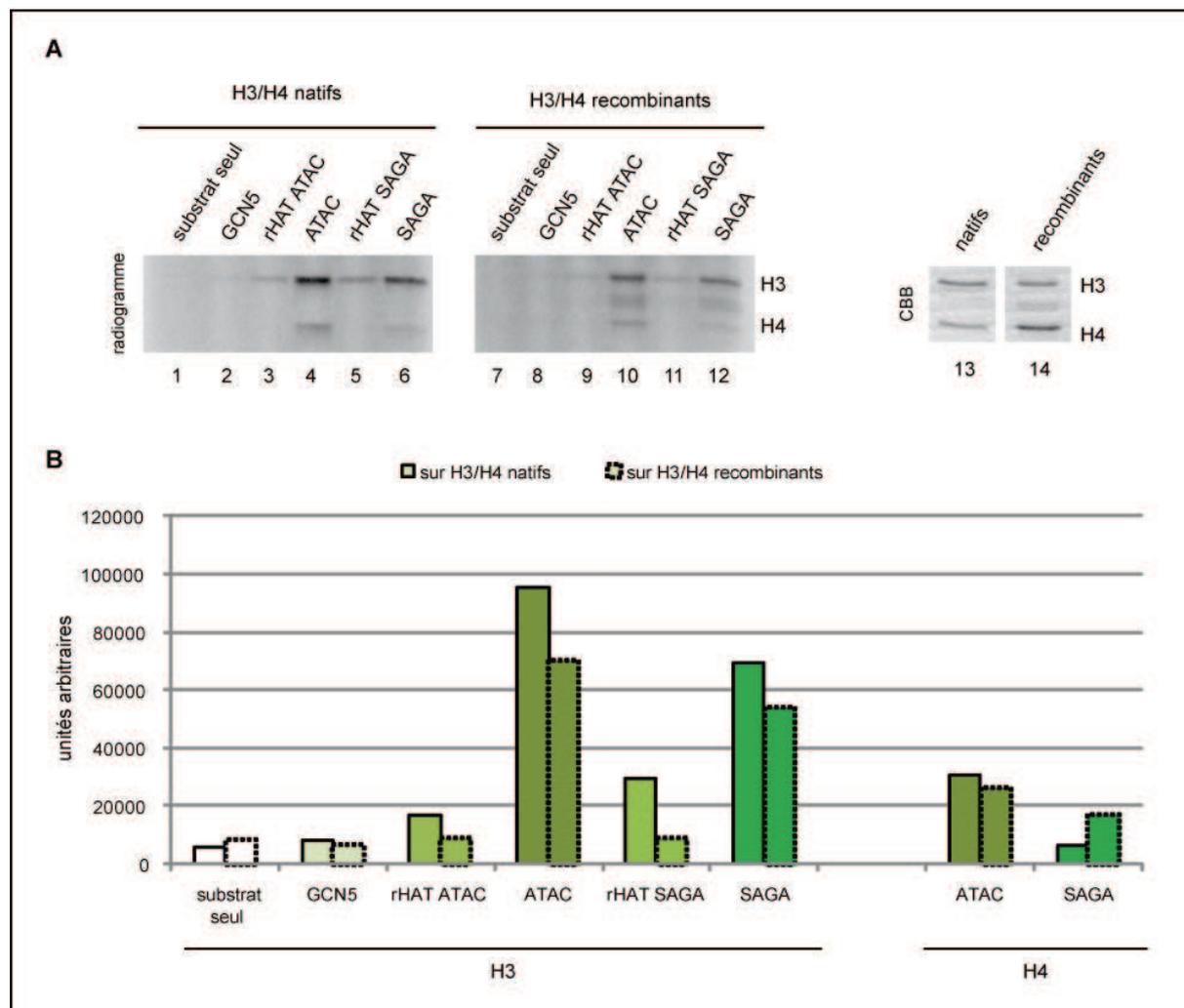


Figure 38 : L'activité de GCN5 est meilleure sur des tétramères H3/H4 natifs que recombinants.

A. La quantité de tétramères H3/H4 natifs issus de cellule HeLa et celle des tétramères recombinants purifiés à partir de bactéries a été normalisée selon H3 sur gel SDS-Page coloré au CBB. Les substrats ont ensuite été incubés avec GCN5 recombinantes, les modules rHAT (rHAT ATAC et rHAT SAGA) ou les complexes endogènes (ATAC et SAGA) avec de l'acétylCoA radioactif. Après migration des protéines sur gel SDS-Page, le signal radioactif a été détecté par le scanner PhosphorImager (radiogramme).

B. L'intensité du signal radioactif obtenu sur les tétramères H3/H4 natifs et recombinants a été quantifiée par ImageQuant.

8. La sous-unité SGF29 permet un meilleur recrutement de GCN5 sur le substrat histone

L'équipe de Marc Timmers (Utrecht, Pays-Bas) s'intéresse au rôle des pré-modifications de la chromatine dans le recrutement des facteurs. En particulier, Andree Schram, une doctorante de son équipe, étudie la reconnaissance de la lysine 4 triméthylée de l'histone H3 par la protéine SGF29. En effet, de ce que nous savons de la littérature, SGF29 se lie à cette modification via le domaine Tudor et permet ainsi le recrutement de SAGA (voir Introduction et (Bian et al., 2011)). Andree Schram a pu confirmer la liaison de SGF29 sur des peptides portant une telle modification. La question, qui se posait alors, était de savoir s'il était aussi possible de recruter ATAC, si SGF29 permet le recrutement des modules HATs et ce dans le contexte de l'octamère.

En collaboration avec Andree Schram, nous avons effectué des tests d'acétylation sur des octamères recombinants (dits WT) en comparaison avec des octamères recombinants portant la modification H3K4me3 produits au sein de son équipe. Des modules recombinants rHAT pour ATAC, avec ou sans SGF29, ont été purifiés à partir d'extraits de cellules d'insecte (GCN5-ADA2a-ADA3 et GCN5-ADA2a-ADA3-SGF29). Il a été fait de même pour rHAT SAGA (GCN5-ADA2b-ADA3 et GCN5-ADA2b-ADA3-SGF29). Ces modules ont été normalisés entre eux selon la quantité en GCN5 par WB (voir Figure 39 A). Ils ont ensuite été incubés avec de l'acétylCoA radioactif en présence d'octamères recombinants WT, portant la modification H3K4 triméthylée (H3K4me3) ou monométhylée (H3K4me1) (Figure 39 B).

Dans un premier temps, nous pouvons constater que le signal est plus fort dans le cas des octamères pré-modifiés comparés au WT (comparer piste 4 avec 5 et 6 par exemple). De plus, nous voyons que le module rHAT SAGA reste plus actif que rHAT ATAC (comparer la piste 5 avec la piste 11 par exemple) et ce avec ou sans SGF29. Ce qui nous a le plus interpellé est que l'activité semble meilleure sur H3K4me3 quand le module contient SGF29 (comparer pistes 11 et 14). Bien que l'activité augmente aussi avec H3K4me1, il semblerait qu'elle reste néanmoins moins forte qu'avec les octamères H3K4me3 (comparer pistes 14 et 15).

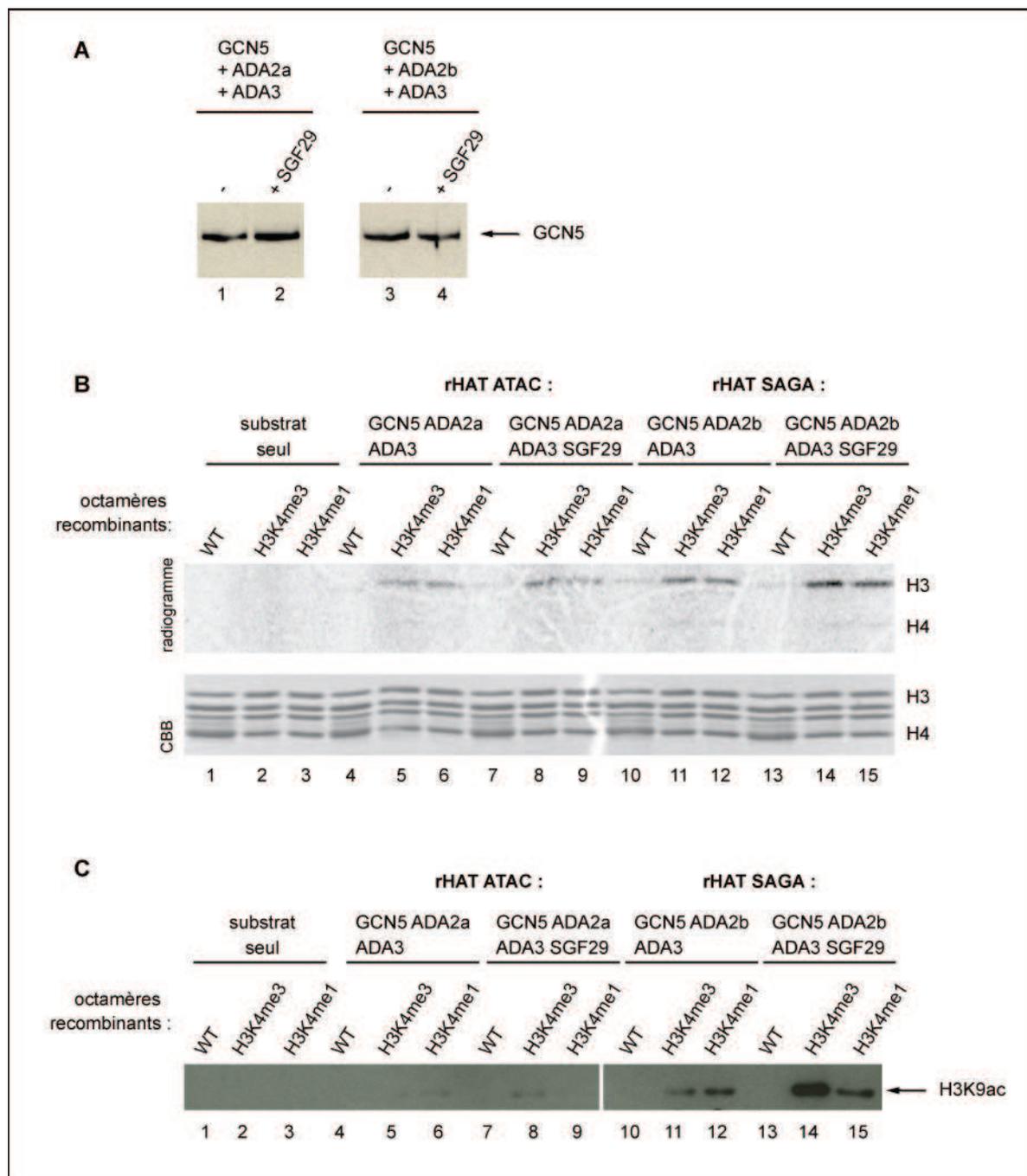


Figure 39 : SGF29 permet un meilleur recrutement de GCN5 sur les octamères H3K4me3.

A. Normalisation des modules rHAT ATAC et rHAT SAGA avec ou sans SGF29 selon la quantité en GCN5. Les modules rHAT pour ATAC (GCN5-ADA2a-ADA3) et SAGA (GCN5-ADA2b-ADA3) ont été purifiés en présence ou non de SGF29 recombinante à partir d'extraits de cellules d'insecte. La concentration de chaque échantillon a été normalisée selon la quantité en GCN5 par WB.

B. Ces quatre modules ont été incubés avec des octamères recombinants sans modification (WT), présentant la modification H3K4 triméthylée (H3K4me3) ou H3K4 monométhylée (H3K4me1) en présence d'acétylCoA radioactif. Les substrats ont ensuite été déposés sur un gel SDS-Page et le signal radioactif visualisé par radiographie sur écran PhosphorImager (radiogramme). Le substrat seul a été incubé sans les enzymes et constitue donc un contrôle négatif.

C. Les modules ont été incubés avec les octamères recombinants comme précédemment, mais cette fois-ci avec de l'acétylCoA froid. Après migration sur gel SDS-Page, la quantité de lysine 9 acétylée sur H3 a été visualisée par WB avec un anticorps spécifique de cette modification (H3K9ac). Les quantités visualisées par gel coloré au

CBB en B sont proportionnelles à celles utilisées pour le WB et montrent la bonne normalisation des octamères recombinants entre eux.

Afin de confirmer ces résultats de façon plus précise, l'expérience a été répétée mais, en présence d'acétylCoA froid. Les substrats ont été mis à migrer sur gel SDS-Page mais, cette fois, la présence de lysine 9 acétylée sur l'histone H3 a été visualisée par WB (Figure 39 C). Nous confirmons les résultats obtenus précédemment, les modules recombinants ont acétylé plus efficacement les octamères présentant les pré-modifications (comparer pistes 11 et 12). De façon intéressante, lorsque le module rHAT SAGA ne contient pas SGF29, celui-ci acétyle de façon équivalente les octamères mono et triméthylés (pistes 11 et 12) alors que lorsque les modules contiennent SGF29, il est visible que ces derniers sont plus actifs sur les octamères H3K4me3 (comparer pistes 14 et 15). Un tel profil existe aussi pour rHAT ATAC, mais est moins facilement observable sur le film de WB au vu de la plus faible activité comparé à rHAT SAGA (pistes 5 et 6, puis 8 et 9).

La modification de la lysine 4 de l'histone H3 joue donc sur l'activité d'acétylation d'ATAC et SAGA. SGF29 permet un recrutement spécifique des complexes sur les octamères présentant H3K4 triméthylée.

C. Résultats non utilisés pour une publication

1. Construction de modules et agrandissement des complexes en utilisant des protéines recombinantes

L'activité de GCN5 sur les histones étant influencée par les partenaires protéiques de l'enzyme, j'ai essayé de comprendre l'organisation du module rHAT et d'agrandir ce module en y ajoutant de nouvelles sous-unités.

a. Construction de modules rHAT partiels

GCN5 a besoin de ses partenaires ADA2a/b, ADA3 et SGF29 pour présenter une meilleure activité enzymatique. Or, ces deux types de module HAT ont une activité différente selon qu'il contient ADA2a ou ADA2b. J'ai alors voulu savoir s'il était possible de purifier

des dimères GCN5-ADA2a et GCN5-ADA2b. Pour cela, des IP sur les protéines surexprimées dans des cellules d'insecte ont été effectuées (Figure 40).

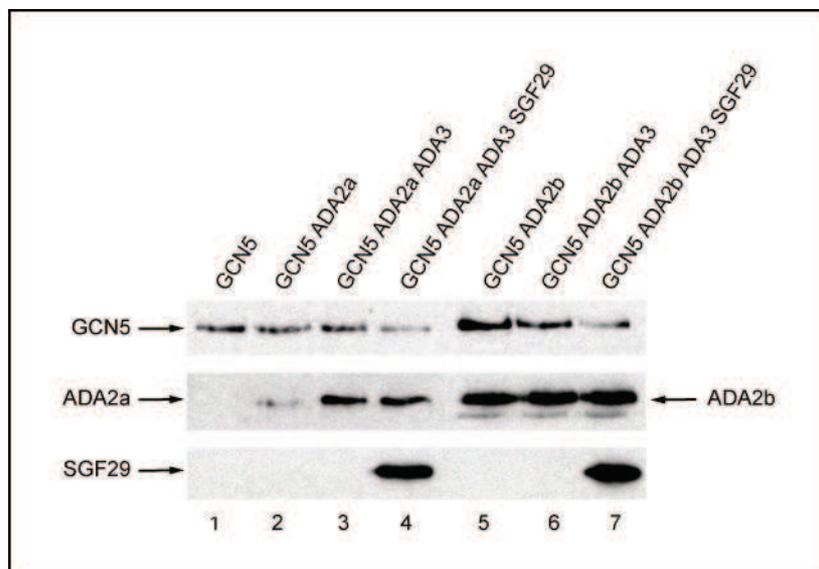


Figure 40 : ADA2b interagit avec GCN5, l'interaction avec ADA2a nécessite ADA3.

Des IPs dirigées contre GCN5 sur des extraits de cellules d'insecte surexprimant les protéines recombinantes ont été effectuées, afin d'établir s'il était possible de purifier des modules plus petits que celui formé par quatre protéines. Les protéines interagissant avec GCN5 ont ensuite été visualisées par WB.

ADA2b interagit bien avec GCN5 (piste 5). Cependant, il n'est pas possible de purifier GCN5 avec ADA2a, l'interaction entre ces deux protéines étant faible (piste 2). C'est avec l'ajout d'ADA3 qu'il est possible de recruter ADA2a dans un module (piste 3).

Nous avons vu que l'activité de GCN5 augmente lorsque celle-ci est au sein du module HAT. ADA2a/b, ADA3 et SGF29 agissent donc sur l'activité enzymatique de GCN5. Or, nous avons aussi montré que la présence de ces protéines n'est pas suffisante pour obtenir une activité comparable à celle du complexe entier. D'autres sous-unités manquent encore pour expliquer cette différence.

Afin de découvrir quelles autres protéines agissent sur GCN5, nous avons voulu savoir quelles protéines interagissent avec le module HAT, et ce chez hATAC et hSAGA.

b. Agrandissement du complexe hSAGA à partir du module rHAT

- i. ADA1 et TAF12 interagissent avec le module HAT mais ne semblent pas agir sur l'activité de GCN5

Il a été montré que les protéines ADA1 et TAF12 interagissent ensemble, de même pour TAF6L et TAF9 (Gangloff et al., 2000). Nous avons alors choisi d'étudier si ces dernières, en plus de SPT20, peuvent interagir avec le module rHAT.

Les sous-unités du complexes hSAGA ont ainsi été surexprimées après infection de cellules d'insecte par baculovirus. Les extraits protéiques contiennent le module rHAT surexprimé avec soit :

- (1) SPT20 surexprimée
- (2) TAF6L et TAF9 surexprimées
- (3) ADA1 et TAF12 surexprimées

Chaque extrait a alors été incubé avec un anticorps contre GCN5, la sous-unité du module HAT, fixé sur des billes (IP). L'éluat a ensuite été analysé par coloration CBB d'un gel SGD-Page (Figure 41 A). Notons que des IPs contre GCN5 sur des extraits contenant uniquement SPT20, TAF6L+TAF9 ou ADA1+TAF12 ont été effectuées comme contrôles négatifs (pistes 2, 4 et 6). Les protéines du module HAT ont effectivement retenues (GCN5, ADA2b, ADA3 et SGF29, pistes 1, 3, 5 et 7). Les protéines SPT20, TAF6L et TAF9 ne sont pas visibles sur le gel, elles n'ont donc pas été retenues par IP. En revanche, ADA1 et TAF12 ont été purifiées (piste 1). ADA1 et TAF12 interagissent ainsi avec le module HAT.

Afin de savoir si ADA1 et TAF12 peuvent jouer un rôle sur l'activité de GCN5, des tests d'activité sur des peptides mimant la queue N-terminale de l'histone H3 ont été effectués. L'activité du module rHAT-ADA1-TAF12 a été comparée à celle du module HAT seul (Figure 41 B). Il ne semble pas avoir d'effet sur l'activité de GCN5. Néanmoins cette expérience nécessite d'être répétée avec une meilleure normalisation des protéines sur WB.

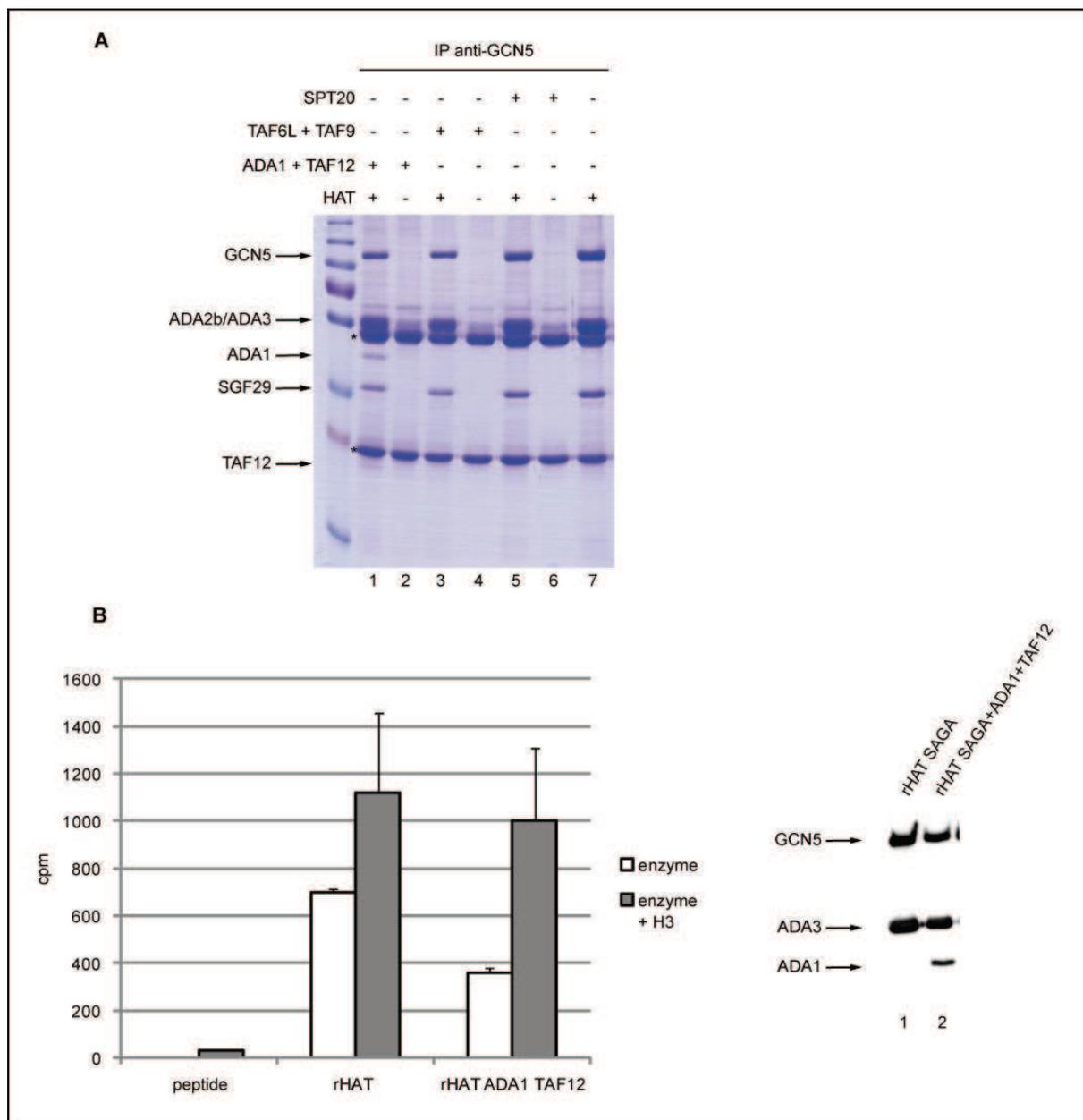


Figure 41 : ADA1 et TAF12 interagissent avec le module rHAT mais ne semblent pas agir sur l'activité du module.

A. Des IPs contre GCN5 (soit le module HAT) ont été effectuées sur des extraits de cellules d'insecte surexprimant également soit ADA1+TAF12 (piste 1), soit TAF6L+TAF9 (piste 3) ou encore SPT20 (piste 5). Le module rHAT seul constitue le contrôle positif (piste 7). Les autres protéines exprimées sans le module rHAT sont des contrôles négatifs (pistes 2, 4 et 6). Les protéines ont été visualisées par coloration au CBB.

B. Le module rHAT et le module rHAT purifié avec ADA1+TAF12 ont été visualisés par WB et leur activité testée sur des peptides mimant la queue N-terminale de l'histone H3 (colonnes en gris dans le graphique). Les modules ont aussi été testés sans peptide comme contrôles négatifs (colonnes blanches). En ordonnée : coup par minute.

ii. Il n'y a pas d'interaction entre les modules HAT et DUB

Le module HAT est composé de quatre protéines : GCN5-ADA2b-ADA3-SGF29. Le module de déubiquitination (DUB) est aussi composé de quatre protéines : USP22-ATXN7-ATXNL3-ENY2. Ces deux modules constituent les cœurs enzymatiques du complexe hSAGA. J'ai alors voulu savoir si ces deux modules pouvaient interagir ensemble pour agrandir le complexe.

Chaque module a été surexprimé dans des cellules d'insecte. Une IP contre GCN5 a été effectué sur le module rHAT comme contrôle positif (C+), sur le module rDUB seul comme contrôle négatif (C-). L'interaction entre les deux modules a été testée par IP contre GCN5 sur un extrait contenant les protéines du rHAT et du rDUB (T) (Figure 42 A). Après incubation des extraits, les billes ont subi des lavages plus ou moins stringents et les protéines encore retenues ont été éluées grâce à une compétition avec des peptides. L'éluat ainsi obtenu et le surnageant ont été analysés par WB (Figure 42 B). Les protéines du module rHAT sont effectivement retrouvées dans l'éluat pour le contrôle positif et le test (pistes 5 et 6). En revanche, le module rDUB se retrouve dans le surnageant (piste 1 et 2). Le module rDUB n'a donc pas été retenu sur les billes : il n'y a pas d'interaction directe entre les modules rHAT et rDUB.

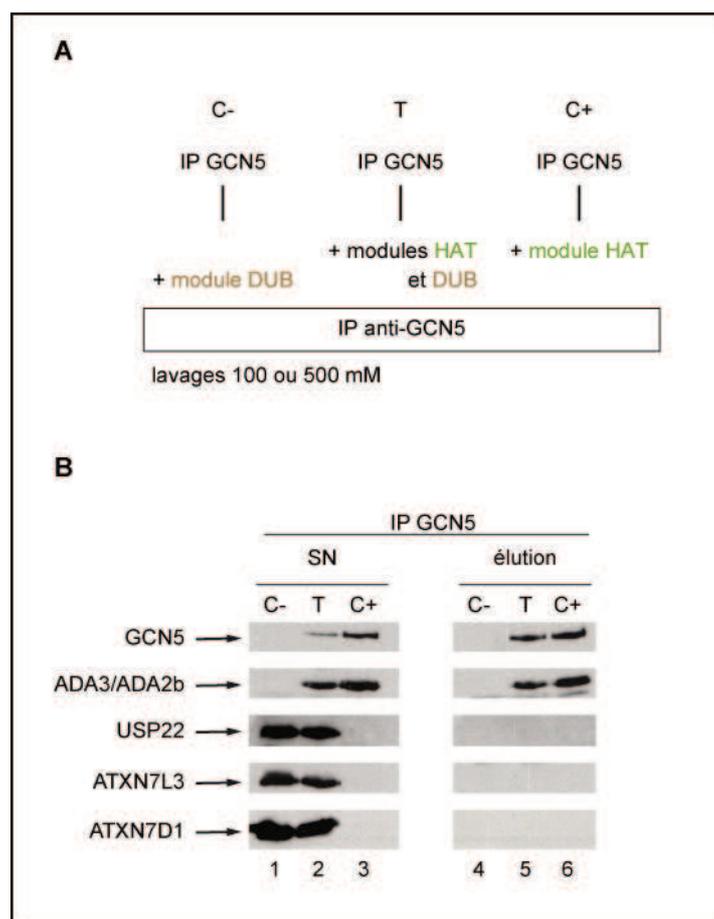


Figure 42 : Il n'y a pas d'interaction directe entre les modules rHAT et rDUB.

A. Schéma des IPs dirigées contre GCN5 effectuées sur des extraits de cellules d'insecte exprimant les protéines recombinantes. Après le temps d'incubation de l'IP, les billes ont été lavées à des concentrations en sel de 100 mM ou 500 mM et les protéines éluées par compétition avec le peptide GCN5.

B. Les éluats et les surnageants des IPs ont été déposés sur gel SDS-Page et les protéines du module HAT (GCN5, ADA2b et ADA3) et celles du module DUB (USP22, ATXN7L3 et ATXN7) ont été visualisées par WB. Les pistes 1 à 3 correspondent au surnageant des IPs (SN), les pistes 4 à 6 aux éluats (élution).

iii. Est-il possible de relier les modules rHAT et rDUB par d'autres protéines ?

L'expérience précédente a montré que les modules recombinants rHAT et rDUB n'interagissent pas ensemble. La question suivante a alors été de savoir s'il était possible de relier ces derniers par d'autres sous-unités de hSAGA.

La protéine SPT20 a un rôle dans l'intégrité structurale du complexe (Nagy et al., 2009; Sterner et al., 1999). De plus, il a été suggéré chez la levure que les protéines Spt, dont ySpt20, seraient proches du module DUB au sein du complexe SAGA (Lee et al., 2011). Nous pouvons supposer que celle-ci peut permettre de faire un lien entre les deux modules. Comme ySpt7 fait aussi partie du module SPT dans le papier de Lee et al. (Lee et al., 2011), j'ai aussi pris cette protéine en considération. Nous avons montré qu'ADA1 et TAF12 interagissent

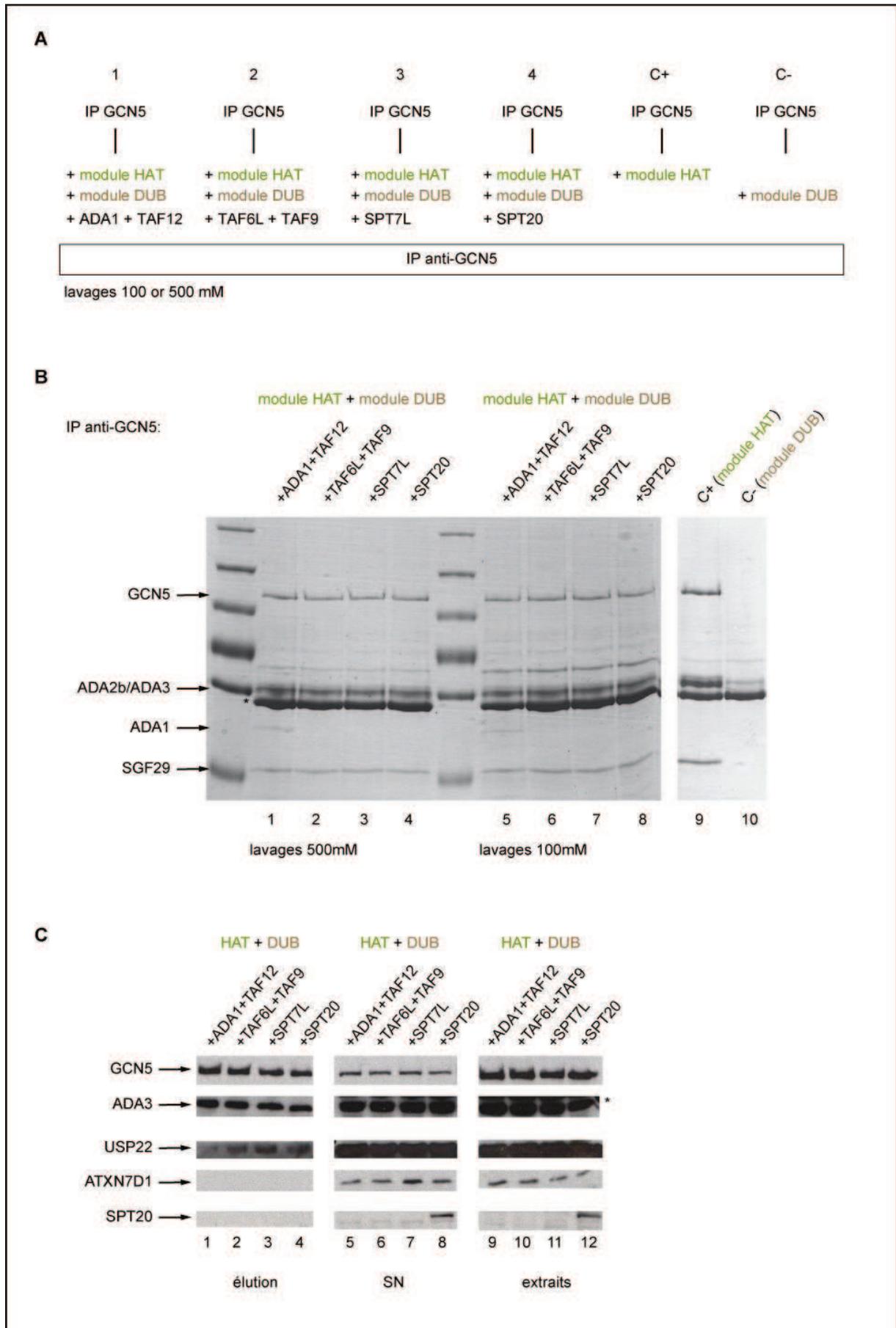
avec le module rHAT, peut-être que ces dernières servent de « lien » avec le DUB ? En outre, nous ne pouvons oublier les TAFs, ainsi nous avons également pris en compte le duo TAF6L-TAF9.

Comme précédemment, les modules rHAT et rDUB ont été surexprimés dans les cellules d'insecte. Selon les tests, les protéines ADA1-TAF12, TAF6L-TAF9, SPT7L ou SPT20 ont été surexprimées en plus dans ces cellules. Des IP contre GCN5 sur chacun de ces extraits ont ensuite été réalisées (Figure 43 A). Une IP sur le module rHAT seul constitue le contrôle positif, sur le rDUB seul le contrôle négatif. Après incubation, les billes ont été lavées à différentes concentrations de sel, puis déposées directement sur gel SDS-PAGE. Les protéines ayant été retenues par l'IP sont révélées par coloration au CBB (Figure 43 B).

Les protéines du module rHAT sont visibles dans chacun des cas (pistes 1 à 9). De même, ADA1 a aussi été retenue comme vu précédemment (piste 1). Notons, que les protéines TAF6L-TAF9, SPT7L et SPT20 ne sont pas retenues. Nous aurions pu nous attendre à les voir interagir avec le module rHAT avec ajout du DUB. Cependant, aucune protéine du module DUB n'apparaissent (pistes 1 à 8). Afin de valider ces observations et confirmer l'identité des protéines, les IP ont été répétées mais, cette fois-ci, les protéines ont été éluées et analysées par WB (Figure 43 C). Les protéines du module rHAT ont bien été retenues (pistes 1 à 4). Mais les protéines du rDUB ainsi que SPT20 se trouvent bien dans le surnageant de l'IP.

Figure 43 : Les protéines ADA1, TAF12, TAF6L, TAF9, SPT7L et SPT20 ne permettent une interaction entre les modules rHAT et rDUB.

- A. Schéma des IPs dirigées contre GCN5 effectuées sur des extraits de cellules d'insecte exprimant les protéines recombinantes. Après incubation IP, les billes ont été lavées à des concentrations en sel de 100 mM ou 500 mM.
- B. Les billes ont été déposées sur gel SDS-Page et les protéines visualisées par coloration au CBB. . Les pistes 1 à 4 correspondent aux billes ayant été lavées à une concentration de 500 mM, les pistes 5 à 8 à une concentration de 100 mM.
- C. Les IPs ont été répétées mais, cette fois-ci, les protéines ont été éluées par compétition avec le peptide GCN5 et visualisées par WB (pistes 1 à 4, élution). Les surnageants des IPs ainsi que les extraits cellulaires de départ ont aussi été analysés (pistes 5 à 8 SN et pistes 9 à 12 extraits).



iv. Les modules rHAT et rTAF n'interagissent pas

Nous avons vu que les modules rHAT et rDUB n'interagissent pas ensemble mais que les protéines ADA1-TAF12 sont immunoprécipitées avec celles du rHAT. Or, dans le complexe hSAGA, il existe un autre module contenant des TAFs (TAF5L, TAF6L, TAF9, TAF10, TAF12). Les protéines du module HAT ainsi que certaines du module TAF (TAF5L-TAF6L-TAF9-TAF12) avec ADA1 ont été surexprimées dans les cellules d'insectes et immunoprécipitées contre GCN5 (Figure 44 A). Une IP contre rHAT constitue le contrôle positif, tandis que celle sur rTAF seul, constitue le contrôle négatif. Les billes ont été directement déposées sur un gel SDS-Page coloré au nitrate d'argent (Figure 44 B, pistes 4 à 6). Les IP ont été répétées et cette fois les protéines ont été éluées et analysées comme précédemment (pistes 1 à 3). Les protéines du module rHAT ont bien été retenues, ainsi qu'ADA1. Mais aucune TAFs n'est mise en évidence.

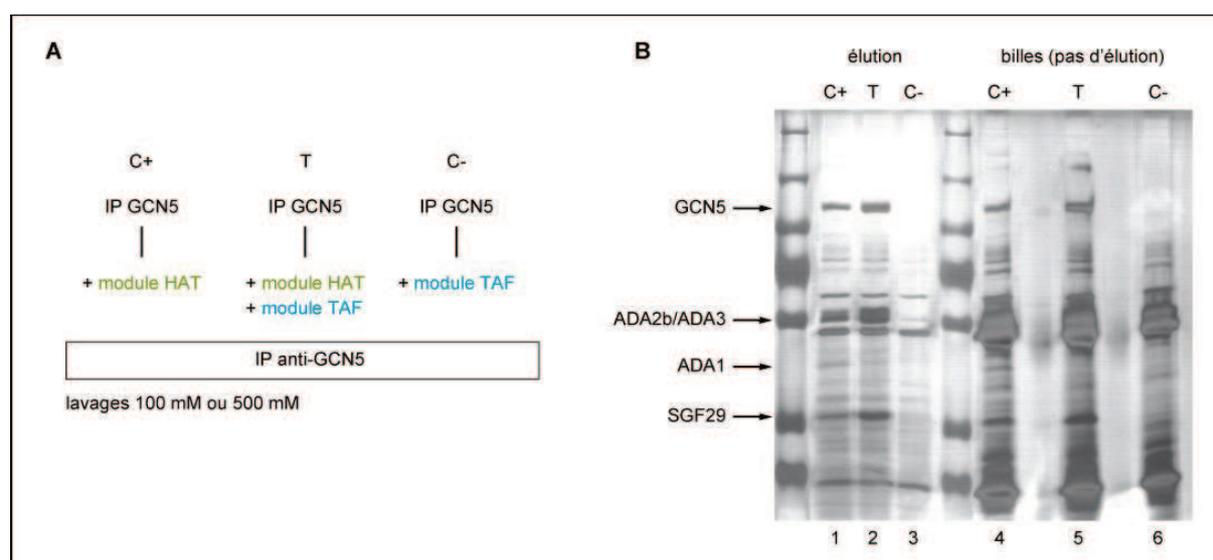


Figure 44 : Les modules rTAF et rHAT ne semblent pas interagir.

Les protéines du module HAT (GCN5-ADA2b-ADA3-SGF29) et du module TAF (TAF5L-TAF6L-TAF9-TAF12-ADA1) ont été surexprimées dans des cellules d'insecte.

A. Schéma des IPs dirigées contre GCN5 effectuées sur des extraits de cellules d'insecte exprimant les protéines recombinantes. Après incubation pour IP, les billes ont été lavées à des concentrations en sel de 100 mM ou 500 mM. Une IP contre la protéine GCN5 a été effectuée sur un extrait contenant les deux modules (T). Une IP contre GCN5 sur le module HAT (C+) constitue un contrôle positif, l'IP sur le module TAF un contrôle négatif (C-).

B. Les protéines retenues par l'IP contre GCN5 sont visualisées par coloration à l'argent après élution grâce à un peptide (pistes 1 à 3) ou les billes ont été directement utilisées pour le gel (pistes 4 à 6).

c. Agrandissement du complexe hATAC à partir du module rHAT

i. Il existe une très faible liaison entre hATAC2 et hWDR5

Lors de l'étude de l'activité de hATAC2, il n'a pas été possible de mettre en évidence une activité d'acétylation (cf Partie 2). L'activité de hGCN5 augmente en présence des protéines du module HAT. Du coup, une des hypothèses serait que hATAC2 ait aussi besoin de partenaire(s) pour exprimer son activité (de façon plus drastique que hGCN5). J'ai alors essayé l'activité d'ATAC2 avec ses partenaires GCN5 et SGF29 (voir Partie 2) mais sans résultat. Afin d'agrandir le module rHAT, j'ai cherché quels partenaires pourraient interagir avec ATAC2.

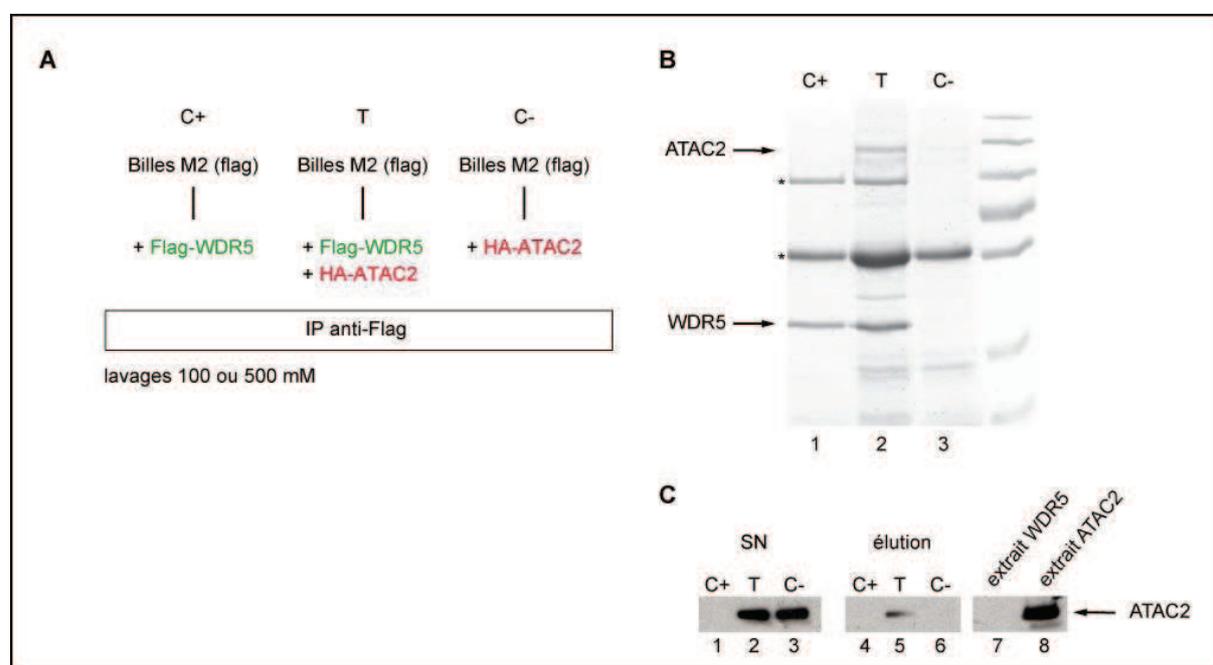


Figure 45 : Il n'existe qu'une très faible interaction entre ATAC2 et WDR5.

A. Les protéines ATAC2 (taguée HA) et WDR5 (taguée Flag) ont été surexprimées dans des cellules d'insectes. Afin d'étudier une interaction entre les deux protéines une IP contre le tag de WDR5 a été effectuée (T). Une IP contre WDR5 constitue un contrôle positif (C+), contre ATAC2 un contrôle négatif (C-).

B. Les billes après IP ont été analysées par CBB : WDR5 se retrouve bien dans le contrôle et le test (piste 1 et 2).

C. Afin de vérifier si ATAC2 interagit ou non avec WDR5, les IP ont été répétées et les protéines éluées. ATAC2 est légèrement visible dans l'éluat (piste 5).

Le complexe hATAC contient plusieurs sous-unités ; au laboratoire, nous avons les plasmides pour hATAC2 et hWDR5 pour surexprimer les protéines dans des cellules d'insecte après infection par baculovirus. J'ai alors cherché à savoir si ces deux protéines pouvaient interagir. Pour cela, des IP dirigées contre WDR5 ont été effectuées sur les extraits

cellulaires contenant les protéines surexprimées (Figure 45 A). L'IP contre WDR5 seule constitue le contrôle positif (C+), contre ATAC2 seule le contrôle négatif (C-). Dans un premier temps, les billes ont été déposées sur gel SDS-Page et les protéines visualisées par CBB (Figure 45 B).

ATAC2 semble avoir été retenue (piste 2). Afin de confirmer ce résultat, l'IP a été répétée et les protéines éluées cette fois-ci : le signal pour ATAC2 est visible en WB, mais la majorité de la protéine se retrouve dans le surnageant (C pistes 2 et 5).

Le même type d'expérience a ensuite été réalisée mais, en dirigeant l'IP contre ATAC2 (Figure 46 A). Sur le gel coloré au CBB et en WB (B et C), la présence de WDR5 est très faible.

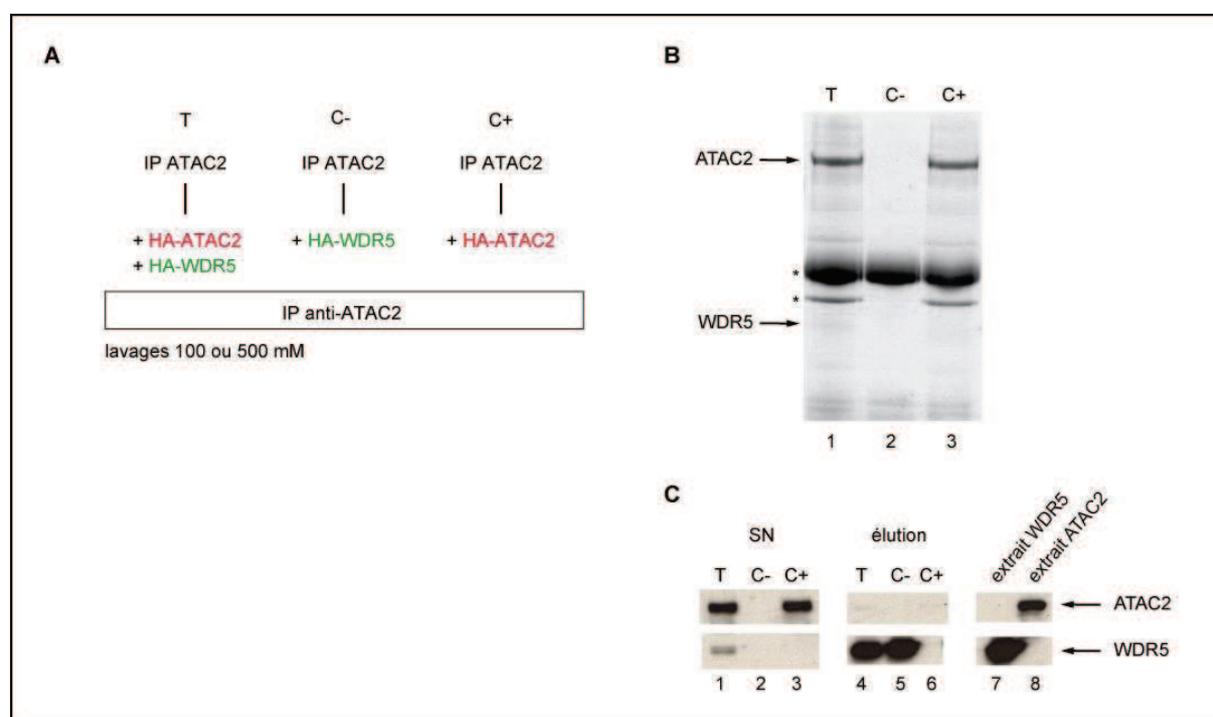


Figure 46 : Confirmation d'une trop faible interaction entre ATAC2 et WDR5.

A. Les protéines ATAC2 et WDR5 ont été surexprimées dans des cellules d'insecte. L'interaction entre les deux protéines a été testée après IP contre ATAC2 (T). L'IP avec WDR5 seule sert de contrôle négatif, contre ATAC2 de contrôle positif.

B. Les billes après IP ont été analysées par CBB : ATAC2 est bien visible dans le contrôle et le test (piste 1 et 3).

C. Afin de confirmer les résultats obtenus en B, les IP ont été répétées et les protéines éluées. WDR5 est majoritairement retrouvé dans le surnageant (piste 4).

ii. ATAC2 et WDR5 ne semblent pas interagir avec le module HAT

J'ai montré en Partie 2 qu'ATAC2 peut interagir avec GCN5. Pour savoir si ATAC2 et WDR5 peuvent influencer l'activité de l'enzyme en plus d'ADA2a, ADA3 et SGF29, j'ai voulu vérifier s'il était possible de purifier un module rHAT+ATAC2+WDR5.

Les protéines ATAC2, WDR5 et celles du module HAT ont été surexprimées dans des cellules d'insecte et les extraits soumis à des IP. Dans un premier temps, les IPs ont été dirigées contre WDR5 (Figure 47 A). Des IPs contre ATAC2 seule et contre le module rHAT constituent les contrôles négatifs (C- ATAC2 et C- HAT). Les billes ont été déposées sur gel SDS-PAGE et les protéines visualisées par CBB (Figure 47 B).

Comme attendu, WDR5 a bien été retenue (piste 1). Une bande pouvant correspondre à SGF29 est visible, néanmoins celle-ci est un peu visible aussi dans le contrôle négatif (piste 3).

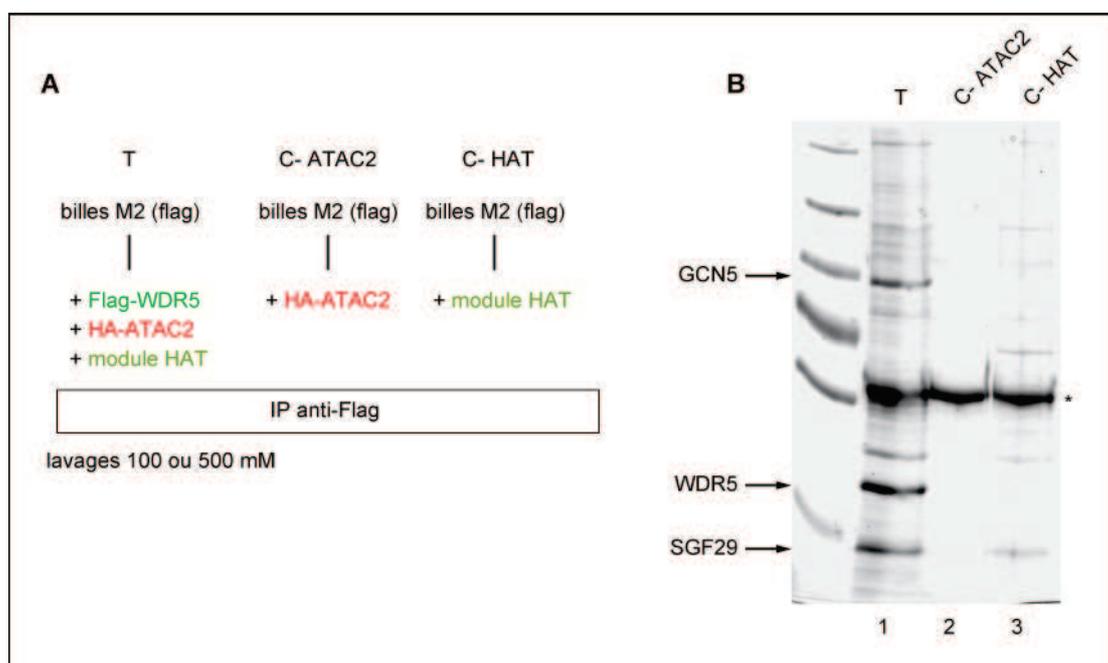


Figure 47 : WDR5 interagit faiblement avec le module rHAT.

A. Les protéines du module HAT (GCN5-ADA2a-ADA3-SGF29), ATAC2 et WDR5 ont été surexprimées dans des cellules d'insecte et immunoprécipitées contre le tag de WDR5 (Flag, T). Les IPs sur ATAC2 et le module HAT constituent les contrôles négatifs.

B. Les protéines retenues par les billes ont été visualisées par CBB : WDR5, mais aussi GCN5 et SGF29 sont visibles (piste 1).

Dans un second temps, l'IP a alors été réalisée contre ATAC2 (Figure 48 A). Les IPs sur les extraits contenant WDR5 seule et le module rHAT seul constituent les contrôles négatifs (C-WDR5 et C- HAT) ; l'IP sur ATAC2 seule est un contrôle positif (C+ ATAC2). Les billes ont été déposées sur gel SDS-PAGE et ce dernier coloré au CBB (Figure 48 B).

ATAC2 a bien été retenue, WDR5 est très légèrement visible sur le gel (piste 2). SGF29 est un peu visible (piste 2), mais la même bande est observée dans le contrôle négatif (piste 4).

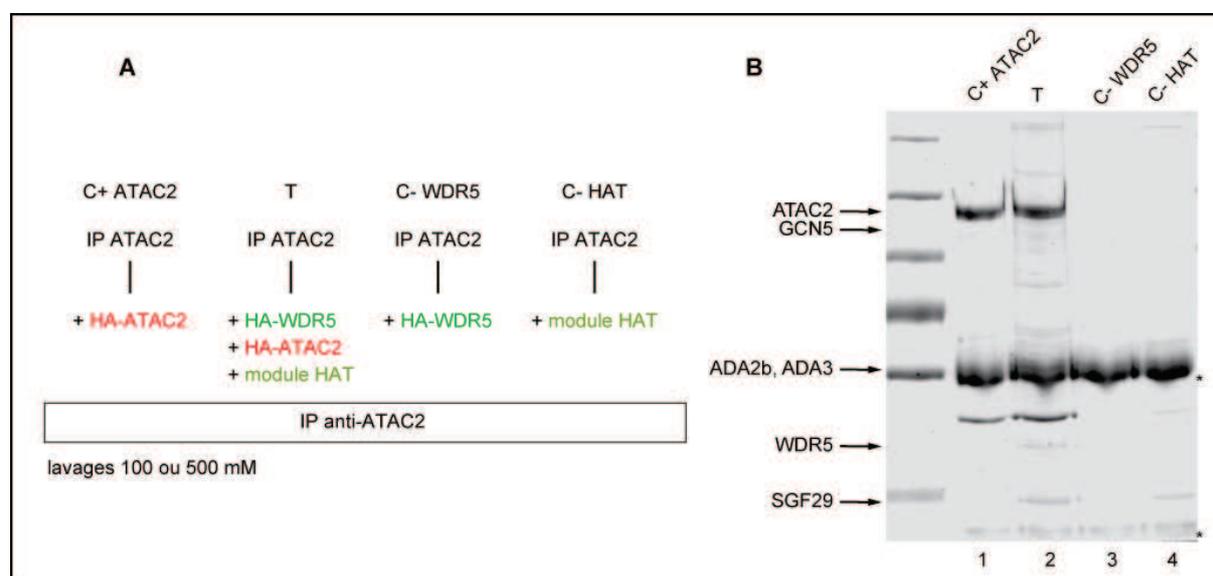


Figure 48 : Il n'est pas possible de purifier ATAC2 avec le module rHAT.

A. Les protéines du module HAT (GCN5-ADA2a-ADA3-SGF29), ATAC2 et WDR5 ont été surexprimées dans des cellules d'insectes. Afin de vérifier l'interaction entre ATAC2 et le module HAT, et peut-être dans ce cas avec WDR5, les protéines ont été immunoprécipitées contre ATAC2 (T). L'IP contre ATAC2 seule constitue le contrôle positif (C+ ATAC2), contre WDR5 ou le module HAT les contrôles négatifs (C- WDR5 et C- HAT).
B. Les protéines retenues par les billes ont été visualisées par CBB.

Il n'est donc pas possible de purifier ici un module rHAT-ATAC2-WDR5, alors qu'un duo ATAC2-GCN5 l'est (voir Partie 2). Cela suggère que les autres protéines du module rHAT perturberaient cette interaction, ou du moins que celle-ci est plus fragile.

2. K9 et K14 sont les cibles des complexes ATAC et SAGA, qu'en est-il des autres lysines ?

Nos tests effectués sur les peptides et expériences d'interférence par des siRNA, ainsi que les données de la littérature, suggèrent que les lysines 9 et 14 de l'histone H3 sont les cibles des complexes hATAC et hSAGA. D'autres lysines faisant partie de H3, peuvent-elles être acétylées par ces complexes ? Pour répondre à cette question, des tests d'activité avec des peptides de différentes longueurs ont été réalisés (Figure 49). Le peptide allant des acides aminés 1 à 8 comprend uniquement K4. Trois combinaisons de peptides couvrant la partie 21 à 40 ont aussi été utilisées pour étudier l'acétylation de K23, K27 ou encore K36K37. Le peptide allant de 1 à 20 correspond à celui que nous avons utilisé jusqu'à présent et constitue

un contrôle positif. Les complexes endogènes hATAC et hSAGA ont été purifiés par une IP contre leur sous-unité ADA2a ou TAF10 respectivement. Puis, ils ont été incubés avec les peptides et de l'acétylCoA radioactif. Comme nous l'avons déjà observé, la partie 1 à 20 portant la lysine 14 est acétylée. Par contre, le peptide ne présentant que la lysine 4 ne l'est pas. Différentes combinaisons de longueurs de peptides ont été utilisées pour déterminer quel résidu pourrait être ciblé dans la région allant de 20 à 40. Mais, aucun des peptides ne montre de signal, hormis le bruit de fond dû à l'autoacétylation des complexes. Les lysines 4, 23, 27, 36 et 37 ne sont donc pas des cibles de hATAC ou hSAGA dans le contexte peptidique.

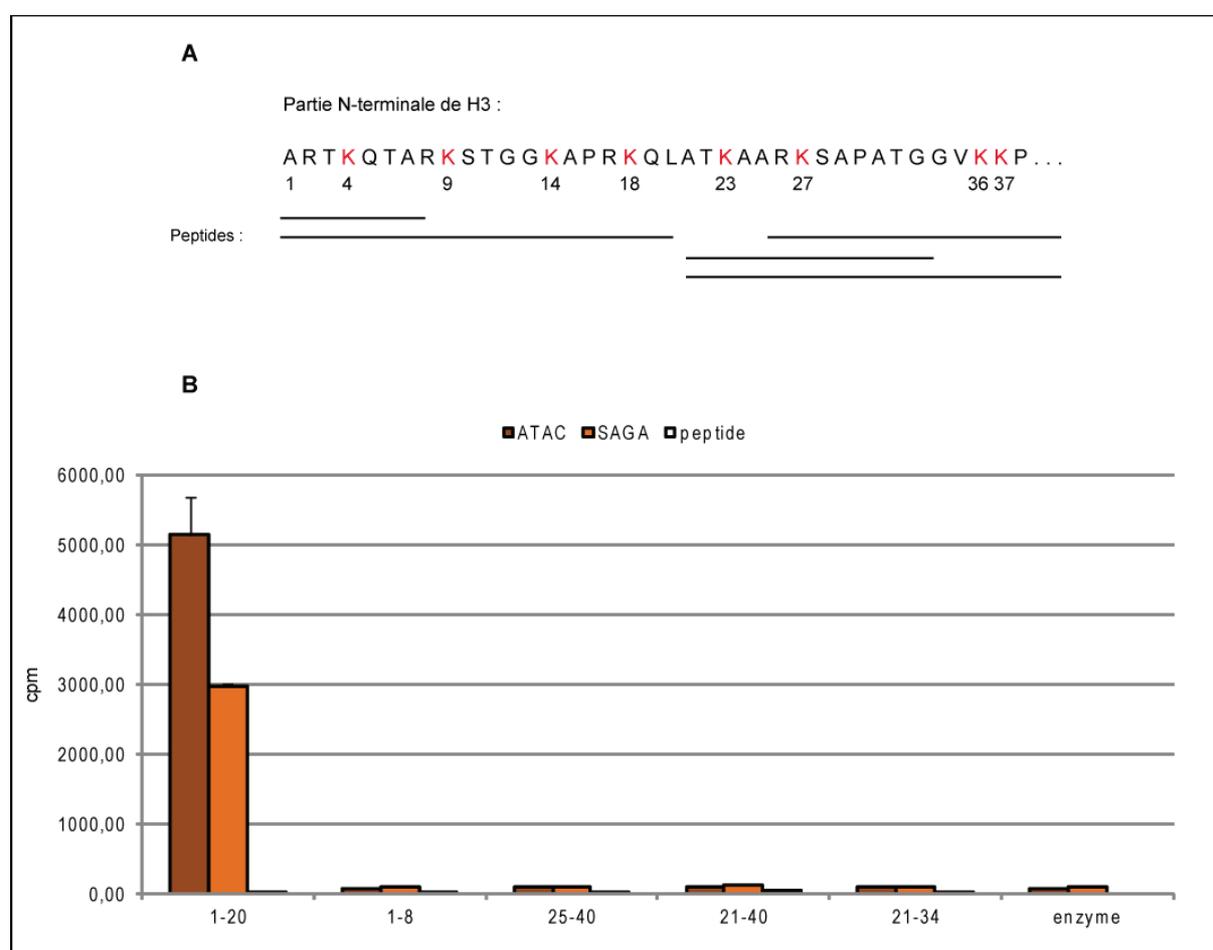


Figure 49 : Les lysines 4, 23, 27, 36 et 37 sur des peptides ne sont ni acétylées par ATAC ni par SAGA.

A. La partie N-terminale de H3 contient plusieurs lysines (en rouge, position indiquée par les nombres sous la séquence). Plusieurs peptides couvrant différentes parties de cette région sont disponibles (barres sous la séquence, représentant les acides aminés couverts).

B. Tests d'acétylation sur les peptides schématisés en A. ATAC et SAGA acétylent la partie 1 à 20 comme nous l'avons déjà démontré. Les autres peptides, contenant K4, K23, K27, K36 et K37 ne sont pas acétylés, le signal d'acétylation correspondant au bruit de fond dû à l'autoacétylation des complexes (enzyme).

En ordonnée : coup par minute (cpm).

3. Existe-t-il une différence d'activité entre les enzymes GCN5 et PCAF ?

a. Qu'en est-il de l'activité des enzymes recombinantes ?

Les premiers travaux que j'ai effectués au laboratoire ont surtout été axés sur GCN5, où nous avons mis en évidence que l'enzyme recombinante cible en particulier la lysine 14 (cf Partie 2). J'ai néanmoins voulu savoir s'il était possible de voir une différence d'activité entre les enzymes GCN5 et PCAF.

Pour ce faire, les protéines recombinantes ont été purifiées à partir de cellules d'insecte et leur quantité normalisée par coloration au CBB. Dans un premier temps, les enzymes ont été testés sur les peptides mutants pour certains résidus par incubation avec de l'acétylCoA radioactif (peptides utilisés dans (Nagy et al., 2010)).

Nous avons montré que GCN5 n'est plus capable d'acétyler le peptide lorsque la lysine 14 est mutée en arginine. Ce résidu est donc la cible de GCN5. Le même résultat est obtenu avec PCAF avec la même intensité de signal (Figure 50 A). De même, aucune des deux enzymes ne semblent agir sur les peptides H4 (Figure 50 B).

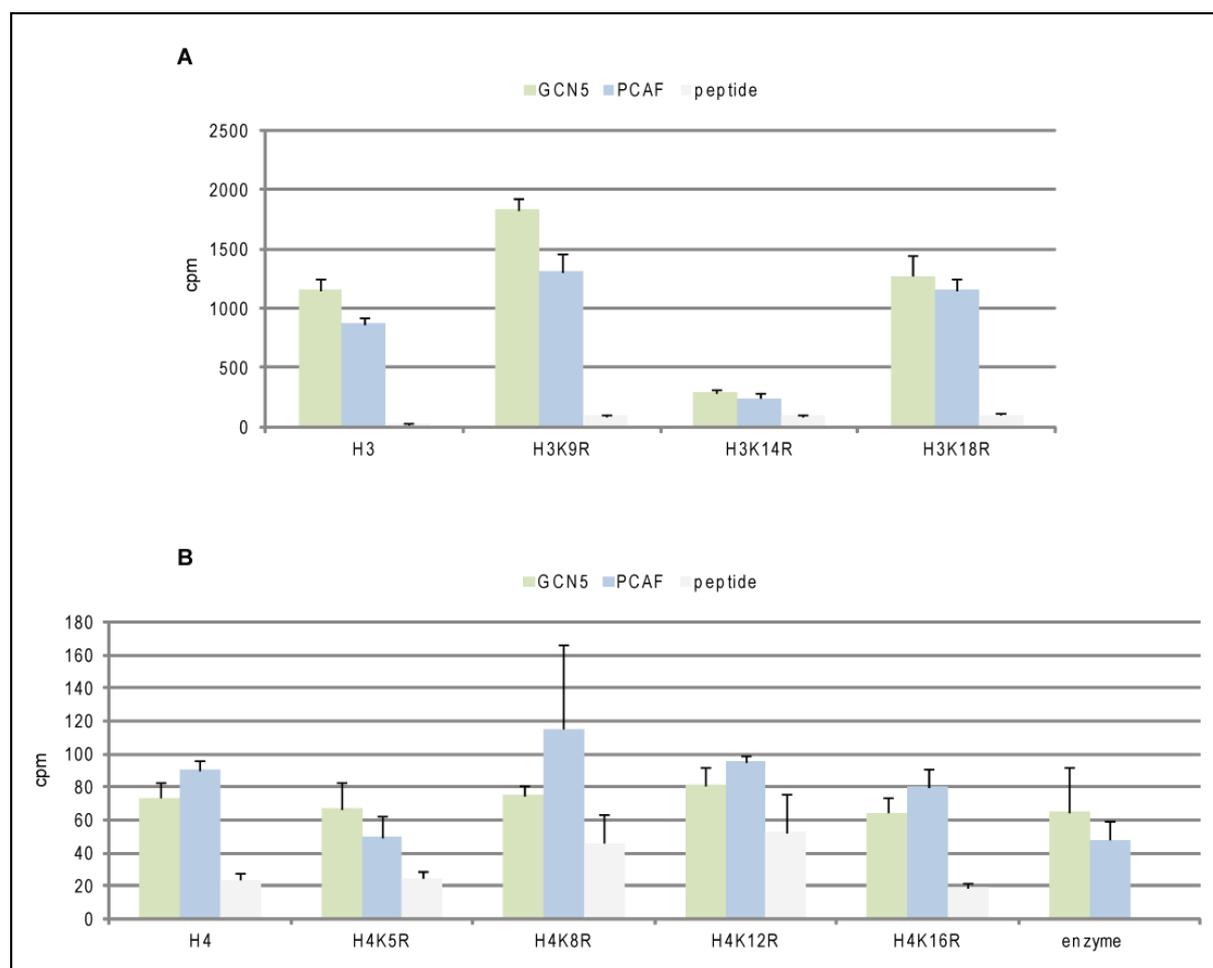


Figure 50 : GCN5 et PCAF acétylent toutes deux préférentiellement la lysine 14 de l'histone H3.

Les protéines recombinantes GCN5 et PCAF ont été purifiées à partir de cellules d'insecte et leur quantité normalisée par visualisation sur gel SDS-Page coloré au CBB. Les enzymes ont ensuite été incubées avec des peptides mutants pour certaines lysines mutées en arginine pour H3 et H4 avec de l'acétylCoA radioactif. A. Représentation des résultats pour GCN5 et PCAF sur les peptides mimant la queue N-terminale de H3. B. Représentation des résultats pour GCN5 et PCAF sur les peptides mimant la queue N-terminale de H4. En ordonnée : coup par minute (cpm).

Ces dernières ont ensuite été testées sur des protéines histones. Ainsi, les enzymes GCN5 et PCAF ont été incubées avec des tétramères H3/H4, des octamères et des polynucléosomes natifs et de l'acétylCoA radioactif. Le signal sur les protéines est détecté par radiographie (Figure 51).

Dans ce cas également, les enzymes agissent de la même manière sur les histones, en acétylant de façon préférentielle l'histone H3. Nous pouvons tout de même remarquer que l'autoacétylation de PCAF est beaucoup plus importante que GCN5.

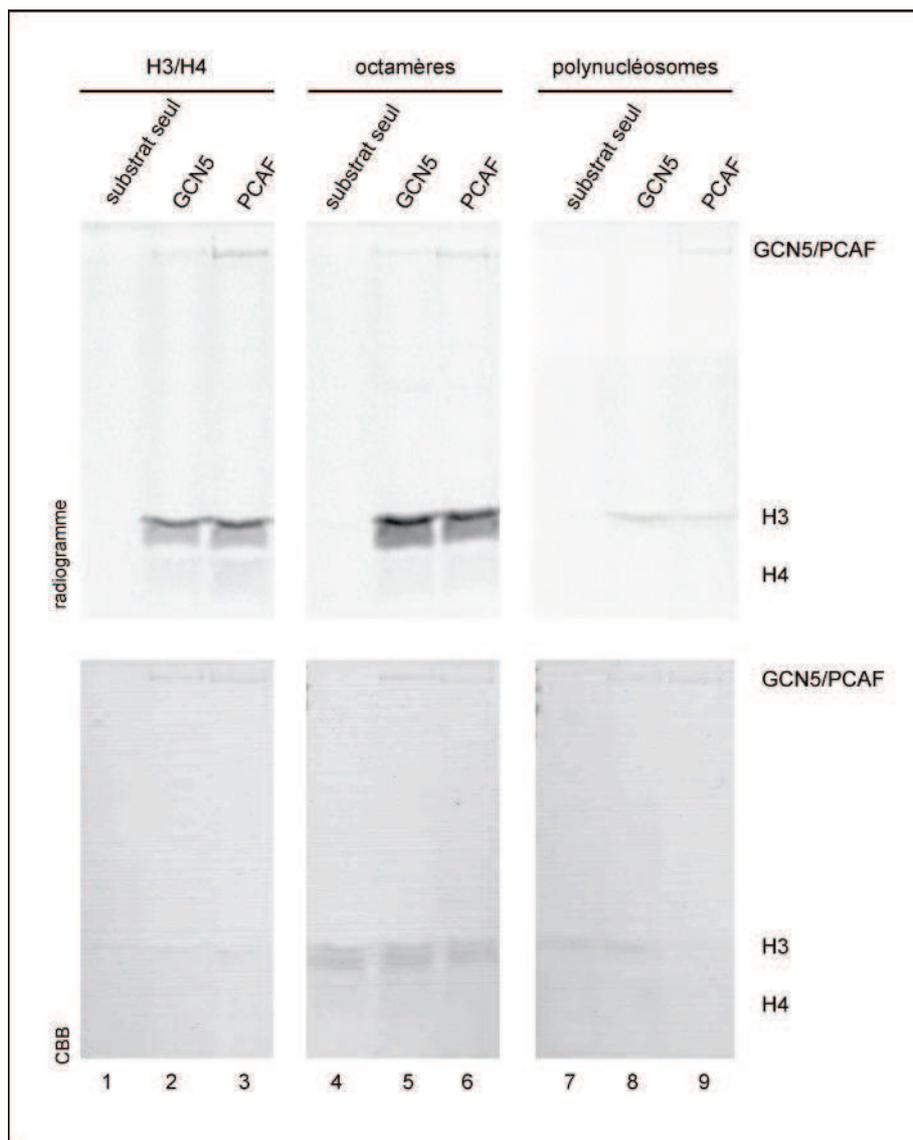


Figure 51 : GCN5 et PCAF recombinantes acétylent les protéines histones de la même manière.

Les protéines recombinantes GCN5 et PCAF ont été purifiées par IP à partir de cellules d'insecte et leur concentration normalisée sur gel par coloration au CBB. Les enzymes ont été incubés avec des tétramères H3/H4 (pistes 2 et 3), des octamères (pistes 5 et 6) et des polynucléosomes (pistes 8 et 9) issus de cellules HeLa avec de l'acétylCoA radioactif. Les échantillons ont été mis à migrer sur gel SDS-Page et le signal radioactif a été détecté par radiographie.

b. Comparaison des complexes ATAC et SAGA selon leur composition en GCN5 ou PCAF

Les enzymes ont enfin été comparées selon leur appartenance à ATAC ou SAGA. Les complexes endogènes ont été purifiés comme décrit dans la section B. Une première IP contre ADA2a ou TAF10 a été effectuée pour différencier ATAC et SAGA ; une seconde IP contre GCN5 permet de purifier les complexes contenant exclusivement GCN5 (G-ATAC ou SAGA), le surnageant contenant les complexes avec PCAF (P-ATAC ou SAPA). Notons que

le surnageant de l'IP pour SAPA contient aussi TFIID (Figure 30 A). Les concentrations des complexes ont été normalisées selon la quantité en protéines ADA3 et SGF29 par WB. Pour être certain que les enzymes GCN5 et PCAF soient bien normalisées entre elles, les complexes ont aussi été comparés aux protéines recombinantes, ces dernières ayant été normalisées avec un anticorps contre leur tag Flag par WB (Figure 52 A). Les quatre complexes, GCN5 au sein d'ATAC ou de SAGA (G-ATAC et SAGA) et PCAF au sein d'ATAC ou SAGA (P-ATAC et SAPA), ont été incubés avec des peptides mimant la partie N-terminale en présence d'acétylCoA radioactif. Puis, le signal sur les peptides a été mesuré en coup par minute (Figure 52 B).

Il en ressort que les quatre complexes acétylent préférentiellement le peptide H3. Mais, nous pouvons noter que P-ATAC semble acétyler H3 et H4 de la même manière. En comparant les complexes ATAC avec SAGA, il n'est pas possible de faire une différence dans la spécificité d'action sur le substrat. En revanche, si l'on compare les complexes selon qu'ils contiennent GCN5 ou PCAF, on constate que G-ATAC et SAGA sont plus actifs sur H3 que P-ATAC et SAPA. De façon encore plus intéressante, c'est l'inverse qui est observé sur le peptide H4 (Figure 52 C).

J'ai voulu déterminer quelles lysines étaient les cibles des complexes contenant PCAF, en comparaison de ceux contenant GCN5. Pour cela, les quatre complexes ont été incubés avec de l'acétylCoA radioactif et les peptides dont certaines lysines ont été mutées en arginine comme décrit précédemment (Figure 53). Les quatre complexes ne sont plus capables d'acétyler le peptide H3 lorsque le résidu 14 est muté (Figure 53 A). GCN5 et PCAF, que ce soit au sein d'ATAC ou SAGA, ciblent donc la lysine 14 sur les peptides. Il n'a pas été possible par contre de déterminer un résidu particulier dans le cas de H4 (Figure 53 B).

Figure 52 : GCN5 et PCAF au sein des complexes ATAC et SAGA acétylent préférentiellement les peptides H3.

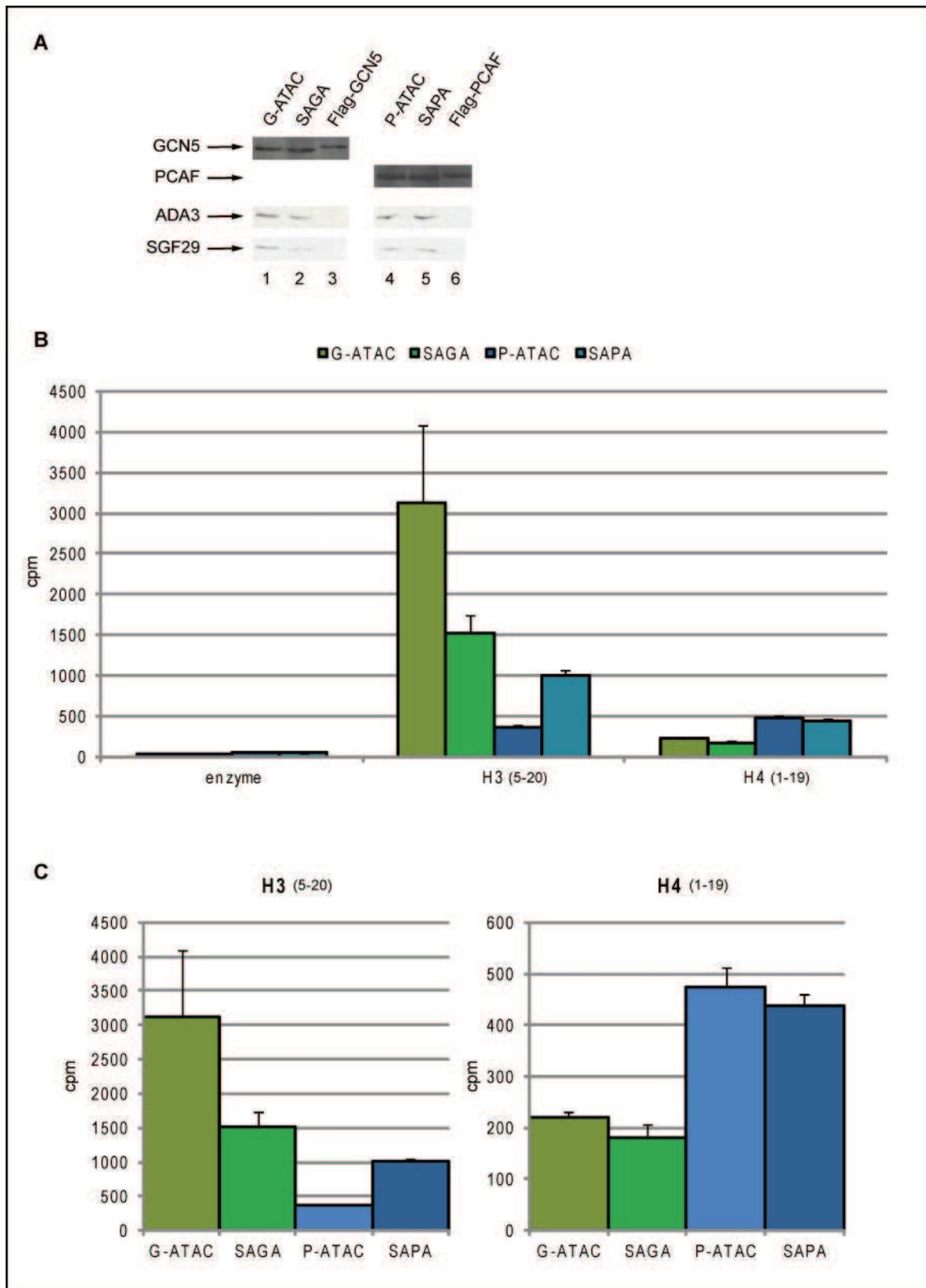
A. Les complexes ATAC et SAGA contenant GCN5 ou PCAF ont été purifiés à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa. Leur concentration a ensuite été normalisée selon la quantité en ADA3 et SGF29, ainsi qu'en enzymes, sachant que GCN5 et PCAF ont pu être comparées avec le tag des protéines recombinantes.

B. Les complexes contenant GCN5 (G-ATAC et SAGA, en vert) ou PCAF (P-ATAC et SAPA, en bleu) ont été incubés avec des peptides mimant la région N-terminale des histones H3 ou H4 avec de l'acétylCoA radioactif. Le bruit de fond correspond à l'autoacétylation des complexes (enzyme).

C. Représentation individuelle des résultats obtenus sur les peptides H3 et H4.

Les nombres entre parenthèses indiquent les acides aminés des histones correspondants.

En ordonnée : coup par minute (cpm).



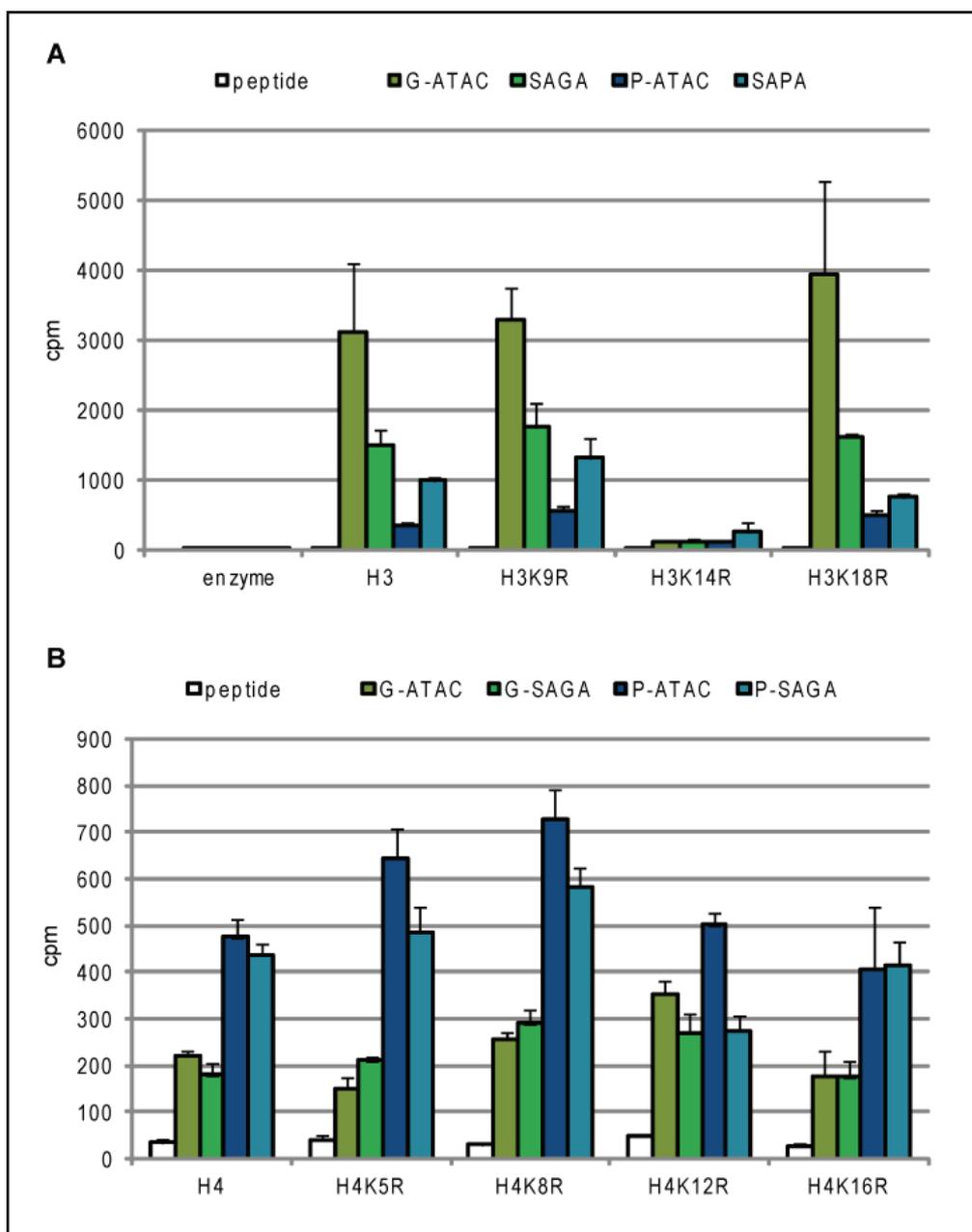


Figure 53 : GCN5 et PCAF, au sein des complexes ATAC et SAGA acétylent les mêmes lysines.

Les complexes contenant GCN5 (G-ATAC et SAGA, en vert) ou PCAF (P-ATAC et SAPA, en bleu) ont été incubées avec des peptides mimant la région N-terminale des histones H3 ou H4 présentant certaines lysines mutées en arginine avec de l'acétylCoA radioactif.

A. Résultats obtenus sur les peptides H3. Le bruit de fond correspond à l'autoacétylation des complexes (enzymes) ou aux peptides incubés sans les complexes (peptide).

B. Résultats obtenus sur les peptides H4.

En ordonnée : coup par minute (cpm).

4. Les pré-modifications des histones peuvent-elle influencer le recrutement et donc l'activité des enzymes HAT ?

Les domaines des différentes protéines permettent leur recrutement sur la chromatine selon les modifications déjà présentes sur les histones. Nous avons ainsi vu en section B que le domaine Tudor de SGF29 permet un meilleur recrutement des complexes sur l'histone H3 quand la lysine 4 est triméthylée. GCN5 et PCAF possédant un bromodomaine impliqué dans la reconnaissance des lysines acétylées, j'ai testé ces enzymes sur des peptides présentant certains résidus acétylés. Ces travaux ont été poursuivis par des expériences avec encore d'autres types de peptides.

a. Expériences sur des peptides pré-acétylés

i. Activité de GCN5 et PCAF recombinantes sur des peptides H3 acétylés

Les enzymes recombinantes GCN5 ou PCAF ont été incubées avec des peptides mimant la queue N-terminale de l'histone H3 sans modification ou portant une lysine pré-acétylée (sur le résidu 9, 14 ou 18) en présence d'acétylCoA radioactif (Figure 54).

Nous pouvons tout d'abord noter que les deux enzymes présentent toutes deux le même profil d'activité. Quant à la pré-acétylation des peptides, le signal est totalement perdu (au niveau du bruit de fond) pour le peptide H3K14ac, cette position étant la cible des enzymes d'après nos expériences précédentes, cela confirme nos observations. Concernant les lysines K9 et K18 acétylées, il semblerait qu'elles ne permettent pas un meilleur recrutement des enzymes via le bromodomaine sur les peptides. Au contraire, le signal est même plus faible.

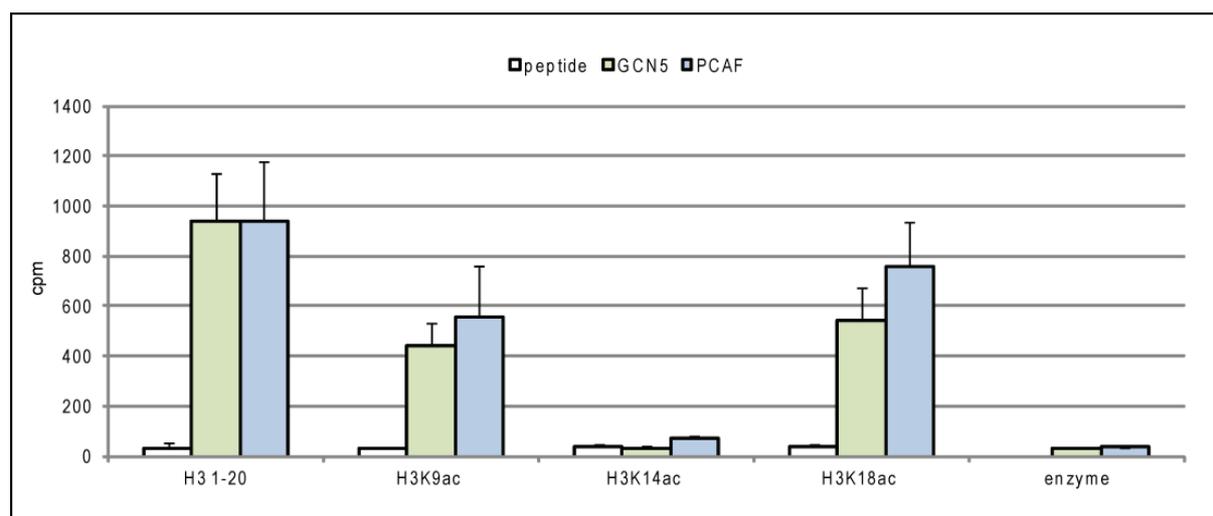


Figure 54 : L'activité de GCN5 et PCAF ne semble pas être modifiée par des peptides acétylés.

Les enzymes GCN5 et PCAF ont été incubées avec de l'acétylCoA radioactif et des peptides minant la queue N-terminale de l'histone H3. Ces peptides sont sans modification (H3) ou avec des lysines pré-acétylées (en position 9, 14 ou 18). L'enzyme a aussi été incubée sans peptide comme contrôle négatif (enzyme). En ordonnée : coup par minute (cpm).

Les enzymes étant au sein du module HAT, j'ai voulu tester les modules recombinants sur ces peptides.

ii. Activité des modules recombinants HAT sur des peptides H3 acétylés

Les modules HAT recombinants correspondant à ATAC (l'enzyme avec ADA2a, ADA3 et SGF29) et SAGA (l'enzyme avec ADA2b, ADA3 et SGF29) ont été purifiés à partir d'extraits de cellules d'insecte. Les modules ont été préparés avec GCN5 (rHAT G-ATAC et rHAT SAGA) ou avec PCAF (rHAT P-ATAC et rHAT SAPA). Comme précédemment, ils ont été incubés avec les peptides H3 plus ou moins pré-acétylés en présence d'acétylCoA (Figure 55).

Ces résultats apportent les mêmes conclusions que précédemment : les modules ne sont pas plus efficacement recrutés sur les peptides pré-acétylés. De plus, ils ne peuvent acétyler le peptide lorsque celui-ci est pré-acétylé sur la position 14, confirmant que cette lysine est la cible des enzymes. En outre, nous obtenons ici aussi une différence d'activité selon que les modules contiennent ADA2a ou ADA2b.

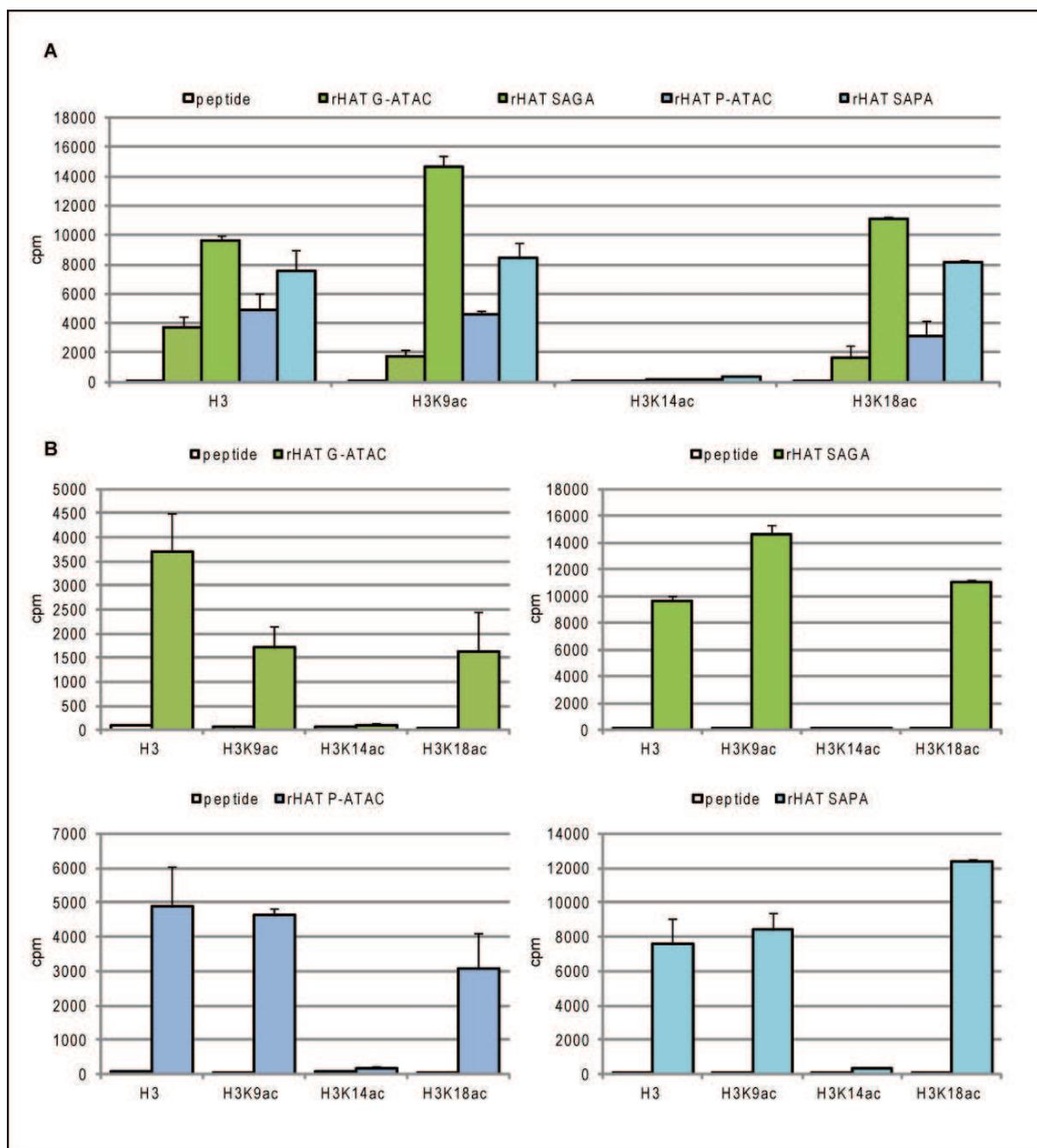


Figure 55 : Les peptides pré-acétylés ne recrutent pas plus efficacement les modules rHAT.

Les modules recombinants rHAT ont été purifiés à partir de cellules d'insecte pour ATAC et SAGA (l'enzyme+ADA2a/b+ADA3+SGF29). Ils contiennent soit GCN5 (rHAT G-ATAC et rHAT SAGA) ou PCAF (rHAT P-ATAC et rHAT SAPA). Le signal a été mesuré après incubation des modules avec les peptides mimant la queue N-terminale de H3 contenant certaines lysines pré-acétylées (K9, K14 ou K18) et de l'acétylCoA radioactif.

A. Représentation des résultats pour les quatre modules rHAT sur le même graphique.

B. Représentation graphique individuelle pour chaque module.

En ordonnée : coup par minute (cpm).

iii. Activité des complexes endogènes sur des peptides H3 acétylés

Afin de compléter nos résultats, j'ai ensuite utilisé ces peptides avec les complexes entiers. Ces derniers ont été purifiés par IP : une première IP dirigée contre ADA2a ou TAF10 afin de retenir ATAC ou SAGA respectivement, puis une seconde IP contre GCN5 dans le but d'obtenir des fractions contenant les complexes avec GCN5 ou PCAF de façon exclusive (Figure 30 A). Nous obtenons ainsi quatre complexes endogènes : GCN5 au sein d'ATAC (G-ATAC) ou de SAGA (SAGA) et PCAF au sein d'ATAC (P-ATAC) ou de SAGA (SAPA). Ces derniers ont été incubés avec les peptides et de l'acétylCoA radioactif et le signal mesuré (Figure 56).

Dans ce cas également, nous obtenons le même profil de résultats que pour les enzymes et modules recombinants.

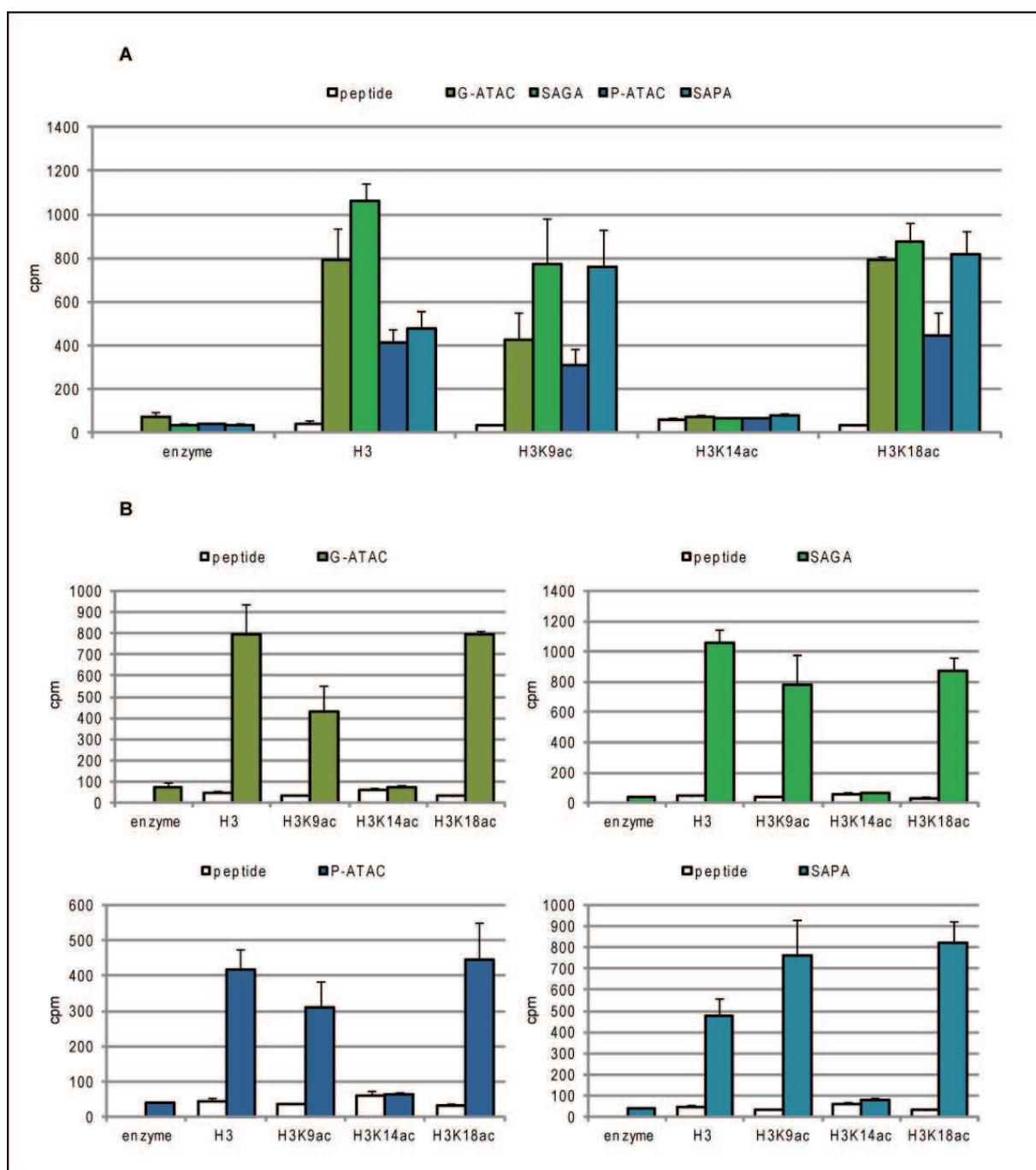


Figure 56 : Les peptides acétylés ne semblent pas mieux recruter les complexes ATAC ou SAGA.

Les quatre complexes endogènes ont été purifiés à partir de cellules HeLa (GCN5 au sein d'ATAC dit G-ATAC ou de SAGA dit SAGA et PCAF au sein d'ATAC dit P-ATAC ou de SAGA dit SAPA). Ils ont été incubés avec les peptides H3 pré-acétylés sur les positions 9, 14 ou 18 avec de l'acétylCoA radioactif et le signal mesuré en coup par minute.

A. Représentation des résultats pour les quatre modules rHAT sur le même graphique.

B. Représentation graphique individuelle pour chaque module.

En ordonnée : coup par minute (cpm).

b. Expériences sur des peptides H3K9 diméthylés et H3S10 phosphorylés

Il a été montré au laboratoire que l'histone H3 peut présenter deux modifications en même temps durant la mitose : la lysine 9 diméthylée (H3K9me2) et la sérine 10 phosphorylée (H3S10p) (Eberlin et al., 2008).

J'ai commencé par tester les complexes recombinants purifiés sur les peptides présentant chacune des modifications ainsi qu'un peptide possédant les deux à la fois (H3K9me2S10p) (Figure 57).

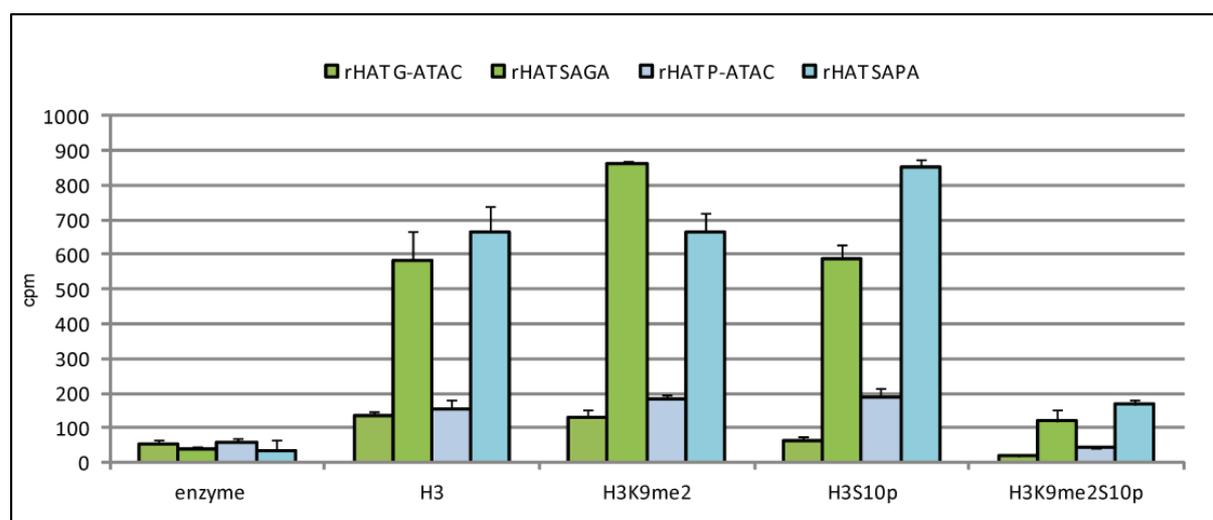


Figure 57 : La double modification H3K9me2S10p entraîne une diminution de l'acétylation du peptide par les modules rHAT.

Les quatre modules rHAT recombinants (contenant soit GCN5 : rHAT G-ATAC et rHAT SAGA soit PCAF : rHAT P-ATAC et rHAT SAPA) ont été incubés avec des peptides mimant la partie N-terminale de l'histone H3 pré-modifiée pour K9 diméthylée (H3K9me2), ou la sérine 10 phosphorylée (H3S10p) ou les deux en même temps (H3K9me2S10p) avec de l'acétylCoA radioactif. L'enzyme correspond aux modules rHAT sans les peptides afin de déterminer le bruit de fond dû à l'autoacétylation des enzymes.

En ordonnée : coup par minute.

Les peptides H3K9me2 et H3S10p ne sont pas plus ou moins acétylés que dans le cas de H3 sans modification. De façon surprenante, lorsque ces deux modifications sont sur le même peptide, nous détectons une forte perte du niveau d'acétylation et ce quelque soit le module rHAT.

Afin de confirmer ces résultats, j'ai répéter l'expérience sur ces peptides mais, cette fois-ci, avec les complexes endogènes (Figure 58 A). Dans ce cas également, lorsque le peptide possède les deux modifications H3K9me2S10p les enzymes ne peuvent plus acétyler leur substrats, alors que prise séparément ces modifications n'ont pas d'effet. Nous pouvons

toutefois remarquer une légère baisse sur le peptide H3S10p sans être aussi drastique que la double modification.

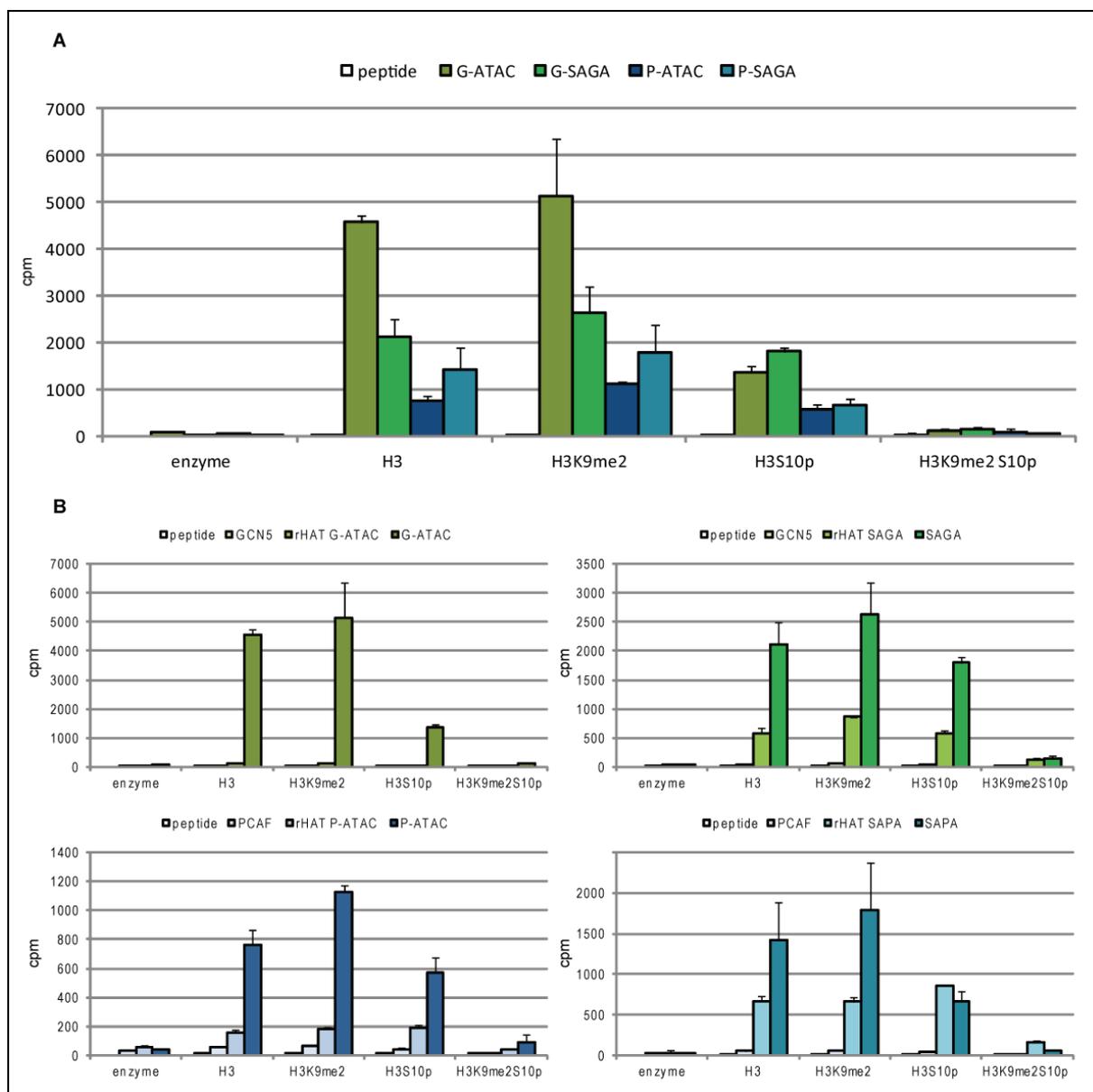


Figure 58 : Les complexes ATAC et SAGA n'acétylent pas le peptide pré-modifié H3K9me2S10p.

Les complexes ATAC et SAGA, contenant GCN5 (G-ATAC et SAGA) ou PCAF (P-ATAC et SAPA) ont été incubés avec des peptides pré-modifiés pour H3K9 diméthylé (H3K9me2), H3S10 phosphorylé (H3S10p) ou présentant les deux modifications (H3K9me2S10p) avec de l'acétylCoA radioactif.

A. Activité des complexes endogènes sur les peptides.

B. Représentations graphiques incluant les résultats des modules rHAT selon l'enzyme et son environnement de manière individuelle.

En ordonnée : coup par minute (cpm).

c. Expériences sur le peptide H3K4 triméthylé

Avant de pouvoir effectuer les expériences d'acétylations sur des protéines histones portant la modification H3K4me3 (voir section B), des tests sur un peptide portant cette modification en comparaison du peptide H3 non modifié ont été réalisés. Les complexes rHAT contenant soit GCN5 soit PCAF mais, aussi, les quatre complexes endogènes ont été incubés avec ces peptides et de l'acétylCoA radioactif. Le signal correspondant au niveau d'acétylation ne montre pas de différence selon le substrat utilisé (Figure 59). Nous avons pourtant pu en mettre une en évidence sur des octamères présentant une telle modification. Cette expérience témoigne de la limite d'utilisation des peptides, le repliement de la protéine H3 est peut-être nécessaire dans la reconnaissance de la modification par SGF29.

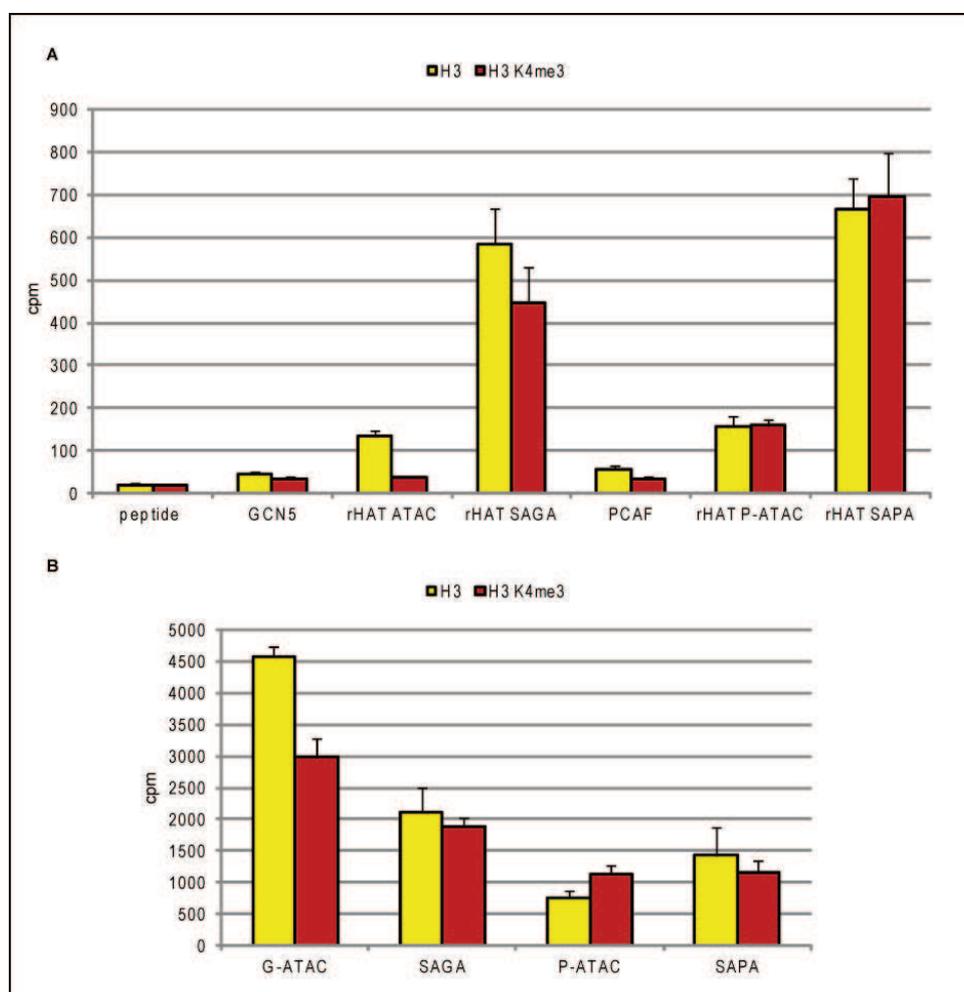


Figure 59 : Il n'est pas possible de visualiser une différence de reconnaissance des peptides H3 et H3K4me3 par ATAC ou SAGA.

A. Les enzymes recombinantes GCN5 et PCAF seules ou au sein des modules rHAT ont été incubées avec les peptides H3 (colonnes en jaune) ou H3K4me3 (en rouge) avec de l'acétylCoA radioactif.

B. L'expérience a été répétée mais en présence des quatre complexes endogènes ATAC et SAGA, contenant soit GCN5 (G-ATAC et SAGA) soit PCAF (P-ATAC et SAGA).

En ordonnée : coup par minute (cpm).

5. L'enzyme GCN5 peut-elle acétyler des sous-unités du complexe ?

GCN5 a une activité AT sur la chromatine, mais aussi sur des protéines non-histones. Sachant que certaines sous-unités des complexes ATAC et SAGA peuvent être acétylées (Choudhary et al., 2009), des tests d'activité préliminaires ont été effectués afin de savoir si l'enzyme peut acétyler les protéines de ces complexes.

Pour cela, les protéines ont été surexprimées dans des cellules d'insecte et purifiées. Les enzymes GCN5 et PCAF ont été incubées avec différentes protéines avec de l'acétylCoA radioactif. Les protéines acétylées sont ensuite visualisées par radiographie (Figure 60).

Dans un premier temps, les enzymes incubées seules montrent une activité d'autoacétylation dans le cas de GCN5 et PCAF (Figure 60 A pistes 8 et 9). Notons que celle de PCAF est plus importante. ATAC2 pouvant être une HAT, elle a aussi été prise en considération pour le test. Cependant, elle ne montre pas d'autoacétylation (piste 7). Par contre, elle peut être acétylée par GCN5 et PCAF (pistes 10 et 11).

L'activité de GCN5 et PCAF a ensuite été étudiée sur les sous-unités ADA3, SGF29 et WDR5 (Figure 60 B). ADA3 est clairement acétylé (piste 10 et 13), SGF29 l'est aussi mais plus faiblement (pistes 11 et 14), tandis que WDR5 ne semblent pas l'être (pistes 12 et 15). Les pistes 16 à 19 constituent des contrôles négatifs.

Les enzymes GCN5 et PCAF peuvent donc acétyler elles-mêmes ainsi qu'ADA3, SGF29 et ATAC2, mais pas WDR5.

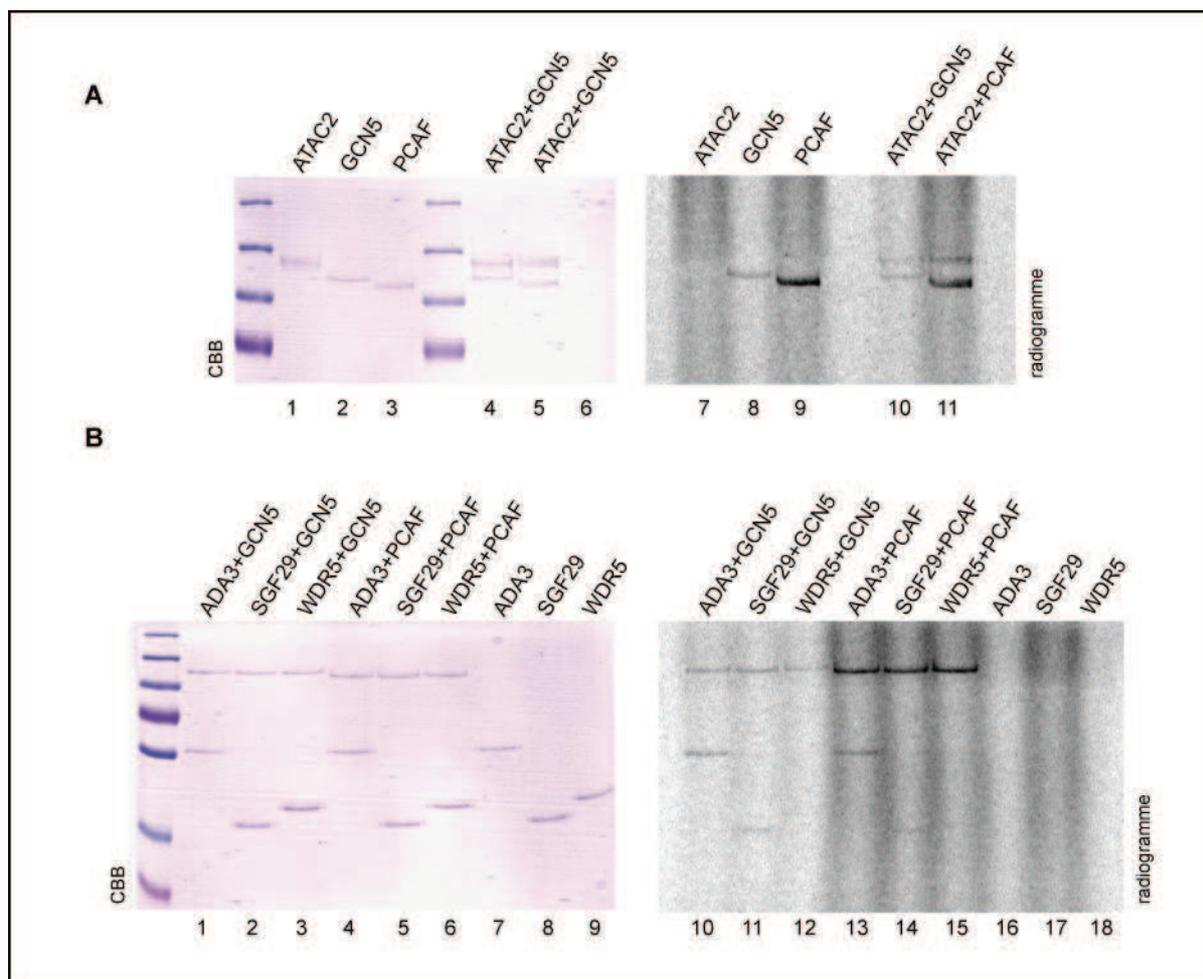


Figure 60 : GCN5 et PCAF peuvent s'autoacétyler et acétyler des sous-unités des complexes ATAC et SAGA.

Les protéines ont été surexprimées dans des cellules d'insecte et purifiées par IP. L'enzyme et chaque protéine ont été incubées avec de l'acétylCoA radioactif et les substrats ainsi acétylés visualisés par radiographie après migration sur un gel SDS-Page coloré au CBB.

A. L'autoacétylation des AT GCN5, PCAF et ATAC2 a été étudiée (pistes 7 à 9), ainsi que la capacité de GCN5 et PCAF à acétyler ATAC2 (pistes 10 et 11).

B. La capacité des enzymes GCN5 et PCAF à acétyler les protéines ADA3, SGF29 et WDR5 a été étudiée (pistes 10 à 12 pour GCN5, 13 à 15 pour PCAF). Les substrats seuls constituent des contrôles négatifs (pistes 16 à 18).

D. Discussion et perspectives

1. Comprendre l'activité de GCN5 : bilan des résultats obtenus

En résumé, dans les expériences effectuées, l'enzyme recombinante GCN5 a pour cible unique la lysine 14 de l'histone H3 dans le cas de l'utilisation de peptides. Si cette position est mutée ou déjà acétylée, aucune autre activité n'est détectée. Par contre, lorsque les expériences sont réalisées en utilisant des octamères comme substrats, une activité est détectée autant sur la position 9 que 14 de H3. En parallèle de ce travail, il a été démontré chez la souris, lors de la délétion des deux enzymes GCN5 et PCAF, que la lysine 9 de H3 n'est plus acétylée, tandis que les autres positions ne sont pas affectées (Jin et al., 2011). De même chez la levure, la délétion de yGcn5 entraîne une diminution de l'acétylation des positions 9 et 18 de H3. *In vivo*, GCN5 serait l'unique enzyme responsable de l'acétylation de H3K9 (Bian et al., 2011).

Ce travail a permis de montrer que GCN5 et PCAF, au sein des complexes hATAC et hSAGA acétylent la lysine 14 de H3 sur des peptides et les lysines 9 et 14 des histones H3 sur des substrats de type octamère. Cependant, je n'ai pas réussi à étudier de façon concluante l'activité des enzymes et complexes sur des nucléosomes, et ce malgré la présence de l'activateur chimérique GAL4VP16 ou de la pré-modification H3K4me3.

Nous avons aussi montré que GCN5 exprime son activité plus efficacement lorsque l'enzyme se retrouve sous l'influence de partenaires (ADA2a/b-ADA3-SGF29). En effet, les expériences d'activité sur des peptides et des octamères ont montré que l'activité de l'enzyme augmente lorsque celle-ci se trouve au sein de modules rHAT ATAC et rHAT SAGA. Cette activité est totale lorsque l'enzyme est au sein des complexes endogènes.

Les sous-unités des complexes possèdent des domaines impliqués dans le recrutement à la chromatine (Tableau 4 et 5) et doivent donc permettre un meilleur recrutement et spécificité d'action de GCN5 sur sa cible. Pour ce qui est de SGF29, par exemple, il a en effet été démontré chez la levure que le domaine Tudor de la protéine permet la reconnaissance de la lysine 4 de H3 lorsque celle-ci est di ou triméthylée, ce qui permet à Gcn5 d'exprimer son activité sur H3 *in vivo* (Bian et al., 2011). En collaboration avec Andree Schram de l'équipe de Marc Timmers, nous avons aussi pu observer une amélioration de l'activité d'acétylation lorsque des octamères portent cette modification en présence de SGF29 dans le module

rHAT. Cela corrèle bien avec le fait que H3K4me3 et acétylation sont toutes deux des marques positives pour l'activation des gènes.

Par conséquent, la reconnaissance des pré-modifications des histones par les complexes est également importante pour cibler l'action de GCN5 sur des gènes particuliers. Nous avons étudié l'importance de H3K4me3, mais aussi la présence d'autres pré-modifications. Il en est ressorti que, si un peptide H3 est à la fois diméthylé sur la lysine 9 et phosphorylé sur la sérine 10, les enzymes ne peuvent plus acétyler le substrat.

Comme nous l'avons vu en Introduction, la structure et les domaines de l'enzyme sont importants pour la reconnaissance du substrat et le recrutement de l'enzyme sur la chromatine. De plus, les partenaires du module HAT jouent également un rôle très important sur l'activité même de GCN5. J'ai pu montrer que GCN5 au sein des modules recombinants rHAT ATAC et rHAT SAGA acétyle préférentiellement les histones H3. Cependant, cette activité est plus importante lorsque GCN5 a pour partenaire ADA2b, alors que l'inverse est observé sur les histones H4 où GCN5 acétyle mieux ce substrat en présence d'ADA2a. Ces partenaires jouent donc un rôle dans la spécificité de substrat de GCN5 selon son appartenance à ATAC ou SAGA.

Le rôle des protéines ADA2a et ADA2b, en plus de SGF29 est donc essentiel pour l'activité catalytique de GCN5 face à son substrat. Néanmoins, nous avons vu que le module HAT n'est pas suffisant pour obtenir une activité comparable à celle des complexes endogènes. De plus amples travaux sont nécessaires pour comprendre comment les autres sous-unités, spécifiques d'ATAC ou de SAGA, jouent un rôle sur cette activité et comment elles permettent un recrutement spécifique sur les gènes. J'ai ainsi commencé à chercher à agrandir les modules recombinants HAT en cherchant quels pourraient être les autres protéines interagissant avec le module HAT et ce, dans le contexte d'ATAC et SAGA. Nous avons pu mettre en évidence qu'ADA1 et TAF12 peuvent interagir avec le module rHAT SAGA.

Les différents faits que je viens de citer soulèvent de nouvelles interrogations et demandent donc de nouvelles recherches afin de mieux comprendre les résultats obtenus. C'est que je détaille à présent ci-après.

2. Comment expliquer la différence d'action d'ADA2a et ADA2b sur l'enzyme ?

a. Rôles d'ADA2a et ADA2b selon les différentes espèces

La présence de deux gènes codant pour les protéines ADA2 corrèle avec l'apparition des métazoaires (Figure 24). Chaque version est propre à un complexe : ADA2a est une sous-unité d'ATAC tandis qu'ADA2b est une sous-unité de SAGA. Nous avons vu en Introduction que chez la drosophile *in vivo*, dGCN5 au sein du complexe dSAGA acétyle les histones H3 alors qu'au sein de dATAC, dGCN5 acétyle les histones H4. Chez l'homme en revanche, les deux complexes acétylent préférentiellement l'histone H3 *in vitro*.

Afin de mieux comprendre le rôle de l'incorporation de l'enzyme GCN5 au sein des complexes hATAC et hSAGA, nous avons étudié l'activité de l'enzyme en fonction de la présence des protéines du module HAT (ADA2a/b, ADA3 et SGF29). Nous avons pu montrer que ces protéines sont effectivement importantes pour l'activité de GCN5 et PCAF, cette dernière augmentant sur les substrats en présence de ces partenaires. De façon remarquable, lorsque nous avons comparé les modules HAT entre eux, nous avons pu mettre en évidence que l'activité de GCN5 sur l'histone est meilleure en présence d'ADA2b que d'ADA2a. Par contre, l'inverse est observé sur l'histone H4. Bien que les deux modules acétylent préférentiellement H3, la régulation de l'enzyme selon la présence d'ADA2a ou ADA2b est différente. De plus, j'ai pu montrer qu'il n'est pas possible de purifier la protéine recombinante ADA2a avec GCN5, alors que les protéines recombinantes ADA2b et GCN5 peuvent être purifiées ensemble. L'interaction entre les protéines ADA2 et l'enzyme est donc plus ou moins forte selon l'une ou l'autre. Afin de mieux comprendre les différences obtenues selon la présence d'ADA2a ou ADA2b et comment ces protéines jouent un rôle sur l'activité de GCN5, je propose les expériences ci-dessous.

b. Localisation d'ADA2a et ADA2b dans la cellule

Afin d'apporter une approche plus *in vivo* dans l'étude des complexes hATAC et hSAGA, la localisation de leurs sous-unités respectives a été étudié par immunofluorescence (IF) au laboratoire par Nikolaos Vosnakis. Il en ressort qu'ADA2a surexprimée exogène se situe principalement dans le cytoplasme. En ajoutant GCN5 surexprimée exogène, cette fois, ADA2a se localise dans le noyau. ADA2b en revanche, se situe toujours dans le noyau.

Cette différence de localisation entre les sous-unités des complexes rappelle les résultats obtenus avec TAF10 (Soutoglou et al., 2005). TAF10 est une sous-unité des complexes SAGA et TFIID et peut interagir avec les protéines TAF3, TAF8 et SPT7L. Les auteurs ont montré que TAF10 surexprimée se situe dans le cytoplasme de la cellule et ne contient pas de domaine de localisation nucléaire NLS (Nuclear Localization Signal). C'est en interagissant avec l'un de ses trois partenaires, possédant un domaine NLS, que TAF10 est relocalisée dans le noyau (Soutoglou et al., 2005). Dans le cas d'ADA2a et ADA2b, par des études bioinformatiques, toutes deux semblent avoir un domaine NLS. Mais, il apparaît que les séquences des domaines NLS d'ADA2a et ADA2b présentent des différences. Une approche serait de remplacer la séquence NSL d'ADA2a par celle d'ADA2b et voir si cela influence la localisation de la protéine dans le noyau cette fois-ci.

Cette différence de localisation dans la cellule s'ajoute à celles que nous observons déjà entre ces deux protéines, à savoir l'influence sur l'activité de GCN5 et la capacité de se lier à cette dernière. Dans le cas de TAF10, celle-ci peut interagir avec ses trois partenaires via son domaine HFD. Cette interaction est donc visible *in vivo* mais aussi *in vitro* (Soutoglou et al., 2005). Or, nous avons vu qu'une IP contre GCN5 retient ADA2b mais pas ou très faiblement ADA2a (Figure 40). Mais, c'est justement l'interaction avec GCN5 qui permet la relocalisation d'ADA2a du cytoplasme vers le noyau. Comment expliquer une liaison *in vivo* qui n'est pas visible *in vitro* ? Néanmoins ces différences d'interaction et de localisation entre les deux protéines ADA2 semblent cohérentes avec le fait qu'ADA2a influence moins l'activité de GCN5 qu'ADA2b.

c. Construire des mutants d'ADA2a/b

Une des premières étapes dans la compréhension de l'influence des sous-unités sur l'activité de GCN5 est d'établir le rôle d'ADA2a et ADA2b. Pour cela, il faudrait considérer la construction de mutants chimériques de ces deux protéines : protéines délétées de certains domaines, mais également échange d'une partie d'ADA2a avec celle d'ADA2b par exemple. Par manque de temps, nous n'avons pu commencer de tels travaux mais une étude chez la drosophile a été effectuée en ce sens très récemment (Vamos and Boros, 2012).

Il est connu que les mutants *dAda2a* conduisent à une diminution du niveau d'acétylation de H4K5 et H4K12 et le mutant *dAda2b* à une diminution sur H3K9 et H3K14 (Ciurciu et al., 2006; Pankotai et al., 2005). dATAC joue donc un rôle dans l'acétylation de

H4 et dSAGA dans celle de H3. Les auteurs ont voulu savoir s'il était possible de restaurer les niveaux d'acétylation dans ces deux mutants à l'aide de protéines dADA2 chimériques. Ils ont alors construit plusieurs types de protéines dont principalement : une protéine contenant la région N-terminale de dADA2a et la région C-terminale de dADA2b (dite dADA2a2b) et une protéine présentant l'inverse (dADA2b2a). En bref, ils ont pu mettre en évidence que la chimère dADA2b2a permet de restaurer l'acétylation de H4 dans les mutants *dAda2a in vivo*. De même, la chimère dADA2a2b restaure l'acétylation de H3 dans les mutants *dAda2b*, ce qui n'est pas le cas des autres chimères. En conclusion de ces travaux, la région C-terminale contenant le domaine SWIRM des protéines dADA2 est responsable de la spécificité de dATAC et dSAGA sur les substrats histones dans ce type d'expériences effectuées *in vivo* (Vamos and Boros, 2012).

Il faut néanmoins prendre en compte que ces résultats ont été obtenus chez la drosophile, et que les substrats du complexe ATAC chez la drosophile sont différents chez les mammifères : dATAC acétyle H4 *in vivo* mais hATAC cible les mêmes histones que hSAGA (H3K9K14) *in vitro*. L'implication des domaines des protéines ADA2 serait à considérer selon le type d'organisme étudié : il est donc important d'effectuer des travaux avec des protéines chimériques d'ADA2a et ADA2b chez l'homme, même si des résultats partiels ont été obtenus chez la drosophile.

d. Obtenir la structure des modules pour comprendre l'influence des protéines ADA2

La région C-terminale des protéines dADA2a/b serait donc la clef pour expliquer la spécificité d'action de dGCN5 au sein des complexes dATAC et dSAGA. Cette région comprend le domaine SWIRM. Chez les mammifères, ce domaine permet l'interaction de hADA2b avec hADA3, alors que la région N-terminale fait la liaison avec hGCN5 (Gamper et al., 2009). Nous nous attendrions plutôt alors à ce que ce soit la région N-terminale d'ADA2a/b qui soit impliquée dans la régulation de l'enzyme. Or, nous avons montré que la présence d'ADA3 est nécessaire pour obtenir un module GCN5-ADA2a-ADA3 (Figure 40). Nous pouvons suggérer que ce serait le type d'interaction créé entre les protéines ADA2a/ADA2b et ADA3 qui pourrait influencer l'enzyme. En ce sens, obtenir une structure des modules HAT en particulier, contenant soit hADA2a ou hADA2b, pourrait apporter des indications quant à une telle hypothèse. Des réponses seront apportées grâce aux travaux de Simon Trowitzsch de l'équipe d'Imre Berger (EMBL, Grenoble) et de Grigory Sharov et

Alexandre Durand de l'équipe de Patrick Schultz (IGBMC). Ces derniers ont pour objectif d'obtenir la structure des deux modules HAT recombinants par cristallographie (EMBL) et par microscopie électronique (IGBMC), respectivement.

3. Comprendre la structure des complexes

Nous avons montré que GCN5 au sein du module HAT présente une meilleure activité d'acétylation. Mais, celle-ci n'est pas comparable à celle du complexe entier. Afin de comprendre comment l'enzyme est régulée, les protéines interagissant avec le module HAT sont à identifier. Pour aller plus loin, c'est la compréhension de l'assemblage des complexes dans son intégralité qu'il va falloir développer. Cela permettra d'en découvrir plus à la fois sur la structure du complexe et le rôle de chaque sous-unité dans celui-ci (rôle architecturale ou sur l'activité de l'enzyme ?).

a. Dans le cas de hSAGA

Comme nous l'avons vu en Introduction, une structure du complexe SAGA dans son intégralité a été effectuée. Cependant, comment les protéines interagissent les unes avec les autres pour former le complexe entier n'est pas vraiment compris. De ce qu'il a été déjà publié, nous avons les modules HAT (GCN5-ADA2b-ADA3-SGF29), DUB (USP22-ATXN7-ATXN7L3-ENY2), le cœur formé de TAFs (TAF5L, TAF6L, TAF9, TAF10, TAF12 et ADA1) et TRRAP. Il est possible de purifier et « construire » ces modules à partir de protéines surexprimées. L'activité du module rHAT étant encore insuffisante comparée à celle du complexe entier, l'identification des protéines interagissant avec rHAT est nécessaire. Il faut alors savoir comment ces modules et les autres protéines du complexe s'assemblent.

Récemment, comme nous l'avons vu en Introduction, afin de comprendre quelles sont les interactions entre protéines au sein du complexe ySAGA, Kenneth Lee a pratiqué une série de délétion de plusieurs sous-unités chez *Saccharomyces cerevisiae* (Lee et al., 2011). Dans chaque cas, il a immunoprécipité le complexe en ciblant une protéine en particulier puis, a étudié la composition du complexe retenu par protéomique quantitative. De cette étude, il ressort que la délétion de yGcn5 ou Sgf29 n'affecte pas l'incorporation d'Ada2 et Ada3 dans ySAGA. Par contre, lors de l'absence d'Ada2, les sous-unités Gcn5, Ada3 et Sgf29 ne sont

plus rattachées à ySAGA. Ada2 serait donc le lien pour l'incorporation du module HAT au sein du complexe ySAGA.

Nous avons essayé de chercher quelles pourraient être ces protéines rattachant le module au complexe par des IP sur les protéines recombinantes. Nous avons pu montrer que la paire ADA1-TAF12 interagit avec le rHAT et d'autres expériences sont nécessaires pour approfondir l'incorporation dans hSAGA. Il aurait été intéressant de trouver des indices quant au rôle d'Ada1 dans l'architecture de ySAGA. Malheureusement le papier de Kenneth Lee ne s'est pas plus concentré sur cette protéine.

D'après le travail effectué sur la levure, les modules HAT et DUB devraient être proches dans le complexe (Lee et al., 2011). Mais il n'a pas été possible de mettre en évidence des interactions avec le module DUB ou encore avec d'autres TAFs (cf section C). D'autres protéines doivent jouer le rôle de « liant » entre ces modules car ceux-ci n'interagissent pas directement.

En outre, Spt3 et Spt20 seraient localisés à proximité des deux modules chez la levure (Lee et al., 2011) (Figure 20). De plus, SPT20 a un rôle important dans l'intégrité du complexe, sans pour autant perturber l'intégrité des modules (Lee et al., 2011; Nagy et al., 2009; Sterner et al., 1999). SPT20 aurait été un parfait candidat pour relier les modules. Malheureusement, nous n'avons pas pu montrer cela. La protéine SPT3 pourrait être celle impliquée dans la liaison des modules HAT et DUB, de nouvelles expériences sont à réalisées en ce sens. De ces résultats obtenus et ceux publiés, nous pouvons poser l'hypothèse que SPT3 interagirait avec le module HAT, SPT20 avec le module DUB et c'est l'interaction SPT3-SPT20 qui raccrocherait les deux modules au complexe hSAGA. Néanmoins, le module HAT ne doit pas être simplement « accroché » par SPT3, et doit en plus être imbriqué dans le complexe par ADA1-TAF12.

Dans la compréhension de l'architecture de SAGA, il faut reconnaître que l'assemblage du complexe n'implique pas les protéines « deux par deux » et qu'il faut considérer les choses dans un ensemble. Nous avons travaillé en surexprimant les modules, mais les parties ne sont peut-être pas aussi faciles à assembler *in vitro*. De plus gros modules ont besoin d'être étudiés afin de pouvoir réunir les différentes parties. Pour ce faire, l'utilisation de la technologie MultiBac, permettant la co-expression de plusieurs protéines à partir d'un seul vecteur lors de l'utilisation de baculovirus, pourrait être employée.

b. Dans le cas de hATAC

Nous n'avons pas pu purifier un module de type rHAT-ATAC2-WDR5 (cf section C.). Bien que des interactions n'aient pas pu être mises en évidence, cela ne signifie pas qu'il n'existe pas de contact entre elles au sein du complexe. En effet, nous avons pu purifier la protéine recombinante ATAC2 avec GCN5. Cette interaction doit être perturbée par les sous-unités du module HAT et la liaison de GCN5 avec ATAC2 doit être renforcée avec d'autres sous-unités. En outre, GCN5 peut acétyler ATAC2 (Figure 60), ce qui suggère que ces protéines peuvent être proches au sein du complexe. Comme discuté plus haut, pour ce genre d'expériences, il faut considérer que soit les protéines n'interagissent pas ensemble dans le complexe, soit d'autres protéines sont nécessaires pour faciliter l'assemblage des modules entre eux. Le complexe hATAC contient une dizaine de protéines, les tests doivent être approfondis avec les autres sous-unités : MBIP, NC2 β , YEATS2 et ZZZ3.

De ce qui est déjà connu, YEATS2 et NC2 β interagissent ensemble via leur domaine HFD (Wang et al., 2008). De plus, des expériences de double-hybride à grande échelle pour étudier l'"interactome" suggèrent que MBIP peut interagir avec WDR5 ou avec ATAC2 (Rual et al., 2005; Venkatesan et al., 2009). Il faudrait pouvoir obtenir les protéines de manière surexprimée afin de vérifier ces interactions par IP, puis essayer de construire des sous-modules. Par exemple, quelles autres sous-unités interagissent avec le module HAT ? Nous pouvons supposer que MBIP pourrait consolider les interactions d'ATAC2 et WDR5 avec le module HAT. De plus, si nous pouvons identifier les protéines qui se lient à ATAC2, nous pourrions peut-être enfin apercevoir une activité d'ATAC2 sur les histones. Si ce n'est toujours pas le cas, peuvent-elles néanmoins influencer une activité enzymatique de la part de celle-ci sur un certain type de substrat autre que histone ?

Ainsi, à l'aide de la plateforme de Biologie Moléculaire de l'Institut, des plasmides gateway pour YEATS2, ZZZ3, ATAC2, MBIP, WDR5 et NC2 β ont été générés (cf Matériels et Méthodes). Ces plasmides permettront d'obtenir la protéine seule et taguée. A plus long terme il sera possible d'obtenir des plasmides de MultiBac, permettant l'expression de plusieurs protéines à partir d'un seul vecteur, pour l'étude de modules protéiques en plus du module HAT.

Par ailleurs, il faut également remarquer qu'à ce jour la structure globale du complexe hATAC n'a pas été résolue. Ce projet est mené par Grigory Sharov de l'équipe de Patrick Schultz (IGBMC). Obtenir la structure du complexe dans son ensemble permettrait dans un

premier temps d'estimer la taille de hATAC et ainsi comprendre la disparité de taille obtenue par gel filtration (voir Partie 2). Par ailleurs, nous avons vu que l'activité de GCN5 au sein du module n'est pas comparable à celle du complexe entier. D'autres sous-unités agissent aussi sur l'enzyme. Situer le module HAT au sein du complexe par des expériences d'immunomarquage apporterait des indications quant à la régulation de l'enzyme au sein du complexe entier. De plus, si les structures du module rHAT et du complexe endogène sont résolues, il serait possible de les comparer et comprendre comment le module HAT est incorporé dans hATAC. Cela permettrait aussi d'établir le nombre de contacts du module HAT avec les autres protéines du complexe.

En outre, j'ai discuté plus haut le fait que les structures des modules recombinants HAT pour hATAC et hSAGA sont étudiées. Pouvoir comparer ces structures à celles des complexes entiers permettrait de comprendre comment l'incorporation de l'enzyme, commune aux deux complexes HAT, se fait de façon spécifique dans un complexe ou dans l'autre.

4. Pourquoi une telle différence d'activité entre des substrats octamères et nucléosomes ?

Chez la levure, une telle différence d'activité entre les substrats histones et nucléosomes a déjà été observée (Eberharter et al., 1998) : des tests d'activité avec ySAGA sur des octamères et des nucléosomes ont été effectués et il s'avère que ySAGA acétyle difficilement les nucléosomes en comparaison des octamères. Il est intéressant de remarquer que les auteurs ont de la même manière étudié d'autres complexes HAT : ADA, NuA3 et NuA4. Ces derniers ne montrent pas une telle différence d'activité sur leurs substrats entre octamères et nucléosomes comme ySAGA, néanmoins, certains points sont à remarquer. En effet, NuA3 peut acétyle H4 dans les octamères et non dans le cas des nucléosomes, de même pour NuA4 avec H3. En revanche, le complexe ADA peut acétyle H2B que dans le cas des nucléosomes. Une différence entre les environnements de type octamère ou nucléosome constitue donc un vrai enjeu dans l'acétylation des histones et une explication ne semble pas si évidente.

a. Le rôle de GAL4VP16 dans le recrutement des complexes sur les nucléosomes

Lorsque nous n'avons obtenu aucun signal d'acétylation sur les nucléosomes comparés aux octamères, nous avons voulu ajuster les conditions d'expérimentation. En Introduction, il a été présenté que SAGA interagit avec les activateurs de la transcription GAL4 et VP16 et que ces associations sont importantes pour l'activation de la transcription. Nous avons alors ajouté la protéine activatrice chimérique GAL4VP16 à nos tests d'activité. Celle-ci comprend le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 et le domaine activateur de VP16 (Hardy et al., 2002). En présence de cette chimère, le recrutement de SAGA sur les nucléosomes serait plus efficace. Malheureusement, bien qu'un signal soit visible, cela reste beaucoup trop faible en comparaison avec des octamères. L'interaction avec GAL4VP16 est importante mais pas suffisante. Notons que dans le papier d'Anton Eberharter, des tests HAT ont été effectués avec ySAGA et l'interaction de ce dernier avec VP16 mise en évidence (Eberharter et al., 1998). Néanmoins, des tests d'activité sur les nucléosomes avec ySAGA en présence de VP16 n'ont pas été présentés. Il aurait été intéressant d'avoir une comparaison entre nos résultats avec les protéines humaines et ceux chez un autre organisme que la levure. Chez l'homme, il a été montré que hSAGA et VP16 interagissent de façon directe et que cette interaction a une importance fonctionnelle pour la stimulation de VP16 lors d'expériences de transcription *in vitro* (Hardy et al., 2002).

b. Le rôle des pré-modifications dans le recrutement des complexes

D'autres facteurs sont primordiaux pour pouvoir observer une activité d'acétylation sur les nucléosomes. En plus des activateurs, nous savons que les pré-modifications des histones ont un rôle important dans la compaction/décompaction de la chromatine. En outre, les sous-unités des complexes ATAC et SAGA possèdent des domaines capables de reconnaître ces modifications. En effet, avec Andree Schram, nous avons comparé l'activité des complexes sur des octamères pré-modifiés pour H3K4me3 et montré que celle-ci est reconnue par SGF29. Elle joue ainsi un rôle dans l'acétylation des histones par les complexes. L'idée à présent est de construire de nouveaux nucléosomes mais, avec des octamères contenant au préalable cette modification, puis d'effectuer des tests HAT avec les complexes sur ces nucléosomes en présence de GAL4VP16.

Par ailleurs, il faudrait également prendre en compte d'autres modifications. En effet, les sous-unités des complexes présentent différents domaines capables de reconnaître des

modifications (cf Introduction) et peuvent par conséquent influencer le recrutement des complexes. De plus, les modifications jouent aussi sur la surface de contact entre le substrat et le domaine HAT de l'enzyme, ce qui peut perturber l'affinité de ce domaine avec l'histone (Figure 61).

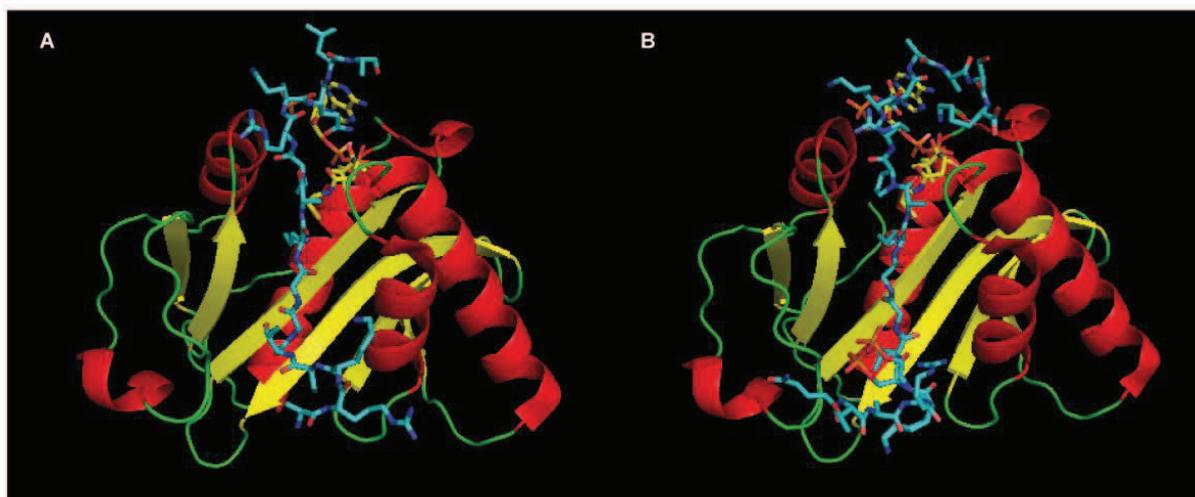


Figure 61 : La conformation du substrat change en présence de pré-modification.

Le domaine HAT de GCN5 de *Tetrahymena thermophila* est représenté en présence de peptides mimant les queues d'histones H3 (positions 1 à 19, en bleu). L'acétylCoA est en jaune.

A. Représentation en présence du peptide H3 non modifié.

B. Représentation en présence du peptide H3 phosphorylé sur la sérine 10.

Références PDB : 1PU9 et 1PUA.

Mais, construire des nucléosomes avec d'autres modifications est très délicat : le plus intéressant serait de jouer sur une combinaison de différentes modifications, or construire des nucléosomes recombinants dans ce cas, est encore difficile à l'heure actuelle. Il existe cependant une manière d'obtenir à peu près le même résultat en considérant les nucléosomes avec des peptides pré-modifiés. En outre, cela apporterait dans le même temps des indications sur le rôle de ces modifications et peut-être même d'établir une spécificité entre ATAC et SAGA comme nous l'avions proposé. Ces considérations expérimentales seront détaillées dans la section 7.c.

c. L'acétylation a-t-elle lieu avant l'incorporation de l'histone dans le nucléosome ?

Concernant l'acétylation des histones, deux possibilités existent. Une catégorie d'enzymes, comme HAT1, acétyle les histones dans le cytoplasme lorsque celles-ci viennent

d'être synthétisées. L'autre catégorie acétylent les histones quand elles sont au sein du nucléosome dans le noyau (Brownell and Allis, 1996). La majorité des sous-unités des complexes étant présentes dans le noyau, nous pouvons considérer que SAGA et ATAC acétylent les histones dans le noyau. Mais, nous pourrions supposer que ces complexes acétyleraient les octamères avant leur incorporation en nucléosome. Cela pourrait expliquer pourquoi il n'est pas possible de détecter un signal sur les nucléosomes.

En effet, dans certains cas, les protéines chaperons interagissent avec les histones nouvellement synthétisées du cytoplasme pour leur transfert dans le noyau, où elles seront acétylées par des enzymes HAT, comme Rtt109 chez la levure. Puis, les histones ainsi modifiées sont intégrées au nucléosome. Or, des purifications de nucléosomes acétylés à partir d'extraits de levure sur colonne ont permis de co-purifier SAGA (Grant et al., 1997). Le complexe est donc capable de se lier directement avec les nucléosomes et de les acétyler. De façon intéressante, il a été mis en évidence que ySAGA de levure se lie sur la queue acétylée de H3 via le bromodomaine de yGcn5 lorsque l'histone est au sein du nucléosome. ySAGA peut ainsi acétyler la queue non modifiée de la seconde histone H3 du tétramère (Li and Shogren-Knaak, 2009). Contrairement à Rtt109 qui acétyle H3 avant son incorporation dans le nucléosome, ySAGA se lie à ce dernier et acétyle la chromatine.

d. Quel est le rôle des protéines chaperons ?

Les complexes sont donc capables d'agir directement sur les histones au sein du nucléosome. Pour ces expériences, nous avons donc pris en considération l'action d'un activateur pour aider au recrutement des complexes HAT sur le nucléosome. Nous pourrions également considérer qu'il existe des enzymes ayant aussi un impact sur la modification de la chromatine : les protéines chaperons. Ces dernières interagissent avec les histones et jouent un rôle dans l'assemblage et le désassemblage des nucléosomes (pour des revues (Avvakumov et al., 2011; De Koning et al., 2007)). Si l'on prend l'exemple de Rtt109 (Regulator of Ty1 Transposition), celle-ci fonctionne de paire avec la protéine chaperon Vps75 (Vacuolar Protein Sorting 75) ou encore Asf1 (Anti Silencing Function 1). Cette interaction favorise l'acétylation de H3 par Rtt109. De façon plus précise, Rtt109 peut acétyler les histones fraîchement synthétisées n'ayant pas encore été incorporées dans le nucléosome (Han et al., 2007).

Dans le cas de SAGA, nous pourrions prendre en considération ASF1. Chez la levure, sa localisation sur les gènes corrèle avec le recrutement du complexe ySAGA sur la chromatine (Takahata et al., 2009). Par des expériences de CHIP chez *S. cerevisiae*, les auteurs ont étudié la position d'Asf1 et ySAGA au cours du temps le long du gène. Il s'avère que le chaperon modifie la chromatine où il s'en suit la liaison de ySAGA sur le gène. De plus, il a été observé que la protéine chaperon Asf1 se lie à l'histone H4 lorsque celle-ci est au sein du nucléosome, ce qui perturbe la conformation de ce dernier (Natsume et al., 2007). Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'Asf1 perturberait la conformation du nucléosome, ce qui permettrait à ySAGA de se lier au nucléosome via son bromodomaine et d'atteindre les positions à acétyler de l'histone H3. Pour répondre à cette question, nous devrions reconsidérer nos expériences effectuées sur le nucléosome mais, cette fois-ci, en présence d'ASF1.

e. L'interaction des complexes avec les nucléosomes serait-elle beaucoup plus difficile ?

Dans le cas de certaines protéines, la liaison de celles-ci avec l'ADN empêche leur acétylation par les ATs (Hernandez-Hernandez et al., 2006). Nous pouvons penser que la liaison des histones avec l'ADN rejoint cette observation et pourrait expliquer la différence observée entre octamères et nucléosomes.

Dans le cas de yGcn5 de levure, des expériences *in vitro* ont montré que l'enzyme acétyle plus difficilement les nucléosomes que les histones libres. En effet, la partie N-terminale de H3 semble devenir plus difficilement accessible à l'enzyme dans le cas des nucléosomes (Tse et al., 1998). La liaison des histones à l'ADN pourrait donc expliquer la difficulté à acétyler les histones. Mais bien que l'activité soit réduite, elle n'est pas inhibée si drastiquement que dans nos expériences. D'autres facteurs, comme discuté au dessus, entrent donc en jeu.

En outre, il a été mis en évidence que yGcn5 a besoin de ses partenaires protéiques afin d'acétyler les nucléosomes. Pourquoi dans notre cas, ne parvenons nous pas à apercevoir une activité lorsque GCN5 est au sein d'un complexe ? Les conditions des expériences effectuées *in vitro* semblent beaucoup influencer la possibilité que l'enzyme acétyle les nucléosomes. Nos conditions paraissent être raisonnables pour pouvoir utiliser les enzymes et les substrats, mais peut-être que ce ne sont pas les conditions optimales. En effet, nous avons toujours utilisés des quantités raisonnables de protéines, mais certaines publications indiquent

que les tests ont été effectués avec jusqu'à quinze fois plus de substrats que dans notre cas. Peut-être devrions-nous encore augmenter les quantités de substrats ? Mais, à ce moment là, nous ne serions plus dans des conditions physiologiques : GCN5 est une enzyme très active dont le substrat favori est H3, si le substrat est acétylé nous devrions voir le signal d'acétylation.

f. Qu'en est-il des niveaux de compaction supérieur ?

Nous avons voulu étudier l'acétylation des histones par hATAC et hSAGA selon les différents niveaux de compaction de la chromatine : octamères, mononucléosomes, polynucléosomes. Bien que certains de ces aspects de la chromatine restent encore à élucider, il ne faut pas oublier l'état supérieur qui consiste en l'ajout de l'histone H1. Pour le moment, nous n'avons pas travaillé sur cet état de la chromatine.

De façon intéressante, il a été mis en évidence que H1 peut être acétylée et plus spécifiquement par l'enzyme GCN5 (Kamieniarz et al., 2012). Ainsi, cette dernière peut acétyler H1 *in vitro* et *in vivo*. Ceci corrèle avec les résultats que nous avons présentés dans la partie sur la caractérisation de hATAC : après traitement au TPA, GCN5 est recruté sur les gènes IE et le niveau de H1 acétylée augmente justement sur ces mêmes gènes. Nous savons que le complexe contenant GCN5, étant recruté suite au traitement TPA, est hATAC (Nagy et al., 2010). Il serait donc juste de penser que le complexe responsable de l'acétylation de H1 au niveau des gènes IE serait précisément hATAC. Notons que cette acétylation réduit l'affinité de H1 pour la chromatine et, par conséquent, facilite la transcription.

Concernant l'activité enzymatique sur ce type de chromatine, il a été montré que la présence de l'histone H1 influe fortement sur l'acétylation des nucléosomes. En effet, l'enzyme PCAF sous forme recombinante n'est plus capable d'acétyler les nucléosomes lorsque H1 est ajoutée (Herrera et al., 2000). Notons que dans ce cas H1 n'entre pas en compétition avec H3 et H1 ne peut pas être acétylée lorsqu'elle est incorporée au nucléosome. De plus, lorsque l'enzyme est au sein d'un complexe multi-protéique, H1 n'est plus un obstacle à l'acétylation de H3 : les sous-unités du complexe doivent participer d'une certaine manière au déplacement de H1 pour faciliter l'accès à H3. Il serait donc intéressant de voir si ces partenaires essentiels pour l'activité de PCAF sur ce type de chromatine sont ceux du complexe ATAC ou SAGA. hATAC acétylerait H1 au niveau des gènes IE après traitement au TPA, qu'en est-il de hATAC et hSAGA sur H1 au niveau d'autres gènes ?

5. Spécificité de substrat dans le cas de cibles de type non-histone

Nous n'avons pu mettre en évidence d'activité spécifique pour hATAC et hSAGA sur les histones. Il semblerait que le complexe hATAC soit plus actif que hSAGA mais il n'y a pas de différence entre les positions acétylées et la réaction face à des peptides prémodifiés. Il existe cependant une spécificité au niveau des gènes : recrutement d'ATAC sur les gènes IE après traitement TPA, catégories de gènes régulés spécifiquement par hATAC ou hSAGA (Krebs et al., 2011). Jusqu'à présent, nous nous sommes focalisé sur la spécificité des complexes sur les histones. Mais, il a été montré que GCN5 et PCAF peuvent avoir pour cible des protéines autres que des histones (voir Introduction). Par exemple, nous avons pu montrer au laboratoire que hATAC, et non hSAGA, acétyle la cycline A (Partie 4 et (Orpinell et al., 2010)). Il reste ainsi encore sûrement beaucoup d'autres cibles de type non-histones à découvrir ; ces derniers pouvant se révéler être un substrat spécifique de l'un ou l'autre complexe HAT.

Pour répondre à ces questions, il faudrait pouvoir faire des tests d'acétylation à grande échelle comme nous en avons discuté dans la Partie 2.

6. Quelles lysines sont vraiment les cibles d'ATAC et SAGA ?

Nous avons démontré que hATAC et hSAGA acétylent les lysines 9 et 14 des histones H3. J'aimerais présenter les résultats obtenus concernant justement l'acétylation de ces positions par GCN5 et PCAF. Des expériences ont été effectuées afin de confirmer que la lysine 9 est la cible principale de GCN5 et PCAF (Jin et al., 2011). En effet, les auteurs ont mis en évidence que dans des lignées de souris double mutantes inductibles pour GCN5 et PCAF, les niveaux de H3K9 acétylées sont drastiquement diminués, alors que l'acétylation des autres positions ne l'est pas. Les tests de spectrométrie de masse en comparant les lignées sauvage et mutante ont permis de montrer que le niveau de H3K9 acétylées est en effet perturbé dans les mutants, alors que le niveau de H3K14 l'est moins. Cela rejoint en quelque sorte ce que nous avons observé dans les cellules HeLa après utilisation d'ARN interférents (KD) (cf Partie 2). Nous avons pu observer que les niveaux de H3K9 acétylées diminuent fortement après KD contre les sous-unités de hATAC ou de hSAGA. Une diminution pour H3K14 acétylée a aussi été mise en évidence mais n'est pas aussi importante que pour la lysine 9. Nous avons aussi pu montrer que les deux complexes acétylent les octamères sur ces deux lysines.

En ce qui concerne nos données, hATAC et hSAGA acétylent donc la lysine 14 des peptides H3, les deux positions 9 et 14 sur des octamères *in vitro*. *In vivo*, des expériences de double KO GCN5/PCAF sur des lignées murines non différenciées dites MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) suggèrent que mATAC et mSAGA acétylent préférentiellement la position 9. Pour expliquer cette différence de préférence entre *in vitro* et *in vivo*, nous pouvons suggérer que dans le cas du KD d'un des deux complexes HAT, l'autre compense pour l'acétylation de K14. Or, pour un double KO GCN5/PCAF, donc des deux complexes, l'acétylation de K14 n'est pas perturbée (Jin et al., 2011). Il est possible néanmoins que ce soit alors d'autres enzymes ou complexes HAT qui compenseraient pour l'acétylation de cette position. Concernant la lysine 9, cette position n'est plus du tout acétylée dans les lignées double KO pour GCN5/PCAF (Jin et al., 2011). L'acétylation de H3K9 est donc uniquement due à ces enzymes. Dans nos expériences effectuées sur des cellules humaines HeLa, l'utilisation d'ARN interférents contre hATAC ou hSAGA conduit dans les deux cas à une diminution de moitié de l'acétylation de cette position. Cela montre que les enzymes au sein de ces complexes acétylent effectivement la position 9, mais aussi qu'un complexe ne peut compenser la perte de l'autre. Les complexes acétyleraient des régions spécifiques du génome, comme nous l'avons vu en Introduction.

Il n'est pas à exclure que hATAC et hSAGA acétylent encore d'autres positions sur les histones. En effet, nous avons montré que hATAC peut acétyler les histones H4. Ces résidus sont encore à identifier. Nous pouvons aussi nous interroger quant à la région plus C-terminale de H3. Pour cela, nous pourrions reproduire les expériences d'acétylation sur les octamères recombinants, mais, au lieu de visualiser les positions acétylées par WB, nous pourrions analyser ces dernières par spectrométrie de masse. Cela nous donnerait une idée de toutes les positions acétylées, et ce sur la longueur totale de l'histone, ce qui serait fastidieux à obtenir par WB. Par ailleurs, nous pourrions obtenir des différences sur ces autres positions selon que l'incubation aurait lieu avec hATAC ou hSAGA.

7. Les pré-modifications sont importantes pour l'activité et la spécificité des complexes ATAC et SAGA

a. L'efficacité d'acétylation des histones natives et recombinantes est différente

En utilisant les peptides pré-modifiés nous n'avons pas pu mettre en évidence d'importance des pré-modifications sur l'activité des enzymes. Par contre, dans le contexte de l'octamère, nous avons pu montrer que les complexes ATAC et SAGA sont mieux recrutés sur la chromatine grâce à la reconnaissance de la position H3K4 triméthylée grâce au domaine Tudor de SGF29. ATAC contient WDR5. Son domaine WD40 permet de servir de plateforme d'assemblage mais pourrait aussi permettre la reconnaissance des histones H3K4 triméthylées. Concernant la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3, nous avons vu que combinée à H3K9 diméthylée, l'acétylation du substrat n'est plus possible. Ce résultat est assez perturbant et il serait intéressant de pouvoir le confirmer dans le contexte de l'octamère. Pour pouvoir tirer une conclusion fiable de nos résultats obtenus sur les peptides, il faudrait compléter nos données par de nouvelles expériences sur les octamères. Or, obtenir des octamères pré-modifiés n'est pas chose aisée et je discuterai de ce point expérimental dans cette section.

b. Interdépendance entre les pré-modifications des histones

Ce que nous n'avons pas discuté au cours de ce manuscrit est l'interdépendance qu'il peut exister entre les pré-modifications des histones (pour une revue (Lee et al., 2010)). Ces modifications peuvent être présentes sur la même histone (régulation dite en *cis*) ou sur des histones différentes (régulation dite en *trans*).

Ainsi, comme exemple de régulation en *cis*, comme je le décrirai plus en détail par la suite, la phosphorylation de la sérine 10 de H3 par la kinase Rsk2 (Ribosomal S6 Kinase 2) favorise l'acétylation de la lysine 14 de la même histone par yGcn5. Dans ce cas, la conformation de l'enzyme est changée par le contact avec la sérine phosphorylée (Cheung et al., 2000).

Il est donc possible d'établir des corrélations dans les pré-modifications des octamères et la façon dont ATAC et SAGA vont acétyler les histones. Mais, qu'en est-il des pré-modifications impliquées dans une régulation en *trans*? En effet, nous avons recherché une spécificité d'action d'ATAC et SAGA sur des peptides pré-modifiés. Ces expériences ne

permettent pas de révéler une implication des pré-modifications si celles-ci jouent un rôle à partir d'une histone voisine. De nos expériences, nous avons pu aussi montrer que les octamères présentant la lysine 4 de H3 triméthylée sont mieux acétylés que s'ils ne sont pas modifiés. Ceci est dû à la reconnaissance de H3K4me3 par la protéine SGF29, ce qui va conduire au recrutement d'ATAC et SAGA sur la chromatine. Ces résultats sont prometteurs mais, les complexes contiennent d'autres protéines spécifiques à chaque complexe et peut-être capable elles-aussi de reconnaître certaines modifications. Etudier comment d'autres pré-modifications pourraient agir sur les complexes, apporterait donc des indices quant à la régulation spécifique des complexes.

c. Considérations expérimentales pour la compréhension du rôle des pré-modifications

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence d'activité entre hATAC et hSAGA sur les peptides pré-modifiés. Nous nous attendions pourtant à observer plus ou moins des reconnaissances spécifiques pour un complexe ou l'autre. Ce qu'il faut considérer dans ce type d'expérience, c'est que nous ne sommes pas dans des conditions proches de la réalité : le substrat ne fait qu'une vingtaine d'acides aminés, ce qui est loin de la protéine dans son ensemble. De ce fait, les repliements de la protéine ou encore l'organisation en octamère n'entrent pas en jeu ici. En fait, les conditions les plus physiologiques restent l'étude enzymatique sur des nucléosomes. Cela pourrait expliquer pourquoi il est difficile de distinguer une spécificité sur des substrats de type peptides. Néanmoins, je suis d'avis que ce travail nécessitait d'être effectué : nous avons en effet déjà pu utiliser les peptides pour étudier l'activité de hATAC et hSAGA et cela nous a aidé à voir plus loin pour la poursuite des expériences ou encore de confirmer ou identifier les positions acétylés. Nous aurions pu obtenir des pistes très intéressantes pour la compréhension du recrutement et de l'activité des complexes sur les histones.

Pour de futures expériences, il faudra considérer d'allier l'environnement physiologique qu'est le nucléosome. Cela permettrait d'être au plus proche de la réalité et également de considérer la régulation des pré-modifications en *trans* si elle s'effectue entre deux nucléosomes. Or, nous avons vu qu'il est difficile de détecter un signal d'acétylation sur les nucléosomes. Il faudrait prendre en compte d'intégrer l'activateur GAL4VP16 en combinant des nucléosomes possédant différentes pré-modifications. D'un point de vue expérimental, il est possible d'obtenir des nucléosomes recombinants ayant des pré-

modifications comme ceux venant de l'équipe de Marc Timmers. Pour obtenir des nucléosomes pré-acétylés sur la lysine 16 de H4 ou encore ubiquitiné sur la lysine 120, des protocoles existent (McGinty et al., 2008; Shogren-Knaak et al., 2006). Mais, ces techniques sont délicates et la quantité de nucléosomes finale est faible. Récemment, il a été suggéré de « mimer » les pré-modifications en incorporant des acides aminés mutés dans les histones, au lieu de modifier ces dernières (Guo et al., 2008; Wang et al., 2012). Pour ce faire, en bref, les auteurs utilisent une tRNA synthétase particulière dite pyrrolysyl-tRNA, lors de la traduction des protéines histones dans *E. coli*. La séquence des histones a été modifiée génétiquement pour que la présence d'un codon ambre entraîne l'incorporation d'une alkylselenocysteine lors de la traduction. Suite à une réaction chimique, cet acide aminé va être modifié pour mimer un acide aminé méthylé, acétylé ou encore phosphorylé (Wang et al., 2012).

Avant d'essayer de recourir à ces techniques, je suggère de commencer à considérer les nucléosomes en présence de peptides : Raphael Margueron a effectué des tests d'activité en combinant nucléosomes et peptides dans la même expérience (Margueron et al., 2009). Les auteurs ont ainsi incubé les nucléosomes recombinants avec les enzymes et les substrats et en plus des peptides avec certaines modifications. Leur objectif a été de montrer que la modification, située sur le peptide, catalyse vraiment l'activité de l'enzyme sur le nucléosome recombinant. Nous pourrions faire de même afin de visualiser s'il existe une différence d'activité sur les nucléosomes selon le peptide modifié incubé. Notons, que comme discuté précédemment, il faudra sûrement prendre en compte d'intégrer GAL4VP16 dans ces expériences afin de visualiser le signal d'acétylation sur les nucléosomes.

d. La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 a son importance

Chez la levure, il a été montré que GCN5 acétyle préférentiellement les lysines 14 des histones H3 si ces dernières présentent la sérine 10 phosphorylée (Cheung et al., 2000; Lo et al., 2000). Les auteurs ont mis en évidence que la position acétylée par yGcn5 est la lysine 14. En outre, la phosphorylation permet une meilleure acétylation du substrat mais l'inverse n'est pas vrai. L'acétylation est une conséquence à la phosphorylation. Les auteurs ont obtenu les mêmes résultats avec les complexes ADA et SAGA (Lo et al., 2000).

Comme nous l'avons vu dans la section 4.b., la conformation du substrat dans le domaine catalytique de GCN5 change selon les modifications sur la chromatine (Figure 61). En effet, GCN5 se lie à la chromatine présentant H3S10p grâce à la conformation qu'une

arginine de son domaine HAT donne à l'enzyme (Lo et al., 2000). De ce fait, celle-ci peut mieux acétyler les histones.

De façon intéressante, yGcn5 acétylerait les histones des gènes *c-fos* et *c-myc* après que celles-ci aient été phosphorylées sur la sérine 10 par une kinase MAP, suite à un traitement dit EGF (Epidermal Growth Factor) (Cheung et al., 2000). Il aurait été curieux de pouvoir reproduire ces résultats chez l'homme et ce, en y intégrant ATAC. En effet, nous avons montré que hATAC et non hSAGA est impliqué dans la régulation des gènes IE comprenant *c-fos* après un stress au TPA (voir Partie 2). Or, chez la levure la kinase MAP responsable de la phosphorylation de H3S10 des gènes *c-fos* et *c-myc* après un traitement EGF est Rsk2. Cette kinase se retrouve justement également dans la voie de phosphorylation des gènes IE *c-fos* et *c-jun*.

En outre, nous avons montré que la combinaison des modifications H3K9me2 et H3S10p sur le même peptide entraîne une perte de l'activité de GCN5, recombinante ou sein des complexes, sur ce substrat. Prise séparément, ces modifications ne perturbent pas l'acétylation de la lysine 14 (Figures 57 et 58). De façon intéressante, la combinaison de ces deux modifications, H3K9me2 et H3S10p a déjà été étudiée (Eberlin et al., 2008). Les auteurs ont mis en évidence que ces deux modifications peuvent avoir lieu sur la même queue d'histone H3 et apparaissent durant la mitose. L'acétylation allant à l'encontre de la condensation de la chromatine, le fait que les complexes HAT ne puissent plus acétyler les histones en présence de ces modifications, corrobore nos observations. De façon plus précise, les auteurs ont montré que la région N-terminale de l'histone prend une conformation particulière lors de la mitose. Nous pouvons suggérer que suite à ce changement de conformation, les complexes ne peuvent plus se lier au substrat. Il serait utile de confirmer cette perte d'acétylation et de recrutement sur le substrat en effectuant des tests d'activité et d'interaction avec des octamères ou des nucléosomes contenant des histones H3K9me2 et S10p.

e. L'acétylation de la lysine 14 permettrait l'acétylation du résidu 9 de H3

Des expériences de spectrométrie de masse ont été effectuées pour évaluer les niveaux de lysines 9 et 14 acétylées dans les cellules murines MEFs (Jin et al., 2011). Comparé à la quantité de peptide H3K9ac, il y a 20 fois plus de peptides présentant H3K14ac. De façon remarquable, des peptides H3K9ac n'ont pu être trouvés que si ces derniers présentent

également la position 14 acétylée. L'acétylation de la lysine 9 ne peut donc avoir lieu sans que le résidu 14 le soit préalablement. Une telle observation devra être prise en compte pour nos futurs tests d'activité.

8. Le rôle de l'acétylation des sous-unités des complexes ATAC et SAGA

J'ai pu commencer à étudier si GCN5 et PCAF sont capables d'acétyler des sous-unités des complexes ATAC et SAGA. Nous savions en effet que ces enzymes peuvent acétyler des substrats autres que les histones, en plus de pouvoir s'autoacétyler. Nous avons alors supposé qu'elles pourraient agir sur des sous-unités des complexes.

J'ai ainsi pu montrer que GCN5 et PCAF peuvent acétyler les sous-unités communes ADA3 et SGF29, et la sous-unité ATAC2 spécifique d'ATAC (Tableau 7).

En outre, des expériences de spectrométrie de masse, afin d'identifier les protéines acétylées, ont pu mettre en évidence certaines protéines, connues comme étant des sous-unités d'ATAC ou SAGA (Choudhary et al., 2009). Nous retrouvons effectivement les protéines ADA3, SGF29 et ATAC2 dans cette liste (Tableau 7). D'autres sous-unités ont aussi été trouvées comme étant acétylées, mais je n'ai pas analysé si ces dernières peuvent l'être par GCN5 ou PCAF.

Tableau 7 : Sous-unités des complexes ATAC et SAGA acétylées.

Les protéines d'ATAC et SAGA ayant été identifiées par des expériences de spectrométrie de masse comme étant acétylées sont reportées dans ce tableau (S.M. : Spectrométrie de Masse). Ces données ont été obtenus de (Choudhary et al., 2009). Les résultats obtenus par des tests d'acétylation par GCN5 et PCAF sur des protéines recombinantes ont été ajoutés (tests AT) (cf Figure 60).

? : tests non effectués, - : pas d'acétylation observée.

SAGA		ATAC	
D'après S.M.	D'après les tests AT	D'après S.M.	D'après les tests AT
PCAF	PCAF/GCN5		PCAF/GCN5
TRRAP	?	ATAC2	ATAC2
TAF6L	?	ZZZ3	?
TAF9	?	WDR5	-
SGF29	SGF29	SGF29	SGF29
ADA2b	?	ADA2a	?
ADA3	ADA3	ADA3	ADA3

Par ailleurs, nous pouvons noter que WDR5 est trouvée acétylée, alors que nous avons montré que les enzymes GCN5 et PCAF n'agissent pas sur celle-ci. D'autres enzymes à activité AT peuvent donc être impliquées dans l'acétylation de ces protéines.

Nous pouvons en outre faire remarquer qu'une autre étude a mis en évidence l'acétylation des sous-unités Spt7, Ada3 et Sgf73 chez la levure (Cai et al., 2011). Dans des lignées KO pour yGcn5, il s'avère que ces dernières ne sont plus acétylées. yGcn5 est donc l'enzyme agissant sur ces protéines. De façon plus précise, l'enzyme acétyle Spt7, Ada3 et Sgf73 lorsque celles-ci sont toutes au sein du même complexe ySAGA (Cai et al., 2011).

Une question se pose alors : quel est le rôle de ces acétylations au sein du complexe ? Nous pouvons supposer que cela pourrait renforcer les interactions dans le complexe, ou avec d'autres protéines. Une explication, pour l'acétylation des protéines Spt7, Ada3 et Sgf73 chez la levure, a été donnée. Une lignée de levure mutante pour l'activité catalytique de yGcn5 a été étudiée en parallèle d'une lignée sauvage lors de la phase de croissance des souches. Lors de la croissance cellulaire, le niveau d'acétylation des histones, situées sur les gènes de croissance, est augmenté grâce à ySAGA. Dans ces deux lignées, lors de l'étape d'activation des gènes de stress et de survie, les complexes ySAGA peuvent se lier aux gènes de croissance de façon équivalente. Or, lors de l'entrée en phase d'activation des gènes de croissance, dans la lignée mutante où ySAGA n'est plus acétylé, le complexe se lie moins bien que le sauvage (Cai et al., 2011). L'hypothèse est que l'acétylation du complexe, lorsque celui-ci doit agir sur la chromatine, permettrait un meilleur recrutement sur les gènes ou encore stimulerait l'activité du complexe. Nous pourrions purifier les complexes endogènes hATAC et hSAGA en présence d'inhibiteur d'enzymes déacétylases (HDACs) et vérifier si dans nos tests les résultats sont modifiés par rapport à ceux obtenus avec nos précédents complexes utilisés.

9. A plus long terme, applications contre le cancer

L'acétylation des histones par les histones acétyltransférases a un effet direct sur la régulation des gènes en augmentant l'affinité de certains facteurs de transcription pour l'ADN nucléosomal. Un défaut de l'activité de ces HATs peut conduire à la formation de tumeurs. Il est reconnu que le cancer est dû à l'accumulation de mutations dans le génome. Cependant, il a été montré récemment que les modifications post-traductionnelles des histones jouent aussi un rôle dans la formation des tumeurs (Esteller, 2007). Plusieurs études montrent en effet un

lien direct entre un défaut d'acétylation des histones et l'apparition de tumeurs (Seligson et al., 2005). Comprendre le fonctionnement et la spécificité d'action des complexes HAT chez l'homme est donc de première importance.

Sachant que certaines approches thérapeutiques anti-cancéreuse reposent sur l'utilisation de molécules inhibitrices d'activités enzymatiques spécifiques, comprendre quelles protéines jouent un rôle dans l'intégration et l'activité du module HAT au sein des complexes hATAC ou hSAGA permettrait d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques. Nous avons montré que l'activité de GCN5 est augmentée lorsque l'enzyme est intégrée dans le module HAT (comprenant ADA2a/b, ADA3 et SGF29). L'importance de ces protéines sur l'activité de GCN5 ou PCAF est d'autant plus intéressante qu'il a été montré qu'ADA3 et SGF29 jouent un rôle dans la tumorigenèse (Germaniuk-Kurowska et al., 2007; Kurabe et al., 2007; Zeng et al., 2002). Il est donc quasiment certain que ces protéines ont un rôle important à jouer quant à la formation d'un cancer dû à une dérégulation des complexes hATAC ou hSAGA.

Contrôler la régulation de l'activité d'acétylation des complexes HAT afin d'établir des traitements thérapeutiques en réponse au cancer est une idée en plein essor (pour une revue (Furdas et al., 2012)). L'un des futurs challenges concernant la compréhension de la régulation de hATAC et hSAGA serait ainsi d'établir une corrélation entre ces complexes et une dérégulation de l'expression des gènes, afin qu'à plus long terme, il soit possible d'étudier le rôle de ces complexes dans la tumorigenèse.

Partie 4

hATAC joue un rôle dans la progression de la mitose en acétylant la cycline A

Contribution au papier :

The ATAC acetyltransferase complex controls mitotic progression by targeting non-histone substrates.

Meritxell Orpinell, Marjorie Fournier, Anne Riss, Zita Nagy, Arnaud R Krebs, Mattia Frontini and László Tora.

EMBO J. 2010 July 21; 29(14): 2381–2394.

Partie 4 : hATAC joue un rôle dans la progression de la mitose en acétylant la cycline A

A. Problématique

Au cours du cycle cellulaire, le niveau de compaction de la chromatine est amené à changer. Nous avons vu en Introduction que les modifications post-traductionnelles des histones, dont l'acétylation, jouent en partie un rôle sur ce niveau de compaction. GCN5 est une histone acétyltransférase impliquée dans le déroulement du cycle cellulaire (Paolinelli et al., 2009; Vernarecci et al., 2008). Nous savons également que GCN5 est une sous-unité des complexes ATAC et SAGA, il est donc fort possible que l'un de ces complexes ait un rôle dans la régulation du cycle cellulaire.

En outre, dSAGA acétyle préférentiellement les histones H3 tandis que dATAC acétyle les histones H4 chez la drosophile (Ciurciu et al., 2006; Guelman et al., 2006; Suganuma et al., 2008). Chez l'homme en revanche, les deux complexes hATAC et hSAGA acétylent tous deux les histones H3 (Guelman et al., 2009; Nagy et al., 2010; Wang et al., 2008). Les substrats histones n'étant pas spécifiques d'un des deux complexes, nous pouvons supposer que la spécificité se joue sur un substrat de type non histone.

Au sein du laboratoire, les questions de savoir si hATAC ou hSAGA peuvent jouer un rôle dans la progression du cycle cellulaire et si hATAC est capable d'acétyler spécifiquement un substrat non-histone se sont alors posées.

B. Résumé de la publication

Note : les figures appelées dans le texte sont celle de la publication.

Afin de savoir si hATAC ou hSAGA jouent un rôle dans la division cellulaire, des ARN interférents (ARNsi) ont été utilisés contre les sous-unités spécifiques de ces complexes telles qu'ADA2a et SPT20 respectivement, dans des cellules humaines (KD). Les cellules en division ont été analysées par microscopie (Figure 1 A, B et C). Dans le cas de l'ARNsi

contre ADA2a, le nombre de cellules présentant une division normale diminue, tandis que le nombre de mitoses incomplètes et de cellules multinuclées augmentent. Dans le cas de l'ARNsi contre SPT20 en revanche, aucune perturbation n'est observée. hATAC, et non hSAGA, aurait donc une importance dans la progression du cycle cellulaire. En effet, par immunofluorescence (IF) nous voyons que hATAC et non hSAGA colocalise avec le fuseau mitotique durant la mitose (Figure 1 D). De façon plus précise, des IFs contre hATAC montrent une colocalisation avec l' α -tubuline, soit les microtubules (Figure 2 C). hATAC présente donc un rôle au niveau des microtubules et ce, uniquement au niveau de la mitose (les microtubules étant dans le cytoplasme et hATAC dans le noyau durant l'interphase, Figure 1 D).

hATAC est impliqué dans la mitose et plus précisément au niveau du fuseau mitotique, mais quelle est le rôle de ce complexe ? Après utilisation d'ARNsi, les cellules présentent un retard en phase M/G1, le nombre de centrosomes augmentent et la distance entre les deux noyaux est réduite (Figure 3 A, C et D). En outre, le nombre de modifications de type H3S10p et H4K20me1 qui sont des marques spécifiques de la mitose (Oda et al., 2009; Wei et al., 1998) augmentent (Figure 3 B). Ces observations montrent que hATAC est important pour une division cellulaire correcte.

hATAC est un complexe à activité acétyltransférase. Or, en absence de hATAC, le niveau de H4K16 et de tubuline acétylée augmente (Figure 4 A à C). Notons qu'un KD de hSAGA n'entraîne pas ces effets. A la suite d'un KD, la structure du complexe hATAC est affectée et, par conséquent, l'activité de GCN5 aussi. L'augmentation de H4K16 acétylée ne peut donc pas être due à hATAC. Ceci suggère que hATAC pourrait acétyler une cible de type non histone inconnue jusqu'à présent.

Il est connu que l'histone déacétylase (HDAC) SIRT2 est capable d'enlever les groupements acétyls de H4K16 et de l' α -tubuline (North et al., 2003; Vaquero et al., 2007; Vaquero et al., 2006). Il a lors été question de savoir si hATAC pouvait réguler la fonction de SIRT2. En l'absence de hATAC, SIRT2 ne colocalise plus correctement avec la chromatine (Figure 4 D). De plus, une surexpression de SIRT2 dans les cellules après KD de hATAC permet de rétablir un niveau normal d'acétylation (Figure 4 E). L'augmentation du niveau de H4K16 acétylées dans les cellules KD est donc due à un problème d'activité de SIRT2 et ne concerne pas l'activité d'acétylation de hATAC sur les histones. hATAC aurait un rôle dans la régulation de l'activité de SIRT2.

SIRT2 est capable d'être phosphorylée. Plus précisément, la phosphorylation de la sérine 331 de SIRT2 bloque son activité HDAC (North and Verdin, 2007; Pandithage et al.,

2008). Or, en absence de hATAC dans la cellule, la phosphorylation de SIRT2 est visible par WB. hATAC est donc impliqué dans le voie de phosphorylation de SIRT2 (Figure 4 F). Or, la phosphorylation de SIRT2 est catalysée par le complexe cycline A/cdk2 (Pandithage et al., 2008). Nous pouvons supposer que hATAC agit sur cycline A/cdk2. En effet, les protéines GCN5 et PCAF, de même que le complexe ATAC, acétylent *in vitro* la cycline A et le complexe avec cdk2 (Figure 5 A et Figure 6 B), mais ce n'est pas le cas de hSAGA (Figure 5 D). Ces résultats sont confirmés *in vivo* (Figure 5 E). En conclusion, le complexe hATAC acétyle la cycline A qui agit sur SIRT2.

Pour confirmer que l'acétylation par hATAC de la cycline A joue sur la stabilité de cette dernière, les quantités de cycline A dans les cellules sont visualisées par WB après KD de GCN5 (Figure 6 C). En absence de GCN5, la dégradation de la cycline A prend plus de temps. Alors que dans des cellules surexprimant GCN5, cette dégradation a lieu plus rapidement qu'en condition WT (Figure S9 B). L'acétylation de la cycline A par GCN5 entraîne donc sa dégradation. Afin de savoir comment le protéasome joue un rôle dans cette dégradation, la même expérience a été réalisée mais en bloquant l'activité du protéasome. En conditions WT, la quantité de cycline A augmente après blocage du protéasome. En condition KD pour GCN5, la quantité de cycline A ne varie pas (Figure 6 D). Ce qui montre qu'en l'absence de GCN5, la cycline A n'est pas la cible du protéasome.

La question a également été de savoir comment les sous-unités de hATAC pourrait agir sur la stabilité de la cycline A. Pour cela, la cycline A a été visualisée par IF dans les cellules après KD des sous-unités de hATAC, ADA2a et ADA3 (Figure 7 A) : celle-ci est stable au cours de la phase G2. Par WB, il apparait que la quantité de cycline A augmente au cours de la phase G1 à G2 et la protéine est dégradée de la phase G2 à M (Figure 7 C). Par contre, après KD d'ADA2a et ADA3 la quantité est stable et importante de G1 à G2. De G2 à M, la dégradation est moins rapide. Notons que cette augmentation de G1 à G2 n'est pas due à une transcription plus active du gène codant pour la cycline A, le niveau d'ARN messagers n'étant pas affecté par le KD (Figure 7 D). L'absence des protéines GCN5, ADA2a et ADA3 entraîne donc une stabilisation des niveaux en cycline A : le complexe hATAC entraîne ainsi la dégradation de la cycline A.

C. Contribution apportée au papier

J'ai mis au point et effectué les tests d'acétylation sur les peptides mimant la cycline A avec les enzymes recombinantes GCN5/PCAF et avec le complexe hATAC purifié à partir de cellules HeLa (Figure 6). J'ai également répété les tests d'acétylation sur les protéines purifiées afin de valider les résultats (Figure 5).

En effet, Meritxell Orpinell a pu montrer hATAC est impliqué dans la voie de phosphorylation de SIRT2. Or, hATAC ne possède pas d'activité de phosphorylation, le complexe agit donc de manière indirecte sur la régulation de SIRT2. La phosphorylation de SIRT2 est en fait catalysée par le complexe cycline A/cdk2. Il a alors été supposé que hATAC agirait sur la cycline A, ce qui permettrait la régulation de SIRT2.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons testé si GCN5 pouvaient acétyler la cycline A. Des tests d'acétylation *in vitro* sur la cycline A recombinante ont été effectués en présence de GCN5 surexprimée : l'enzyme et la cycline A ont été incubées en présence d'acétylCoA radioactif. Après migration sur un gel SDS-Page, le signal radioactif a été détecté par un écran PhosphorImager et révélé par un scanner Typhoon. Le radiogramme obtenu indique que l'enzyme est capable d'acétyler ce substrat (Figure 5 A). Nous avons alors regardé si les protéines PCAF et ATAC2 pouvaient aussi acétyler la cycline A, tandis que le mutant catalytique de GCN5 a été utilisé comme contrôle négatif. En effet, PCAF est une protéine homologue de GCN5 et peut aussi faire partie du complexe hATAC (voir Partie 2). Quant à ATAC2, bien que présentant un domaine GNAT, nous n'avons pas pu montrer d'activité d'acétylation sur les histones (voir Partie 2). Nous avons alors voulu savoir si son activité pouvait se révéler sur ce substrat non histone. Il en ressort que PCAF, comme GCN5, peut acétyler la cycline A, mais aucune activité n'est détectée pour ATAC2 (Figure 5 B).

GCN5 fait partie des complexes hATAC et hSAGA. Afin de vérifier que son activité d'acétylation de la cycline A est bien spécifique du complexe hATAC, des tests d'acétylation *in vitro* ont été réalisés en présence des deux complexes. Ces derniers ont été purifiés à partir de cellules HeLa et leur quantité normalisée selon la présence de GCN5 sur un gel coloré au nitrate d'argent (Figure 5 C). Ils ont ensuite été testés sur la protéine cycline A recombinante en présence d'acétylCoA radioactif. Il s'avère que hATAC est le complexe acétylant la cycline A, le signal obtenu avec hSAGA étant comparable au contrôle négatif (substrat incubé sans les enzymes) (Figure 5 D).

Par la suite, nous avons voulu déterminer quelles positions de la cycline A sont les cibles de hATAC. Par spectrométrie de masse, il a été possible de déterminer que les positions K54 et K68 de la cycline A seraient les cibles de GCN5. J'ai effectué les tests d'acétylations *in vitro* sur des peptides mimant les régions de la cycline A contenant ces résidus, et ce en présence des enzymes recombinantes GCN5, PCAF ou du complexe endogène hATAC (Figure 6 A et B). Il en ressort que ces derniers acétylent préférentiellement le peptide contenant les lysines 68 et 76. Le complexe hATAC, via GCN5 ou PCAF, est donc capable d'acétyler la cycline A sur cette région de la protéine.

D. Publication 3

Publication 3

The ATAC acetyl transferase complex controls mitotic progression by targeting non-histone substrates

Meritxell Orpinell, Marjorie Fournier, Anne Riss, Zita Nagy, Arnaud R Krebs, Mattia Frontini¹ and Lászlò Tora*

Department of Functional Genomics, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7104, INSERM U964, Université de Strasbourg, Illkirch Cedex, France

All DNA-related processes rely on the degree of chromatin compaction. The highest level of chromatin condensation accompanies transition to mitosis, central for cell cycle progression. Covalent modifications of histones, mainly deacetylation, have been implicated in this transition, which also involves transcriptional repression. Here, we show that the Gcn5-containing histone acetyl transferase complex, Ada Two A containing (ATAC), controls mitotic progression through the regulation of the activity of non-histone targets. RNAi for the ATAC subunits Ada2a/Ada3 results in delayed M/G1 transition and pronounced cell division defects such as centrosome multiplication, defective spindle and midbody formation, generation of binucleated cells and hyperacetylation of histone H4K16 and α -tubulin. We show that ATAC localizes to the mitotic spindle and controls cell cycle progression through direct acetylation of Cyclin A/Cdk2. Our data describes a new pathway in which the ATAC complex controls Cyclin A/Cdk2 mitotic function: ATAC/Gcn5-mediated acetylation targets Cyclin A for degradation, which in turn regulates the SIRT2 deacetylase activity. Thus, we have uncovered an essential function for ATAC in regulating Cyclin A activity and consequent mitotic progression.

The EMBO Journal (2010) 29, 2381–2394. doi:10.1038/emboj.2010.125; Published online 18 June 2010

Subject Categories: chromatin & transcription; cell cycle

Keywords: Ada; chromatin; histone; spindle; α -tubulin

Introduction

Eukaryotic cells must regulate accurately the packaging and unfolding of their chromatin throughout the cell cycle to ensure precise transcription and timely replication of their genetic material. The structural features of chromatin are controlled partially by post-translational modifications occur-

ring on histones, among which acetylation has a major function (Kouzarides, 2007). Histone acetylation levels are defined by the co-ordinated but opposite action of histone acetyl transferase (HAT) and deacetylase (HDAC) enzymes, which regulate essential cellular processes, such as DNA replication, transcription and/or cell division. During mitotic chromosome condensation, HDAC activity is favoured on the histones resulting in a predominantly deacetylated state (Valls *et al*, 2005). HDAC enzymes also regulate mitotic progression by targeting non-histone substrates that drive chromosome separation (Dryden *et al*, 2003; Ishii *et al*, 2008). The high level of histone deacetylation during mitosis suggested that the activity of HAT complexes is downregulated during this process, and thus their potential contribution to cell division remained largely unexplored.

Gcn5, the founding member of a GNAT protein family, is a subunit of several transcriptional coactivator complexes (Brownell and Allis, 1996; Lee and Workman, 2007). In addition to the function of Gcn5 in transcription regulation, its potential involvement in cell cycle regulation has been recently described (Vernarecci *et al*, 2008; Paolinelli *et al*, 2009). In metazoans, at least two Gcn5 containing HAT complexes exist: Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase (SAGA) and Ada Two A containing (ATAC) (Lee and Workman, 2007; Nagy and Tora, 2007; Suganuma *et al*, 2008; Wang *et al*, 2008; Guelman *et al*, 2009; Nagy *et al*, 2010). These two complexes share a number of components, but differ in molecular size, subunit composition and substrate specificity (Martinez, 2002; Ciurciu *et al*, 2008; Suganuma *et al*, 2008; Nagy *et al*, 2010). Gcn5 and two adaptor proteins, Ada2b/Ada3 in SAGA or Ada2a/Ada3 in ATAC, form the catalytic core of the complexes, respectively (Suganuma *et al*, 2008; Wang *et al*, 2008; Gamper *et al*, 2009; Nagy *et al*, 2010). In addition, the mammalian ATAC complex harbours several *bona fide* subunits with distinct properties, such as a second putative HAT enzyme (Atac2), other subunits involved in transcription regulation (NC2 β), nucleosome remodelling (Wdr5, Sgf29), cell growth (Yeats2) and potential DNA binding (Zzz3) (Wang *et al*, 2008; Guelman *et al*, 2009; Nagy *et al*, 2010). Recently, it has been shown that the presence of Gcn5-HAT, or its vertebrate paralogue, Pcaf, is mutually exclusive in mammalian ATAC complexes (Nagy *et al*, 2010).

Drosophila ATAC possesses different substrate specificity than dSAGA, as it mainly acetylates histone H4 (Ciurciu *et al*, 2006; Guelman *et al*, 2006; Suganuma *et al*, 2008). The H4-specific activity was suggested to result from the presence of the second HAT, Atac2, in the complex (Suganuma *et al*, 2008). However, when testing the HAT activity of different human ATAC preparations on free histones and nucleosomes, it acetylated histone H3 and H4, with histone H3 being the preferential target (Wang *et al*, 2008; Guelman *et al*, 2009; Nagy *et al*, 2010). As in human, both SAGA and ATAC complexes have same specificity towards histone H3 and

*Corresponding author. Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7104, INSERM U964, Université de Strasbourg, 1 Rue Laurent Fries, BP 10142, Illkirch Cedex 67404, France.

Tel.: +33 388 65 34 44, Fax: +33 388 65 32 01;

E-mail: laszlo@igbmc.u-strasbg.fr

¹Present address: Clinical Science Center, Hammersmith Hospital Campus, Du Cane Road, London W12 0NN, UK

Received: 3 November 2009; accepted: 14 May 2010; published online: 18 June 2010

H4, acetylation of different non-histones targets could give functional specificity for each complex. However, at present the function of the metazoan ATAC complex is not clear, and the physiological targets of this complex await further analysis.

Here, we identify a function for the mammalian ATAC complex in orchestrating mitotic progression. We provide evidence that the specific depletion of the Ada core of ATAC leads to severe mitotic abnormalities including centrosome multiplication, defective midbody formation and completion of cytokinesis, appearance of binucleated cells, H4K16 and α -tubulin hyperacetylation, and impaired mitotic localization and activity of the SIRT2 deacetylase. We report that the presence of the ATAC complex is essential during mitosis to inhibit Cyclin A/Cdk2 activity by favouring Cyclin A degradation through acetylation. As the Cyclin A/Cdk2 kinase is essential for correct centrosome formation and inhibits SIRT2 function, our data positions the ATAC complex as an important regulator of mitosis, and thus uncovers an essential function for the ATAC acetyl transferase (AT) complex in cell division.

Results

Identification of the ATAC complex at the mitotic spindle

As Gcn5 has been implicated in cell cycle regulation (see Introduction), we aimed to investigate which of the two mammalian Gcn5-containing complexes, SAGA or ATAC, was involved in this function *in vivo*. Thus, we tested whether ablation of Spt20 (SAGA specific) and Ada2a (ATAC specific) by RNAi would affect normal cell division rates (Figure 1A–C). The indicated subunits were knocked down by either transfecting a mixture of four specific siRNAs against the respective mRNAs (Spt20 or Ada2a) into mouse NIH3T3 cells, or by transfecting different small hairpin (sh) DNA constructs targeting Spt20 or Ada2a into human HeLa or 293T cells. First, the efficiency of the depletion was verified and the specific effects were compared with a mixture of non-targeting siRNAs (Mock) (Supplementary Figure 1). As Spt20 or Ada2a knockdown (KD) was efficient and specific in the different cellular systems used, we tested whether the ablation of either SAGA or ATAC function would influence cell division. To this end, we scored the number of cells undergoing mitosis using time-lapse microscopy. The initial number of cells on the image field was considered the ‘Total’ cell number, and the cell cycle of each cell was followed for 30 h. For each cell, we determined whether it was (1) dividing properly or (2) displaying cell division defects (such as asymmetrical, delayed or failed division) and (3) multinucleation. Depletion of Ada2a led to reduced number of cells undergoing proper division (<50%), as these cells show several defects to complete mitosis. On the contrary, depletion of Spt20 had no significant effect (Figure 1A; Supplementary Figure 2). Consistent with this, depletion of Ada2a, but not that of Spt20, lead to increased mitotic abnormalities (delayed, asymmetric or incomplete cell divisions) and concomitantly, increased population of bi- or multinucleated cells (Figure 1B and C; Supplementary Figure 2). These data suggest that the ATAC complex is required for proper cell cycle progression in mammalian cells.

To define the cellular events in which ATAC is involved during cell cycle and to compare it with SAGA, we investigated the localization of these two complexes along different stages of the cell cycle in mouse fibroblasts using immunofluorescence labelling. Interestingly, ATAC specific subunits (Ada2a and Yeats2) and subunits of ATAC that are also present in SAGA, localized to the mitotic spindle (Gcn5 and Ada3) (Figure 1D, panels g–j; Supplementary Figure 3B). In contrast, SAGA-specific subunits, such as Spt20 or Usp22, were excluded from the chromatin and the mitotic spindle during mitosis (Figure 1D, panels k and l; Supplementary Figure 3A). These observations suggest that the whole ATAC complex localizes to the mitotic spindle. Note that in interphasic cells all the antibodies used gave a nuclear staining for the tested factors (Figure 1D, panels a–f).

To confirm that the observed specific localization corresponds to the ATAC complex, we compared the composition of ATAC in asynchronized and G2/M synchronized cells. Cells were either non-treated or synchronized with nocodazole and cell extracts prepared. From both cell extracts, ATAC complexes were immunopurified using three different antibodies against ATAC-specific subunits and the ATAC composition was then verified by western blot (WB) analysis (Figure 1E). The fact that no differences were detected between the compositions of the immunoprecipitated complexes prepared from non-synchronized (A) or mitotic cells (M) suggested that the ATAC complex does not dissociate during mitosis. This is in good agreement with the immunofluorescence experiments (Figure 1D; Supplementary Figure 3B). Consistent with these observations, ATAC subunits, such as Ada2a and Ada3 (hereafter Ada2a/3), co-localized during all mitotic stages (Figure 2A, panel g; Figure 2C, panels g–i). In addition, the KD of either Ada2a or Ada3 impaired the localization of Ada3 and Ada2a, respectively (Figure 2A, panels b–f). Finally, KD of Ada2a or Ada3 resulted in the dissociation of the Gcn5-HAT subunit from the complex (Figure 2B, lanes 4 and 8, for KD efficiency see Supplementary Figure 1A–C). Altogether, our data indicate that the ATAC complex requires its integrity to localize to the mitotic spindle.

To get a more precise description of the localization of ATAC subunits to the mitotic spindle, we compared the localization of Ada2a/3 to that of the microtubule network (exemplified by α -tubulin) and members of the chromosome passenger complex (CPC) (exemplified by Aurora B). These two markers were selected because of their important functions during cell division: the microtubule network, because it provides the pulling force for chromosome segregation (Dumont and Mitchison, 2009), and the CPC, because it is controlling several mitotic features ranging from chromosome-microtubule attachment to cytokinesis (Ruchaud *et al*, 2007). Interestingly, from early mitotic stages to anaphase, the ATAC subunits Ada2a and Ada3 strongly co-localized with the microtubule network, as exemplified by the α -tubulin staining (Figure 2C, panels p–r), but not with CPC components, such as Aurora B (Figure 2C, panels y, z, aa). These data suggest that during mitosis the ATAC complex is mainly associated with the microtubule network. The co-localization of Ada2a/3 with α -tubulin is restricted to mitosis, as during interphase, all ATAC subunits analysed were predominantly nuclear (Figure 1D, panels a–d), whereas the microtubule network is cytoplasmic.

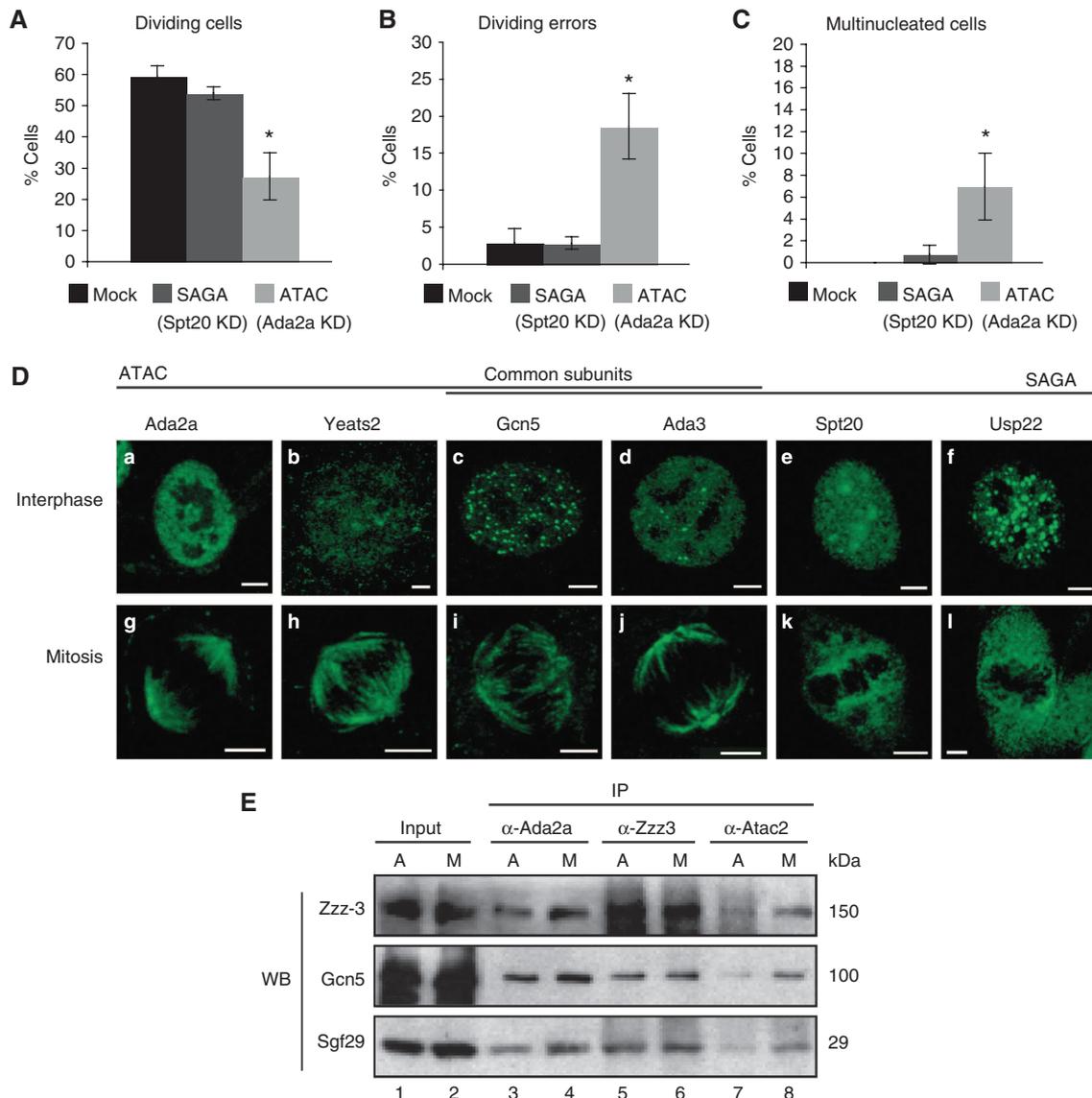


Figure 1 Identification of ATAC as a potential mitotic regulator. (A–C) Cell division analysis of NIH-3T3 cells transfected with control siRNA (Mock) or siRNA to achieve either SAGA (Spt20)- or ATAC (Ada2a)-specific subunit knockdowns (KDs). siRNA-transfected cells in prophase were randomly chosen and video imaged for 30 h. See Supplementary Figure 2 for representative images from the time-lapse analysis. The initial number of cells on the image field was considered the ‘Total’ cell number, and the life cycle of each cell was followed. For each cell, we determined whether it was (A) undergoing normal cell division, (B) displaying division errors (delayed, asymmetric or uncompleted cell divisions), or (C) multinucleation. The number of cells in (A), (B) or (C) is expressed as percentage of total cells analysed (>100 cells/condition, mean and s.d. from four independent experiments, * $P < 0.05$). (D) Interphasic and mitotic localization of endogenous ATAC or SAGA subunits in mouse NIH-3T3 cells. Cells were stained with anti-ATAC (Ada2a, Yeats2)-, anti-ATAC/SAGA (Gcn5, Ada3)- or anti-SAGA (Usp22, Spt20)-specific antibodies, as indicated. Scale bars: 4 μm. (E) Composition of the ATAC complex in asynchronous (A) or mitotic (M) cell cultures. Cell extracts were prepared and immunoprecipitation (IP) of the endogenous ATAC complex was carried out using antibodies against the indicated subunits from the two cell populations. A total of 10% of the input extracts (Input) and the immune pellets were analysed by western blot (WB) using antibodies as indicated.

Depletion of the Ada core of ATAC leads to mitotic abnormalities

The specific positioning of ATAC subunits to the mitotic spindle prompted us to further investigate the function of ATAC at different mitotic stages. We explored how cells progressed through the cell cycle after G2/M arrest on Ada2a or Ada3 RNAi. Consistent with the above results, cells depleted for Ada2a or Ada3 showed a delayed M/G1 transition after nocodazole synchronization (Figure 3A). In agreement with this prolonged mitotic phase after Ada2a or Ada3 depletion, we also observed an increase in the

mitotic index of these cells, which was measured on the basis of cells positive for mitotic-specific histone marks such as H3S10P and H4K20me1 (Figure 3B) (Wei *et al*, 1998; Oda *et al*, 2009). Moreover, visualization of centrosomes by γ -tubulin and chromatin by Hoechst staining in the Ada2a/3-depleted cells showed a drastic induction of centrosome multiplication, with a four-fold increase in cells containing more than two centrosomes (Figure 3C). Furthermore, imaging of α -tubulin or chromatin in these cells revealed that the ablation of Ada2a and Ada3 lead to the appearance of aberrant midbodies, which are thicker than those in the

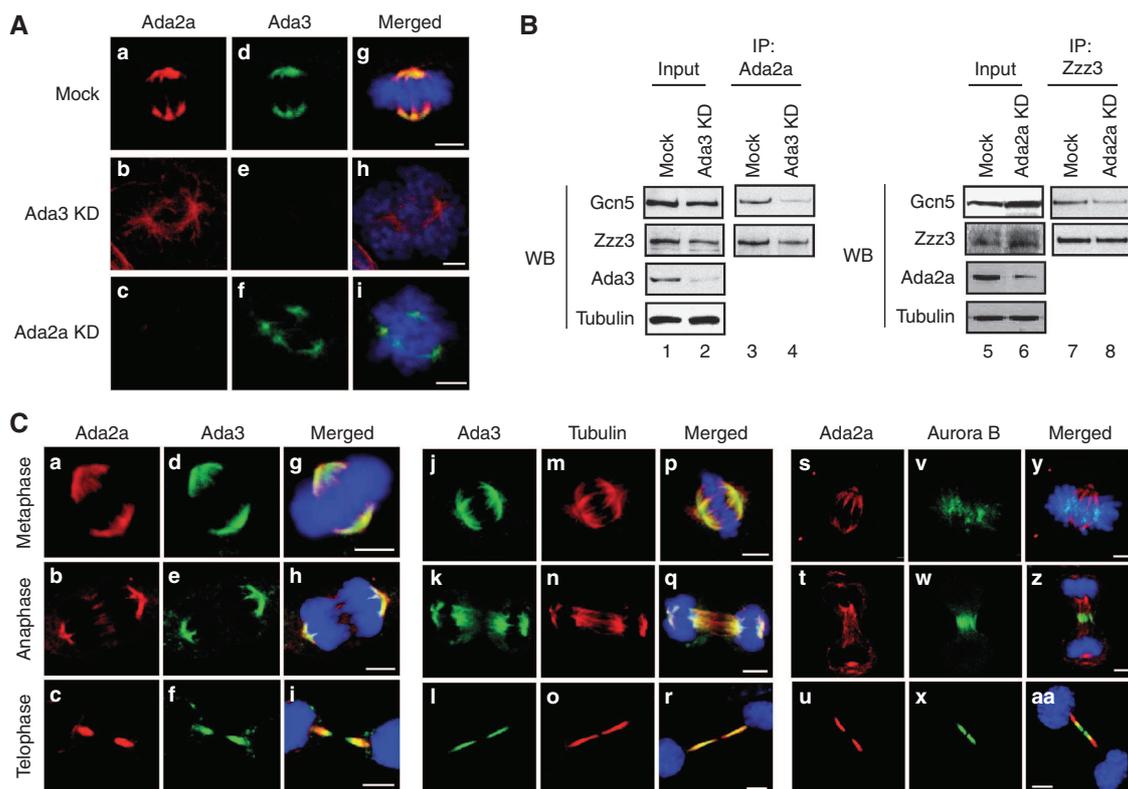


Figure 2 The ATAC complex stays associated during mitosis and colocalizes with the microtubule network. **(A)** Knock down (KD) of endogenous Ada2a (panels c, f, i) and Ada3 (panels b, e, h) protein expression after RNAi was verified by immunofluorescence and compared with cells transfected with a non-targeting control siRNA (Mock, panels a, d, g). The antibody used to label the cells is indicated at the top of the panels. Images are representative of $n > 3$ independent experiments. Scale bars: 4 μ m. **(B)** Composition of the ATAC complex on Ada3 and Ada2a knockdown. Cells were synchronized in G2/M phase with nocodazole and immunoprecipitation (IP) of the endogenous ATAC complex was carried out using an anti-Ada2a or anti-Zzz3 antibody, as marked. A total of 10% of the input extracts (Input) and the immune pellets were analysed by western blot (WB) using the antibodies indicated on the left of the panels. **(C)** The co-localization of Ada2a with Ada3 (panels a–i), Ada3 with α -tubulin (panels j–r) and Ada2a with AuroraB (panels s–aa) was tested by immunofluorescence in metaphase, anaphase and telophase cells (marked on the left). The merged images show the specific localization of the tested factors together with DNA (blue). Images are representative of at least three independent experiments. Scale bars: 4 μ m.

control cells and twisted in shape, as well as to shortened distances between the dividing nuclei (Figure 3D). All these data show that cells lacking Ada2a or Ada3 are unable to proceed properly along cytokinesis and suggest that the mammalian ATAC complex is required for correct cell division, by affecting both initial and late stages of mitosis.

Depletion of the Ada core of ATAC leads to H4K16 and tubulin hyperacetylation

In metazoan organisms, the function of the ATAC complex has been associated with acetylation of histones (see Introduction), particularly H4K16. As the H4K16Ac mark is known to prevent chromatin compaction (Shogren-Knaak *et al*, 2006), the need of a functional ATAC complex during mitosis seems paradoxical with the notion that histone hypoacetylation is a prerequisite for mitotic chromosome formation (Kruhlak *et al*, 2001; Cimini *et al*, 2003; Valls *et al*, 2005) (Supplementary Figure 4). We thus examined whether global levels of acetylation on specific histone residues were affected in mitotic cells upon RNAi for Ada2a/3. Unexpectedly, knocking down the Ada2a or Ada3 components of the ATAC complex resulted in a specific increase of H4K16 acetylation (Figure 4A, panels d–l; Figure 4C), whereas H3K9, H3K14, H4K5 and H4K12 acetyla-

tion levels remained unchanged (Supplementary Figure 5). The hyperacetylation of H4K16 suggests a defective chromosome condensation following Ada2a/3 KD. As we identified ATAC subunits at the mitotic spindle together with α -tubulin, we also explored the state of α -tubulin acetylation under the same RNAi conditions. A similar hyperacetylation was observed on α -tubulin, whose mitotic function is also critically regulated by its acetylation (Zilberman *et al*, 2009 and refs therein). Thus, RNAi of either Ada2a or Ada3 induced hyperacetylation of both H4K16 and α -tubulin, which would consequently affect chromatin architecture and the tubulin network (Figure 4A and B, panels d–l; Figure 4C). Note, however, that the KD of the SAGA-specific subunit Spt20 did not result in hyperacetylation of α -tubulin (Supplementary Figure 6).

Earlier observations suggested that the Gcn5-HAT activity in the ATAC complex may be positively regulated by the Ada2a and Ada3 subunits that are directly interacting with Gcn5 (Balasubramanian *et al*, 2002; Gamper *et al*, 2009). Consistent with this, we observed that Gcn5 dissociates from the ATAC complex after Ada2a/3 KD (Figure 2B). Therefore, the increased acetylation of H4K16 and α -tubulin on Ada2a or Ada3 depletion may not be the result of an increased AT activity of ATAC. Rather, ATAC might affect other substrates

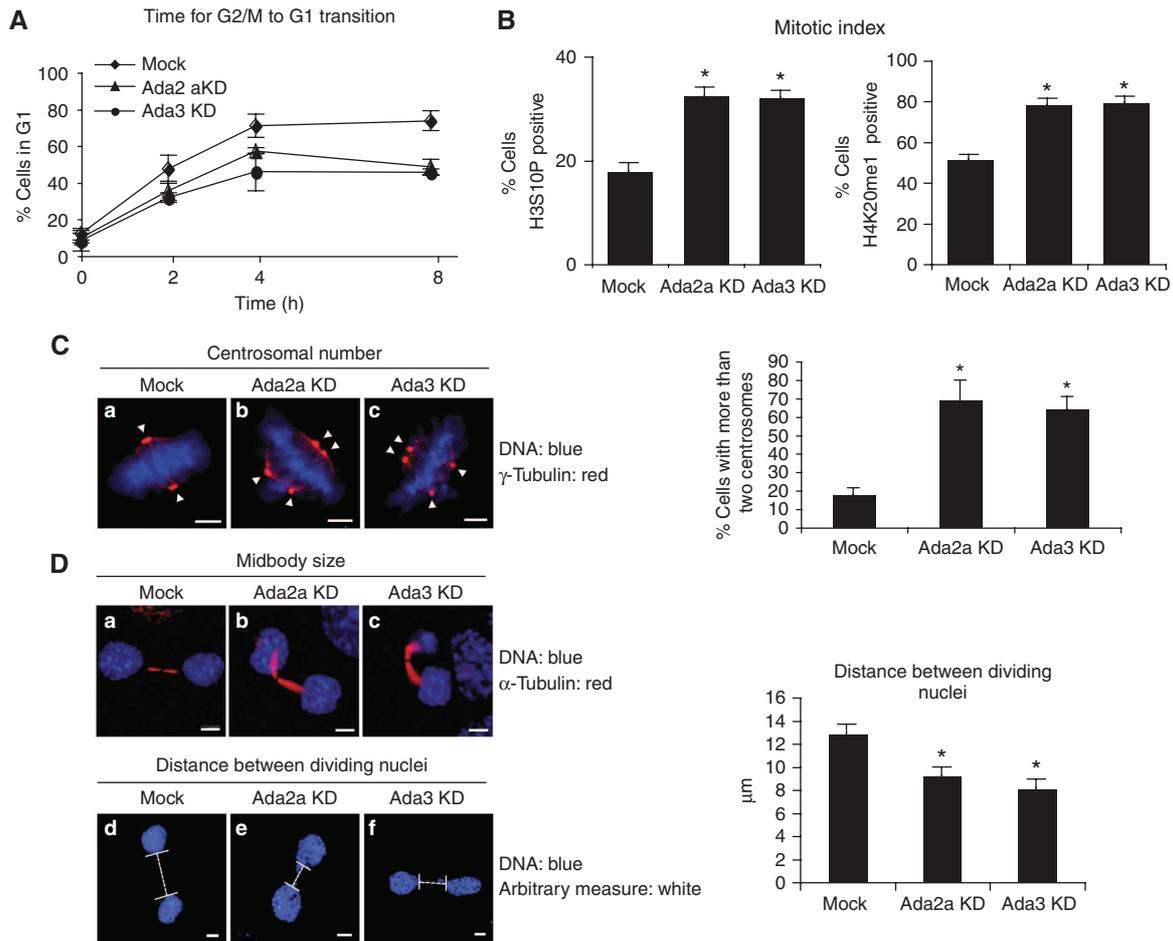


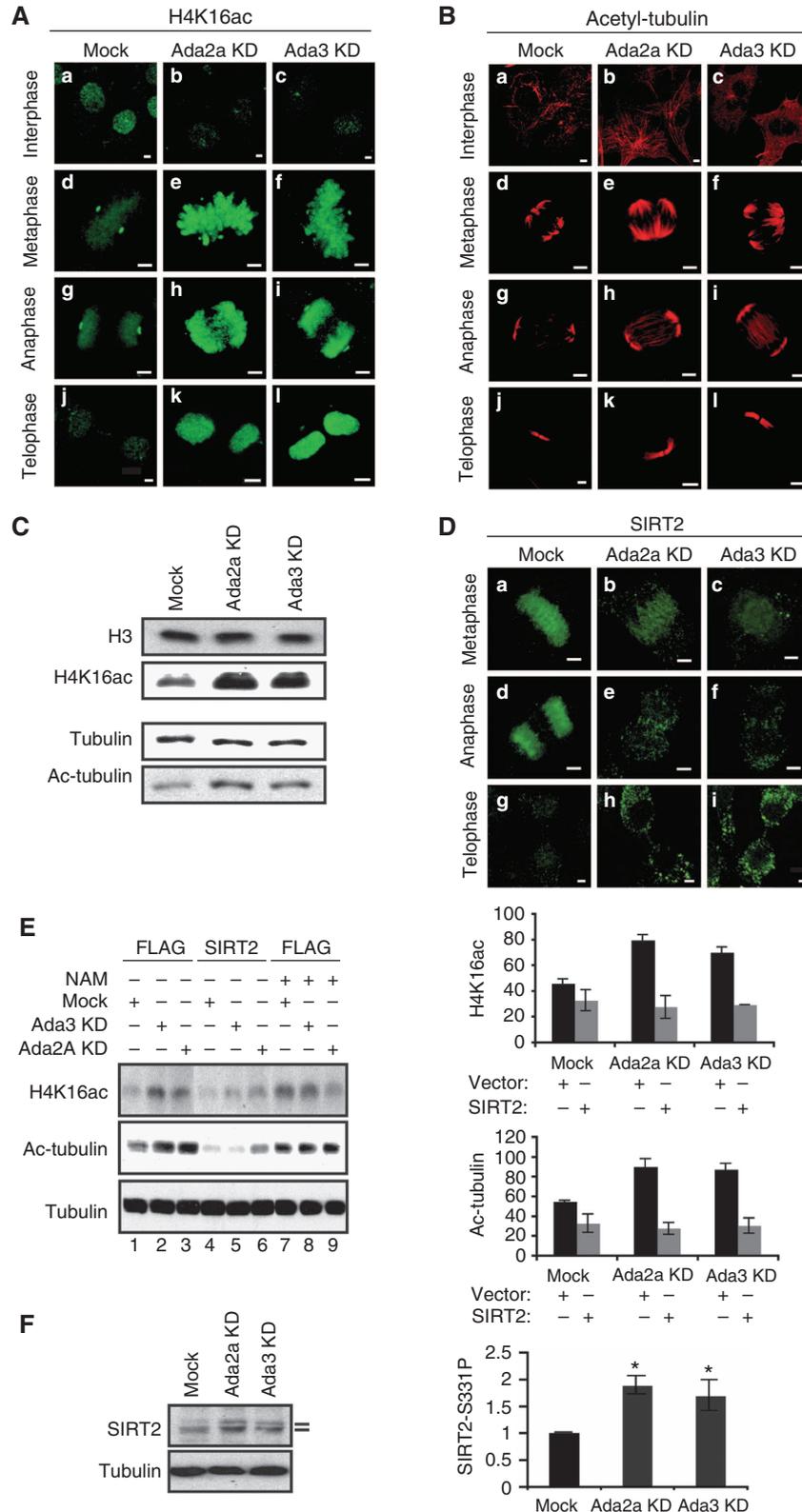
Figure 3 ATAC-depleted cells display delayed mitosis and defects in cytokinesis. NIH-3T3 cells were transfected with non-targeting control siRNA (Mock) or siRNAs against Ada2a or Ada3. After 72–96 h of transfection, cells were further analysed. (A) The different siRNA-treated cells were treated overnight with nocodazole to arrest them in G2/M and then released. After release, cells were harvested at different time points (as indicated) and the G1 population was monitored by FACS analysis. The results are expressed as percentage of total cells analysed (mean and s.d. from four independent experiments). (B) To analyse the mitotic index of siRNA-transfected cell populations, cells were stained with an anti-H3S10P and an anti-H4K20me1 antibody, and the DNA was visualized by Hoechst staining. The number of cells positive for the two marks were determined by immunofluorescence for each condition (>400 cells/condition, mean and s.d. from $n > 4$ independent experiments, $*P < 0.05$). (C) To visualize centrosomes in siRNA-transfected mitotic cells, the cells were stained with an anti- γ -tubulin antibody and the DNA was visualized by Hoechst staining. Centrosome numbers were determined for each condition (>200 cells/condition, mean and s.d. from $n > 4$ independent experiments, $*P < 0.05$). (D) To visualize the microtubule network in siRNA-transfected mitotic cells, cells were co-stained with an anti- α -tubulin antibody and Hoechst (DNA). A line (dashed-white line), placed on the basis of the position of the midbodies (α -tubulin staining), was used for measuring the distance between the daughter cells (>100 cells/condition, mean and s.d. from $n > 3$ independent experiments, $*P < 0.05$).

that consequently lead to changes in the acetylation status of H4K16 and α -tubulin. Interestingly, the mammalian HDAC SIRT2 mediates both mitotic H4K16 and α -tubulin deacetylation (North *et al*, 2003; Vaquero *et al*, 2006, 2007), suggesting that it may be a potential target of the ATAC complex. SIRT2 belongs to the class III HDAC enzymes (sirtuins), which require nicotinamide (NAM) adenine dinucleotide [NAD(+)] for catalysis. SIRT2 resides in the cytoplasm during interphase, but at the onset of mitosis relocates to the nucleus, in which it deacetylates its substrates thereby ensuring mitotic progression (Vaquero *et al*, 2006, 2007). Thus, next we analysed the SIRT2 localization in cells in which ATAC subunits have been knocked down. In Ada2a/3-depleted cells, SIRT2 did not localize properly to the chromatin during mitosis (Figure 4D) that can explain the observed increase in the levels of acetylation of H4K16 and α -tubulin. To confirm our hypothesis, we tested whether overexpression of SIRT2 could rescue the deacetylation of

H4K16 and α -tubulin in Ada2a/3-depleted cells. Indeed, overexpression of wild-type SIRT2 rescued both H4K16 and α -tubulin deacetylation in Ada2a/3-depleted cells (Figure 4E, compare lanes 1–3 with 4–6). In contrast, overexpressing the catalytically inactive SIRT2-H150Y mutant did not restore the H4K16 and α -tubulin deacetylation (Supplementary Figure 7) (Pandithage *et al*, 2008), further suggesting that the HDAC activity of SIRT2 is needed for this function. Consistent with this, inhibition of endogenous SIRT2 activity in cells with NAM (Bitterman *et al*, 2002) mimicked the effects of Ada2a/3 RNAi on H4K16 and α -tubulin acetylations (Figure 4E, compare lane 1 with lanes 2, 3 and 7, and see quantification on the right of the panel). Finally, *in vitro* SIRT2 tubulin deacetylase (TDAC) assays using overexpressed SIRT2 protein in Ada2a or Ada3 KD cell backgrounds further showed that the deacetylase activity of SIRT2 is impaired when the ATAC complex is lacking the Ada core (Supplementary Figure 8A). These observations together indicate that the

increased H4K16 and α -tubulin acetylation caused by KDs of Ada2a/3 is due to reduced/mislocalized SIRT2 activity and not because of increased activity of ATAC. To prove our hypothesis that SIRT2 is the major deacetylase involved in the observed phenotype, we aimed to exclude the potential contribution from the principal α -TDAC in the cells, HDAC6

(Hubbert *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2003). To this end, we first tested the *in vitro* HDAC6 enzymatic activity in TDAC assays by using overexpressed HDAC6 protein in Ada2a or Ada3 KD cell backgrounds. This experiment showed that HDAC6 is fully active in the absence of the Ada core of the ATAC complex (Supplementary Figure 8B). Next, we



inhibited the endogenous activity of HDAC6 with TSA (Minoru *et al*, 1995; Furumai *et al*, 2001) and compared the levels of α -tubulin acetylation to those observed on either NAM treatment or Ada2a/3 depletion. TSA treatments led to a more than 10-fold increase on α -tubulin acetylation levels, clearly larger than the 2.5-fold increase observed on either NAM treatment or Ada2a/3 depletion (Supplementary Figure 8C; Figure 4E, compare lanes 1–7). This result is consistent with the notion that HDAC6 is indeed the main α -TDAC acting in the cells. Furthermore, as earlier tested for SIRT2, we examined whether overexpression of HDAC6 could rescue the deacetylation of α -tubulin in Ada2a/3-depleted cells. Contrary to the SIRT2 overexpression experiment (Figure 4E), exogenous HDAC6 expression did not restore α -tubulin acetylation levels in Ada2a/3 backgrounds (compare Supplementary Figure 8D, lanes 2–6 with Figure 4E, lanes 2–6).

Overall, these results show that the hyperacetylation of H4K16 and α -tubulin observed on depletion of Ada2a or Ada3 is due to inefficient SIRT2 deacetylase activity. Furthermore, our data indicate that the ATAC complex modulates SIRT2 activity during mitosis, placing these two opposite enzymatic activities as parts of the same regulatory pathway.

ATAC regulates the phosphorylation state of SIRT2

SIRT2 activity can be regulated through post-translational modifications on several residues, among which S331 phosphorylation has been shown to partially block its HDAC activity (North and Verdin, 2007; Pandithage *et al*, 2008). Interestingly, after Ada2a/3 KD, a slower SIRT2 migrating form appeared on WB, suggesting that ATAC could regulate SIRT2 phosphorylation (Figure 4F, upper panel). The use of SIRT2-S331P-specific antibodies (Pandithage *et al*, 2008) confirmed that SIRT2 was phosphorylated on S331 in cells in which either Ada2a or Ada3 was depleted (Figure 4F, right panel). Expression of an SIRT2 mutant in which the S331 residue is mutated to alanine (S331A) was enough to prevent the hyperacetylation effects of Ada2a/3 KD on α -tubulin (Supplementary Figure 7). In contrast, overexpression of a SIRT2-S331E phospho-mimicking mutant phenocopied the effect of the Ada2a/3 KD, suggesting that Ada2a and Ada3 would indirectly regulate SIRT2 activity through changes in its phosphorylation status (Supplementary Figure 7).

ATAC acetylates Cyclin A

The inhibitory phosphorylation of SIRT2 on S331 is catalysed by the Cyclin A/Cdk2 complex (Pandithage *et al*, 2008). As ATAC had no detectable kinase activity on SIRT2 (data not

shown), we next explored whether ATAC might indirectly affect SIRT2 phosphorylation, and thus its activity, by regulating Cyclin A/Cdk2 function through its acetylation. On the basis of the specific localization of Gcn5 to the spindle during mitosis (Figure 1D, panel i), we first checked whether this enzyme could acetylate Cyclin A/Cdk2. Using *in vitro* acetylation assays, we could detect that recombinant Gcn5 acetylates recombinant Cyclin A alone or in the context of the Cyclin A/Cdk2 complex (Figure 5A, lanes 11 and 12). However, as the ATAC complex contains other acetyltransferase activities such as Atac2 or Pcaf (see Introduction), we also tested these enzymes as potential Cyclin A acetyltransferases, along with Gcn5 and a catalytically inactive form of Gcn5 (rGCN5- Δ HAT) (Bu *et al*, 2007). As earlier described, the GCN5- Δ HAT mutant does not acetylate histone H3 and H4 peptides *in vitro* (Supplementary Figure 9A). We observed that Cyclin A is acetylated by Gcn5 and Pcaf, in agreement with a recent report (Mateo *et al*, 2009) (Figure 5B, lanes 8 and 9). On the contrary, neither the catalytically inactive Gcn5 (rGCN5- Δ HAT) nor Atac2 acetylated Cyclin A *in vitro* (Figure 5B, lanes 7 and 10), which further indicates that only the paralogue HATs, Gcn5 and Pcaf can acetylate Cyclin A. Next, we tested whether these enzymes could also mediate Cyclin A acetylation when incorporated in their respective endogenous complexes (ATAC or SAGA). To this end, we obtained highly pure ATAC or SAGA complexes from HeLa cells (Figure 5C) and used them to carry out *in vitro* acetylation assays as before. This experiment shows that only the ATAC complex mediates Cyclin A acetylation (Figure 5D, compare lane 10 with 11 and 12). Therefore, this result indicates that Cyclin A is a target for the acetyltransferase activity of ATAC and that the activity of the Cyclin A/Cdk2 kinase complex may be controlled by acetylation in the cells. To test whether Gcn5 can acetylate Cyclin A in a cellular context, cells were transfected with expression vectors for either Flag-Cyclin A together with Flag-Gcn5 wild type (Gcn5wt), or with a Flag-Gcn5 HAT-defective mutant (GCN5- Δ HAT). After transfection, an anti-Flag immunoprecipitation (IP) was carried out and the acetylation status of Cyclin A was analysed by using an antibody against Ac-Lys. We detected acetylated Cyclin A only in the wt Gcn5-expressing cells indicating that Cyclin A is a target of the Gcn5-HAT activity (Figure 5E).

Identification of Cyclin A residues targets for Gcn5 acetylation

In a recent study, lysines K54, K68, K95 and K112 of Cyclin A were identified as potential *in vitro* target sites for Pcaf

Figure 4 ATAC regulates the mitotic function of the SIRT2 HDAC. (A–C) Ada2a/3 depletion causes H4K16 and α -tubulin hyperacetylation. NIH-3T3 cells transfected with control (mock), Ada2a or Ada3 siRNA were visualized by immunofluorescence along mitosis using either (A) anti-H4K16ac or (B) anti-Acetyl- α -tubulin antibodies. (C) Western blot (WB) analysis of mitotic whole cell extracts from Ada2a/3 siRNA-transfected cells (indicated on the top) using the antibodies as indicated on the left. (D) Ada2a/3 KD disturbs the mitotic positioning of SIRT2. NIH-3T3 cells were transfected with the indicated siRNAs and mitotic cells were visualized using the anti-SIRT2 antibody in immunofluorescence. (E) SIRT2 overexpression restores H4K16 and α -tubulin deacetylation, whereas the inhibition of SIRT2 mimics the KD of either Ada2a or Ada3. The 293T cells were co-transfected with an empty vector (FLAG) or an expression vector for SIRT2-FLAG (SIRT2), and DNA constructs expressing shRNAs against Ada2a (Ada2a KD), Ada3 (Ada3 KD) or a scramble shRNA (Mock) as indicated on the top of the panel. Transfected cells were either untreated or treated O/N with 5 mM nicotinamide (NAM). After the indicated transfections and treatments, WCE was prepared from the cells and analysed by western blot (WB) with the indicated antibodies (left panel). Panels on the right: the results of the quantification of $n > 10$ independent experiments by densitometry ($*P < 0.05$). (F) Ada2a or Ada3 knockdown increases the phosphorylation of SIRT2 on S331. NIH-3T3 cells were treated with control (mock), Ada2a or Ada3 siRNAs for 48 h. Cell extracts were prepared after transfection and analysed by WB using an anti-SIRT2 antibody (left panel). Endogenous SIRT2 was immunoprecipitated from control and Ada2a or Ada3 KD 293T cells and analysed by an antibody that recognizes SIRT2 in general or specifically recognizing SIRT2 phosphorylated on S331P. WBs obtained with the phospho-specific antibody were quantified by densitometry. Indicated fold changes are mean from $n = 4$ independent experiments, $*P < 0.05$.

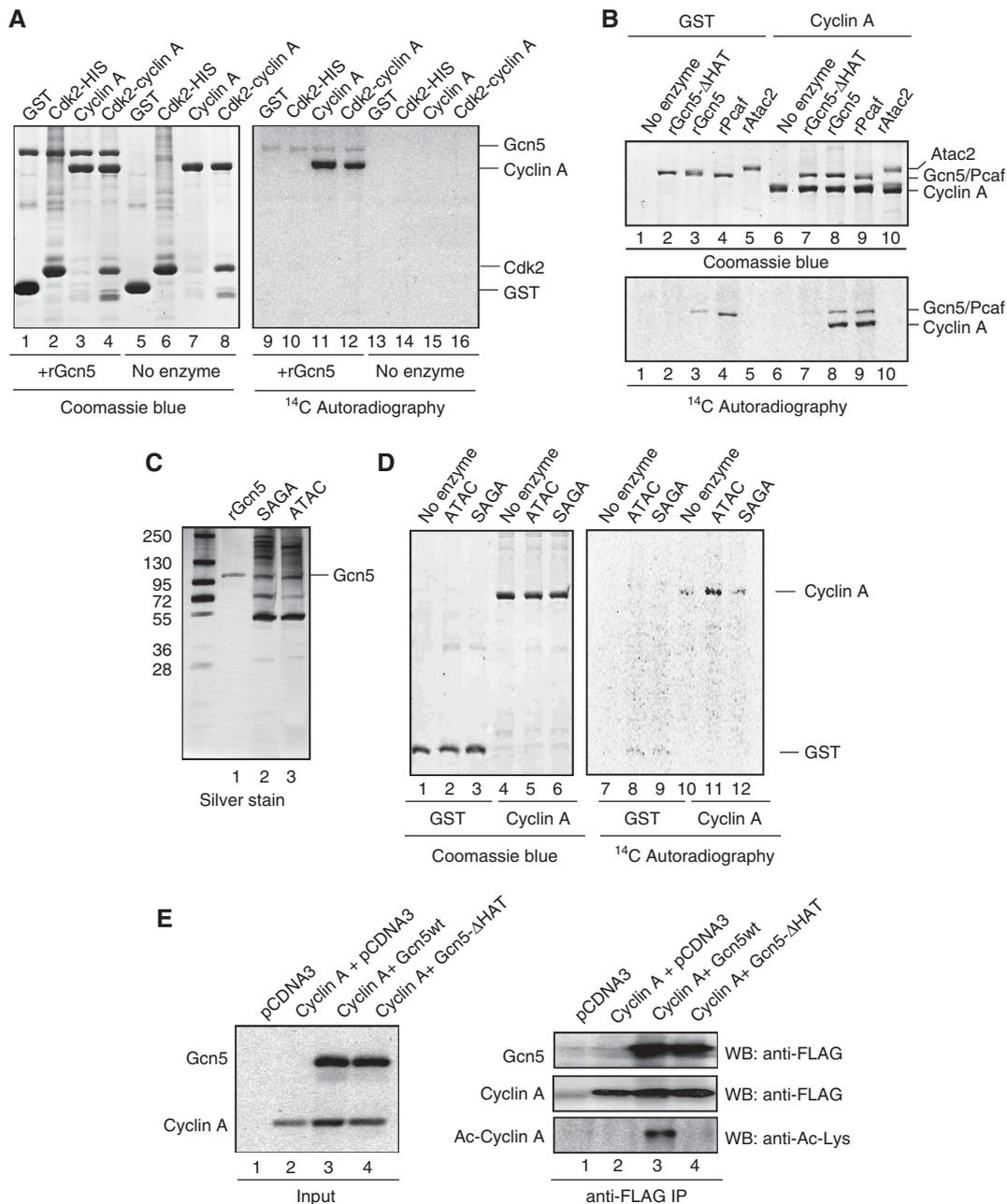


Figure 5 The ATAC complex acetylates Cyclin A/Cdk2 through Gcn5 or Pcaf. **(A)** Gcn5 acetylates the Cyclin A/Cdk2 complex *in vitro*. *In vitro* acetylation assays have been carried out using purified recombinant (r) Cdk2 and Cyclin A as substrates, and rGcn5 as enzyme. Reactions were separated by SDS-PAGE, visualized by coomassie blue staining (left panel) and labelled proteins were visualized by autoradiography (right panel). **(B)** Gcn5 and Pcaf, but not Gcn5-ΔHAT or Atac2, efficiently acetylate Cyclin A *in vitro*. *In vitro* acetylation assays have been carried out using purified recombinant (r) Cyclin A as substrate, and rGcn5, rGcn5-ΔHAT, rPcaf or rAtac2 as enzyme. Reactions were separated by SDS-PAGE, visualized by coomassie blue staining (upper panel) and labelled proteins were visualized by autoradiography (lower panel). **(C, D)** The ATAC complex, but not SAGA, acetylates Cyclin A *in vitro*. *In vitro* acetylation assays have been carried out using purified recombinant (r) Cyclin A as substrate, and the purified hATAC or hSAGA complexes as enzymes. **(C)** Shows a silver staining for the respective ATAC and SAGA purifications, with equivalent Gcn5 content. **(D)** Shows the acetylation experiment performed with the purified ATAC and SAGA complexes: reactions were separated by SDS-PAGE, visualized by coomassie blue staining (left panel) and labelled proteins were visualized by autoradiography (right panel). **(E)** Gcn5 acetylates Cyclin A *in vivo*. 293T cells were transfected with an empty vector (pCDNA3) (lane 1), or co-transfected with FLAG-Cyclin A and pCDNA3 (lane 2); FLAG-Cyclin A and FLAG-Gcn5 wild type (Gcn5wt) (lane 3), or Cyclin A and FLAG-Gcn5 mutated in the HAT domain (Gcn5-ΔHAT) (lane 4). WCEs from the transfected cells was prepared and analysed by western blot (WB) with the indicated antibodies (left panel). FLAG-tagged proteins were immunoprecipitated from WCEs, eluted with FLAG peptide and analysed with an antibody recognizing acetyl-lysines, Cyclin A and Gcn5 (as indicated).

acetylation (Mateo *et al*, 2009). These four lysine residues are located on the N-terminal domain of Cyclin A, in the so-called canonical degradation (D)-box (positions 46–63) or the extended D-box (65–82) (Tin Su, 2001 and references therein).

Interestingly, these domains have been implicated in regulating the stability of the protein (Wolthuis *et al*, 2008) (Figure 6A). Moreover, it has been reported that the replacement of K54 and K68 of Cyclin A by arginines stabilizes

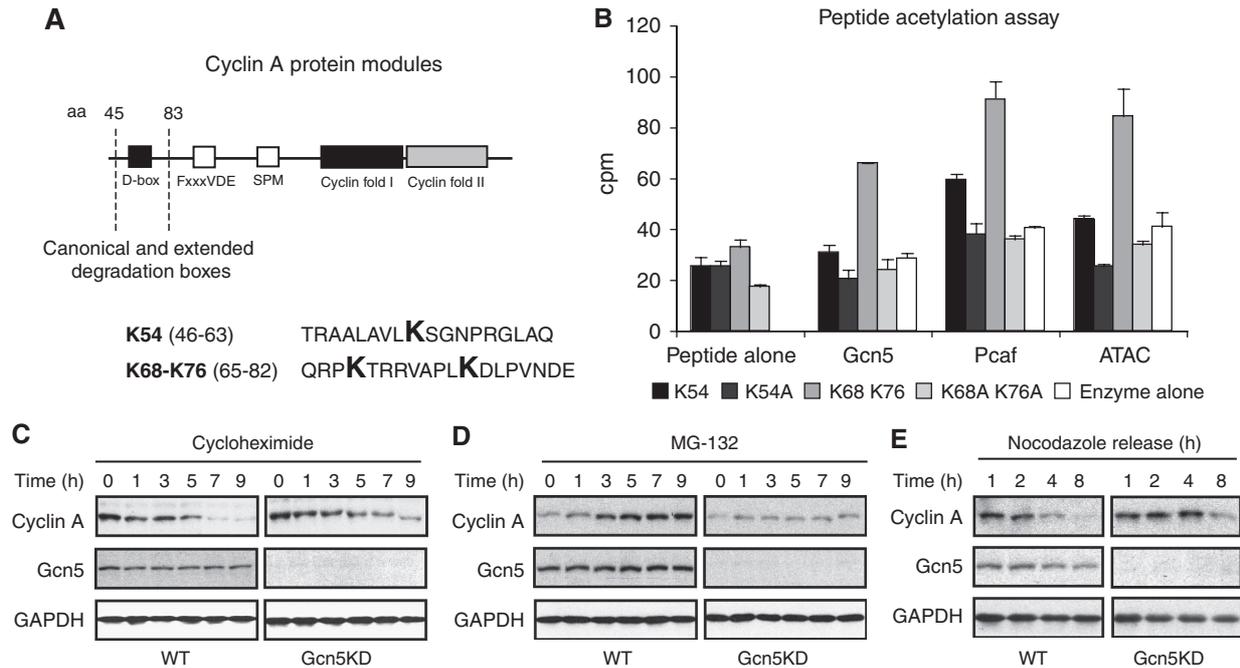


Figure 6 The ATAC complex regulates Cyclin A stability through acetylation. **(A)** Upper panel: schematic representation of the Cyclin A protein and its characteristic domains. The amino-acid (aa) positions of the canonical (D-box) and the extended degradation boxes are indicated. Lower panel: summary of the peptides synthesized to be used as substrate in the peptide acetylation assays shown in **(B)**. **(B)** Peptide acetylation assays were performed using rGcn5, rPcaf or the ATAC complex as enzymes, and the peptides containing potential lysine target sites [wt (K) or mutated to Alanine (A)] as indicated. **(C, D)** Gcn5 acetylation promotes Cyclin A degradation *in vivo* through the proteasome. Inducible HeLa shRNA (Luc-KD or Gcn5-KD) cell lines maintained in the presence of doxycyclin were left untreated or exposed to cycloheximide **(C)** or MG-132 **(D)** for different time points (as indicated). Cells were collected, WCEs prepared and analysed by WB with the indicated antibodies. **(E)** Gcn5 acetylation promotes Cyclin A degradation during mitosis. HeLa shRNA (Luc-KD or Gcn5-KD) cell lines maintained with doxycyclin, blocked at the G2 phase of the cell cycle with Nocodazole for 18 h and then released from this block for several hours as indicated. Cells were collected, WCEs prepared and analysed by WB with the indicated antibodies.

Cyclin A in an ubiquitin-independent manner (Fung *et al*, 2005). As our mass spectrometric analysis suggested that Gcn5 may acetylate Cyclin A at positions K54 and K68 positions (data not shown) and as these lysines are located in the D-box of Cyclin A, we generated two peptides covering these positions, and their corresponding mutant versions in which the lysines (K) were substituted with alanines (A) (Figure 6A). Using the wild-type or mutated peptides in *in vitro* peptide acetylation assays, we observed that either the recombinant rGcn5 or rPcaf enzymes or the ATAC complex acetylated the Cyclin A peptide (from amino-acid 65–82) containing K68 and K76, which corresponds to the extended D-box (Geley *et al*, 2001) (Figure 6B). In contrast, the enzymatic activities were much less efficient on the Cyclin A peptide (from amino-acid 46–63) containing K54, present within the canonical D-box (Figure 6B). Note that the corresponding mutant peptides showed only background acetylation levels. Importantly, an earlier study showed that the single deletion of the canonical D-box (positions 45–58) does not affect Cyclin A protein turnover. However, the deletion of both the canonical and extended D-box (position 47–83) leads to stable Cyclin A protein levels (Geley *et al*, 2001). Our present results together with earlier observations suggest that acetylation of Cyclin A on the extended D-box may serve as a regulatory mechanism for Cyclin A protein stability along the cell cycle, and concomitantly, regulate Cyclin A mitotic function through its degradation.

Gcn5 regulates Cyclin A stability through acetylation

The function of Cyclin A/Cdk2 is restricted to early mitotic stages as Cdk2 is inactivated and Cyclin A degraded when cells enter in prometaphase (den Elzen and Pines, 2001). Thus, we tested whether the acetylation of Cyclin A by Gcn5 would affect the stability of Cyclin A in the cells. To this end, we generated an inducible HeLa cell line in which Gcn5 expression could be knocked down by the doxycyclin inducible expression of a specific shRNA (<http://tronolab.epfl.ch/>). As a control, we generated a cell line with an inducible shRNA against Luciferase (Luc-KD). After 48 h of induction by doxycyclin treatment, Luc-KD or Gcn5-KD cells were treated with cycloheximide to block *de novo* protein synthesis and the Cyclin A levels at different time points were measured by WB analysis (Figure 6C). In wild-type cells, degradation of Cyclin A was completed after 5–7 h of cycloheximide treatment. In contrast, in Gcn5-KD cells, this degradation was clearly delayed, as after 9 h of cycloheximide treatment Cyclin A was still detectable. This result is in good agreement with our hypothesis that Gcn5 activity could regulate Cyclin A protein stability. To further confirm this observation, we performed the same type of experiment, but on cells transfected with expression vectors for Gcn5wt or for Gcn5-ΔHAT. After transfection, cells were treated with cycloheximide and Cyclin A levels measured by WB analysis (Supplementary Figure 9B). In non-transfected cells, degradation of Cyclin A started at 6 h of cycloheximide treatment, whereas in Gcn5-expressing cells, this degradation started

earlier (around 3 h of treatment), further confirming that Gcn5-mediated acetylation can trigger Cyclin A degradation. In contrast, in cells expressing the Gcn5- Δ HAT mutant, Cyclin A degradation started much later (around 9 h of treatment) further underlining the importance of the acetyltransferase activity of Gcn5 in Cyclin A degradation (Supplementary Figure 9B).

On the basis of these results and on the identification of the potential lysines as target of Gcn5 acetyltransferase activity within the extended D-box of Cyclin A, we next tested whether Gcn5-mediated Cyclin A degradation was proteasome dependent. For this aim, after 48 h of doxycyclin treatment, wild-type or Gcn5-KD cells were treated with MG-132 to block proteasome-mediated protein degradation, and Cyclin A levels were then measured by WB analysis at different time points of MG-132 treatment (Figure 6D). In wild-type cells, Cyclin A levels steadily increased over time, whereas in Gcn5-KD cells, Cyclin A levels remained unchanged. This result suggests that in the absence of Gcn5, Cyclin A is not targeted to proteasome degradation. This observation is in agreement with our working hypothesis that Gcn5-mediated acetylation on Cyclin A triggers Cyclin A degradation. Finally, we evaluated whether the mitotic degradation of Cyclin A was affected in the absence of Gcn5. Thus, we blocked both wt and Gcn5-KD cells at the G2 phase of the cell cycle by nocodazole treatment for 18 h, and then monitored Cyclin A protein levels by WB at different time points after releasing the block (Figure 6E). Consistent with our above results, we observed a delayed Cyclin A degradation on G2/M synchronization and release in Gcn5-KD cells, when compared with the wild-type cells (Figure 6E). These results together show that Gcn5 AT activity has a function in the regulation of the mitotic degradation of Cyclin A and thus the activity of the Cyclin A/cdk2 kinase. Our data show that Cyclin A is degraded in a Gcn5-dependent manner at the beginning of mitosis to ensure timely completion of cell division (Tin Su, 2001 and references therein).

Ada core of the ATAC complex regulates Cyclin A stability

Next, we tested whether depletion of the Ada2a/3 subunits of the ATAC complex could lead to changes in Cyclin A levels in the cells. To this end, we examined Cyclin A levels under Ada2a/3 KD conditions by immunofluorescence, either in late G2 or metaphase. In agreement with our above observations, in Ada2a/3-depleted cells, Cyclin A levels remained stable during late G2, suggesting that Cyclin A degradation at early mitotic stages did not occur (Figure 7A, compare panel a with c and e, or panel g with i and k). Next, we analysed endogenous Cyclin A levels by WB analysis in asynchronous, G1 or G2/M arrested cell populations. Asynchronous cultures showed increased Cyclin A levels after Ada2a/3 depletion (Figure 7B). After the release of control cells arrested in G1 or G2/M, Cyclin A levels steadily increased from G1 to G2 (Figure 7C, lanes 1–3), and were degraded on G2 to M transition (lanes 4 and 5 in Figure 7C). In contrast, Ada2a/3-depleted (KD) cells displayed higher and stable Cyclin A levels along G1–G2 (Figure 7C, lanes 1–3), and were unable to trigger Cyclin A degradation on mitosis (Figure 7C, lanes 4 and 5).

To test whether the increased Cyclin A protein levels on Ada2a/3 KD could be also due to transcriptional effects, we

evaluated the impact of Ada2a KD on the transcription of the *Cyclin A* gene in cell populations synchronized at the G2 phase of the cell cycle (Figure 7D, left panels). After synchronization, control or Ada2a KD cells were collected and mRNA expression for *Cyclin A* or *Cyclin B* was measured. This experiment clearly showed that *Cyclin A* or *B* transcripts did not change on Ada2a KD (Figure 7D, right panel), further confirming our above results that the ATAC KD induced Cyclin A stabilization effects are taking place at the protein level. The lack of Cyclin A degradation on G2/M release in Gcn5-, Ada2a- and Ada3-depleted cells strongly suggests that ATAC-mediated acetylation contributes to Cyclin A degradation in wild-type conditions.

In summary, here we describe a new pathway in which the ATAC complex controls Cyclin A/Cdk2 and, indirectly, SIRT2 activity. The ATAC/Gcn5-mediated acetylation of Cyclin A targets it for degradation, which is indispensable for obtaining the non-phosphorylated form of SIRT2. This SIRT2 is consequently fully active and able to deacetylate its mitotic targets, H4K16 and tubulin.

Discussion

Although the function of HAT complexes in regulating chromatin structure and transcription activation is widely studied (Lee and Workman, 2007; Nagy and Tora, 2007), less is known about their non-histone substrates and the function they fulfil through acetylating other proteins than histones. In the present report, we describe that the Gcn5-containing ATAC complex localizes to the mitotic spindle in which it has an essential function in orchestrating the progression through mitosis. This is a specific feature of the ATAC complex that contrasts with the other Gcn5-containing complex, SAGA, showing a different localization and not being involved in mitosis. We show that cells display a number of mitotic abnormalities upon depletion of the Ada core of ATAC. Our observations suggest that in the absence of the Ada core, the Gcn5 AT, probably as a free protein or associated with a partial ATAC complex, acetylates inefficiently its mitotic substrates, and in turn globally impacts on mitotic progression.

Indeed, analysis of the phenotype arising on Ada2a/3 depletion reveals a number of defects in crucial stages of cell division. Altogether, Ada2a/3-depleted cells proceed with major difficulties through mitosis, by either dividing at very slow rates or asymmetrically. In the most severe cases, these cells fail to complete their division and generate multinucleated cells or cells that die soon after mitosis.

Depletion of Ada2a/3 critically affects both early and late mitotic states. Ada2a/3 KD leads to a four-fold increase in the number of cells possessing super-numeral centrosomes compared with control cells. Deregulated centrosome amplification has a major impact on cell division, as centrosome duplication is a prerequisite for proper bipolar spindle formation, correct chromosome segregation and symmetrical cell division (Heald *et al*, 1997). Importantly, centrosome duplication requires, among other activities, the function of the Cdk2 kinase in association with Cyclin A (Meraldi *et al*, 1999). In addition, Cyclin A/Cdk2 has been described to be essential to coordinate centrosomal and mitotic events (De Boer *et al*, 2008). Therefore, any modification of normal Cyclin A/Cdk2 activity would influence not only proper

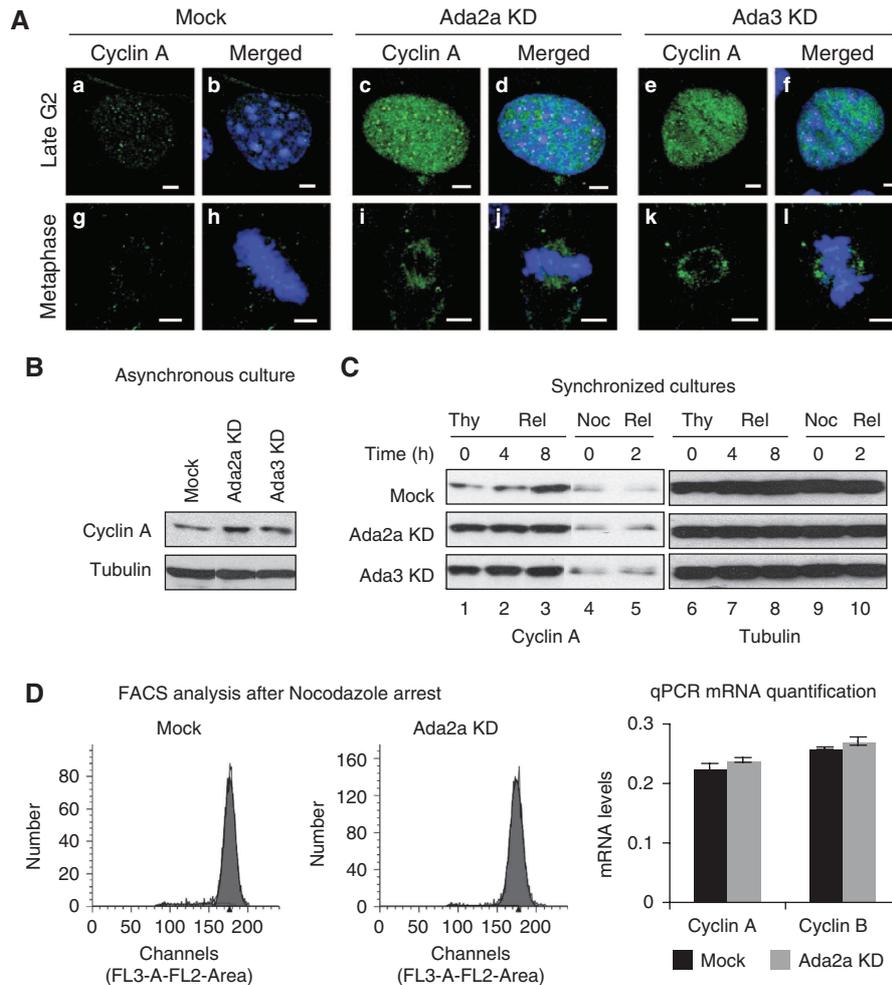


Figure 7 The Ada core of the ATAC complex regulates Cyclin A stability. **(A)** Mock or Ada2a/3 siRNA-transfected cells were visualized by immunofluorescence in late G2 and metaphase using an anti-Cyclin A antibody. Images are representative of three independent experiments. **(B, C)** WB analysis of Cyclin A levels in cell extracts prepared from wild-type or Ada2a and Ada3 KD cells. Asynchronous **(B)**, G1 (thymidine: Thy) or G2/M (nocodazole: Noc) arrested cells **(C)** were released and Cyclin A protein level monitored using the indicated antibodies. **(D)** *Cyclin A* transcription is not affected after depletion of an ATAC subunit (Ada2a). Mock or Ada2a siRNA-transfected cells were blocked at the G2/M phase of the cell cycle by Nocodazole treatment for 18 h (as verified by the FACS analyses shown on the left). In the two left panels the x-axis represents the DNA content and the y-axis the cell numbers ($\times 1000$). Cells were collected and their respective RNA extracted. This RNA was used for quantitative PCR analysis of the *Cyclin A* and *Cyclin B* transcripts for each condition (panel on the right). Mean and s.d. were calculated from three independent experiments.

centrosome duplication rates, but also centrosomal activities and mitotic events. Our results uncover the involvement of the ATAC complex, through Gcn5-mediated acetylation, in the regulation of Cyclin A stability and as a consequence, Cdk2 activity. Importantly, the depletion of Ada2a and Ada3 deregulates the enzymatic activity of ATAC, as the Ada core is essential to sustain Gcn5-HAT activity (Balasubramanian *et al*, 2002). Furthermore, we show that the depletion of the Ada2 or Ada3 subunits results in the disassembly of Gcn5 from the ATAC complex. Overall, the deregulated ATAC activity because of the Ada2a/3 KD would directly affect Cyclin A acetylation, stability and function, thus correlating with the observed centrosome abnormalities. Consistent with the aberrant centrosome multiplication, Ada2a/3-depleted cells manifest defects also in spindle and midbody formation, which in turn correlates with the observed difficulties to proceed through cytokinesis and complete cell division. Altogether, these abnormalities result in a time delay of mitosis and retarded entry into the G1 phase of the cell cycle.

In addition, Ada2a and Ada3 KD lead to changes in chromatin post-translational modifications, such an increase in H4K16 acetylation levels and a reduction of H3S10 phosphorylation levels (Ciurciu *et al*, 2008; Nagy *et al*, 2010 and data not shown). These two features oppose the normal mitotic scenario characterized by high H3S10P and low H4K16Ac levels required for normal chromatin condensation. Furthermore, we also show abnormal hyperacetylation of the microtubule network in ATAC-depleted cells. Microtubules act as pulling forces for chromosome segregation and their dynamics relies on hypoacetylated states, as α -tubulin acetylation marks static microtubule-based structures (Westermann and Weber, 2003; Hammond *et al*, 2008). Therefore, the observed hyperacetylation of α -tubulin would impair proper chromosome segregation and is consistent with the phenotype of binucleated cells that we describe. Thus, the absence of the Ada core of ATAC leads to inefficient chromosome compaction (because of H4K16 hyperacetylation) and increased microtubule stability (because of α -tubulin hyperacetylation), which together will impair mitotic progression.

It seemed striking that the depletion of an AT complex could lead to the hyperacetylation of two proteins whose deacetylated state is a prerequisite for mitotic progression: α -tubulin and H4K16. We solved this apparent paradox by showing that the effects observed in the absence of the Ada core of ATAC derive from impaired SIRT2 activity on these substrates. Consistent with this, in the absence of Ada2a and Ada3, SIRT2 overexpression is enough to restore normal H4K16 and α -tubulin deacetylation. Moreover, we also show that the Cyclin A/Cdk2 complex constitutes the link between the activities of ATAC and SIRT2, and that ATAC-mediated acetylation of Cyclin A determines the fate of the Cyclin A/Cdk2 complex by priming Cyclin A for degradation. These observations are in good agreement with recent findings describing that Cyclin A degradation could be triggered by acetylation (Mateo *et al*, 2009). Furthermore, in this report, we show that both Gcn5 and the ATAC complex mediate lysine acetylation in the extended D-box of Cyclin A and thus regulate Cyclin A degradation along the cell cycle. Consequently, any dysfunction of the ATAC complex will have an impact on Cyclin A activity. At the onset of mitosis, Cyclin A has to be degraded to ensure faithful mitotic progression. Indeed, an earlier report shows that after deletion of its extended D-box, Cyclin A becomes non-degradable, which leads to mitotic delay, as cells show anaphase arrest and difficulties to complete cytokinesis (Geley *et al*, 2001). Our study shows a situation that mimics the phenotype arising after deletion of the Cyclin A extended D-box, as depletion of Ada2a or Ada3 also leads to Cyclin A stabilization and difficulties for mitotic completion. Overall, our data illustrate a pathway in which, during mitosis, ATAC inhibits Cyclin A/Cdk2 function by promoting Cyclin A degradation through Gcn5-mediated acetylation. This consequently renders SIRT2 non-phosphorylated and fully active, inducing deacetylation of H4K16 and α -tubulin, which allows chromatin compaction and segregation. In the absence of the Ada2a/3 core of ATAC, Gcn5 activity is not correctly targeted and thus, Cyclin A levels remain high, as Cyclin A fails to be efficiently degraded. This in turn would lead to amplified Cyclin A/Cdk2 kinase activity, which then would result in abnormal centrosome duplication and defective bipolar spindle formation, SIRT2 phosphorylation and inactivation. All these effects together would then lead to defective chromatin compaction, microtubule dynamics, and thus, mitotic failure.

Altogether, our data highlight an essential implication of a mammalian AT complex in mitosis, by regulating the activity of crucial non-histone substrates. We have uncovered a novel function for a HAT complex (ATAC) that earlier has been mainly implicated in transcription regulation. Acetylation of non-histone substrates is now being generally accepted as a regulatory mechanism of protein activity. As we describe in this study for Cyclin A, protein acetylation seems to be a more general mechanism to control protein turnover and, therefore, the function of important cellular protein machines is controlled by regulating their cellular amounts (Caron *et al*, 2005; Sadoul *et al*, 2008). The involvement of the ATAC complex in targeting cell cycle kinase complex(es) reveals a novel regulatory function for this complex in controlling cell cycle progression. Moreover, our new results challenge the classical concept that HAT activities must be replaced by HDACs during mitosis, and indicate that ATs must remain active and act coordinately with HDACs to regulate cell division.

Materials and methods

Cell culture, reagents, treatments and transfections

Cell culture conditions, specific treatments and transfection reagents are detailed in the Supplementary data.

Generation of inducible HeLa shRNA cell lines

During a first infection, HeLa cells (ATCC) were transduced with a lentivirus encoding the tetraCycline repressor DNA-binding domain fused to a KRAB domain (pLV-tTRKRAB-red). Five days after infection, a cell population expressing similar levels of the dsRED marker was sorted using an FACS Diva. These cells were hereafter grown in DMEM supplemented with 10% Tet-free FBS. In a second round of infections, these cells were transduced with lentiviruses harbouring shRNA cloned in pLVTH either against Gcn5 (target sequences: CGTGCTGTACCTCGAATGA) or GL2 luciferase as control (target sequences: CCTTACGCTGACTACTTCGA) at a MOI of 20. All cell lines generated were checked for the presence of the EGFP marker after 2 days of doxycyclin induction (1 μ g/ml) by FACS. Lentivirus production and titre evaluation were carried out according to Professor D Trono's laboratory protocols (<http://tronolab.epfl.ch/>) pLV-tTRKRAB-red, pLVTH and the packaging systems were kindly provided by Professor D Trono and are described in Wiznerowicz and Trono (2003).

Antibodies

Antibodies used in this study are detailed in the Supplementary data.

Protein overexpression in baculoviruses

Expression and purification of human Cyclin A in complex with Cdk2 was performed as earlier described (Sarcevic *et al*, 1997). The baculovirus expressing rGcn5 was described in Demyen *et al* (2007). The rGcn5- Δ HAT construct is essentially the same containing two point mutations (E575A and D615A) generated by site-directed mutagenesis. The rATAC2 expressing baculovirus contains the amplified human ATAC2 cDNA obtained from the IMAGE clone IRAUp969G0838D. Primers used for the amplification were 5'-TCCTCGAGCTGTATTCGCATCAGCGCC-3' and 5'-AAGAATTCGATG GATAGTAGCATCCACCTGAG-3'. The amplicon was inserted into the EcoRI XhoI sites of the HA tag containing pCDNA 3.1 vector and further cloned into pVL1393 (BD Biosciences) to generate recombinant viruses. The rPCAF was kindly provided by N Rochel.

Preparation of cell extracts and IP

Details concerning preparation of total or nuclear cell extracts from mammalian cells or insect cells, and immunoprecipitation are described in the Supplementary data.

HAT assays

Acetylation assays: proteins, purified either by GST pull down or by His-tag purification, were incubated in the presence of recombinant Gcn5, Gcn5- Δ HAT, Pcaf or Atac2 (purified from baculovirus-infected insect cells by anti-FLAG or anti-HA IP followed by elution with FLAG or HA peptides) or the human ATAC or SAGA complexes (purified from HeLa nuclear extracts) and 14 C-Acetyl-CoA. The reaction mixture (25 μ l) containing 5X HAT buffer (250 mM Tris [pH 7.9], 50% glycerol, 0.5 mM EDTA, 250 mM KCl, 100 mM sodium butyrate, 5 mM and the protease inhibitor C-Complete (Roche) was incubated for 1 h at 30°C. The reaction was stopped by adding Laemmli buffer with 10 mM DTT and boiled for 5–10 min. Proteins from the reactions were separated on a 13% SDS-PAGE and analysed by coomassie brilliant blue staining and then by radiography.

Peptide acetylation assays were performed as described in Nagy *et al* (2010).

TDAC assays were performed as described in North *et al* (2003).

Immunofluorescence

Details concerning indirect immunofluorescence, microscopy, and image analysis are described in the Supplementary data.

FACS analysis

Cells were trypsinized, washed with PBS, and fixed with ice-cold 70% ethanol O/N at 4°C. DNA was stained using a solution with 50 μ g/ml propidium iodide (Sigma) and 1 mg/ml RNase A in PBS. The cells were analysed on FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest and ModFit data analysis software.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

Acknowledgements

We thank V Band, B Lüscher, B Sarcevic, X Zhao for reagents, BJ North for reagents and advice; D Devys, ME Torres-Padilla and C Cantó for critically reading the paper and the IGBMC facilities for technical support. ZN and MO were supported by a fellowship from the European Community grant and a fellow-

ship from the Fondation pour la Recherche Médicale, and AK and AR by a fellowship of the Alsace Region. This work was supported by funds from CNRS, and European Community (HPRN-CT 00504228, STREP LSHG-CT-2004-20 502950 and EUTRACC LSHG-CT-2007-037445), INCA (2008-UBICAN) and AICR (09-0258) grants.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Balasubramanian R, Pray-Grant MG, Selleck W, Grant PA, Tan S (2002) Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. *J Biol Chem* **277**: 7989–7995
- Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA (2002) Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast Sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* **277**: 45099–45107
- Brownell JE, Allis CD (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* **6**: 176–184
- Bu P, Evrard YA, Lozano G, Dent SY (2007) Loss of Gcn5 acetyltransferase activity leads to neural tube closure defects and exencephaly in mouse embryos. *Mol Cell Biol* **27**: 3405–3416
- Caron C, Boyault C, Khochbin S (2005) Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *BioEssays* **27**: 408–415
- Cimini D, Mattiuzzo M, Torosantucci L, Degraffi F (2003) Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. *Mol Biol Cell* **14**: 3821–3833
- Ciurciu A, Komonyi O, Boros IM (2008) Loss of ATAC-specific acetylation of histone H4 at Lys12 reduces binding of JIL-1 to chromatin and phosphorylation of histone H3 at Ser10. *J Cell Sci* **121**: 3366–3372
- Ciurciu A, Komonyi O, Pankotai T, Boros IM (2006) The Drosophila histone acetyltransferase Gcn5 and transcriptional adaptor Ada2a are involved in nucleosomal histone H4 acetylation. *Mol Cell Biol* **26**: 9413–9423
- De Boer L, Oakes V, Beamish H, Giles N, Stevens F, Somodevillatorres M, DeSouza C, Gabrielli B (2008) Cyclin A//cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. *Oncogene* **27**: 4261–4268
- Demény MA, Soutoglou E, Nagy Z, Scheer E, Janoshazi A, Richardot M, Argentini M, Kessler P, Tora L (2007) Identification of a small TAF complex and its role in the assembly of TAF-containing complexes. *PLoS One* **2**: e316
- den Elzen N, Pines J (2001) Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol* **153**: 121–136
- Dryden SC, Nahhas FA, Nowak JE, Goustin A-S, Tainsky MA (2003) Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol Cell Biol* **23**: 3173–3185
- Dumont S, Mitchison TJ (2009) Force and length in the mitotic spindle. *Curr Biol* **19**: R749–R761
- Fung TK, Yam CH, Poon RY (2005) The N-terminal regulatory domain of cyclin A contains redundant ubiquitination targeting sequences and acceptor sites. *Cell Cycle* **4**: 1411–1420
- Furumai R, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M, Horinouchi S (2001) Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 87–92
- Gamper AM, Kim J, Roeder RG (2009) The STAGA subunit ADA2b is an important regulator of human GCN5 catalysis. *Mol Cell Biol* **29**: 266–280
- Geley S, Kramer E, Gieffers C, Gannon J, Peters J-M, Hunt T (2001) Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* **153**: 137–148
- Guelman S, Kozuka K, Mao Y, Pham V, Solloway MJ, Wang J, Wu J, Lill JR, Zha J (2009) The double-histone-acetyltransferase complex ATAC is essential for mammalian development. *Mol Cell Biol* **29**: 1176–1188
- Guelman S, Suganuma T, Florens L, Swanson SK, Kiesecker CL, Kusch T, Anderson S, Yates III JR, Washburn MP, Abmayr SM, Workman JL (2006) Host cell factor and an uncharacterized SANT domain protein are stable components of ATAC, a novel dAda2A/dGcn5-containing histone acetyltransferase complex in Drosophila. *Mol Cell Biol* **26**: 871–882
- Hammond JW, Cai D, Verhey KJ (2008) Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 71–76
- Heald R, Tournebize R, Habermann A, Karsenti E, Hyman A (1997) Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J Cell Biol* **138**: 615–628
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang X-F, Yao T-P (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**: 455–458
- Ishii S, Kurasawa Y, Wong J, Yu-Lee LY (2008) Histone deacetylase 3 localizes to the mitotic spindle and is required for kinetochore-microtubule attachment. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 4179–4184
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693–705
- Kruhlik MJ, Hendzel MJ, Fischle W, Bertos NR, Hameed S, Yang X-J, Verdin E, Bazett-Jones DP (2001) Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin. *J Biol Chem* **276**: 38307–38319
- Lee KK, Workman JL (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 284–295
- Martinez E (2002) Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol Biol* **50**: 925–947
- Mateo F, Vidal-Laliena M, Canela N, Busino L, Martinez-Balbas MA, Pagano M, Agell N, Bachs O (2009) Degradation of cyclin A is regulated by acetylation. *Oncogene* **28**: 2654–2666
- Meraldi P, Lukas J, Fry AM, Bartek J, Nigg EA (1999) Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-Cyclin A. *Nat Cell Biol* **1**: 88–93
- Minoru Y, Sueharu H, Teruhiko B (1995) Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *BioEssays* **17**: 423–430
- Nagy Z, Riss A, Fujiyama S, Krebs A, Orpinell M, Jansen P, Cohen A, Stunnenberg H, Kato S, Tora L (2010) The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes. *Cell Mol Life Sci* **67**: 611–628
- Nagy Z, Tora L (2007) Distinct GCN5//PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* **26**: 5341–5357
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* **11**: 437–444
- North BJ, Verdin E (2007) Mitotic regulation of SIRT2 by Cyclin-dependent kinase 1-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* **282**: 19546–19555

- Oda H, Okamoto I, Murphy N, Chu J, Price SM, Shen MM, Torres-Padilla ME, Heard E, Reinberg D (2009) Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Mol Cell Biol* **29**: 2278–2295
- Pandithage R, Lilischkis R, Harting K, Wolf A, Jedamzik B, Luscher-Firzlaff J, Vervoorts J, Lasonder E, Kremmer E, Knoll B, Luscher B (2008) The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependent kinases affects cell motility. *J Cell Biol* **180**: 915–929
- Paolinelli R, Mendoza-Maldonado R, Cereseto A, Giacca M (2009) Acetylation by GCN5 regulates CDC6 phosphorylation in the S phase of the cell cycle. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 412–420
- Ruchaud S, Carmenta M, Earnshaw WC (2007) Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 798–812
- Sadoul K, Boyault C, Pabion M, Khochbin S (2008) Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie* **90**: 306–312
- Sarcevic B, Lilischkis R, Sutherland RL (1997) Differential phosphorylation of T-47D human breast cancer cell substrates by D1-, D3-, E-, and A-type cyclin-CDK complexes. *J Biol Chem* **272**: 33327–33337
- Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun J-M, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**: 844–847
- Suganuma T, Gutierrez JL, Li B, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, Abmayr SM, Workman JL (2008) ATAC is a double histone acetyltransferase complex that stimulates nucleosome sliding. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 364–372
- Tin Su T (2001) Cell cycle: how, when and why cells get rid of cyclin A. *Curr Biol* **11**: R467–R469
- Valls E, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas MA (2005) Role of histone modifications in marking and activating genes through mitosis. *J Biol Chem* **280**: 42592–42600
- Vaquero A, Scher MB, Lee DH, Sutton A, Cheng HL, Alt FW, Serrano L, Sternglanz R, Reinberg D (2006) SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev* **20**: 1256–1261
- Vaquero A, Sternglanz R, Reinberg D (2007) NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene* **26**: 5505–5520
- Vernarecci S, Ornaghi P, Bagu A, Cundari E, Ballario P, Filetici P (2008) Gcn5p plays an important role in centromere kinetochore function in budding yeast. *Mol Cell Biol* **28**: 988–996
- Wang Y-L, Faiola F, Xu M, Pan S, Martinez E (2008) Human ATAC is a GCN5/PCAF-containing acetylase complex with a novel NC2-like histone fold module that interacts with the TATA-binding protein. *J Biol Chem* **283**: 33808–33815
- Wei Y, Mizzen CA, Cook RG, Gorovsky MA, Allis CD (1998) Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7480–7484
- Westermann S, Weber K (2003) Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 938–948
- Wiznerowicz M, Trono D (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* **77**: 8957–8961
- Wolthuis R, Clay-Farrace L, van Zon W, Yekezare M, Koop L, Ogink J, Medema R, Pines J (2008) Cdc20 and Cks direct the spindle checkpoint-independent destruction of Cyclin A. *Mol Cell* **30**: 290–302
- Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, Matthias P (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules *in vivo*. *EMBO J* **22**: 1168–1179
- Zilberman Y, Ballestrin C, Carramusa L, Mazitschek R, Khochbin S, Bershadsky A (2009) Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *J Cell Sci* **122**: 3531–3541

SUPPLEMENTARY EXPERIMENTAL PROCEDURES

1.1. Reagents and Antibodies:

Reagents: Aphidicolin, Cycloheximide, Nocodazole, Sodium butyrate, NAD and NAM were purchased from Sigma.

Antibodies: Antibodies were purchased as follows: Rabbit polyclonal for H4K5, H4K12, H3K14, Aurora B and Survivin from Abcam ; Rabbit polyclonal for H3, H3K9, H4K16, from Upstate Biotechnology; Mouse Monoclonal Anti- α -Tubulin, Anti- γ -Tubulin and Acetyl- α -Tubulin from Sigma. Rabbit Polyclonal Anti-SIRT2 and Anti-Cyclin A from Santa Cruz Biotechnology. Mouse Polyclonal Anti-Acetylated Lysines from Santa Cruz Biotechnology. Secondary Antibodies for Western Blot from Jackson Laboratories. Secondary Antibodies for Immunofluorescence: Alexa Fluor Antibodies from Invitrogen; Cy3 Antibodies from Jackson Laboratories.. ATAC or SAGA specific antibodies were raised against the peptides indicated below, and used for generation of mouse monoclonal or rabbit polyclonal antibodies. Sera were purified by Sulfolink Coupling Gel (Pierce) according to the protocol of the manufacturer.

Monoclonal antibodies: Ada2a #2AD1E11, #2AD2A1 : MDRLGSFSNDPSDKPP(C) ; GCN5 #4GC : MAEPSQAPTPAPAAQPRPL(C)

Polyclonal antibodies: Ada3 #1328: ASTSPRNQNKPF(C);Ada 3#2678 : LEGKTGHGPGPG PGRPKSKN (C); ATAC2 #2734 : IRSHLHRSDPHWTPEPD(C); Gcn5 #2676 : MAEPSQ APTPAPAAQPRPL(C); SGF29#2461: HATNKYEVDDEEGKERH(C); SPT20#2470: CR QRPPKRKYLSSGRKSVF; YEATS2#2783:LSQHNDFLSDKDNNSNM(C); ZZZ3 #2616: CGNNNGRRTTDLKQQSTDESW.

Antibodies against the following proteins have been described earlier. GNC5: #2GC2 (Brand et al, 2001); Spt20 (Zohn et al, 2006); USP22: #2391 (Zhao et al, 2008) ; SIRT2-S331P (Pandithage et al, 2008).

1.2. Cell growth condition, treatments:

Cell growth: NIH/3T3 cells were grown in Dulbecco's modified Medium supplemented with 4,5 g/l glucose, 10% NCS and gentamycine. 293T cells were grown in Dulbecco's modified Medium supplemented with 4,5 g/l glucose, 10% FCS332 and gentamycine. HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Medium supplemented with 4,5 g/l glucose, 10% FCS3395 and gentamycine.

Treatments: For **G1 arrest**, cells were incubated with Thymidine (2mM) for 16-20 hours; for **G2/M arrest**, cells were incubated with Nocodazole (0.1ng/ μ l) for 16-20 hours. After the respective blocks, cells were washed three times with PBS, incubated with fresh

medium and collected at the times indicated. Alternatively, to enrich the mitotic population for confocal microscopy, cells were arrested in S-phase with Aphidicolin (0.5 $\mu\text{g/ml}$) for 16 hours. Then cells were washed three times with PBS, incubated with fresh medium for 6 hours and treated for immunofluorescence as described below. **NAM treatments:** 293T cells were incubated O/N at 5mM. **TSA treatments:** 293T cells were incubated for 16h at 400nM. **Cycloheximide treatments:** cells were incubated from 0 to 12 hours at 100 $\mu\text{g/ml}$. **MG-132 treatments:** cells were incubated from 0 to 12 hours at 20 nM.

Transient Transfections:

siRNA transient transfections: siRNA were provided by Dharmacon. Scramble or Negative Control (ref. number D-001810-10), anti-mAda2a siRNA (ref. number L-054832-01), anti-mAda3 (ref. number L-051901-01). The siRNAs were transfected into NIH/3T3 cells using Dharmafect 1 and OptiMEM serum free medium following the recommendations of the supplier.

Transient transfections for simultaneous Knock-down and overexpression : shRNA encoding plasmids: shRNA plasmids for Knock-Down: control and for Ada3KD were kindly provided by V. Band. h-hSpt20 was cloned in the pSUPER vector (targeting the 684-703nt sequence of targeted region: 5' gatgaacactcgcceaatg 3'). **Plasmids for SIRT2 or HDAC6 overexpression:** pCDNA3-FLAG, SIRT2-FLAG, HDAC6-FLAG plasmids were kindly provided by BJ. North. SIRT2wt and mutants H150Y, S331A and S331E were kindly provided by B. Lüscher.

Transient transfections for DNA overexpression : Plasmids for Cyclin A overexpression: pCMV-FLAG-Cyclin A was kindly provided by B. Sarcevic. **Plasmids for Gcn5 overexpression:** Gcn5 wild type or mutated on the HAT domain (mutated in the positions: E575A and D615A) were cloned in the pCDNA3 vector containing a FLAG-tag.

The corresponding plasmids were transfected in 293T cells using Lipofectamine 2000 and OptiMEM serum free medium following the recommendations of the supplier.

Protein overexpression in Baculoviruses: Sf9 cells were infected at 5 MOIs and processed after 48-72 hours post-infection.

1.3. Cell extract preparation

Whole cell extracts of NIH/3T3 cells treated with control or anti-Ada2a/3 siRNAs were harvested in Laemmli buffer containing DTT (10 mM), sonicated (3 pulses 15 seconds each at maximum intensity) and boiled for 20 minutes. Alternatively, cell lysates were prepared with IP Buffer 100 (25 mM Tris pH 7.9, 5 mM MgCl_2 , 10% glycerol, 100 mM KCl, 0.1% NP40, 0.3 mM DTT) supplemented with protease inhibitor C-Complete (Roche). Equal

protein amounts of protein were prepared with Laemmli buffer with 10 mM DTT and boiled for 5 minutes.

Total cell extracts of 293T cells transiently transfected (48h) with plasmids encoding Control (mock) or ATAC-specific shRNAs (ADA2a/3) were harvested in lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 150 mM NaCl) in the presence of protease inhibitor C-Complete (Roche).

In order to preserve acetylation marks on histones or other substrates in the procedures of lysis described above, all the steps (PBS washes and Lysis) were performed in the presence of 5 μ M Sodium Butyrate at a final concentration of 5 μ M.

Nuclear extract preparation for subsequent purification of the ATAC complex was described earlier (Leurent et al, 2004; Demeny et al, 2007).

Protein extract from baculoviruses: S9f infected cells (one 175 cm³ flask per condition) were harvested, pelleted and washed twice with cold PBS. The cellular pellet was lysed first for 10 minutes at 4°C with 2ml Tp600 buffer (20 mM Tris [pH 8], 5 mM MgCl₂, 25% Glycerol, 600 mM KCl, 0.5% NP-40). This first step of lysis was followed by addition of 1 ml Tp0 buffer (10 mM Tris [pH 8], 5 mM MgCl₂, 5% Glycerol, 0.1% NP-40) for 10 minutes. Non-lysed material was pelleted down by centrifugation at 8000 rpm for 10 minutes at 4°C.

1.4. Immunoprecipitations

Endogenous immunoprecipitations were carried out as described earlier (Demeny et al, 2007).

FLAG-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-FLAG M2 agarose affinity gel (Sigma), for 2 hr at 4°C from 1 mg of total cell lysate. Immunoprecipitated material was washed three times for 15 min each in low-stringency lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 150 mM NaCl, supplemented with protease inhibitor C-Complete (Roche)), followed by elution with FLAG peptide for 2-5 hr at 4°C.

GST-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-GST resin (GE Healthcare) for 1-2 hr at 4°C. Immunoprecipitated material was washed three times in low-stringency IP100 buffer (25 mM Tris [pH 7.9], 5 mM MgCl₂, 10% Glycerol, 100 mM KCl, 0.1% NP-40, 0.3 mM DTT, supplemented with protease inhibitor C-Complete (Roche)).

His-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-His Ni-NTA resin (Qiagen) for 1-2 hr at 4°C. Immunoprecipitated material was washed three times in low-stringency IP100 buffer.

1.5. Protein Analysis

SDS-Page: Protein samples from Acetylation assays were run in SDS-Page and stained with Coomassie Blue R-250 for 1 hour, destained O/N in Destaining solution (12,5% EtOH, 7,5% Acetic Acid), incubated for 2x10 minutes 100% Acetic Acid, 20 minutes with 'Amplify' (Sigma), dried and exposed at -80°C for several days at -80°C.

Western blotting: Protein samples were run in SDS-Page and blotted onto nitrocellulose membranes (Whatman), blocked with 5% skimmed milk in PBS and later incubated with the different antibodies, according to manufacturer's instructions. The membranes were incubated with anti-mouse or rabbit horseradish peroxidase linked secondary antibody (1:10000 dilution). Primary and Secondary antibodies were diluted in 1% skimmed milk in PBS. Alternatively, for the detection of Histone Acetylation marks, protein samples were run in SDS-Page and blotted onto Immobilon-P membranes (Millipore), blocked with 5% BSA in PBS-0.05% Tween20 and incubated with the different antibodies, according to manufacturer's instructions. The membranes were incubated with anti-mouse or rabbit horseradish peroxidase linked secondary antibody (1:10000 dilution). Primary and Secondary antibodies were diluted in 1% BSA in PBS-0.05% Tween20.

1.6. Immunofluorescence

Indirect Immunofluorescence: For immunofluorescence, NIH/3T3 cells were cultured on Lab-TekII Chamber slides or glass coverslides. Then, cells were fixed in 2% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes at room temperature, washed three times in PBS (10 minutes) and subsequently permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 15 minutes (three incubations of 5 minutes each). After permeabilization, cells were incubated with blocking buffer (10% FCS in PBS) 20 minutes at room temperature. Primary antibodies were diluted in blocking buffer (10% FCS in PBS 0.1% Triton X-100) and incubated with cells for 1 hour at room temperature. After washing with PBS three times, cells were incubated with secondary antibodies conjugated with Alexa 488, Alexa 647 (Molecular Probes) or Cy3 (Jackson Laboratories) for 1 h at room temperature. Then DNA was stained with Hoechst 33258 dye at 5 µg/ml for 1 min at room temperature. After washing with PBS, slides were mounted with anti-fade reagent (80% glycerol/ 5% propyl gallate/ 20%PBS).

Alternatively, cells were washed in PBS, pre-extracted for 10 seconds in Extraction Buffer (20 mM K-PIPES pH 6.8, 10 mM K-EGTA pH 6.8, 1 mM MgCl₂, 0,2% Triton X-100) and fixed for 10 minutes with 4% PFA in Extraction Buffer. After washing with PBS, the staining of the slides was performed as described before.

Cells were probed with Primary Antibodies at the following dilutions: Ada2a; Ada3; Gcn5; Yeats2; Usp22; Spt20 (1:250); Anti-Acetylated histones; anti Sirt2 (1:200); Anti-Aurora B (1:500); Anti H3Ser10P (1:100); anti- α -Tubulin or anti- α -AcetylTubulin (1:1000).

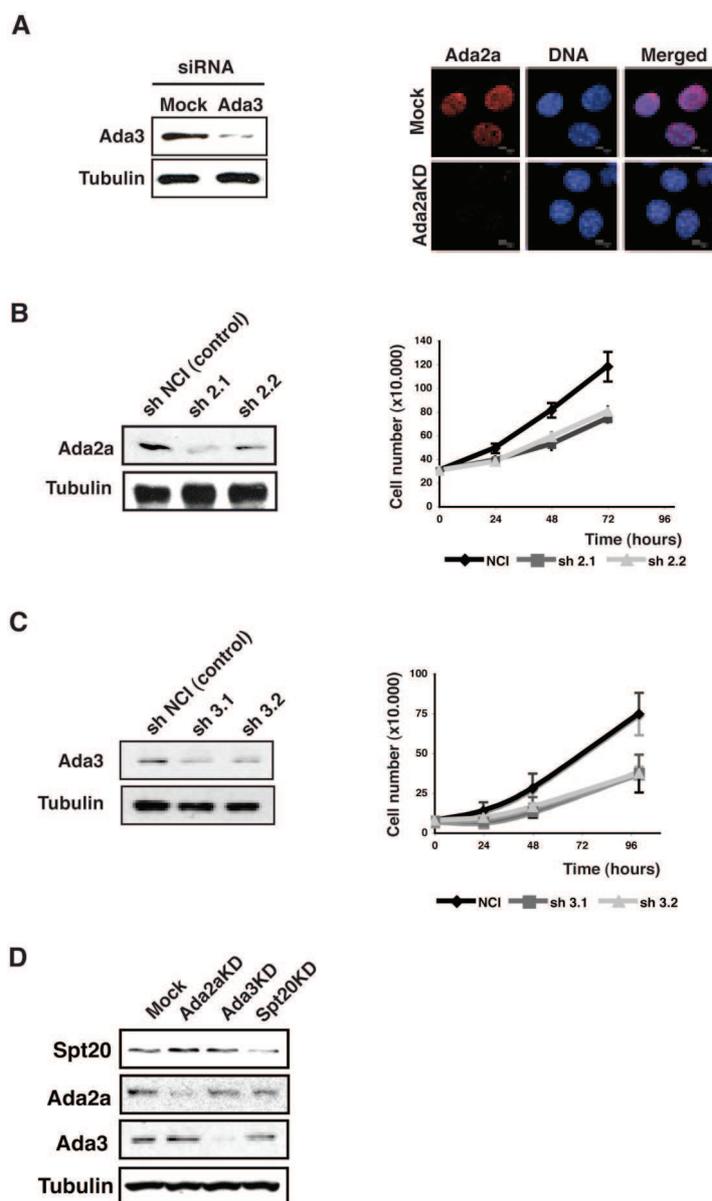
Secondary antibodies were diluted as follows: Alexa 488-labelled anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies, and Alexa 647-labelled anti-mouse secondary antibody (1:750); Cy3-labelled anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody (1:750; Jackson Laboratories).

1.7. Microscopy

Confocal Microscopy: Confocal imaging was performed using a Leica SP2 AOBS Upright DMRXA2 Confocal Microscope from Leica Microsystems operating with a 405 laser diode for Hoechst 33258; with the 488 nm line from an argon laser for Alexa 488, with a He/Ne 543 nm laser for Cy3; or with a 633 nm He/Ne laser for Alexa 647. All images were acquired with a 63x (HCX PL Apo CS NA: 1.2, Leica Microsystems) or a 100x (HCX PL APO CS NA: 1.4, Leica Microsystems) oil immersion objectives, 3 to 5x electronic zoom, and the pinhole set to 1 Airy unit. To compare the intensities of labelling between antibodies, the power of the laser was set to the most intense labelling for each antibody and the same conditions were used for all images for a given antibody. Imaging was performed on the basis of the LCS software and processed with Photoshop (Adobe) software.

Time-Lapse Microscopy: 3T3-NIH cells were grown on 24-well polystyrene plates Flat Bottom with low evaporation lid (Becton Dickinson) suitable for life imaging. Cells were simultaneously transfected with the corresponding siRNA and siGLO Green for the selection of transfected cells for imaging, according to manufacturer instructions. 24-48 hours after transfection, 24-well plates were placed in a chamber fixed to a robotized stage of an inverted microscope (Leica DMIRE2) and maintained at 37°C with 5% CO₂ (Pecon GmbH). Three independent wells corresponding to each condition were collected every 4 min for 30 h. Images were acquired with a Leica DMIRE2 inverted microscope, 20x objective (N Plan PhaCo, NA: 0.4 NA, Leica Microsystems), coupled to a CoolSnap FX camera (Roper Scientific). Image acquisition and editing was performed by the use of Metamorph software (Molecular Devices). Phase contrast was used for transmitted light contrast technique.

SUPPLEMENTARY FIGURES AND CORRESPONDING FIGURE LEGENDS



Supplementary Figure 1 (Orpinell et al.)

Supplementary Figure 1:

Validation of the knockdown of the different ATAC or SAGA subunits tested after 48-72 hours of siRNA or sh transfection.

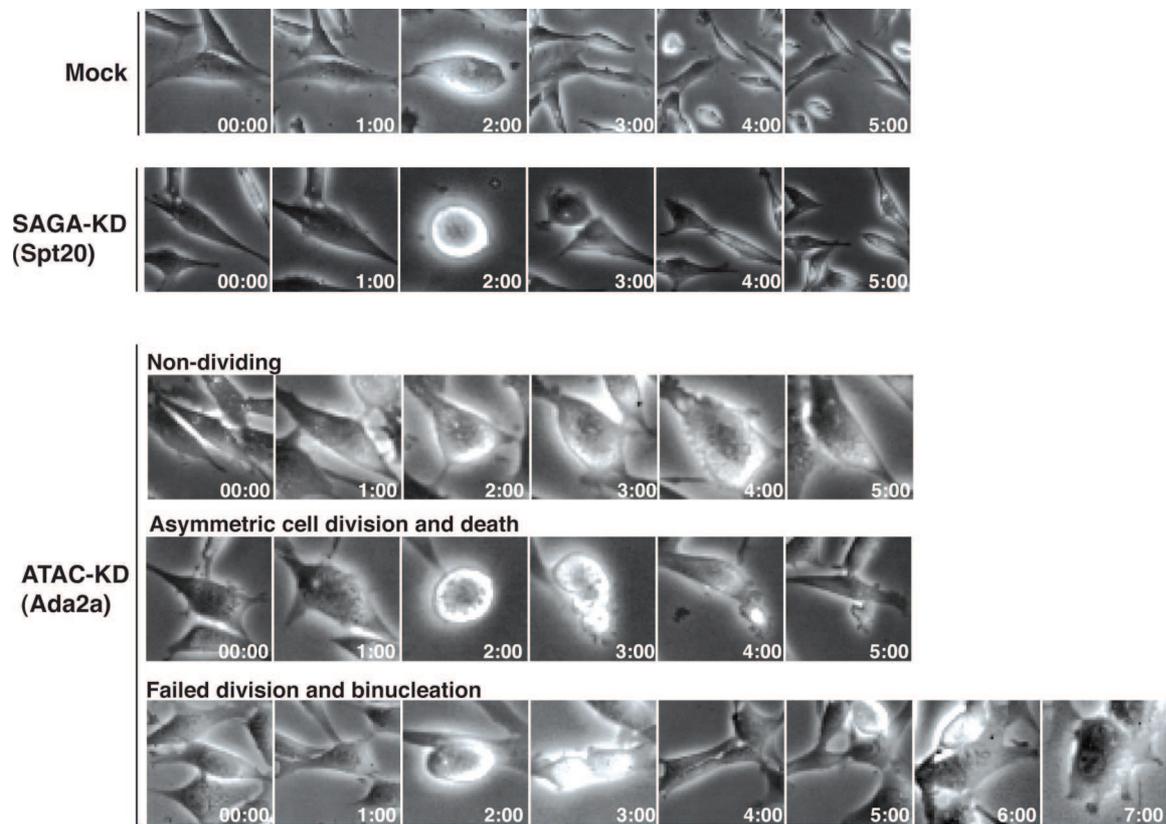
(A) Left panel: Western blot analysis of whole cell extracts in scramble siRNA (Mock); or Ada3 siRNA transfected 3T3-NIH cells. Right panel: confocal imaging of Ada2a in scramble or siAda2a conditions in 3T3-NIH cells.

(B) Left panel: Western blot analysis of whole cell extracts of scramble shDNA (NCI) or two different shAda2a plasmid transfected HeLa cells (2.1 and 2.2) simultaneously transfected

with an hAda2a-expressing plasmid to facilitate anti-Ada2a detection by Western Blot. Right panel: Cell proliferation assays of HeLa cells transfected with scramble shDNA (NCI) or shAda2a plasmids (2.1 and 2.2).

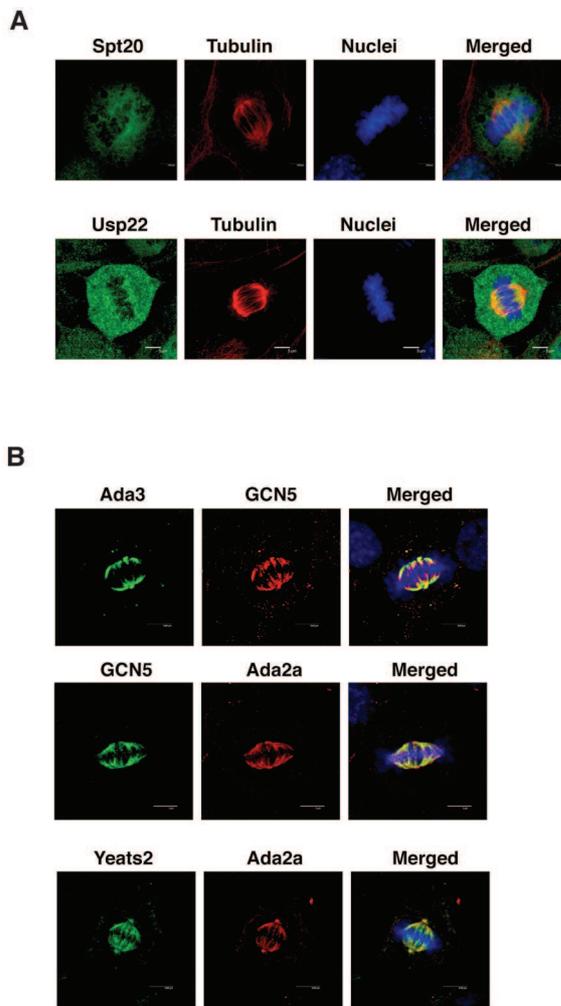
(C) Left panel: Western blot analysis of whole cell extracts of scramble shDNA (NCI) or two different shAda3 plasmid transfected HeLa cells (3.1 and 3.2). Right panel: Cell proliferation assays of HeLa cells transfected with scramble shDNA (NCI) or shAda3 plasmids (3.1 and 3.2).

(D) Western blot analysis of whole cell extracts prepared from HeLa cells transfected with scramble shDNA (NCI); shAda2a (2.1), shAda3 (3.1) and shSPT20, with anti-Ada2a, anti-Ada3, anti-Spt20 and anti- α -tubulin antibodies as indicated.



Supplementary Fig. 2 (Orpinell et al.)

Supplementary Figure 2: Cell division analysis of NIH-3T3 cells transfected with control siRNA (Mock) or siRNA against the indicated SAGA (Spt20) or ATAC (Ada2a) subunits: siRNA transfected cells in prophase were randomly chosen and video imaged for 30 hours. The number of cells undergoing division, displaying division errors (delayed, asymmetric or uncompleted cell divisions), or multi-nucleation, was quantified and expressed as percentage of total cells analyzed (>100 cells/condition) as shown in Figure 1 A-C.

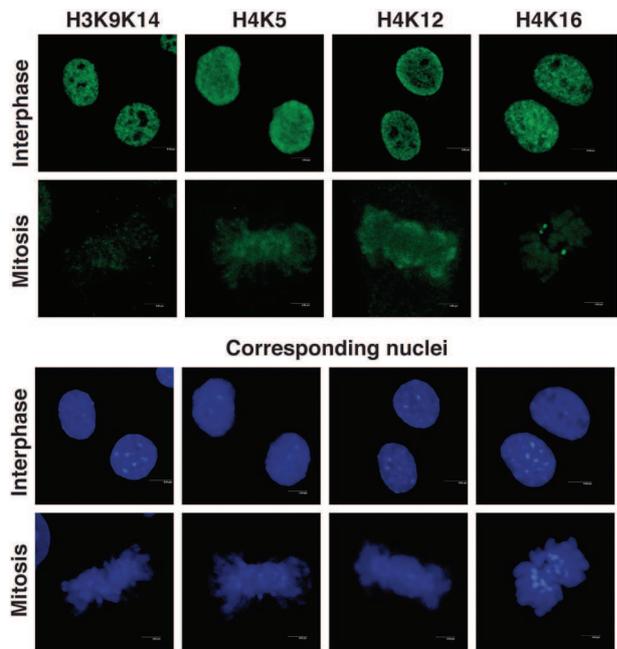


Supplementary Figure 3 (Orpinell et al.)

Supplementary Figure 3: ATAC, but not SAGA subunits, colocalize at the mitotic spindle during mitosis.

(A) Mitotic localization of endogenous SAGA subunits in mouse NIH-3T3 cells. Cells were stained with anti-SAGA (Usp22, Spt20) and anti- α -tubulin specific antibodies, as indicated.

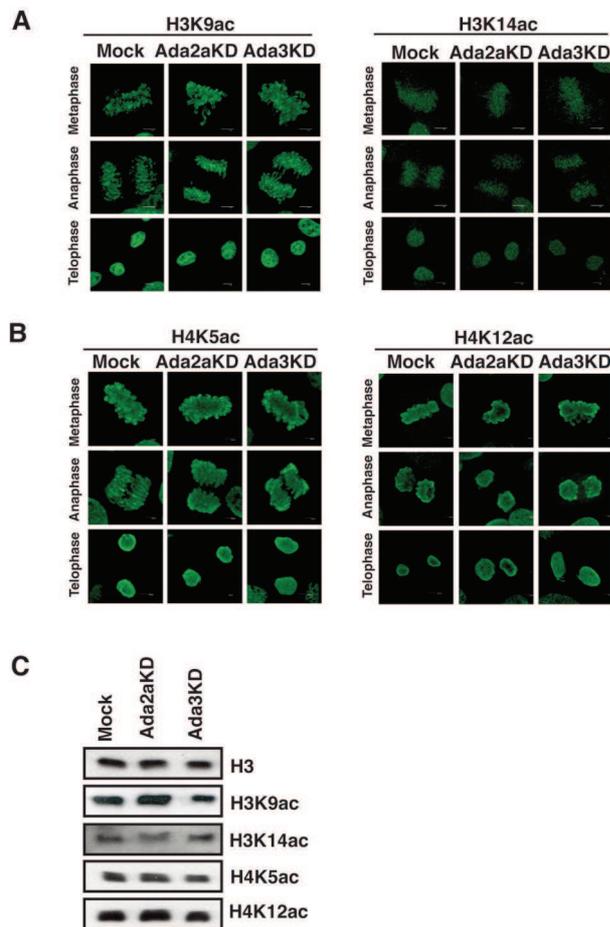
(B) Mitotic colocalization of endogenous ATAC subunits in mouse NIH-3T3 cells. Cells were stained with anti-ATAC (Ada2a, Yeats2) and anti ATAC/SAGA (Gcn5, Ada3) specific antibodies, as indicated.



Supplementary Figure 4 (Orpinell et al.)

Supplementary Figure 4: Global histone deacetylation occurs at the onset of mitosis.

Interphasic and mitotic localization of H3 (K9, K14) and H4 (K5, K12, K16) acetylation histone marks in mouse NIH-3T3 cells. Cells were fixed and the nuclei of the dividing cells visualized by Hoechst staining. Cells were stained with anti-ac-H3 or anti-ac-H4 as indicated.

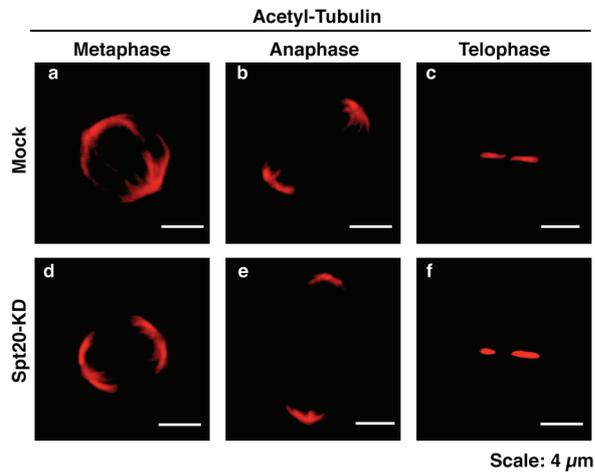


Supplementary Figure 5 (Orpinell et al.)

Supplementary Figure 5: The depletion of Ada2a and Ada3 subunits does not affect histone acetylation marks upon mitosis.

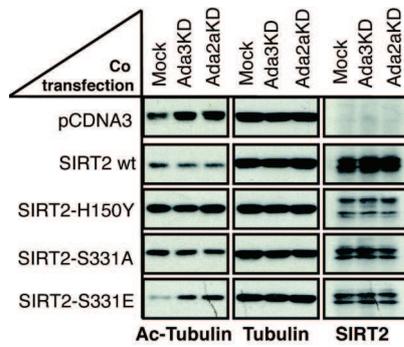
(A-B) 72 hours after siRNA transfection (control “mock” or against Ada2a, Ada3, as indicated) cells were fixed and the acetylation status of known ATAC histone substrates was visualized by indirect fluorescence along different mitotic stages (marked on the left). (A) H3 acetylation on Lysine 9 (left panel) or Lysine 14 (right panel), (B) H4 acetylation on Lysine 5 (left panel) or Lysine 12 (right panel).

(C) 72 hours after siRNA transfection (control “mock”, or against Ada2a or Ada3), whole cell extracts from mitotic cell populations were analysed by Western blot for several histone acetylation marks on H3 or H4 as indicated.



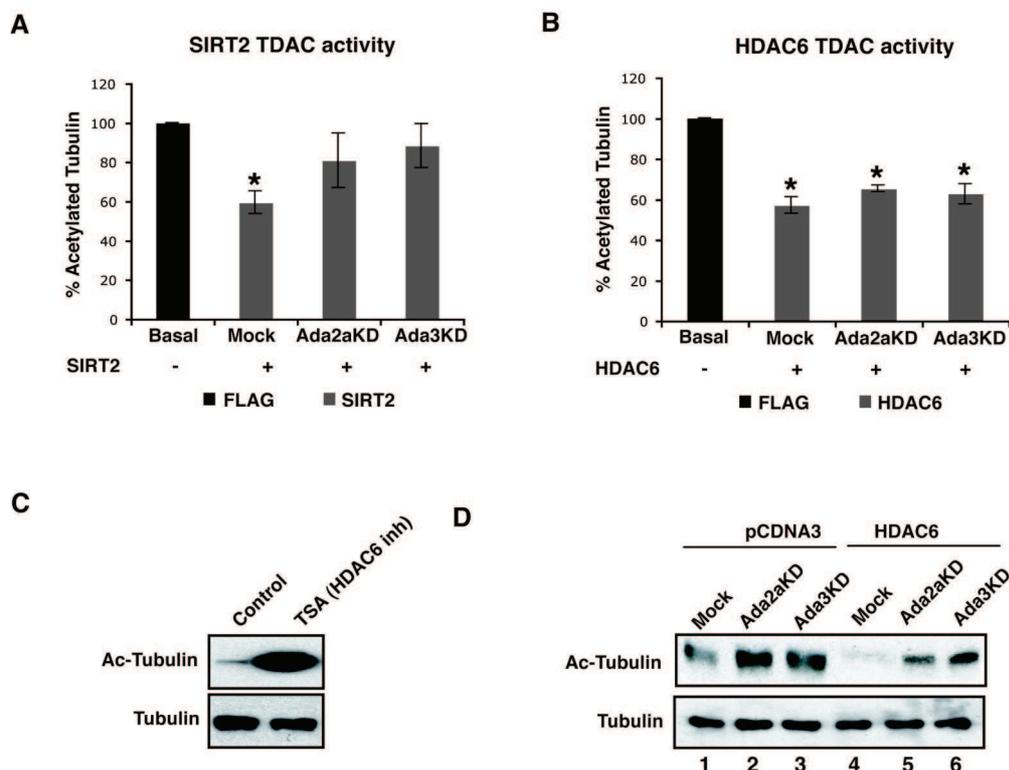
Supplementary Figure 6 (Orpinell et al.)

Supplementary Figure 6: Depletion of the SAGA subunit Spt20 does not affect Tubulin Acetylation levels. NIH-3T3 cells transfected with control (Mock), or Spt20 siRNA (Spt20-KD) were visualized by immunofluorescence along mitosis using anti-Acetyl- α -tubulin antibodies.



Supplementary Figure 7 (Orpinell et al.)

Supplementary Figure 7: SIRT2 mutants differentially interfere with the Ada2a/3 KD phenotype. WB analysis of WCE prepared from cells simultaneously transfected with an empty vector (pCDNA3) or expression vectors for SIRT2wt or SIRT2 point mutants (H150Y, S331A, S331E) (marked on the left), and DNA constructs expressing shRNAs against Ada3 (Ada3KD), against Ada2a (Ada2aAKD) or an empty vector (Mock) (marked on the top).



Supplementary Figure 8 (Orpinell et al.)

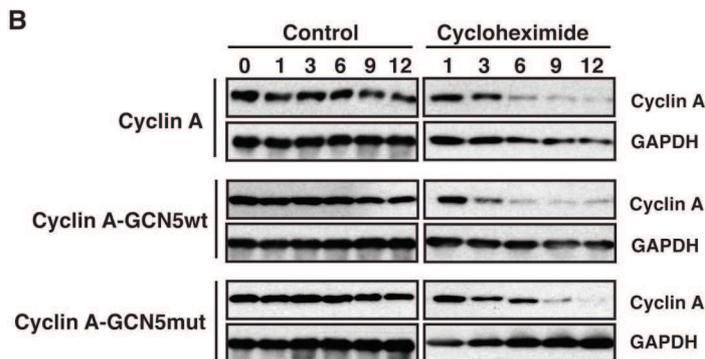
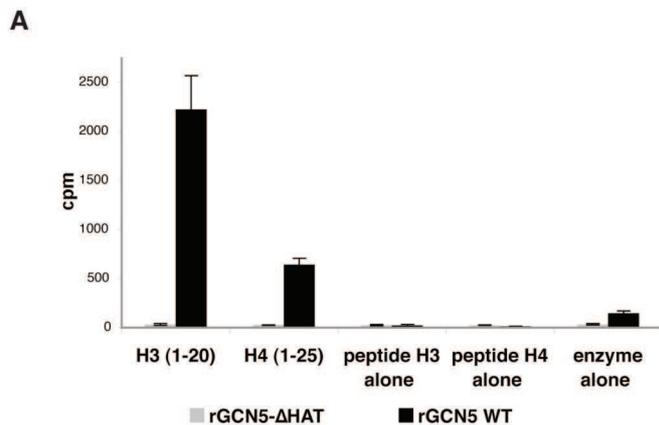
Supplementary Figure 8: Tubulin deacetylase activities are inhibited upon Ada2a/3 KD.

(A) 293T cells were co-transfected with FLAG or SIRT2-FLAG and shDNA constructs for Control (Mock), Ada2aKD or Ada3KD. Cellular lysates were harvested and immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody. The immunoprecipitated proteins were incubated with purified tubulin substrates, in the presence of NAD. The reaction products were analyzed by Western blotting with specific antisera for acetylated α -tubulin, tubulin, and FLAG and quantified by densitometry. Results are presented as percentage of acetylated tubulin vs. tubulin (mean \pm S.D. from 4 independent experiments, * $p < 0.05$).

(B) 293T cells were co-transfected with FLAG or HDAC6-FLAG and shDNA constructs for Control (Mock), Ada2aKD or Ada3KD. Cellular lysates were harvested and immunoprecipitated with antiserum for FLAG. Tubulin deacetylation activity was measured as on panel (A).

(C) 293T cells were treated with the HDAC6 inhibitor TSA for 16h (400 nM). Cellular lysates were analyzed by Western blotting with specific antisera for acetylated α -tubulin and tubulin.

(D) 293T cells were co-transfected with pCDNA3-FLAG or HDAC6-FLAG and shDNA constructs for Control (Mock), Ada2aKD or Ada3KD. Cellular lysates were analyzed by Western blotting with specific antisera for acetylated α -tubulin and tubulin.



Supplementary Figure 9 (Orpinell et al.)

Supplementary Figure 9: The ATAC complex regulates Cyclin A stability via acetylation.

(A) The HAT mutant Gcn5 enzyme possesses no detectable acetyltransferase activity. Wild type or HAT mutant flag-tagged Gcn5 was overexpressed in SF9 cells infected with the corresponding baculoviruses and immunopurified using M2 anti-flag affinity beads. Protein content of the samples was normalized by densitometry after western blot. Similar amounts of the WT or the mutant enzyme were used in peptide acetylation assay (see materials and methods) in parallel with the indicated control reactions. The WT enzyme efficiently acetylated both peptides showing a preference for the H3 peptide, and possessed a low auto-acetylation activity also. The HAT mutant enzyme remained inactive in all the reactions in agreement with data obtained with its mouse homologue (Bu et al., 2007)

(B) Gcn5 acetylation promotes Cyclin A degradation *in vivo*. 293T cells were co-transfected with FLAG-Cyclin A and FLAG-pCDNA3; FLAG-Cyclin A and FLAG-GCN5 wild type (GCN5wt) or Cyclin A and FLAG-GCN5 mutated in the HAT domain (GCN5mut). Transfected cells were left untreated or exposed to Cycloheximide for different time points

(as indicated). Cells were collected, WCEs prepared and analysed by western blot with the indicated antibodies.

E. Discussion et perspectives

Au laboratoire, pour l'étude de hATAC, nous nous intéressons particulièrement à son activité sur les histones. Or, ici le sujet a été d'étudier l'influence de l'acétylation d'une cible autre que les histones.

1. L'importance des sous-unités de hATAC

Nous savons que les protéines du complexe jouent un rôle important sur l'activité de l'enzyme GCN5 (voir Introduction et Partie 3). Ici en effet, les KD de ADA2a et ADA3, des sous-unités du module HAT entraîne des défauts dans la mitose. Ces problèmes ne sont en revanche pas observés dans le cas de KD de protéines de SAGA. Les sous-unités de hATAC sont donc cruciales pour une activité spécifique de GCN5 dans la mitose.

En outre, la localisation de hATAC au niveau du fuseau mitotique, et non hSAGA, confirme que les protéines spécifiques des complexes ont un impact sur la localisation de GCN5 et sa spécificité enzymatique.

2. Le paradoxe d'une AT entraînant une diminution d'acétylation

Il a été très intéressant de constater qu'en l'absence de hATAC, les niveaux d'acétylation de H4K16 et de l' α -tubuline augmentaient, alors que l'inverse aurait été plutôt attendu. En effet, hATAC a été mis en évidence comme acétylant préférentiellement les histones H3, mais a aussi une activité sur H4.

Il a fallu alors découvrir qu'en réalité les niveaux d'acétylation de H4K16 et l' α -tubuline sont en fait sous l'influence de l'activité de déacétylation de SIRT2. hATAC joue ainsi un rôle complètement nouveau en acétylant cette fois non pas la chromatine mais une protéine, la cycline A. Et cette acétylation participe de façon indirecte à l'activité HDAC de SIRT2. En résumé, l'acétylation de la cycline A par hATAC (et plus précisément par sa sous-unité GCN5) entraîne la dégradation de la cycline A. Cette dernière n'est donc plus présente pour former le complexe cycline A/cdk2. La protéine SIRT2 n'est alors plus phosphorylée et donc inactivée : elle va alors continuellement déacétyler la tubuline et H4K16, ce qui entraîne des défauts dans la mitose et le cycle cellulaire. L'acétylation d'une cible de type non histone par hATAC permet le contrôle positif d'une enzyme à activité HDAC.

3. Acétylation et dégradation ?

hATAC est donc capable d'acétyler d'autres substrats que les histones. Par ailleurs, l'activité d'acétylation de hATAC est plus précisément reliée ici à la dégradation d'une protéine.

Il a déjà été montré que l'acétylation peut être un signal pour la machinerie d'ubiquitination, entraînant la dégradation de la protéine (cf Introduction). Cependant, les processus, mettant ici en scène hATAC et la régulation de la stabilité protéique, ne sont pas compris en détail. En effet, il faudrait chercher à comprendre si l'acétylation des positions K54 et K68 est suffisante pour entraîner la dégradation de la cycline A ou si d'autres modifications sont nécessaires. Dans le cas du facteur de transcription GATA1 par exemple, selon la lysine acétylée cela entraîne soit l'activation de GATA1 pour la régulation de la transcription, ou au contraire sa dégradation par le protéasome. Mais, même si la protéine est acétylée sur la lysine correspondante, cela n'est pas suffisant pour entraîner sa dégradation. En effet, GATA1 doit aussi être phosphorylée en plus de l'acétylation de la protéine (Hernandez-Hernandez et al., 2006). Il serait intéressant de savoir si le même système de coopération acétylation-phosphorylation est mis en œuvre dans le cas de hATAC avec la cycline A.

Par ailleurs, l'enzyme étudiée ici est GCN5. Or, il a été montré que son homologue PCAF est capable d'acétyler la cycline A et que la diminution de PCAF dans la cellule a un effet encore plus drastique sur ce niveau d'acétylation de la cycline A que GCN5 (Mateo et al., 2009). De plus, les deux enzymes PCAF et GCN5 sont les enzymes spécifiques de l'acétylation de la cycline A, d'autres enzymes n'agissant pas dans ce processus (Mateo et al., 2009; Mateo et al., 2010). Nous avons vu que PCAF et GCN5 font partie de manière exhaustive du complexe hATAC (Nagy et al., 2010). Les deux types de complexe, soit avec GCN5 soit avec PCAF, jouent donc un rôle dans la régulation du cycle cellulaire.

En conclusion, hATAC n'a pas uniquement une activité d'acétylation sur les histones, mais peut également acétyler des protéines non-histones, impliquées dans d'autres fonctions cellulaires que la transcription. Ainsi, hATAC, en plus de jouer un rôle dans la régulation de la transcription, a aussi son importance dans la division cellulaire.

Conclusion

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence qu'il existe un second complexe contenant GCN5 chez l'homme : hATAC. J'ai pu déterminer la composition en sous-unités de ce complexe et montrer que, comme hSAGA, il acétyle préférentiellement l'histone H3 *in vitro* et *in vivo* (Nagy et al., 2010).

Concernant les catégories de gènes régulés par les complexes, nous avons pu démontrer que hATAC et hSAGA ont des rôles différents selon le type de signalisation. Ainsi, hSAGA est recruté spécifiquement au promoteur des gènes de réponse suite à un stress du réticulum endoplasmique (cf Partie 1). A contrario, hATAC est recruté sur les gènes de réponse immédiate lors d'un stress par traitement au TPA (cf Partie 2). En outre, hATAC et non hSAGA est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire en contrôlant la dégradation de la cycline A lors de la mitose (cf Partie 4).

D'autre part, mon autre objectif a été d'étudier la régulation allostérique de l'enzyme GCN5 selon son appartenance aux complexes hATAC ou hSAGA. Ainsi, j'ai étudié l'activité de l'enzyme au sein de modules HAT recombinants (GCN5-ADA2a/b-ADA3-SGF29) et des complexes endogènes. Nous avons pu démontrer que les sous-unités des modules agissent sur l'activité de l'enzyme sur des peptides et des octamères. Ainsi, SGF29 permet le recrutement sur la chromatine méthylée sur H3K4. De plus, alors que hATAC et hSAGA acétylent tous deux préférentiellement H3, ADA2a et ADA2b régulent différemment la spécificité d'action de GCN5. L'activité de l'enzyme au sein des modules rHAT ATAC et rHAT SAGA augmente sur les histones H3 par rapport à l'enzyme seule. Cependant, cette activité est plus importante lorsque GCN5 a pour partenaire ADA2b, alors que l'inverse est observé sur les histones H4 où GCN5 acétyle mieux ce substrat en présence d'ADA2a (cf Partie 3).

En résumé, j'ai ainsi pu apporter de nouvelles données sur l'activité de GCN5 au sein des complexes hATAC et hSAGA chez l'homme sur différents types de substrats. Pour la suite, la compréhension de l'acétylation des nucléosomes demande de plus amples investigations. Afin de mieux comprendre comment GCN5 est régulée par ses partenaires et plus précisément comment l'incorporation de l'enzyme au sein d'un environnement de type ATAC ou de type SAGA peut être important pour la cellule, je pense que des données structurales sont à apporter. En effet, la structure des complexes dans leur ensemble demande de nouvelles investigations mais surtout l'étude des repliements protéiques au sein des modules HAT pourrait expliquer l'influence d'ADA2a ou ADA2b sur GCN5 et compléter les données fonctionnelles.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

A. Caractérisation d'anticorps polyclonaux

1. Synthèse d'un peptide/épitope antigénique

Afin de générer des anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt, des épitopes potentiels (antigènes) ont été définis grâce au programme Antigenic du site Emboss (European Molecular Biology Open Software Suite, <http://www.bioinfo.hku.hk/EMBOSS>). Il s'agit de séquences d'une vingtaine d'acides aminés qui présentent une forte probabilité de conduire à une réaction immunitaire. Pour chaque protéine d'intérêt, des séquences de protéines homologues ont été collectées afin de réaliser des alignements multiples. Il a été ainsi possible de déterminer si la séquence obtenue par Antigenic se trouve dans une région conservée de la protéine. Plus la conservation est forte, plus la chance que la séquence corresponde à un domaine fonctionnel est importante. La séquence la moins conservée est donc choisie, car elle est spécifique de la protéine d'intérêt et l'épitope est probablement accessible pour la reconnaissance par l'anticorps.

La synthèse du peptide est basée sur la technique de synthèse peptidique en phase solide. Le groupement amine des acides aminés est protégé par la liaison d'un groupement tBOC (t-butyloxycarbone). Un acide aminé est fixé par son groupement carboxyle sur une bille de polystyrène. Le groupement tBOC de cet acide aminé est retiré par traitement avec de l'acide trifluoroacétique. Un second acide aminé peut alors former une liaison peptidique par réaction de son groupe carboxyle sur le groupement amine du premier acide aminé. Ce processus est répété jusqu'à l'obtention du peptide complet. Enfin, le peptide est libéré de la bille de polystyrène par traitement avec de l'acide fluorhydrique à -2 °C. L'institut possède deux synthétiseurs automatiques Applied Biosystems 431A et 433A pour réaliser cette manipulation.

Des cystéines sont ensuite ajoutées à l'extrémité C ou N-terminale du peptide. Ces résidus vont permettre de lier covalamment le peptide (formation de ponts disulfures) à l'ovalbumine, une protéine non immunogène qui va servir de transporteur après l'injection du lapin. Ces cystéines vont également permettre la fixation du peptide sur une colonne lors de la purification de l'anticorps.

Tableau 8 : Liste des peptides produits pour ATAC et SAGA.

Protéine	Peptides	Séquence (aa)
hGCN5	PE286	CKCNGWKNPKPPTAP
hGCN5	PI229	IWESGFTMPPSEGTQLVPC
hGCN5	PI230	MAEPSQAPTPAPAAQPRPLC
mPCAF	PJ5	MAEAGGAGSPALPPAPPHG
mADA3	PI228	LEGKTGHGPGGRPKSKN
hSGF29	PH300	HATNKYEVDIDEEGKERHC
hADA2a	PD120	MDRLGSFSNDPSDKPPC
hATAC2	PI263	DIDSEDTDSNTSLQTRAC
hATAC2	PI264	IRSHLHRSDPHWTPEPDC
hMBIP	PJ41	GKRRRKVQPPQQNYSLAELDC
hMBIP	PJ42	TRPEGIPGSGHKPNSMLRC
hYEATS2	PJ39	KLEDLQQFQKREPENEEEC
hYEATS2	PJ40	LSQHNDFLSDKDNNNSMC
hZZZ3	PI129	CPTRGSPTKNSSPYRENGQF
hZZZ3	PI130	CGNNNGRTTDLKQQSTRESW
hADA2b	PI1	TIPNRVTDHTCPSGGC
hATXN7	P35	CTIPGAQGLMNSSLLHQPKAR
hATXN7	P36	KEKLQLRGNTRPMHPIQQSRC
hATXN7	PE21	MSERAADDVRGEPRRAA
hATXN7L3	PH155	CKKKPKPPAPPTPSIYDDIN
hATXN7L3	PH166	CLQWDGSSDLSPSDSGSSKTS
hENY2	PE223	CNQKLIETGERERLKE
hENY2	PI102	CKEVIKEKGLEHVTVDD
hSPT3	PE33	STATSSSRSTGKSISFAC
hSPT7L	PG28	QSPDDSDSSYGSHSTDSLMLC
hSTP20	PI3	CLNRQQDLSHCPPPPQL
hSTP20	PI5	CRQRPPKRYLSSGRKSVF
hTAF9	PG226	LQKKASTSAGRITVPC
hTAF10	PC143	GGPGAGAAAGGTG
hTAF10	PC249	MSCSGSGADPEAAPASAASAC
hTAF10	PG158	ASGSSRSKSKDRKYTLC
hTRRAP	PG83	CVKVNPEREDSETRTHSIIPRGS
hTRRAP	PG84	DQQPDSMDPNSSGEGVNSVC
hUSP22	PH219	VSRPEPEGEAMDAEC

2. Obtention de sérums de lapin par injection de peptides

Les injections sont réalisées sur des lapins de souche Néo-Zélandais Blanc par le service de production d'anticorps de l'Institut. Dans un premier temps, les lapins sont anesthésiés par voie intramusculaire et du sang est prélevé à l'artère médiane de l'oreille. Ce sang contient un sérum que l'on nomme pré-immun, ce sérum servira de témoin négatif pour les tests de sérums et d'anticorps. Les peptides ont été couplés à de l'ovalbumine afin d'induire une réaction immunitaire. Ils sont ensuite injectés par voie intradermique en 40 à 60 points. Un mois après l'injection, 30 ml de sang sont prélevés chaque semaine pendant un mois. Une amplification de la réaction a lieu par injection sous-cutanée. Douze jours plus tard, le lapin est sacrifié et 70 à 80 ml de sang sont prélevés par voie intracardiaque. Le sang est à chaque fois centrifugé 3000 rpm pendant 20 minutes et le sérum est stocké à -20 °C. Les sérums contenant l'anticorps sont ensuite analysés par western blot.

3. Purification de l'anticorps par chromatographie d'affinité

Les anticorps fonctionnels et spécifiques contenus dans le sérum brut sont purifiés par chromatographie d'affinité en utilisant une colonne SulfoLink[®] Coupling Gel. La colonne est équilibrée avec un tampon Tris 50 mM, EDTA-Na 5 mM, pH 8,5. Puis, le peptide synthétisé en section 1 est fixé de façon covalente sur la colonne. Il s'agit d'une réaction du groupement thiol de la cystéine greffé sur le peptide avec le groupe iodoacétyle de la colonne. Les sites aspécifiques sont bloqués par une solution cystéine 50 mM, Tris 50 mM, EDTA-Na 5 mM, pH 8,5. La colonne est ensuite lavée avec du NaCl 1 M, et le sérum est chargé trois fois. Enfin, la colonne est lavée avec du PBS et les anticorps retenus par le peptide sont élués grâce à une solution de glycine à 0,1 M pH 2,5 dans des tubes contenant au préalable du Tris 2M pH 8,8. Une partie des fractions d'anticorps purifiés est ensuite déposée sur un gel d'électrophorèse et analysée par coloration au Bleu de Coomassie. La fraction possédant le plus d'anticorps est dialysée contre du PBS. La fraction contenant les anticorps est ainsi mise dans un tube possédant une membrane de dialyse pendant plusieurs heures. Seuls les sels et petites molécules de moins de 8 kDa peuvent passer à travers la membrane. L'échantillon est aliquoté et du glycérol est ajouté afin de pouvoir conserver l'anticorps à -20 °C.

Tableau 9 : Anticorps utilisés au laboratoire.

Wb : western blot, ip : immunoprécipitation, if : immunofluorescence, chip : immunoprécipitation de la chromatine.

Protéine	Anticorps (peptides) applications
hGCN5	5GC2A6 (PI230) <i>wb if</i> , 4GC1G8 (PI229) <i>if</i> , 2676 (PI230) <i>wb ip</i> , 2C11 (PE286) <i>wb</i>
hPCAF	sc-13124 <i>wb</i> , 2760 (PJ5) <i>wb ip if</i>
hADA3	2678 (PI228) <i>wb ip if chip</i>
SGF29	2461 (PH300) <i>wb chip</i>
hADA2a	2AD2A1 (PD120) <i>ip</i>
hATAC2	2734 (PI264) <i>wb ip</i> , 2733 (PI264) <i>if</i>
MBIP	2786 (PJ42) <i>wb ip</i>
hNC2beta	Oelgeschläger <i>wb</i>
WDR5	ab22512 <i>wb</i>
YEATS2	2783 (PJ40) <i>wb ip if</i>
ZZZ3	2616 (PI230) <i>wb ip chip</i>
ADA2b	2459 (PI1) <i>wb</i>
ATXN7	ataxin7-1C1 2A12 2A10 <i>if</i> , 1597 (P35) 1261 (PE21) 1599 (P36) <i>wb ip if</i>
ATXN7L3	ataxin7L3-2B1 (PH166) <i>wb</i> , 2D7 (PH155) <i>ip chip</i> , 2325 (PH155) <i>wb ip</i> , 2326 (PH166) <i>wb chip</i>
SPT3	SPT3-1SP-2C10 (PE33) <i>ip</i> , 2923 2924 <i>wb ip</i>
SPT7L	hSPT7like-3SP-1H6 (PG28) <i>wb ip</i>
STP20	2487 (PI5) <i>ip wb</i> , 4112 <i>wb chip</i> , 3006 <i>wb ip chip</i>
TAF9	TAF9-1H1 (PG226) <i>wb</i> , 2255 (PG226) <i>wb</i>
TAF10	TAF10-1H8 (PC249) <i>ip</i> , TAF10-2B11 (PC144) <i>wb if</i>
TAF12	TAF12-22TA <i>wb</i>
TRRAP	TRRAP-1D5 (PG84) <i>wb</i> , TRRAP-1B3 (PG84) <i>ip chip</i>
USP22	2391 (PH219) <i>wb chip</i>

B. Expression de protéines

1. Préparation des extraits nucléaires de cellules HeLa

L'ensemble de la manipulation est réalisée à 4 °C, afin d'éviter la dégradation des protéines d'intérêt par les protéases de l'extrait.

Les cellules humaines HeLa sont centrifugées 10 minutes à 3000 g, puis resuspendues et lavées dans du PBS. Après une nouvelle centrifugation, le culot de cellules est resuspendu dans 4 X PCV (Packed Cell Volume) de solution 50 mM Tris pH 7,9, 1 mM EDTA-Na, 1 mM DTT et 0,5 mM PMSF (Phenyl Methyl SulFonide) durant 30 minutes. Cette solution

fragilise la membrane des cellules. Celle-ci est ensuite cassée mécaniquement par des allers-retours successifs dans un broyeur de tissus (dounce) avec un piston B. Le geste est répété au maximum 10 fois afin de ne pas casser les noyaux des cellules. Après une centrifugation à 3300 rpm durant 10 minutes, le culot contenant les noyaux est resuspendu dans 4 X PCV de solution 50 mM Tris pH 7,9, 0,5 mM EDTA-Na, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 25 % glycérol et 500 mM NaCl. La membrane des noyaux est cassée avec le dounce B par 20 allers-retours. Les protéines sont alors libérées. Après une incubation de 30 minutes, la solution est centrifugée 15000 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant contenant les protéines est passé à travers une gaze hydrophile. Les protéines sont ensuite précipitées avec 0,03 g de sulfate d'ammonium par ml de surnageant (V) et agitées 30 minutes. Après une centrifugation à 30000 rpm durant 20 minutes, le culot correspondant aux protéines est resuspendu dans 1/5 de volume V de tampon de dialyse (50 mM Tris pH 7,9, 20 % glycérol, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0,5 mM DTT et 0,5 mM PMSF). En parallèle, un boudin de dialyse (Dialysis Tubling Vislling) a préalablement été bouilli 30 minutes dans une solution de 1 mM EDTA-Na. L'EDTA complexe les cations de la membrane, permettant ainsi l'ouverture des pores. La dialyse a lieu durant 12 heures dans 4 l de tampon de dialyse. Enfin, l'extrait est centrifugé 15 minutes à 9000 rpm pour éliminer les matières insolubles, puis aliquoté et conservé à -80 °C.

2. Surexpression de protéines dans des cellules d'insectes

Les vecteurs codant pour les protéines d'intérêt à surexprimer présentent un promoteur fort polyhédrine et sont co-transfectés dans des cellules d'insectes SF9 avec un plasmide BaculoGold. Au sein de ces cellules, le vecteur d'intérêt et l'ADN viral vont recombiner pour donner des baculovirus qui seront amplifiés, purifiés et conservés à 4 °C. Lorsque la protéine devra être produite, les cellules d'insecte seront infectées avec ces baculovirus. Ces étapes sont réalisées par le service de baculovirus de l'Institut.

Après infection, les cellules sont incubées à 27 °C durant 48 heures. Les cellules sont centrifugées à 2000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C. Le culot est lavé au PBS puis resuspendu dans un tampon d'extraction (400 mM KCl, 20 mM TrisHCl pH 7,5, 2 mM DTT, 20 % glycérol et 1 X inhibiteur de protéases). Pour une flasque T175, nous utilisons 1 ml de tampon. L'échantillon est ensuite congelé dans l'azote liquide et décongelé et ce 3 à 4 fois avant d'être centrifugé 10 minutes à 13000 rpm à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines est conservé à -80 °C.

Tableau 10 : Vecteurs pour l'obtention de protéines surexprimées en cellules d'insecte disponibles.

Protéine	Virus disponible pour surexpression en cellule d'insecte
hGCN5	Flag-GCN5 (pNZ7)
hPCAF	Flag-PCAF (N. Rochel)
mADA3	Flag-ADA3 (pNZ5)
hSGF29	His-SGF29 (pNZ27)
hADA2a	Flag-ADA2a (pNZ2), ADA2a (pNZ4)
hATAC2	HA-ATAC2 (pNZ51)
hWDR5	HA-WDR5 (pVL1393-HA-WDR5)
hADA1	Flag-ADA1 (pNZ10)
hADA2b	Flag-ADA2b (pFast-Bac ADA2b)
hATXN7	Flag-ATXN7 (pVL7NFL)
hATXN7L3	Flag-ATXN7L3 (pVL Flag-ATXN7L3)
hENY2	His-ENY2 (pAcHIS ENY2), Strept-ENY2 (pBacPAK8 Strept-ENY2)
hSPT3	Flag-SPT3 (pNZ8)
hSPT7L	Flag-SPT7L (pSK SPT7L Flag)
hSTP20	SPT20/p38IP (pNZ13)
hTAF6L	His-TAF6L (pNZ23)
hTAF5L	Flag-TAF5L (pNZ26)
hTAF9	TAF9 (pVL TAF31)
hTAF10	TAF10 (pVL TAF30 kz)
hTAF12	TAF12 (TAF20)
hUSP22	Flag-USP22 (pVLFlagUSP22), HA-USP22 (pVL HA-USP22)
GCN5 ADA2a ADA3 SGF29	His-GCN5 ADA2a ADA3 SGF29 Multibac (ATAC HAT module)
GCN5 ADA2a ADA3 SGF29	His-GCN5 ADA2b ADA3 SGF29 Multibac (SAGA HAT module)

Au laboratoire, nous disposons aussi de plasmides gateway pour co-expression par concaténation, obtenus par la plateforme de Biologie Moléculaire de l'Institut (Tableau 11). Ces vecteurs ne sont pas encore utilisables pour une infection, une transformation avec les souches contenant le bacmide sont encore nécessaires.

Tableau 11 : Plasmides gateway disponibles pour les sous-unités d'ATAC.

Protéine	Plasmides pFCGW disponibles
hATAC2	HA-hATAC2 (C0248)
hMBIP	hMBIP (C0165), cMyc-hMBIP (C0166)
hNC2 β	hNC2 β (C0169), GST-NC2 β (C0170)
hWDR5	Flag-hWDR5 (C0251)
hYEATS2	hYEATS2 (C0173), Flag-hYEATS2 (C0174)
hZZZ3	hZZZ3 (C0177)
hYEATS2 hNC2 β	Flag-hYEATS2 GST-hNC2 β (C0244)
hZZZ3 hMBIP	hZZZ3 cMyc-hMBIP (C0245)

C. Immunoprécipitation

1. Immunoprécipitation de protéines

L'expérience d'immunoprécipitation (IP) permet de mettre en évidence l'existence d'interactions spécifiques entre deux protéines. Tout d'abord, les anticorps purifiés sont fixés sur des billes de sépharose couplées à la protéine A pour les anticorps polyclonaux ou à la protéine G pour les monoclonaux. Cette protéine interagit avec le fragment constant de l'anticorps ; celui-ci est alors retenu sur les billes. 5 μ g d'anticorps, dans 500 μ l de PBS, sont ainsi incubés avec 50 μ l de billes pendant une heure à température ambiante. Après deux lavages avec du tampon IP500 (500 mM KCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,9, 5 mM MgCl₂, 0,3 mM DTT, 10 % glycérol, 0,1 % NP40, 1 X inhibiteur de protéases complète du fournisseur Roche), et deux lavages avec du tampon IP100 (100 mM KCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,9, 5 mM MgCl₂, 0,3 mM DTT, 10 % glycérol, 0,1 % NP40, 1X inhibiteur de protéases), les billes couplées à l'anticorps sont prêtes à être utilisées.

En parallèle à la préparation des anticorps fixés sur les billes, 500 μ l d'extraits nucléaires sont incubés avec 50 μ l de billes, afin d'éliminer les interactions aspécifiques avec la résine (preclearing). Après ces étapes de préparation et preclearing, l'extrait nucléaire est incubé avec des anticorps spécifiques fixés sur les billes pendant plusieurs heures à 4 °C. Les billes sont ensuite à nouveau lavées deux fois avec le tampon IP500, puis avec le tampon IP100, pour éliminer les protéines non spécifiques collées aux résines. Puis, les protéines sont

chargées sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE avec la solution de bleu et analysées par western blot.

Notons qu'il est possible de récupérer les protéines sous forme détachée de la résine. Pour cela, 1 mg/ml de peptide synthétisé en section A.1 sont ajoutés aux billes. Cela va conduire à une compétition entre les peptides et les protéines pour les anticorps fixés aux billes. Les protéines sont libérées dans le tampon. L'échantillon est centrifugé et le surnageant contenant les protéines libres est récupéré puis analysé par western blot.

2. Immunoprécipitation de la chromatine

L'Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) permet d'analyser les séquences d'ADN sur lesquelles se seront fixées les protéines d'intérêt.

Pour cela, les cellules HeLA sont mises à pousser jusqu'à atteindre 90 % de confluence. Elles sont alors lavées avec du PBS froid et incubées 10 minutes avec 1 % de formaldéhyde à température ambiante. La réaction est stoppée avec 0,125 M de glycine, les cellules sont lavées au PBS contenant du 0,5 mM de PMSF, puis récupérées au râteau et resuspendues dans une solution (25 mM HEPES pH 7,8, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,1 % NP-40, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0,5 mM PMSF et 1 X inhibiteur de protéases) afin de fragiliser les cellules-ci. Elles sont ensuite cassées mécaniquement par des allers-retours successifs dans un broyeur de tissus (dounce) avec un piston B. La fraction nucléaire est alors resuspendue dans un tampon de sonication (50 mM HEPES pH 7,8, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % Na-deoxycholate, 0,5 % SDS, 0,5 mM PMSF et 1 X inhibiteur de protéases).

La chromatine est ensuite soniquée grâce à un Bioruptor de la compagnie Diagenode jusqu'à obtenir des fragments de 200 à 500 paires de base (3x10 min 10 sec on 20 sec off). Après centrifugation pour éliminer les débris cellulaires, le surnageant est dilué de manière à avoir une concentration finale en SDS de 0,1 %, comprenant du sperme de saumon soniqué (20 µg/ml) et BSA (Bovine Serum Albumin, 1 mg/ml). Ce tampon est aussi utilisé pour laver les billes (protéines G pour des anticorps monoclonaux, A pour polyclonaux).

La chromatine est incubée avec les billes 1 heure à 4 °C sous rotation afin d'éliminer les interactions non spécifiques avec les billes (preclearing). La chromatine ainsi nettoyée est ensuite incubée avec l'anticorps pendant plusieurs heures à 4 °C. L'anticorps est fixé sur les billes en ajoutant ces dernières pour 2 heures sous rotation à 4 °C. Des lavages successifs à 4 °C sont effectués selon : 2 x 10 min dans le tampon 0,1 % SDS, 2 x 10 min dans un tampon A

(50 mM HEPES pH 7,8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0,1 % Nadeoxycholate, 0,1 % SDS, 0,5 mM PMSF et 1 X inhibiteur de protéases), 2 x 10 min dans un tampon B (20 mM HEPES pH 7,8, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0,5 % NP-40, 0,5 % Nadeoxycholate, 0,5 mM PMSF et 1 X inhibiteur de protéases) puis 2 x 10 min dans un tampon Tris-EDTA (10 mM Tris pH 7,5 et 1 mM EDTA). La chromatine liée est alors éluée grâce à un tampon d'éluion (50 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA et 1 % SDS) à 65 °C en vortexant de temps en temps. Il s'en suit un traitement à la RNase A (5 µg/ml) à 200 mM NaCl durant plusieurs heures à 65 °C puis la protéinase K est ajoutée pour 2 heures.

L'ADN est enfin purifié par extraction phénol-chloroforme (voir section E.2), précipité à l'éthanol et analysé par qPCR en utilisant les kits Sybrgreen des compagnies Roche ou Qiagen au LightCycler480.

D. Analyse des protéines sur gel

1. Electrophorèse SDS-Page

Des protéines sont dénaturées à 100 °C pendant 5 minutes dans une solution de bleu de chargement (1M Tris-HCl pH 6,8, 30 % glycérol, 4 % SDS, 0,1 M DTT, bleu de Bromophénol) puis déposées sur un gel d'électrophorèse SDS-Page (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Les molécules sont alors chargées négativement et vont migrer en fonction de leur poids moléculaire grâce à l'application d'un champ électrique.

Le gel de polyacrylamide comprend deux parties : un gel de concentration des protéines (5 % polyacrylamide p/v pH 6,8) et un gel de séparation des protéines (8 à 20 % polyacrylamide p/v pH 8,8). Le pourcentage d'acrylamide du gel, c'est-à-dire le taux de réticulation du gel, est déterminé en fonction du poids de la protéine à mettre en évidence. La migration a lieu dans un tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM glycine, 1 % SDS) sous 15 mA pour le gel de concentration puis 30 mA pour le gel de séparation jusqu'à la sortie du bleu du gel.

2. Western blot

Pour un western blot, les protéines séparées sur le gel d'électrophorèse sont transférées sur une membrane de nitrocellulose, dans un tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM

glycine) grâce à un champ électrique de 150 V durant 45 minutes. Afin de bloquer les interactions aspécifiques, la membrane est saturée avec du lait (5 % dans du PBS, 2 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 anhydre) pendant une heure à température ambiante. Puis la membrane est incubée plusieurs heures à 4 °C dans les différents sérums dilués dans du lait (0,5 % lait dans PBS). La membrane est ensuite lavée trois fois dix minutes avec une solution de PBS 0,05 % Tween-20. Afin de visualiser la fixation des anticorps primaires, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire contre les anticorps de lapin couplé à la peroxydase dilué 10000 X durant une heure. Une série de trois lavages PBS 0,05 % Tween-20 est à nouveau réalisée et la membrane est mise en contact avec un produit de révélation. La révélation se fait grâce à une réaction chimio-luminescente (oxydation du luminol par la peroxydase) ; le signal est détecté par autoradiographie sur un film KODAK BIOMAX-XAR.

3. Coloration au Bleu de Coomassie

Le Bleu de Coomassie permet d'analyser les quantités de protéines sur gel après une coloration. Cette dernière est en effet proportionnelle à la quantité de protéine et permet de visualiser un minimum de 100 ng de protéines par bande.

Après la migration du gel (voir section 1), celui-ci est incubé avec une solution de bleu de coomassie (0,25 g de Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 pour 100 ml de solution 10 % acide acétique, 50 % éthanol, 40 % H_2O) pendant 30 minutes. Le CBB va se fixer sur les acides aminés basiques et aromatiques. Puis le gel est décoloré grâce à une solution de décoloration (10 % acide acétique, 50 % éthanol, 40 % H_2O) pendant plusieurs heures.

4. Gel à l'argent

En compromis à la coloration des protéines sur gel par CBB, il est possible d'effectuer une coloration à l'argent qui permet de visualiser 0,25 ng de protéines par bande.

Les gels à l'argent sont effectués en utilisant le kit de Thermo Scientific en prenant garde à éviter des contaminations par la kératine (celle-ci étant fortement détectée à l'argent). De même, l'eau milliQ est utilisée pour les lavages et les tampons.

Brièvement, le gel est tout d'abord lavé à l'eau, dans une solution 30 % éthanol, 10 % acide acétique, puis 10 % éthanol et à nouveau à l'eau, avant d'être sensibilisé dans une

solution de thiosulfate de sodium. Le gel est ensuite incubé dans une solution comprenant du nitrate d'argent et du formaldéhyde. L'argent est ensuite révélé par une solution de carbonate de sodium et de formaldéhyde pendant 2 à 3 minutes. La réaction est stoppée par 5 % d'acide acétique.

E. ADN et ARN

1. Préparation de l'ADN plasmidique

a. Obtention de cellules compétentes

Une colonie de cellules *Escherichia Coli*, souche DH5 α ou BL21, est ensemencée dans du milieu LB (Luria Bertani) (1 % tryptone, 0,5 % extrait de levure, 1 % NaCl, pH 7,0) jusqu'à atteindre une densité optique de 0,2 à une longueur d'onde de 600 nm : les bactéries atteignent la phase exponentielle de croissance. Les cellules sont ensuite centrifugées à 4000 g pendant dix minutes. Le culot est resuspendu dans une solution de CaCl₂ à 0,1 M froid et incubé une heure à 4 °C, ce qui permet de perméabiliser les membranes. Les cellules sont à nouveau centrifugées à 4000 g pendant dix minutes, puis le culot est resuspendu dans 1/20 du volume de CaCl₂ et 33 % de glycérol et est conservé à -80 °C en aliquots.

b. Transformation de cellules compétentes

Les cellules sont décongelées à 4 °C, puis mises en contact avec 1 μ g maximum de plasmide pendant 30 minutes. Celles-ci subissent ensuite un choc thermique à 42 °C durant 3 minutes afin de permettre l'entrée de l'ADN. La paroi est régénérée à 4 °C durant 10 minutes, puis les cellules se développent à 37 °C dans du milieu LB sans antibiotique durant une heure. Enfin, la suspension est étalée sur des boîtes LB-Agar contenant 100 μ g/ml d'ampicilline. Seules les bactéries ayant incorporé le plasmide contenant le gène de résistance à l'ampicilline peuvent pousser. Les boîtes sont ensuite placées à 37 °C pendant 12 heures. Une colonie est alors ensemencée dans 300 ml de milieu LB, pendant plusieurs heures, afin d'amplifier l'ADN plasmidique.

c. Extraction de l'ADN plasmidique

Le protocole utilisé a été mis au point par MACHEREY-NAGEL. Les cellules d'*E.Coli* sont récupérées par centrifugation 5000 g pendant 10 minutes à 4 °C, puis resuspendues. L'ADN et les protéines sont ensuite dénaturés et l'ARN dégradé par un traitement avec un tampon sodium hydroxide/SDS contenant de la RNase A, fourni par le fabricant. Les protéines, l'ADN chromosomique et les débris cellulaires sont précipités par un tampon contenant de l'acétate de potassium et sont retenus par un filtre. L'ADN plasmidique interagit avec une colonne échangeuse d'anions Nucleobond® qui retient les acides nucléiques. L'élution est réalisée à pH alcalin. Puis l'ADN est précipité à l'isopropanol, centrifugé à 15000 g pendant 30 minutes à 4 °C. Le culot d'ADN est repris dans de l'eau.

2. Analyse des niveaux d'ARN

Les ARN sont purifiés en utilisant du Trizol (Invitrogen), selon le protocole du fournisseur : après avoir cassé les cellules grâce au Trizol, du chloroforme (1/5^{ème} du volume) est ajouté à l'échantillon. Celui-ci est centrifugé 12000g 15 minutes à 4 °C et la fraction aqueuse contenant les ARN est gardée. Après précipitation de l'ARN à l'aide d'isopropanol 10 minutes à température ambiante, le culot est lavé avec 75 % d'éthanol et repris dans de l'eau et conservé à -80 °C.

100 ng d'ARN est ensuite utilisé pour être réversiblement transcrit en utilisant la transcriptase inverse MMLV (20 unités) en présence de 100 ng d'héxamères : l'ARN est incubé avec les hexamères 10 minutes à 70 °C, puis avec l'enzyme, un mix des dNTP (10 mM chacun), 10 mM DTT et le tampon de l'enzyme à 20 °C 10 minutes, 42 °C 50 minutes, 94 °C 10 minutes). Les échantillons sont enfin analysés par qPCR en utilisant le LightCycler 480.

3. Transfection d'ARNsi

Les ARNsi ont été produits par Dharmacon et transfectés dans des cellules HeLa en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) et du milieu OptiMEM, selon les recommandations du fournisseur. L'ARN et la lipofectamine sont dilués chacun à part dans de

l'OptiMEM pendant 5 minutes, avant d'être réunis et laissés 20 minutes à température ambiante. La solution est alors ajoutée aux cellules confluentes à 50 %. Ces dernières, préalablement lavées au PBS, sont incubées dans de l'OptiMEM à 37 °C. Après 6 heures environ, l'OptiMEM est remplacé par le milieu pour cellules HeLa (1 g/l DMEM, 5 % FCS et antibiotique). Les cellules sont collectées après 24 à 48 heures d'incubation à 37 °C.

4. Extraction phénol-chloroforme

Cette extraction permet de purifier l'ADN et l'ARN à partir d'un extrait contaminé par des protéines. ½ volume de phénol et ½ volume de chloroforme sont ajoutés à l'échantillon puis celui-ci est centrifugé 5 minutes à 13000 rpm. La phase aqueuse contenant l'ADN et l'ARN est récupérée et 1 volume de chloroforme y est ajouté. Après centrifugation, la phase aqueuse est à nouveau récupérée et 3 volumes d'éthanol 100 % et 1/10 d'acétate d'ammonium à 3 M pH 5 sont ajoutés. Puis l'échantillon est mis à incuber à -80 °C pour précipitation. Après centrifugation à 13000 rpm, le culot est lavé à l'éthanol 70 % puis resuspendu dans de l'eau.

F. Tests d'activité d'acétylation

1. Préparation des substrats

a. Les peptides

Les substrats peuvent être des peptides mimant les queues d'histones ou une partie de protéine d'intérêt (Tableau 12). Ils sont produits selon le protocole en section A.

Tableau 12 : Liste des peptides mimant les queues d'histones.

Histone	Peptide	Position (aa)	Séquence
H3	PI139	1 - 20	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLC
H3	PJ163	1 - 8	ARTKQTARK
H3	PJ64	5 - 20	QTARKSTGGKAPRKQLC
H3	PI123	21 - 34	LATKAARKSAPATGGC
H3	PJ165	21 - 40	ATKAARKSAPATGGVKKPHR
H3	PJ164	25 - 40	ARKSAPATGGVKKPHR
H3K9ac	PH270	1 - 20	MARTKQTARK ^{ac} STGGKAPRKQ
H3K14ac	PH147	6 - 17	TARKSTGGK ^{ac} APRC
H3K18ac	PJ291	1 - 20	ARTKQTARKSTGGKAPRK ^{ac} QL
H3K4me3	PJ26	1 - 20	ARTK ^{me3} QTARKSTGGKAPRKQL
H3K9me2	PI141	1 - 20	ARTKQTARK ^{me2} STGGKAPRKQLC
H3K36me2	PH83	27 - 40	KSAPATGGVK ^{me2} KPHRC
H3K37me2	PH84	27 - 40	KSAPATGGVKK ^{me2} PHRC
H3S10p	PI143	1 - 20	ARTKQTARK ^{Sp} TGGKAPRKQLC
H3K9me2S10p	PH139	6 - 17	TARK ^{me2Sp} TGGKAPRC
H3K9R	PJ65	5 - 20	QTARRSTGGKAPRKQLC
H3K14R	PJ66	5 - 20	QTARKSTGGRAPRKQLC
H3K18R	PJ67	5 - 20	QTARKSTGGKAPRRQLC
H4	PJ68	1 - 19	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRC
H4	PJ104	1 - 25	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRDNC
H4K5R	PJ69	1 - 19	SGRGRGGKGLGKGGAKRHRC
H4K8R	PJ70	1 - 19	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRC
H4K12R	PJ71	1 - 19	SGRGKGGKGLGRGGAKRHRC
H4K16R	PJ72	1 - 19	SGRGKGGKGLGKGGARRHRC

b. Les protéines d'histones

Afin d'étudier l'activité des enzymes sur des substrats de type histone, ces derniers sont purifiés de manière à obtenir des dimères d'histones, des octamères mais également des nucléosomes.

i. Préparation de dimères H2A/H2B, de tétramères H3/H4 et d'octamères natifs

Les histones sont purifiées par colonne d'hydroxyapatite à partir de cellules HeLa et selon le protocole Gavin R. Schnitzler (Schnitzler, 2001). Toutes les étapes se font à 4 °C avec des tampons déjà froids.

Le culot de cellules HeLa est resuspendu dans du PBS 1 X, puis dans du tampon de lyse (20 mM HEPES pH 7,5, 0,25 M sucrose, 3 mM MgCl₂, 0,5 % Nonidet P-40, 1 mM DTT, 0,4 mM PMSF et 1 X inhibiteur de protéases). Les cellules sont cassées grâce à l'action mécanique d'un broyeur (douce, piston B). Il est possible de vérifier l'efficacité de la lyse en mettant quelques microlitres avec du bleu de Trypan entre lame et lamelle au microscope. Le culot du lysat est lavé avec du tampon de lyse, puis avec un tampon B (20 mM HEPES pH 7,5, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 3 mM DTT, 0,4 mM PMSF, 0,6 M KCl, 10 % glycérol et 1 X inhibiteur de protéases). Après centrifugation 30 minutes 17000g à 4 °C, le culot de noyaux peut être conservé à -80 °C.

Le culot de noyaux de cellules HeLa est resuspendu dans un tampon HAP (50 mM Na₃PO₄ pH 6,8, 0,6 M NaCl, 1 mM β-Mercaptoéthanol et 0,5 mM PMSF) puis broyé par action mécanique (douce, piston B) et incubé à 4 °C 10 minutes. De la résine Hydroxyapatite BioGel (BioRad) est ajoutée à l'extrait. L'échantillon est déposé sur une colonne BioRad et lavé avec du tampon HAP. Les dimères d'histones sont ensuite élués en augmentant la concentration saline : les dimères H2A/H2B seront élués en premier avec du tampon HAP contenant 0,9 M NaCl, puis ce seront les tétramères H3/H4 avec 2,5 M NaCl. Les octamères peuvent également être purifiés par une seule élution à 2,5 M NaCl. Les fractions collectées sont analysées sur un gel SDS-PAGE 15 %.

ii. Polynucléosomes

Le culot de noyaux est resuspendu dans un tampon MSB (20 mM HEPES pH 7,5, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 5 % glycérol et 1 X inhibiteur de protéases), puis après centrifugation et élimination du surnageant, dans un tampon HSB (20 mM HEPES pH 7,5, 0,65 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,34 M sucrose, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF et 1 X inhibiteur de protéases) avant d'être broyé par action mécanique (douce). Après centrifugation, le surnageant est dilué dans 2 M NaCl et dialysé avec un tampon LSB (20 mM HEPES pH 7,5, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT et 0,5 mM PMSF). L'échantillon est mis à 37 °C durant 5 minutes après y avoir ajouté du CaCl₂ à 3 mM final. L'ADN est alors digéré par une nucléase micrococciale (10 U/ml) à 37 °C de 5 à 15 minutes. La digestion est interrompue en ajoutant de l'EGTA. L'échantillon est déposé sur une colonne de gradient de glycérol 10 à 40 %. Les fractions collectées sont analysées sur gel SDS-PAGE 15 %.

iii. Octamère et nucléosomes recombinants

Les octamères et nucléosomes recombinants ont été préparés par Philipp Tropberger de l'équipe de Robert Schneider. Les octamères et nucléosomes recombinants portant les modifications H3K4me1 et H3K4me3 ont été produits dans l'équipe de Marc Timmers. Ci-dessous les protocoles utilisés par Philipp Tropberger :

Les histones recombinantes

Les histones recombinantes sont produites après transformation de bactéries BL21 avec les plasmides codant pour les histones humaines. Les colonies permettent de lancer une culture de 1 litre à 37 °C. Lorsque la densité optique atteint 0,5, l'expression des histones est induite en ajoutant de l'IPTG (0,5 mM en concentration finale) pendant 3 à 4 heures. Les bactéries sont ensuite centrifugées et resuspendues dans un tampon de lavage (50 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0 et 5 mM β -Mercaptoéthanol). Les cellules sont alors soniquées (Branson 4X 30 sec amplitude 100 %) et les culots lavés deux fois avec le tampon de lavage contenant 1 % de Triton X-100, puis avec le tampon de lavage sans Triton. Le culot est alors repris dans un tampon dénaturant (7 M guanidium hydrochloride, 20 mM Tris pH 7,5 et 10 mM DTT) pendant 1 heure à température ambiante. Après centrifugation 15 min à 17000 g, le surnageant est transféré dans un nouveau tube et centrifugé à nouveau. Enfin, il est dialysé à 4 °C contre un tampon SAU200 (7 M urée, 20 mM acétate de sodium pH 5,2, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0 et 5 mM β -Mercaptoéthanol). Après centrifugation, le surnageant est déposé sur une colonne échangeuse de cations (ResourceS cation GE) et les protéines séparées par un gradient de 40 ml de 0 % 200 mM à 100 % 600 mM NaCl (SAU200 et SAU600) grâce à une HPLC AKTA Prime. Les fractions contenant les histones sont dialysées dans de l'eau contenant 2 mM de β -Mercaptoéthanol puis centrifugées 17000 g pendant 20 minutes. La quantité d'histones est déterminée à une densité optique de 276 nm selon la formule de Luger (Luger et al., 1999) soit $DO / \text{coefficient d'extinction molaire } (\epsilon) \times \text{ poids moléculaire} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$, sachant que :

Tableau 13 : Poids moléculaire et extinction molaire des histones.

Histone	Poids moléculaire (Da)	E (cm/M)
H2A	13960	4050
H2B	13774	6070
H3	15273	4040
H4	11236	5400

Les histones peuvent être lyophilisées et conservées à -80 °C.

Octamères recombinants

Pour construire les octamères, les histones sont reprises dans le tampon dénaturant pendant 1 heure à température ambiante, puis les histones sont regroupées en quantité équivalente pour 30 minutes avant d'être dialysées dans un tampon renaturant (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0, 2 M NaCl et 5 mM β -mercaptoéthanol) à 4 °C. Après centrifugation utilisant une colonne VivaSpin (30 kDa) à 17000 g pendant 15 minutes, les octamères ainsi formés sont séparés des dimères, tétramère et agrégats par gel filtration (Superdex200 HR 10/30) en utilisant un système AKTA Explorer HPLC. La stœchiométrie des histones est vérifiée par coloration d'un gel SDS-Page par Bleu de Coomassie. Les octamères présentant une bonne stœchiométrie sont conservés à -20 °C après avoir ajouté du glycérol (50 % final).

Nucléosomes recombinants

Les nucléosomes sont reconstitués grâce à un gradient de dialyse (Luger et al., 1999). Brièvement, les octamères recombinants sont incubés avec l'ADN plasmidique selon le ratio 0,9 : 1 (en masse) dans un tampon contenant 10 mM Tris pH 7,4, 0,5 mM EDTA et 2 M NaCl. Cet ADN contient des répétitions du gène 5S (ayant des affinités de liaison avec le nucléosome) et 5 X le site de liaison de la protéine GAL4 (Kundu et al., 2000; Vignali et al., 2000). L'échantillon est ensuite dialysé dans le même tampon mais présentant une concentration finale de 100 mM NaCl. Cette diminution en sel se fait grâce à une machine de dialyse Slide-A-Lyzer (Thermo) avec ajout progressif du tampon contenant 10 mM NaCl à l'aide d'une pompe péristatique (BioRad) (environ 36h sont nécessaires). Enfin la chromatine est dialysée contre le buffer HAT (5 % glycerol, 50 mM NaCl, 50 mM Tris pH8, 0,1 mM EDTA), concentrée par ultrafiltration en utilisant les colonnes VivaSpin 500 et conservée à 4 °C.

2. Test sur des peptides

Cette expérience consiste à mesurer la fixation de groupements acétyles marqués radioactivement sur des peptides. Les enzymes recombinantes HAT et les complexes contenant des HAT doivent être étudiés en même quantité afin de pouvoir comparer les activités. Les quantités d'enzymes sont alors équilibrées en déposant une partie de chaque échantillon sur un gel d'acrylamide (section 1.3).

Les peptides sont resuspendus dans du tampon Tris-HCL 50 mM, KCl 20 mM pH 8,0. Pour chaque expérience, 20 µl de réaction sont préparés. 1,2 µl de peptide à 1 mg/ml et 1,2 µl d'acétylCoA marqué radioactivement au tritium ^3H (Perkin Elmer) sont ajoutés à une même quantité de complexes. Le tampon (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM KCl, 5 mM DTT, 4 mM EDTA-Na) permet de compléter le volume à 20 µl. Les réactions sont incubées pendant 1 heure à 30 °C. Chaque réaction est ensuite déposée sur un filtre Whatman P81. Il s'agit d'un papier en phosphate de cellulose qui sert de support échangeur de cations. Les peptides sont alors fixés par leurs charges positives sur les filtres. Ces derniers sont lavés dans du tampon NaHCO_3 50 mM pH 9,0 froid 3 X 10 minutes. Enfin, les filtres sont lavés dans de l'acétone à -20 °C, séchés, puis plongés dans du liquide de scintillation du fournisseur Brand. Le signal radioactif est mesuré après 30 minutes d'incubation grâce à un compteur LS 6000 Beckman. La quantité de radioactivité mesurée représente ainsi la quantité de groupements acétyles ayant été fixés par l'enzyme sur les peptides mimant les queues d'histones.

3. Test sur des protéines

L'enzyme et le substrat sont incubés avec de l'acétylCoA radioactif (par test 0,04 µCi de ^{14}C -acétylCoA, Perkin Elmer) dans un tampon HAT 1 X (50 mM Tris pH 7.9, 10% glycerol, 0,1 mM EDTA, 50 mM KCl, 20 mM Sodium Butyrate, 1 mM DTT et 1 X inhibiteur de protéases) pendant 1 heure à 30 °C. L'échantillon est ensuite déposé sur un gel SDS-PAGE et les protéines visualisés par coloration au Bleu de Coomassie afin de confirmer les quantités. Le gel est incubé 2 x 10 minutes dans de 100 % d'acide acétique et 20 minutes dans une solution d'amplification (GE Healthcare NAMP100) avant d'être séché. Un écran de PhosphorImager (Fuji) est placé sur le gel durant plusieurs heures et le signal est révélé par un scanner Typhoon 8600.

4. Production et utilisation de GAL4VP16 pour les tests d'acétylation

Le protocole et le plasmide codant pour la protéine de fusion GAL4-HIS6-VP16 ont été fournis par Philippe Tropberger de l'équipe de Robert Schneider.

Des bactéries E.coli BL21/DE3 sont transformées avec le plasmide codant pour GAL4-HIS6-VP16 (Kundu et al., 2000). Les colonies obtenues sont utilisées pour une culture dans un volume de 2 litres de LB. Lorsque les bactéries atteignent une DO de 600 nm, elles

sont induites par 1 mM d'IPTG et sont ensuite mises à pousser pendant 2 heures à température ambiante en présence de 20 μ M de ZnSO₄. Ce dernier permet la solubilité de la protéine. Le culot de cellules est resuspendu dans un tampon de lyse (10 mM TrisHCl pH8, 10 % glycérol, 500 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, 10 mM imidazole, 1 mM PMSF et 1 X inhibiteur de protéases) et soniqué durant 4 minutes (2 sec on, 2 sec off, amplitude 35 %). Du Triton X-100 est ajouté à une concentration finale de 0,1 % et l'extrait purifié des débris cellulaires par centrifugation. La protéine est immunoprécipitée par incubation de l'extrait avec des billes Ni-NTA (Qiagen) durant plusieurs heures. Les billes sont ensuite déposées sur une colonne et lavées avec un tampon E (20 mM HEPES pH 7,6, 100 mM NaCl, 20 % glycérol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 μ M ZnSO₄, 20 mM imidazole et 1 mM PMSF). La protéine est éluée grâce au tampon E contenant cette fois-ci 200 mM d'imidazole. Les fractions ainsi obtenues sont analysées sur un gel SDS-PAGE par coloration au Bleu de Coomassie et sont conservées à -80 °C.

Pour le test d'acétylation, les protéines GAL4VP16 sont incubées avec le substrat (500 ng pour 1 μ g de substrat) ½ heure à 30 °C. Puis l'enzyme est ajoutée et l'expérience se poursuit comme indiqué dans la section 3.

Références bibliographiques

A

- Alepuz, P.M., de Nadal, E., Zapater, M., Ammerer, G. and Posas, F. (2003) Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *Embo J*, **22**, 2433-2442.
- Avery, O.T., Macleod, C.M. and McCarty, M. (1944) Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. *J Exp Med*, **79**, 137-158.
- Avvakumov, N., Nourani, A. and Cote, J. (2011) Histone chaperones: modulators of chromatin marks. *Mol Cell*, **41**, 502-514.

B

- Baumann, M., Pontiller, J. and Ernst, W. (2010) Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview. *Mol Biotechnol*, **45**, 241-247.
- Benkirane, M., Sardet, C. and Coux, O. (2010) Lessons from interconnected ubiquitylation and acetylation of p53: think metastable networks. *Biochem Soc Trans*, **38**, 98-103.
- Bhaumik, S.R., Smith, E. and Shilatifard, A. (2007) Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 1008-1016.
- Bian, C., Xu, C., Ruan, J., Lee, K.K., Burke, T.L., Tempel, W., Barsyte, D., Li, J., Wu, M., Zhou, B.O., Fleharty, B.E., Paulson, A., Allali-Hassani, A., Zhou, J.Q., Mer, G., Grant, P.A., Workman, J.L., Zang, J. and Min, J. (2011) Sgf29 binds histone H3K4me2/3 and is required for SAGA complex recruitment and histone H3 acetylation. *Embo J*, **30**, 2829-2842.
- Bloom, F. (1995) A Textbook of Histology. *Chapman and Hall*.
- Bonnet, J., Wang, Y.H., Spedale, G., Atkinson, R.A., Romier, C., Hamiche, A., Pijnappel, W.W., Timmers, H.T., Tora, L., Devys, D. and Kieffer, B. (2010) The structural plasticity of SCA7 domains defines their differential nucleosome-binding properties. *EMBO Rep*, **11**, 612-618.
- Brand, M., Leurent, C., Mallouh, V., Tora, L. and Schultz, P. (1999) Three-dimensional structures of the TAFII-containing complexes TFIID and TFTC. *Science*, **286**, 2151-2153.
- Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E. and Gustin, M.C. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, **259**, 1760-1763.
- Brooks, C.L. and Gu, W. (2011) The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein Cell*, **2**, 456-462.
- Brownell, J.E. and Allis, C.D. (1995) An activity gel assay detects a single, catalytically active histone acetyltransferase subunit in Tetrahymena macronuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6364-6368.
- Brownell, J.E. and Allis, C.D. (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 176-184.
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis, C.D. (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, **84**, 843-851.
- Bryant, G.O. and Ptashne, M. (2003) Independent recruitment in vivo by Gal4 of two complexes required for transcription. *Mol Cell*, **11**, 1301-1309.

C

- Cai, L., Sutter, B.M., Li, B. and Tu, B.P. (2011) Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes. *Mol Cell*, **42**, 426-437.
- Candau, R., Moore, P.A., Wang, L., Barlev, N., Ying, C.Y., Rosen, C.A. and Berger, S.L. (1996) Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Mol Cell Biol*, **16**, 593-602.
- Carre, C., Ciurciu, A., Komonyi, O., Jacquier, C., Fagegaltier, D., Pidoux, J., Tricoire, H., Tora, L., Boros, I.M. and Antoniewski, C. (2008) The Drosophila NURF remodelling and the ATAC

- histone acetylase complexes functionally interact and are required for global chromosome organization. *EMBO Rep*, **9**, 187-192.
- Carre, C., Szymczak, D., Pidoux, J. and Antoniewski, C. (2005) The histone H3 acetylase dGcn5 is a key player in *Drosophila melanogaster* metamorphosis. *Mol Cell Biol*, **25**, 8228-8238.
- Ceribelli, M., Dolfini, D., Merico, D., Gatta, R., Vigano, A.M., Pavesi, G. and Mantovani, R. (2008) The histone-like NF-Y is a bifunctional transcription factor. *Mol Cell Biol*, **28**, 2047-2058.
- Chen, X., Chi, Y., Bloecher, A., Aebersold, R., Clurman, B.E. and Roberts, J.M. (2004) N-acetylation and ubiquitin-independent proteasomal degradation of p21(Cip1). *Mol Cell*, **16**, 839-847.
- Cheung, P., Tanner, K.G., Cheung, W.L., Sassone-Corsi, P., Denu, J.M. and Allis, C.D. (2000) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell*, **5**, 905-915.
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V. and Mann, M. (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, **325**, 834-840.
- Ciurciu, A., Komonyi, O. and Boros, I.M. (2008) Loss of ATAC-specific acetylation of histone H4 at Lys12 reduces binding of JIL-1 to chromatin and phosphorylation of histone H3 at Ser10. *J Cell Sci*, **121**, 3366-3372.
- Ciurciu, A., Komonyi, O., Pankotai, T. and Boros, I.M. (2006) The *Drosophila* histone acetyltransferase Gcn5 and transcriptional adaptor Ada2a are involved in nucleosomal histone H4 acetylation. *Mol Cell Biol*, **26**, 9413-9423.
- Crick, F. (1970) Central dogma of molecular biology. *Nature*, **227**, 561-563.
- Crippa, M.P., Alfonso, P.J. and Bustin, M. (1992) Nucleosome core binding region of chromosomal protein HMG-17 acts as an independent functional domain. *J Mol Biol*, **228**, 442-449.
- Currie, R.A. (1998) NF-Y is associated with the histone acetyltransferases GCN5 and P/CAF. *J Biol Chem*, **273**, 1430-1434.
- Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*, **118**, 545-553.
- D**
- De Koning, L., Corpet, A., Haber, J.E. and Almouzni, G. (2007) Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 997-1007.
- Demény, M.A., Soutoglou, E., Nagy, Z., Scheer, E., Janoshazi, A., Richardot, M., Argentini, M., Kessler, P. and Tora, L. (2007) Identification of a small TAF complex and its role in the assembly of TAF-containing complexes. *PLoS One*, **2**, e316.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491-496.
- Donati, G., Imbriano, C. and Mantovani, R. (2006) Dynamic recruitment of transcription factors and epigenetic changes on the ER stress response gene promoters. *Nucleic Acids Res*, **34**, 3116-3127.
- Durso, R.J., Fisher, A.K., Albright-Frey, T.J. and Reese, J.C. (2001) Analysis of TAF90 mutants displaying allele-specific and broad defects in transcription. *Mol Cell Biol*, **21**, 7331-7344.
- E**
- Eberharter, A., John, S., Grant, P.A., Utley, R.T. and Workman, J.L. (1998) Identification and analysis of yeast nucleosomal histone acetyltransferase complexes. *Methods*, **15**, 315-321.
- Eberharter, A., Sterner, 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**, 6621-6631.
- Eberlin, A., Grauffel, C., Oulad-Abdelghani, M., Robert, F., Torres-Padilla, M.E., Lambrot, R., Spohner, D., Ponce-Perez, L., Wurtz, J.M., Stote, R.H., Kimmins, S., Schultz, P., Dejaegere, A. and Tora, L. (2008) Histone H3 tails containing dimethylated lysine and adjacent phosphorylated serine modifications adopt a specific conformation during mitosis and meiosis. *Mol Cell Biol*, **28**, 1739-1754.
- Ellis, T.H., Hofer, J.M., Timmerman-Vaughan, G.M., Coyne, C.J. and Hellens, R.P. (2011) Mendel, 150 years on. *Trends Plant Sci*, **16**, 590-596.

Esteller, M. (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*, **8**, 286-298.

F

Fedorova, E. and Zink, D. (2008) Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 2174-2184.

Fry, C.J. and Peterson, C.L. (2001) Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr Biol*, **11**, R185-197.

Fukuyama, K., Yoshida, M., Yamashita, A., Deyama, T., Baba, M., Suzuki, A., Mohri, H., Ikezawa, Z., Nakajima, H., Hirai, S. and Ohno, S. (2000) MAPK upstream kinase (MUK)-binding inhibitory protein, a negative regulator of MUK/dual leucine zipper-bearing kinase/leucine zipper protein kinase. *J Biol Chem*, **275**, 21247-21254.

Furdas, S.D., Kannan, S., Sippl, W. and Jung, M. (2012) Small molecule inhibitors of histone acetyltransferases as epigenetic tools and drug candidates. *Arch Pharm (Weinheim)*, **345**, 7-21.

G

Gamper, A.M., Kim, J. and Roeder, R.G. (2009) The STAGA subunit ADA2b is an important regulator of human GCN5 catalysis. *Mol Cell Biol*, **29**, 266-280.

Gangloff, Y.G., Sanders, S.L., Romier, C., Kirschner, D., Weil, P.A., Tora, L. and Davidson, I. (2001) Histone folds mediate selective heterodimerization of yeast TAF(II)25 with TFIID components yTAF(II)47 and yTAF(II)65 and with SAGA component ySPT7. *Mol Cell Biol*, **21**, 1841-1853.

Gangloff, Y.G., Werten, S., Romier, C., Carre, L., Poch, O., Moras, D. and Davidson, I. (2000) The human TFIID components TAF(II)135 and TAF(II)20 and the yeast SAGA components ADA1 and TAF(II)68 heterodimerize to form histone-like pairs. *Mol Cell Biol*, **20**, 340-351.

Georgakopoulos, T., Gounalaki, N. and Thireos, G. (1995) Genetic evidence for the interaction of the yeast transcriptional co-activator proteins GCN5 and ADA2. *Mol Gen Genet*, **246**, 723-728.

Georgakopoulos, T. and Thireos, G. (1992) Two distinct yeast transcriptional activators require the function of the GCN5 protein to promote normal levels of transcription. *Embo J*, **11**, 4145-4152.

Germaniuk-Kurowska, A., Nag, A., Zhao, X., Dimri, M., Band, H. and Band, V. (2007) Ada3 requirement for HAT recruitment to estrogen receptors and estrogen-dependent breast cancer cell proliferation. *Cancer Res*, **67**, 11789-11797.

Goodman, R.H. and Smolik, S. (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev*, **14**, 1553-1577.

Goppelt, A. and Meisterernst, M. (1996) Characterization of the basal inhibitor of class II transcription NC2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4450-4455.

Grant, P.A., Duggan, L., Cote, J., Roberts, S.M., Brownell, J.E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C.D., Winston, F., Berger, S.L. and Workman, J.L. (1997) Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev*, **11**, 1640-1650.

Grant, P.A., Eberharter, A., John, S., Cook, R.G., Turner, B.M. and Workman, J.L. (1999) Expanded lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J Biol Chem*, **274**, 5895-5900.

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**, 863-867.

Grigoryev, S.A., Arya, G., Correll, S., Woodcock, C.L. and Schlick, T. (2009) Evidence for heteromorphous chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 13317-13322.

Grove, G.W. and Zweidler, A. (1984) Regulation of nucleosomal core histone variant levels in differentiating murine erythroleukemia cells. *Biochemistry*, **23**, 4436-4443.

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

- Guelman, S., Kozuka, K., Mao, Y., Pham, V., Solloway, M.J., Wang, J., Wu, J., Lill, J.R. and Zha, J. (2009) The double-histone-acetyltransferase complex ATAC is essential for mammalian development. *Mol Cell Biol*, **29**, 1176-1188.
- Guelman, S., Sukanuma, T., Florens, L., Swanson, S.K., Kiesecker, C.L., Kusch, T., Anderson, S., Yates, J.R., 3rd, Washburn, M.P., Abmayr, S.M. and Workman, J.L. (2006) Host cell factor and an uncharacterized SANT domain protein are stable components of ATAC, a novel dAda2A/dGcn5-containing histone acetyltransferase complex in *Drosophila*. *Mol Cell Biol*, **26**, 871-882.
- Guo, J., Wang, J., Lee, J.S. and Schultz, P.G. (2008) Site-specific incorporation of methyl- and acetyl-lysine analogues into recombinant proteins. *Angew Chem Int Ed Engl*, **47**, 6399-6401.
- Gupta, M.P., Samant, S.A., Smith, S.H. and Shroff, S.G. (2008) HDAC4 and PCAF bind to cardiac sarcomeres and play a role in regulating myofilament contractile activity. *J Biol Chem*, **283**, 10135-10146.
- ## H
- Hagiwara, T., Nakashima, K., Hirano, H., Senshu, T. and Yamada, M. (2002) Deimination of arginine residues in nucleophosmin/B23 and histones in HL-60 granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **290**, 979-983.
- Han, J., Zhou, H., Li, Z., Xu, R.M. and Zhang, Z. (2007) Acetylation of lysine 56 of histone H3 catalyzed by RTT109 and regulated by ASF1 is required for replisome integrity. *J Biol Chem*, **282**, 28587-28596.
- Hardy, S., Brand, M., Mittler, G., Yanagisawa, J., Kato, S., Meisterernst, M. and Tora, L. (2002) TATA-binding protein-free TAF-containing complex (TFTC) and p300 are both required for efficient transcriptional activation. *J Biol Chem*, **277**, 32875-32882.
- Hassan, A.H., Awad, S. and Prochasson, P. (2006) The Swi2/Snf2 bromodomain is required for the displacement of SAGA and the octamer transfer of SAGA-acetylated nucleosomes. *J Biol Chem*, **281**, 18126-18134.
- Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J. and Workman, J.L. (2002) Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell*, **111**, 369-379.
- Helmlinger, D., Marguerat, S., Villen, J., Swaney, D.L., Gygi, S.P., Bahler, J. and Winston, F. (2011) Tra1 has specific regulatory roles, rather than global functions, within the SAGA co-activator complex. *Embo J*, **30**, 2843-2852.
- Henikoff, S. and Shilatifard, A. (2011) Histone modification: cause or cog? *Trends Genet*, **27**, 389-396.
- Hernandez-Hernandez, A., Ray, P., Litos, G., Ciro, M., Ottolenghi, S., Beug, H. and Boyes, J. (2006) Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. *Embo J*, **25**, 3264-3274.
- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T. and Baulcombe, D.C. (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science*, **308**, 118-120.
- Herrera, J.E., Sakaguchi, K., Bergel, M., Trieschmann, L., Nakatani, Y. and Bustin, M. (1999) Specific acetylation of chromosomal protein HMG-17 by PCAF alters its interaction with nucleosomes. *Mol Cell Biol*, **19**, 3466-3473.
- Herrera, J.E., West, K.L., Schiltz, R.L., Nakatani, Y. and Bustin, M. (2000) Histone H1 is a specific repressor of core histone acetylation in chromatin. *Mol Cell Biol*, **20**, 523-529.
- Hong, L., Schroth, G.P., Matthews, H.R., Yau, P. and Bradbury, E.M. (1993) Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem*, **268**, 305-314.
- Horiuchi, J., Silverman, N., Marcus, G.A. and Guarente, L. (1995) ADA3, a putative transcriptional adaptor, consists of two separable domains and interacts with ADA2 and GCN5 in a trimeric complex. *Mol Cell Biol*, **15**, 1203-1209.
- Horiuchi, J., Silverman, N., Pina, B., Marcus, G.A. and Guarente, L. (1997) ADA1, a novel component of the ADA/GCN5 complex, has broader effects than GCN5, ADA2, or ADA3. *Mol Cell Biol*, **17**, 3220-3228.

- Huisinga, K.L. and Pugh, B.F. (2004) A genome-wide housekeeping role for TFIID and a highly regulated stress-related role for SAGA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*, **13**, 573-585.
- Hwang, C.S., Shemorry, A. and Varshavsky, A. (2010) N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. *Science*, **327**, 973-977.

J

- Jacob, A.L., Lund, J., Martinez, P. and Hedin, L. (2001) Acetylation of steroidogenic factor 1 protein regulates its transcriptional activity and recruits the coactivator GCN5. *J Biol Chem*, **276**, 37659-37664.
- Jacob, F. and Monod, J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol*, **3**, 318-356.
- Jiang, J., Lu, J., Lu, D., Liang, Z., Li, L., Ouyang, S., Kong, X., Jiang, H., Shen, B. and Luo, C. (2012) Investigation of the acetylation mechanism by GCN5 histone acetyltransferase. *PLoS One*, **7**, e36660.
- Jin, Q., Yu, L.R., Wang, L., Zhang, Z., Kasper, L.H., Lee, J.E., Wang, C., Brindle, P.K., Dent, S.Y. and Ge, K. (2011) Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *Embo J*, **30**, 249-262.
- Joëlle Brodeur, M.T., Projetbleu. (2006) Biologie moléculaire.

K

- Kamieniarz, K., Izzo, A., Dundr, M., Tropberger, P., Ozretic, L., Kirfel, J., Scheer, E., Tropel, P., Wisniewski, J.R., Tora, L., Viville, S., Buettner, R. and Schneider, R. (2012) A dual role of linker histone H1.4 Lys 34 acetylation in transcriptional activation. *Genes Dev*, **26**, 797-802.
- Khorasanizadeh, S. (2004) The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, **116**, 259-272.
- Knutson, B.A. and Hahn, S. (2011) Domains of Tra1 important for activator recruitment and transcription coactivator functions of SAGA and NuA4 complexes. *Mol Cell Biol*, **31**, 818-831.
- Kohler, A., Zimmerman, E., Schneider, M., Hurt, E. and Zheng, N. (2010) Structural basis for assembly and activation of the heterotetrameric SAGA histone H2B deubiquitinase module. *Cell*, **141**, 606-617.
- Kornberg, R.D. and Lorch, Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, **98**, 285-294.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693-705.
- Krebs, A.R., Demmers, J., Karmodiya, K., Chang, N.C., Chang, A.C. and Tora, L. (2010) ATAC and Mediator coactivators form a stable complex and regulate a set of non-coding RNA genes. *EMBO Rep*, **11**, 541-547.
- Krebs, A.R., Karmodiya, K., Lindahl-Allen, M., Struhl, K. and Tora, L. (2011) SAGA and ATAC histone acetyl transferase complexes regulate distinct sets of genes and ATAC defines a class of p300-independent enhancers. *Mol Cell*, **44**, 410-423.
- Kundu, T.K., Palhan, V.B., Wang, Z., An, W., Cole, P.A. and Roeder, R.G. (2000) Activator-dependent transcription from chromatin in vitro involving targeted histone acetylation by p300. *Mol Cell*, **6**, 551-561.
- Kuo, M.H., Brownell, J.E., Sobel, R.E., Ranalli, T.A., Cook, R.G., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis, C.D. (1996) Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature*, **383**, 269-272.
- Kuo, M.H., Zhou, J., Jambeck, P., Churchill, M.E. 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.
- Kurabe, N., Katagiri, K., Komiya, Y., Ito, R., Sugiyama, A., Kawasaki, Y. and Tashiro, F. (2007) Deregulated expression of a novel component of TFTC/STAGA histone acetyltransferase complexes, rat SGF29, in hepatocellular carcinoma: possible implication for the oncogenic potential of c-Myc. *Oncogene*, **26**, 5626-5634.
- Kusch, T., Guelman, S., Abmayr, S.M. and Workman, J.L. (2003) Two *Drosophila* Ada2 homologues function in different multiprotein complexes. *Mol Cell Biol*, **23**, 3305-3319.

L

- Lang, G., Bonnet, J., Umlauf, D., Karmodiya, K., Koffler, J., Stierle, M., Devys, D. and Tora, L. (2011) The tightly controlled deubiquitination activity of the human SAGA complex differentially modifies distinct gene regulatory elements. *Mol Cell Biol*, **31**, 3734-3744.
- Lee, J.S., Smith, E. and Shilatifard, A. (2010) The language of histone crosstalk. *Cell*, **142**, 682-685.
- Lee, K.K., Sardi, M.E., Swanson, S.K., Gilmore, J.M., Torok, M., Grant, P.A., Florens, L., Workman, J.L. and Washburn, M.P. (2011) Combinatorial depletion analysis to assemble the network architecture of the SAGA and ADA chromatin remodeling complexes. *Mol Syst Biol*, **7**, 503.
- Lee, K.K. and Workman, J.L. (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 284-295.
- Legube, G., Linares, L.K., Tyteca, S., Caron, C., Scheffner, M., Chevillard-Briet, M. and Trouche, D. (2004) Role of the histone acetyl transferase Tip60 in the p53 pathway. *J Biol Chem*, **279**, 44825-44833.
- Leurent, C., Sanders, S.L., Demeny, M.A., Garbett, K.A., Ruhlmann, C., Weil, P.A., Tora, L. and Schultz, P. (2004) Mapping key functional sites within yeast TFIID. *Embo J*, **23**, 719-727.
- Li, B., Carey, M. and Workman, J.L. (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell*, **128**, 707-719.
- Li, G. and Reinberg, D. (2011) Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev*, **21**, 175-186.
- Li, M., Luo, J., Brooks, C.L. and Gu, W. (2002) Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem*, **277**, 50607-50611.
- Li, S. and Shogren-Knaak, M.A. (2009) The Gcn5 bromodomain of the SAGA complex facilitates cooperative and cross-tail acetylation of nucleosomes. *J Biol Chem*, **284**, 9411-9417.
- Li, W., Nagaraja, S., Delcuve, G.P., Hendzel, M.J. and Davie, J.R. (1993) Effects of histone acetylation, ubiquitination and variants on nucleosome stability. *Biochem J*, **296 (Pt 3)**, 737-744.
- Lin, Y.Y., Lu, J.Y., Zhang, J., Walter, W., Dang, W., Wan, J., Tao, S.C., Qian, J., Zhao, Y., Boeke, J.D., Berger, S.L. and Zhu, H. (2009) Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell*, **136**, 1073-1084.
- Linares, L.K., Kiernan, R., Triboulet, R., Chable-Bessia, C., Latreille, D., Cuvier, O., Lacroix, M., Le Cam, L., Coux, O. and Benkirane, M. (2007) Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nat Cell Biol*, **9**, 331-338.
- Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D. and Berger, S.L. (1999) p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, **19**, 1202-1209.
- 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**, 917-926.
- Luger, K., Rechsteiner, T.J. and Richmond, T.J. (1999) Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Methods Enzymol*, **304**, 3-19.

M

- Malik, S. and Roeder, R.G. (2010) The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat Rev Genet*, **11**, 761-772.
- Marcus, G.A., Horiuchi, J., Silverman, N. and Guarente, L. (1996) ADA5/SPT20 links the ADA and SPT genes, which are involved in yeast transcription. *Mol Cell Biol*, **16**, 3197-3205.
- Marcus, G.A., Silverman, N., Berger, S.L., Horiuchi, J. and Guarente, L. (1994) Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *Embo J*, **13**, 4807-4815.
- Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M.L., Son, J., Drury, W.J., 3rd, Voigt, P., Martin, S.R., Taylor, W.R., De Marco, V., Pirrotta, V., Reinberg, D. and Gambin, S.J. (2009) Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature*, **461**, 762-767.
- Marmorstein, R. (2001) Structure and function of histone acetyltransferases. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 693-703.

- Marmorstein, R. and Berger, S.L. (2001) Structure and function of bromodomains in chromatin-regulating complexes. *Gene*, **272**, 1-9.
- Martinez, E., Kundu, T.K., Fu, J. and Roeder, R.G. (1998) A human SPT3-TAFII31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID. *J Biol Chem*, **273**, 23781-23785.
- Masumi, A. (2010) Histone acetyltransferases as regulators of nonhistone proteins: the role of interferon regulatory factor acetylation on gene transcription. *J Biomed Biotechnol*, **2011**, 640610.
- Mateo, F., Vidal-Laliena, M., Canela, N., Busino, L., Martinez-Balbas, M.A., Pagano, M., Agell, N. and Bachs, O. (2009) Degradation of cyclin A is regulated by acetylation. *Oncogene*, **28**, 2654-2666.
- Mateo, F., Vidal-Laliena, M., Pujol, M.J. and Bachs, O. (2010) Acetylation of cyclin A: a new cell cycle regulatory mechanism. *Biochem Soc Trans*, **38**, 83-86.
- McGinty, R.K., Kim, J., Chatterjee, C., Roeder, R.G. and Muir, T.W. (2008) Chemically ubiquitylated histone H2B stimulates hDot1L-mediated intranucleosomal methylation. *Nature*, **453**, 812-816.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G. and Yusupov, M. (2012) One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, **19**, 560-567.
- Morgan, T.H. (1910a) Chromosomes and Heredity. *The American Naturalist*, **44**, 449-496.
- Morgan, T.H. (1910b) Sex Limited Inheritance in *Drosophila*. *Science*, **32**, 120-122.
- Morris, S.A., Rao, B., Garcia, B.A., Hake, S.B., Diaz, R.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Allis, C.D., Lieb, J.D. and Strahl, B.D. (2007) Identification of histone H3 lysine 36 acetylation as a highly conserved histone modification. *J Biol Chem*, **282**, 7632-7640.
- Muratoglu, S., Georgieva, S., Papai, G., Scheer, E., Enunlu, I., Komonyi, O., Cserpan, I., Lebedeva, L., Nabirochkina, E., Udvardy, A., Tora, L. and Boros, I. (2003) Two different *Drosophila* ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Mol Cell Biol*, **23**, 306-321.
- N**
- Nagy, Z., Riss, A., Fujiyama, S., Krebs, A., Orpinell, M., Jansen, P., Cohen, A., Stunnenberg, H.G., Kato, S. and Tora, L. (2010) The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes. *Cell Mol Life Sci*, **67**, 611-628.
- Nagy, Z., Riss, A., Romier, C., le Guezennec, X., Dongre, A.R., Orpinell, M., Han, J., Stunnenberg, H. and Tora, L. (2009) The human SPT20-containing SAGA complex plays a direct role in the regulation of endoplasmic reticulum stress-induced genes. *Mol Cell Biol*, **29**, 1649-1660.
- Nagy, Z. and Tora, L. (2007) Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene*, **26**, 5341-5357.
- Natsume, R., Eitoku, M., Akai, Y., Sano, N., Horikoshi, M. and Senda, T. (2007) Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4. *Nature*, **446**, 338-341.
- North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M. and Verdin, E. (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*, **11**, 437-444.
- North, B.J. and Verdin, E. (2007) Mitotic regulation of SIRT2 by cyclin-dependent kinase 1-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*, **282**, 19546-19555.
- O**
- Oda, H., Okamoto, I., Murphy, N., Chu, J., Price, S.M., Shen, M.M., Torres-Padilla, M.E., Heard, E. and Reinberg, D. (2009) Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Mol Cell Biol*, **29**, 2278-2295.
- Ogryzko, V.V., Kotani, T., Zhang, X., Schiltz, R.L., Howard, T., Yang, X.J., Howard, B.H., Qin, J. and Nakatani, Y. (1998) Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell*, **94**, 35-44.
- Ornaghi, P., Ballario, P., Lena, A.M., Gonzalez, A. and Filetici, P. (1999) The bromodomain of Gcn5p interacts in vitro with specific residues in the N terminus of histone H4. *J Mol Biol*, **287**, 1-7.

- Orpinell, M., Fournier, M., Riss, A., Nagy, Z., Krebs, A.R., Frontini, M. and Tora, L. (2010) The ATAC acetyl transferase complex controls mitotic progression by targeting non-histone substrates. *Embo J*, **29**, 2381-2394.
- Owen, D.J., Ornaghi, P., Yang, J.C., Lowe, N., Evans, P.R., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P. and Travers, A.A. (2000) The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *Embo J*, **19**, 6141-6149.
- P**
- Pandithage, R., Lilischkis, R., Harting, K., Wolf, A., Jedamzik, B., Luscher-Firzlaff, J., Vervoorts, J., Lasonder, E., Kremmer, E., Knoll, B. and Luscher, B. (2008) The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependent kinases affects cell motility. *J Cell Biol*, **180**, 915-929.
- Pankotai, T., Komonyi, O., Bodai, L., Ujfaludi, Z., Muratoglu, S., Ciurciu, A., Tora, L., Szabad, J. and Boros, I. (2005) The homologous Drosophila transcriptional adaptors ADA2a and ADA2b are both required for normal development but have different functions. *Mol Cell Biol*, **25**, 8215-8227.
- Pankotai, T., Popescu, C., Martin, D., Grau, B., Zsindely, N., Bodai, L., Tora, L., Ferrus, A. and Boros, I. (2010) Genes of the ecdysone biosynthesis pathway are regulated by the dATAC histone acetyltransferase complex in Drosophila. *Mol Cell Biol*, **30**, 4254-4266.
- Paolinelli, R., Mendoza-Maldonado, R., Cereseto, A. and Giacca, M. (2009) Acetylation by GCN5 regulates CDC6 phosphorylation in the S phase of the cell cycle. *Nat Struct Mol Biol*, **16**, 412-420.
- Pollard, K.J. and Peterson, C.L. (1997) Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, **17**, 6212-6222.
- Poux, A.N. and Marmorstein, R. (2003) Molecular basis for Gcn5/PCAF histone acetyltransferase selectivity for histone and nonhistone substrates. *Biochemistry*, **42**, 14366-14374.
- Pray-Grant, M.G., Schieltz, D., McMahon, S.J., Wood, J.M., Kennedy, E.L., Cook, R.G., Workman, J.L., Yates, J.R., 3rd and Grant, P.A. (2002) The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway. *Mol Cell Biol*, **22**, 8774-8786.
- Proft, M. and Struhl, K. (2002) Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell*, **9**, 1307-1317.
- R**
- Roth, S.Y., Denu, J.M. and Allis, C.D. (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*, **70**, 81-120.
- Rual, J.F., Venkatesan, K., Hao, T., Hirozane-Kishikawa, T., Dricot, A., Li, N., Berriz, G.F., Gibbons, F.D., Dreze, M., Ayivi-Guedehoussou, N., Klitgord, N., Simon, C., Boxem, M., Milstein, S., Rosenberg, J., Goldberg, D.S., Zhang, L.V., Wong, S.L., Franklin, G., Li, S., Albala, J.S., Lim, J., Fraughton, C., Llamas, E., Cevik, S., Bex, C., Lamesch, P., Sikorski, R.S., Vandenhaute, J., Zoghbi, H.Y., Smolyar, A., Bosak, S., Sequerra, R., Doucette-Stamm, L., Cusick, M.E., Hill, D.E., Roth, F.P. and Vidal, M. (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*, **437**, 1173-1178.
- S**
- Samara, N.L., Datta, A.B., Berndsen, C.E., Zhang, X., Yao, T., Cohen, R.E. and Wolberger, C. (2010) Structural insights into the assembly and function of the SAGA deubiquitinating module. *Science*, **328**, 1025-1029.
- Sapountzi, V. and Cote, J. (2011) MYST-family histone acetyltransferases: beyond chromatin. *Cell Mol Life Sci*, **68**, 1147-1156.
- Schiltz, R.L., Mizzen, C.A., Vassilev, A., Cook, R.G., Allis, C.D. and Nakatani, Y. (1999) Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J Biol Chem*, **274**, 1189-1192.
- Schnitzler, G.R. (2001) Isolation of histones and nucleosome cores from mammalian cells. *Curr Protoc Mol Biol*, **Chapter 21**, Unit 21 25.
- Sela, D., Chen, L., Martin-Brown, S., Washburn, M.P., Florens, L., Conaway, J.W. and Conaway, R.C. (2012) Endoplasmic Reticulum Stress-responsive Transcription Factor ATF6alpha Directs Recruitment of the Mediator of RNA Polymerase II Transcription and Multiple Histone Acetyltransferase Complexes. *J Biol Chem*, **287**, 23035-23045.

- Seligson, D.B., Horvath, S., Shi, T., Yu, H., Tze, S., Grunstein, M. and Kurdistani, S.K. (2005) Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature*, **435**, 1262-1266.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R. and Peterson, C.L. (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, **311**, 844-847.
- Sikorski, T.W. and Buratowski, S. (2009) The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr Opin Cell Biol*, **21**, 344-351.
- Smith, E.R., Belote, J.M., Schiltz, R.L., Yang, X.J., Moore, P.A., Berger, S.L., Nakatani, Y. and Allis, C.D. (1998) Cloning of Drosophila GCN5: conserved features among metazoan GCN5 family members. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2948-2954.
- Sonnenbichler, J. (1979) Advances in chromatin research. *Naturwissenschaften*, **66**, 244-250.
- Soutoglou, E., Demeny, M.A., Scheer, E., Fienga, G., Sassone-Corsi, P. and Tora, L. (2005) The nuclear import of TAF10 is regulated by one of its three histone fold domain-containing interaction partners. *Mol Cell Biol*, **25**, 4092-4104.
- Spedale, G., Mischerikow, N., Heck, A.J., Timmers, H.T. and Pijnappel, W.W. (2010) Identification of Pep4p as the protease responsible for formation of the SAGA-related SLIK protein complex. *J Biol Chem*, **285**, 22793-22799.
- Spedale, G., Timmers, H.T. and Pijnappel, W.W. (2012) ATAC-king the complexity of SAGA during evolution. *Genes Dev*, **26**, 527-541.
- Sterner, D.E. and Berger, S.L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 435-459.
- 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**, 41-45.
- Suganuma, T., Gutierrez, J.L., Li, B., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Abmayr, S.M. and Workman, J.L. (2008) ATAC is a double histone acetyltransferase complex that stimulates nucleosome sliding. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 364-372.
- Suganuma, T., Mushegian, A., Swanson, S.K., Abmayr, S.M., Florens, L., Washburn, M.P. and Workman, J.L. (2010) The ATAC acetyltransferase complex coordinates MAP kinases to regulate JNK target genes. *Cell*, **142**, 726-736.
- Svejstrup, J.Q. (2004) The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin. *Biochim Biophys Acta*, **1677**, 64-73.
- T**
- Takahata, S., Yu, Y. and Stillman, D.J. (2009) FACT and Asf1 regulate nucleosome dynamics and coactivator binding at the HO promoter. *Mol Cell*, **34**, 405-415.
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., Lu, Z., Ye, Z., Zhu, Q., Wysocka, J., Ye, Y., Khochbin, S., Ren, B. and Zhao, Y. (2011) Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*, **146**, 1016-1028.
- Thompson, P.R., Wang, D., Wang, L., Fulco, M., Pediconi, N., Zhang, D., An, W., Ge, Q., Roeder, R.G., Wong, J., Levrero, M., Sartorelli, V., Cotter, R.J. and Cole, P.A. (2004) Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 308-315.
- Timmers, H.T. and Tora, L. (2005) SAGA unveiled. *Trends Biochem Sci*, **30**, 7-10.
- Tremethick, D.J. (2007) Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell*, **128**, 651-654.
- Tse, C., Georgieva, E.I., Ruiz-Garcia, A.B., Sendra, R. and Hansen, J.C. (1998) Gcn5p, a transcription-related histone acetyltransferase, acetylates nucleosomes and folded nucleosomal arrays in the absence of other protein subunits. *J Biol Chem*, **273**, 32388-32392.
- Turner, B.M. (2007) Defining an epigenetic code. *Nat Cell Biol*, **9**, 2-6.

U

Utlely, R.T., Ikeda, K., Grant, P.A., Cote, 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.

V

Vamos, E. and Boros, I.M. (2012) The C-terminal domains of ADA2 proteins determine selective incorporation into GCN5-containing complexes that target histone H3 or H4 for acetylation. *FEBS Lett.*

Vannini, A. and Cramer, P. (2012) Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Mol Cell*, **45**, 439-446.

Vaquero, A., Scher, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Serrano, L. and Reinberg, D. (2007) SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature*, **450**, 440-444.

Vaquero, A., Scher, M.B., Lee, D.H., Sutton, A., Cheng, H.L., Alt, F.W., Serrano, L., Sternglanz, R. and Reinberg, D. (2006) SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev*, **20**, 1256-1261.

Venkatesan, K., Rual, J.F., Vazquez, A., Stelzl, U., Lemmens, I., Hirozane-Kishikawa, T., Hao, T., Zenkner, M., Xin, X., Goh, K.I., Yildirim, M.A., Simonis, N., Heinzmann, K., Gebreab, F., Sahalie, J.M., Cevik, S., Simon, C., de Smet, A.S., Dann, E., Smolyar, A., Vinayagam, A., Yu, H., Szeto, D., Borick, H., Dricot, A., Klitgord, N., Murray, R.R., Lin, C., Lalowski, M., Timm, J., Rau, K., Boone, C., Braun, P., Cusick, M.E., Roth, F.P., Hill, D.E., Tavernier, J., Wanker, E.E., Barabasi, A.L. and Vidal, M. (2009) An empirical framework for binary interactome mapping. *Nat Methods*, **6**, 83-90.

Vermeulen, M., Eberl, H.C., Matarese, F., Marks, H., Denissov, S., Butter, F., Lee, K.K., Olsen, J.V., Hyman, A.A., Stunnenberg, H.G. and Mann, M. (2010) Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell*, **142**, 967-980.

Vernarecci, S., Ornaghi, P., Bagu, A., Cundari, E., Ballario, P. and Filetici, P. (2008) Gcn5p plays an important role in centromere kinetochore function in budding yeast. *Mol Cell Biol*, **28**, 988-996.

Vetting, M.W., LP, S.d.C., Yu, M., Hegde, S.S., Magnet, S., Roderick, S.L. and Blanchard, J.S. (2005) Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys*, **433**, 212-226.

Vignali, M., Steger, D.J., Neely, K.E. and Workman, J.L. (2000) Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes. *Embo J*, **19**, 2629-2640.

W

Wang, Y.L., Faiola, F., Xu, M., Pan, S. and Martinez, E. (2008) Human ATAC Is a GCN5/PCAF-containing acetylase complex with a novel NC2-like histone fold module that interacts with the TATA-binding protein. *J Biol Chem*, **283**, 33808-33815.

Wang, Z.U., Wang, Y.S., Pai, P.J., Russell, W.K., Russell, D.H. and Liu, W.R. (2012) A Facile Method to Synthesize Histones with Posttranslational Modification Mimics. *Biochemistry*.

Watson, J.D. and Crick, F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**, 737-738.

Weake, V.M., Swanson, S.K., Mushegian, A., Florens, L., Washburn, M.P., Abmayr, S.M. and Workman, J.L. (2009) A novel histone fold domain-containing protein that replaces TAF6 in Drosophila SAGA is required for SAGA-dependent gene expression. *Genes Dev*, **23**, 2818-2823.

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**, 7480-7484.

Welihinda, A.A., Tirasophon, W., Green, S.R. and Kaufman, R.J. (1997) Gene induction in response to unfolded protein in the endoplasmic reticulum is mediated through Ire1p kinase interaction with a transcriptional coactivator complex containing Ada5p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4289-4294.

- Welihinda, A.A., Tirasophon, W. and Kaufman, R.J. (2000) The transcriptional co-activator ADA5 is required for HAC1 mRNA processing in vivo. *J Biol Chem*, **275**, 3377-3381.
- Wieczorek, E., Brand, M., Jacq, X. and Tora, L. (1998) Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II. *Nature*, **393**, 187-191.
- Woodcock, C.L. and Ghosh, R.P. (2010) Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a000596.
- Workman, J.L. and Kingston, R.E. (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*, **67**, 545-579.
- Wu, P.Y., Ruhlmann, C., Winston, F. and Schultz, P. (2004) Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell*, **15**, 199-208.
- Wu, P.Y. and Winston, F. (2002) Analysis of Spt7 function in the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA coactivator complex. *Mol Cell Biol*, **22**, 5367-5379.

X

- Xie, A.Y., Bermudez, V.P. and Folk, W.R. (2002) Stimulation of DNA replication from the polyomavirus origin by PCAF and GCN5 acetyltransferases: acetylation of large T antigen. *Mol Cell Biol*, **22**, 7907-7918.
- Xu, W., Edmondson, D.G., Evrard, Y.A., Wakamiya, M., Behringer, R.R. and Roth, S.Y. (2000) Loss of Gcn5l2 leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. *Nat Genet*, **26**, 229-232.
- Xu, W., Edmondson, D.G. and Roth, S.Y. (1998) Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Mol Cell Biol*, **18**, 5659-5669.

Y

- Yang, X.J. (2004) Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *Bioessays*, **26**, 1076-1087.
- Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, **382**, 319-324.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M. and Mori, K. (2001) Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, **21**, 1239-1248.
- Young, N.L., Dimaggio, P.A. and Garcia, B.A. (2010) The significance, development and progress of high-throughput combinatorial histone code analysis. *Cell Mol Life Sci*, **67**, 3983-4000.

Z

- Zapater, M., Sohrmann, M., Peter, M., Posas, F. and de Nadal, E. (2007) Selective requirement for SAGA in Hog1-mediated gene expression depending on the severity of the external osmotic stress conditions. *Mol Cell Biol*, **27**, 3900-3910.
- Zeng, M., Kumar, A., Meng, G., Gao, Q., Dimri, G., Wazer, D., Band, H. and Band, V. (2002) Human papilloma virus 16 E6 oncoprotein inhibits retinoic X receptor-mediated transactivation by targeting human ADA3 coactivator. *J Biol Chem*, **277**, 45611-45618.
- Zhao, Y., Lang, G., Ito, S., Bonnet, J., Metzger, E., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Le Guezennec, X., Stunnenberg, H.G., Krasnov, A., Georgieva, S.G., Schule, R., Takeyama, K., Kato, S., Tora, L. and Devys, D. (2008) A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol Cell*, **29**, 92-101.
- Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., Mitchell, T., Miller, P., Dean, R.A., Gerstein, M. and Snyder, M. (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, **293**, 2101-2105.
- Zlatanova, J., Bishop, T.C., Victor, J.M., Jackson, V. and van Holde, K. (2009) The nucleosome family: dynamic and growing. *Structure*, **17**, 160-171.
- Zohn, I.E., Li, Y., Skolnik, E.Y., Anderson, K.V., Han, J. and Niswander, L. (2006) p38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of E-cadherin during mouse gastrulation. *Cell*, **125**, 957-969.

Caractérisation fonctionnelle de l'activité de l'histone acétyltransférase GCN5 au sein des complexes ATAC et SAGA chez l'homme

Résumé

Afin d'initier la transcription par l'ARN Polymérase II, la chromatine est modifiée par des coactivateurs, dont certains catalysent des modifications post-traductionnelles des queues des histones. La protéine GCN5 est une enzyme qui possède une activité histone acétyltransférase (HAT) et fait partie du complexe SAGA, qui acétyle les histones H3. Or, il existe un second complexe HAT contenant GCN5 : le complexe ATAC, mis en évidence chez la drosophile. Chez l'homme en revanche, l'existence d'un tel complexe n'avait pas encore été démontrée au début de ma thèse.

L'objectif de ma thèse a consisté tout d'abord en la purification et la caractérisation du complexe HAT ATAC chez l'homme. La composition en sous-unités du complexe humain ATAC a été déterminée et l'activité de ce dernier sur les histones étudiée. Puis, j'ai cherché à comprendre le fonctionnement et la spécificité d'action du complexe ATAC, par rapport au complexe SAGA. Pour cela, j'ai voulu comprendre comment les sous-unités influencent l'activité de l'enzyme, et ainsi identifier les protéines qui permettent la spécificité des complexes.

Acétylation, histone, GCN5, ATAC, SAGA, épigénétique, chromatine

Résumé en anglais

In order to initiate the transcription by the RNA polymerase II, chromatin needs to be modified by coactivators. GCN5 is a histone acetyltransferase enzyme (HAT), which can acetylate the histones. This enzyme is found in a multiproteic complex named SAGA. Recently, a second HAT complex containing GCN5 was discovered: ATAC, in drosophila. At the beginning of my thesis, the existence of such complex in human was not shown.

My thesis objectives were to identify and characterize an ATAC complex in human cells. We purified and identified the composition in subunits of human ATAC. Then we studied the activity of ATAC on histones, compared to SAGA. Next, we were wondering how the subunits of the two HAT complexes could play a role on the regulation of the activity of the enzyme GCN5, in order to understand the histone specificity of ATAC and SAGA.

Histone acétylation, GCN5, ATAC, SAGA, epigenetic, chromatin