



Assemblage et spécificité des complexes acétyltransférases de la famille MYST

Thèse

Marie-Eve Lalonde

Doctorat en Biologie cellulaire et moléculaire
Philosophiae Doctor

Québec, Canada

© Marie-Eve Lalonde, 2014

Résumé

La chromatine est une structure nucléaire composée des histones, autour desquelles l'ADN s'enroule pour être empaqueté dans le noyau. La dynamique de cette structure permet de réguler plusieurs procédés nucléaires, tels que la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. Il existe, entre autre, des complexes de modifications de la chromatine qui collaborent à la régulation de ces différentes fonctions nucléaires. Les acétyltransférases de la famille MYST participent à l'acétylation des queues N-term des histones. Très conservées de la levure à l'humain, elles possèdent des rôles importants dans plusieurs processus cellulaires. Deux des complexes MYST ont été au cœur de mes études doctorales, soit le complexe HBO1 et MOZ/MORF. Mon projet de doctorat avait comme premier objectif de disséquer les différents domaines protéiques présents au sein de ces deux complexes et de caractériser leurs interactions soit avec les autres sous-unités, soit avec la chromatine. Par des analyses biochimiques, nous avons déterminé le mode d'assemblage des complexes MYST. Nous avons également caractérisé leurs différents domaines de reconnaissance de modifications post-traductionnelles des histones, afin de déterminer leur mode de recrutement. Des analyses à l'échelle du génome entier nous ont aussi permis de localiser ces protéines à des loci bien précis. De plus, il nous a été possible de constater l'importance de l'association des protéines ING sur la fonction suppresseur de tumeur du complexe HBO1-JADE. Suite à une purification de la protéine BRPF1, j'ai pu constater l'association de HBO1 avec cette protéine. Comme deuxième objectif de thèse, j'ai donc eu à caractériser le nouveau complexe HBO1-BRPF1 et à démontrer sa spécificité d'acétylation. En utilisant des essais d'acétylation *in vitro* combinés à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, j'ai pu établir un nouveau mode de régulation de l'activité acétyltransférase de la protéine HBO1. Ce mécanisme étonnant démontre un changement de spécificité de l'activité catalytique des MYST en fonction de leur association aux protéines d'échafaudage. Tous ces résultats démontrent donc qu'il est important de considérer l'ensemble des sous-unités des complexes MYST, car elles sont toutes aussi importantes que l'enzyme pour la reconnaissance, la spécificité d'acétylation ainsi que les fonctions cellulaires de ces complexes.

Abstract

Chromatin is a nuclear structure formed by DNA that is wrapped around histone octamers, allowing for its compaction in the nucleus. This structure is dynamic and regulates many nuclear processes, such as transcription, replication and DNA repair. Among other factors, complexes that modify chromatin collaborate for the regulation of these nuclear functions. The MYST acetyltransferase family participate in the acetylation of histone N-term tails. Highly conserved from yeast to human, they play various roles in many cellular pathways. During my PhD, I have focused on two of these MYST acetyltransferases, HBO1 and MOZ/MORF. The first objective of my project was to dissect the different protein domains comprised within these complexes and define their interactions either with other subunits or with chromatin. Using biochemical experiments, we brought to the forefront the assembly mechanism of the MYST complexes. Additionally, we characterized their chromatin recognition domains, which helped us determine their recruitment mechanism. Genome-wide analysis also gave us the precise localisation of these proteins on many loci. Moreover, we could determine that the association with ING subunits is essential for the tumor suppressor function of these complexes. Following purification of the BRPF1 protein, we could detect binding of the HBO1 protein. Thus, the second objective of my PhD project was to characterize the newly identified HBO1-BRPF1 complex and determine its acetylation specificity. Using *in vitro* acetylation assays combined with chromatin immunoprecipitation experiments, we unravelled a new regulation mechanism of the HBO1 acetyltransferase activity. This surprising mechanism shows a switch of histone tail acetylation specificity depending of the associated scaffold proteins, an activity previously thought to be intrinsic to the catalytic subunit. These data highlight a new role of the associated scaffold subunits within MYST-ING acetyltransferase complexes in directing the acetylation of specific histone tails. Altogether, these results demonstrate that it is important to consider MYST acetyltransferases as complexes, since their different subunits contribute to chromatin recognition, acetylation specificity and cellular functions.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures.....	xv
Liste des figures supplémentaires.....	xvii
Liste des abréviations.....	xix
Remerciements.....	xxvii
Avant-Propos	xxix
Chapitre 1 Introduction.....	1
1.1. Structure et dynamique de la chromatine	2
1.1.1. Composition de la chromatine : Histones et nucléosome.....	2
1.1.2. Fonctions de la chromatine.....	3
1.1.3. Variants d'histones	5
1.1.3.1. Les variants de l'histone H2A.....	5
1.1.3.2. Les variants de l'histone H3.....	7
1.1.4. Complexes de remodelage ATP-dépendants.....	7
1.1.4.1. Différentes familles de complexes de remodelage de la chromatine.....	8
1.1.5. Les chaperons d'histones.....	11
1.1.6. Modifications post-traductionnelles des histones.....	13
1.1.6.1. La méthylation des histones.....	14
1.1.6.2. L'acétylation des histones.....	18
1.1.6.2.1 La famille des GNATs.....	20
1.1.6.2.2 La famille des MYSTs.....	20
1.1.6.2.3 La famille CBP/p300.....	21
1.1.6.2.4 Les histones déacétylases (HDACs).....	21
1.1.6.3. La phosphorylation des histones.....	23
1.1.6.4. L'ubiquitination des histones.....	23

1.1.7.	Interrelation entre les différentes marques d'histones.....	24
1.1.8.	Les domaines de reconnaissance des modifications post-traductionnelles des histones	25
1.2.	Les complexes associés aux acétyltransférases de la famille MYST.....	26
1.2.1.	Les protéines INGs.....	28
1.2.2.	TIP60.....	31
1.2.2.1.	Rôles fonctionnels du complexe TIP60.....	32
1.2.2.2.	Domaines de reconnaissance de la chromatine au sein du complexe TIP60	33
1.2.3.	HBO1.....	34
1.2.3.1.	Rôles fonctionnels du complexe HBO1.....	35
1.2.3.2.	Domaines de reconnaissance de la chromatine au sein du complexe HBO1	36
1.2.4.	MOZ/MORF.....	36
1.2.4.1.	Rôles fonctionnels du complexe MOZ/MORF.....	37
1.2.4.2.	Domaines de reconnaissance de la chromatine au sein du complexe MOZ/MORF.....	38
1.2.5.	MOF.....	39
1.2.5.1.	Rôles fonctionnels du complexe MOF-MSL.....	39
1.2.5.2.	Domaines de reconnaissance de la chromatine au sein du complexe MOF-MSL.....	40
1.3.	But du projet de doctorat.....	40
Chapitre 2 Perceiving the epigenetic landscape through histone readers.....		43
2.1.	Résumé.....	44
2.2.	Abstract.....	45
2.3.	History of histone PTMs.....	47
2.4.	Methylation readers.....	48
2.4.1.	Lysine methylation.....	49
2.4.2.	Functional significance of Kme recognition.....	53
2.4.3.	Arginine methylation.....	55
2.4.4.	Functional significance of Rme recognition.....	57
2.5.	Acetylation readers.....	57

2.5.1.	Functional significance of Kac recognition	59
2.6.	Phosphorylation readers	59
2.6.1.	Functional significance of Sph and Tph recognition	61
2.7.	Unmodified H3 readers	61
2.8.	Combinatorial readout of and cross-talk between PTMs	64
2.9.	Concluding remarks	67
2.10.	Acknowledgments	68
Chapitre 3 Conserved molecular interactions within the HBO1 acetyltransferase complexes regulate cell proliferation		69
3.1.	Résumé	70
3.2.	Abstract	71
3.3.	Introduction	72
3.4.	Materials and Methods	74
3.4.1.	Cell culture, plasmids and recombinant proteins	74
3.4.2.	Antibodies and peptides	75
3.4.3.	Affinity purification of protein complexes	75
3.4.4.	Peptide and GST pull-down assays	76
3.4.5.	Histone acetyltransferase assays with protein complexes	76
3.4.6.	NMR Spectroscopy	77
3.4.7.	Microarray data analysis	77
3.4.8.	Cell growth analysis	78
3.4.9.	Anchorage-independent cell growth	78
3.4.10.	Assays of p53-dependent transcription	78
3.4.11.	Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays	78
3.4.12.	Chip-seq analysis	79
3.5.	Results	80
3.5.1.	MYST-ING HAT complexes can be separated into three classes	80
3.5.2.	JADE proteins coordinate the assembly of HBO1 complexes	82
3.5.3.	Short domains conserved in all MYST-ING complexes are responsible for bridging specific acetyltransferases with their ING factors	84

3.5.4.	Domain II-mediated association of ING proteins with JADE-HBO1 determines the modulation of acetyltransferase activity by methylated lysine 4 of histone H3	87
3.5.5.	MYST-ING4/5 HAT complexes contain multiple histone H3-binding PHD finger domains with different specificities towards lysine 4 methylation status	89
3.5.6.	Association of the ING proteins with HBO1-JADE is required for growth control	90
3.5.7.	HBO1 depletion leads to down-regulation of multiple genes in the p53 pathway of cell cycle control and apoptosis	94
3.5.8.	Growth control by the HBO1-JADE1L-ING complex occurs through direct recruitment and action at p53-regulated genes	94
3.5.9.	HBO1 is located in the 5' region of transcribed genes and colocalizes with H3K4me3	97
3.6.	Discussion	99
3.7.	Acknowledgements	103
Chapitre 4 Exchange of associated factors directs a switch in HBO1 acetyltransferase histone tail specificity.....		105
4.1.	Résumé	106
4.2.	Abstract	107
4.3.	Introduction	108
4.4.	Results	110
4.4.1.	The PZP domain of BRPF1 binds to unmethylated histone H3K4.....	110
4.4.2.	Each PHD finger of the PZP domain is critical for chromatin binding and acetylation	114
4.4.3.	ING5 directs BRPF1 localization to H3K4me3 enriched chromatin at the 5'-end of active genes	116
4.4.4.	Two distinct forms of HBO1 complexes exist with different scaffold subunits	119
4.4.5.	BRPF1-MYST complexes acetylate only histone H3 in chromatin	120
4.4.6.	The scaffold subunits of the MYST-ING complexes direct histone tail specificity during acetylation of chromatin	122
4.4.7.	A short N-terminal region within scaffold subunits directs which histone tail is acetylated by MYST complexes on chromatin	125
4.5.	Discussion	128

4.6.	Materials and Methods.....	134
4.6.1.	Purification of MYST HAT complexes.....	134
4.6.2.	Recombinant protein purifications and peptide pull-downs.....	134
4.6.3.	NMR Spectroscopy.....	135
4.6.4.	Fluorescence Spectroscopy.....	135
4.6.5.	Antibodies and peptides.....	136
4.6.6.	HAT assays.....	136
4.6.7.	ChIP assays.....	136
4.6.8.	ChIP-seq analysis.....	137
4.7.	Acknowledgments.....	138
4.8.	Supplementary Figures.....	139
Chapitre 5 Discussion.....		145
5.1.	Assemblage des complexes MYST.....	146
5.2.	Les domaines de reconnaissance de la chromatine au sein des complexes MYST..	147
5.3.	Rôle des complexes MYST dans la régulation des gènes et de la prolifération cellulaire.....	149
5.4.	Le complexe HBO1-BRPF1.....	151
5.5.	Spécificité de l'activité acétyltransférase des MYST.....	153
5.6.	Conclusion.....	157
Bibliographie.....		161
Annexe.....		187

Liste des tableaux

Tableau 2-1. Histone readers and their target PTMs.	49
Tableau 3-1. Examples of genes affected during stable expression of JADE1L in HeLa cells.	92
Tableau 3-2. Examples of genes affected during HBO1 depletion by siRNA in HeLa cells.	99
Tableau 5-1. Résumé des différents domaines protéiques et spécificités des complexes MYST étudiés.	158
Tableau 5-2. Résumé des différentes fonctions cellulaires des sous-unités et paralogues des complexes acétyltransférases de la famille MYST principalement étudiés.	159

Liste des figures

Figure 1-1. Structure et composition du nucléosome.	3
Figure 1-2. Niveaux organisationnels de la chromatine à l'intérieur du noyau.....	4
Figure 1-3. Mécanismes d'action des complexes de remodelage de la chromatine.	8
Figure 1-4. Modifications post-traductionnelles des histones.	14
Figure 1-5. Distribution de certaines modifications post-traductionnelles des histones sur les régions promotrices et codantes des gènes.	17
Figure 1-6. Acétylation et méthylation dynamique aux promoteurs et aux régions codantes des gènes.	22
Figure 1-7. Interrelation entre les différentes marques d'histones.	25
Figure 1-8. Schéma des complexes MYST acétyltransférases.	27
Figure 1-9. Domaines de reconnaissance de la chromatine au sein des complexes acétyltransférases de la famille MYST.	27
Figure 1-10. Conservation de la structure des complexes contenant des protéines INGs. ...	29
Figure 2-1. Readers of histone PTMs.	46
Figure 2-2. Molecular mechanisms for the recognition of methyllysine and methylarginine.	56
Figure 2-3. Molecular mechanisms for the recognition of acetyllysine, phosphoserine or phosphothreonine and unmodified histone H3.	63
Figure 2-4. Combinatorial readout of PTMs.	65
Figure 3-1. Common features of the MYST-ING histone acetyltransferases complexes. ...	81
Figure 3-2. Molecular determinants for assembly of HBO1 HAT complexes.	83
Figure 3-3. Molecular dissection of MYST-ING HAT complexes identifies two conserved domains essential for assembly.	87
Figure 3-4. Domain II-dependent association of ING subunits stimulates MYST HAT activity towards histone H3 peptides methylated on lysine 4.	88
Figure 3-5. The first PHD finger of the JADE1 PZP domain dictates the specificity of the entire domain toward histone H3K4 methylation status.	90
Figure 3-6. JADE1 interaction with ING is essential for tumor suppressor activity which implicates HBO1-dependent up-regulation of the p21 CDK inhibitor.	93
Figure 3-7. HBO1-JADE-ING complexes directly bind and stimulate p53-regulated genes to control cell proliferation.	96
Figure 3-8. HBO1 is mainly located in the 5' end of transcribed genes and colocalizes with H3K4me3.	98
Figure 4-1. Characterization of the two PHD fingers in the PZP domain of BRPF1.	113
Figure 4-2. BRPF1 PHD1 and PHD2 fingers are required for binding to chromatin and its acetylation.	115

Figure 4-3. BRPF1 localizes to H3K4me3 enriched regions through its association with ING5..... 118

Figure 4-4. BRPF1 scaffold subunit co-purifies with both MOZ/MORF and HBO1 catalytic subunits..... 121

Figure 4-5. Association of different scaffold subunits with the HBO1 HAT is responsible for switching its histone acetylation specificity between H4 and H3. 124

Figure 4-6. A small N-terminal domain in the scaffold subunits of MYST-ING complexes is responsible for directing specific histone tail acetylation. 127

Figure 4-7. Model for MYST acetyltransferases assembly in alternate complexes leading to different histone tail specificities. 132

Liste des figures supplémentaires

Figure S4-1. Characterization of the two PHD fingers in the PZP domain of BRPF1.....	139
Figure S4-2. Control heatmaps for CHIP-seq signals on +/- 5kb surrounding TSS of genes are shown.	140
Figure S4-3. MYST subunits CHIP-seq signal intensities around the transcription start site (TSS) of genes in human RKO cells correlates globally with gene expression levels.	142
Figure S4-4. BRPF2 antibody recognizes both BRPF2 and BRPF1.	142
Figure S4-5. BRPF1/2 interacts with HBO1.	142
FigureS 4-6. HBO1-BRPF1 complex acetylates H3K14.....	143
Figure S4-7. Deletion of BRPF1 N-terminus also changes the histone tail specificity of the associated acetyltransferase.	144
Figure A-1. Acétylation de p53 par les complexe MYST acétyltransférases HBO1, TIP60 et MOF.	188

Liste des abréviations

ACF: ATP-dependent chromatin assembly and remodeling factor
ADA: adaptator
ADD: ATRX-DNMT3-DNMT3L
ADN : acide désoxyribonucléique
AIRE: Autoimmune regulator
AML1: Acute myeloid leukemia 1
ARN : acide ribonucléique
ARP: actin-related protein
Asf1 : anti-silencing function
ATM : Ataxia telangiectasia mutated
ATP: adenosine triphosphate
ATR : ATM and Rad3-related
BAF: Brg1/Brm associated factors
BAH: bromo-adjacent homology
BAX: Bcl-2-associated X
BD: bromodomain
BIR: baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat
BRCT: BRCA1 C Terminus
Brd: Bromodomain
Bre1: Brefeldin A-sensitivity protein 1
BRG1 : brahma related gene 1
BRMS1: Breast cancer metastasis-suppressor 1
BRPF: Bromodomain and PHD finger-containing protein
CAF-1 : chromatin assembly factor 1
CBP : CREB binding protein
CD: Chromodomain
CDK: Cyclin dependant kinase
cDNA: coding DNA
Cdt1: cdc10-dependent transcript 1
CENP-A : centromeric protein A
CHD: Chromodomain Helicase DNA-binding
ChIP: chromatin immunoprecipitation
CHRAC: Chromatin accessibility complex protein
Chz1 : chaperone of H2AZ-H2B
CMV: cytomegalovirus
CoREST : corepressor for REST
Crb2: Crumbs-like protein 2

Daxx: Death domain-associated protein
DDB1: DNA damage-binding protein 1
DMAP1: DNA methyltransferase 1-associated protein 1
DMEM: Dulbecco modified Eagle medium
DNA-PK : DNA-dependent protein kinase
dNMPs: deoxyribonucleoside monophosphates
DNMT1: DNA methyltransferase 1
Dot1 : disruptor of telomeric silencing 1
Dpf3: Double PHD finger protein 3
DTT: dithiothreitol
Eaf: esa1 associated factor
Elp3: elongator protein 3
EPC:Enhancer of polycomb
Ep11: Enhancer of Polycomb-like-1
Esa1: essential SAS2-related acetyltransferase 1
FACT : facilitate transcription
FBS: Fetal bovine serum
GAL1: Galactose kinase 1
GAS41: Glioma-amplified sequence 41
Gcn5 : general control nonderepressible 5
GST : glutathione S Transferase
HAS: helicase-SANT
HAT: histone acetyltransferase
hBAF53: BRG1-associated factor A, 53kDa
HBO1: histone acetyltransferase Bound to ORC1
hBRM : human brahma
Hda1: histone deacetylase-A
HDAC: Histone deacetylase
HIF: Hypoxia-inducible factor
HIRA : histone cell cycle regulation defective homolog A
HOX: homeobox
HP1: heterochromatin protein 1
Hpa: Histone and other Protein Acetyltransferase
HRP: Horseradish peroxidase
HSQC: ¹H, ¹⁵N heteronuclear single quantum coherence
Hzt1: yeast H2AZ 1
IgG: Immunoglobulin G
Ikb: inhibitor of kB
ING: Inhibitor of growth
INO08: inositol 80
IOC4: ISWI one complex protein 4

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
ISWI: imitation SWI
Jmj: Jumonji
Kac: lysine acetylation
KAT: Lysine acetyltransferase
kb: kilobase
Kme: Lysine methylation
KMT: lysine methyltransferase
LSD1: lysine specific demethylase
Mb : mégabase
MBT : malignant brain tumor
MCM : minichromosome maintenance
MDC1: Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MDM2: Mouse double minute 2 homolog
MEF2: Myelin expression factor 2
MOF: male on the first
MORF: Monocytic leukemia zinc finger protein-related factor
MOZ: monocytic leukemia zinc finger
MRG15: MORF related gene on chromosome 15
MRGBP: MORF related gene binding protein
MSL : male specific lethal
Myb : myeloblastosis
myoD : Myoblast determination protein
MYST: MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et TIP60
Nap1: nucleosome assembly protein 1
NASP: nuclear autoantigenic sperm protein
N-CoR: nuclear receptor co-repressor
NER: nucleotide excision repair
NF-KB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLS: nuclear localization signal
nm : nanomètre
NMR: Nuclear magnetic resonance
NoRC: nucleolar remodeling complex
NuA3/4 : nucleosome acetyltransferase of H3/H4
NuRD: Nucleosome Remodeling and Deacetylase
NURF: nucleosome remodeling factor
NURF: Nucleosome-remodeling factor
Nut1: Negative regulation of URS Two 1
ORC1 : origin recognition complex 1
PBAF: Polybromo-associated BRG1-associated factor
PBS: phosphate-buffered saline

PCAF: p300/CBP associated factor
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR: Polymerase chain reaction
PHD : plant homeodomain
PHF: PHD finger protein
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride
PRC : *Polycomb Repressive Complex*
PRMT: Protein arginine N-methyltransferase
PTM: post-translational modification
PZP: PHD-Zn Knuckle-PHD
Rad6: radiation 6
Rb : retinoblastoma
RING: Really Interesting New Gene
Rme: Arginine methylation
RNA: Ribonucleic acid
RNF: Ring Finger
RPB1: RNA binding protein 1
Rpd3: reduced potassium dependency 3
RSC: remodel the structure of chromatin
RSF: Remodeling and Spacing Factor
RT-PCR: Reverse transcription PCR
Rtt: regulation of Ty1 transposition
SAGA: Spt, Ada, Gcn5 et acetyltransferase
SANT: Swi3, Ada2, N-Cor TFIIIB
SAP130: Sin3-associated polypeptide p130
Sas : something about silencing
SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis
Set: su(var), enhancer of zeste, trithorax
Sgf29: SAGA-associated factor 29
shRNA: short hairpin RNA
siARNs: silencing ARN
Sin3: swi-independent 3
Sir : silent information regulator protein
SIRT1: sirtuin-1
SLIK: SAGA-like
SMN: Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N
SMRT: Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SNF : sucrose non fermenting
SPF30: Survival of motor neuron-related-splicing factor 30
Spt : suppressor of Ty
SRCAP: snf2-related CBP activator protein

STAT1: Signal transducer and activator of transcription 1
Sth1: Snf2 (two) homolog 1
SUV39H1: Suppressor of variegation 3-9 homolog 1
SWI : mating type switching
SWR1 : Swi2/Snf2-related ATPase 1
TAF: TBP-associated factors
TAP: Tandem affinity purification
TDRD3: Tudor domain-containing protein 3
TFTC: TATA-binding protein-free TAF-containing *complex*
TIF2: Transcriptional intermediary factor-2
Tip60: Tat interacting protein (60kDa)
TRIM: Tripartite motif
TRRAP: transformation/transactivation domain associated protein
TSS: Transcription start site
TTD : Tandem tudor domain
UHRF1: Ubiquitin-like-containing PHD and RING finger domains protein 1
UV: Ultraviolet
VHL: Von Hippel-Lindau
Vsp75: vacuolar protein sorting 75
WDR5: WD repeat-containing protein 5
WICH: WSTF-ISWI chromatin remodeling complex
Wnt : Wingless-related integration site
WT: Wild type
Ybf2: yeast binding factor
Yng: yeast homolog of mammalian ING1

À ma fille

La chance ne sourit qu'aux esprits bien préparés

LOUIS PASTEUR

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Jacques Côté qui m'a donné l'opportunité d'effectuer mon doctorat dans son laboratoire. Merci surtout d'avoir pris tout le temps nécessaire, que ce soit simplement pour discuter ou pour répondre à mes questions, je t'en suis très reconnaissante. Toutes nos discussions m'ont bien entendu transmis ta passion pour notre domaine de recherche, mais m'ont également permis d'apprendre la rigueur et l'intégrité scientifique qui t'habitent. Tu as été pour moi un directeur de thèse exceptionnel, qui a su avoir confiance en moi et être à l'écoute.

Un grand merci également à mes collègues de travail, avec qui j'ai pu échanger sur de nombreux sujets. J'ai eu la chance d'être entourée pendant toute ma thèse de gens passionnés et qui aiment parler « science ». J'ai donc pu évoluer dans un environnement idéal et des plus stimulants. Un merci particulier à Céline, pour ton aide, ton écoute et ton soutien matinal...

Bien entendu mes remerciements suivants vont à l'endroit de ma famille. J'ai toujours pu compter sur leur soutien tout au long de mes études. Maman et Papa, vous avez toujours valorisé l'éducation de vos enfants, et je ne serais pas parvenue aussi loin dans mon cheminement scolaire sans votre appui inconditionnel. Je ne vous remercierai jamais suffisamment pour tous les sacrifices que vous avez faits pour moi au cours de ces années. Merci aussi à ma sœur, qui malgré la distance Québec-Montréal, a toujours pris de mes nouvelles et a partagé avec moi mes réussites et mes échecs. Ton soutien m'a été d'une aide précieuse. Finalement, un grand merci à Guillaume de m'avoir aidé à relever ce défi, mais aussi pour ta patience, ton sens de l'écoute et ton soutien inestimable. Tu as toujours été là pour moi, autant dans les moments difficiles que dans les bons et je t'en suis infiniment reconnaissante. C'est aussi grâce à toi si j'ai su garder un équilibre de vie « raisonnable » au cours de ces années, ce qui n'est pas peu dire! Je t'aime profondément et j'ai maintenant hâte aux prochains beaux défis qui nous attendent.

Avant-Propos

L'article de synthèse présenté dans le chapitre 2 porte sur les domaines de reconnaissance d'histone. J'ai été chargée d'écrire les sections portant sur les rôles fonctionnels de ces domaines dans la cellule, suite à l'invitation du Dre Kutateladze. Cet article de synthèse a été publié en décembre 2012, dans le volume 19 numéro 12 de la revue *Nature Structural & Molecular Biology*.

L'article présenté dans le chapitre 3, dont je suis co-première auteure avec Nikita Avvakumov, a été publié dans l'édition de décembre 2012 de la revue *Molecular and Cellular Biology* (*Mol. Cell. Biol.* 2012, 32(3):689-703.) J'ai participé à la réalisation des expériences pour les figures 3(B-F), 7(B-E) et 8 (en totalité), alors que Nikita a réalisé les expériences pour les figures 2 (en totalité), 6(A-C) et 7(A). Nehmé Saksouk a réalisé les expériences pour les figures 4, 5(A), 6(F-G), alors qu'Anne-Julie Landry a fait les expériences pour les figures 7(C-D). Geneviève Robitaille a fait les expériences pour les figures 6(D-E), sous la supervision du Dr Darren E. Richard et Karen C. Glass a produit les expériences de NMR de la figure 5B, sous la supervision du Dre Tatiana G. Kutateladze. Yannick Doyon et Christelle Cayrou ont participé à la construction de plusieurs plasmides utilisés au cours de ces expériences. Finalement, Eric Paquet a effectué la majorité des analyses bio-informatiques nécessaires pour les figures 6 et 8.

Le troisième article présenté dans le chapitre 4 a été accepté pour publication par la revue scientifique *Genes and Development* au moment du dépôt de cette thèse. En tant que première auteure, j'ai participé à l'écriture du manuscrit ainsi qu'à la réalisation des figures. De plus, j'ai réalisé les expériences pour les figures 4-1(g), 4-2(au complet), 4-3(c-g), 4-4(au complet), 4-5(a-c), 4-6(a, b, d), 4-7(au complet) ainsi que les figures supplémentaires S4-2 à S4-7. Nikita Avvakumov a réalisé les expériences pour la figure 4-6c, France-Hélène Joncas a réalisé les expériences pour la figure 4-5(d,e). Dans l'équipe du Dre Tatiana G. Kutateladze, Karen C. Glass, Michael Holliday, Brianna J. Klein et Qiong Tong ont réalisés les expériences pour la figure 4-1(d-f, h) ainsi que S4-1. Nehmé Saksouk a réalisé les expériences pour la figure 4-1(c) et Eric Paquet a procédé à l'analyse des résultats de séquençage à haut débit nécessaires pour les figures 4-3 et S4-2. Le complexe

recombinant exprimant la protéine Epl1 tronquée utilisée pour la figure 4-6d a été fournie par le laboratoire du Dr Song Tan. Finalement, plusieurs constructions GST- PHD ou PZP utilisées dans cet article ont été faites par Kezhi Yan du laboratoire du Dr Xiang-Jiao Yang.

Chapitre 1

Introduction

1.1. Structure et dynamique de la chromatine

Chacune des cellules de notre corps contient une grande quantité d'ADN. Malgré sa taille énorme, cette molécule est tout de même circonscrite à l'intérieur du noyau, mesurant à peine quelques microns. Ceci est vrai non seulement pour les cellules humaines, mais aussi pour l'ensemble des organismes eucaryotes, qui par définition, possèdent tous un noyau. Afin d'empaqueter cet ADN, la cellule utilise principalement de petites protéines appelées histones. Ces histones, grâce à leur grande affinité pour l'ADN, vont permettre son enroulement ainsi que la création de structures secondaires qui compacteront la molécule à l'intérieur du noyau. C'est l'assemblage de l'ADN avec l'ensemble de ces protéines que l'on nomme chromatine.

1.1.1. Composition de la chromatine : Histones et nucléosome

Les histones sont de petites protéines que l'on trouve en quantité abondante dans la cellule. Il existe cinq classes d'histones : les histones H1/H5, H2A, H2B, H3 et H4. Globalement, les histones sont structurées dans leur partie centrale sous forme d'hélices alpha permettant ainsi leur dimérisation, à l'exception de la famille H1/H5. Les histones H3, H4, H2A et H2B se regroupent ensemble en octamère formé de deux dimères d'histone H3-H4 lesquels s'assemblent en tétramère et auquel s'ajoute deux dimères d'histones H2A-H2B. Cet octamère protéique permet l'enroulement de 146 paires de base d'ADN pour former l'unité de base de la chromatine, c'est-à-dire le nucléosome (Luger et al. 1997) (Figure 1-1). À l'extérieur du corps globulaire central, les extrémités N- et C-terminales (ou queues) des histones sont beaucoup moins structurées et se retrouvent exposées à la surface du nucléosome, leur permettant d'interagir avec d'autres protéines qui s'associent à la chromatine. L'empaquetage de l'ADN se faisant sur différents niveaux de complexité, les histones H1 et H5 vont permettre la liaison entre les différents nucléosomes et ainsi favoriser un niveau de compaction supplémentaire dans la structure de la chromatine.

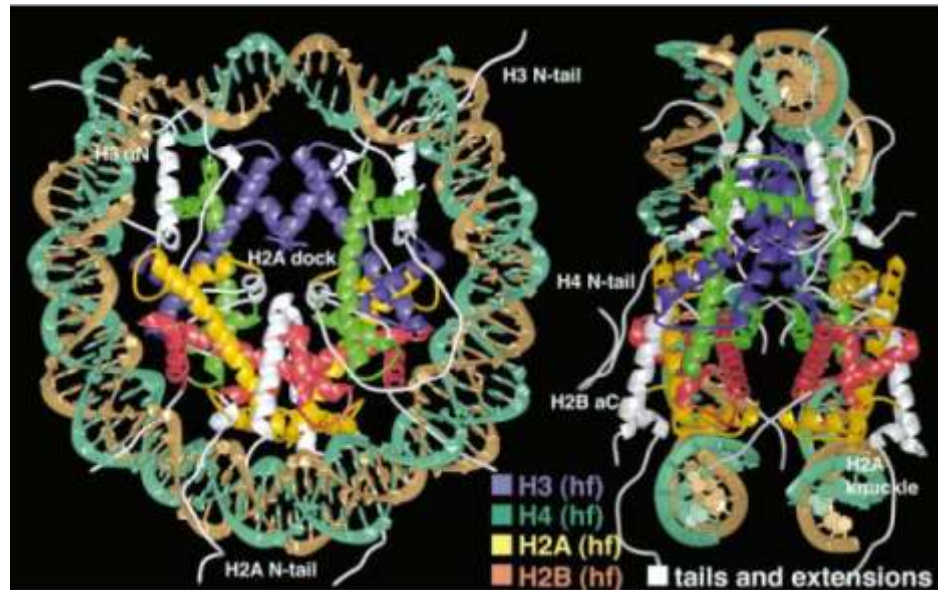


Figure 1-1. Structure et composition du nucléosome.

L'octamère d'histones est composé du tétramère H3-H4 et de deux dimères H2A-H2B autour desquels s'enroulent 146 paires de base d'ADN. Les queues N-terminales des histones se retrouvent à la surface du nucléosome. (Tiré de (Luger et al. 2000)).

1.1.2. Fonctions de la chromatine

Tel que mentionné ci-haut, la chromatine permet tout d'abord l'empaquetage de l'ADN à l'intérieur du noyau cellulaire. Il existe plusieurs niveaux de compaction de la chromatine. Malgré que leur formation ne soit pas tout à fait bien comprise, chacun de ces niveaux possède des caractéristiques physiques uniques (Figure 1-2). Le nucléofilament, formé des octamères d'histones autour desquels s'est enroulé l'ADN, forme une structure secondaire de 10 nm qui, au microscope, rappelle la forme d'un collier de perles. Il se forme ensuite une structure beaucoup plus dense au microscope appelée fibre de 30 nm, créée entre autre par les histones de liaisons H1 et H5 qui favorisent les liens inter-nucléosomiaux et par la queue N-term de l'histone H4 qui participe également à la compaction de la chromatine (Dorigo et al. 2003). À un niveau encore supérieur, cette fibre s'enroule sur elle-même pour former d'éventuelle boucles de chromatine qui vont ultimement mener à la formation des chromosomes mitotiques. En effet, c'est lors de la mitose que le niveau de compaction de la chromatine est à son maximum, facilitant ainsi la division de l'ADN dans les deux cellules filles. On nomme hétérochromatine la structure plus dense et donc ordinairement moins transcrite formée par les niveaux de compaction supérieurs. À l'opposé, on appelle

généralement euchromatine, la chromatine moins dense et donc plus accessible pour différentes protéines tel que des facteurs de transcription (transcriptionnellement active).

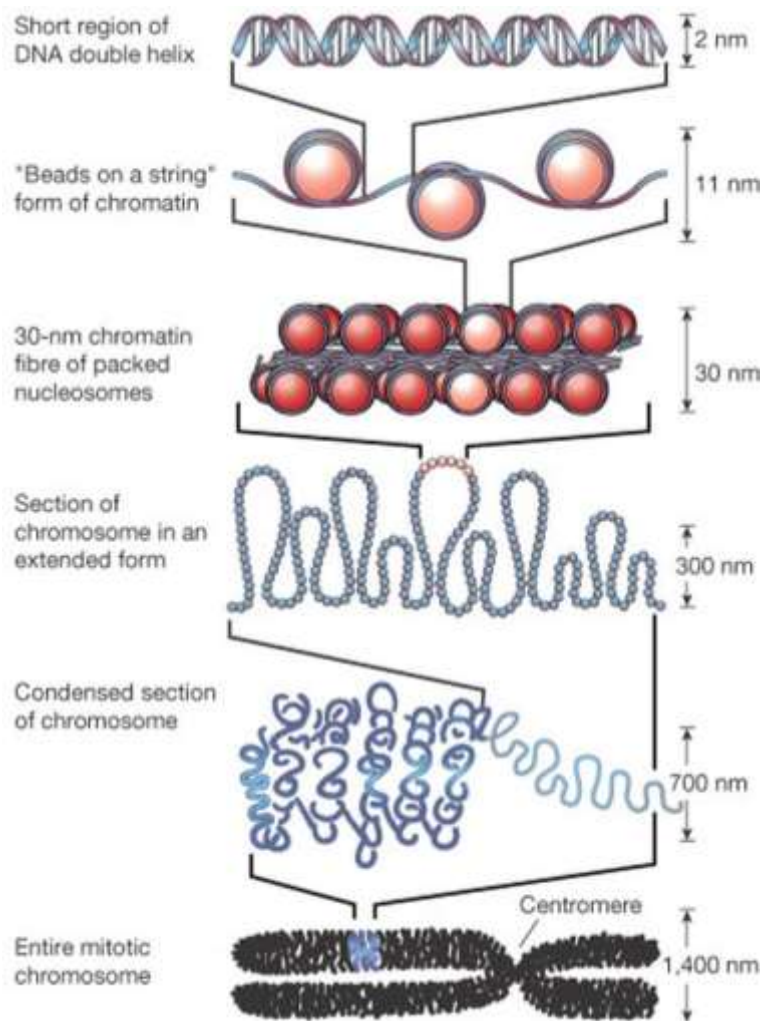


Figure 1-2. Niveaux organisationnels de la chromatine à l'intérieur du noyau.

Les différents stades de condensation de l'ADN double hélice jusqu'au chromosome mitotique montrent un enroulement de l'ADN autour des histones suivi de la formation de boucle qui permettent cet empaquetage serré. (Tiré de (Felsenfeld and Groudine 2003)).

La régulation de l'accessibilité pour différents facteurs protéiques est donc une autre des fonctions importantes de la chromatine. Plusieurs processus cellulaires tel que la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN nécessitent un contact direct avec celui-ci. En effet, chacun de ces processus a besoin que la chromatine soit dans un état décondensé et « ouvert » afin de permettre aux différentes protéines effectrices telles que les polymérases transcriptionnelles, répliquatives et réparatrices de pouvoir accéder à la

molécule d'ADN. Plusieurs facteurs interviennent dans la régulation de cette accessibilité. Tout d'abord, l'ADN peut être méthylé et les différentes histones peuvent être modifiées de façon post-traductionnelles et ainsi moduler leurs interactions réciproques. Il existe également des variants d'histones, des chaperons d'histones ainsi que des facteurs de remodelage de la chromatine qui participent aussi à réguler la condensation et l'accès à la chromatine. Nombreux de ces acteurs participant à faire fluctuer l'accessibilité à la chromatine et sont décrits en détails dans les sections suivantes.

1.1.3. Variants d'histones

Les histones H2A, H2B, H3 et H4 constituant communément le nucléosome sont dites « canoniques ». Les gènes encodant pour ces histones se retrouvent dans le génome sous forme de groupes de répétition et sont transcrits au cours de la phase de réplication de l'ADN (phase S) du cycle cellulaire. Ces histones sont également incorporées dans la chromatine au cours de cette même phase. Au cours de l'évolution, les gènes d'histones ont évolué de telle sorte que les organismes ont pu développer des variants d'histones (Malik and Henikoff 2003). Ces variants, possédant des propriétés distinctes des histones canoniques, ont permis à ces organismes d'ajouter de la diversification à la structure et à la régulation de leur chromatine. Contrairement aux gènes d'histones canoniques, les gènes des variants d'histones se retrouvent en faible nombre de copies ou en copie unique dans le génome. De plus, leur transcription n'est pas couplée à la réplication de l'ADN et a lieu tout au long du cycle cellulaire. Les histones H2A et H3 possèdent différentes isoformes bien caractérisées, alors que celles de l'histone H2B sont très peu définies et sont seulement retrouvées dans les tissus testiculaires chez l'humain (H2B.1, H2B.W) (Skene and Henikoff 2013). Pour sa part, l'histone H4 ne semble pas avoir acquis de variants au cours de l'évolution. Tous ces variants semblent aujourd'hui importants non seulement pour moduler l'interaction des nucléosomes avec la chromatine, mais sont aussi impliqués dans différents processus cellulaires et développementaux.

1.1.3.1. Les variants de l'histone H2A

L'histone H2A possède la plus grande famille de variants. Contrairement aux autres familles de variants, les isoformes de l'histone H2A sont les plus divergentes et structurellement différentes de leur histone canonique (Bonisch and Hake 2012)

(Vardabasso et al. 2013). Ceci confère donc à ses variants un rôle important dans plusieurs processus biologiques. Chez l'humain, les plus connus de ces variants sont H2A.Z, H2A.X ainsi que macroH2A. L'histone H2A.Z est principalement incorporée au niveau des sites d'initiation de la transcription (TSS) dans les nucléosomes qui entourent la région dépourvue de nucléosome (« nucleosome free region », NFR), permettant soit l'activation, soit la répression de certains gènes (voir aussi Figure 1-5) (Talbert and Henikoff 2010). Également déposé dans des régions d'hétérochromatine subtélomériques, l'homologue de ce variant chez *S. cerevisiae* (htz1) a aussi montré un rôle dans l'arrêt de la propagation de ces régions réprimées (Venkatasubrahmanyam et al. 2007). De plus, H2A.Z semble être impliqué dans d'autres fonctions cellulaires telles que la réparation des cassures double-brin, la stabilité du génome et la ségrégation des chromosomes (Talbert and Henikoff 2010).

Le variant d'histone H2A.X joue pour sa part un rôle bien caractérisé dans la réparation de l'ADN. En effet, ce variant possède une région C-terminale distincte de l'histone H2A canonique qui présente un motif de reconnaissance (SQ(E/D)(I/L/Y)) pour les kinases ATM/ATR/DNA-PK impliquées dans la signalisation de cassures à l'ADN. La sérine de ce motif est rapidement phosphorylé en réponse à un bris de l'ADN, c'est ce que l'on appelle alors γ H2A.X. Cette marque d'histone se propagera ainsi sur 1-2Mb d'ADN et permettra le recrutement de la machinerie de réparation de l'ADN. Mis à part son rôle démontré dans la réparation, H2A.X jouerait aussi un rôle lors de la méiose dans l'inactivation du chromosome mâle (Fernandez-Capetillo et al. 2003). Fait intéressant à noter, la drosophile possède un variant d'histone hybride entre H2A.Z et H2A.X appelé H2Av. Ce variant ressemble davantage à H2A.Z mais sa région C-terminale possède le motif de phosphorylation retrouvé chez H2A.X.

Le variant macroH2A est retrouvé sur le chromosome X inactif dans les cellules femelles de mammifères (Costanzi and Pehrson 1998). Ce variant joue un rôle dans le maintien de la répression des gènes présents sur ce chromosome. Il est aussi incorporé au niveau de gènes responsables de la pluripotence lors du développement, permettant leur répression et donc la différenciation cellulaire (Pasque et al. 2012).

1.1.3.2. Les variants de l'histone H3

L'histone H3 possède elle aussi deux variants majeurs, soit le variant CENP-A et l'histone H3.3. CENP-A ne possède que 60% d'homologie avec l'histone H3 canonique et est retrouvée exclusivement aux centromères des chromosomes où elle est responsable de leur maintien et de leur formation (Black and Cleveland 2011). Ce variant est également responsable de la liaison aux kinétochores lors de la mitose (Talbert and Henikoff 2010). Chez la levure ainsi que chez la drosophile, l'homologue Cse4 fait en sorte que l'ADN s'enroule dans le sens anti-horaire autour des nucléosomes, alors que CENP-A confère un enroulement horaire classique à l'ADN autour du nucléosome (Furuyama and Henikoff 2009).

Pour ce qui est du variant H3.3, il diffère de l'histone H3 canonique (H3.1) de par seulement 5 acides aminés. Ces acides aminés sont pour la plupart localisés à l'interface d'interaction H3-H4. Ceci a pour effet de créer une spécificité d'interaction de ce variant avec différentes chaperones d'histones (Elsasser et al. 2012; Liu et al. 2012a). Les nucléosomes possédant le variant H3.3 sont principalement retrouvés dans les régions promotrices des gènes actifs où ils mettent en place, conjointement à H2A.Z, un environnement propice au recrutement de facteur de transcription (Jin et al. 2009; Tachiwana et al. 2011). On retrouve également H3.3 dans certaines régions comme les télomères et dans la chromatine péri-centromérique. Le rôle de ce variant à ces endroits est moins caractérisé, mais certaines évidences expérimentales portent à croire qu'il serait aussi responsable de réguler la transcription de gènes présents à ces endroits (Drane et al. 2010; Lewis et al. 2010). Finalement, une particularité majeure du variant H3.3 vient du fait que, contrairement à l'histone canonique, il peut être incorporé indépendamment de la réplication de l'ADN (phase S) (Tagami et al. 2004).

1.1.4. Complexes de remodelage ATP-dépendants

En plus des variants d'histones qui participent à la régulation de la structure de la chromatine, celle-ci est régulée de façon dynamique par des complexes de remodelage. Ceux-ci permettent la restructuration de la chromatine en déplaçant ou en éjectant des nucléosomes, ainsi qu'en déroulant l'ADN empaqueté autour des nucléosomes (Figure 1-3). Ces actions peuvent donc moduler l'accessibilité de certaines protéines à l'ADN, tels

que des facteurs de transcription ou des protéines de réparation. De plus, ils participent à l'ajout de variants d'histones au sein de la chromatine et jouent donc un rôle majeur dans sa régulation.

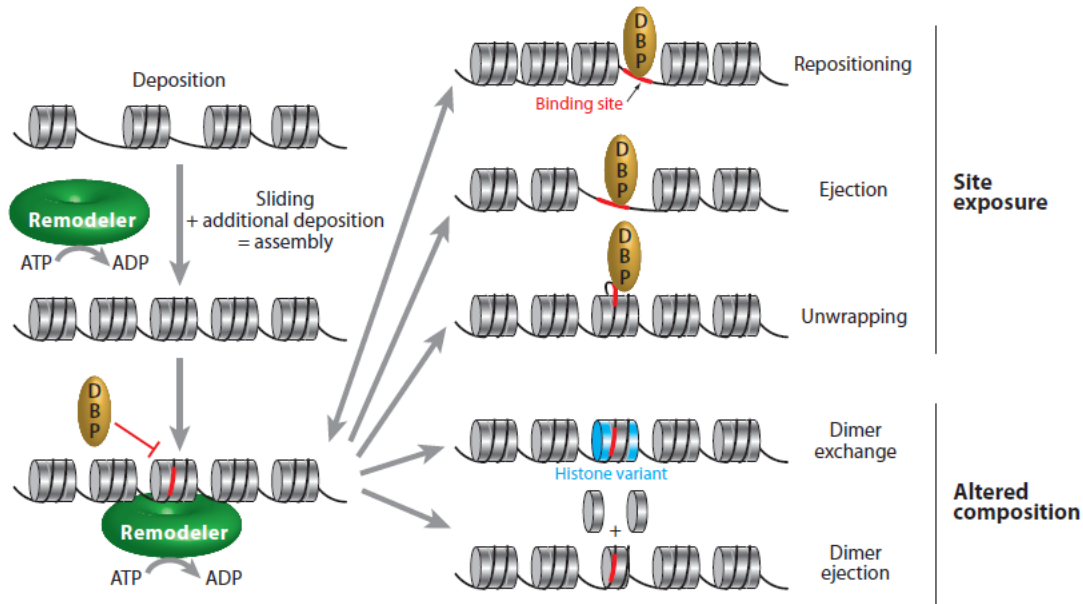


Figure 1-3. Mécanismes d'action des complexes de remodelage de la chromatine.

Les complexes ATP dépendants permettent le déplacement ou l'éviction de nucléosomes sur la chromatine, ce qui permet une accessibilité pour des protéines liant l'ADN (DBP). Par ces mécanismes, ils contribuent à l'échange et au dépôt de variants d'histones sur la chromatine, modifiant ainsi sa composition. (Tiré de (Clapier and Cairns 2009).)

1.1.4.1. Différentes familles de complexes de remodelage de la chromatine

Il existe 4 grandes familles de complexes de remodelage de la chromatine, celles-ci étant très conservées de la levure à l'humain, et tous utilisant l'hydrolyse de l'ATP pour exercer leurs fonctions. Ces familles ont donc en commun un domaine ATPase qui sert de moteur pour déplacer l'ADN et briser les interactions ADN-histone. Certaines caractéristiques des complexes de remodelage rejoignent toutes les familles, comme par exemple le fait qu'elles ont toutes une affinité pour les nucléosomes. Elles renferment également chacune des domaines de reconnaissance pour des modifications post-traductionnelles des histones ainsi que des domaines d'interactions avec d'autres protéines. De plus, tous les complexes de remodelage de la chromatine, comme leurs noms l'indiquent, se retrouvent sous la forme de complexes multi-protéiques, à l'image des complexes de modification de la chromatine. Par

contre, chacune de ces familles possède des domaines protéiques uniques ou des fonctions biologiques précises qui les distinguent.

La première famille est celle des complexes de remodelage SWI/SNF. Chez l'humain, il existe deux grandes enzymes ATPases faisant partie de cette famille, hBRM ou BRG1, qui forment soit les complexes BAF et PBAF. Chez la levure les deux enzymes sont Snf2 ou Sth1, qui forment respectivement les complexes SWI/SNF et RSC. Ces ATPases possèdent un domaine HSA (helicase-SANT) ainsi qu'un bromodomaine en C-term. De plus, les protéines humaines interagissent à la fois avec une protéine d'actine et avec une protéine ARP (hBAF53, actin-related protein). Cette famille est impliquée dans plusieurs activités d'éjection ou de déplacement de nucléosomes. La majorité des fonctions biologiques identifiées jusqu'à ce jour pour les complexes BAF/PBAF humains sont au cœur des processus transcriptionnels autant pour son activation que lors de l'élongation (Kwon et al. 1994; Corey et al. 2003; Hsiao et al. 2003). Des rôles dans le développement et la différenciation cellulaire ont aussi été montrés (de la Serna et al. 2001; Lickert et al. 2004; Lessard et al. 2007; Huang et al. 2008). En plus de leur rôle transcriptionnel, le complexe SWI/SNF a un rôle dans la réplication de l'ADN (Flanagan and Peterson 1999) ainsi que dans la réparation de l'ADN (Chai et al. 2005) et le complexe RSC a un rôle dans la réparation de l'ADN (Chai et al. 2005; Shim et al. 2007) ainsi que dans la ségrégation des chromosomes lors du cycle cellulaire (Hakimi et al. 2002; Huang et al. 2004).

La deuxième grande famille est appelée ISWI et contient 2 ATPases chez l'humain, soit SNF2L ou SNF2H, qui forment les complexes NURF, CHRAC, ACF, NoRC, RSF et WICH. Cette famille porte son nom dû à l'homologie avec l'ATPase équivalente découverte chez la drosophile, Imitation SWI. Chez la levure, on retrouve les ATPases Isw1 et Isw2, qui forment les complexes ISW1a, ISW1b et ISW2. Les domaines caractéristiques de cette catégorie d'ATPase se trouvent en C-term, un domaine SANT et un domaine SLIDE qui ensemble permettent la liaison aux queues d'histones non modifiées (Boyer et al. 2004). Alors que les complexes de levure ISW1a/b semblent jouer un rôle activateur dans la transcription (Moreau et al. 2003; Morillon et al. 2003), le complexe ISW2 semble au contraire avoir davantage un rôle de répresseur transcriptionnel (Goldmark et al. 2000; Fazzio et al. 2001; Whitehouse et al. 2007). De plus, les complexes ISW2 ainsi

que ACF, WICH et NoRC jouent un rôle dans la réplication de l'ADN (Bozhenok et al. 2002; Collins et al. 2002; Li et al. 2005; Vincent et al. 2008). Finalement, le complexe ACF possède un rôle dans l'assemblage des nucléosomes (Fyodorov and Kadonaga 2002; Maier et al. 2008).

Les complexes de remodelage de la famille CHD ont comme caractéristique principale, la présence d'un tandem de chromodomaines à l'extrémité N-term de l'enzyme. À l'instar de la protéine CHD1 de levure qui est monomérique et qui existe également chez l'humain, le complexe NuRD de cette famille est composé de plusieurs sous-unités chez l'humain. Si certains de ces complexes CHD peuvent glisser le long de la chromatine pour permettre l'éviction de nucléosomes et activer ainsi la transcription (Simic et al. 2003; Walfridsson et al. 2007), d'autres sont plutôt impliqués dans un mécanisme de répression transcriptionnelle (Wade et al. 1999). Par ailleurs, un rôle dans le développement et la différenciation cellulaire est aussi caractérisé pour le complexe NuRD (Fujita et al. 2004; Kaji et al. 2006; Yoshida et al. 2008).

La dernière famille de complexes de remodelage est INO80. La caractéristique principale des enzymes faisant partie de cette famille est que le domaine ATPase est divisé en deux parties, où une longue insertion permet la liaison de protéines Rvb1/2 et de protéines ARPs (Jonsson et al. 2004). Chez la levure, il existe deux grands complexes dans cette famille, soit INO80 et SWR1 (les enzymes portant les mêmes noms que les complexes). Chez l'humain, on retrouve aussi INO80, mais également SRCAP et TIP60, qui contiennent p400. Fait intéressant à noter, la protéine de remodelage SWR1 et le complexe MYST acétyltransférase NuA4 qui sont séparés chez *S. cerevisiae*, ont fusionné au cours de l'évolution pour former un seul grand complexe chez l'humain appelé TIP60-p400 (Doyon et al. 2004). En effet, TIP60 contient non seulement une activité acétyltransférase analogue à NuA4, mais sa sous-unité p400 est l'homologue de SWR1. Même si SWR1 est similaire à INO80, il possède la fonction unique d'éviction des dimères de nucléosomes H2A-H2B et les remplace par le variant dimérique H2A.Z-H2B (Kobor et al. 2004; Mizuguchi et al. 2004). De plus, les deux complexes sont recrutés au niveau du variant γ H2A.X lors de la réparation de l'ADN (Downs et al. 2004; Morrison et al. 2004; van Attikum et al. 2004;

Papamichos-Chronakis et al. 2006). Finalement, le complexe INO80 a aussi un rôle caractérisé dans l'activation de la transcription (Cai et al. 2007).

1.1.5. Les chaperons d'histones

Les derniers acteurs participant à la dynamique de la chromatine sont les chaperons d'histones. Ces petites protéines participent à l'assemblage de la chromatine en aidant au dépôt et à l'éviction des histones de l'ADN, mais contrairement aux complexes de remodelage de la chromatine, leur activité ne requiert pas la présence d'ATP. Au cours de différents processus cellulaires, les chaperons d'histones sont donc responsables de la prise en charge des histones qui sont détachées de la chromatine, mais sont également responsables du transport de nouvelles histones vers la chromatine.

Il existe plusieurs différents chaperons d'histones et tous ont une spécificité d'interaction pour certains dimères particuliers d'histones. Les dimères H2A-H2B sont pris en charge par les chaperons FACT, Nap1, Chz1 (levure) et les nucléoplasmines. De plus, les dimères contenant les variants de l'histone H2A sont également pris en charge par quelques-uns de ces chaperons. Pour leur part, les dimères d'histones H3-H4 sont transportés par les chaperons Asf1, CAF-1, Rtt106 (levure), Vps75 (levure), Spt6, hNASP (yHif1 chez la levure), alors que les dimères contenant le variant H3.3 sont plutôt transportés par les protéines HIRA et Daxx.

Il existe différents processus cellulaires qui nécessitent l'éviction ou encore l'ajout d'histones à la chromatine et les chaperons se retrouvent donc au cœur de la régulation de ces procédés. Lors de la transcription des gènes, la machinerie d'initiation de la transcription a besoin d'un accès à l'ADN au niveau de la région promotrice des gènes. Cet accès est créé, entre autre, grâce à une coopération entre des complexes de remodelage de la chromatine, des complexes acétyltransférases ainsi que des chaperons d'histones. La chaperone Asf1 semble particulièrement importante pour l'initiation de la transcription, car elle a été montrée requise pour l'activation de certains gènes chez la levure (Adkins et al. 2004; Korber et al. 2006; Rufiange et al. 2007). Des évidences de la littérature suggèrent que le rôle d'Asf1 dans l'activation de la transcription passe également par sa modulation de la marque H3K56ac. Asf1 est requis pour l'acétylation de H3K56 par Rtt109 chez la

levure (Recht et al. 2006; Adkins et al. 2007; Tsubota et al. 2007; Das et al. 2009). Cette marque qui est présente au niveau des histones nouvellement synthétisées, déstabilise les nucléosomes une fois incorporée dans la chromatine. Asf1, en incorporant des histones possédant cette marque, faciliterait donc de nouvelles « vagues » d'initiation de la transcription. La présence de H3K56ac dans les cellules humaines reste toutefois controversée. L'ARN polymérase doit avoir elle aussi un accès direct à l'ADN et les nucléosomes doivent donc être déplacés pour permettre l'élongation de la transcription. Ce sont les chaperons FACT et Spt6 qui semblent plutôt intervenir dans ce processus et plusieurs études ont montré qu'ils collaborent pour enlever les nucléosomes présents devant l'ARNpolIII et pour les remettre suite à son passage (Li et al. 2007a).

La réplication de l'ADN a aussi besoin que les nucléosomes soient enlevés en avant de la fourche de réplication et redéposés en arrière, à la fois sur le brin mère et sur le brin nouvellement synthétisé. Les hélicases de la réplication, les MCMs, éjectent les nucléosomes lors du déroulement de l'ADN et ces histones sont prises en charge par les chaperons FACT et Asf1, qui s'occuperont respectivement des dimères H2A-H2B et H3-H4 (Gambus et al. 2006; Groth et al. 2007). Les histones déposées en aval de la fourche sont un mélange de nouvelles et d'anciennes histones. Les nouvelles histones H3-H4 sont importées dans le noyau par la protéine chaperon NASP et ces dimères sont déposés par le chaperon CAF-1, qui interagit directement avec PCNA, le facteur de processivité de l'ADN polymérase (Rolf Ben-Shahar et al. 2009; Campos et al. 2010). Ce processus implique également la présence de H3K56ac sur les histones nouvellement synthétisées double-brin chez la levure (Li et al. 2008). Les dimères H2A-H2B sont pour leur part déposés par FACT et Nap1 (Alabert and Groth 2012).

Finalement, les chaperons d'histones sont également requis pour la réparation de l'ADN. Comme pour la transcription, cette implication se ferait en deux temps. En premier lieu pour l'accès à l'ADN de la machinerie de réparation lors d'un dommage et en deuxième lieu pour la redéposition d'histones suite à la réparation. Par contre, peu d'évidences dans la littérature relatent de l'importance des chaperons pour avoir accès aux sites de dommage à l'ADN (Avvakumov et al. 2011). Ce rôle revient principalement aux complexes de remodelage de la chromatine, tel que décrit précédemment (voir section

1.1.4). La restauration de la structure de la chromatine suite à la réparation du dommage est aidée par le chaperon FACT, qui remplace les dimères γ H2A.X-H2B par des dimères non phosphorylés (Heo et al. 2008). Les protéines Asf1 et CAF-1 participent également au processus de restauration de la chromatine et sont importantes pour désactiver les points de contrôles du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN. (Chen et al. 2008; Kim and Haber 2009).

1.1.6. Modifications post-traductionnelles des histones

Comme les queues N-terminales des histones sont exposées et à l'extérieur du nucléosome, celles-ci deviennent donc des cibles pour les enzymes qui ajoutent des modifications post-traductionnelles. Ces modifications, tout comme les variants d'histones, participent à la régulation de la structure de la chromatine et mais jouent aussi un rôle signalétique important pour divers processus cellulaires (Kouzarides 2007). Il existe aujourd'hui quatre grands types de modifications post-traductionnelles des histones soit l'acétylation, l'ubiquitination, la phosphorylation et la méthylation (Figure 1-4). Ces différentes modifications sont déposées de façon précise et spécifique à certains endroits du génome et vont non seulement influencer la structure de la chromatine, mais vont aussi servir de plateforme de recrutement pour différentes protéines possédant des domaines de reconnaissance pour ces modifications (voir Chapitre 2). Bien entendu, les enzymes qui déposent ces différents groupements sur les histones et qui créent ainsi des « marques d'histones » se trouvent au cœur de la régulation des fonctions de la chromatine.

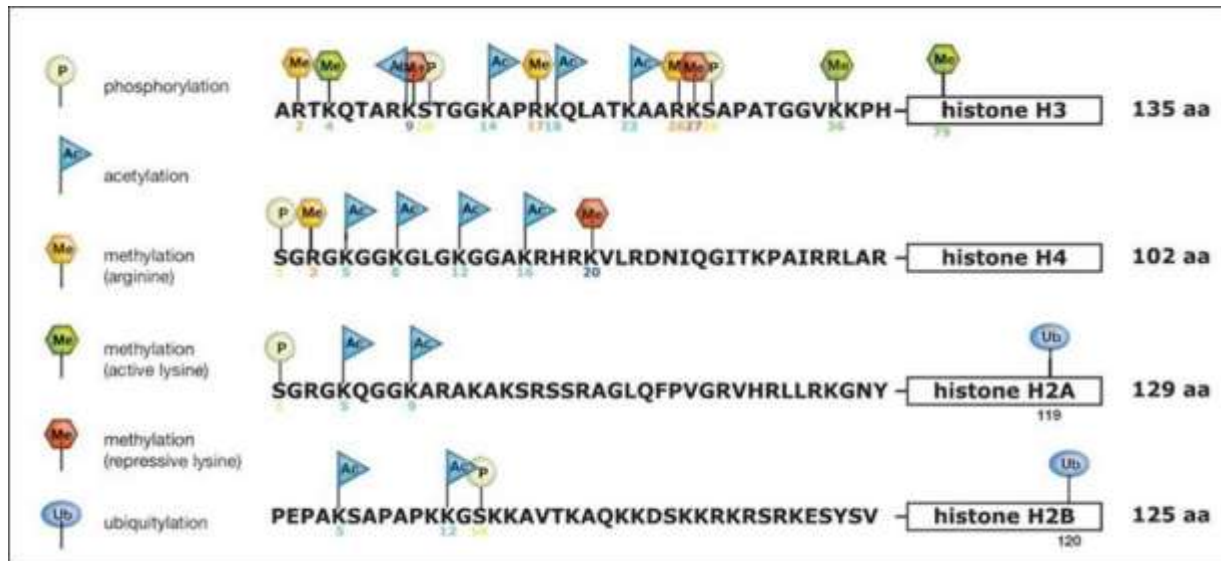


Figure 1-4. Modifications post-traductionnelles des histones.
(Tiré de (Allis 2007)).

1.1.6.1. La méthylation des histones

La méthylation consiste en un groupement méthyl qui s'ajoute soit aux résidus lysines ou arginines. Chacun de ces résidus peut subir soit une mono-, di- ou tri- méthylation (seulement les lysines pour la tri), ce qui augmente la diversité des modifications que l'on peut retrouver dans le génome. De plus, la di-méthylation des arginines peut être effectuée de façon symétrique ou asymétrique et certains domaines de reconnaissance de ces marque en feront la distinction (Couture et al. 2006; Han et al. 2006; Schuetz et al. 2006; Zhao et al. 2009). Contrairement à d'autres modifications, la méthylation n'altère pas la charge des résidus, mais affecte plutôt leur caractère hydrophobe ainsi que leur taille. Plusieurs enzymes méthyltransférases sont responsables de la méthylation spécifique de ces différents résidus d'histones, tandis que la déméthylation est assurée par des déméthylases. La première méthyltransférase identifiée a été SUV39H1 (KMT1A) chez la souris et chez l'homme (Rea et al. 2000). Il existe aujourd'hui plus d'une trentaine de ces méthyltransférases, la plupart identifiées par recherche d'homologie de séquence du domaine SET catalytique, retrouvé dans les méthyltransférases (Black et al. 2012). Il n'existe pour l'instant qu'une seule méthyltransférase qui n'a pas de domaine SET, soit hDot1L (humain) ou Dot1p (levure) (KMT4) (Lacoste et al. 2002; van Leeuwen et al. 2002; Okada et al. 2005). Chaque méthyltransférase possède une spécificité élevée de

substrat, certaines ne reconnaissant que des lysines déjà mono- ou di-méthylées. De plus, certaines peuvent ajouter plusieurs stades de méthylation à la même lysine, alors que d'autre ne pourront ajouter qu'un seul groupement méthyl. Puisque la méthylation est une marque très stable, les deux classes principales de déméthylases n'ont été identifiées que récemment. La première, LSD1, fonctionne avec un domaine amine oxidase (FAD)-dépendant, alors que la seconde, les Jumonji, utilise leur domaine JmjC pour oxyder les groupements méthyl à l'aide de l' α -kétoglutarate (Shi et al. 2004; Trewick et al. 2005; Tsukada et al. 2006; Whetstine et al. 2006; Cai et al. 2007). Les principales lysines méthylées se trouvent sur l'histone H3 (H3K4, K9, K27, K36, K79), alors que la lysine 20 est retrouvée méthylée sur l'histone H4. Bien entendu, cette multitude de marques d'histones est impliquée dans diverses fonctions cellulaires (voir également Chapitre 2).

Tout d'abord, la méthylation de H3K4 est une marque liée à l'activation transcriptionnelle des gènes à l'échelle du génome. Chez la levure, il n'existe qu'une seule méthyltransférase pour ce résidu, Set1, alors que chez les mammifères, six ont été identifiées jusqu'à maintenant (Ruthenburg et al. 2007a). Sa tri-méthylation est localisée principalement aux régions promotrices ainsi qu'autour des sites d'initiation de la transcription et sa présence est fortement corrélée avec le niveau d'expression des gènes, puisqu'elle participe au recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Figure 1-5) (Bernstein et al. 2002; Santos-Rosa et al. 2002; Liang et al. 2004; Vakoc et al. 2006). La distribution de la mono- et de la di-méthylation de H3K4 varient davantage entre les organismes. Chez *S. cerevisiae*, la di-méthylation recouvre une grande partie de la région codante des gènes et la mono-méthylation se concentre surtout autour de la région 3' des gènes (Pokholok et al. 2005). Chez les vertébrés, la majorité de la di-méthylation co-localise avec la tri-méthylation de H3K4 (Schneider et al. 2004). Il existe par contre certains sites où il y a présence de H3K4me2 sans H3K4me3, ces sites étant considérés comme régulateurs transcriptionnels ou enhanceurs (Bernstein et al. 2005; He et al. 2010b). On retrouve également de la mono-méthylation de H3K4 au niveau des enhanceurs de plusieurs gènes (Heintzman et al. 2007; Heintzman et al. 2009). La méthylation de la lysine 36 de H3 est elle aussi associée avec la transcription. Contrairement à H3K4me3, elle se retrouve principalement au niveau de la région codante des gènes et joue un rôle dans l'élongation (Kizer et al. 2005; Pokholok et al. 2005; Barski et al. 2007). La méthylation de la lysine 79 de H3, déposée par hDot1, est

impliquée au niveau de la transcription des gènes aux télomères et permet d'établir les frontières entre l'euchromatine et l'hétérochromatine (Ng et al. 2003; Altaf et al. 2007; Fingerman et al. 2007). De plus, cette marque joue également un rôle dans la réparation de l'ADN, en permettant entre autre le recrutement de la protéine 53BP1 ou de son orthologue de levure Rad9 via leur tandem de domaines Tudor (Huyen et al. 2004; Wysocki et al. 2005). Finalement, une fusion hDot1-MLL a été répertoriée dans certains cas de leucémies et entraîne une augmentation de la transcription du gène HoxA9 (Okada et al. 2005).

Contrairement aux méthylation de H3K4/K36/K79, les méthylation de H3K9 ainsi que de H3K27 sont impliquées dans la formation d'hétérochromatine et la répression transcriptionnelle (Peters et al. 2003; Roh et al. 2006). En effet, H3K9me permet principalement le recrutement de la protéine HP1 (via son chromodomaine), une protéine de structure de la chromatine responsable de la formation d'hétérochromatine (Lachner et al. 2001). De plus, H3K27me est retrouvée au niveau des promoteurs de certains gènes au cours du développement et participe à leur répression (Lee et al. 2006; Roh et al. 2006). La méthylation de H3K27 est effectivement très abondante dans les cellules souches embryonnaires, avec environ la moitié des histones di-méthylées et 15% mono ou tri-méthylées (Peters et al. 2003). Cette marque permet entre autre le recrutement des protéines de la famille des Polycomb (via leurs chromodomaines), PRC1 et PRC2 (Simon and Kingston 2009). Ces deux complexes protéiques non seulement peuvent lier H3K27me, mais participent également eux-mêmes à la modification de la chromatine. En effet, le complexe PRC1 est responsable d'ubiquitiner H2AK119, alors que le complexe PRC2 permet la di et la tri-méthylation de H3K27 et ensemble ils participent à la répression transcriptionnelle (Margueron and Reinberg 2011).

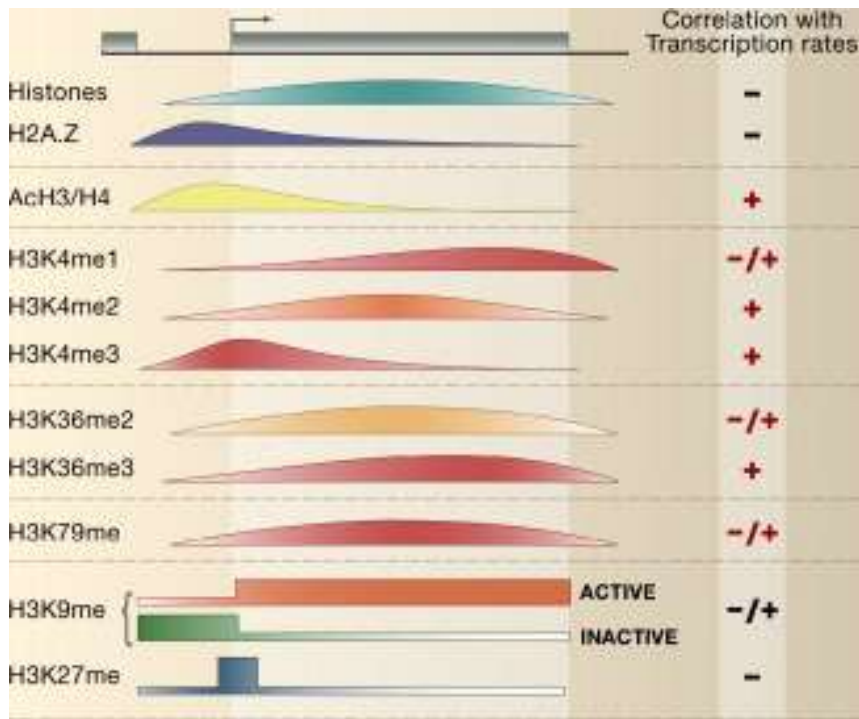


Figure 1-5. Distribution de certaines modifications post-traductionnelles des histones sur les régions promotrices et codantes des gènes.

La distribution des marques d'histones varie énormément autour des régions présentant de la transcription. La méthylation de H3K4 est particulièrement importante pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle, alors que la méthylation de H3K36 l'est tout autant pour l'élongation par l'ARN polymérase. Certaines marques comme H3K9me3 ou H3K27me3 participent à la répression transcriptionnelle. De plus, on retrouve le variant d'histone H2A.Z autour des sites d'initiation de la transcription ainsi que l'acétylation des histones présentes dans ces mêmes régions. (Tiré de (Li et al. 2007a).)

Finalement, la méthylation de la lysine 20 de H4 joue un rôle autant au niveau de la réplication de l'ADN, de la réparation, ainsi que dans la condensation de la chromatine et dans la régulation de l'expression des gènes (Botuyan et al. 2006; Yang and Mizzen 2009; Kuo et al. 2012). Ces fonctions passent entre autre par les liaisons des protéines ORC1 (réplication) ainsi que de 53BP1 (réparation) (voir chapitre 2, section 2.4.2). De plus, il a récemment été montré que la méthylation de la lysine 56 de l'histone H3 avait un rôle dans la réplication de l'ADN, en permettant la rétention du facteur de processivité de la réplication PCNA à la chromatine (Yu et al. 2012).

1.1.6.2. *L'acétylation des histones*

En plus d'être méthylées les lysines des histones peuvent aussi être acétylées. L'acétylation a lieu sur le groupement ϵ -amine des résidus, ce qui a pour effet de neutraliser la charge positive constitutive de cet acide aminé. Les groupements phosphates des acides nucléiques de l'ADN sont chargés négativement et interagissent normalement par liaisons électrostatiques avec le groupement amine de ces lysines. Une fois la charge neutralisée, la liaison histone-ADN est donc diminuée. Ceci affecte la stabilité des nucléosomes et la chromatine se retrouve alors dans un état davantage relâché. De plus, l'acétylation de la queue N-term de l'histone H4 influence aussi les liaisons inter et intra-nucléosomales, ce qui affecte les structures secondaires de la chromatine (Kan et al. 2009). Ce sont les enzymes acétyltransférases qui sont responsables d'ajouter un groupement acétyl, en utilisant l'acétyl-coenzyme A comme donneur. À l'inverse, les déacétylases enlèvent ces groupements acétyl et permettent aux lysines de retrouver leur charge positive.

Puisque l'acétylation déstabilise les nucléosomes, elle facilite l'accès pour plusieurs protéines nucléaires à l'ADN. Les régions promotrices sont donc acétylées de façon globale pour faciliter la liaison de facteurs de transcription ainsi que de la machinerie transcriptionnelle, et les niveaux d'acétylation corrént avec les niveaux de transcription (Figure 1-5). Les lysines acétylées servent également de plates-formes de recrutement pour les protéines qui possèdent des domaines de reconnaissance tels que les bromodomains (voir Chapitre 2). Chez la levure, l'acétylation aux promoteurs est d'ailleurs requise pour y recruter le complexe de remodelage SWI/SNF via le bromodomaine de sa sous-unité Snf2 (Hassan et al. 2002). Chez l'humain, la sous-unité BRG1 de SWI/SNF a aussi été montrée pour lier H4K8ac (Agalioti et al. 2002). La lysine 27 de l'histone H3 est aussi acétylée aux régions *enhancers* et corréle avec l'activation de la transcription (Creyghton et al. 2010). Lors de la transcription, l'acétylation permet aussi de déstabiliser les nucléosomes présents en avant de l'ARN polymérase afin d'aider leur éviction et faciliter le passage de la machinerie transcriptionnelle (Govind et al. 2007; Ginsburg et al. 2009). De plus, l'acétylation semble aussi participer au démarrage des fourches de réplication de l'ADN au niveau des origines et permet leur activation (Unnikrishnan et al. 2010). Une fois la transcription ou la réplication terminées, les histones nouvellement synthétisées sont déposées dans la chromatine via leur(s) chaperon(s). L'acétylation est également une

marque déposée sur les histones nouvellement synthétisées. L'acétylation des lysines 5 et 12 de l'histone H4 par Hat1 sur ces nouvelles histones est d'ailleurs très conservée de la levure à l'humain (Kleff et al. 1995; Sobel et al. 1995). À l'opposé, l'acétylation de la queue N-term de l'histone H3 n'est pas aussi bien conservée pour la déposition des histones. Les lysines 9 et 27 sont acétylées sur les nouvelles histones de levure, alors que l'acétylation d'H3 est difficilement détectable dans les cellules humaines (Sobel et al. 1995; Kuo et al. 1996; Xu et al. 2005). On retrouve également sur ces nouvelles histones l'acétylation de H3K56 déposée par Rtt109 chez la levure, alors que sa présence est encore controversée chez l'humain (Masumoto et al. 2005; Ozdemir et al. 2005; Xu et al. 2005; Driscoll et al. 2007; Han et al. 2007; Li et al. 2008; Drogaris et al. 2012).

Par les mêmes principes d'accessibilité et de plates-formes de recrutement, l'acétylation de certaines lysines, principalement au niveau des histones H2A et H4 participent également à la réponse aux dommages à l'ADN en permettant la liaison des protéines impliquées dans ce processus aux sites de cassures (Bird et al. 2002; Downs et al. 2004; Sun et al. 2005; Murr et al. 2006; Sun et al. 2009; Xu and Price 2011). Ceci est particulièrement vrai dans le cas des cassures double-brin, où l'acétyltransférase MYST NuA4 de levure a montré un rôle important pour leur réparation (voir section 1.2.2.1). Finalement, l'acétylation de H4K16 joue un rôle particulier dans la structure et la dynamique de la chromatine. Chez la levure, cette marque déposée par Sas2 compétitionne avec la déacétylase Sir2 pour établir les frontières entre l'euchromatine et l'hétérochromatine (voir également section 1.1.6.2.4) (Kimura et al. 2002; Altaf et al. 2007). De plus, cette marque participe à la compensation de dosage des chromosomes X chez la drosophile (voir section 1.2.5.1). Elle est également impliquée dans la modulation de la fibre de 30nm de la chromatine, puisqu'un mutant constitutivement acétylé pour ce résidu (produit par ligation chimique des 22 premiers acides aminés de la queue N-term de H4) bloque l'apparition de cette structure secondaire (Shogren-Knaak et al. 2006).

Il existe deux grandes familles d'histone acétyltransférases, que l'on classe selon leur domaine catalytique. La famille des GNATS (Gcn5 *N*-acétyltransférases), dont Gcn5 est le membre fondateur, a été la première identifiée. Il existe également la famille des MYST, dont les membres fondateurs sont Morf, Ybf2 (Sas3), Sas2 et Tip60. Finalement, plusieurs

autres protéines qui ne possèdent pas de domaines HAT consensus se retrouvent parmi un groupe d'acétyltransférases orphelines, la plus connue de celles-ci étant p300/ CBP. La plupart des acétyltransférases forment des complexes protéiques stables, où la sous-unité catalytique est responsable d'acétyler, alors que les autres sous-unités serviront au ciblage spécifique de certains loci sur la chromatine. En effet, la plupart des acétyltransférases ne peuvent acétyler seule leur substrat sur la chromatine et la présence des autres sous-unités des complexes est essentielle (Lee and Workman 2007).

1.1.6.2.1 La famille des GNATs

Bien que Gcn5 soit l'acétyltransférase majeure de cette famille, il existe quelques autres enzymes dans cette catégorie, soit PCAF (humain), Hat1, Elp3, Nut1 et Hpa2 (levure) (Lee and Workman 2007). Chez la levure, la sous-unité Gcn5 forme des complexes distincts, soit SAGA, SLIK et ADA. Chacun de ces complexes cible l'acétylation de la queue N-term d'H3. Gcn5 et ses complexes associés sont connus depuis longtemps pour jouer un rôle dans la transcription (Brownell et al. 1996; Pollard and Peterson 1997), mais un rôle plus récent dans la réparation de l'ADN a aussi été identifié. La sous-unité SAP130 du complexe TFIIIC qui contient la protéine humaine GCN5L est très homologue à la protéine DDB1 de la voie du NER (nucleotide excision repair) (Brand et al. 2001). De plus, le complexe TFIIIC acétyle davantage la chromatine en présence d'ADN endommagé par les rayons UVs et cet ADN possède une plus grande quantité d'histones H3 acétylés autant chez les mammifères que chez la levure (Brand et al. 2001; Teng et al. 2002; Yu et al. 2005; Yu and Waters 2005).

1.1.6.2.2 La famille des MYSTs

Les acétyltransférases de la famille des MYSTs sont également très conservées de la levure à l'humain. Tout comme la famille des GNATs, elles se retrouvent sous la forme de complexes protéiques. Le domaine MYST présent dans les sous-unités catalytiques contient un doigt de zinc C₂HC ainsi qu'un site de liaison pour l'acétyl-CoA (Utley and Cote 2003). Il existe 4 grands complexes MYST chez l'humain, soit TIP60, MOZ/MORF, HBO1 et MOF. Chacun de ces complexes est impliqué dans différentes fonctions cellulaires. Une section entière est consacrée aux complexes MYST acétyltransférases (voir section 1.2.).

1.1.6.2.3 La famille CBP/p300

Comme son nom l'indique, cette famille possède comme protéines majeures CBP et p300. Ces enzymes ont une grande homologie et possèdent entre autre 3 régions riches en cystéines et histidines, ainsi qu'un bromodomaine (Chan and La Thangue 2001). Ces protéines sont connues pour être des co-activateurs transcriptionnels et interagissent avec plusieurs facteurs de transcription. Elles sont impliquées dans la croissance, la différenciation cellulaire ainsi que dans l'apoptose (Giordano and Avantaggiati 1999; Goodman and Smolik 2000). Contrairement aux autres familles d'acétyltransférases, CBP et p300 peuvent acétyler les quatre histones, à la fois *in vivo* et *in vitro* (Iyer et al. 2004). De plus, cette famille de protéine est probablement celle qui possède la plus grande quantité de substrats non-histones identifiés jusqu'à maintenant. En effet, plusieurs activateurs transcriptionnels se trouvent acétylés par CBP/p300, mentionnons entre autre E2F, p53, myb, p73, Rb, myoD et GATA1 (Iyer et al. 2004).

1.1.6.2.4 Les histones déacétylases (HDACs)

Jusqu'à ce jour, une grande quantité de HDACs ont été identifiées chez l'humain. On peut diviser ces déacétylases en trois grandes classes, soit les classes I, II et III (sirtuines).

La classe I contient les déacétylases qui ont une homologie avec la déacétylase de levure Rpd3. Parmi cette classe, on retrouve HDAC1/2/3 et 8 (Thiagalingam et al. 2003). Ces enzymes sont exprimées de façon ubiquitaire dans les noyaux de plusieurs tissus et cette catégorie de déacétylases forme des complexes multi-protéiques. On les retrouve entre autre au sein des complexes CoREST, NuRD, N-CoR, SMRT ainsi que mSin3A/B (Yang and Seto 2008). Ces complexes jouent un rôle soit dans la transcription des gènes, la signalisation hormonale, le cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN (Yang and Seto 2008). Chez la levure, il existe deux complexes Rpd3 (L ou S) et chacun joue un rôle dans la régulation de la transcription des gènes. Le complexe Rpd3S se retrouve au niveau de la région codante alors que le complexe Rpd3L se situe au niveau de la région promotrice, où il favorise la répression transcriptionnelle (Kadosh and Struhl 1997; Carrozza et al. 2005a; Carrozza et al. 2005b). Un schéma résumant les principaux acteurs ainsi que les principales marques d'histones retrouvées aux régions promotrices et codantes est présenté à la figure 1-6.

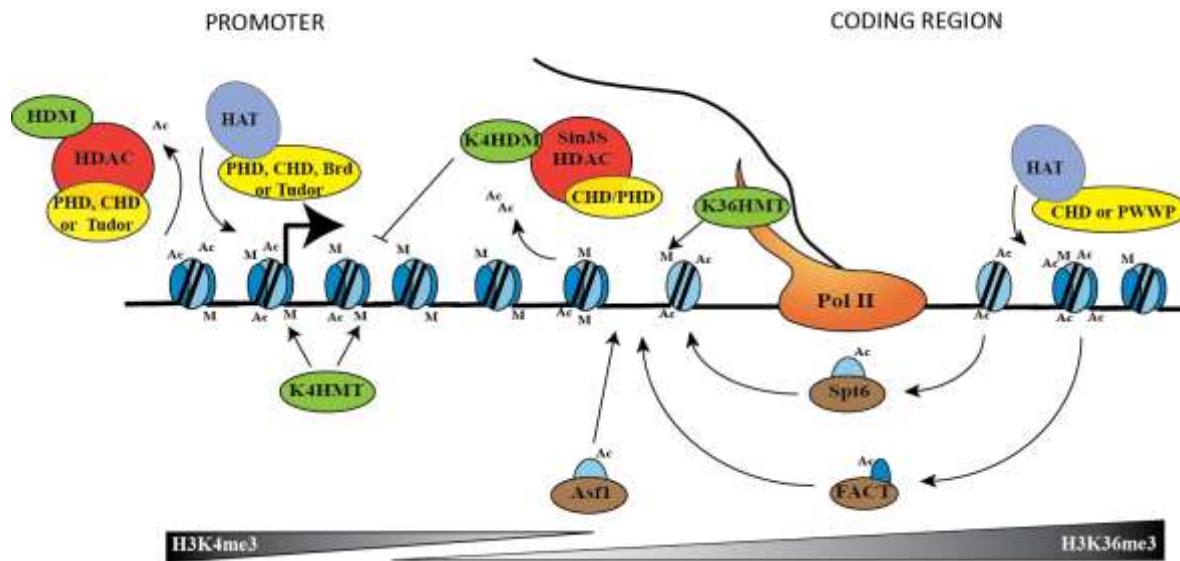


Figure 1-6. Acétylation et méthylation dynamique aux promoteurs et aux régions codantes des gènes.

Les acétyltransférases (HAT) et les déacétylases (HDAC) d'histones s'associent soit à la région promotrice ou à la région codante via leurs domaines de reconnaissance pour les marques d'histones acétylées ou méthylées (PHD, CHD, Brd, Tudor, PWWP). Ensemble, ils participent à l'éviction des histones en avant de la polymérase transcriptionnelle (Pol II) ainsi qu'à leur redéposition après son passage. Les histones éjectées de la chromatine sont prises en charge par des chaperons (FACT, Spt6, Asf1). On note également la présence de la marque H3K4me3 au niveau de la région promotrice des gènes et de la marque H3K36me3 au niveau de la région codante.

La classe II contient les déacétylases homologues à la protéine Hda1 de levure. Les HDAC4/5/6/7/9/10 et 11 font partie de cette catégorie (Thiagalingam et al. 2003). Cette classe forme des complexes protéiques beaucoup plus volumineux et la plupart ont leur domaine catalytique en C-term. Contrairement à la classe I, la classe II est exprimée majoritairement dans le cytoplasme des cellules et ne transigent dans le noyau que lorsque nécessaire (Martin et al. 2007). De plus, elles sont capables de s'associer à plusieurs facteurs de transcription tels que les importines et MEF2 (Bannister et al. 2000; Verdel et al. 2000).

La dernière classe de déacétylases, les sirtuines (classe III), a été identifiée par homologie avec la protéine Sir2 de levure. Il existe sept sirtuines chez l'humain (SIRT1-7). Le domaine catalytique de ces enzymes est dépendant du cofacteur NAD^+ et contient deux motifs à doigts de zinc et un zipper de leucine (Imai et al. 2000). Leur activité aurait un rôle

dans le « silencing » de la chromatine (formation d'hétérochromatine), dans le vieillissement ainsi que dans le métabolisme cellulaire (Guarente 2000). La stimulation de la formation d'hétérochromatine par Sir2 chez la levure est arrêtée par la présence de la marque H4K16ac, déposée par Sas2 à la frontière avec l'euchromatine (Kimura et al. 2002; Altaf et al. 2007). Cette marque empêche donc la propagation de l'hétérochromatine vers les régions transcriptionnellement actives.

1.1.6.3. La phosphorylation des histones

Les résidus sérines et thréonines sont sujet à la phosphorylation. Cette modification est déposée par des kinases et est reversée par des phosphatases. Cette marque est impliquée dans la signalisation de différents processus nucléaires (voir Chapitre 2). Le plus important exemple est la phosphorylation du variant H2A.X sur la sérine 139 (humain) qui permet le recrutement de protéines de réparation à l'ADN (voir section 1.1.3.1). La phosphorylation de certains résidus de l'histone H3 par la kinase Aurora B et est également importante pour la ségrégation des chromosomes lors de la mitose. Finalement, on attribue aussi à cette marque un rôle lors de la transcription, puisque la phosphorylation de plusieurs résidus est impliquée dans l'activation ou la répression transcriptionnelle (Rossetto et al. 2012).

1.1.6.4. L'ubiquitination des histones

Le groupement ubiquitine consiste en une petite protéine de 76 acides aminés, très conservée chez tous les eucaryotes. Elle contient une glycine à son extrémité C-terminale, directement impliquée dans la réaction d'ubiquitination avec des résidus lysines contenus sur d'autres protéines. Cette liaison peptidique peut avoir également lieu entre différentes ubiquitines où l'extrémité C-term d'une première molécule se liera soit aux lysines 48 ou 63 d'une autre molécule d'ubiquitine. Ceci a pour effet de créer une chaîne de poly-ubiquitination, elle aussi impliquée dans la signalisation de la cellule. La majorité de l'ubiquitination retrouvée sur les lysines des histones est de la mono-ubiquitination, c'est-à-dire qu'une seule ubiquitine se liera aux résidus de la protéine. Cette modification post-traductionnelle est déposée par une série d'enzymes appelées E1 activatrices de l'ubiquitine, E2 ubiquine-conjugases et E3 ubiquitine-ligases. Comme pour les autres marques d'histones, cette modification est réversible et peut être enlevée par des enzymes qui déubiquitinent les protéines.

De façon similaire aux marques d'histones précédentes, la mono-ubiquitination des histones joue un rôle important dans la transcription des gènes. Alors que l'ubiquitination de H2A semble inhiber la transcription des gènes (H2AK119), celle de H2B a une corrélation activatrice (Nakagawa et al. 2008) (Minsky et al. 2008). Chez la levure, des études ont montré que l'ubiquitination de H2BK123 était requise pour qu'il y ait triméthylation de H3K4 par Set1 et de H3K79 par Dot1 (marques activatrices de transcription) (Dover et al. 2002; Sun and Allis 2002; Zhu et al. 2005; Lee et al. 2007). Cette marque est déposée par les enzymes Rad6 (E2) et Bre1 (E3) (Hwang et al. 2003; Wood et al. 2003). Les mono-ubiquitination de H2A/H2A.XK119 et de H2BK120 jouent également un rôle dans la réparation de l'ADN. Déposées par RNF8, RNF20/RNF40 et par RING1B/BMI1, ces marques servent au recrutement de la machinerie de réparation (Marteijn et al. 2009; Wu et al. 2009; Ginjala et al. 2011; Moyal et al. 2011; Wu et al. 2011a). Par ailleurs, la poly-ubiquitination par RNF8 et RNF168 des histones H2A et H2A.X a plus récemment aussi montré un rôle dans la réparation de l'ADN (Huen et al. 2007; Kolas et al. 2007; Mailand et al. 2007; Stewart et al. 2009). Finalement, la mono-ubiquitination de H2A ainsi que de H2B semble avoir aussi d'autres rôles à jouer, dans l'ouverture de la chromatine, dans l'établissement des frontières de l'hétérochromatine et dans l'inactivation du chromosome X femelle (de Napoles et al. 2004; Fang et al. 2004; Fierz et al. 2011; Ma et al. 2011).

1.1.7. Interrelation entre les différentes marques d'histones

Comme il existe différentes marques d'histones qui peuvent avoir lieu sur la même ou sur différentes queues N-term ou encore dans le même ou dans des nucléosomes adjacents, la combinaison de ces marques est également importante. Celle-ci contribue à la diversité de la reconnaissance par des protéines et ajoutent ainsi un niveau de complexité dans la régulation de la chromatine et dans ses fonctions. Ce qui est appelé « code des histones » est donc beaucoup plus compliqué qu'une simple marque qui recrute une protéine unique. Plusieurs combinaisons de marques d'histones possèdent une fonction spécifique dans la cellule et chacune donnera donc un résultat différent. De plus, les marques peuvent être interdépendantes et s'influencer (Figure 1-7). Cette influence peut avoir lieu en *cis*, c'est-à-dire sur la même queue N-term d'histone, ou encore en *trans*, sur des queues d'histones

différentes. Une des interactions en *cis* bien caractérisée se retrouve sur la queue N-term de l'histone H3. La phosphorylation de la sérine 10 favorise l'acétylation de la lysine 14 (Lo et al. 2000). Ensemble, ces marques contribuent à empêcher la méthylation de la lysine 9 et donc empêcher le recrutement de la protéine HP1 (Dormann et al. 2006). De la même façon, la phosphorylation de la sérine 1 de l'histone H4 semble réprimer l'acétylation des lysines 5, 8 et 12 chez la levure (Utley et al. 2005). De plus, la méthylation de H4R3 semble aussi être affectée par l'acétylation des lysines présentes sur la même queue N-term (Feng et al. 2011). Plus récemment, un mécanisme d'interdépendance en *trans* a aussi été confirmé, où l'ubiquitination de H2BK123 est requise pour la méthylation de H3K4 et de H3K79, autant chez la levure que chez l'humain (Shahbazian et al. 2005; Kim et al. 2013; Wu et al. 2013).

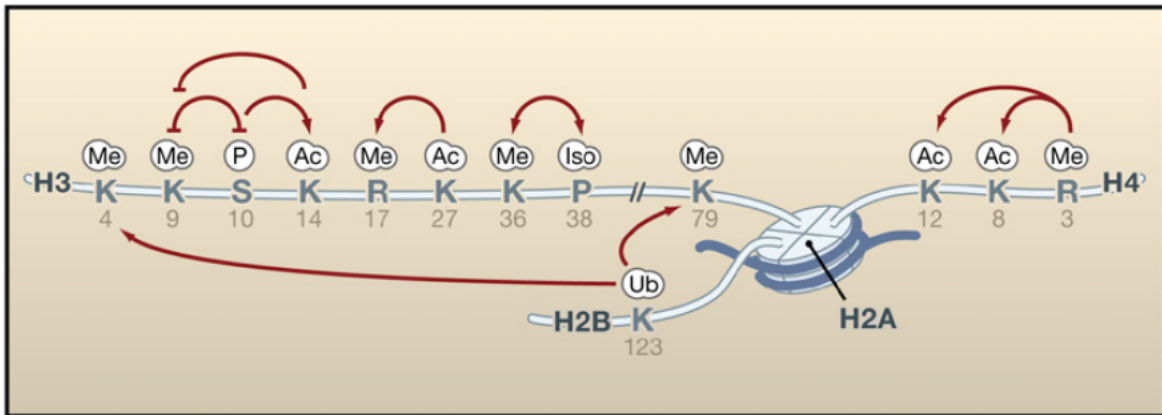


Figure 1-7. Interrelation entre les différentes marques d'histones.

(Tiré de (Kouzarides 2007)).

1.1.8. Les domaines de reconnaissance des modifications post-traductionnelles des histones

Comme mentionné ci-haut, chacune des marques d'histone peut être reconnue par différents domaines protéiques. Les complexes de modifications de la chromatine ainsi que d'autres protéines, possèdent des domaines de reconnaissance pour des marques d'histones précises. Cette reconnaissance peut nécessiter une seule ou bien une combinaison de modifications. Le Chapitre 2 revoit en détails tous les domaines de reconnaissance à la chromatine ainsi que leur structure et leurs rôles fonctionnels respectifs.

1.2. Les complexes associés aux acétyltransférases de la famille MYST

Puisque les complexes MYST acétyltransférases sont au cœur de mon sujet de thèse, cette section permettra d'approfondir les différentes connaissances obtenues jusqu'à ce jour à leur égard.

Comme mentionné précédemment (voir section 1.1.6.2.3), il existe 4 grands complexes MYST acétyltransférases chez l'humain, soit TIP60, MOZ/MORF, HBO1 et MOF (Figure 1-8). Chaque complexe est nommé en fonction de l'enzyme qui le compose. Trois de ces complexes ont en commun un cœur tétramérique composé de la sous-unité enzymatique (soit Tip60, HBO1 ou MOZ/MORF), la sous-unité d'échafaudage (soit EPC1/2, JADE1/2/3 ou BRPF1/2/3), d'une sous-unité ING (inhibitor of growth, soit ING3, ING4 ou ING5) et de la protéine hEaf6. De son côté, MOF se retrouve aussi sous forme de tétramère, mais celui-ci est composé de sa sous-unité catalytique (MOF) et de trois protéines; MSL1, MSL2 et MSL3L1, où MSL1 est la protéine d'échafaudage du complexe. De plus, une des particularités de ces complexes est le fait que plusieurs des sous-unités qui les composent possèdent des domaines de reconnaissance à la chromatine (domaines PHD, bromodomaines, chromodomaines, PWWP domaines, etc.) (voir Figure 1-9). Ces domaines coopèrent pour cibler les complexes à la chromatine et les y retenir.

Puisque les MYST acétyltransférases participent à la régulation de plusieurs fonctions cellulaires, il apparaît aujourd'hui évident que ces complexes soient associés à la formation de cancers. Par ailleurs, quelques-unes des sous-unités présentes au sein des complexes MYST se trouvent sous la forme de fusions protéiques dans plusieurs types de tumeurs. Par exemple, la fusion EPC-PHF1 se retrouve dans certains types de sarcomes utérins, alors que la fusion MOZ-TIF2 est impliquée dans le développement de la leucémie myéloïde (Deguchi et al. 2003; Micci et al. 2006). Ceci semble donc suggérer que la perte ou le gain de fonctions engendrés par l'apparition de ces protéines de fusion (ou par la disparition de la protéine sauvage) est au cœur du processus de transformation cellulaire.

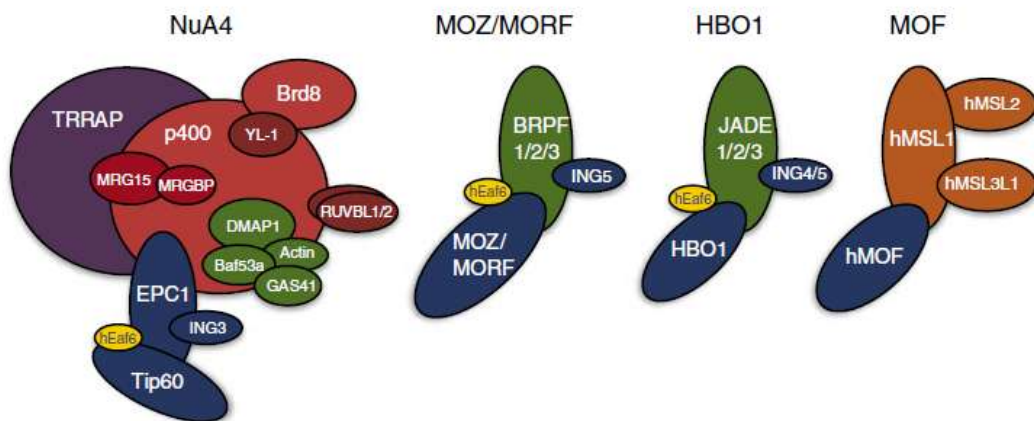


Figure 1-8. Schéma des complexes MYST acétyltransférases.

Complexes MYST acétyltransférases présents chez l'humain ainsi que les différents domaines protéiques présents dans les sous-unités enzymatiques. (Tiré de (Avvakumov and Cote 2007b)).

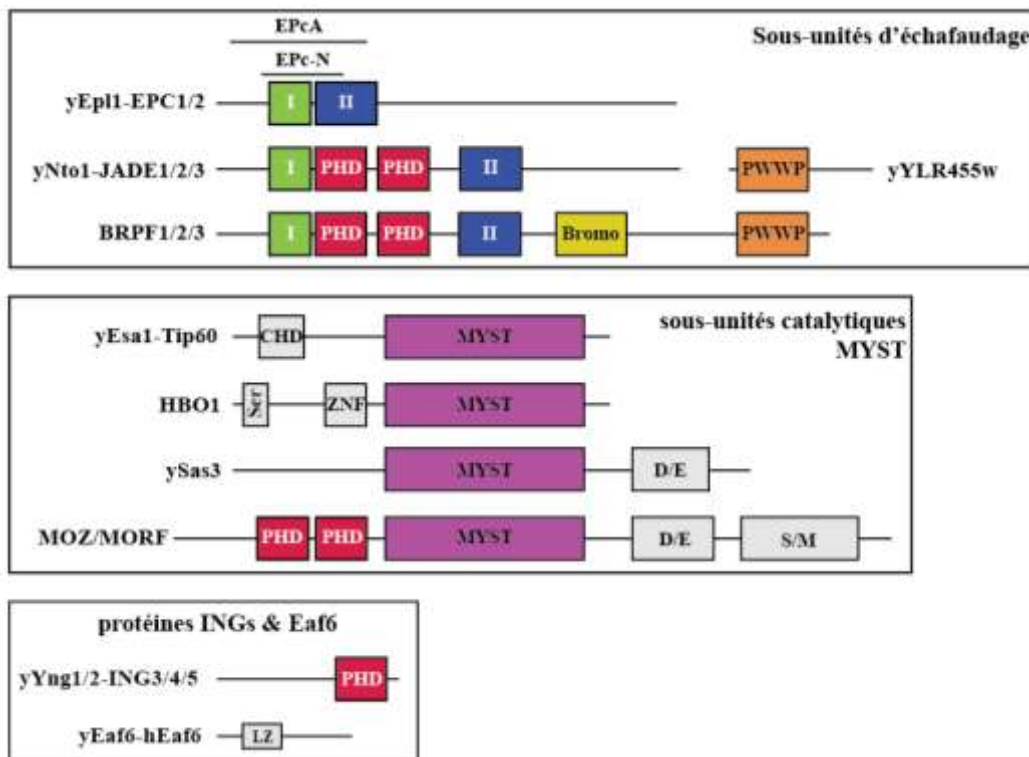


Figure 1-9. Domaines de reconnaissance de la chromatine au sein des complexes acétyltransférases de la famille MYST.

(adapté de (Avvakumov et al. 2012)).

1.2.1. Les protéines ING

Tel que mentionné ci-haut, les complexes MYST acétyltransférases comprennent une sous-unité de la famille ING (ING3/4/5), à l'exception de MOF, et ce autant chez la levure que chez l'humain (Figure 1-9). Le membre fondateur de cette famille de protéine, ING1, a d'abord été identifié dans une étude de criblage de gènes dont l'expression était perdue dans des cellules tumorales (Garkavtsev et al. 1996). Les autres INGs ont par la suite été trouvées par homologie de séquence et sont aujourd'hui toutes associées à différents cancers (Shimada et al. 1998; Nagashima et al. 2003; Shiseki et al. 2003). Chacune de ces protéines possède de nombreux variants d'épissage, mais on ne connaît pas très bien le rôle de chacun de ces variants. À l'extrémité C-term de ces protéines, on retrouve un domaine PHD très bien conservé. Ce domaine lie la marque H3K4me3, présente aux régions promotrices des gènes (Pena et al. 2006; Shi et al. 2006; Champagne et al. 2008; Hung et al. 2009; Saksouk et al. 2009). De plus, dans la protéine ING1, ce domaine se trouve muté dans plusieurs types de cancers (Campos et al. 2004a) (Campos et al. 2004b). En plus de leur domaine PHD, toutes les INGs possèdent un domaine NLS (nuclear localization signal) nécessaire pour l'importation au noyau. Malgré que ces protéines ne possèdent pas d'activité catalytique intrinsèque, elles ont néanmoins une fonction essentielle dans la cellule, en faisant le pont entre les complexes de modification de la chromatine dont elles font partie et les loci génomiques qu'elles ciblent. D'ailleurs, on attribue aux cinq INGs des rôles dans le contrôle de la prolifération et de la croissance cellulaire, dans la voie p53 et on leur confère des propriétés de suppresseurs de tumeur (Campos et al. 2004a; Russell et al. 2006). Ce n'est d'ailleurs pas étonnant de les retrouver mutées dans plusieurs cancers (Unoki et al. 2009).

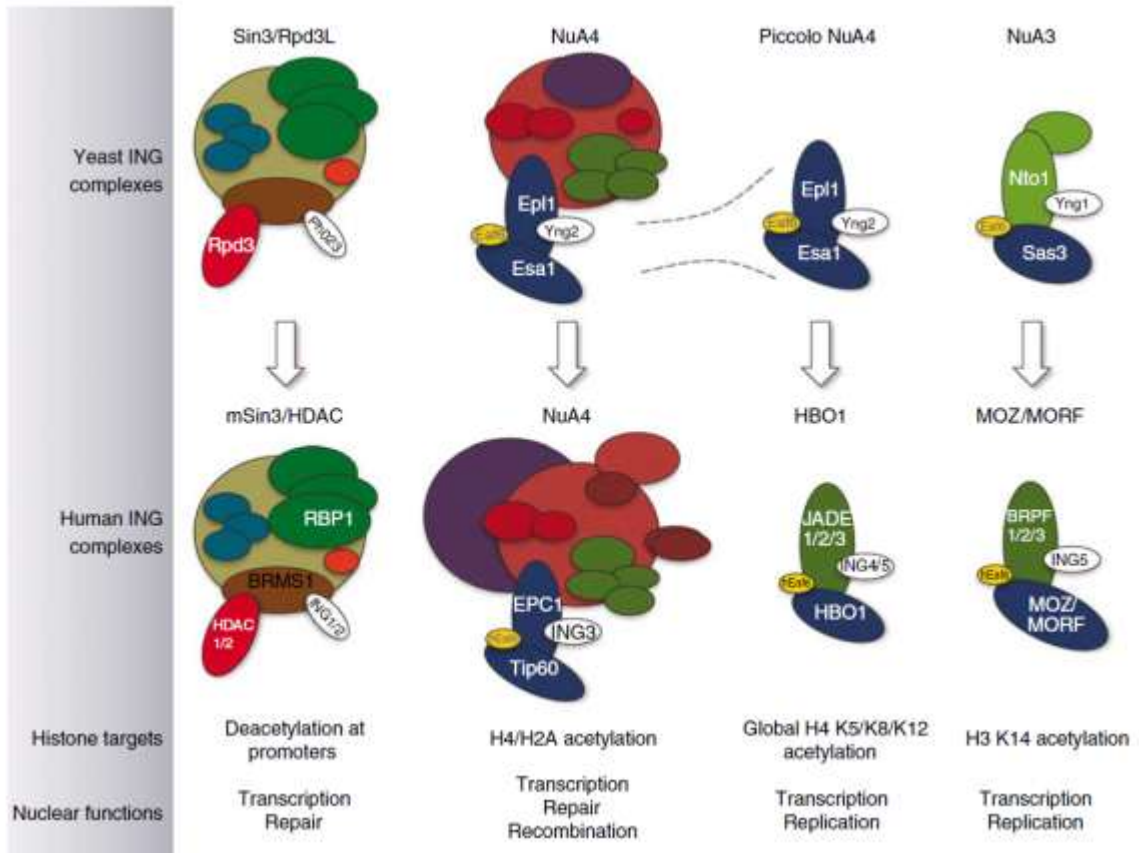


Figure 1-10. Conservation de la structure des complexes contenant des protéines INGS.

Les cinq protéines INGS interagissent avec différents complexes de modification de la chromatine, en majorité des complexes MYST acétyltransférase, à l'exception d'ING1/2 qui interagissent avec un complexe déacétylase. De plus, ces complexes sont très conservés de la levure à l'humain. (Tiré de (Avvakumov and Cote 2007b))

Les protéines ING1 et ING2, contrairement aux autres INGS, se retrouvent dans un complexe déacétylase appelé mSin3 (ou Rpd3L chez la levure, Figure 1-10). Ce complexe possède comme sous-unités l'enzyme HDAC1/2, mais également les protéines BRMS1, SAP30 et RPB1. ING1 possède un domaine d'interaction pour la protéine de réplication et de réparation PCNA et leur interaction semble réguler la réponse aux dommages par les rayons UV ainsi que l'apoptose (Scott et al. 2001). Malgré l'absence d'un tel domaine dans ING2, une interaction avec PCNA a quand même été montrée et semble réguler la progression de la fourche de réplication (Larrieu et al. 2009). Par ailleurs, la déplétion d'ING2 dans des cellules U2OS semble provoquer un passage plus rapide de la transition G1/S, accompagné d'une diminution de l'expression de p21, un inhibiteur connu de cette transition (Larrieu et al. 2010). La surexpression d'ING1 ainsi que d'ING2 dans des lignées

cellulaires ont montré des phénotypes d'apoptose, de sénescence et d'arrêt du cycle cellulaire et ces effets sont probablement dus à leurs interactions avec la protéine p53 (Helbing et al. 1997; Nagashima et al. 2001; Soliman et al. 2008). Des *knock down* par siARNs d'ING2 ont aussi montré des phénotypes de suppression tumorale par une activation de la voie p53 et de la sénescence (Kumamoto et al. 2008).

La protéine ING3 se trouve pour sa part au sein du complexe MYST acétyltransférase TIP60 (Doyon et al. 2004). Comme les INGs précédentes, ING3 a aussi été montrée pour avoir un rôle dans les fonctions de transcription, d'apoptose et d'induction de l'arrêt du cycle cellulaire de p53 (Nagashima et al. 2003). Par ailleurs, un siARN dirigé contre ING3 a montré une inhibition de l'apoptose induite en réponse aux rayons UVs, renforçant ainsi son rôle de suppresseur de tumeurs (Wang and Li 2006).

Finalement, les protéines ING4 et ING5 se retrouvent dans les complexes MYST acétyltransférases HBO1 (ING4/5) et MOZ/MORF (ING5) (Doyon et al. 2006). Tout comme les INGs précédentes, ING4/5 ont été montrées pour favoriser l'activité transcriptionnelle de p53, suggérant également une activité suppresseur de tumeurs pour ces protéines (Shiseki et al. 2003). D'ailleurs, ING4 est la seule ING qui a réellement été confirmée comme étant suppresseuse de tumeurs, suite à l'identification de mutants donnant une perte de fonction à la protéine (Kim et al. 2010b; Moreno et al. 2010). Par contre, certaines expériences de siARNs contre ces protéines ont montré des rôles distincts pour les deux INGs. En effet, alors que la déplétion d'ING4 crée une accumulation des cellules MCF7 en phase G2/M, la déplétion d'ING5 crée plutôt une accumulation en phase S, lors de la réplication (Doyon et al. 2006). ING4 a aussi été associée dans la littérature à l'inhibition de la protéine HIF-1, responsable de l'induction de l'hypoxie lors de l'angiogénèse, ainsi qu'à l'inhibition de la voie NF- κ B via l'expression d'I κ B (Ozer et al. 2005; Colla et al. 2007; Coles et al. 2010). Des souris ING4^{-/-} ont d'ailleurs montré une réduction du niveau d'expression d'I κ B et une augmentation de l'expression de p65/RelA, une sous-unité de NF- κ B (Coles et al. 2010). De plus, une interaction directe dans des cellules de glioblastomes a été observée entre ING4 et p65/RelA, favorisant l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (Garkavtsev et al. 2004). Finalement, ING4 a été identifiée dans une étude de criblage pour des protéines supprimant la perte d'inhibition de

contact créée par la surexpression de l'oncogène myc, renforçant ainsi son rôle de suppresseur de tumeurs (Kim et al. 2004).

1.2.2. TIP60

L'acétyltransférase de la famille MYST la plus étudiée est Tip60. Cette enzyme, qui fait partie d'un complexe qui porte le même nom, acétyle les lysines 5/8/12 sur l'histone H4 ainsi que les lysines de l'histone H2A et ses variants H2A.X/H2A.Z, dans un contexte de chromatine. Le complexe TIP60 possède un total de 16 sous-unités, qui incluent le sous-cœur tétramérique EPC1-Tip60-ING3-hEaf6, tel que discuté précédemment (Figure 1-8). Chez la levure, l'homologue de Tip60, Esa1, est la seule acétyltransférase essentielle à la survie. L'expression de Tip60 est souvent diminuée dans plusieurs types de cancers, et sa fonction semble liée à plusieurs voies de signalisation pro- et anti-oncogéniques (Avvakumov and Cote 2007b). Par ailleurs, des expériences menées avec des souris ont montré que Tip60 était une protéine suppresseur de tumeurs haplo-insuffisante pour la formation de lymphomes activés par l'oncogène myc (Gorrini et al. 2007). En plus de ces quatre sous-unités, on retrouve des protéines telles que TRRAP et p400, Brd8, MRG15/MRGBP, DMAP1, YL-1, Baf53a, GAS41, RUVBL1/2 et une protéine d'actine (Doyon et al. 2004; Doyon et al. 2006).

Malgré que le rôle de chacune de ces sous-unités ne soit pas bien défini, on sait notamment que plusieurs sous-unités homologues de levure font également partie du complexe SWR1 de remodelage de la chromatine, qui permet l'échange entre H2A et son variant H2A.Z (voir section 1.4.1.1). La sous-unité p400, qui sert de protéine d'échafaudage au complexe et qui possède un domaine ATPase de type SWI2/SNF2, fait le pont entre la fonction acétyltransférase du complexe TIP60 et la fonction de remodelage de la chromatine, normalement effectuée par SWR1 chez la levure (Auger et al. 2008). Par ailleurs, p400 est impliquée dans la sénescence par p53, via la transcription de p21 (Chan et al. 2005; Gevry et al. 2007). Pour sa part, la sous-unité TRRAP possède un domaine lié à la kinase de réparation ATM (ataxia telangiectasia mutated) et joue un rôle dans la transformation cellulaire par c-Myc ainsi que dans la voie de réparation des cassures double-brins de l'ADN (McMahon et al. 1998; Murr et al. 2006). La sous-unité DMAP1 est aussi requise pour l'activation de la protéine ATM et donc pour la réponse aux dommages (Penicud and

Behrens 2013). Celle-ci est également trouvée liée à DNMT1, une méthyltransférase de l'ADN, au niveau des foyers de réplication de l'ADN et semble aussi jouer un rôle lors du développement dans des cellules souches embryonnaires de souris (Rountree et al. 2000; Mohan et al. 2011).

1.2.2.1. Rôles fonctionnels du complexe TIP60

En plus des histones, Tip60 est capable d'acétyler d'autres substrats. La majorité de ces protéines ciblées sont des facteurs de transcription et leur acétylation semble affecter à la fois la stabilité et l'activité de ces protéines (Sapountzi and Cote 2011). Par exemple, l'acétylation de la protéine Rb par Tip60, semble la mener à sa dégradation dans le protéasome, alors que l'acétylation des facteurs de transcription p53 ou Notch1 active ou inhibe respectivement leur activité transcriptionnelle (Legube et al. 2004; Leduc et al. 2006; Kim et al. 2007). On sait notamment que Tip60 cible la lysine 120 de p53 et que cette acétylation permet de moduler la décision entre l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en apoptose (Sykes et al. 2006; Tang et al. 2006). En plus de participer à l'initiation de la transcription, NuA4/Tip60 permet également de faciliter le processus d'élongation en acétylant les nucléosomes (Ginsburg et al. 2009). L'association de cette acétyltransférase à la chromatine a d'ailleurs été cartographiée sur le génome entier et a permis de constater qu'elle se trouvait au niveau des promoteurs ainsi que sur la région codante des gènes (Wang et al. 2009b).

En plus de son rôle bien établi de régulateur de la transcription, le complexe TIP60 est aussi lié à la voie de réparation des cassures double-brin. L'utilisation d'un mutant de Tip60 dont la fonction catalytique a été inactivée dans des cellules HeLa a permis de détecter que les cellules étaient déficientes dans la réparation des cassures double-brin (Ikura et al. 2000). Suite à cette découverte, l'acétyltransférase peut acétyler ATM et ainsi l'activer, ce qui mène à l'arrêt du cycle cellulaire, ainsi qu'à la phosphorylation du variant H2A.X autour de la cassure (Sun et al. 2005). Chez *S. cerevisiae*, le complexe homologue NuA4 a aussi été montré pour être recruté directement au site de la cassure, et ce via sa sous-unité Arp4 (Downs et al. 2004). Des expériences de ChIP (chromatin immunoprecipitation) dans des cellules souches embryonnaires utilisant un système artificiel de cassure double-brin avec l'endonucléase I-SceI a permis de valider le recrutement de Tip60 et de TRRAP aux sites

de cassures (Murr et al. 2006). Plus récemment, l'acétylation de l'histone H4 par Tip60 aux sites de cassure a montré une diminution du recrutement de la protéine 53BP1 qui permet la réparation via le NHEJ (*non-homologous end joining*), favorisant ainsi la voie de réparation par recombinaison homologue (Tang et al. 2013). Cette même étude a d'ailleurs montré que la déplétion de Tip60 par siARN montre une perte de foyers BRCA1 en réponse aux dommages et un donc un défaut de la recombinaison homologue. Des études du complexe chez la drosophile ont démontré qu'elle était également impliquée dans la restauration de l'environnement chromatinien suite à la réparation de l'ADN, en facilitant le remplacement des histones H2A.X phosphorylées par le variant non phosphorylé (Kusch et al. 2004). Chez l'humain, la déplétion des sous-unités RUVBL1 et Tip60 du complexe TIP60 ont également montré une persistance de la phosphorylation de H2A.X à la cassure, suite à la réparation de l'ADN (Jha et al. 2008). Cette régulation se fait entre autre par l'acétylation de H2A.X par Tip60, ce qui mène à son ubiquitination et à sa dégradation (Ikura et al. 2007).

1.2.2.2. Domaines de reconnaissance de la chromatine au sein du complexe TIP60

Tel que décrit au préalable, les complexes MYST possèdent de nombreux domaines pouvant interagir avec différentes modifications présentes au sein de la chromatine (Figure 1-9). La sous-unité enzymatique Tip60 (ou Esa1 chez la levure), possède un chromodomaine qui peut interagir avec la marque H3K4me1 présente au niveau des enhancers (Jeong et al. 2011). De plus, ce domaine est essentiel pour l'acétylation des nucléosomes par le complexe (Selleck et al. 2005). La sous-unité MRG15 possède également un chromodomaine qui lui peut reconnaître H3K36me3 (Zhang et al. 2006). La protéine Brd8 possède quant à elle deux bromodomains, alors que DMAP1 ainsi que p400 possèdent chacun des domaines SANT. De plus, la protéine EPC1 (ou Epl1 de levure) possède un domaine N-term appelé « EPcA » qui semble essentiel pour sa liaison à la chromatine et pour son activité nucléosomale ((Selleck et al. 2005; Chittuluru et al. 2011; Huang and Tan 2013) et Chapitre 4). Finalement, tel que discuté précédemment, la protéine ING3 possède un domaine PHD capable de recruter le complexe à la marque H3K4me3 (voir section 1.2.1).

1.2.3. HBO1

L'acétyltransférase HBO1 a d'abord été identifiée comme interagissant avec les protéines de réplication ORC1 (oririgin recognition complexe 1) et MCM2 (Iizuka and Stillman 1999; Burke et al. 2001). Cette enzyme s'associe avec les protéines JADE1/2/3, ING4/5 et hEaf6 pour former le complexe tétramérique HBO1, connu pour effectuer l'acétylation globale des lysines 5/8/12 de l'histone H4 (voir Figure 1-8). Ce rôle revient à un sous-complexe de NuA4 chez la levure, Piccolo NuA4 (Boudreault et al. 2003). Fait intéressant à noter, le gène HBO1 a été identifié comme étant un site courant d'intégration rétrovirale, ce qui provoque la formation de leucémies myéloïdes et de lymphomes des cellules B/T chez la souris (Suzuki et al. 2002). Tout comme la protéine ING4 du même complexe, il semblerait qu'HBO1 agissent en tant que suppresseur tumoral en inhibant NF- κ B dans les cellules 293T (Contzler et al. 2006). Récemment, des souris HBO1^{-/-} ont permis de montrer que l'enzyme était également responsable de l'acétylation de la lysine 14 de l'histone H3 au cours du développement embryonnaire, et ceci semble avoir été confirmé dans des cellules érythroblastes (Kueh et al. 2011; Mishima et al. 2011). De plus, il semblerait que dans ces cellules, HBO1 soit associée avec la protéine d'échafaudage BRPF2, habituellement en complexe avec l'acétyltransférase MOZ/MORF (Doyon et al. 2006; Ullah et al. 2008; Mishima et al. 2011). L'association d'ING4 avec l'acétyltransférase a également montré une stimulation de l'acétylation de l'histone H3 sur des nucléosomes, ce qui semble bien suggérer que son activité peut également se diriger vers cette histone (Hung et al. 2009; Saksouk et al. 2009). HBO1 semble aussi important pour la régulation du développement, puisque les souris *knock out* meurent à l'état embryonnaire. La protéine d'échafaudage du complexe, JADE1, possède pour sa part deux variants d'épissage JADE1L et JADE1S qui peuvent tous deux lier HBO1 (Saksouk et al. 2009). Par contre, le variant long permet de cibler le complexe à la région promotrice des gènes alors que le variant court permet de le cibler à la région codante (Foy et al. 2008; Saksouk et al. 2009). Cette différence est causée par la perte de l'interaction du variant JADE1S avec les protéines ING4/5, ce qui ne permet plus au complexe de lier H3K4me3 aux promoteurs des gènes (voir section 1.2.1). JADE1 possède elle aussi une fonction de suppresseurs de tumeurs dans certaines lignées de tumeurs rénales ainsi qu'un rôle dans la régénération tissulaire de l'épithélium des cellules

rénales (Zhou et al. 2005; Havasi et al. 2013). On attribue également à cette protéine, un rôle dans l'inhibition de la voie de signalisation Wnt (Chitalia et al. 2008).

1.2.3.1. Rôles fonctionnels du complexe HBO1

En plus des rôles dans le développement et la suppression tumorale attribués aux sous-unités HBO1 et JADE1, le complexe HBO1 joue un rôle important dans le contrôle de la transcription des gènes. Comme sa fonction précédemment décrite de répresseur de la transcription par le facteur NF- κ B, il a été décrit chez la drosophile pour interagir avec les protéines Polycomb afin de réprimer la transcription des gènes *HOX* (Grienenberger et al. 2002). À l'opposé, HBO1 joue aussi un rôle de co-activateur de plusieurs facteurs de transcription, comme par exemple du récepteur nucléaire hormonal de la progestérone dans les cellules de reins de singe ou encore de DFos et DJun chez la drosophile (Georgiakaki et al. 2006; Miotto et al. 2006).

Le rôle le mieux décrit pour HBO1 se retrouve par contre au niveau du processus de réplication de l'ADN. Tel que mentionné ci-haut, la protéine a d'abord été trouvée liée aux protéines ORC1 et MCM2 de la réplication, qui font partie du complexe de pré-initiation de la réplication. Chez *Xenopus laevis*, la déplétion de XHbo1 entraîne d'ailleurs une perte du complexe MCM2-7 au niveau de la chromatine, ce qui abolit la réplication de l'ADN dans ces cellules (Iizuka et al. 2006). Cette étude montre également qu'HBO1 peut acétyler *in vitro* les protéines ORC2, MCM2 et CDC6. Un rôle d'HBO1 dans la réplication des cellules pré-adipocytes de souris a aussi été évoqué (Johmura et al. 2008). Dans les cellules humaines, la déplétion d'HBO1 bloque la progression du cycle cellulaire et diminue la quantité de cellules en phase S (Doyon et al. 2006). Récemment, HBO1 a été montré pour interagir directement avec la protéine Cdt1 du complexe de pré-réplication dans les cellules HeLa (Miotto and Struhl 2008). La surexpression d'HBO1 entraîne d'ailleurs une augmentation de la re-réplication (plus d'une initiation de la réplication par cycle cellulaire) dans ces cellules ainsi que dans d'autres lignées. Finalement, une étude utilisant un mutant *dead catalytic* pour l'enzyme, a permis de constater que son activité acétyltransférase sur l'histone H4 était requise pour la formation des complexes de pré-initiation aux niveaux des origines de réplication et que cette activité était inhibée par le recrutement de la protéine

Geminin (qui mène à la dégradation de Cdt1 suite au démarrage de la fourche de réplication) au niveau de ces origines (Miotto and Struhl 2010).

1.2.3.2. Domaines de reconnaissance de la chromatine au sein du complexe HBO1

Le complexe initial HBO1-Jade possède plusieurs domaines PHD éparpillés parmi les sous-unités ING4/5 ainsi que JADE1/2/3 (Figure 1-9). Le domaine PHD d'ING4 et celui d'ING5 interagissent avec la marque H3K4me3, localisée aux sites d'initiation de la transcription et ciblent le complexe à ces endroits (Champagne et al. 2008; Hung et al. 2009; Saksouk et al. 2009). Les protéines JADEs possèdent quant à elles deux domaines PHD (PHD1 et PHD2) séparés par un *Zn knuckle*, pour former le PZP (PHD1-*Zn knuckle*-PHD2). Ces PHDs reconnaissent tous deux la queue N-term de l'histone H3, mais contrairement aux PHDs des protéines INGs, le PHD1 perd toute liaison en présence de la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (Saksouk et al. 2009). D'ailleurs, le PHD1 est dominant en terme d'interaction par rapport au PHD2, puisque l'utilisation d'une protéine recombinante comprenant uniquement le domaine PZP de JADE1 se comporte de façon similaire au PHD1, c'est-à-dire que son interaction avec l'histone H3 est perdue en présence de H3K4me3. Finalement, le PHD2 est tout de même essentiel pour la liaison *in vivo* du complexe à la chromatine, puisque l'utilisation d'un mutant Δ PHD2 dans les cellules 293T perd l'interaction avec la chromatine (Saksouk et al. 2009).

1.2.4. MOZ/MORF

Le complexe MYST acétyltransférase MOZ/MORF, responsable de l'acétylation de H3K14/K23, possède soit MOZ ou MORF comme enzyme. Celles-ci sont très similaires et lient individuellement les protéines d'échafaudage BRPF1/2/3 via leur domaine catalytique MYST (Doyon et al. 2006; Ullah et al. 2008). Dans le même complexe, on retrouve également les protéines ING5 et hEaf6 (voir Figure 1-8). L'acétyltransférase MOZ a d'abord été identifiée comme partenaire d'une fusion avec la protéine CBP suite à une translocation chromosomale dans certaines leucémies myéloïdes aiguës (Borrow et al. 1996). Suite à cette découverte, la protéine MORF a été trouvée par simple homologie de séquence, alors qu'une étude génétique indépendante a permis d'identifier l'homologue chez la levure, Sas3 (Reifsnnyder et al. 1996; Champagne et al. 1999). Depuis, d'autres

translocations chromosomiques impliquant les protéines MOZ ou MORF ont été identifiées, dont MOZ-p300, MOZ-TIF2 et MORF-CBP (Carapeti et al. 1998; Chaffanet et al. 2000; Panagopoulos et al. 2001). Certaines de ces fusions ont d'ailleurs été montrées comme étant directement responsables de la transformation cellulaire, autant *in vitro* que suite à leur injection chez la souris (Deguchi et al. 2003). Il apparaît donc évident que la dérégulation des acétyltransférases MOZ et MORF soit responsable de la transformation oncogénique et que ces protéines jouent des rôles essentiels dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

1.2.4.1. Rôles fonctionnels du complexe MOZ/MORF

L'un des rôles les mieux caractérisés pour MOZ se retrouve dans le développement, en particulier pour l'expression des gènes *HOX* ainsi que dans l'hématopoïèse. En effet, l'utilisation de souris MOZ^{-/-} a permis de détecter un défaut dans la production de cellules souches hématopoïétiques (Katsumoto et al. 2006; Thomas et al. 2006). Dans ces souris, on note aussi une baisse considérable de l'expression de gènes tels que c-kit et HOXA9. Par la suite, une souris exprimant un mutant dont la fonction catalytique a été inactivée de l'enzyme MOZ a été créée, et celle-ci montre également une baisse significative du nombre de précurseurs hématopoïétiques (Perez-Campo et al. 2009). Ceci suggère donc que le rôle de MOZ dans le développement des cellules souches de l'hématopoïèse passe par son activité acétyltransférase. Un lien pour cette enzyme avec l'expression des différents gènes *HOX* a également été montré dans plusieurs autres études (Miller et al. 2004; Crump et al. 2006; Voss et al. 2009; Qiu et al. 2012). Lorsque l'on effectue le *knockout* d'un gène encodant pour une protéine du même complexe, BRPF2, les embryons de souris montrent des défauts sévères d'érythropoïèse (Mishima et al. 2011), alors que des défauts d'expression des gènes *HOX* apparaissent lorsqu'elle est mutée chez le poisson zèbre (Laue et al. 2008). Ces phénotypes récapitulent donc ceux observés en l'absence de la sous-unité catalytique du complexe. Plus récemment, une étude a révélé que la délétion de MOZ phénotypait également le syndrome de DiGeorge chez la souris, une maladie génétique causée par la perte de l'expression du gène TBX1 (Voss et al. 2012). Ce phénotype serait causé par la perte d'expression de TBX1 en absence de MOZ. Un rôle dans la régulation du développement a aussi été attribué à MORF, où l'homologue chez la souris, Querkopf, joue par contre un rôle dans la neurogénèse (Thomas et al. 2000; Merson et al. 2006). Toutes ces

données démontrent donc l'importance que possède le complexe MOZ/MORF dans la régulation du développement, surtout via son contrôle de l'expression de certains gènes essentiels à ce processus.

En plus d'influencer la transcription des gènes *HOX* au cours du développement, le complexe MOZ/MORF joue également un rôle de co-activateur transcriptionnel pour plusieurs autres facteurs de transcription. Tout d'abord, il a été montré que MOZ interagit avec la protéine AML1 pour l'acétyler et permet de stimuler la transcription de ses gènes cibles (Kitabayashi et al. 2001). Cette acétyltransférase est également capable d'interagir avec la protéine p65 de NF- κ B et d'augmenter l'expression des gènes ciblés par ce facteur de transcription (Chan et al. 2007). De plus, MOZ peut acétyler ainsi que lier la protéine p53 dans des fibroblastes embryonnaires de souris et ceci permet l'expression de la protéine d'arrêt du cycle cellulaire p21 (Rokudai et al. 2009).

Finalement, puisque la déplétion de la protéine ING5 du complexe entraîne un défaut de progression dans la phase S du cycle cellulaire, il est suggéré que tout comme le complexe HBO1, MOZ/MORF puisse aussi jouer un rôle dans la réplication de l'ADN (Doyon et al. 2006).

1.2.4.2. Domaines de reconnaissance de la chromatine au sein du complexe MOZ/MORF

Le complexe acétyltransférase MOZ/MORF est celui qui possède le plus de domaines de reconnaissance de la chromatine parmi ses sous-unités (Figure 1-9). Tout d'abord, les sous-unités catalytiques MOZ et MORF possèdent elles-mêmes un tandem de domaines PHD. Ce tandem a d'ailleurs récemment été montré pour lier une combinaison étonnante de marques présente sur la queue de l'histone H3. En effet, les deux domaines PHD reconnaissent H3K14ac combiné à H3R2 non modifié et sont nécessaires pour la liaison du complexe à la chromatine (Ali et al. 2012; Qiu et al. 2012). Les protéines d'échafaudage BRPFs possèdent quant à elles un domaine PZP (PHD1-Zn-knuckle-PHD2), un bromodomaine ainsi qu'un domaine PWWP. Les domaines PHD1 et PHD2 de la protéine BRPF2 ont également fait l'objet d'études récentes, où on identifie que la lysine 4 de l'histone H3 ne doit pas être méthylée pour qu'il y ait liaison du PHD1, alors que le PHD2 semble être un domaine PHD atypique possédant des caractéristiques de liaison à l'ADN

(Qin et al. 2011; Liu et al. 2012c). Le domaine PWWP de BRPF1 a aussi été caractérisé et montre une préférence de liaison à H3K36me3 (Laue et al. 2008; Vezzoli et al. 2010). Dans une étude à grande échelle d'interactions de plusieurs protéines à bromodomains avec différentes marques d'histones, le bromodomaine de BRPF1 a montré une certaine affinité pour plusieurs lysines acétylées, mais ces résultats restent probablement à être revalider (Filippakopoulos et al. 2012). Finalement, la sous-unité ING5 possède, tel que mentionné déjà à plusieurs reprises, un domaine PHD qui reconnaît H3K4me3.

1.2.5. MOF

L'acétyltransférase MOF est responsable de la majorité de l'acétylation de H4K16 dans plusieurs organismes (Smith et al. 2000; Kimura et al. 2002; Shia et al. 2005; Smith et al. 2005; Taipale et al. 2005). Il existe deux complexes humains contenant cette enzyme. Le premier, MOF-MSL est formé des protéines hMSL1, hMSL2 et hMSL3 (Smith et al. 2005). Le second, MOF-MSL1v1 est formé des protéines MSL1v1, PHF20, MRCS1/2, WDR5 et de composantes des pores nucléaires (Li et al. 2009). Ces deux complexes possèdent des fonctions très différentes et le deuxième, récemment caractérisé, acétyle la protéine p53 sur la lysine 120 et contribue ainsi à la régulation de son activité, tout comme le fait Tip60 (Li et al. 2009). Chez la drosophile, le complexe MOF-MSL est très similaire à celui humain, mais contient en plus la protéine MLE, ainsi que deux ARNs non-codants, rox1/2 (Rea et al. 2007). Deux études ont publié un *knockout* de MOF chez la souris. Ces deux études ont observé que cette délétion était létale au stade embryonnaire et abolissait l'acétylation de H4K16 (Gupta et al. 2008; Thomas et al. 2008).

1.2.5.1. Rôles fonctionnels du complexe MOF-MSL

En plus d'acétyle la protéine p53 et d'auto-acétyle ses sous-unités MSL1 et MSL3, MOF est également capable de cibler TIP5, une composante du complexe de remodelage NoRC (Buscaino et al. 2003; Zhou et al. 2009). Chez la drosophile, le complexe MOF-MSL est très bien caractérisé et est responsable de la compensation de dosage des chromosomes X sexuels. Cette compensation est effectuée en doublant le niveau de transcription du chromosome X sexuel chez le mâle pour égaliser l'expression faite par deux chromosomes X sexuels chez la femelle. Ce contrôle de la transcription génique passe par l'acétylation de H4K16 sur le chromosome X (Akhtar and Becker 2000; Smith et al. 2000). Bien que le rôle

du complexe humain soit un peu différent puisque la compensation de dosage passe par une inactivation d'une copie du chromosome X chez la femelle, la grande similarité entre les complexes orthologues suggère que celui-ci joue tout de même un rôle dans la régulation transcriptionnelle. Des expériences de déplétion de hMOF et de hMSL1 ont d'ailleurs montré une dérégulation de l'expression de plusieurs gènes dans des cellules HeLa (Smith et al. 2005). Finalement, le complexe semble également jouer un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN, en permettant son activation (Gupta et al. 2005; Sharma et al. 2010).

1.2.5.2. Domaines de reconnaissance de la chromatine au sein du complexe MOF-MSL

Il existe peu de domaines de reconnaissance de la chromatine caractérisés dans le complexe MOF-MSL. Les sous-unités hMOF et MSL3 possèdent chacune un chromodomaine. Celui de MSL3 a été montré pour lier H3K36me3 et cette liaison permet au complexe de s'étaler sur le chromosome X afin d'activer la transcription des gènes pour la compensation de dosage (Sural et al. 2008). La délétion du chromodomaine de MOF montre également que ce domaine est essentiel pour l'acétylation de H4K16 chez la drosophile et pour l'étalement du complexe MOF-MSL sur le chromosome X (Conrad et al. 2012). La protéine MSL2 possède quant à elle un domaine RING, mais qui n'a pas été caractérisé.

1.3. But du projet de doctorat

La composition des complexes comprenant des protéines ING a été décrite en détail par mon laboratoire d'accueil de doctorat (Doyon et al. 2006). Parmi ses complexes, on retrouve notamment trois MYST acétyltransférases qui ont d'ailleurs fait l'objet d'études approfondies autant par notre groupe que par divers autres laboratoires. Certains résultats obtenus suggèrent que les complexes MYST-ING participent à plusieurs fonctions nucléaires, tel que la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN.

Mon projet de doctorat s'est principalement concentré sur deux de ces complexes, soit le complexe HBO1 ainsi que le complexe MOZ/MORF. Nous avons auparavant démontré que l'acétyltransférase HBO1 pouvait s'associer à deux variants d'épissage de la protéine JADE1 (JADE1L vs JADE1S) et que ces associations pouvaient réguler non seulement la composition du complexe, mais aussi sa localisation génomique (Saksouk et al. 2009).

Afin de pousser plus loin la caractérisation de ces complexes MYST, mon premier objectif de thèse a été de poursuivre la dissection des différents domaines protéiques présents au sein de ces deux complexes et de caractériser leurs interactions soit avec les autres sous-unités, soit avec la chromatine. Par des analyses biochimiques, nous avons mis en lumière le mode d'assemblage des complexes MYST. Nous avons également caractérisé les différents domaines de reconnaissance de modifications post-traductionnelles des histones compris dans ces complexes, afin de déterminer leur mode de recrutement. Des analyses à l'échelle du génome entier nous ont d'ailleurs permis de localiser ces protéines à des loci bien précis. De plus, il nous a été possible de constater l'importance de l'association des protéines ING sur la fonction suppresseur de tumeur du complexe HBO1-JADE.

Jusqu'à récemment, l'acétyltransférase HBO1 avait été montrée pour n'être en complexe qu'avec les protéines JADEs. De nouvelles études ont par la suite laissé croire, que la protéine pouvait également s'associer dans un nouveau complexe avec les BRPFs, normalement comprises dans le complexe MOZ/MORF (voir figure 1-7) (Mishima et al. 2011). Suite à une purification de la protéine BRPF1, j'ai pu également constater l'association de HBO1 avec cette protéine. Comme deuxième objectif de thèse, j'ai donc eu à caractériser le nouveau complexe HBO1-BRPF1 et à démontrer sa spécificité d'acétylation. En utilisant des essais d'acétylation *in vitro* combinés à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (*in vivo*), j'ai pu établir un nouveau mode de régulation de l'activité acétyltransférase de la protéine HBO1. Ce mécanisme étonnant démontre un changement de spécificité de l'activité catalytique des MYST en fonction de leur association aux protéines d'échafaudage.

Chapitre 2

Perceiving the epigenetic landscape through histone readers

Catherine A Musselman¹, Marie-Eve Lalonde², Jacques Côté² & Tatiana G Kutateladze¹

¹Department of Pharmacology, University of Colorado School of Medicine, Aurora, Colorado, USA. ²Laval University Cancer Research Center, Hôtel-Dieu de Québec, Québec City, Québec, Canada.

Correspondence should be addressed to T.G.K. (tatiana.kutateladze@ucdenver.edu).

2.1. Résumé

Les modifications post-traductionnelles (MPTs) des histones permettent de réguler la structure ainsi que la dynamique de la chromatine. Les MPTs peuvent moduler les interactions directes entre l'ADN et les histones, mais créent également des plates-formes de recrutement pour des protéines effectrices ou encore simplement pour des protéines « lectrices », possédant des domaines de reconnaissance pour ces MPTs. La liaison de ces protéines permet le recrutement et la stabilisation de différents acteurs des voies de signalisation nucléaires, et ce à des sites bien précis du génome. Ainsi, les processus de transcription des gènes ainsi que de réparation, de recombinaison et de réplication de l'ADN dépendent en effet du recrutement des protéines de ces voies à la chromatine. Cette revue met en avant-plan les dernières avancées concernant la caractérisation de la liaison aux MPTs des histones ainsi que l'identification de nouvelles protéines « lectrices » de ces marques.

2.2. Abstract

Post-translational modifications (PTMs) of histones provide a fine-tuned mechanism for regulating chromatin structure and dynamics. PTMs can alter direct interactions between histones and DNA and serve as docking sites for protein effectors, or readers, of these PTMs. Binding of the readers recruits or stabilizes various components of the nuclear signaling machinery at specific genomic sites, mediating fundamental DNA-templated processes, including gene transcription and DNA recombination, replication and repair. In this review, we highlight the latest advances in characterizing histone-binding mechanisms and identifying new epigenetic readers and summarize the functional significance of PTM recognition.

The genetic material of eukaryotic cells is packaged into the nucleus in the form of chromatin. Chromatin is made up of building blocks called nucleosomes. Each nucleosomal particle contains an octamer of four histone proteins, H2A, H2B, H3 and H4, around which genomic DNA is wound almost twice (Luger et al. 1997). The nucleosomes undergo recurrent structural rearrangements through DNA unwrapping and rewrapping and histone core disassembly and assembly, and are subject to covalent modifications. The modifications, or epigenetic marks, have been identified on both DNA and histones. While DNA can primarily be methylated, histones are capable of carrying a wide array of posttranslational modifications (PTMs) (Kouzarides 2007). A particularly large number of PTMs have been discovered on the histone tails that protrude from the nucleosomal core and are freely accessible to enzymes for the deposition or removal of PTMs (Fig. 1). The mechanism by which histone PTMs affect chromatin structure and dynamics can generally be broken into two categories. Histone PTMs can directly influence histone-DNA and histone-histone interactions or can be targeted by protein effectors, also referred to as histone-binding domains or readers of PTMs.

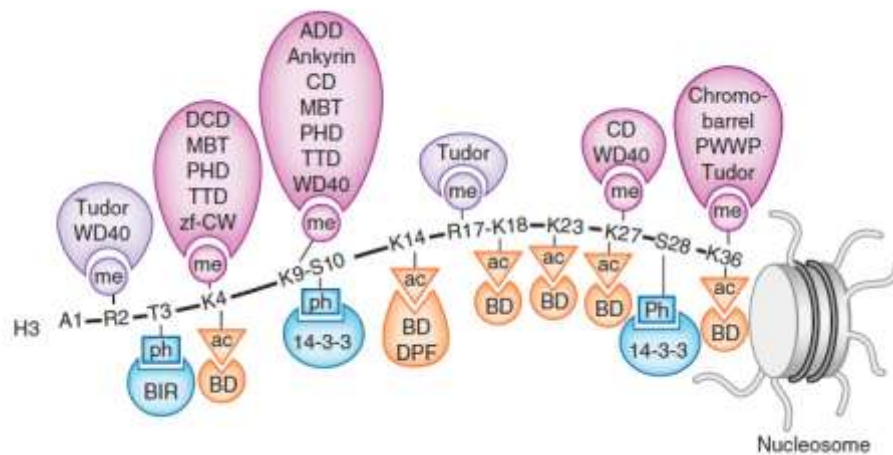


Figure 2-1. Readers of histone PTMs.

Recognition of the methylated (me) lysine, methylated (me) arginine, acetylated (ac) lysine and phosphorylated (ph) serine and threonine residues of the N-terminal histone H3 tail by indicated readers.

The specific recognition of PTMs by readers recruits various components of the nuclear signaling network to chromatin, mediating fundamental processes such as gene

transcription, DNA replication and recombination, DNA damage response and chromatin remodeling. Chromatin-associating complexes often contain multiple readers within one or several subunits that exhibit specificities for distinct PTMs. Coordinated binding to multiple PTMs can provide a lock-and-key type mechanism for targeting particular genomic sites and ensuring the proper biological outcomes. Misreading of epigenetic marks has been shown to underlie a host of human diseases including autoimmune and developmental abnormalities and cancer (Portela and Esteller 2010; Dawson and Kouzarides 2012). More recently, misregulation of epigenetic pathways has been implicated in addiction, schizophrenia and other mental disorders (Tsankova et al. 2007; Robison and Nestler 2011). Thus, understanding the molecular mechanism and functional significance of reader-PTM interactions is essential to understanding not only the basic mechanisms of epigenetic regulation, but also the etiology of epimutation-induced human diseases.

In this review we outline known readers of histone PTMs, detail their mechanisms of action, and discuss crosstalk between protein effectors and consequences of the combinatorial readout of PTMs.

2.3. History of histone PTMs

The first posttranslational modifications of histones were discovered nearly 50 years ago (Allfrey et al. 1964). However, it wasn't until 30 years later that enzymatic activities of a histone acetyltransferase and a deacetylase were directly linked to transcriptional regulation (Brownell et al. 1996; Taunton et al. 1996). In addition to lysine acetylation, numerous PTMs have now been identified, including methylation, ubiquitination, sumoylation, crotonylation, butyrylation, and propionylation of lysine residues, methylation, citrullination, and ADP-ribosylation of arginine residues, and phosphorylation and glycosylation of serine and threonine residues. As a significant level of interplay between PTMs has begun to unfold, it led Strahl and Allis to propose the histone code hypothesis, which states that 'multiple histone modifications, acting in a combinatorial or sequential fashion on one or multiple histone tails, specify unique downstream function (Strahl and Allis 2000). Soon after, the terms writer, eraser and reader to describe proteins that deposit, remove and recognize PTMs, respectively, were formulated (Jenuwein and Allis 2001;

Ruthenburg et al. 2007a). In addition to histone PTMs, other factors including methylation and hydroxymethylation of DNA, histone variants, nucleosome positioning, non-coding RNAs, and histone chaperones are necessary for fine-tuning chromatin structure and function, and together constitute the powerful and dynamic epigenetic machinery.

The original term epigenetics was associated with heritable changes in gene activity that occur without alterations in the genetic code, sometimes defined as ‘soft’ inheritance (Berger et al. 2009; Bonasio et al. 2010). However, more and more often this term is used to describe DNA-related regulatory mechanisms which do not involve changes in the nucleotide sequence regardless of whether such imprinting is strictly heritable (epi- stands for ‘above’ in Greek, hence ‘above genetics’). The intricate relationship among the epigenetic elements represents one of the most intriguing concepts in modern chromatin biology, which we have only begun to explore. Clearly, the spatial and temporal modulation of and crosstalk between histone PTMs plays a very significant role in defining the chromatin landscape.

In 1999 the first reader of histone PTMs was discovered when bromodomain of the P/CAF histone acetyltransferase (HAT) was found to recognize acetylated lysine (Dhalluin et al. 1999). It was also the first example supporting the hypothesis that bromodomains contribute to ‘acetylation by tethering transcriptional HATs to specific chromosomal sites (Dhalluin et al. 1999). Since then a large number of histone effectors have been identified and characterized, including readers of methylated lysine and arginine and phosphorylated serine and threonine (Taverna et al. 2007). Moreover, many readers can discriminate a particular sequence surrounding a PTM, affording specific chromatin targeting ability to their host proteins. Below we outline the known protein effectors and the molecular mechanisms of their interaction with target PTMs.

2.4. Methylation readers

Methylation is perhaps the most versatile of all histone PTMs. Two residues, lysine and arginine, can be methylated and each of these has three possible methylation states. Unlike other modifications, methylation does not change the overall charge, although it does alter the hydrophobic character and size of the modified residue.

2.4.1. Lysine methylation

Lysine is methylated on its ϵ -amino group and can be mono-, di-, or trimethylated. Six lysine residues in histone H3 (K4, K9, K26, K27, K36 and K79) as well as K20 of histone H4 and K26 of histone H1 comprise canonical sites for methylation. With the exception of H3K79, these are all located in the N-terminal tails of the histone proteins. To date, readers of methylated lysine are the most thoroughly characterized group and include ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L), Ankyrin, BAH (bromo adjacent homology), chromo-barrel, chromodomain (CD), double chromodomain (DCD), MBT (malignant brain tumor), PHD (plant homeodomain), PWWP, Tandem Tudor domain (TTD), Tudor, WD40 and zf-CW (zinc finger CW) (Table 1 and Fig. 2a).

Recognition of	Reader	Histone PTM
Methyllysine	ADD	H3K9me3
	Ankyrin	H3K9me2, H3K9me1
	BAH	H4K20me2
	Chromo-barrel	H3K36me3, H3K36me2, H4K20me1, H3K4me1
	Chromodomain	H3K9me3, H3K9me2, H3K27me3, H3K27me2
	DCD	H3K4me3, H3K4me2, H3K4me1
	MBT	H3Kme1, H3Kme2, H4Kme1, H4Kme2
	PHD	H3K4me3, H3K4me2, H3K9me3
	PWWP	H3K36me3, H4K20me1, H4K20me3, H3K79me3
	TTD	H3K4me3, H3K9me3, H4K20me2
	Tudor	H3K36me3
	WD40	H3K27me3, H3K9me3
	zf-CW	H3K4me3
Methylarginine	ADD	H4R3me2s
	Tudor	H3Rme2, H4Rme2
	WD40	H3R2me2
Acetyllysine	Bromodomain	H3Kac, H4Kac, H2AKac, H2BKac
	DBD	H3KacKac, H4KacKac
	DPF	H3Kac
	Double PH	H3K56ac
Phosphoserine or phosphothreonine	14-3-3	H3S10ph, H3S28ph
	BIR	H3T3ph
	Tandem BRCT	H2AXS139ph
Unmodified histone	ADD	H3un
	PHD	H3un
	WD40	H3un

Tableau 2-1. Histone readers and their target PTMs.

The foremost trait of the Kme-specific readers is that they bind methylated lysine residues via an aromatic cage, typically formed by two to four aromatic residues (Fig. 2b). In many complexes the aromatic rings are positioned perpendicular to each other surrounding the fully extended side chain of the methylated lysine. The complex formation is driven by cation- π interactions between the methylammonium group and the aromatic rings, as well as hydrophobic and van der Waals contacts. The mono-, di-, or trimethylated state of lysine is selected for by the exact composition and size of the pocket. A reader prefers mono- or dimethylated over trimethylated lysine if one of the walls of the cage is replaced by a negatively charged Asp or Glu residue, whose carboxylate group makes additional favorable hydrogen bonding and electrostatic contacts with the methylammonium moiety (Fig. 2c). A small pocket size can also preclude interaction with a higher methylation state due to steric hindrance, whereas a larger pocket selects for a higher methylation state as necessary contacts are only possible with the bulkier methylammonium group.

Specificity for a particular Kme is imparted by interaction with surrounding residues. Some histone readers exhibit high levels of specificity, while others are only selective for a certain methylation state and otherwise bind very promiscuously. Beyond caging of the Kme, the mechanism of recognition of surrounding residues varies among readers.

The structurally related CD, chromo-barrel, MBT, PWWP, Tudor and TTD modules possess a characteristic β -barrel topology and comprise the Royal superfamily. CD is the smallest member, consisting of four curved β strands and an α helix. CDs of HP1 and Pc proteins were found to recognize H3K9me3 and H3K27me3, respectively, and it was the first example of a Kme-specific reader (Bannister et al. 2001; Jacobs and Khorasanizadeh 2002; Nielsen et al. 2002; Fischle et al. 2003; Min et al. 2003). CDs mostly prefer trimethylated lysine, though some have been shown to bind dimethylated species. The aromatic cage of CD of mouse/fly HP1 contains an Asp/Glu residue, accounting for its ability to interact well with H3K9me3 and H3K9me2 (Jacobs and Khorasanizadeh 2002; Nielsen et al. 2002). Upon binding, the histone peptide adopts a β strand conformation and inserts between two β strands of CD, completing the five-stranded antiparallel β -barrel. This induced-fit binding mode is stabilized through backbone hydrogen bonds and electrostatic contacts involving up to seven residues preceding Kme3 and one residue

following Kme3 of the histone peptide. A small hydrophobic pocket in which the n-2 (with respect to Kme) residue resides precludes binding of H3K4me3, whereas interactions at the n-4 and n-5 positions are important for distinguishing between H3K9me3 and H3K27me3 (Blus et al. 2011).

Other Royal superfamily members have a complete five-stranded β -barrel, which prevents the insertion of a peptide between β strands of the barrel. Instead, the histone tail lies across an open edge of the β -barrel, with the methylated lysine occupying the aromatic cage located near the upper rim. Tudor is the classic module that utilizes this binding mechanism. Tudor can exist as a single domain or in tandem containing two β -barrels. The single Tudor domain of PHF1 has been shown to recognize H3K36me3, whereas the canonical tandem Tudor domain (TTD) of 53BP1 associates with H4K20me2, and hybrid TTD of JMJD2A binds H3K4me3 and H4K20me3 (Botuyan et al. 2006; Huang et al. 2006; Lee et al. 2008; Musselman 2012). The aromatic cage is generally seen in only one β -barrel of TTDs and the majority of contacts with the histone tail are found within that barrel. An interesting exception to this is TTD of Sgf29 (Bian et al. 2011). In the complex of Sgf29 TTD with H3K4me3, the peptide spans both Tudor domains, with Ala1 and K4me3 being bound in separate β -barrels (Bian et al. 2011). Here recognition of Ala1 largely defines the specificity towards H3K4, a common determinant of H3K4me3 binding.

MBT reads lower methylation states, recognizing mono- and dimethylated lysines. The currently characterized MBTs contain 2–4 repeats of ~100 amino acids. The most common 3MBT module folds in a propeller-like structure and the 4MBT module has an asymmetric rhombus architecture (Grimm et al. 2007; Li et al. 2007c; Min et al. 2007; Guo et al. 2009). Interestingly, although each MBT repeat contains an aromatic cage, which also includes an acidic residue, only the second repeat binds methylated lysine (Grimm et al. 2007; Li et al. 2007c; Min et al. 2007; Guo et al. 2009). Very little sequence specificity is observed as few contacts are made with the histone residues beyond Kme1/2 (Klymenko et al. 2006; Grimm et al. 2007; Li et al. 2007c; Min et al. 2007; Guo et al. 2009). The other two members of the Royal family, PWWP and chromo-barrel, exhibit some specificity, preferring H3K36me3/2 and H4K20me1, however bind rather weakly (Zhang et al. 2006; Xu et al. 2008; Wang et al. 2009a; Kim et al. 2010a; Vezzoli et al. 2010; Wu et al. 2011b).

Distinct from the Royal family is the PHD finger, a well-characterized reader of H3K4me3 (Li et al. 2006; Pena et al. 2006; Shi et al. 2006; Wysocka et al. 2006). It contains a C₄HC₃ motif that coordinates two zinc ions in a cross-brace manner. Such an arrangement produces a globular domain with a small β sheet and an α helix. PHD fingers make extensive contacts with H3K4me3, imparting a high degree of specificity (Musselman and Kutateladze 2011). The peptide forms the third anti-parallel β strand, pairing with the existing double-stranded β sheet of the protein. While trimethylated Lys4 inserts into the aromatic cage, Arg2 occupies the adjacent binding pocket. This pocket often contains acidic residues, which restrain the guanidinium group of Arg2 through ionic and hydrogen-bonding interactions. Ala1 is bound in a small hydrophobic cavity and its N-terminal amino group donates two to three hydrogen bonds to the backbone carbonyl groups of the protein. This strictly conserved coordination of Ala1 and a frequent constraining of Arg2 as well as fitting of Thr3 into a small pocket provides the specificity toward K4me3. A similar mode of recognition of the histone Ala1-Lys4me3 sequence is seen in a single zinc-finger, zf-CW (He et al. 2010a), and in the double chromodomain (DCD) of human CHD1 where two CD domains fold in a unique module forming a conjoint binding site for the peptide (Flanagan et al. 2005).

The WD40 domain of EED binds trimethylated lysines using an aromatic cage, positioned at the top of the channel of a seven-bladed β -propeller (Margueron et al. 2009; Xu et al. 2010). It is fairly promiscuous and interacts with H3K27me3, H3K9me3, H4K20me3 and H1K26me3. The structure of EED WD40 in complex with H3K27me3 reveals an important role of the residues flanking K27me3 (Margueron et al. 2009; Xu et al. 2010). A small hydrophobic residue, a solvent exposed residue and another hydrophobic residue at the positions -2, -1 and +2, respectively, are responsible for the preferential recognition of repressive chromatin marks and discriminating against H3K4me3. Due to extensive intermolecular contacts, the ankyrin repeats of G9a and GLP, and the BAH domain of ORC1 display high specificity for H3K9me2/1 and H4K20me2, respectively (Collins et al. 2008; Kuo et al. 2012). The H3K9me2 peptide is sandwiched between the β turns and α helices of the 4th and 5th ankyrin repeats, whereas K9me2 fits into the aromatic cage also containing a Glu. The Ser10-Gly13 residues of the H3K9me2 peptide are involved in

multiple interactions that impart specificity. The ATRX ADD domain and the PHD fingers of CHD4 and TRIM33 are examples of readers lacking the aromatic cage (Musselman et al. 2009; Eustermann et al. 2011; Iwase et al. 2011; Mansfield et al. 2011; Xi et al. 2011). Binding of these modules to the histone H3 tail is enhanced by methylation of H3K9. K9me3 is uniquely coordinated through formation of nonconventional carbon-oxygen hydrogen bond or hydrophobic and cation- π contacts with a single aromatic residue.

2.4.2. Functional significance of Kme recognition

Methylation of lysine residues is the most characterized PTM in terms of cellular functions, hallmarked by a major role in transcriptional regulation. On a global chromatin level, H3K4me is considered to be a gene activation mark, however, the consequence of its readout by histone effectors is highly context dependent. Lysine trimethylation is generally located in the 5' end region of actively transcribed genes and this is conserved from yeast to higher eukaryotes (Bernstein et al. 2002; Liang et al. 2004; Schneider et al. 2004). The TAF3 subunit of the basal transcription complex TFIID binds to H3K4me3 via its PHD finger, directly implicating this mark in transcription activation (Vermeulen et al. 2007). By contrast, recognition of H3K4me3 by the PHD finger of ING2, a subunit of mSin3a histone deacetylase complex, links this PTM to rapid gene repression (Shi et al. 2006). Binding of the PHD finger of the PHF8 histone demethylase (Horton et al. 2010) and the DCD of the CHD1 ATPase (Flanagan et al. 2005) to H3K4me mediates enzymatic activities of these proteins, coupling the readout of H3K4me to the chromatin-modifying and -remodeling mechanisms. The chromo-barrel domain of the Tip60 acetyltransferase associates with H3K4me1, a marker of active and poised enhancer elements, tethering Tip60 to the enhancer regions and leading to estrogen-induced transcription (Jeong et al. 2011).

Histone H3 lysine 36 methylation also plays a role in the transcriptional process. Genome-wide profiling of H3K36me stages shows a progressive shift from monomethylation to trimethylation of K36 between the 5' and 3' end of genes (Bannister et al. 2005). The H3K36me-specific enzyme Set2 binds to elongating RNA pol II and methylates the coding regions of genes, preventing spurious transcription initiation and histone exchange in budding yeast by recruiting the Rpd3S deacetylase complex through its Eaf3 subunit, which binds to K36me via its chromo-barrel domain (Carrozza et al. 2005b; Joshi and Struhl

2005; Keogh et al. 2005). This complex deacetylates nucleosomes on gene bodies during elongation and thus provides nucleosome stability in the wake of elongating RNA pol II (Venkatesh et al. 2012). Recognition of H3K36me3 by the Tudor domain of PHF1 inhibits PRC2-mediated H3K27 methylation (Musselman 2012). This interaction may represent a mechanism to guide the deposition of H3K27me3, restricting activity of the PRC2 complex at the boundaries of active and repressed regions and preventing the Polycomb-linked repressive environment from spreading into neighboring transcriptionally active chromatin (Schmitges et al. 2011; Yuan et al. 2011).

The importance of K36me recognition for other fundamental processes has recently been established. Association with K36me by the chromo-barrel domains of MRG15 and the MSL3 subunit of the MOF complex plays a role in regulating alternative splicing of mRNAs (Luco et al. 2010) and upregulating genes for dosage compensation in *D. melanogaster* (Alekseyenko et al. 2008), respectively. The PWWP domain present in the IOC4 subunit of the ISW1b chromatin-remodeling complex also recognizes H3K36me (Maltby et al. 2012b; Smolle et al. 2012), bridging readout of this PTM with ATP-dependent nucleosome remodeling activity. An additional role for H3K36me in DNA repair and recombination through the LEDGF PWWP domain has been suggested (Daugaard et al. 2012); however, it remains unclear whether it has a positive or negative regulatory function in DNA replication (Biswas et al. 2008; Pryde et al. 2009). Recently, the BAH domain of ORC1 has been shown to bind H4K20me2, and this interaction aids in DNA replication licensing (Kuo et al. 2012). The H4K20me2 mark also plays a critical role in the DNA repair pathway in which it is targeted by TTD of 53BP1 (Botuyan et al. 2006). This interaction is in direct competition with the JMJD2A/B histone demethylases, which bind to H4K20me2 via their TTDs prior to DNA damage (Malette et al. 2012). Upon DNA damage, JMJD2 is degraded through the RNF8/RNF168 pathway, exposing H4K20me2 to 53BP1 TTD (Malette et al. 2012).

Recognition of the histone H3 K9 and K27 methylation marks is largely associated with formation of constitutive/facultative heterochromatin and gene silencing. H3K27me1 and H3K9me3 are found in pericentromeric heterochromatin regions (Peters et al. 2003; Rice et al. 2003), while H3K27me3 and H3K9me2 colocalize in repressed euchromatin regions.

The K27me and K9me marks both are targets for CD-containing proteins. The former recruits Pc proteins and their host PRC1 complexes to repressed chromatin (Fischle et al. 2003; Min et al. 2003), whereas the latter recruits HP1 proteins involved in heterochromatin formation and spreading (Bannister et al. 2001; Lachner et al. 2001; Canzio et al. 2011).

2.4.3. Arginine methylation

The omega nitrogen atoms of arginine can be monomethylated (Rme) or dimethylated either symmetrically (Rme2s) or asymmetrically (Rme2a). To date, methylation of H3R2, H3R8, H3R17, H3R26, H4R3, H2AR11 and H2AR29 has been reported. As compared to Kme, information on writing and especially erasing and recognition of Rme is rather limited; however there are some indications that this mark is read by histone effectors, and a number of readers display sensitivity to the methylation state of arginine.

The Tudor domain is known to bind methylated arginines in non-histone ligands, particularly PIWI (Chen et al. 2011), and recent studies suggest that the TDRD3 Tudor domain recognizes H3R17me2a and H4R3me2a (Xu et al. 2010; Liu et al. 2012b). While no structure has yet been determined of a Tudor bound to a Rme-containing histone peptide, the structures of the SMN and SPF30 Tudor domains in complex with a dimethylated arginine amino acid provide insight into how this mark can be specifically recognized (Tripsianes et al. 2011). Like Kme, methylated Arg occupies an aromatic cage at the top of the Tudor β -barrel (Fig. 2d). This cage is however much narrower than the cage for methylated Lys, thus favoring the planar guanidinium group.

The WD40 repeat of WDR5 prefers H3R2me2s over unmodified or methylated at Lys4 histone H3 peptides (Migliori et al. 2012). The first three N-terminal residues of H3 are involved in the majority of direct contacts, which are also conserved in the complexes of WDR5 with H3un and H3K4me (Couture et al. 2006; Han et al. 2006; Ruthenburg et al. 2006; Schuetz et al. 2006). The side chain of R2me2s inserts deeply into the open channel of the β -propeller with the methylated guanidine moiety being sandwiched between two phenylalanine rings (Migliori et al. 2012) (Fig. 2d). Notably, in the complexes of WDR5 with various H3 peptides, R2 is bound in the same pocket and adopts a similar

conformation; however Rme2s makes tighter hydrophobic interactions, whereas unmethylated R2 forms an additional water-mediated hydrogen bond (Couture et al. 2006; Ruthenburg et al. 2006; Schuetz et al. 2006; Migliori et al. 2012).

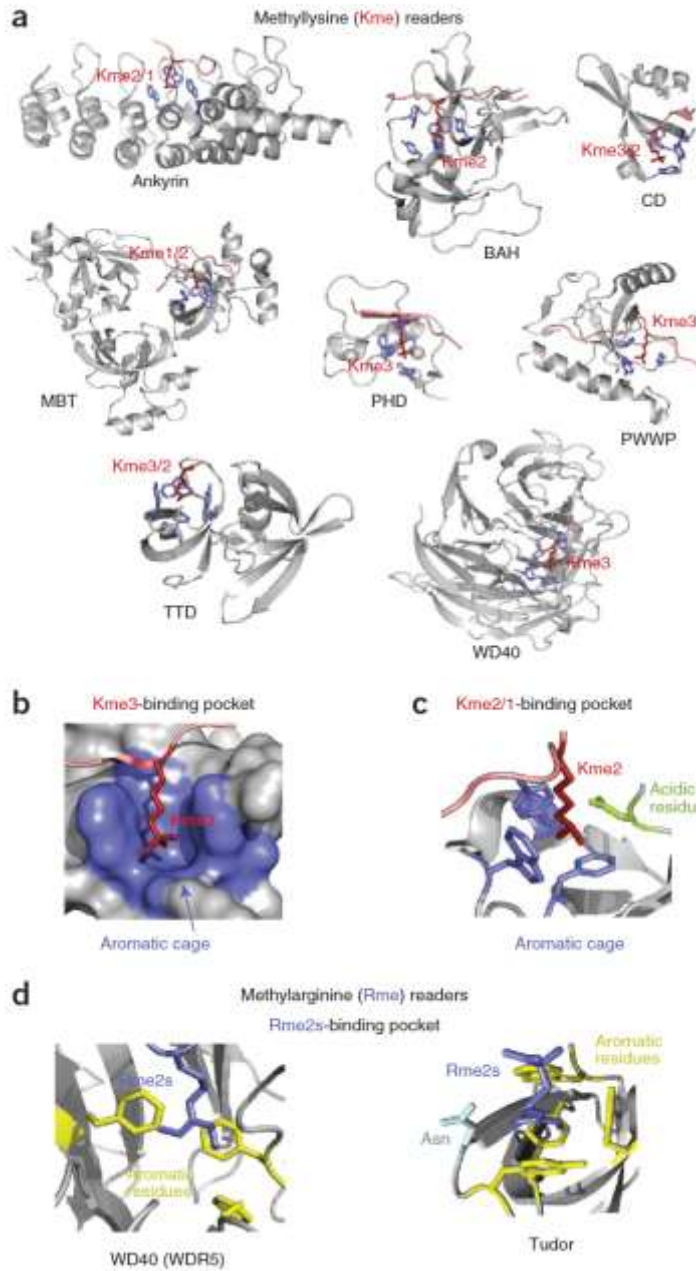


Figure 2-2. Molecular mechanisms for the recognition of methyllysine and methylarginine.

(a) Structures of the readers in complex with histone peptides methylated at lysine residues. The aromatic cage residues and the histone peptides are colored blue and red, respectively. (b–d) The binding sites for trimethylated lysine (Kme3) (b), dimethylated lysine (Kme2) (c) and symmetrically dimethylated arginine (Rme2s) (d).

2.4.4. Functional significance of Rme recognition

Very little is known about the significance of methylarginine readout in histone proteins. One of the few reported examples involves recognition of H3R17me_{2a} and H4R3me_{2a} by the TDRD3 Tudor domain, which facilitates recruitment of this co-transcriptional activator to gene promoters and is necessary for proper co-activation (Yang et al. 2010). The ADD domain of the DNMT3a DNA methyltransferase has been shown to interact with H4R3me_{2s}, promoting silencing of the human β -globin locus (Zhao et al. 2009). The association of the WDR5 WD40 module with H3R2me_{2s}, produced by PRMT5 and PRMT7, is important for euchromatin maintenance (Migliori et al. 2012). Altogether, these examples demonstrate that recognition of methylated arginines in histone proteins can influence transcriptional processes.

2.5. Acetylation readers

Besides being methylated, lysine can also be acetylated at the ϵ -amino group. Unlike methylation, this modification changes the electrostatic properties of histone proteins by neutralizing the charge of lysine. Currently, acetylation has been found to occur on H3 (K4, K9, K14, K18, K23, K27, K36, K56), H4 (K5, K8, K12, K16, K20, K91), H2A (K5, K9), and H2B (K5, K12, K15, K16, K20, K120). Generally speaking this PTM leads to a more open chromatin structure as it weakens the interaction with the negatively charged DNA, and is largely associated with a transcriptionally active state. To date, three histone effectors capable of reading acetylated lysine have been identified.

Bromodomain (BD) is the most thoroughly characterized acetylated lysine (Kac) reader (Dhalluin et al. 1999; Sanchez and Zhou 2009). Despite little sequence similarity between the family members, BDs fold into a highly conserved four helix bundle structure (helices α A, α B, α C, α Z). The inter-helical ZA and BC loops create a deep, primarily hydrophobic cavity, into which the acetyllysine inserts. Kac makes several contacts with hydrophobic residues, including two often conserved tyrosines and is stabilized by a hydrogen bond with a highly conserved Asn. The surface properties of BDs vary considerably, accounting for a wide array of ligands (Filippakopoulos et al. 2012). In general, isolated BDs bind to acetylated histones weakly, yet at times they display specificity, imparted by interaction

with surrounding residues. Simultaneous recognition of multiply acetylated sequences either by a single BD or by covalently linked BDs can significantly enhance binding, as seen in TAF1 and Brdt (Jacobson et al. 2000; Moriniere et al. 2009). Two BD modules in the double bromodomain (DBD) of TAF1 create a V-shape structure with both Kac binding pockets oriented in the same direction and separated by ~ 25 Å, a distance ideal for recognition of doubly acetylated H4 tail (Jacobson et al. 2000). In agreement, TAF1 DBD displays much higher affinity for diacetylated H4K5acK12ac and H4K8acK16ac peptides than for monoacetylated peptides, suggesting that each BD module interacts with one acetyllysine in the same peptide. Brdt utilizes a different mechanism to increase binding. The first BD of Brdt accommodates both acetyllysines of H4K5acK8ac in a wider hydrophobic pocket (Fig. 3a), whereas the second BD binds H3K18ac (Moriniere et al. 2009).

More recently, the double PHD finger (DPF) of Dpf3b has been found to associate with acetylated histone peptides (Lange et al. 2008; Zeng et al. 2010). The PHD modules in DPF adopt a typical zinc-finger topology but have a large interface, which results in an overall unique scaffold (Zeng et al. 2010). The structure of the DPF-H3K14ac complex reveals that the PHD modules are engaged in coordinated interaction (Zeng et al. 2010). While the first four N-terminal residues of H3K14ac are bound by the second PHD module, the first PHD module anchors Lys14ac in the binding pocket composed of hydrophobic and charged residues, including the necessary Asp-Phe sequence.

The double pleckstrin homology (PH) domain of Rtt106 has recently been implicated in binding to H3K56ac (Su et al. 2012). Each PH domain consists of a seven-stranded β -barrel, capped by one or two α helices at one of the open ends. The opposite end of the barrel is framed by three variable loops, which in a canonical PH domain comprise the binding site for a phosphoinositide lipid (Kutateladze 2010). Although it is unclear whether Rtt106 binds lipids, chemical shift perturbation analysis reveals that the H3K56ac-binding pocket is located in the second PH module at the interface of the C-terminal α helix and the β -barrel, with an Asp, Tyr and Arg most likely forming a cleft for Kac (Su et al. 2012).

2.5.1. Functional significance of Kac recognition

For a long time, acetylation of histones was merely considered as a mechanism for chromatin opening by way of disrupting the association between histones and DNA, however a number of effector-harboring proteins have been found to bind Kac. Many of these interactions are implicated in gene transcription, linking the direct readout of this PTM to transcriptional control. The BRD family of proteins is composed of transcription regulators that possess BDs, which are specific for singly or multiply acetylated histone peptides (Filippakopoulos et al. 2012). Activation and regulation of the DPF3b- and MOZ-target genes requires binding of their DPFs to H3K14ac (Zeng et al. 2010; Qiu et al. 2012).

Recognition of H3K56ac by the PH domain of the histone chaperone Rtt106 is essential in gene silencing as well as DNA damage response (Su et al. 2012). Likewise, association of BD of the catalytic subunit of SWI/SNF, BRG1, with acetylated H3 is necessary for DNA repair (Lee et al. 2010). Yeast DBD-containing proteins Bdf1 and Bdf2 target H4Kac and regulate transcription and chromatin dynamics, but are also important for replication-coupled DNA repair and normal mRNA splicing (Matangkasombut and Buratowski 2003; Koerber et al. 2009; Albuлесcu et al. 2012; Garabedian et al. 2012). The BD-harboring protein ACF1 is enriched in replicating pericentromeric heterochromatin and its depletion causes a delay in cell-cycle progression (Collins et al. 2002). A closely related protein BPTF contains a BD that binds H4K16ac, which is important for the *Hox* gene localization of the BPTF-NURF complex (Ruthenburg et al. 2011).

2.6. Phosphorylation readers

Similar to lysine acetylation, phosphorylation of serine and threonine (S/Tph) alter the electrostatic and topographic properties of histones by adding a bulky, negatively charged group to the modified residue. While recognition of phosphorylated sequences by cytosolic proteins has been characterized relatively well, much less is known about histone phosphorylation. Histones can be phosphorylated at T3, T6, S10, T11, S28 and T45 of H3; S1 of H4; S1 and T120 of H2A; S139 of H2AX (a human histone variant); and S14 of H2B and these PTMs are essential in DNA damage response pathways, mitosis, and transcriptional regulation.

The tandem BRCT domain has been found to specifically recognize H2AXS139ph (named γ H2AX) (Stucki et al. 2005). Each BRCT has an α/β sandwich architecture, with a central four-stranded β sheet surrounded by α helices on either side (Fig. 3b). The tandem repeats align in a head-to-tail manner forming a considerable hydrophobic interface. The H2AXS139ph peptide lays in the groove at the interface of two repeats. The phosphorylated S139 residue is held in a basic site through direct and water-mediated hydrogen bonds and ionic interactions. In all characterized BRCT domains specificity is defined by a hydrophobic residue at the +3 position, which is bound in a well-formed hydrophobic pocket on the protein surface (Stucki et al. 2005; Williams et al. 2010). Additionally, the carboxyl group at the C-terminus of γ H2AX (at the +3 position) is stabilized by hydrogen bonds with a conserved arginine, contributing significantly to the strength and specificity of the interaction.

The 14-3-3 ζ isoform recognizes H3S10ph and H3S28ph (Macdonald et al. 2005). 14-3-3 ζ belongs to a family of 14-3-3 proteins that generally interact with phosphorylated non-histone targets. The crystal structure of 14-3-3 ζ bound to H3S10ph provides insight into the mechanism underlying specificity for the histone ligand. The H3S10ph peptide assumes a partially extended conformation and inserts into a cleft formed by five helices of the U-shaped nine-helical protein. S10ph is restrained through multiple hydrogen bonding and ionic contacts with two arginine residues and a tyrosine, whereas the G12-G13 sequence adopts a conformation necessary for the C-terminus of the peptide to exit the cleft.

The BIR domain of Survivin is the newest histone reader that binds H3T3ph (Jeyaprasath et al. 2011; Du et al. 2012; Niedzialkowska et al. 2012). BIR folds into a small α/β structure stabilized by the coordination of a single zinc ion. The H3T3ph peptide is bound in an extended conformation across a largely electronegative surface of the BIR domain, with T3ph placed in a small positively charged patch composed of a lysine and a histidine. The peptide is anchored through an extensive network of hydrogen bonds involving several Asp and Glu residues of BIR and the free amino group of A1, the side chain of K4, and the backbone of the peptide.

2.6.1. Functional significance of Sph and Tph recognition

One of the best characterized histone phosphorylation marks is on serine 139 or 129 of mammalian or yeast histone H2A(X), respectively. In response to DNA damage, various kinases involved in the DNA repair pathway (ATM, ATR and DNA-PK) phosphorylate this residue to facilitate the repair process. Apart from recruiting the tandem BRCT domains of MDC1 (Stucki et al. 2005) and 53BP1/Crb2 (Ward et al. 2003; Sofueva et al. 2010), other proteins implicated in the DNA repair pathway have also been suggested to bind this PTM (Stucki et al. 2005; Stucki and Jackson 2006; Liu et al. 2012b). Likewise, a pro-apoptotic function has been proposed for the recognition of adjacent phosphorylated tyrosine 142 of H2AX by the PTB domain of Fe65 (Cook et al. 2009).

Two other established functions for histone S/Tph are regulation of mitosis and transcription. The Aurora B kinase phosphorylates H3S10 during mitosis, which is necessary for chromosome condensation and segregation (Hirota et al. 2005). This modification acts to release HP1 proteins from chromatin through disrupting the interaction of their CDs with H3K9me3 (Fischle et al. 2005; Hirota et al. 2005). The chromosomal passenger complex subunit Survivin binds H3T3ph via its BIR domain to allow proper Aurora B activity at inner centromeres (Wang et al. 2010; Jeyaprakash et al. 2011). The 14-3-3 family of proteins has many isoforms, some of which recognize H3S10ph and H3S28ph (Macdonald et al. 2005). Moreover, this binding is reinforced by acetylation of K14 on the same histone tail (Walter et al. 2008; Winter et al. 2008). The recruitment of 14-3-3 or its yeast homologs Bmh1/2 is necessary for transcription activation of GAL1 or HDAC1 among other genes (Walter et al. 2008; Winter et al. 2008).

2.7. Unmodified H3 readers

A large number of PHD fingers, as well as the ADD and WD40 modules associate with the H3un tail (Fig. 3c). Some similarity in the molecular mechanisms for the recognition of H3un and H3K4me3 by the PHD fingers is apparent. Like H3K4me3, the H3un peptide forms the third anti-parallel β strand in the complex (Lan et al. 2007). The side chain of A1 is buried in a small hydrophobic cavity, and the N-amino group of A1 is fixed by hydrogen bonds with backbone carbonyls of the protein. The guanidinium moiety of R2 is commonly

restrained through the formation of hydrogen bonding and ionic contacts. Differences between the two binding mechanisms arise from the distinct coordination of K4. The H3un-specific PHD fingers lack the aromatic cage and instead unmethylated K4 is bound by a set of hydrogen bonds and salt bridges formed with the acidic residues clustered on the surface of the protein. The majority of PHD fingers interact with a long stretch of the H3un tail, recognizing up to nine residues of H3 (Musselman and Kutateladze 2011), however the extended PHD finger of UHRF1 makes contacts with the only first four residues of H3un (Hu et al. 2011; Rajakumara et al. 2011; Wang et al. 2011). The R2 residue of the peptide rather than K4 is robustly bound by several hydrogen bonds, which results in a decreased sensitivity to PTMs on K4.

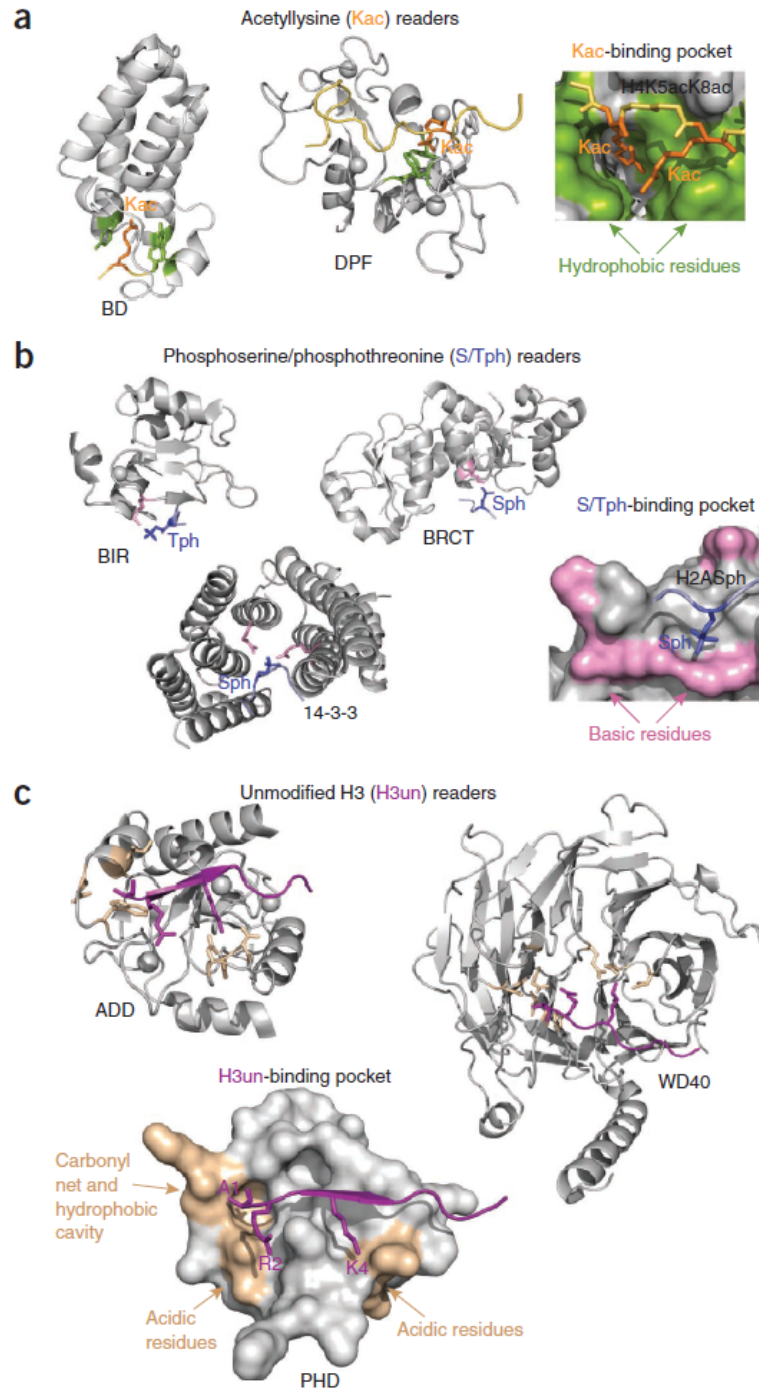


Figure 2-3. Molecular mechanisms for the recognition of acetyllysine, phosphoserine or phosphothreonine and unmodified histone H3.

(a–c) Structures of the readers bound to histone peptides that are acetylated at lysine residues (a), phosphorylated at serine or threonine residues (b) and unmodified (c). Binding-site residues are colored green (a), pink (b) and wheat (c) with the corresponding peptides in orange, blue and purple, respectively.

The ADD domain consists of a GATA-like C₄ finger followed by a PHD finger, which together coordinate three zinc ions. The ADD domain binds to the H3un peptide, utilizing a mechanism typical of PHD fingers and recognizing seven residues of the peptide (Ooi et al. 2007). The WD40 domain of Nurf55 is in direct contact with nine residues of H3un (Schmitges et al. 2011). The structure of the Nurf55-H3un complex reveals a hydrophobic cavity accommodating A1 and several hydrogen bonds fixing the amino groups of A1 and K4. However, buried within the propeller fold R2 is not stabilized through hydrogen bonds and instead sandwiched between two aromatic residues.

2.8. Combinatorial readout of and cross-talk between PTMs

The list of newly identified histone readers has grown rapidly, yet the finite number of readers and numerous biological processes they mediate suggest that explicit mechanisms exist to differentiate functions of the effector-containing proteins and elicit distinct biological outcomes. Given the extensive and complex nature of the chromatin landscape, several mechanisms involving the combinatorial readout of epigenetic marks have been uncovered.

The activity of a reader toward a particular modification can be influenced by neighboring PTMs (Fig. 4a). In fact, many readers associate with a significant stretch of the histone tail, allowing for sensing multiple marks. The neighboring PTMs can either enhance or impede interaction with the target PTM. The classic example is the inhibition of binding of HP1 CD to H3K9me₃ by phosphorylation of S10, which may negatively regulate localization of HP1 at chromatin during mitosis (Fischle et al. 2005). Similarly, phosphorylation of T3 decreases affinity of CHD1 DCD toward H3K4me₃ (Flanagan et al. 2005). Methylation of H3K4 abrogates interactions of the H3un-specific PHD fingers (Musselman and Kutateladze 2011) and ADD (Iwase et al. 2011), whereas acetylation of H4K8 substantially increases binding of Brdt BD to H4K5ac (Moriniere et al. 2009). Methylation of R2 enhances interaction of the Rag2 PHD finger with H3K4me₃ (Ramon-Maiques et al. 2007), while inhibiting this activity in the case of TAF3 and AIRE PHD fingers (Vermeulen et al. 2007; Chignola et al. 2009).

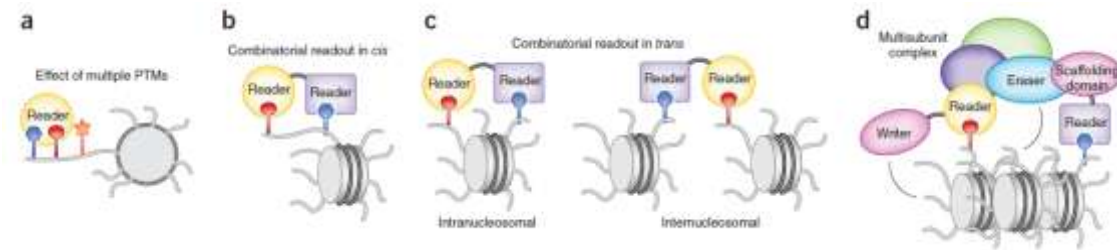


Figure 2-4. Combinatorial readout of PTMs.

(a–c) Recognition of a target PTM is influenced by adjacent PTMs on the same histone tail (a) and the combined action of multiple readers within the same protein (b,c). (d) Multivalent engagement of readers within individual subunits of the complex. The reader-harboring proteins can also contain the catalytic domains (which act as writers and erasers) or scaffolding domains that bridge their host proteins with other subunits of the complex. Readers can recognize PTMs on a single histone tail (*cis* mechanism) or different histone tails (*trans* mechanism).

Recruitment of a reader to a specific genomic region can be further modulated through the combinatorial action of multiple effectors (Fig. 4b, c). A number of chromatin-associated proteins contain more than one reader, including multiple copies of the same reader or a combination of various readers, often specific for distinct PTMs. The combinatorial readout in *cis*, where effectors bind PTMs within the same histone tail (Fig. 4b), was initially reported for TAF1 DBD (Jacobson et al. 2000). Each BD module of TAF1 DBD recognizes one acetyllysine on the same diacetylated H4 peptide. Coincidence detection of two histone PTMs by different effectors has been demonstrated for the PHD-BD cassettes of TRIM24 and TRIM33 (Tsai et al. 2010; Xi et al. 2011). While the PHD finger of TRIM33 binds to K9me3, the BD module recognizes K18ac on the same H3 peptide (Xi et al. 2011). Likewise, TRIM24 concomitantly associates with H3un and K23ac of the H3 tail through its PHD finger and BD, respectively (Tsai et al. 2010). The PHD finger and TTD of UHRF1, a key factor for maintenance of DNA methylation, synergistically recognize H3un and K9me3 of the H3K9me3 peptide (Arita et al. 2012). Combinatorial reading of PTMs by an effector and a catalytic histone-binding domain has been shown for the histone demethylases PHF8 and KIAA1718, where binding of the PHD finger to H3K4me3 in the doubly methylated H3K4me3K9me2 and H3K4me3K27me2 peptides directs association of the catalytic domains of PHF8 and KIAA1718 with K9me2 and K27me2, respectively (Horton et al. 2010). BRPF1/2, a member of the Trithorax family

with a central role during development, contains two PHD fingers, a PWWP domain and a BD. Although it has not yet been determined whether the interactions occur on the same histone tail, the PWWP domain preferentially binds H3K36me3 and the first PHD domain associates with H3un (Laue et al. 2008; Vezzoli et al. 2010; Qin et al. 2011; Wu et al. 2011b).

Multiple PTMs can also be recognized on separate tails of a single nucleosome or adjacent nucleosomes, which are directly linked by DNA or otherwise within close spatial proximity (Fig. 4c). Despite the wide-spread phenomena of multivalent engagement, characterization of combinatorial readout in *trans* poses unique challenges and only a few examples are currently described. BPTF, a subunit of the NURF chromatin remodeling complex, contains an H3K4me3-specific PHD finger and an acetyllysine-binding BD, connected by a rigid α -helical linker (Li et al. 2006; Wysocka et al. 2006). A modeling study reveals that the PHD-linker-BD assembly fits complementarily on the surface of a single nucleosome with the PHD finger and BD concomitantly interacting with H3K4me3 and H4K16ac, respectively (Ruthenburg et al. 2007b). More recently the intranucleosomal engagement of the two readers and co-existence of the H3K4me3 and H4K16ac marks on a single nucleosome within human cells have been confirmed experimentally (Ruthenburg et al. 2011). Another example of the in *trans* acting readers is the PHD fingers of CHD4, interdomain organization of which positions these two modules with a duplicate function to concurrently associate with two H3 tails of a nucleosome (Musselman et al. 2012b).

An even more complex combinatorial *trans* readout can be seen in chromatin complexes containing histone readers in multiple subunits (Fig. 4d). The interplay between such effectors generates a multifaceted network of intertwined contacts that can provide a high degree of specificity. The PHD finger-containing subunits of the HBO1 complex work together to regulate its acetyltransferase activity (Hung et al. 2009; Saksouk et al. 2009). Similarly, the methyltransferase function of the PRC2 complex is modulated by its subunits harboring WD40 repeats, Tudor and PHD fingers (Margueron and Reinberg 2011). The SAGA complex, which has a major role in transcription regulation, contains BDs, CDs and TTDs that bridge the complex to Kac- and H3K4me3-enriched chromatin (Hassan et al. 2002; Bian et al. 2011). The MYST HATs are also present in complexes harboring multiple

histone readers (Avvakumov and Cote 2007b), including the PHD fingers of BRPF1, ING5 and MOZ (Saksouk et al. 2009). The tumor suppressor Tip60 HAT complex contains subunits with the H3K4me3-specific PHD domain, H3K36me3- and H3K4me1-binding chromo-barrel domains and two BDs linked to diacetylated H4 (Pena et al. 2006; Moriniere et al. 2009; Jeong et al. 2011; Xie et al. 2011). Furthermore, many nuclear complexes are not static and undergo component swapping, a powerful mechanism for altering their chromatin targeting capabilities. Beyond mediating specific chromatin anchoring, PTM crosstalk can also trigger a cascading series of writing, erasing and reading events. For instance, the PIM1 kinase phosphorylates H3K9ac, generating H3K9acS10ph (Zippo et al. 2009). This mark is recognized by 14-3-3, which recruits the acetyltransferase MOF. MOF, in turn, deposits H4K16ac, a mark targeted by BD of BRD4, which subsequently recruits P-TEFb necessary for transcription elongation (Zippo et al. 2009).

2.9. Concluding remarks

Recognition of PTMs by histone readers has become an important paradigm in chromatin biology. Over the past decade a wealth of information has been gathered on histone PTMs and PTM-reader relationship, shedding light on the incredibly intricate nature of the chromatin landscape and resultant interactions. The biological consequences of effector-PTM interactions are highly context dependent, relying on the combinatorial readout of the spatially and temporally fluctuating local epigenetic environment and leading to a highly fine-tuned targeting of particular genomic sites.

Recent significant advances in high-throughput technologies allow for the exploration of interactions between readers and peptide fragments of modified histones at a comprehensive level, however little is known about activities of these domains in the context of the nucleosome or chromatin fiber. Moreover, the multifaceted contacts between PTMs and readers, synergistic or antagonistic nature of their interactions and engagement of other components of the epigenetic machinery is only beginning to be characterized. Such future studies will provide significant insight into the epigenetic regulatory mechanisms and may lead to the discoveries of new pharmacological targets and biomarkers. For example, recently developed small molecule inhibitors for BD of the BET protein family exhibit anticancer activity and show promising results in preclinical studies

(Filippakopoulos et al. 2010). Unlike mutations in the genome, epimutations are largely reversible and thus epigenetic therapy has a high therapeutic potential. Although in depth characterization of the epigenetic pathways is necessary to better understand and exploit this potential, the prospective benefits are far-reaching.

2.10. Acknowledgments

Research in T.G.K.'s laboratory is supported by grants from the US National Institutes of Health (NIH; GM096863 and CA113472 to T.G.K.). Work in J.C.'s laboratory is supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-14308 and MOP-64289 to J.C.). M.-E.L. is supported by a Fonds de recherche du Québec–Santé studentship and J.C. is a Canada Research Chair. C.A.M. is supported by an NIH National Research Service Award.

Chapitre 3

Conserved molecular interactions within the HBO1 acetyltransferase complexes regulate cell proliferation

Nikita Avvakumov^{1#}, Marie-Eve Lalonde^{1#}, Nehmé Saksouk¹, Eric Paquet¹, Karen C. Glass^{2†}, Anne-Julie Landry¹, Yannick Doyon¹, Christelle Cayrou¹, Geneviève Robitaille¹, Darren Richard¹, Xiang-Jiao Yang³, Tatiana G. Kutateladze² and Jacques Côté^{1*}

1. Laval University Cancer Research Center, Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), 9 McMahon Street, Quebec City, Qc G1R 2J6, Canada; 2. Department of Pharmacology, University of Colorado at Denver, Aurora, CO 80045, USA ; 3. Goodman Cancer Centre, McGill University and Department of Medicine, McGill University Health Centre, Montreal, Qc H3G 0B1, Canada

These authors contributed equally to the work

† Present address: Department of Pharmaceutical Sciences, Albany College of Pharmacy and Health Sciences, 261 Mountain View Drive, Room 302G, Colchester, VT 05446

* Corresponding author at:

phone: (418) 525-4444 ext. 15545

fax: (418) 691-5439

e-mail: jacques.cote@crhdq.ulaval.ca

3.1. Résumé

Les acétyltransférases de la famille MYST possèdent des spécificités de substrats et de fonctions, mais ont tous en commun l'association avec une protéine ING suppresseuse de tumeurs. Le complexe ING contenant l'acétyltransférase HBO1 est une source majeure d'acétylation des histones H3 et H4 *in vitro* et joue un rôle important dans la régulation des gènes ainsi que dans la réplication de l'ADN. Dans cette étude, notre dissection moléculaire du complexe HBO1/ING met en lumière les différents domaines protéiques requis pour l'assemblage du complexe et pour sa fonction cellulaire. Plusieurs domaines PHD sont présents dans les différentes sous-unités et lient la queue N-term de l'histone H3 avec différentes spécificités, reconnaissant chacun différents statuts de méthylation de la lysine 4. Nous montrons que l'association native entre les domaines PHD des protéines ING4/5 et HBO1-Jade est nécessaire à la fonction inhibitrice de croissance du complexe, en lien avec son activité de suppresseur de tumeurs. Des analyses de génomiques fonctionnelles nous indiquent que la voie p53 est ciblée par le complexe, au moins en partie par la régulation de l'initiation de la transcription de p21/CDKN1A. Ces résultats démontrent l'importance de l'association des INGs avec les acétyltransférases MYST pour contrôler la prolifération cellulaire, une association régulée qui permettrait au complexe de jouer ses fonctions de suppresseur de tumeurs.

3.2. Abstract

Acetyltransferase complexes of the MYST family with distinct substrate specificities and functions maintain a conserved association with different ING tumor suppressor proteins. ING complexes containing the HBO1 acetylase are a major source of histone H3 and H4 acetylation *in vivo* and play critical roles in gene regulation and DNA replication. Here, our molecular dissection of HBO1/ING complexes unravels the protein domains required for their assembly and function. Multiple PHD finger domains present in different subunits bind histone H3 N-terminal tail with a distinct specificity towards lysine 4 methylation status. We show that natively regulated association of the ING4/5 PHD domain with HBO1-JADE determines the growth inhibitory function of the complex, linked to its tumor suppressor activity. Functional genomic analyses indicate that the p53 pathway is a main target of the complex, at least in part through direct transcription regulation at the initiation site of p21/CDKN1A. These results demonstrate the importance of ING association with MYST acetyltransferases in controlling cell proliferation, a regulated link that accounts for the reported tumor suppressor activities of these complexes.

3.3. Introduction

Members of the ING (INhibitor of Growth) family of growth regulators are present in all eukaryotes, with the five human proteins (ING1 to 5) and the three from *S. cerevisiae* (Yng1, Yng2 and Pho23) being the most studied. Their homology is highest at the carboxyl termini within a Plant HomeoDomain (PHD) finger - a motif common to many chromatin-regulatory proteins (Doyon et al. 2006; Saksouk et al. 2008). Expression analyses of several tumor types show that ING genes are either mutated or down-regulated in many forms of cancer (Ythier et al. 2008; Piche and Li 2010), and a number of studies have implicated the ING proteins in the regulation of the cell cycle and proliferation, cellular aging and senescence, hormone signaling pathways, brain tumor growth and angiogenesis (reviewed in (Russell et al. 2006)). These functions stem from direct mechanistic roles in chromatin modification and remodeling, gene-specific transcription regulation, as well as in DNA repair, recombination and replication (Avvakumov and Cote 2007b; Soliman and Riabowol 2007; Saksouk et al. 2008).

The multi-subunit protein complexes containing ING family members have been purified and characterized from yeast and human cells (reviewed in (Avvakumov and Cote 2007b; Saksouk et al. 2008)). The human INGs can be divided into three groups - ING1/2, ING3, and ING4/5 - based on their association with three distinct types of protein complexes (Doyon et al. 2006). Each of these complexes regulates chromatin modification and structure via histone acetylation and deacetylation. The ING complexes that carry out histone acetylation contain members of the MYST family of HATs as their catalytic subunits (Fig. 1A). Human MYST HATs include Tip60 (KAT5), HBO1 (KAT7), MOZ (KAT6A), MORF (KAT6B) and MOF (KAT8). These enzymes are also known to play crucial roles in transcription activation as well as in DNA repair, recombination and replication, and are implicated in development and many human diseases, most notably cancer (Avvakumov and Cote 2007b; Gorrini et al. 2007; Yang and Ullah 2007; Voss and Thomas 2009).

Together with other histone modifying enzymes, MYST acetyltransferases are key players in regulating local and global chromatin dynamics. The protruding tails of nucleosomal histones are substrates for a large number of post-translational modifications such as

acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination and sumoylation (Kouzarides 2007). Different combinations of these modifications can regulate each other and establish an epigenetic signature that can be read by specific protein domains present in nuclear effector proteins, such as chromodomains, bromodomains, Tudor domains, MBT domains and PHD fingers (Latham and Dent 2007; Taverna et al. 2007).

Interestingly, many reports have identified the PHD finger as an important effector domain that selectively binds to the trimethylated lysine 4 residue of histone H3 (H3K4me3), a mark preferentially located at promoters and immediately downstream of transcription start sites (TSS) (Li et al. 2006; Pena et al. 2006; Shi et al. 2006; Wysocka et al. 2006; Liu et al. 2007; Matthews et al. 2007; Ramon-Maiques et al. 2007; Ruthenburg et al. 2007a; Vermeulen et al. 2007). Significantly, all PHD domains of the ING family members were shown to bind preferentially to this histone modification with strong dissociation constants ($K_D < 10 \mu\text{M}$) (Pena et al. 2006; Shi et al. 2006). Notably, yeast Yng1 PHD finger binds H3K4me and allows the associated NuA3 HAT complex to bind and acetylate chromatin (Martin et al. 2006; Taverna et al. 2006). Moreover, in response to DNA damage, the PHD domain of human ING2 binds with high affinity to H3K4me3, which stabilizes the association of the mSin3-HDAC1/2 deacetylase complex at the promoters of pro-proliferation genes and represses their transcription (Shi et al. 2006). Similarly, HBO1-ING4/5 complexes were shown to functionally interact with H3K4me3 chromatin, acetylate surrounding histone tails and stimulate local transcription (Hung et al. 2009; Saksouk et al. 2009). Thus, these findings suggest that the MYST-ING protein complexes contribute to epigenetic regulation of nuclear functions through a cross-talk between histone methylation and acetylation.

Interestingly, two new classes of chromatin-interacting PHD fingers have been identified more recently. In a striking contrast to the original, PHDs of the second class bind the histone H3 N-terminal domain only when the lysine 4 residue is not methylated (Jia et al. 2007; Lan et al. 2007). The third class was shown to be important for binding to chromatin by the yeast RPD3S deacetylase complex irrespective of histone marks (Li et al. 2007b). We recently demonstrated that both new types of PHD fingers are present in the JADE subunit of the HBO1-ING complexes and that they are essential for binding to

chromatin *in vivo* (Saksouk et al. 2009). Strikingly, these features mean that a single HBO1 complex harbors PHD fingers of all three classes, with different specificities toward histone H3 lysine 4 methylation.

We have also previously characterized the human MYST-ING HAT complexes and highlighted their different specificities and functions (Doyon et al. 2006). All MYST-ING complexes from yeast to humans appear to contain a core of 4 subunits that share significant homologies (Fig. 1). In addition, these subunits carry several domains with potential for reading different chromatin marks (Fig. 1B). Here we report the molecular dissection of MYST-ING HAT complexes *in vitro* and *in vivo*. We focused on the human ING4/5 tetrameric complexes which contain the HBO1 HAT and JADE1/2/3 paralogues (Fig. 1A), as they constitute one of the major sources of histone H4 and H3 acetylation *in vivo* (Doyon et al. 2006; Voss et al. 2009; Kueh et al. 2011). Notably, we identified two short domains conserved in all MYST-ING complexes that act as a scaffold for complex assembly. Interestingly, alternative mRNA splicing within these domains produces two distinct isoforms of JADE1, whose incorporation into the complex specifically regulates the association of ING4/5 with HBO1. An array of techniques including cell growth assays, gene expression analysis and chromatin immunoprecipitation indicate that association of the ING subunit with JADE1-HBO1 is essential for growth inhibition and argue that ING tumor suppressor activity functions in part through the acetyltransferase activity of HBO1 within a p53-linked pathway. Our results provide important information on structural determinants responsible for assembly of functionally distinct MYST/ING HAT complexes from yeast to human cells. They unravel how different PHD finger domains within a single HAT complex cooperate to regulate functions in chromatin binding, transcription regulation and control of cell proliferation, ultimately linking chromatin methylation and acetylation to the tumor suppression function of ING proteins.

3.4. Materials and Methods

3.4.1. Cell culture, plasmids and recombinant proteins

Tet-off retrovirus-transduced cell lines expressing FLAG-HBO1-TAP, FLAG-ING3-TAP, HA-ING4-TAP and FLAG-ING5-TAP have been described previously (Doyon et al.

2006). The JADE1L, JADE3 and hEaf6 full-length cDNAs were obtained from ORIGENE. For construction of HA- or FLAG-tagged mammalian expression plasmids, full-length or truncated HBO1, JADE1/3, ING4/5 and hEaf6 were cloned by PCR into pcDNA3. For expression in bacteria, the different domains of JADE1, JADE3, ING4, ING5, HBO1, hEaf6, Yng2 and Esa1 were cloned by PCR into pGEX4T3 (GE Healthcare), pET15b+ (Novagen) or pST44 (Selleck et al. 2005), and the recombinant proteins were purified following standard procedures. Mammalian expression vectors for HA- and FLAG-tagged JADE1S(1-509) isoform and its PHD mutants have been described (Panchenko et al. 2004). For transient transfections, 2×10^6 cells (HeLa S3, 293T and RKO) were transfected with 8 μg of each expression plasmid by the calcium phosphate method. JADE1L/S and their PHD2 deletion mutants were cloned into the retroviral vector pRev-CMV-3xFLAG and the retrovirus was used to transduce HeLa S3 cells. Expression levels for the different isolated clones were measured and found to be particularly low for JADE1L (data not shown). Details of the cloning procedures and primer sequences are available upon request. Nuclear localization of all transfected proteins was confirmed by immunofluorescence.

3.4.2. Antibodies and peptides

The following antibodies were used for western blots: anti-FLAG M2-R (1:2000) and anti-GST (1:2000) (Sigma); anti-HA 3F10 (1:2000) and 12CA5 (1:2000) (Roche); anti-6xHis (1:4000, Clontech) ; anti- γ H2AX (1:1000) (Millipore); anti-H3 (1:10000), anti-tubulin, anti-p21, anti-HBO1, anti-ING4, anti-ING5 (1:1000) and anti-hEaf6 (1:500) (Abcam). Biotinylated histone peptides were kind gifts from Dr. Or Gozani (Stanford University) or purchased from Millipore.

3.4.3. Affinity purification of protein complexes

Tandem-affinity purifications of native ING complexes from mammalian cells were done as previously described (Doyon et al. 2006). For affinity purification from cotransfected cells, 293T cells were harvested 48hrs post-transfection, washed twice with cold PBS and lysed in 1 ml/plate of lysis buffer [20mM HEPES pH 7.9, 150mM KCl, 5% glycerol, 1 mM DTT, 100 μM ZnAcetate, 2 mM MgCl_2 , 2mM EDTA, 0.2% (v/v) NP-40, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

aprotinin, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin, 1 mM PMSF, 0.1 mM Na₂MoO₄, 0.1 mM Na₃VO₄, 10 mM β-glycerophosphate, 10 mM NaF and 10 mM Na butyrate] on ice for 30 min. The cell lysate was then clarified by centrifugation for 30 min at 21,000 g. The supernatant was incubated for 3 hrs or overnight with FLAG-M2 agarose (Sigma) at 4°C. The resin was recovered by centrifugation and then washed five times with the same buffer but containing 0.1 % (v/v) NP-40 and 300 mM KCl. Bound proteins were eluted with 400 ng/µl 3xFLAG peptide in elution buffer (20mM HEPES pH7.5, 100 mM KCl, 0.1% Triton, 5% glycerol). A portion of the eluate was resolved by SDS-PAGE and analyzed by western blotting.

3.4.4. Peptide and GST pull-down assays

Concentrations of purified recombinant proteins were normalized by SDS-PAGE and Coomassie staining. Concentrations of biotinylated peptides were verified by anti-biotin dot blots. For pull-down assays, 500 ng of biotinylated histone peptides were incubated with 1 µg of candidate binding protein in 100 µl of binding buffer [300 mM KCl, 50 mM Tris pH 7.5, 0.05% (v/v) NP-40, 100 µg/ml BSA, 1mM PMSF] at 4 degrees for 3 hours to overnight. After 1 hour of incubation with streptavidin-coupled Dynabeads (Invitrogen), the beads were washed four times with binding buffer and subjected to a western blot analysis with an anti-GST antibody. For GST pull-down assays, 500 ng of His-tagged proteins were pre-cleared with glutathione Sepharose-bound GST and incubated with 1 µg of glutathione Sepharose-bound proteins in a final volume of 50 to 120 µl in pull-down buffer (25 mM HEPES pH 7.5, 250 mM KCl, 10 % glycerol, 100 µg / mL BSA, 0.1 % (v/v) NP-40, 0.5 mM DTT and protease inhibitors) for 2 hrs at room temperature. Supernatants were removed and the resin was washed 2 times with pull-down buffer at 300 mM KCl and once with pull down buffer at 150 mM KCl. Input (50%) and bound material were analyzed by western blotting with anti-6xHis antibodies.

3.4.5. Histone acetyltransferase assays with protein complexes

HAT assays with histone peptides (300 ng) were performed essentially as described (Utley et al. 2005). Briefly, protein complexes were incubated with or without substrate in 15 µl final volume of 50 mM KCl, 50 mM Tris (pH 8), 1 mM DTT, 5 % glycerol, 10 mM Na-

Butyrate and 0.1 mM EDTA with 0.5 μ l of [3 H] acetyl-CoA (0.25 μ Ci/ μ l, 4.9 Ci/mmol) for 45 min at 30°C. Each reaction was spotted onto p81 filters, washed three times with 50 mM Na Carbonate (pH 9.2) and processed for scintillation counting.

3.4.6. NMR Spectroscopy

NMR experiments were performed at 25°C on Varian INOVA 600 and 500 MHz spectrometers using pulse field gradients to suppress artifacts and eliminate water signal. 1 H, 15 N heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra of uniformly 15 N-labeled JADE1 PHD1 and PZP (0.1-0.2 mM) were recorded as histone tail peptides (synthesized by the UCD Biophysics Core Facility) or unlabeled PHD1 were added stepwise.

3.4.7. Microarray data analysis

Duplicate RNA samples from transduced HeLa cells stably expressing JADE1L were compared to samples from cells transduced with empty vectors. Four RNA samples (two independent experiments with duplicate samples for each) from siHBO1-treated HeLa cells (as described before (Doyon et al. 2006)) were compared to samples from cells treated with control siRNA (luciferase). Illumina HumanHT-12 v3.0 and v4.0 microarray data were processed in BioConductor using the package lumi (Lin et al. 2008). The background corrected intensities from BeadStudio were directly imported into R (www.r-project.org) with the function lumiR. Data were first transformed to log₂ and then normalized using the quantile normalization using lumiT and lumiN functions respectively. The test for statistical difference between the conditions was performed using the Empirical Bayes method eBayes in limma (Smyth 2004). Multiple hypothesis correction was performed using the Benjamini-Hochberg correction. We considered a gene to be significantly differentially modulated between two conditions while the absolute log₂ fold change is higher than log₂(1.5) and the adjusted p-value is lower than 0.05. Raw data as well as data used in this analysis have been deposited in the GEO database under the accession GSE33221.

3.4.8. Cell growth analysis

HeLa S3 cells retrovirally transduced to express JADE1 constructs were seeded at 4×10^4 cells per well of 6-well plates and allowed to grow in a standard tissue culture incubator. For each cell line, two independent wells were harvested on days 3, 5 and 7 post-seeding. Cells were counted using an Auto T4 Automatic cell counter (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA).

3.4.9. Anchorage-independent cell growth

1×10^5 HeLa S3 cells retrovirally transduced to express JADE1 constructs were suspended in DMEM/10%FBS/0.3% agar and plated on 100mm dishes in duplicate. Following 3 weeks of growth in a standard tissue culture incubator, four random fields on each plate were photographed using a light microscope with $4 \times$ magnification. Colonies in each field were counted using the AlphaImager software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

3.4.10. Assays of p53-dependent transcription

Reverse transcription-PCR assays were performed as described before (Doyon et al. 2004). Luciferase reporter assays to test the capacity of ING4, HBO1, ING3 and Tip60 to potentiate p53-dependent transcriptional activation were performed in triplicates using the wwp/p21-Luc reporter (el-Deiry et al. 1993) and a pGL3-BAX-luciferase construct (Sc. Reagent) as previously described (Doyon et al. 2006).

3.4.11. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays

Briefly, 2×10^8 asynchronously growing RKO cells were cross-linked with 1% formaldehyde followed by treatment with 125mM glycine. Cells were then washed with PBS and resuspended in ChIP lysis buffer A (10mM HEPES pH 7.5, 10mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.75% triton X-100) and incubated for 10 min on ice. Cells were then resuspended in ChIP lysis buffer B (10mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA) and incubated on ice for 10 min. Cells were finally resuspended in ChIP lysis buffer C (150 mM NaCl, 25mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% triton X-100, PMSF 1 mM, 2 μ g/mL leupeptin, 5 μ g/mL aprotinin, 2 μ g/mL pepstatin) and sonicated on ice (Diagenode Bioruptor) to shear chromatin to an average length of 500 bp.

After overnight incubation at 4°C using 1 mg of chromatin per IP with 5 µg of specific antibodies, protein A Dynabeads (Invitrogen) were added and incubated for 4 hours at 4°C. Beads were washed extensively and eluted with 1% SDS, 0.1M NaHCO₃. Cross-links were reversed overnight at 65°C in the presence of 0.2 M NaCl, and samples were then treated with RNase A followed by Proteinase K. DNA was recovered using phenol-chloroform and ethanol precipitation. Quantitative real-time PCR was performed using SYBR Green I (Roche) with LightCycler 480 (Roche). The error bars represent standard errors based on 3 independent experiments. Primers used in the PCR reactions (available upon request) were analyzed for linearity range and efficiency.

3.4.12. Chip-seq analysis

Chromatin immunoprecipitation from RKO cells was done as described above. To prepare libraries for sequencing, DNA samples were processed with the Genomic DNA preparation kit (Illumina) according to the manufacturer's protocol. 1 µl of adapter oligo mix (Illumina) was used for each ligation reaction. Gel extracted DNA of each library was amplified through 18 PCR cycles. Samples were sequenced by 36bp single-reads on a Genome Analyzer II platform (Illumina). Raw sequences were mapped using BWA (Li and Durbin 2009) on build hg18 of the human genome and deposited in the GEO database under the accession GSE33221. Uniquely mapped sequences were kept for downstream analysis. The global profiles at transcription start sites presented in Figure 8A were produced using the UCSC genome browser genes definition and the Python package HTseq. In case of multiple TSS associated to the same gene, we selected the one with the highest number of HBO1 mapped reads within 5000 base pairs around the transcription start site. We discarded genes transcribed in opposite directions for which TSS are at a distance lower than 10000 base pairs to prevent introducing any artefacts in the global profiles. For gene expression level in RKO cells, we used publicly available data from an Affymetrix U133 plus 2.0 chip (West and Marnett 2005). The binning of genes in function or their level of expression was performed by first sorting the log₂ expression level and then subdividing genes in four equal categories (quartiles).

3.5. Results

3.5.1. MYST-ING HAT complexes can be separated into three classes

Based on the available literature and our characterization of yeast and human MYST-ING HAT complexes, we identified three major conserved classes based on structure, sequence and functional homologies (Fig. 1; (Howe et al. 2002; Boudreault et al. 2003; Doyon et al. 2004; Doyon et al. 2006; Taverna et al. 2006; Avvakumov and Cote 2007b)). We previously established yeast Piccolo NuA4 as a core tetrameric complex that encompasses strong nucleosomal HAT activity and also determined that the Epl1 protein assembles the complex by bridging the MYST enzyme Esa1 with the ING protein Yng2 (Boudreault et al. 2003; Selleck et al. 2005). Upon closer analysis of MYST-ING complexes in eukaryotes, we suggested that they are all based on a similar tetrameric structure formed by homologous or related proteins (Doyon et al. 2006). In this model, an Epl1-related factor independently interacts with MYST and ING proteins to assemble a functional complex (Fig. 1A). In support of this hypothesis, two short regions of sequence homology have been found in the scaffold subunits of all MYST-ING complexes (boxes labeled I and II in Fig. 1B; see sequences in Fig. 3A), suggesting that these are the binding regions for MYST and ING proteins (Doyon et al. 2006). To test this hypothesis we performed *in vivo* and *in vitro* interactions studies, focusing our efforts on the human HBO1 complex.

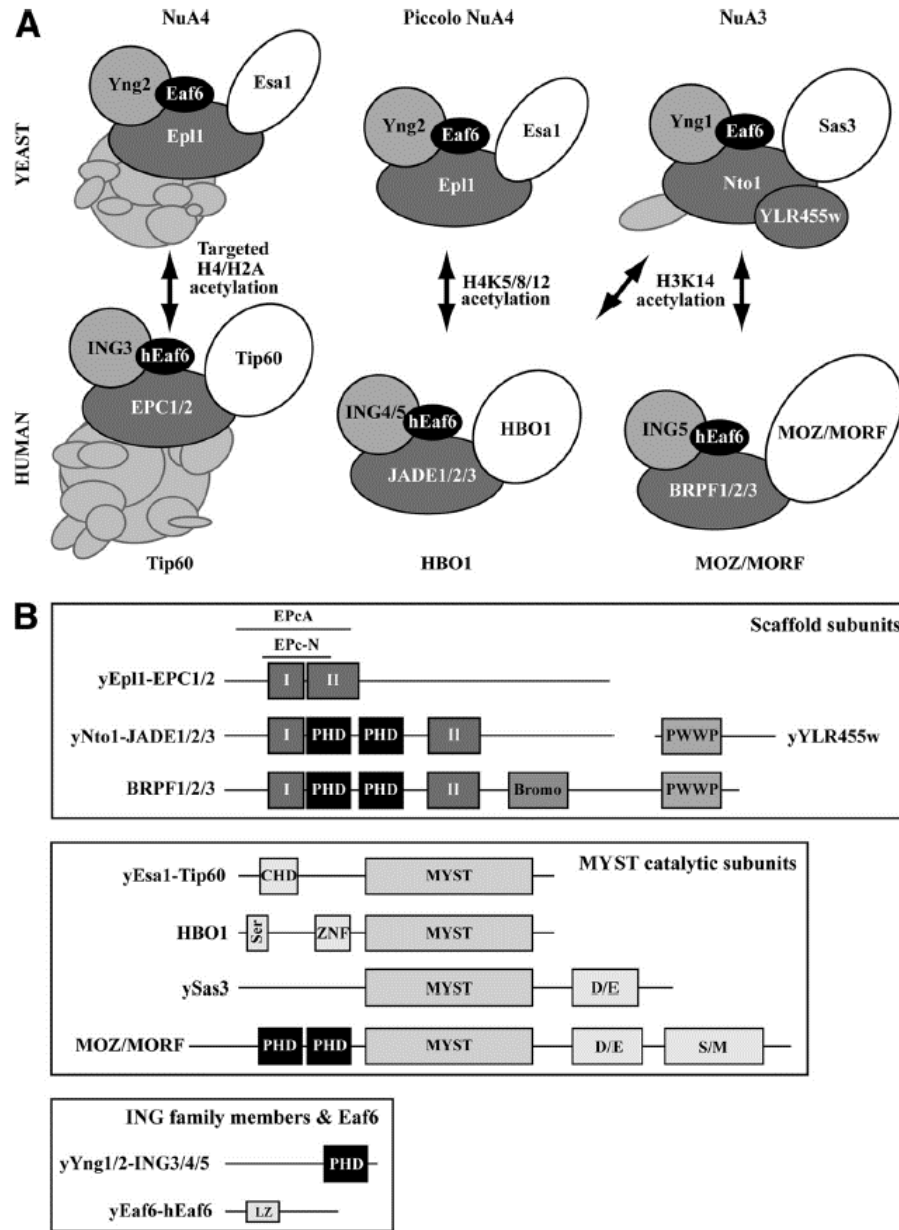


Figure 3-1. Common features of the MYST-ING histone acetyltransferases complexes.

(A) Structural and functional conservation of MYST-ING HAT complexes from yeast to human. (B) Homologous core subunits of all MYST-ING complexes and their associated protein domains. Domains not mentioned in the text: Bromo, bromodomain; CHD, chromodomain; Ser, serine-rich; ZNF, zing-finger; D/E, acidic; S/M, serine/methionine-rich; LZ, leucine zipper. The previously identified domains EPCa in EPC, E(Pc) and Epl1, Epc-N and I/II in Epl1, Nto1, EPC, JADE and BRPF are also identified (Stankunas et al. 1998; Doyon et al. 2006; Perry 2006).

3.5.2. JADE proteins coordinate the assembly of HBO1 complexes

JADE1, a candidate tumor suppressor, has been physically linked to VHL function, transcription regulation, Wnt signaling and apoptosis (Zhou et al. 2002; Panchenko et al. 2004; Zhou et al. 2004; Zhou et al. 2005; Chitalia et al. 2008). Our initial purification of HBO1 acetyltransferase complexes identified full-length JADE1/2/3 paralogues as stably associated subunits (Doyon et al. 2006). Subsequently, it became clear that HBO1 could also associate with a shorter isoform of JADE1, named JADE1S (Fig. 2A)(Foy et al. 2008; Saksouk et al. 2009). In fact, the bulk of functional information on JADE1 in the literature is based on this smaller 509 amino acid-protein produced by an abundant mRNA splice variant (Zhou et al. 2002; Panchenko et al. 2004; Zhou et al. 2004; Zhou et al. 2005).

To confirm the role of JADE1 as the scaffold of the complex, we first verified that there was no direct interaction between HBO1 and ING proteins by performing cotransfections and immunoprecipitations followed by western blot analyses (data not shown). We then produced N-terminal and C-terminal deletions of JADE1L and analyzed their assembly into complexes by simultaneous cotransfections with HBO1 and ING5 (Fig. 2B). Analysis of immunopurified JADE1 indicates that association with ING5 requires amino acids 509-600 of JADE1L that encompass a portion of the conserved domain II (lane 2 vs. 3). In contrast, the interaction between HBO1 and JADE1 depends primarily on domain I contained within amino acids 114-199 (lane 5 vs. 6). Similar results were obtained using ING4 instead of ING5, and the JADE3 paralogue (data not shown). Thus, JADE1L functions as the scaffold of the HBO1 complex by performing direct and independent interactions with the ING and HBO1 proteins *in vivo*, through regions containing conserved domains I and II (Fig. 1B, 2A). These data also confirm that the shorter JADE1S isoform does not associate with ING proteins *in vivo* (Foy et al. 2008; Saksouk et al. 2009).

We then analyzed the requirements for the association of the fourth subunit of HBO1 complexes, hEaf6. This protein is present in all MYST-ING HAT complexes but its role is unknown. Cotransfections show a clear association of hEaf6 with HBO1/JADE1L/ING5 (Fig. 2C lane 7). The interaction of hEaf6 with the complex is greatly enhanced by the presence of ING5, in an HBO1-independent manner (Fig. 2C lanes 1 & 5 vs. 6 & 7).

However, no direct interaction was detected between ING4/5 and hEaf6 by co-transfection (data not shown). These results argue that, like ING5 and HBO1, hEaf6 binds JADE1, but its interaction with the scaffold protein requires the presence of ING5. We speculate that the presence of low amounts of HA-hEaf6 with JADE1 immunopurified in the absence of co-transfected ING5 (Fig. 2C lane 1) is mediated by the endogenous ING5 protein, which can be detected in the immunoprecipitations with an anti-ING5 antibody after a long exposure (Fig. 2C bottom panel).

Overall, our current and previously published analyses indicate that each MYST-ING complex contains a scaffold subunit that appears to make independent interactions with the MYST HAT enzyme and the ING proteins (Figs. 1, 2 and data not shown) (Boudreault et al. 2003; Doyon et al. 2004; Foy et al. 2008; Ullah et al. 2008).

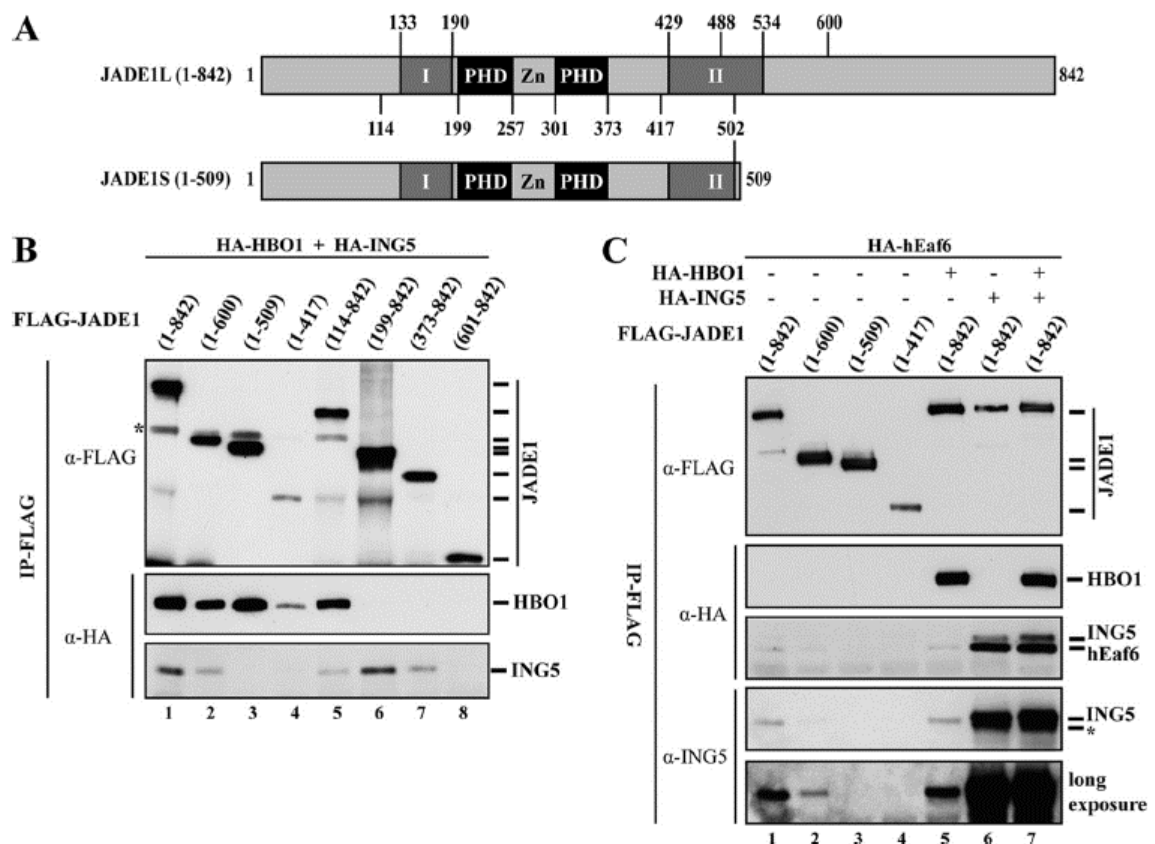


Figure 3-2. Molecular determinants for assembly of HBO1 HAT complexes.

(A) Schematic representation of JADE1 protein isoforms produced by mRNA splice variants. (B) Distinct regions of JADE1 are required for HBO1 and ING5 interaction. Indicated N-terminal and C-terminal deletion mutants of FLAG-JADE1 were affinity

purified after co-transfection with HA-HBO1 and HA-ING5, and analyzed by western blotting. JADE1 (1-509) corresponds to the JADE1S natural isoform. (C) Stable association of hEaf6 with JADE1 requires ING5. FLAG-JADE1 co-immunoprecipitations were analyzed as above after co-transfections with the indicated vectors.

3.5.3. Short domains conserved in all MYST-ING complexes are responsible for bridging specific acetyltransferases with their ING factors

To map more precisely the interactions detected in the HBO1 complexes and to address directly the roles of conserved domains I and II of JADE1, we performed glutathione *S*-transferase (GST) pull-down assays using recombinant polypeptides. Domains I and II of JADE1L (Fig. 3A) were fused to GST and tested for interaction with HBO1, ING4 and hEaf6. In agreement with the model proposed above, we found that ING4 shows strong specific binding to domain II, while HBO1 interacts with domain I (Fig. 3B). These interactions occur through the HBO1 MYST domain (middle panel), and independently of the ING4 PHD finger (bottom). We then tested the determinants for hEaf6 association. No binding was observed between hEaf6 and domain I of JADE1 (Fig. 3C, upper panel). A very weak interaction could be detected between hEaf6 and domain II of JADE1 (Fig. 3C, upper panel), and it was greatly enhanced by addition of ING4 to the reaction (Fig. 3C, lower panel), reminiscent of what we observed *in vivo* (Fig. 2C). Again, no interaction between hEaf6 and ING4 could be detected in the absence of JADE1 domain II.

Based on domain II sequence homology between JADE, BRPF, EPC, yEpl1 and yNto1 proteins, we can identify two subdomain regions separated by a short linker, labeled here IIa and IIb (Fig. 3A). Pull down assays using both domains and recombinant ING4 show a specific and strong interaction with domain IIb and none with IIa (Fig. 3D). Critically, as indicated in Figure 3A, domain IIb is disrupted in the JADE1S splice variant, which accounts for this isoform's inability to bind ING proteins (Fig. 1B; ref 10 & 43).

Altogether, these results clearly demonstrate the role of JADE1 as a platform for assembly of HBO1 complexes through distinct molecular interactions with each subunit. They also confirm our hypothesis that two small peptide regions conserved in a specific subunit of all MYST-ING complexes are responsible for bridging together MYST HATs and ING proteins. These conserved interactions were also confirmed using domains I and II of the

Epl1 subunit of the yeast Piccolo NuA4 complex (Fig. 3E) and are corroborated by our previous cotransfection experiments with human MOZ-BRPF1-ING5 complex (Ullah et al. 2008). Furthermore, the natural occurrence of an abundant splice variant of JADE1 producing a shorter isoform (Zhou et al. 2005) represents a mechanism of regulating the association of ING4/5 proteins with the HBO1 HAT, supporting the concept of functionally distinct roles of HBO1 complexes with or without an ING subunit (Fig. 3F, see below).

A

Domain I

```

Ep11 146 SYTGES-----ATVEE--CCGTNYMDEEDETLINEQVNGSSS---I--TEDEFELICSSFEHAIH 201
Nto1 156 PNITISTSTKSAIQKF-ASISPNFVNF--KPOYDMDEQDELVHYNKRKYFKI---Q--SHEIFELIMTLETEWF 224
EPC1 99 QLIHIQ-----PFSLD--AEQPYDIDSEDEVEVNRKRRKMD-----ICPLOFEEIMDRLEKSG 151
EPC2 99 QLIHIQ-----PFLND--NEQPYDMDESEDETINRNRKME-----IKPLOFEIMDRLEKASS 151
BRPF1 197 SYTYTE-----KSAEELD---EEVEYDMDEEYINIDINEERKTEGVSP--PQEIFEYIMDRLEKESY 257
BRPF2 138 VYKYTE-----KSAEELD---NEVEYDMDEEDYAWLEI--NEKRRKGCVPV--SQSMFEFLMDREKESH 198
BRPF3 136 AYRYTE-----KPPEDLD---AEVEYDMDEEDLAWLDMVNEKRRVVGHSLSADTFELMDREKESY 196
JADE1 114 KYIVSSSEPELGY---VDIRTLAD--SVCRYDINMDAAWLELTNEEFKEMGMPEDDEYTMERVLDEFEQRCY 183
JADE2 111 GPPAQASPSSTMLGE---GSQFNP--GGSRYDLDLIDAYWLELNSBLKEMERPEDELTLERVLDELETLCH 180
JADE3 111 KYTHCSSPDTPPEGY---INIMELAA--SVCRYDLDMDLFWLQELNEDLAEMGCGP--DENLMKTEVLELHCH 180

```

Domain II

```

Ep11 253 ---FDPVSMNTRPLQCTI---KFGSKTYDWRERKIEVNGYETFPQLNFRPGEKEEIDPYVCFRR--EVRPRKTRRI
Nto1 498 ---VFAEITKIVDFGLANPPAGAFDCKYWSMKBELTGGTPTACFENNSLGLTEG---VQTR-----
EPC1 153 ---QPVSLQAKLLKED---BELREYEPYWIKKRANCRGPSLPSVQCKRDGSSSTNDPYVAFRRSTKQTRKNRKN
EPC2 153 ---QLVSLQAKLLNED---EYLKAMDYDWRKRNCRGPSLPTQCKRDGSSSTNDPYVAFRRSTKQTRKNRKN
BRPF1 513 VECIPPHRLSKTNRLLTQKRSQFVQRHSHYWTLLKRSRNGVPLRRQLTHLQSRNCDVGRDSEDKNWLKSEQ-----
BRPF2 449 APYIPQRLNRANQVALQKQKQFVERAHSYVLLKRLSRNCAPLRRQLSSLQSRSSQ---RENDEEMKAKKEE-----
BRPF3 476 VQIPSYRLNKICSGLSFQRKNQFVQRHHNYWLLKQARNVPLRRQLSHLQSRNACQ---REQDEKTSVKEE-----
JADE1 427 ---FYTFVNLIDVARALRIP---BEVDFLYQYWKLRVNFNRP--LTPKDEEDNLAKREK---EVLFR-----
JADE2 404 ---FYELVEPAEVAERLDA---DALQDFLYQYWKLRKANANQPL--LTPKTDVVDNLAQQEC---EVLFR-----
JADE3 407 ---FYSLVRVEDVAELGSP---TLAQDFLYQYWKLRKSNFNKPL--LTPPKEDENGLVQKE---EVLFR-----

```

IIa

```

Ep11 DILNSQRLRAHQELKNEKLLALLVAKREN--SLNW--NDELKIFQRK--K--- 376
Nto1 ---DFANDQLRDLVRLKELTTLVKKRTOASNS--SRKKVFFV--VKSPOKYLL 608
EPC1 DEASYEKMLLRDLRAVTLIEMIKRREKSKRELIHTLEIMKRYNMG--- 276
EPC2 DEASYEKMLLRDFSRALTIEMIKRREKSKRELIHTLEIMKRYNMG--- 276
BRPF1 ---LKSQHLRDLERARLLVELIKREKIKRETKVQIAMEYQITPF 633
BRPF2 ---LKYQHLRDLERARLLVELIKREKIKREOVKQVAMELRLTPL 567
BRPF3 ---LKYQHLRDLERARLLVELIKREKIKREOVKQVAMELRLTPF 594
JADE1 ---LQLETHLRODLERVRNLCYMTTRREKIKRSVCKVCEQIENLYTKRL 534
JADE2 ---LQLETHLRODLERVRNLCYMTTRREKIKRHAQCKVCEQIENLYTKRL 511
JADE3 ---LQLETHLRODLERVRNLCYMTTRREKIKRSHNKVCEQIENLYTKRL 514

```

IIb
JADE1S

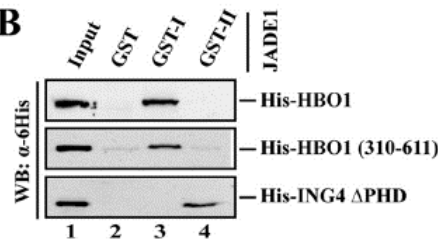
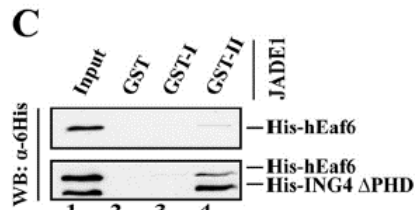
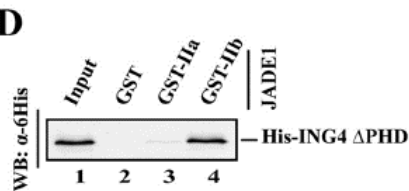
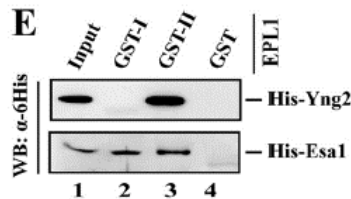
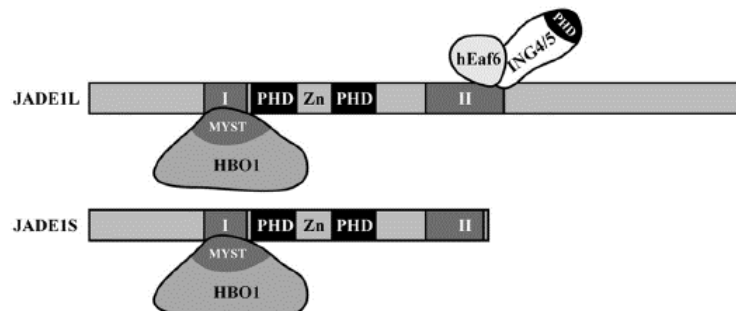
B**C****D****E****F**

Figure 3-3. Molecular dissection of MYST-ING HAT complexes identifies two conserved domains essential for assembly.

(A) Sequence alignment of conserved domains in yeast and human proteins associated with ING/MYST-containing HAT complexes. Domain II can be further subdivided into two parts based on concentrations of homology. Location of the frameshift removing the C-terminal portion of domain II in JADE1S is shown. Sites of post-translational modifications are indicated in bold.(B-D) ING4 binds JADE1 domain IIb in vitro while HBO1 interacts with domain I, and hEaf6 needs ING4 to efficiently associate with JADE1 domain II. GST pull-down assays with the indicated recombinant proteins were analyzed by western blotting. HBO1 aa310-611 represents the carboxyl terminus of the protein containing the MYST domain. ING4 Δ PHD includes aa1-169 of the protein.(E) The functions of domains I and II are conserved in other MYST-ING complexes. GST-pull-downs as above using homologous domains in yeast Epl1 with Esa1 MYST and Yng2 ING proteins.(F) Model of interactions within HBO1 complexes and the effect of JADE1S shorter isoform.

3.5.4. Domain II-mediated association of ING proteins with JADE-HBO1 determines the modulation of acetyltransferase activity by methylated lysine 4 of histone H3

A hallmark of ING tumor suppressor proteins is the presence of a C-terminal PHD finger domain. This domain in ING proteins has been shown to specifically interact with histone H3 methylated at lysine 4 (Martin et al. 2006; Pena et al. 2006; Shi et al. 2006; Taverna et al. 2006; Champagne et al. 2008; Hung et al. 2009; Saksouk et al. 2009). This association has an impact on HAT activity of MYST-ING complexes as shown by HAT assays using purified native ING4-HBO1-JADE-hEaf6 complex with histone H3 tail peptides unmodified or methylated on lysine 4 (H3K4me). We observed that the acetyltransferase activity of the ING4 complex is strongly stimulated by methylation of lysine 4 (Fig. 4A). To delineate the determinants of this stimulation, we purified HBO1-JADE1-ING5 following transient transfection and observed that the HAT activity of this complex was similarly stimulated by H3K4me (Fig. 4B). Interaction of ING5 with domain IIb of JADE1 was specifically required for this stimulation as JADE1(1-600) but not JADE1S(1-509) displayed increased acetylation of H3K4me peptides (Fig. 4C & D). Similarly, a BRPF1-dependent association of the MOZ/MORF complexes with ING5 was required to observe increased acetylation in response to H3 K4 methylation (Champagne et al. 2008). Native purified ING5 complexes (a mix of HBO1-JADE and MOZ/MORF-BRPF complexes (7)) also showed a very strong stimulation of HAT activity by H3K4me, while their activity

remained unchanged in response to methylation of H3 on lysine 9 (Fig. 4E). On the other hand, this effect was not seen with the native ING3 complex (large Tip60-EPC complex)(Fig. 4F), likely reflecting the fact that histone H3 is not a physiological target of the Tip60 MYST enzyme (Doyon et al. 2004; Doyon et al. 2006). Taken together, these results support a role for the ING subunits in stimulating the activity of MYST HAT complexes towards H3 K4me-containing chromatin, a mark highly enriched around transcription start sites of active genes.

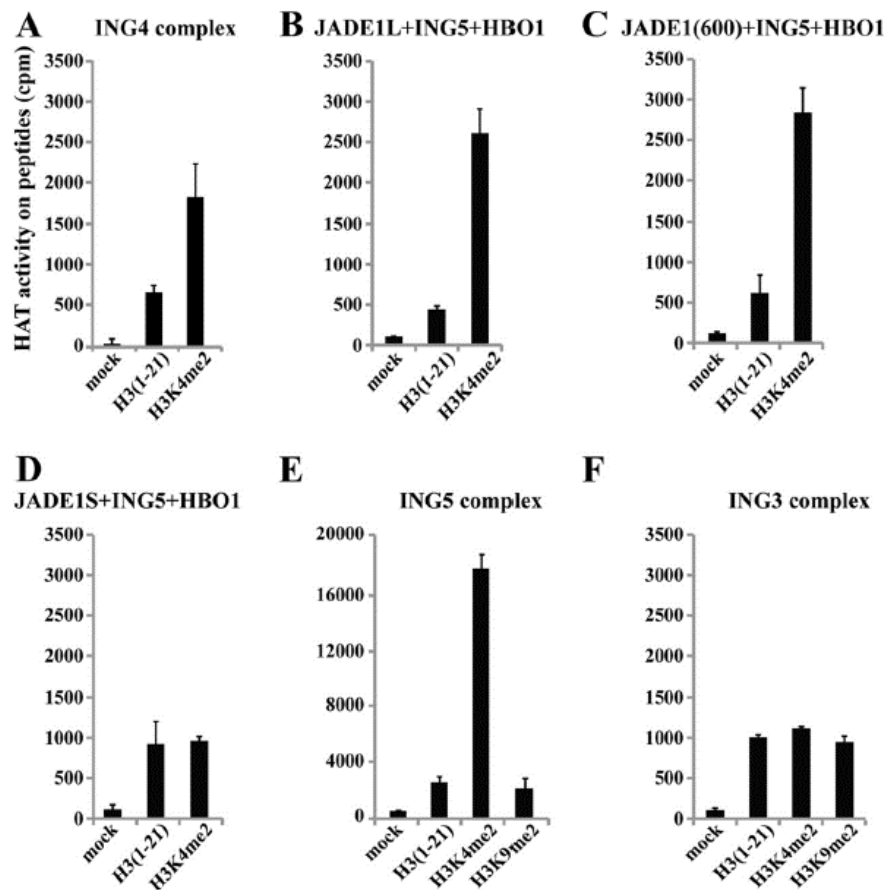


Figure 3-4. Domain II-dependent association of ING subunits stimulates MYST HAT activity towards histone H3 peptides methylated on lysine 4.

(A) Native ING4 complex preferentially acetylates histone H3 tails that are methylated on lysine 4. Purified native ING4 complex (ING4, JADE, HBO1 and hEaf6, see Fig. 1A) was tested in HAT assays with the indicated histone H3 peptides. Reactions were spotted on membranes and counted by liquid scintillation.(B-D) Domain IIb-dependent physical association of the ING subunit is required for stimulation of HBO1 HAT activity on H3K4me tails. HBO1 HAT was affinity-purified after co-transfection with the indicated cDNAs and tested in HAT assays on peptides as in (A).(E, F) Stimulation of H3 acetylation

by H3K4me is only seen with H3-specific HATs. Purified native ING5 (a mix of HBO1 and MOZ/MORF complexes, see Fig. 1A) and ING3 (Tip60) acetyltransferase complexes were tested as in (A).

3.5.5. MYST-ING4/5 HAT complexes contain multiple histone H3-binding PHD finger domains with different specificities towards lysine 4 methylation status

As shown in figure 1B, MYST-ING HAT complexes contain multiple domains that are potentially important for protein-protein interactions and for binding to specific chromatin regions. Interestingly, ING4/5 complexes contain other PHD finger domains in addition to the one in the ING proteins. We have previously shown that JADE PHD domains display striking specificities (Saksouk et al. 2009). While the second PHD of the PHD-Zn knuckle-PHD (PZP) region binds the H3 N-terminal tail irrespectively of its methylation status, the first domain (PHD1) binds the same portion of H3 only when H3K4 is not methylated. A similar property of the first PHD finger of BRPF2 was recently reported (Qin et al. 2011). We confirmed these binding properties of PHD1 and PHD2 of JADE1 and JADE3 in peptide pull-down experiments using recombinant domains fused to GST and biotinylated peptides (Fig. 5A). While we have previously demonstrated that the histone H3 tail and PHD2 of JADE1 were critical for HBO1 association with chromatin *in vitro* and *in vivo*, we have also shown that PHD1 has a dominant effect within the PZP domain, and in the absence of associated ING proteins blocks the interaction with H3 tails methylated on lysine 4 (Foy et al. 2008; Saksouk et al. 2009). The dominance of PHD1 within the PZP domain was further underlined by NMR analysis of binding to H3 peptides, showing similar chemical shift changes with each construct (Fig. 5B). Such significant chemical shift changes could not be obtained with PHD2 alone as it did not seem properly folded for NMR analysis. These results lead us to suggest that the PZP domain functions as a single functional entity for interaction with chromatin and that our previous results obtained with PHD2 deletion mutant in fact reflect disruption of the entire PZP structure (Saksouk et al. 2009).

This observation raises interesting questions regarding the putative cross-talk between chromatin and these modules and their ability to functionally regulate MYST-ING complex localization in the genome. It also suggests that such interactions could regulate HAT

activity of the complexes, and underlines the potential impact of controlling the ING subunit association with the complex.

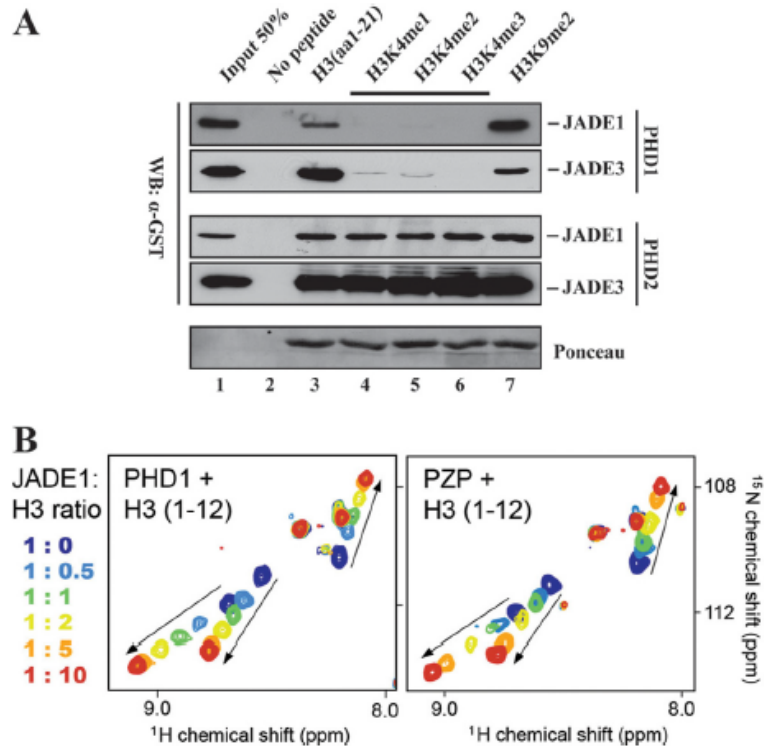


Figure 3-5. The first PHD finger of the JADE1 PZP domain dictates the specificity of the entire domain toward histone H3K4 methylation status.

(A) JADE PHD finger domains interact with histone H3 tail peptides *in vitro*, but with different effect of lysine 4 methylation. Peptide pull-down assays with the indicated biotinylated peptides and recombinant PHD fingers fused to GST were analyzed by western blot with anti-GST. JADE PHD1s prefer the non-methylated form while PHD2s bind H3 peptides in a methylation-independent manner. H3 K9 methylation has limited effect on the binding of these PHD fingers.

(B) NMR analysis indicates that JADE1 PHD1 alone binds the H3 tail similarly to the full PZP domain. Superimposed ^1H , ^{15}N HSQC spectra of JADE1 PHD1 and PZP, recorded during addition of the indicated H3 peptides. The spectra are color-coded according to the protein-peptide ratio.

3.5.6. Association of the ING proteins with HBO1-JADE is required for growth control

We have previously shown that transduced clones of HeLa cells expressing full-length JADE1L protein grew very slowly in normal conditions, while the protein unable to bind

chromatin due to mutated PHD2 had no effect on growth (Saksouk et al. 2009). This is clearly linked to the proposed tumor suppressor activity of JADE1 (Zhou et al. 2005) since anchorage-free growth measured by colony formation in soft agar is also decreased by JADE1L but not the mutant (Saksouk et al. 2009). However, it was still important to determine whether this growth inhibition effect required an association with ING tumor suppressor proteins. As shown in Figure 6A and B, stable expression of the JADE1S isoform, incapable of interacting with ING4/5 but still associated with HBO1, has no significant effect on normal cell growth or anchorage-free colony formation. The stable clones expressing JADE1L were difficult to maintain in culture as they tend to undergo a growth arrest after several passages. This behavior was linked to the level of JADE1L expression but was still seen even when the protein was expressed at a lower level than in other constructs (data not shown), suggesting that even a slight disruption of the balance between HBO1 complex subunits can have a profound effect on cell viability.

It was interesting to determine whether this slow growth phenotype was linked in some way to a cell cycle checkpoint activation, genome instability and/or cell death. Western blot analyses indicated that JADE1L-expressing cells possess a higher level of endogenous γ H2AX (Fig. 6C), a mark linked to DNA damage and checkpoint activation that could also reflect DNA fragmentation during cell death (Bonner et al. 2008). We then measured the expression of genes in JADE1L transduced cells using DNA microarrays. Over 499 genes were found to be significantly up-regulated when JADE1L was expressed compared to cells transduced with the empty vector, while 457 genes were down-regulated (see Suppl. Table I). Examples of genes significantly affected are presented in Table I. Among the up-regulated genes were a large number of interleukins, which have a well-established link to cellular senescence (Acosta et al. 2008; Kuilman et al. 2008; Rodier et al. 2009; Groppo and Richter 2011; Rodier and Campisi 2011), as well as the STAT1 transcription factor. In addition, genes linked to or regulated by the p53 pathway were also up-regulated, most-strikingly the p21/WAF1 CDK inhibitor. Increased amounts of the p21 gene product were also confirmed by a western blot (Fig. 6D). These results suggested that growth inhibition by JADE1L expression may occur through a p53-related pathway involving the well-known p21 CDK inhibitor, which has been linked to cell cycle arrest in response to DNA damage, cellular senescence and apoptosis (Jung et al. 2010).

Category	Genes ^b
Downregulated genes	CCNM2, DAB2 ^c , p57/KIP2/CDKN1C, p18/INK4C/CDKN2C, H19; SAP30 ^d , LSD1/AOF2/BHC110/KDM1A ^d , CDK5, 14-3-3 sigma ^e , MCM5, DMAP1 ^d , GMNN, CCNF and SKP2, and CCNE1 and CCNB1 genes
Upregulated genes	GDF15 ^e ; IL-1A/B, IL-6, IL-8, IL-24, and IL-32 ^f ; CCND1; JUN; VEGFA; CDK7 (TFIIH); STAT1; p21/WAF1/CDKN1A ^{e,f} ; DNase II; GADD45A ^e ; GADD45B ^e ; APP ^e ; IGF2BP2 ^e ; and p8/NUPR1 ^e genes

^a See Table S1 in the supplemental material for the full list of genes whose expression is significantly affected in transduced HeLa cells expressing JADE1L (>1.5-fold change [up or down] with *P* value of <0.05).

^b IL-1A/B, interleukin 1A or B; VEGFA, vascular endothelial growth factor A.

^c Linked to the Wnt signaling pathway.

^d Linked to chromatin-mediated repression or heterochromatin formation (deacetylation, H3K4 demethylation, DNA methylation).

^e Linked to or regulated by the p53 pathway.

^f Linked to cellular senescence.

Tableau 3-1. Examples of genes affected during stable expression of JADE1L in HeLa cells.

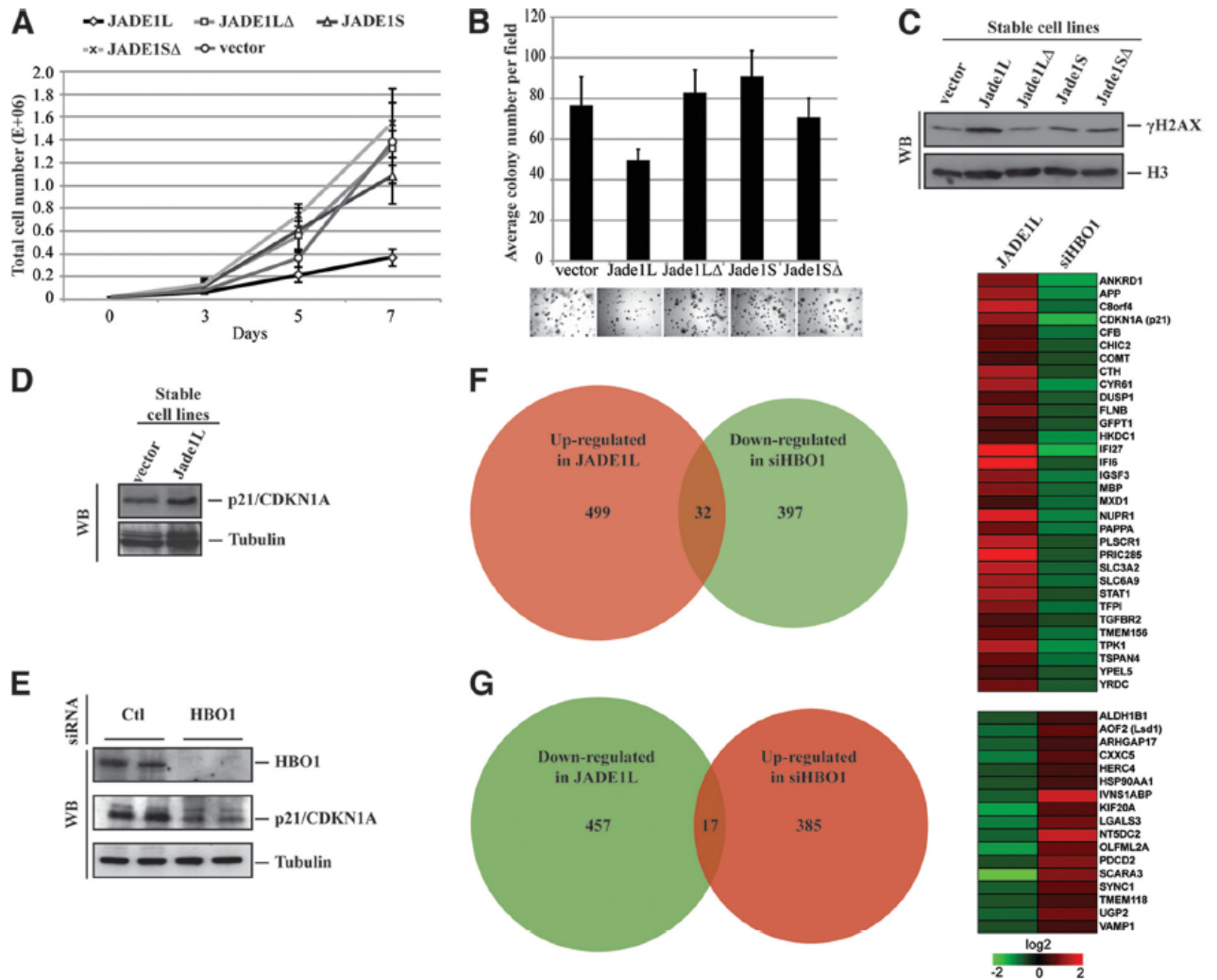


Figure 3-6. JADE1 interaction with ING is essential for tumor suppressor activity which implicates HBO1-dependent up-regulation of the p21 CDK inhibitor.

(A) Expression of JADE1L strongly inhibits HeLa cell growth while JADE1S or PHD-deleted mutants do not. Indicated transduced cell lines were seeded at the same density and cells were counted over a period of 7 days. (B) JADE1L inhibits anchorage independent cell growth while JADE1S or PHD-deleted mutants do not. HeLa cell clones expressing the different constructs were grown in soft agar for three weeks and colony formation was measured. Examples of image fields are shown at the bottom. (C) JADE1L-expressing cells contain higher levels of γ H2AX, a marker of DNA damage response, cell cycle checkpoint activation, and senescence. Whole cell extracts of the indicated JADE1-expressing clones were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. (D-E) JADE1L expression increases p21 protein level while HBO1 depletion decreases it. Western blot as in (C) using p21 and tubulin antibodies on indicated transduced or knocked down HeLa cells. (F-G) Venn diagrams showing the number of genes significantly up- or down-regulated by JADE1L expression or HBO1 depletion, and the genes commonly affected but in opposite ways (fold-change >1.5 with p-value < 0.05).

3.5.7. HBO1 depletion leads to down-regulation of multiple genes in the p53 pathway of cell cycle control and apoptosis

In order to identify genes that are regulated by HBO1-JADE complexes *in vivo*, we used microarrays to measure gene expression after siRNA-mediated knock-down of HBO1 in HeLa cells in comparison to a control siRNA (see Suppl. Table II). Examples among the 397 genes that were up-regulated and 385 genes that were down-regulated are presented in Table II. It is striking to see the number of p53-regulated genes that are repressed during HBO1 depletion, including not only p21/CDKN1A but also several others implicated in apoptosis. Knock-down of HBO1 and the associated decrease of the p21 protein were confirmed by western blot (Fig. 6E). It is also important to note that many genes important for transcription repression and heterochromatinization were up-regulated during HBO1 knock-down, including H3K4 demethylase-, histone deacetylase- and DNA methyltransferase-associated factors.

If a gene is directly regulated by the HBO1-JADE-ING complexes, one would expect its expression to be inversely affected in JADE1L over-expressing cells versus HBO1-depleted cells. Results from the two sets of microarray experiments were compared to find such genes and these are presented in Figure 6F and 6G. While the number of genes that fit this criteria is limited, p21/CDKN1A and the LSD1/KDM1A H3K4 demethylase are among those showing this pattern of mis-regulation in JADE1L versus siHBO1 cells. These results suggest that the p21 gene could be a direct target of the HBO1-JADE-ING complexes through local recruitment and acetylation.

3.5.8. Growth control by the HBO1-JADE1L-ING complex occurs through direct recruitment and action at p53-regulated genes

As for JADE1L, increased expression of ING proteins in transduced HeLa cells leads to decreased colony formation in soft agar, a characteristic of tumor suppressors (Fig. 7A). Over-expression of the different components of the HBO1 complex during transient transfections also leads to increased transcription of the p21/CDKN1A gene, as measured by RT-PCR (Fig. 7B). JADE1S has less effect in these conditions, presumably because of its lack of interaction with ING proteins. Since HeLa cells are known to possess a

compromised p53 pathway due to the presence of the HPV E6 protein that targets it for degradation, we carried out subsequent experiments in the p53-positive RKO cells from human colon carcinoma since these have been used extensively in the initial studies of ING proteins (Nagashima et al. 2001; Nagashima et al. 2003; Shiseki et al. 2003). Using a luciferase reporter gene under the control of the p21 promoter, we were able to show that expression of the ING3 and ING4 proteins leads to increased transcription from p21, as previously reported (Nagashima et al. 2003; Shiseki et al. 2003)(Fig. 7C). Furthermore, the cotransfection of a shRNA vector targeting p53 highlights the dependence of the ING-mediated stimulation of the p21 promoter activation on p53. Expression of HBO1 shows an even stronger effect than that of its associated ING4 subunit, and this effect is again lost upon p53 depletion. By comparison, expression of the ING3-associated Tip60 acetyltransferase, a known regulator of the p53 pathway (Avvakumov and Cote 2007b), has a small effect. This suggests that ING3 augments the activity of this promoter by a mechanism that does not involve recruitment of the Tip60 HAT activity. These outcomes can be also detected using a different p53-regulated promoter, BAX, although overall expression and stimulation in this case is weaker (Fig. 7D). Finally, to determine whether the HBO1-JADE-ING complexes directly regulate p53-dependent transcription of the p21 gene, we performed chromatin immunoprecipitation experiments (ChIP) using polyclonal antibodies against HBO1 and ING5 proteins. As shown in figure 7E, both proteins are clearly enriched *in vivo* around the transcription start site (TSS) of the p21 gene, a region of chromatin particularly dense in histone H3 methylated at lysine 4, which serves as the binding target of the ING4/5 PHD fingers. Altogether, these results indicate that the HBO1-JADE1L-ING4/5 complexes control cell growth in part through direct binding and activation of the p21/CDKN1A promoter in a process that is mediated by p53.

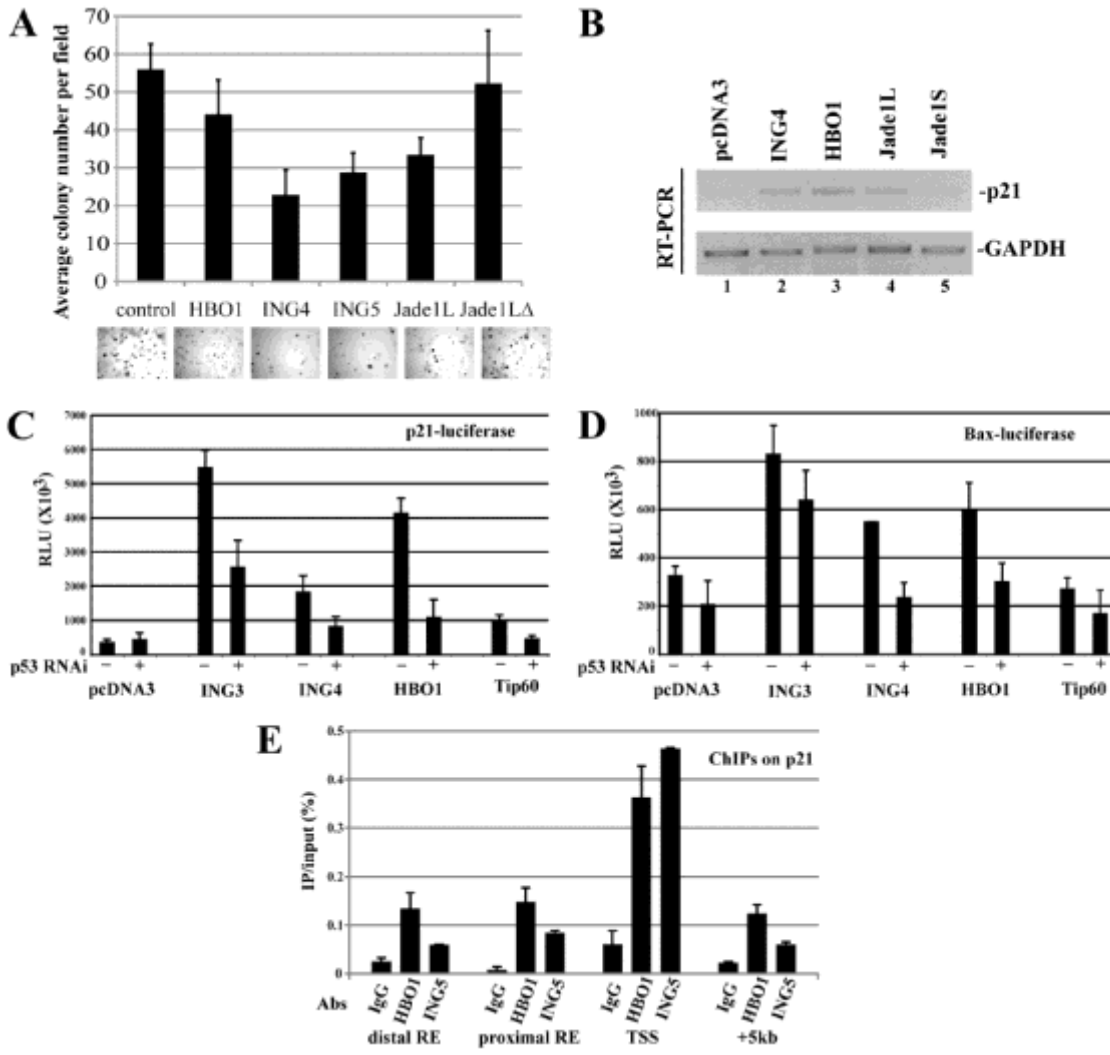


Figure 3-7. HBO1-JADE-ING complexes directly bind and stimulate p53-regulated genes to control cell proliferation.

(A) HBO1-JADE1L-ING4/5 inhibits anchorage independent cell growth. HeLa clones expressing the different constructs were incubated in soft agar and colony formation was measured as in Figure 6B. (B) Over-expression of HBO1, JADE1L and ING4 increases endogenous p21 transcription. RT-PCR analysis of HeLa cells transfected with the indicated expression vectors. (C-D) HBO1 and ING4 proteins stimulate p53-dependent transcription. Luciferase assays on RKO cells transfected with the indicated expression vectors. Cells were also transfected with a shRNA expression vector against p53 or control (empty). Luciferase reporters tested were under the control of the p21 (C) or BAX (D) promoters. Data from triplicate cultures are presented with standard deviation. (E) HBO1-ING complex is bound to the p21 promoter *in vivo*, near the transcription start site (TSS). ChIP analysis of HBO1 and ING5 enrichment on the p21/CDKN1A gene. Values representing direct IP over input ratio (%) are based on three different cultures with standard errors. "RE" (Response Element) represents locations of known p53 binding sites on the p21 promoter.

3.5.9. HBO1 is located in the 5' region of transcribed genes and colocalizes with H3K4me3

In order to precisely map the localization of native HBO1 complexes throughout the genome, we performed a ChIP-seq experiment in RKO cells. Analysis of ChIP-seq signal unveiled that genome-wide, HBO1 is mainly located immediately downstream of the TSS of genes and that its signal intensity strongly correlates with gene expression level (Figs 8A). We also saw a significant enrichment of HBO1 over promoter regions within the 2kb upstream of the transcription start site, with a diminished occupancy at the TSS itself. A more detailed analysis over the HOXA cluster indicated a strong enrichment of HBO1 mostly near the HOXA9 and HOXA10 genes (Fig. 8B). This observation is of interest as expression of HOXA10 was found to be downregulated upon knock-down of HBO1 in our microarray experiment (Table II). Finally, localization of HBO1 at the p21 locus demonstrated exactly the pattern described above, with the highest enrichment within the first 3kb of the coding region of the gene (Fig. 8C). Association of the H3K4me3 mark with this area of genes is well established (Rando and Chang 2009). As no ChIP-seq data for H3K4me3 in RKO are available, we utilized the data from K562 and HUVEC cells, which we obtained from the ENCODE project (Ernst et al. 2011). We saw a clear correlation between the H3K4me3 and HBO1 peaks surrounding the TSS of p21/CDKN1A, despite the fact that the two signals come from different cell lines and experimental conditions (Fig. 8C). Altogether, these data establish a strong global colocalization of the HBO1 complex with methylated H3K4 within the 5' regions of genes, in a manner that is proportional to transcription levels. They also confirm that HBO1-JADE-dependent stimulation of the p21 gene occurs through ING-dependent association with H3K4me near the TSS.

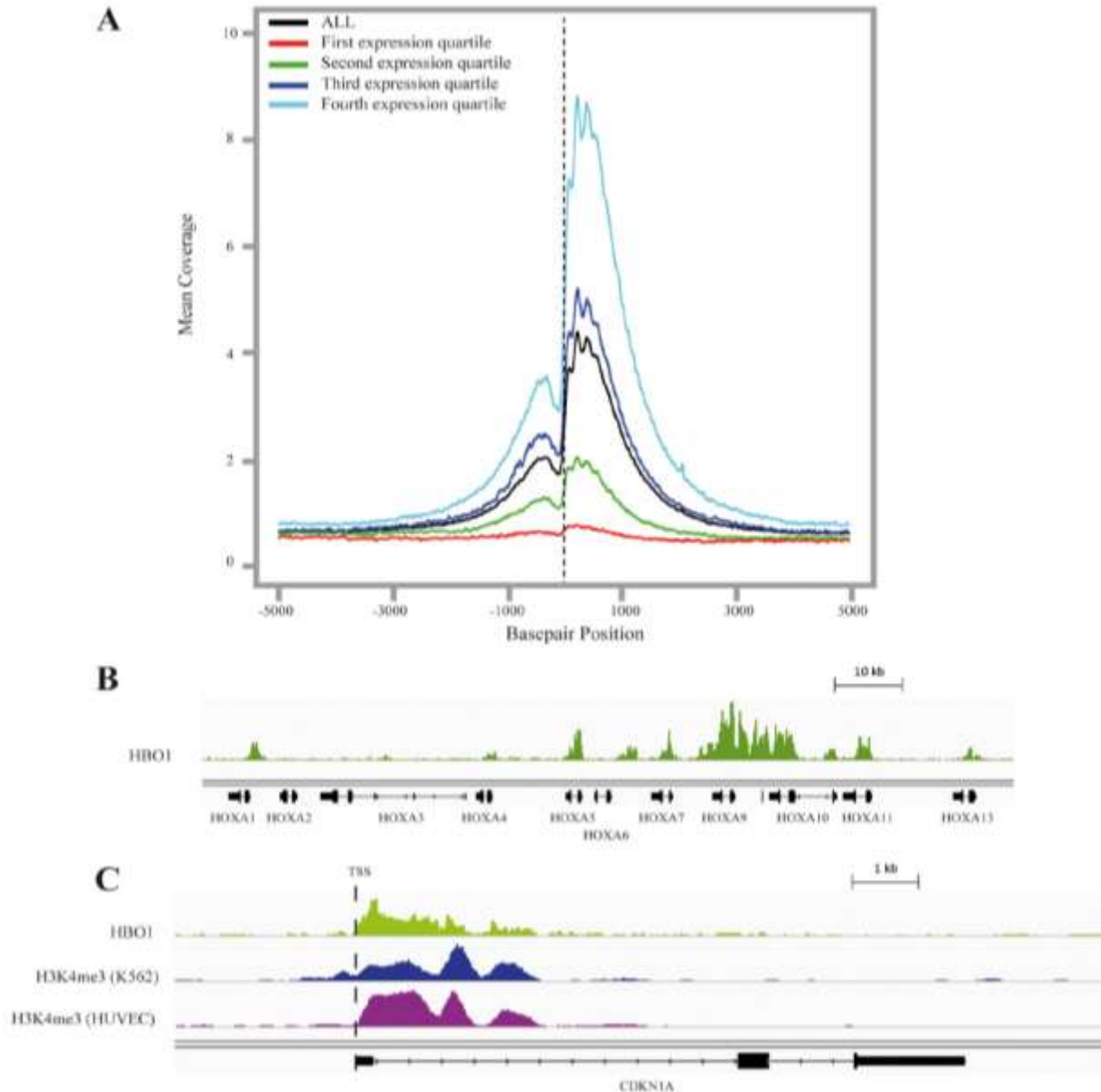


Figure 3-8. HBO1 is mainly located in the 5' end of transcribed genes and colocalizes with H3K4me3.

(A) HBO1 ChIP-seq signal intensity around the transcription start site (TSS) of genes in human RKO cells correlates globally with gene expression levels. The global profiles were produced using the UCSC genome browser genes definition and the Python package HTseq (see methods). The binning of genes in function of their expression levels in RKO cells (West and Marnett 2005) was performed by subdividing genes in four equals categories (the fourth quartile includes the most highly expressed genes). (B) Enrichment of HBO1 signal over the HOXA cluster in the RKO cell line. The scale bar represents 10 kilobases. (C) HBO1 signal is enriched in 5' of the p21 coding region and colocalizes with the H3K4me3 signal. Our Chip-seq HBO1 data from RKO cells aligned with H3K4me3 signal

from HUVEC and K562 cells obtained from Broad Institute/ENCODE project (Ernst et al. 2011). The scale bar represents 1 kilobase.

Category	Genes
Downregulated genes	DUSP2 ^c , NKD2 ^d , CASP9 ^c , p21/WAF1/CDKN1A ^c , NEDD4 ^c , p18/INK4C/CDKN2C APP ^c , BAX ^c , HOXA10, IGFBP3 ^c , p8/NUPR1 ^c , EXT2, CDK11, MAD, BAG1 ^c , APAF1 ^c , CASP3 ^c , PTEN ^c , FOS, STAT1, STAT5, DKK ^d , and PIM1 ^c genes
Upregulated genes	MAPK3/ERK1, 14-3-3 eta, KAP1/CDKN3 ^c , YES1, HMGN4, MSX1, LCOR ^e , HOXA5, POLD3, DNMT1 ^e , BID ^c , FZD4 ^d , FZD9 ^d , LSD1/AOF2/BHC110/KDM1A ^e , BHC80/PHF21A ^e , UHRF1 ^e , HELLS/LSH ^e , TLE4 ^e , BRMS1L ^e , TRIM24/TIF1alpha ^c , TRIM33/TIF1gamma ^e , BRPF1, and BCL9 ^d genes

^a See Table S2 in the supplemental material for the full list of genes whose expression is significantly affected in HeLa cells after siRNA-mediated knockdown of HBO1 (>1.5-fold change [up or down] with *P* value of <0.05).

^b MAPK3, mitogen-activated protein kinase 3; ERK1, extracellular signal-regulated kinase 1.

^c Linked to or regulated by the p53 pathway.

^d Linked to the Wnt signaling pathway.

^e Linked to chromatin-mediated repression or heterochromatin formation (deacetylation, H3K4 demethylation, DNA methylation).

Tableau 3-2. Examples of genes affected during HBO1 depletion by siRNA in HeLa cells.

3.6. Discussion

MYST-ING HAT complexes are highly conserved in eukaryotes and play critical roles in genome expression and maintenance (Avvakumov and Cote 2007b). In this study we uncovered the conserved structural determinants for assembly of these complexes and their interaction with chromatin. By focusing our efforts on the human HBO1 complex, a major source of histone H4 and H3 acetylation *in vivo* (Doyon et al. 2006; Kueh et al. 2011), we identified two short regions conserved in a subunit present in all MYST-ING complexes that are responsible for physical association of the MYST HAT enzyme and the ING tumor suppressor. In a separate study on the MOZ/MORF complexes, deletions affecting these short conserved domains in the BRPF1 subunit also disrupted complex assembly (Ullah et al. 2008). Importantly, our work identified a physiological regulation of the MYST-ING complex assembly which involves the natural occurrence of isoforms of the JADE1 protein produced by splice variants. One of these isoforms lacks the conserved region responsible

for ING protein association (Fig. 2 and 3). This regulated association of ING proteins with HBO1 complexes was confirmed *in vivo* and was shown to have strong implications to the HBO1 HAT function (Fig. 4). Indeed, ING4/5 proteins contain a PHD finger domain that stimulates HBO1 HAT activity towards chromatin containing histone H3 trimethylated at lysine 4 (Saksouk et al. 2009), a mark found near the transcription start sites of active genes (Shilatifard 2006). This may well account for the reported roles of HBO1 in transcription regulation (Avvakumov and Cote 2007b). It remains to be determined whether these interactions are important for the reported role of HBO1 in the initiation of DNA replication (Miotto and Struhl 2008; Miotto and Struhl 2010). However, our previous work clearly indicated that the ING5 protein was critical for DNA synthesis *in vivo* (Doyon et al. 2006).

A hallmark of MYST-ING complexes is the presence of multiple PHD finger domains within a single complex (Fig. 1B). We have previously analyzed the functions of the additional PHD modules present within the HBO1-associated JADE1 protein and found that they also bound histone H3 tails with high affinity, but with distinct specificity towards the K4 methylation status (Saksouk et al. 2009). While binding of the first PHD is completely inhibited by K4 methylation, the second PHD is largely unaffected. While we previously demonstrated the critical role of JADE1 PHD2 in chromatin binding and function of HBO1 complexes (Saksouk et al. 2009), our data also suggested the dominance of PHD1 within the double PHD/PZP structure in avoiding H3K4 methylation. We now show using NMR analysis that PHD1 alone produces the same chemical shift as the entire PZP domain when binding the histone H3 tail, supporting a single functional entity for interaction with chromatin (Fig. 5). These results have strong functional implications in light of the regulated association of ING4/5 with HBO1 complexes, which may occur not only through the use of JADE1 isoforms, but also through external modulation. Intriguingly, multiple post-translational modifications, including S/T/Y phosphorylation and lysine acetylation have been mapped within conserved domain II of the scaffold subunits and within ING proteins in large scale proteomic studies (Rikova et al. 2007; Choudhary et al. 2009; Huttlin et al. 2010)(Fig. 3; see phosphosite.org or phosida.org). Thus, it is plausible that modification of the JADE-HBO1 complexes in response to various

cellular events can alter their subunit composition, thereby regulating or re-targeting their activity.

The molecular interactions that we described for MYST-ING complexes in general and HBO1-JADE-ING in particular are critical for the function of these complexes, not only in binding and modification of specific regions of chromatin but also in their growth suppression activity linked to the ING tumor suppressors. We showed that only the isoform of JADE1 capable of interacting with ING proteins is able to slow growth and impair colony formation in soft agar, a signature of tumor suppressor activity (Fig. 6). In light of this, it is interesting to note that analysis of splice variants of JADE1 has shown that the ratio of the short to the long isoform greatly varies from 2 to 0.15 in a collection of over 300 cancer cell lines (Greshock et al.). This wide range of relative transcript levels suggests that regulation of JADE1 splicing can be used by some tumorigenic cell lines to impair the tumor suppressing function of the protein. This activity of JADE1L isoform implicates an induced senescence-like phenotype linked to up-regulation of several interleukins, the p21/CDKN1A gene and DNA damage checkpoint activation. These abilities of the JADE1 complex appear to be dependent on the associated HBO1 acetyltransferase since siRNA-mediated depletion of this HAT leads to strong down-regulation of the p21 gene. In fact, microarray analyses of gene expression indicate that loss of HBO1 leads to down-regulation of a large number of genes linked to the p53 pathway of cell cycle control, senescence and apoptosis. ING proteins have been implicated in these processes (Soliman and Riabowol 2007), and we now show evidence that they function through their association with MYST acetyltransferase complexes. In agreement with this model, a recent report has shown a functional interaction between MOZ and p53 in inducing p21 expression and cell-cycle arrest (Rokudai et al. 2009). Our data now indicate that HBO1-JADE-ING complexes directly stimulate p53-dependent transcription of genes like p21 and that they are enriched near the transcription start site, where high levels of H3K4me3-containing chromatin exist, allowing them to associate with chromatin through the PHD finger domain of the ING tumor suppressors (Fig. 7 & 8). It is noteworthy to point out that the gene encoding LSD1/KDM1A, a major H3K4 demethylase and transcriptional repressor (Lan et al. 2008) is regulated in an opposite fashion upon

increased JADE1L expression or HBO1 depletion (Fig. 6G), suggesting a function of the HBO1-JADE-ING complex in blocking H3K4 demethylation.

Our microarray experiments upon the manipulation of HBO1 and JADE1L protein levels also identified putative targeted genes and pathways that support important roles of this acetyltransferase complex in many cellular processes. In addition to the full set of p53 targets for cell cycle arrest and apoptosis, genes implicated in transcription repression, like components of deacetylase and demethylase complexes and factors involved in the maintenance of genomic DNA methylation (DNMT1-UHRF1), were upregulated during HBO1 depletion (Table II). This suggests a significant increase in heterochromatinization of the genome in the treated cells and supports a global role of HBO1 in marking and stabilizing euchromatin, as evidenced by its global effect on H3/H4 acetylation (Doyon et al. 2006; Kueh et al. 2011; Mishima et al. 2011). This is certainly in agreement with our ChIP-seq data that physically links HBO1 to the 5' end of genes in a direct correlation to the level of transcription (Fig. 8). This bias toward the 5' of genes was also recently obtained through ChIP-chip analysis in leukemic cells (Mishima et al. 2011). Furthermore, while it has been argued that JADE1 is a direct repressor of Wnt signaling (Chitalia et al. 2008), we show here that HBO1 depletion leads to downregulation of repressors of the Wnt signaling pathway and upregulation of the frizzled receptors and BCL9, supporting a transcriptional role in modulating this pathway. Finally, it is interesting to note a likely compensation mechanism upon HBO1 depletion as the gene for BRPF1 is upregulated, suggesting that MOZ/MORF complexes may compensate for the global loss of H3K14 acetylation (Kueh et al. 2011). Mouse knockouts for HBO1 are embryonic lethal and show an almost complete loss of H3K14ac but an increase of H4K16ac (Kueh et al. 2011). The latter phenotype could be explained by the down-regulation of the Nuprin1/p8 inhibitor of the hMOF acetyltransferase, the MYST enzyme responsible for the bulk of H4K16ac (Smith et al. 2005; Gironella et al. 2009).

The work presented here highlights the highly conserved nature of the molecular interactions within the MYST-ING family of acetyltransferase complexes. It also demonstrates that the ING tumor suppressor proteins function through their association with these complexes and chromatin regions carrying the H3K4me histone mark. It will be

interesting to determine how this MYST-ING interaction is modulated to regulate cell proliferation. The multiple roles of these acetyltransferase complexes in genome expression and stability make them ideal targets and effectors for signaling events that regulate cell cycle progression.

3.7. Acknowledgements

We are grateful to Or Gozani for the biotinylated histone peptides, Song Tan for recombinant HBO1, JADE1 and ING4 vectors and help in the early stages of this study, Mitch Smith for recombinant HBO1 vectors, and Maria Panchenko for JADE1S vectors. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to J.C. (MOP-64289), the Canadian Cancer Society Research Institute (CCSRI) to X.-J.Y. and the National Institutes of Health (NIH) to T.G.K.. N.A. held a CIHR/Institute of Aging fellowship, M.-E.L. a National Science and Engineering Research Council (NSERC) Ph.D. studentship, K.S.G. an American Cancer Society Fellowship and Y.D. a CIHR/Canada Graduate Scholarship. J.C. is a Canada Research Chair.

Supplemental material for this article (Table S1 and S2) may be found at:
<http://mcb.asm.org/content/32/3/689/suppl/DC1>.

Chapitre 4

Exchange of associated factors directs a switch in HBO1 acetyltransferase histone tail specificity

Marie-Eve Lalonde¹, Nikita Avvakumov¹, Karen C. Glass^{2*}, France-Hélène Joncas¹,
Nehmé Saksouk¹, Michael Holliday³, Eric Paquet¹, Kezhi Yan⁵, Qiong Tong², Brianna J.
Klein², Song Tan⁴, Xiang-Jiao Yang^{5,6}, Tatiana G. Kutateladze^{2,3} and Jacques Côté^{1#}

¹Laval University Cancer Research Center, Hôtel-Dieu de Québec (CHUQ), Quebec City, Québec G1R 2J6, Canada. ²Department of Pharmacology, and ³Molecular Biology Program, University of Colorado School of Medicine, Aurora, CO 80045, USA. ⁴Center for Gene Regulation, Department of Biochemistry & Molecular Biology, 108 Althouse Laboratory, The Pennsylvania University, University Park, PA 16802-1014, USA. ⁵The Rosalind & Morris Goodman Cancer Research Center and Department of Biochemistry, McGill University, Montreal, Québec H3A 1A1, Canada. ⁶Department of Medicine, McGill University Health Center, Montreal, Québec H3A 1A1, Canada.

*Present address: Department of Pharmaceutical Sciences, Albany College of Pharmacy and Health Sciences, Colchester VT

Corresponding author: (418) 525-4444 ext. 15545; Jacques.Cote@crhdq.ulaval.ca

4.1. Résumé

Les histones acétyltransférases (HAT) s'assemblent avec plusieurs sous-unités pour former des complexes afin de diriger leur activité vers différentes lysines d'histones sur les nucléosomes. Dans cet article, nous avons caractérisé les différentes HAT natives qui s'assemblent en complexe avec la famille des protéines d'échafaudage BRPFs. Leur domaine PHD-Zn *Knuckle*-PHD est essentiel pour la liaison à la chromatine et ne peut lier que les histones H3K4 non méthylées. Cette spécificité de liaison est contrecarrée par le PHD de la protéine ING5. Les complexes natifs contenant la protéine BRPF1 peuvent avoir comme sous-unité catalytique soit la protéine MOZ/MORF ou la protéine HBO1. De façon intéressante, nous avons montré précédemment que le complexe formé de la protéine HBO1 associé à JADE1 pouvait acétyler l'histone H4. Ici, nous démontrons que le complexe HBO1-BRPF1 acétyle plutôt l'histone H3 de la chromatine. Nous avons cartographié une courte région dans la partie N-term des protéines d'échafaudage permettant de cibler différentes queues N-term d'histones. Le choix entre les différentes sous-unités d'échafaudage associées à HBO1 permet donc de réguler la spécificité d'acétylation entre les histones H3 et H4. Ces résultats mettent en lumière un nouveau rôle essentiel pour les protéines associées aux MYST acétyltransférases, rôle que l'on avait toujours attribué à l'enzyme elle-même.

4.2. Abstract

Histone acetyltransferases (HAT) assemble into multisubunit complexes in order to target distinct lysine residues on nucleosomal histones. Here, we characterize native HAT complexes assembled by the BRPF-family of scaffold proteins. Their PHD-ZnKnuckle-PHD domain is essential for binding chromatin and restricted to unmethylated H3K4, a specificity that is reversed by the associated ING subunit. Native BRPF1 complexes can contain either MOZ/MORF or HBO1 as catalytic acetyltransferase subunit. Interestingly, while the previously reported HBO1 complexes containing JADE scaffold proteins target histone H4, the HBO1-BRPF1 complex acetylates only H3 in chromatin. We mapped a small region to the N-terminus of scaffold proteins responsible for histone tail selection on chromatin. Thus, alternate choice of subunits associated with HBO1 can switch its specificity between H4 and H3 tails. These results uncover a crucial new role for associated proteins within HAT complexes, previously thought to be intrinsic to the catalytic subunit.

4.3. Introduction

In eukaryotic cells, DNA wraps around histone octamers to form nucleosomes, the basic units of chromatin. This structural organisation not only allows compaction of the DNA in the nuclei, but also regulates diverse cellular processes, like DNA repair, transcription and replication. This regulation is mainly exerted via the different post-translational modifications of the protruding N-term tail residues of histones, such as acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination and sumoylation. These modifications act as docking sites for different protein effectors involved in many cell pathways (Musselman et al. 2012a). Acetylation of histone lysines is one of the best characterized functional modifications. It is deposited by histone acetyltransferases (HATs) by transferring the acetyl group from acetyl-CoA on the ϵ -amino group of lysine residues. Although histone acetylation has mostly been associated with transcriptional activators and regulators, it has also been implicated in other processes, like DNA repair, replication and mRNA splicing (Shahbazian and Grunstein 2007; van Attikum and Gasser 2009; de Almeida and Carmo-Fonseca 2012).

The MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60) family of acetyltransferases is composed of evolutionary conserved enzymes that are assembled into multi-subunit protein complexes. They acetylate histone tails within chromatin but also target non-histone substrates, in both human and yeast (Sapountzi and Cote 2011). We have previously purified several native MYST complexes and found that they are based on a tetrameric core structure associated with an ING tumor suppressor subunit, the Eaf6 subunit and an EPC (enhancer of polycomb)-related scaffold subunit (Doyon et al. 2006; Saksouk et al. 2009; Avvakumov et al. 2012). Four human MYST complexes assemble in such a manner, namely Tip60 (KAT5), HBO1 (MYST2, KAT7), MOZ (MYST3, KAT6A) and MORF (MYST4, KAT6B) (Fig. 1a). These enzymes have been shown to play crucial roles in DNA repair, recombination and replication, as well as in transcription activation (Avvakumov and Cote 2007b), which in turn regulates developmental processes (Voss and Thomas 2009) and is involved in leukemia and several genetic diseases (Avvakumov and Cote 2007a; Yang and Ullah 2007; Voss and Thomas 2009).

As for several chromatin related proteins, the MYST-ING complexes comprise diverse subunits that carry various histone recognition modules which bind to different post-translationally modified residues. Indeed, they contain chromodomains, bromodomains and PWWP domains, but the most abundant histone binding domain found within these proteins is the PHD (*plant homeodomain*) finger. PHD fingers form a versatile recognition motif family which binds to different histone modifications of the N-terminal tail of histone H3. Most of the PHD fingers can read histone methylation state of H3K4 (me0 vs me2/3), but some can recognize other histone H3 residues and/or modifications (Musselman et al. 2012a). We recently characterized the binding properties of the different PHD fingers found in the MYST acetyltransferase complex HBO1 (Saksouk et al. 2009; Avvakumov et al. 2012). Even though the various domains found within the complex have unique recognition motifs, we showed that they cooperate to bind chromatin on H3K4me3, a mark found near the transcription start site (TSS) of actively transcribed genes (Shilatifard 2006). The two PHD fingers of the JADE1L scaffold subunit (Fig. 1b) work together to recognize unmethylated H3K4, while the PHD finger of the ING4 subunit directs the binding of the entire complex toward H3K4me3. Indeed, ING tumor suppressor proteins all contain a PHD finger that recognizes the trimethylated form of H3K4 (Pena et al. 2006; Shi et al. 2006; Champagne et al. 2008; Saksouk et al. 2009). The integration of the different binding properties of PHD fingers within HBO1 complex allows for its tumor suppressor activity, through its regulation of transcriptional activity, leading to the control of cell proliferation (Avvakumov et al. 2012).

The BRPF1 protein is the scaffold subunit of the MYST acetyltransferase complex MOZ/MORF (Doyon et al. 2006; Ullah et al. 2008). It has been shown to play a role in maintaining anterior HOX gene expression during zebrafish development and consequently in determining segmental identity (Laue et al. 2008). It is also thought to be part of the TrxG family of genes, which are important for maintaining active genes during development (Laue et al. 2008). The mutually exclusive catalytic subunits of the complex, MOZ and MORF, are also known to play a role in HOX gene expression and development in both mouse and zebrafish (Miller et al. 2004; Voss et al. 2009; Qiu et al. 2012). Moreover, the MOZ acetyltransferase is frequently translocated in acute myeloid leukemia and is required for proper haematopoietic stem cells (HSCs) proliferation (Katsumoto et al.

2006; Thomas et al. 2006; Perez-Campo et al. 2009; Aikawa et al. 2010). As for many chromatin-related proteins, BRPF1 contains a variety of histone recognition modules that can bind to different modifications (Fig. 1b). Its N-term region has two PHD domains linked by a Zn knuckle (PZP domain) while the C-term has both a bromodomain and a PWWP domain. This PWWP domain can bind to the H3K36me3 mark found on the coding regions of active genes (Vezzoli et al. 2010). As for other scaffold subunits within MYST complexes, BRPF1 also contains at its N-term a region of homology with the EPcA domain found in enhancer of polycomb proteins (Stankunas et al. 1998; Avvakumov et al. 2012). We have shown that two homology subdomains within EPcA serve as docking sites, one for the HAT subunit (domain I) and one for the hEaf6 and ING proteins (domain II)(Fig. 1b) (Avvakumov et al. 2012).

In this study, we first dissected the molecular interactions of the PZP (PHD-Zn knuckle-PHD) domain in BRPF1 for different chromatin modifications, showing that the first PHD domain acts dominantly over the second one in targeting unmethylated H3K4, but they function together to drive binding to chromatin. Moreover, we found that the different subunits of the complex are distributed genome-wide over H3K4me3-rich regions, targeted by the ING5 subunit. Finally, we discovered that the different scaffold subunits of MYST-ING complexes not only play an essential role in enabling chromatin acetylation but also select which histone tail is modified. We propose a model in which the HBO1 acetyltransferase is competing for binding to either BRPF or JADE scaffold subunits in cells and where this differential association determines which histone tail is acetylated by the HAT on chromatin. While JADE directs the acetylation toward H4 tail, BRPF1 targets H3 acetylation. Our results thus provide novel insights on the mechanism by which MYST acetyltransferases target chromatin acetylation from yeast to human cells and thus help understand how these enzymes regulate their different cellular functions.

4.4. Results

4.4.1. The PZP domain of BRPF1 binds to unmethylated histone H3K4

BRPF1 contains many potential chromatin recognition domains as depicted in Fig. 1b. We previously demonstrated that the JADE1L scaffold subunit found within the HBO1 HAT

complex contains a PZP domain that recognizes unmethylated H3K4 (Saksouk et al. 2009; Avvakumov et al. 2012). Importantly, the first PHD domain of BRPF2 (also known as Brd1, a paralog of BRPF1) has recently been shown to bind the N-term tail of histone H3 (Qin et al. 2011; Liu et al. 2012c). As BRPF1 also contains a similar tandem PHD finger module, we characterized its affinity for histone marks. We first examined the affinity of the two separated PHD fingers using peptide pulldown experiments with recombinant domains fused to GST and biotinylated peptides (Fig. 1c). The first PHD (PHD1) domain shows specific binding to unmethylated H3K4 peptides, while the second PHD (PHD2) domain shows some interaction with H3 peptides irrespective of their methylation status. These interactions were also analysed using NMR. Substantial chemical shift changes observed in the spectra upon addition of the peptide indicated that the PHD1 finger recognizes the unmodified histone H3 tail (Fig. 1d). Moreover, methylation or acetylation of H3K9 did not affect binding of PHD1 to H3 (see supplementary Fig. 1a-b). Likewise, binding of the PHD1 finger to the histone peptides mono-, di- and trimethylated at Lys4 was examined by tryptophan fluorescence (Fig. 1e). A single methyl group attached to Lys4 reduced binding of the PHD1 finger by ~10 fold, whereas affinity for H3K4me2 and H3K4me3 was dropped by ~100 fold. Thus, methylation of Lys4 disrupts the association of BRPF1 PHD1 with histone H3. Additionally, PHD1 requires the first N-terminal amino acids of the H3 tail for proper binding (see supplementary Fig. 1b). These results indicate that PHD1 associates with the extreme N-terminus of histone H3, likely through hydrogen bonds and ionic interactions with Ala1, Arg2 and unmodified Lys4, as reported for other PHD fingers (Musselman et al. 2012a), and that this binding is disrupted by methylation of Lys4. To demonstrate that PHD1 has a similar mechanism of interaction as other H3K4me0-binding PHD fingers, we mutated two key conserved residues and measured significantly lower binding in peptide pulldown assays (supplementary Fig. 1c-d).

Conversely, neither the N-terminal part of the histone tail (residues 1-12), nor the downstream sequence (residues 9-19) were able to induce chemical shift changes in the ¹⁵N-labeled PHD2 finger of BRPF1, illustrating out that this module alone is not capable on its own of specific binding to these sections of histone H3 tail (Fig. 1f). We also found that PHD2 and PHD1 do not interact with each other, as no resonance perturbations were observed in the PHD2 finger during gradual addition of unlabeled PHD1 (Fig. 1f). On the

other hand, nice chemical shift changes were obtained when incubating PHD2 with increasing amounts of dNMPs, suggesting that PHD2 could in fact interact with DNA (supplementary Fig. 1e).

The two PHD fingers were then tested together as the full PZP module. Peptide pulldowns demonstrate that binding of the PZP to the N-term tail of H3 is inhibited by methylation of H3K4 (Fig. 1g), revealing PHD1 as a dominant recognition module over PHD2 within the PZP domain. To examine whether the Zn-knuckle and/or the second PHD2 finger cooperate with PHD1 in the association with H3 by recognizing the histone sequence downstream of Lys9, binding affinity of BRPF1 PZP for a longer peptide was measured by tryptophan fluorescence. We found that PZP binds to the peptide containing residues 1-20 of histone H3un with a K_d of 12 μ M (Fig. 1h and supplementary Fig. 1f). This value was comparable to the K_d value measured for the interaction of a single PHD1 module with the short H3un peptide (6 μ M, Fig. 1e). Furthermore, the PZP domain and PHD1 alone exhibited similar affinities toward the short H3un peptide ($K_d = 2 \mu$ M and 6 μ M, respectively). Methylation or acetylation of Lys9 or Lys14 had very little to no effect on the interaction of PZP with the short H3un peptide (Fig. 1h and supplementary Fig. 1f). Together, these data demonstrate that the PZP domain of BRPF1 recognizes histone H3 N-terminus that is unmethylated on Lys4 and that this *in vitro* interaction is driven by the first PHD.

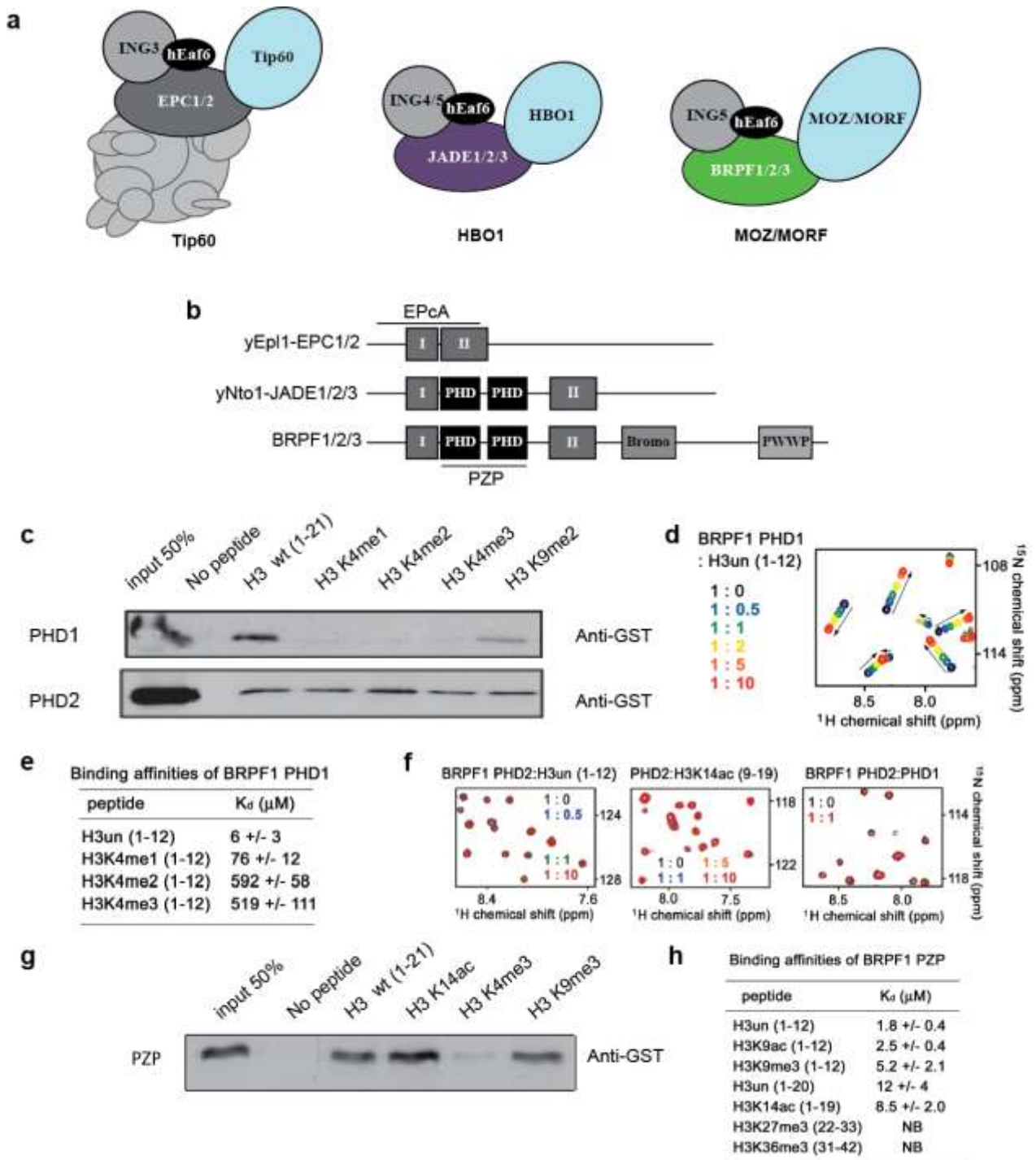


Figure 4-1. Characterization of the two PHD fingers in the PZP domain of BRPF1.

(a) Subunit organisation of human MYST acetyltransferase complexes used in this study. The core subunits have a scaffold protein (JADE, BRPF, EPC), an ING tumor suppressor protein (ING3, 4, 5) and the catalytic enzyme protein (Tip60, HBO1, MOZ/MORF). (b) Schematic representation of the conserved protein domains found in the scaffold subunits of MYST-ING HAT complexes (yeast and human). (c) The PHD1 finger of the PZP domain of BRPF1 recognizes unmethylated H3 in vitro, while the PHD2 finger shows

interaction with H3 peptides independently of methylation status. Peptide pull-down assays with different biotinylated peptides and recombinant PHD fingers fused to GST were analyzed by Western blotting with anti-GST antibody (WB: α -GST). (d) Superimposed $^1\text{H},^{15}\text{N}$ HSQC spectra of BRPF1 PHD1, collected as unmodified H3 peptide was titrated in. The spectrum is color-coded according to the protein-peptide ratio. (e) Binding affinities of the BRPF1 PHD1 finger for histone H3 peptides with different K4 methylation status were measured by tryptophan fluorescence. Numbers in parenthesis represent the amino acid positions of histone H3 included in the peptides. (f) Superimposed $^1\text{H},^{15}\text{N}$ HSQC spectra of BRPF1 PHD2, collected as indicated peptides or unlabeled BRPF1 PHD1 were added stepwise. The spectra are color-coded according to the protein-peptide ratio. (g) The PZP domain of BRPF1 binds to unmethylated histone H3K4 *in vitro*. Peptide pull-down assays with different biotinylated peptides and recombinant PZP domain fused to GST were analyzed by Western blot with α -GST antibody. The PHD1 dictates the specificity of the entire domain toward unmethylated H3K4. (h) Binding affinities of the PZP domain for indicated H3 peptides were measured by tryptophan fluorescence. Numbers in parenthesis represent the amino acid positions included in the peptides. NB: no binding was detected.

4.4.2. Each PHD finger of the PZP domain is critical for chromatin binding and acetylation

To determine the functional relevance of the second PHD finger, we immunopurified wild-type and ΔPHD2 BRPF1 complexes from co-transfected 293T cells. Western analysis of the wild-type complex indicates the co-purification of endogenous histone H3 (Fig. 2a). This co-fractionation is completely lost after removal of the PHD2 domain of BRPF1, implying a crucial role in binding histone H3 *in vivo*. Furthermore, when the purified complexes were used in HAT assays, acetylation of chromatin was abolished by the deletion of PHD2, while acetylation of free histones was not affected (Fig. 2b). These data indicate that, while the NMR studies did not support a role in binding to the H3 tail, the second PHD of the PZP domain is essential for binding to chromatin and its subsequent acetylation. In order to compare these observations with the deletion of the first PHD domain which drives the *in vitro* interaction, we then immunopurified both ΔPHD1 and ΔPHD2 complexes (Fig. 2c) and compared their acetyltransferase activity on chromatin and free histones. Similar to PHD2, the PHD1 finger is essential for acetylation of chromatin by the complex, while not affecting acetylation of free histones (Fig. 2d and e). Altogether, these data demonstrate that both PHD fingers of BRPF1 are necessary for the complex to bind and acetylate chromatin, suggesting that the PZP domain functions as a single module binding to nucleosomes.

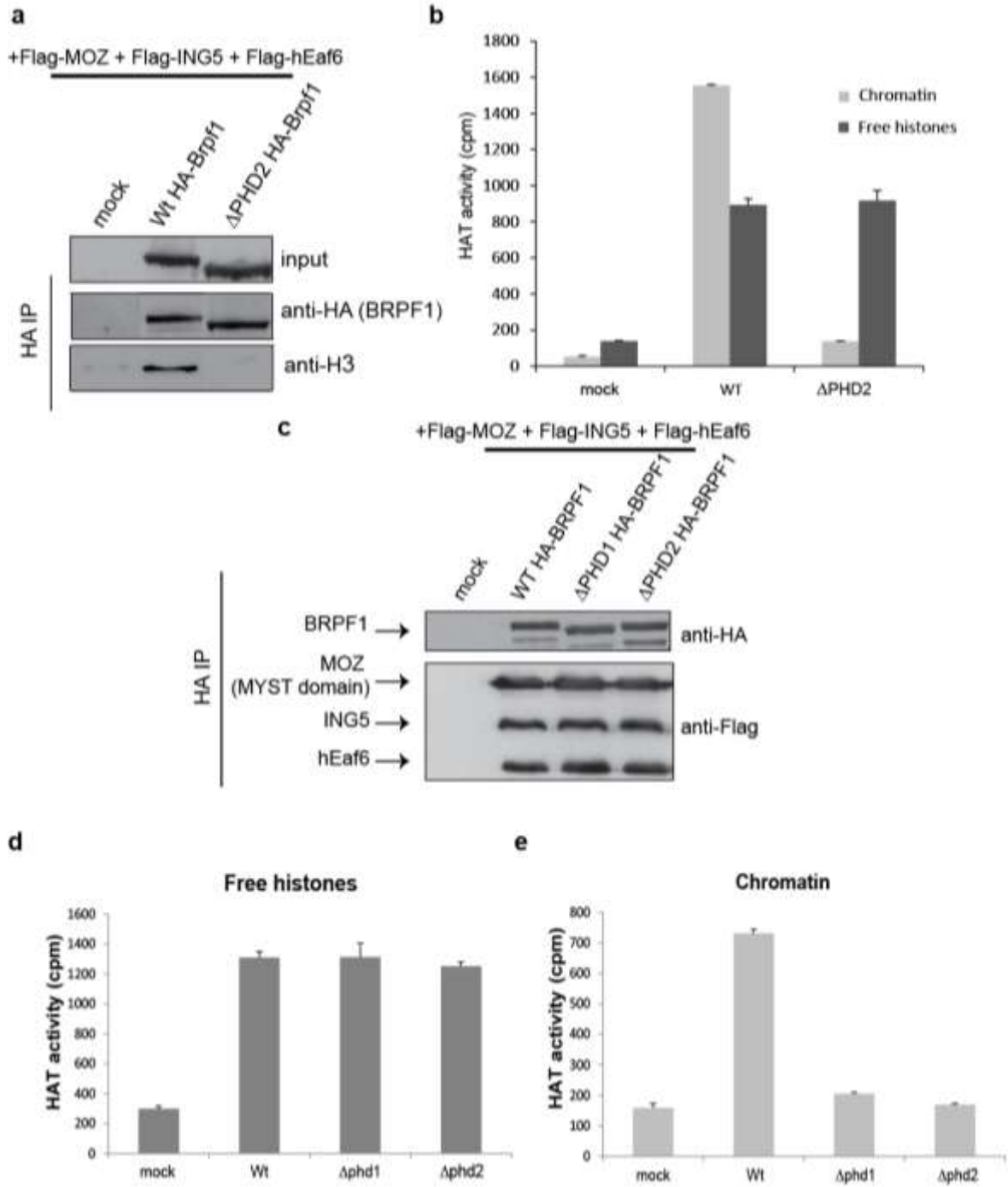


Figure 4-2. BRPF1 PHD1 and PHD2 fingers are required for binding to chromatin and its acetylation.

(a) BRPF1 associates with histone H3 in vivo and this binding is lost when the PHD2 finger is deleted. 293T cells were co-transfected with HA-BRPF1 (WT or Δ PHD2) plasmids, Flag-MOZ (MYST domain), Flag-ING5 and Flag-hEaf6 plasmids and whole-cell extracts (WCE) were used for HA IP. As the MYST domain of the MOZ catalytic subunit is sufficient for HAT activity and complex assembly (Ullah et al. 2008), it was used to

avoid the high degradation sensitivity of the full-length protein (225 kDa). Mock control was co-transfected with both HA empty and Flag empty plasmids. Histone H3 binding was analyzed by WB α -H3. (b) PHD2 is required for proper in vitro chromatin acetylation. HAT assays with the same purified complexes as in a were performed on chromatin or free histones. Reactions were spotted on membranes and counted by liquid scintillation. Values are based on three independent experiments with standard error. (c) WB on purified WT, Δ PHD1 and Δ PHD2 complexes in 293T cells showing equal expression of the different subunits. WCE was used after co-transfection of HA-BRPF1 plasmids (WT, Δ PHD1 or Δ PHD2), Flag-MOZ, Flag-ING5 and Flag-hEaf6 plasmids for HA-IP. HA beads were eluted with HA peptide and fractions were loaded on gel. (d)(e) PHD1 is also important for acetylation of chromatin in vitro. HAT assay on free histones (d) or chromatin (e) using the complexes purified in c were spotted on membranes for liquid scintillation counting. Values are based on three independent experiments with standard error.

4.4.3. ING5 directs BRPF1 localization to H3K4me3 enriched chromatin at the 5'-end of active genes

We have previously identified ING5 as the ING tumor suppressor subunit of the MOZ/MORF complexes (Doyon et al. 2006; Ullah et al. 2008). This association occurs via the conserved domain II of BRPF proteins (Ullah et al. 2008; Avvakumov et al. 2012). As ING proteins contain a PHD domain in their C-terminal that has been shown to recognize H3K4me3 (Pena et al. 2006; Champagne et al. 2008; Musselman et al. 2012a), we asked if the presence of the ING5 protein within the complex is targeting BRPF1 to the H3K4me3 mark in chromatin. First, we used recombinant complexes purified from SF9 cells +/- ING5 to perform HAT assays on histone peptides. We observed that the HAT activity of ING5-containing complex is greatly stimulated on H3K4me3 peptides when compared unmodified or H3K9me peptides (Fig. 3a). This is reminiscent of our previous observations for ING4 and the JADE1/HBO1 complex, where the presence of ING4 stimulated acetylation of H3K4me3 peptides (Saksouk et al. 2009; Avvakumov et al. 2012). On the other hand, we observed a clear inhibition of HAT activity when peptides carry methylated Lys4 and ING5 is absent from the BRPF1 complex (Fig. 3b). This result corroborates what we observed in Fig. 1g, where the PZP domain of BRPF1 is unable to bind H3 peptides that are methylated on Lys4. Together, these data suggest that there is an interplay between the different PHD domains found within the complex and that the PHD of ING5 is prevailing over the others in driving interaction with H3K4me3, while BRPF1 PZP domain is required for binding to chromatin per se.

To test how this interplay occurs *in vivo*, we then performed ChIP-seq experiments in human RKO cells using H3K4me3, ING and BRPF antibodies. This p53-positive human colon carcinoma cell line shows the expected features when mapping the H3K4me3 chromatin mark, i.e. enrichment near the transcription start site (TSS) of active genes, with signals increasing with the expression levels (Fig. 3c and Supplementary Fig. 2a and 3). Genome-wide localization analysis of the ING5 protein showed enrichment around TSS of active genes, on the same regions where H3K4me3 is located (Fig. 3d and Supplementary Fig. 2b). In comparison, the ING2 protein, which also binds H3K4me3 through its PHD domain (Pena et al. 2006; Shi et al. 2006), was found within the same genomic regions (Fig. 3d and Supplementary Fig. 2c). ING2 is a subunit of the histone deacetylase (HDAC) complex mSin3a (Doyon et al. 2006; Shi et al. 2006). Our data indicate that ING5 (HAT) and ING2 (HDAC) complexes co-localize at the TSS of actively transcribed genes, arguing for a primary role of their H3K4me3-binding PHD finger in this targeting. Previous genome-wide mapping of several HAT and HDAC proteins showed that they are similarly found near TSS of actively transcribed regions, in a dynamic process allowing rapid resetting of chromatin (Wang et al. 2009b). We then used an antibody raised against the BRPF2 paralog to evaluate genomic distribution by ChIP-seq. This antibody is equally efficient at recognizing the BRPF1 protein (but not BRPF3) because of the highly conserved region used as antigen (Supplementary Fig. 4). The BRPF1/2 distribution was also localized near TSS of active genes, at H3K4me3 enriched regions, similar to what was observed for ING5 (Fig. 3e and Supplementary Fig. 3d). This is also almost identical to our recently published genome-wide profile of the HBO1 HAT in the same cell line (compare heat maps in Fig. 3e) (Avvakumov et al. 2012). Upon closer examination at specific loci, we clearly observe co-localization of BRPF1/2 and ING5 proteins over H3K4me3-rich regions near p21(CDKN1A) TSS and at the HOXA cluster (Fig. 3f and g).

Overall, these results show that BRPF1/2, ING5 and HBO1 proteins co-localize on H3K4me3-rich regions surrounding the TSS of actively transcribed genes and that their signals are proportional to the expression level of these genes. In addition, it indicates that the ING5 protein is a primary determinant for BRPF1/2 complex association with specific genomic loci, correlating with its binding to the H3K4me3 histone mark, both *in vitro* and *in vivo*.

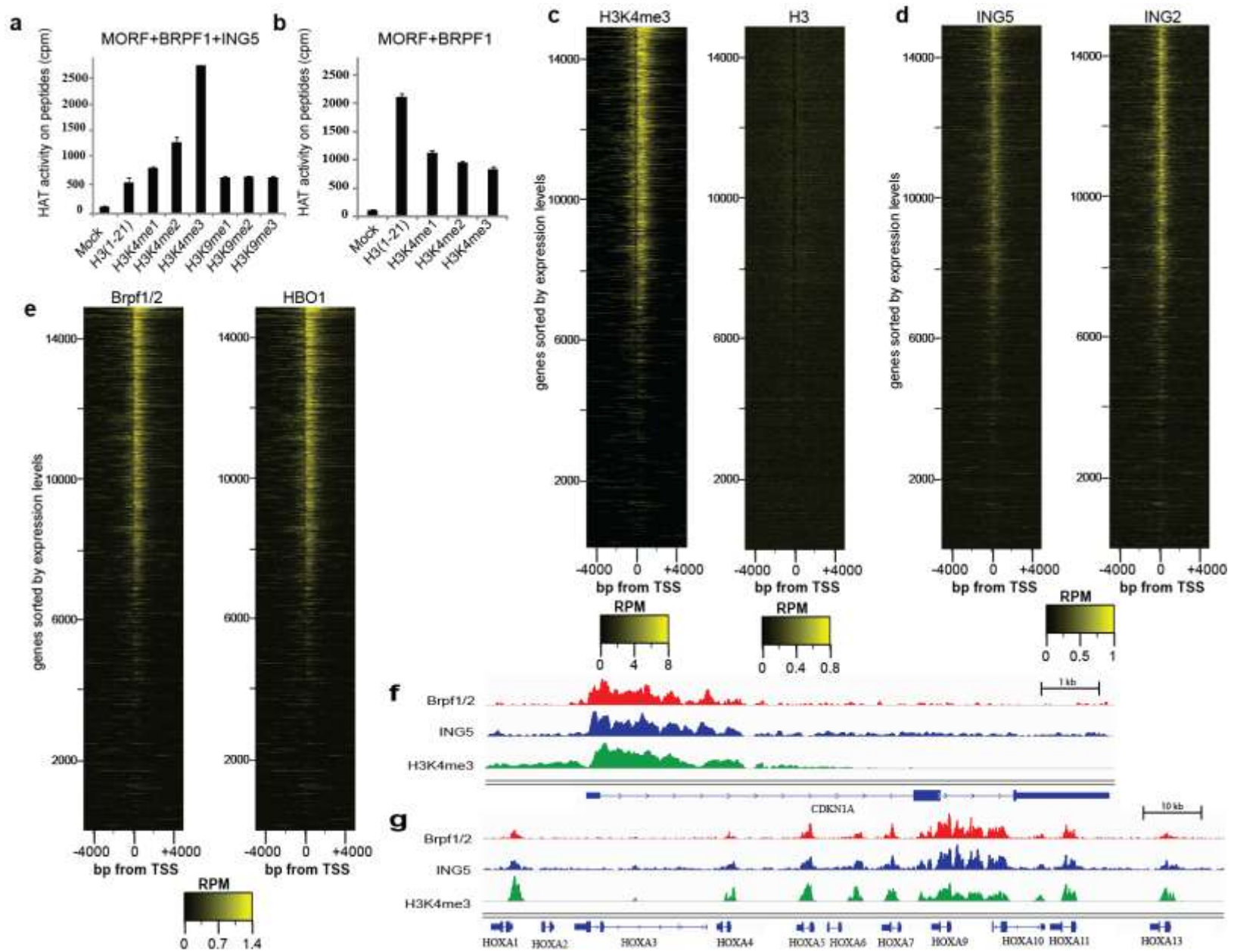


Figure 4-3. BRPF1 localizes to H3K4me3 enriched regions through its association with ING5.

(a-b) ING5 directs the binding of the entire MORF complex towards H3K4me3 *in vitro*. Complexes +/- ING5 were purified from SF9 cells and used in HAT assays on diverse modified histone peptides. Values are based on two independent experiments with standard error. **(c to e)** ING5, ING2, BRPF1/2 and HBO1 co-localize with H3K4me3 near TSS of genes. Heat maps of each protein ChIP-seq signal on +/- 5kb surrounding TSS of genes are shown. Genes were sorted by gene expression level (see Methods) from high (top) to low (bottom) and the signals were corrected over reads per million (RPM). **(c)** Enrichment of H3K4me3 signal compared to H3 signal. **(d)** ING5, ING2, and **(e)** BRPF1/2, HBO1 are bound at H3K4me3 enriched regions near TSS of genes. **(f-g)** BRPF1/2 and ING5 colocalize at the p21/CDKN1A gene and the HOXA cluster. The different signals for each protein are shown to illustrate their binding at H3K4me3 enriched region near the p21/CDKN1A TSS **(f)** and each TSS of the HOXA cluster **(g)**.

4.4.4. Two distinct forms of HBO1 complexes exist with different scaffold subunits

We had previously shown that the ING5 protein is associated with two different MYST acetyltransferase complexes in HeLa cells, the HBO1-JADE1/2/3 and MOZ/MORF-BRPF1/2/3 complexes (Fig. 1a) (Doyon et al. 2006). A recent study in K562 cells argued that the BRPF2 scaffold protein could be associated with the HBO1 HAT (Mishima et al. 2011). To investigate this possible distinct interaction, we purified BRPF1 from stably transduced HeLa cells (Fig. 4a). Mass spectrometry and Western blot analyses confirmed association of MOZ/MORF HATs, hEaf6 and ING5, as we previously reported (Fig. 4a and b) (Doyon et al. 2006; Ullah et al. 2008). Significant signals were also obtained for HBO1. Thus, both MOZ/MORF and HBO1 catalytic HAT subunits can be associated with BRPF1 *in vivo*. In addition, ING4 was also identified as a BRPF1-associated factor, in contrast to our previous results that suggested its restriction to HBO1-JADE1/2/3 complexes (Doyon et al. 2006). Moreover, using transduced HBO1 as bait for purification from HeLa cells, we were able to identify by western and mass spec both JADE1L and BRPF2/3 as interacting partners (Fig. 4c; data not shown). We also confirmed the interaction in 293T cells where immunoprecipitation of Flag-HBO1 brings down endogenous BRPF1/2 proteins (Supplementary Fig. 5). These results demonstrate the presence of a new MYST-ING acetyltransferase complex within HeLa cells, formed by HBO1 and a BRPF paralog.

4.4.5. BRPF1-MYST complexes acetylate only histone H3 in chromatin

We used the purified BRPF1 fraction for *in vitro* HAT assays and we observed a striking specificity for histone H3 in chromatin, while both H3 and H4 are targeted as free histones (Fig. 4d). While we previously found MOZ/MORF-BRPF-ING5 complexes to have similar specificity (Doyon et al. 2006; Ullah et al. 2008), the presence of HBO1 in the fraction suggested otherwise. Indeed, HBO1 is known to acetylate mainly the N-terminal tail of histone H4 on chromatin, both *in vitro* and *in vivo*, specifically on lysine 5, 8 and 12 (Doyon et al. 2006). We then used CHIP assays to determine whether the presence of additional BRPF1 protein in the transduced HeLa cells influences the level of H3 and H4 acetylation at specific loci *in vivo*. When compared with cells transduced with an empty vector, the Flag-BRPF1 cell line shows a significant increase of H3 acetylation, on both lysine 14 and 23, at the p21 TSS (Fig. 4e and f). Moreover, a slight increase can also be observed 2kb downstream from the p21 TSS where the BRPF1 complex is still likely bound (see Fig. 3f). We also noticed some increase of H4 acetylation at the same loci but the effect seems much smaller and could be indirect/subsequent to H3 acetylation (Fig. 4g). Indeed, H3K14ac was recently shown to inhibit demethylation of H3K4 (Maltby et al. 2012a), which would favour recruitment of other HATs through increased H3K4me3. Importantly, no change in H3 and H4 acetylation levels was observed at an intergenic control locus (Fig. 4e-g). These data indicate that purified BRPF1 complexes target mainly H3K14 and H3K23 in chromatin, *in vitro* and *in vivo*, despite the fact that a previously characterized H4-specific MYST enzyme, HBO1, is present in the fraction. However, HBO1 occupancy measured by CHIP on the same regions did not show any increase in BRPF1 transduced cells compared to the control cell line (Fig. 4h). This indicates that, while increased BRPF1 level leads to higher H3 acetylation on p21, it does not seem to target additional HBO1 protein.

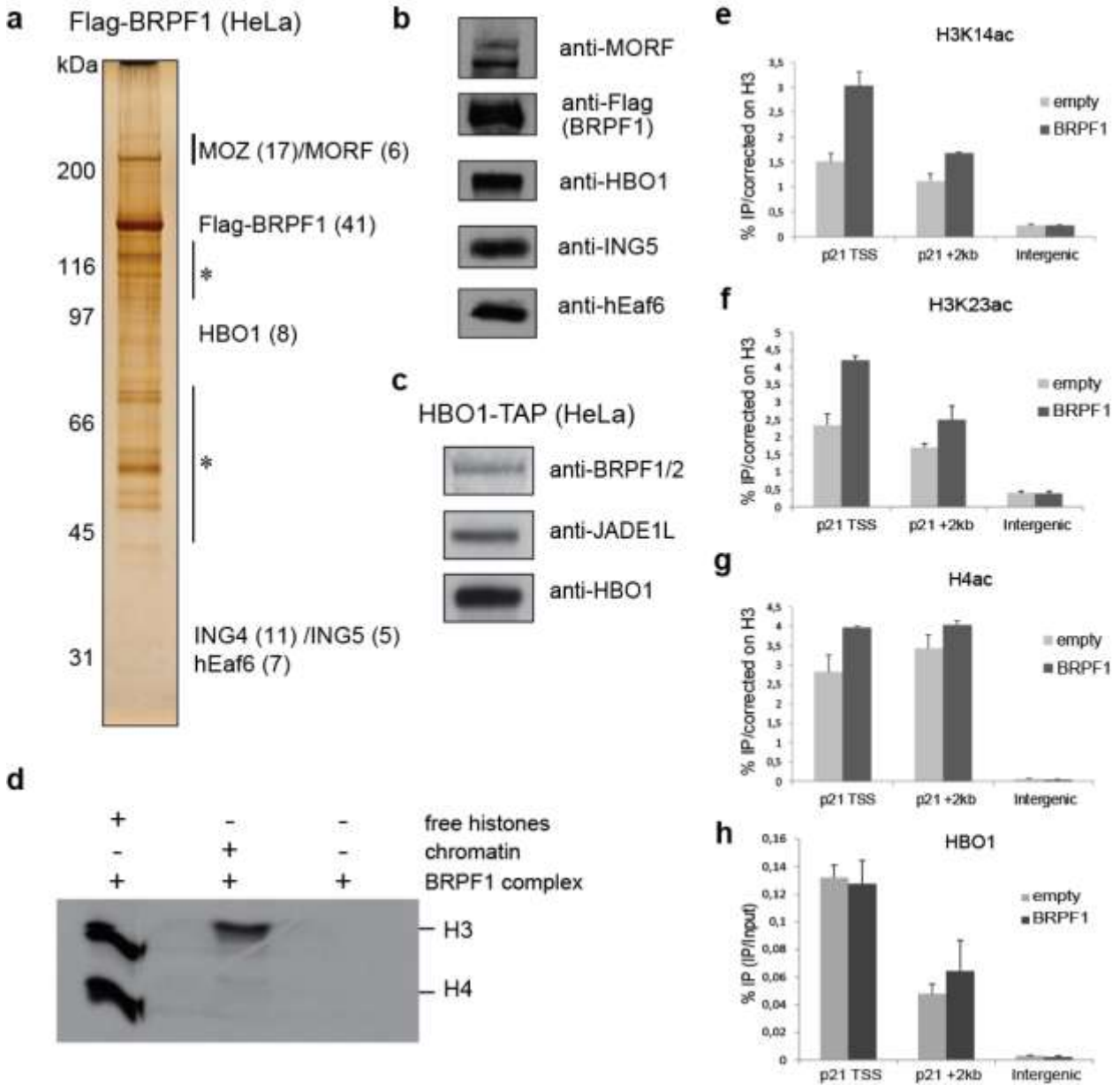


Figure 4-4. BRPF1 scaffold subunit co-purifies with both MOZ/MORF and HBO1 catalytic subunits.

(a) A transduced stable HeLa cell line expressing 3xFlag-BRPF1 was used to purify associated proteins by anti-Flag IP/elution. Immunopurified proteins were analysed on gel by silver staining. Non-specific contaminants are shown by the (*). (b) Purified complex in a was analyzed by Western blot with indicated antibodies. The two bands appearing with the MORF antibody are both MOZ and MORF, as the MORF antibody recognizes both proteins(Ullah et al. 2008). (c) Western blot analysis of a tandem affinity purification (TAP) from a transduced HeLa cell line stably expressing HA-HBO1-TAP (protein A and calmodulin-binding protein). (d) BRPF1 complexes acetylate histone H3 on chromatin in vitro. HAT assays were performed on free histones or native chromatin with the purified BRPF1 fraction in a. Acetylated histones were separated by SDS-PAGE and revealed by fluorography. (e-g) BRPF1 complexes acetylate histone H3 on chromatin in vivo.

Chromatin immunoprecipitation analysis of H3K14/K23 and H4 acetylation in transduced HeLa cells stably expressing BRPF1. Acetylation levels corrected for nucleosome occupancy (total H3 signal) were measured at the p21 TSS, 2kb downstream and at an intergenic locus. BRPF1 increases significantly H3K14ac and H3K23ac at the p21 TSS while showing no effect at intergenic locus. (h) HBO1 occupancy on p21 gene does not change upon increased BRPF1 expression. ChIP analysis of HBO1 in BRPF1 and control transduced cell lines. All ChIP values are based on two independent experiments with standard error.

4.4.6. The scaffold subunits of the MYST-ING complexes direct histone tail specificity during acetylation of chromatin

Since no H4 acetylation was observed *in vitro* with the purified BRPF1 complexes containing either MOZ, MORF or HBO1 catalytic subunits, we sought to determine the histone lysine residues targeted by the newly identified HBO1-BRPF1-ING5-hEaf6 complex. For this purpose, we overexpressed in 293T cells the different combinations of the desired subunits and purified the resulting complexes using the Flag-tagged scaffold subunit (Fig. 5a). These overexpressed complexes were then used in HAT assays on both free histones and chromatin. As expected, the BRPF1-MOZ complex acetylates H3 on chromatin whereas the JADE1-HBO1 complex acetylates H4 (Fig. 5b). This is in sharp contrast to the lack of histone specificity when using free histones as substrate, where histones H3/H4 are acetylated equally by both complexes. Remarkably, when the HBO1 acetyltransferase is associated with BRPF1, acetylation of chromatin by this complex is restricted to histone H3 (Fig. 5b). To more precisely identify the lysine residues acetylated on H3, we performed HAT assays with unlabelled acetyl-CoA followed by Western blot analysis with specific histone mark antibodies. We observed an increase in H3K23ac and H3K14ac with the HBO1-BRPF1 complex compared to the mock fraction while no change in H3K9ac was detected (Fig. 5c). This H3K14/23 specificity was also observed using peptides in HAT assays (Supplementary Fig.6). These results indicate that HBO1 can acetylate both H3 and H4 lysine residues on chromatin, but that its specificity is determined by the associated scaffold subunit. While HBO1-JADE-ING-hEaf6 targets H4K5/8/12 on chromatin, HBO1-BRPF-ING-hEaf6 targets H3K14/23.

Since JADE and BRPF PZP domains behave similarly in histone/chromatin binding functions (Fig. 1 and 2, (Saksouk et al. 2009; Avvakumov et al. 2012)), and that their

domain II associate with the same set of ING proteins (ING4/5), the drastic change of nucleosomal histone specificity put upon the MYST acetyltransferase must originate from other parts of these scaffold proteins. Obvious candidate features are present on BRPF proteins since they also contain a Kac-binding bromodomain and a H3K36me3-binding PWWP domain at their C-terminus (Fig. 1b) (Vezzoli et al. 2010; Filippakopoulos et al. 2012). We constructed C-terminal deletions of the PWWP domain and the bromodomain in BRPF1. We purified HBO1 complexes containing either WT BRPF1 or BRPF1 lacking these domains (Fig. 5d) and used them in HAT assays (Fig. 5e). Neither the deletion of the PWWP domain nor the deletion of the bromodomain of BRPF1 affected the specificity of HBO1 for histone H3 on chromatin substrate. These data indicate that the two histone mark-reader modules at the C-terminus of BRPF1 are not involved in selecting the histone tail specificity of the HAT complex.

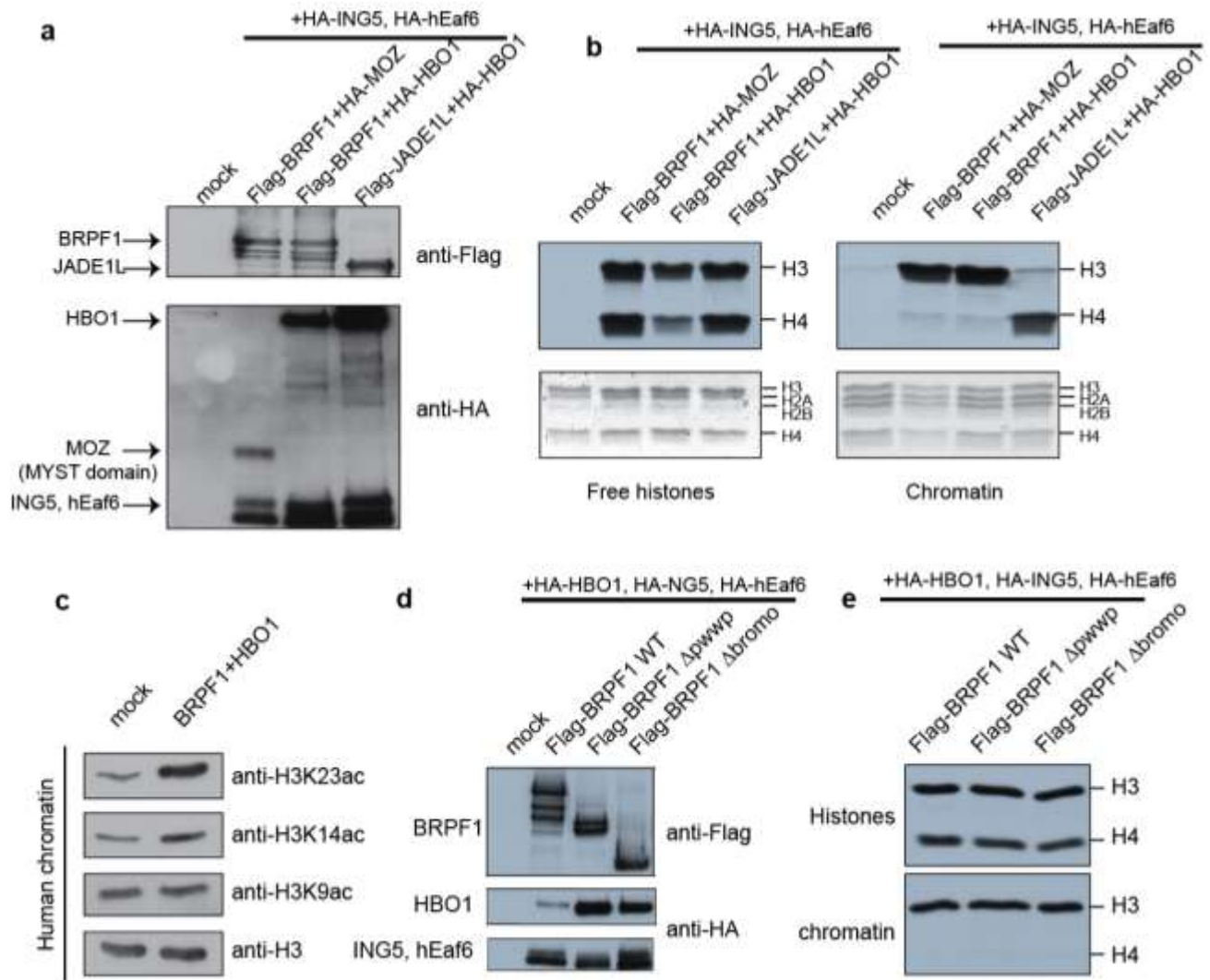


Figure 4-5. Association of different scaffold subunits with the HBO1 HAT is responsible for switching its histone acetylation specificity between H4 and H3.

(a) Purification of the MOZ-BRPF1, HBO1-BRPF1 and HBO1-JADE1L complexes. 293T cells were transfected with flagged scaffold subunits plasmids (BRPF1 and JADE1L) while other cotransfected subunits were HA tagged. Mock control was cotransfected with Flag-empty and HA-empty plasmids. Complexes were purified from WCE by Flag-IP and eluted with 3xFlag peptides. (b) The scaffold subunit changes chromatin acetylation specificity. The purified complexes in a were used in HAT assays on both chromatin and free histones. Acetylated histones were separated by SDS-PAGE and revealed by fluorography. Coomassie stained gels show equivalent amounts of histones between samples. (c) HBO1-BRPF1 complex acetylates H3K14 and H3K23. HAT assays with the purified HBO1-BRPF1 complex were performed on chromatin followed by WB analysis of different histone marks. (d) Purification of various deletions of Brpf1. Cotransfected 293T cells with either WT, Δ Bromo or Δ PWWP Flag-BRPF1 plasmids, combined with HA-HBO1, HA-ING5 and HA-hEaf6 plasmids were used for Flag-IP purification and complexes were analyzed by WB with indicated antibodies. (e) PWWP domain and Bromodomain of

BRPF1 are not essential for acetylation specificity. The purified complexes in d were used in HAT assays on both chromatin and free histones. The amount of complex used for HAT assays was normalised to free histone activity. Acetylated histones were separated by SDS-PAGE and revealed by fluorography.

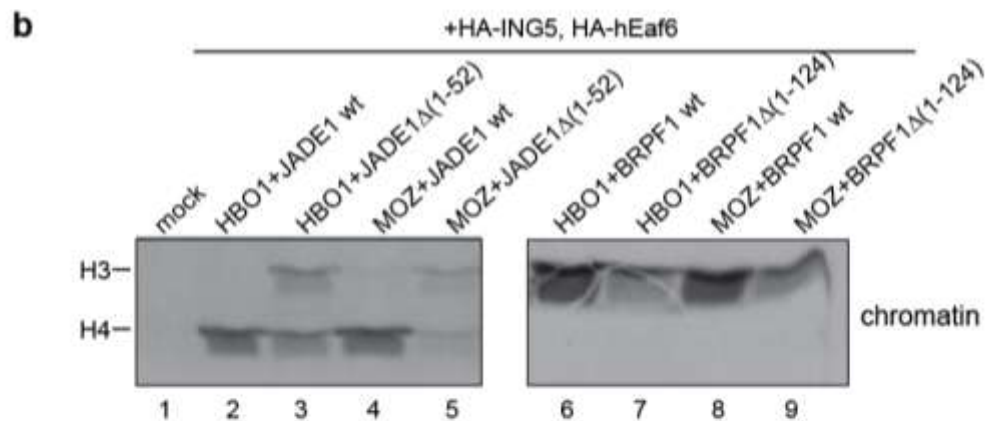
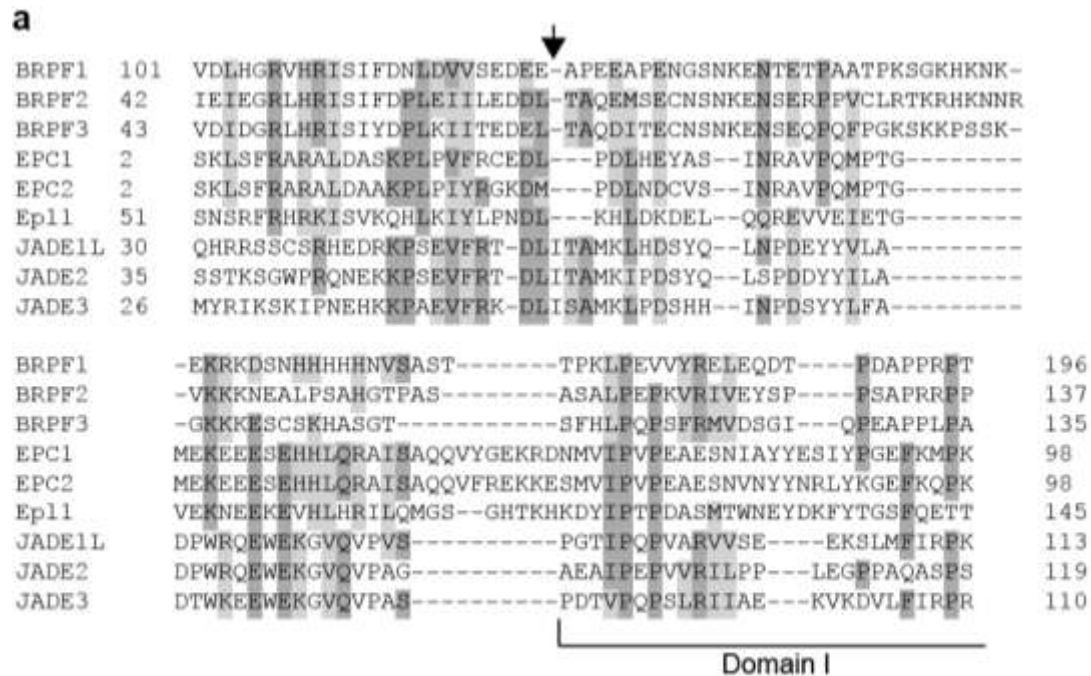
4.4.7. A short N-terminal region within scaffold subunits directs which histone tail is acetylated by MYST complexes on chromatin

When comparing sequence homologies between scaffold subunits of human MYST-ING HAT complexes, it became apparent that some features were conserved at the N-terminus region, just before the domain I, responsible for binding the MYST subunit (Fig. 6a). This region is considered part of the larger EPcA domain in enhancer of polycomb proteins, scaffold subunits of the NuA4/Tip60 HAT complex (Fig. 1a and b). We have previously shown that this small region at the beginning of EPcA is important for chromatin binding and nucleosomal HAT activity of the yeast NuA4 complex (Selleck et al. 2005; Chittuluru et al. 2011). To investigate whether the corresponding N-terminal region in BRPF1 or JADE1 scaffold subunits is implicated in nucleosomal HAT activity and, perhaps, histone tail selection, we produced N-terminal deletions that removed the first 20 amino-acids of the EPcA-related region. The WT or truncated JADE1 and BRPF1 scaffold subunits were purified as tetrameric complexes from co-transfections with either HBO1 or MOZ as catalytic subunit. HAT assays with the purified complexes were performed on chromatin (Fig. 6b). Strikingly, association of MOZ with JADE1 instead of BRPF1 also shifts its histone tail specificity from H3 to H4, as we have seen for HBO1 (compare lanes 4 and 8, 2 and 6). Since MOZ is mostly known for acetylating histone H3, this result clearly supports our previous conclusion about HBO1 and expands it to other MYST HATs, i.e. that it is the scaffold subunit which is responsible for directing the histone tail specificity during acetylation of chromatin, not the acetyltransferase subunit.

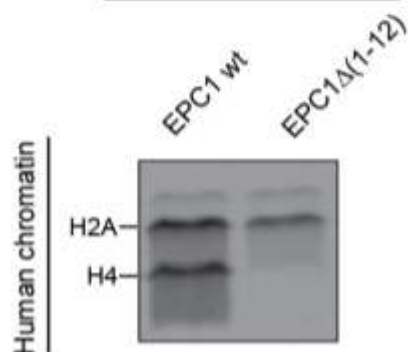
When associated to HBO1, removal of the small N-terminal EPcA-related region of JADE1 protein not only resulted in a loss of H4 acetylation on chromatin but also a clear appearance of H3 acetylation (Fig. 6b lanes 2 and 3). This was also the case when truncated JADE1 was associated to MOZ (Fig. 6b lanes 4 and 5). These results not only indicate that this region of JADE1 is important for acetylation of chromatin but also for histone tail selection. However, removal of the same region in BRPF1, while leading again to a loss of

HAT activity on chromatin for both HBO1 and MOZ, did not seem to significantly change histone tail specificity, as only H3 acetylation could be observed (Fig. 6b, compare lanes 6 and 7, 8 and 9). Yet, repeat of the assay with equivalent amounts of nucleosomal HAT activity between wild type and mutant complexes showed a significant loss of histone tail specificity as H4 acetylation is now detected in the mutants (Supplementary Fig. 7). Thus, deletion of the EPcA-related region leads to reduced nucleosomal HAT activity, as we have shown for yeast Epl1 in NuA4 (Selleck et al. 2005; Chittuluru et al. 2011). But our results also indicate that the same region of JADE1 is indeed responsible for selecting the H4 tail versus H3 for acetylation on chromatin. Since the loss of tail specificity detected with the BRPF1 mutant is more subtle, it is possible that H3 tail acetylation is the default target driven by the PZP domain in JADE and BRPF proteins.

To further investigate the molecular mechanisms of histone tail selectivity, we analyzed other MYST-ING HAT complexes that contain scaffold subunits naturally lacking a PZP domain. We purified human Tip60-EPC1-ING3-hEaf6 complex from co-transfected cells and recombinant yeast piccolo NuA4 complex from bacteria. Both these complexes acetylate selectively histone H4 and H2A tails on chromatin substrates (Fig. 6c and d) while they can target H3 in free histones (Boudreault et al. 2003; Doyon et al. 2004). Removal of only the first 12 amino acids of human EPC1 and its EPcA domain completely abolishes acetylation of histone H4 tail by Tip60 on chromatin (Fig. 6c). In a clear contrast, acetylation of histone H2A tail is preserved. Similar results were obtained with yeast piccolo NuA4, as a complex containing the equivalent deletion of the yeast scaffold protein Epl1 also lost its activity towards nucleosomal histone H4 tail but retained its activity towards H2A (Fig. 6d). Thus, deletion of the first portion of the EPcA-related domain resulted in loss of H4 acetylation in Tip60/EPC1, NuA4/Epl1, JADE1/MOZ and JADE1/HBO1 complexes, supporting a role for this domain in orienting the MYST HAT to acetylate the H4 tail in chromatin. However, since there was no loss of H2A tail-specific acetylation by Tip60 and NuA4, in comparison to gain of H3 tail acetylation in the case of JADE1, these results suggest that other histone tail specificity determinants are at play, likely within the same region of the scaffold subunits. Altogether, these data indicate that scaffold subunits in MYST acetyltransferase complexes are not only essential to enable acetylation of chromatin but are also required to direct which histone tail gets acetylated.



c +HA-ING3, HA-hEaf6, HA-Tip60



d + rec. Yng2, rec. Esa1

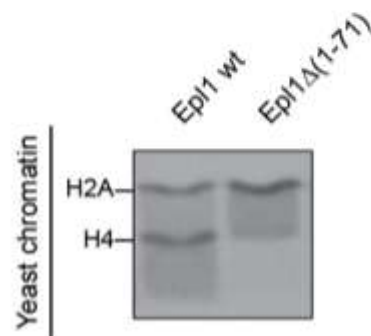


Figure 4-6. A small N-terminal domain in the scaffold subunits of MYST-ING complexes is responsible for directing specific histone tail acetylation.

(a) Sequence alignment of scaffold subunits of MYST-ING complexes with the N-terminal region of the EPcA domain found in enhancer of polycomb proteins (EPC1/2, Epl1). An arrow indicates the location of the N-terminal truncation in BRPF1 and JADE1 mutants. Domain I is the region of association with the MYST HAT. (b) Deletion of the N-term part of scaffold subunits BRPF1 and JADE1L alters chromatin acetylation specificity. 293T cells were cotransfected with the indicated expression plasmids, with HA-tagged catalytic subunits and flag-tagged scaffold subunits. HA-ING5 and HA-hEAF6 expression plasmids were also cotransfected for each purification. Flag IPs were performed on WCE and were eluted with 3xFlag peptides. Purified complexes were used in HAT assays and acetylated histones were separated by SDS-PAGE and revealed by fluorography. The complexes were normalised to the same HAT activity on free histones (by liquid assays). (c) Deletion of the N-term part of scaffold subunit EPC1 also modifies chromatin acetylation specificity. EPC1 WT and Δ 1-12 complexes were purified and used for HAT assays by co-expressing Flag-EPC1, HA-ING3, HA-hEaf6 and HA-Tip60. (d) The N-term domain of the yeast homolog Epl1 acts similarly in directing histone specificity. Recombinant yeast piccolo NuA4 complexes with WT or Δ 1-71 Epl1 were used for HAT assays on yeast chromatin and acetylated histones were treated as in a.

4.5. Discussion

Posttranslational modifications of histone residues can directly alter chromatin structure by modulating the interactions between histones and DNA. They can also serve as docking platforms for the binding of chromatin-associated proteins and thus in activating nuclear signalling pathways (Musselman et al. 2012a). A tight regulation of the deposited modifications and of the related enzymes is thus necessary to ensure proper chromatin dynamics. The MYST family of acetyltransferases assemble in different multiprotein complexes. Several subunits of these complexes contain such histone recognition motifs (Avvakumov and Cote 2007b; Avvakumov et al. 2012). In this study, we dissected the binding properties of the PZP domain located in the BRPF1 protein, a scaffold subunit of MOZ/MORF HAT complexes. We found that, as for JADE1 and BRPF2 PZP domains (Saksouk et al. 2009; Qin et al. 2011; Avvakumov et al. 2012), the first PHD finger of BRPF1 has strong affinity for histone H3 N-terminal domain, but only when H3K4 is not methylated. Interestingly, PHD1 acts dominantly over PHD2 within the PZP in blocking interaction to methylated forms of H3K4 (Fig. 1). Nevertheless, both PHD1 and PHD2 are required for MOZ-BRPF1-ING5-hEaf6 complex to bind histone H3 in vivo and acetylate chromatin in vitro (Fig. 2). Thus, although PHD2 does not show any structured binding to histone peptides in vitro, it is still required for proper binding of the BRPF1 complexes to chromatin. This is reminiscent of JADE1 PHD2 finger which is also essential for binding

chromatin *in vivo* and for the tumor suppressor activity of the HBO1 complex (Saksouk et al. 2009). However, our results with BRPF1 PHD fingers suggest that they act together as a single functional module, the PZP domain, to bind chromatin and allow its acetylation by the MYST HAT. This is supported by similar results obtained when only the Zn knuckle region between PHD1 and PHD2 is deleted (data not shown). Interestingly, it was recently suggested that BRPF2 PHD2 finger could in fact bind DNA (Liu et al. 2012c). Our NMR data with dNMPs and BRPF1 PHD2 also support this model (Supplementary Fig. 1e). Thus, within the PZP domain, PHD2 could assist PHD1 by allowing binding to nucleosomal DNA while PHD1 locks in histone H3 N-terminal domain.

As multiple chromatin binding domains are found within the different subunits of MYST-ING HAT complexes, further study is still required to understand the interplay that exists between them. We have shown that the ING5 PHD domain directs binding of the associated complexes to H3K4me3-rich regions and stimulates acetylation, both *in vitro* and *in vivo* (Fig. 3 and Fig. 4). Since both MOZ and BRPF1 have been linked to HOX gene activation (Laue et al. 2008; Voss et al. 2009; Qiu et al. 2012), it is thus very likely that their transcriptional regulation occurs via their binding to the TSS of these genes, which are highly enriched in H3K4me3 (Fig. 3g). Moreover, in the absence of ING5, we clearly demonstrate that the PZP domain binding features inhibited the acetylation on H3K4 methylated peptides (Fig. 3b). Thus, the PHD of the ING5 subunit prevails over the PZP domain of BRPF1, redirecting the binding of the complex to H3K4me3-containing chromatin. Nevertheless, even when ING5 is present, the PZP domain is required for binding to chromatin and acetylation. It is possible that BRPF-ING HAT complexes target asymmetric nucleosomes in which only one H3 tail is methylated on Lys4. These complexes may also favour spreading of the H3K4 methylation mark by simultaneously binding a methylated nucleosome through ING5 and an adjacent unmethylated one through the PZP, leading to acetylation of H3K14, which stimulates methylation of H3K4 (Nakanishi et al. 2008; Maltby et al. 2012a). The MOZ/MORF HATs found associated with BRPF1 also contain a tandem PHD domain that has recently been shown to bind unmodified H3R2 and acetylated H3K14 (Ali et al. 2012; Qiu et al. 2012). It will be interesting to determine how the five PHD fingers found in different subunits of the

MOZ/MORF-BRPF1-ING5-hEaf6 complex functionally interact with each other and other histone reader modules during binding to chromatin.

Some apparent contradictions are present in the literature regarding the HBO1 acetyltransferase. We and others have shown that the HBO1 enzyme is purified with JADE scaffold proteins and is responsible for histone H4 tail acetylation (Doyon et al. 2006; Iizuka et al. 2006; Foy et al. 2008; Iizuka et al. 2008; Miotto and Struhl 2010). We have even showed that HBO1 siRNA-mediated knock down in HeLa cells lead to a global loss of H4 acetylation on lysines 5, 8 and 12, matching *in vitro* specificity on chromatin and arguing that HBO1 was the main H4-specific HAT in mammals (Doyon et al. 2006). On the other hand, it was later shown that HBO1 gene knock out in mouse embryos leads instead to a loss of bulk H3K14ac in primary embryonic fibroblasts at E9.5, while H4 acetylation persisted (Kueh et al. 2011). In addition, a HBO1-BRPF2 complex was reported in K562 leukemic cells and shown to target global H3K14 acetylation and erythroid regulators (Mishima et al. 2011). These contradicting results are quite adequately explained in the present study with the finding that HBO1-JADE and HBO1-BRPF HAT complexes co-exist within HeLa cells (Fig. 4). Moreover, this differential association to distinct scaffold subunits is responsible for switching HBO1 specificity on chromatin toward different histone tails (Fig. 5). HBO1-JADE1 complex targets mainly H4 residues, whereas the HBO1-BRPF1 complex acetylates only H3 in the context of chromatin. The varying protein expression levels between different tissues and/or during different developmental stages thus allow for fine tuned regulation, leading to differential patterns of acetylated histones across the genome. Such functionally important tissue-specific variability of paralog subunits in chromatin regulators has been well documented for the BAF(SWI/SNF) remodelling complex (Hargreaves and Crabtree 2011). It is important to point out that HBO1 is nevertheless confirmed as a major mammalian HAT since its depletion leads to global loss of histone acetylation, on H3 in mouse erythroblasts/embryonic fibroblasts or on H4 in HeLa cells (Doyon et al. 2006; Kueh et al. 2011; Mishima et al. 2011). It will be very interesting to determine what is responsible for bulk H4 acetylation in *Hbo1*^{-/-} MEFs (Kueh et al. 2011). Is it Tip60? Is it another MYST HAT now associated with a JADE protein?

We have identified a short EPcA-related N-terminal domain in BRPF1 and JADE1 as the region responsible for histone tail specificity of the associated MYST acetyltransferase on chromatin substrates (Fig. 6 and 7). Interestingly, truncation of this domain in human EPC1 and yeast Epl1 protein cripples Tip60/NuA4 ability to acetylate nucleosomal H4 but histone H2A acetylation persists. This basic region of Epl1 was recently shown in cross-linking experiments to bind histone H2A N-terminal tail in nucleosomes (Huang and Tan 2013). Thus, it is tempting to speculate that this binding to H2A is orienting the NuA4 complex on the nucleosome to target the H4 tail for acetylation. The corresponding regions in BRPF and JADE proteins would bind nucleosomes in distinct manners, leading to different histone tail selection for acetylation. The residual acetylation of H3 tail detected in BRPF1 and JADE1 truncations may be driven by the H3 binding function of the PZP domain and/or the ING subunit. Indeed, we have shown that H3K4me3-binding ING4/5 subunits favour acetylation of histone H3K14 even from within the HBO1-JADE1 complex (Hung et al. 2009; Saksouk et al. 2009). It is important to point out that ING4/5 in this case allows H3K14 acetylation on the top of the main H4 acetylation performed by HBO1-JADE1, not a complete switch of histone tail specificity as demonstrated here between HBO1-JADE1 and HBO1-BRPF1 complexes.

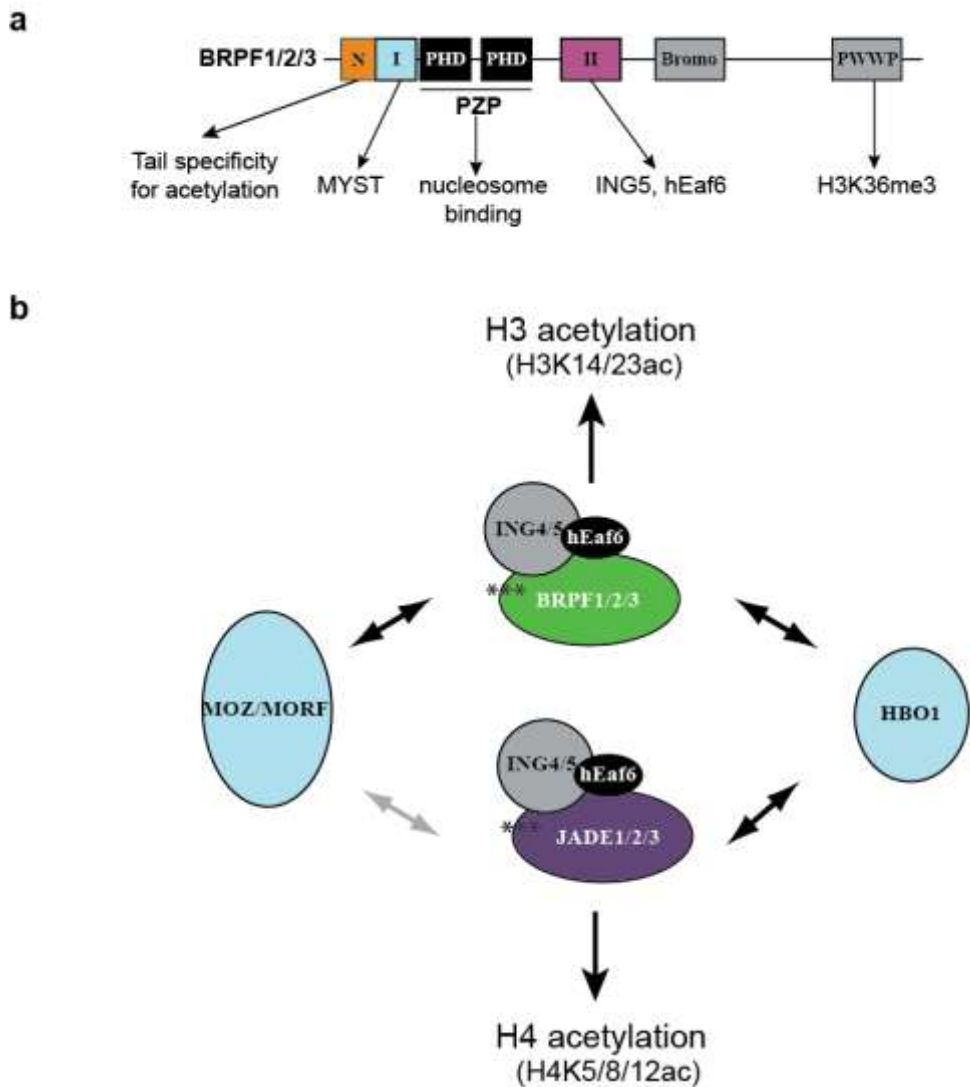


Figure 4-7. Model for MYST acetyltransferases assembly in alternate complexes leading to different histone tail specificities.

(a) Schematic representation of protein domains in BRPF paralogs and their demonstrated specific interactions/roles. (b) The HBO1 and MOZ/MORF catalytic subunits can be associated to different scaffold proteins, leading to a switch in histone tail specificity for acetylation of chromatin substrates. Thus, protein complexes associated with HAT proteins not only enable them to acetylate chromatin substrates but also select which histone tail is targeted, a specificity previously thought to reside in the acetyltransferase itself. The arrow between MOZ/MORF and JADE1/2/3 is grey since this interaction has only been reported in co-transfection experiments.

It is well established that acetylation neutralizes the charge of lysine residues to modulate the interactions with nucleosomal DNA and neighbouring nucleosomes, regulating higher order chromatin structure (Tse et al. 1998). Indeed, H3 acetylation shows

distinctive effects on modulating the tertiary structure compared to H2A or H4 acetylation (Siino et al. 2003; Wang and Hayes 2008), underlying the importance of specific histone acetylation in regulating different cellular processes. H3 acetylation essentially appears to affect DNA accessibility in individual nucleosomes while H4 acetylation has more long-range effects on chromatin compaction (Wang and Hayes 2008). Moreover, acetylated lysines on histones H3 and H4 can recruit distinct nuclear effector proteins, such as transcriptional co-activators like Rsc4 by H3K14ac, TRIM24 by H3K23ac and Brd2 by H4ac (Agalioti et al. 2002; Kasten et al. 2004; Agricola et al. 2006; Tsai et al. 2010; Draker et al. 2012). Such differential recruitment of specific bromodomain-containing proteins could thus help regulate the expression level of specific genes (Filippakopoulos et al. 2012). It remains to be determined how the specific di-acetylation of H3K14/23 by BRPF1-MYST complexes is interpreted compared to the different combinations deposited on H3 by PCAF/GCN5 and CBP/p300.

In conclusion, this study uncovers a new crucial role of factors associated with HAT proteins in multisubunit complexes. We and others have previously demonstrated that complex assembly is required to enable HAT enzymes to acetylate their target in native chromatin substrates (Carrozza et al. 2003). We now show that scaffold subunits associated with MYST-family HATs not only allow chromatin binding and acetylation but also select which histone tail becomes acetylated. Up until now, histone tail specificity has been thought to reside in the acetyltransferase protein. The alternate association of the HBO1 catalytic subunit with BRPF and JADE proteins induces a striking shift of acetylation specificity between H3 and H4 tails. These results highlight the new role of the associated scaffold subunits within MYST-ING acetyltransferase complexes in directing the acetylation of specific histone tails. These findings add a new mechanism to the regulation of chromatin dynamics and call for caution when interpreting and comparing studies in which the function of HAT proteins is analyzed outside their physiological context.

4.6. Materials and Methods

4.6.1. Purification of MYST HAT complexes

The native BRPF1 complex was purified from a retrovirus transduced HeLa cell line expressing 3xFlag-BRPF1 from a CMV promoter (pRCF vector). Nuclear extract were prepared following standard procedure (Abmayr 1993) and immunoprecipitation (IP) with anti-Flag agarose beads (Sigma) was done before eluting with Flag peptide buffer (100 mM KCl, 20 mM HEPES pH 7.5, 20% glycerol, 0.1% Triton X-100, 400 µg/mL 3xFlag peptide, 1mM DTT, 0.1 mM ZnCl₂, 1mM PMSF). Tandem affinity purification of the native HBO1 complexes was done as previously described (Doyon et al. 2006). Purification of MYST complexes from transient transfections was performed in 293T cells. Cells were transfected near confluency with 6 µg of each plasmid (MYST, ING, BRPF/JADE/EPC, hEAF6 with the indicated tags) per 150mm plate. Cells were harvested 48h post-transfection, and whole cell extracts (WCE) were prepared followed by anti-Flag IP/elution with Flag peptide or anti-HA IP/elution with HA peptide as previously described (Saksouk et al. 2009; Avvakumov et al. 2012). Tandem mass spectrometry analysis was done after in-gel digestion with trypsin at the Taplin Mass Spectrometry Facility. Expression vectors were constructed and, when indicated, mutated following standard procedures (details are available upon request). PHD1 and PHD2 deletions correspond to amino acids 265-355 and 359-450.

4.6.2. Recombinant protein purifications and peptide pull-downs

The BRPF1 PHD1 (aa. 275-329), PHD2 (aa. 385-456) and PZP (aa. 256-543) domains were expressed in *E. coli* Rosetta pDEST15 or BL21 pGEX4T3 cells grown in LB or ¹⁵NH₄Cl minimal media supplemented with 1.5 mM ZnCl₂. After induction with IPTG (1.0 mM) for 16 hrs at 20°C, bacteria were harvested by centrifugation and lysed with lysozyme and/or by sonication. The unlabelled and ¹⁵N-labelled GST-fusion proteins were purified on glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare). The GST tag was either cleaved with PreScission protease, or kept for Western blot analysis/peptide pull-downs, in which case the GST-fusion protein was eluted off the glutathione Sepharose beads using 50 mM reduced L-glutathione (Sigma Aldrich). For NMR analysis, the proteins were concentrated

into 20 mM Tris-HCl, pH 6.8, in the presence of 150 mM NaCl, 10 mM dithiothreitol and 10% D₂O. Protein complexes purification from bacteria and SF9 cells were done as previously described (Selleck et al. 2005; Ullah et al. 2008). Peptide pull-downs with GST fusion proteins were performed as previously described using biotinylated peptides and streptavidin magnetic beads (Saksouk et al. 2009).

4.6.3. NMR Spectroscopy

NMR experiments were performed at 25°C on Varian INOVA 600 and 500 MHz spectrometers using pulse field gradients to suppress potential artifact and eliminate water signal. ¹H, ¹⁵N heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra of uniformly ¹⁵N-labeled PHD1, PHD2 and PZP (0.1-0.2 mM) were recorded as histone tail peptides (synthesized by the UCD Biophysics Core Facility), deoxyribonucleoside monophosphates (dNMPs) (a mixture of dAMP, dTMP, dCMP and dGMP, 1:1:1:1), or unlabeled PHD1 were added stepwise.

4.6.4. Fluorescence Spectroscopy

Tryptophan fluorescence measurements were carried out at 25°C on Fluoromax-3 spectrofluorometer. The samples of 1-10 μM PHD1 or PZP containing progressively increasing concentrations of histone peptides (up to 1 mM) were excited at 295 nm. Emission spectra were recorded between 305 and 405 nm with a 0.5 nm step size and a 1 s integration time and averaged over three scans. K_d values were determined by a nonlinear least-squares analysis using the equation:

$$\Delta I = \Delta I_{\max} \left(\frac{([L] + [P] + K_d) - \sqrt{([L] + [P] + K_d)^2 - 4[P][L]}}{2[P]} \right)$$

where [L] is the concentration of the peptide, [P] is the concentration of the protein, ΔI is the observed change of signal intensity, and ΔI_{max} is the difference in signal intensity of the free and fully bound states of the protein. The K_d values were averaged over three separate experiments, with error calculated as the standard deviation between the runs.

4.6.5. Antibodies and peptides

The following antibodies were used for Western blotting with the indicated dilutions: Anti-Flag M2 HRP (1/10000, Sigma), anti-HA HRP (1/1000, Roche), anti-HA.11 (Babco, 1/1000), anti-HBO1 (1/2000, abcam), anti-hEaf6 (1/1000, abcam), anti-MORF (1/1000)(Ullah et al. 2008), anti-ING5 (1/1000, Abcam), anti-H3 (1/5000, Abcam). For ChIP and ChIP-seq, the following antibodies were used: anti-H3K4me3 (Abcam), anti-H3 (Abcam), anti-H4ac (Millipore), anti-H3K14ac (Millipore), anti-H3K23ac (Millipore), anti-ING5 (Abcam), anti-HBO1 (Abcam), anti-ING2 (Epitomics), anti-MRG15 and anti-BRPF2 (Bethyl). Biotinylated histone peptides were purchased from Millipore.

4.6.6. HAT assays

Native human chromatin and free histone were purified as previously described(Utley et al. 1996). HAT assays with histone peptides (300 ng, Millipore), core histones (500 ng), or H1-depleted oligonucleosomes (500 ng) prepared from HeLa S3 cells were performed in a 15 µl reaction containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM sodium butyrate (Sigma) and 1.25 nCi ³H labelled (Perkin Elmer Life Sciences) or unlabelled acetyl-CoA (Sigma). Samples were either spotted on P81 membranes (GE Healthcare) for counting or loaded on 18% SDS-PAGE gels. For gel assays, Coomassie staining was followed by EN³HANCE (Perkin Elmer) treatment and fluorography.

4.6.7. ChIP assays

Chromatin preparation from RKO cells was done as previously described(Avvakumov et al. 2012). For immunoprecipitation of chromatin, we used 200 ug of chromatin with 1-3 ug of specific antibodies and incubated overnight at 4°C. Then, 40 µL of Protein A Dynabeads (Invitrogen) were added to each sample and incubated for 4h at 4°C. The beads were washed extensively and eluted with 1% SDS and 0.1M NaHCO₃. Cross-linked samples were reversed by heating overnight at 65°C in presence of 0.2M NaCl. Samples were then treated with RNase A and proteinase K for 2h and DNA was recovered by phenol-chloroform and ethanol precipitation. Quantitative real-time PCR corrected for primer efficiencies in their linear range were performed using SYBR green I (Roche) on a

LightCycler 480 (Roche). The error bars represent standard errors based on 2 independent experiments. The primers used for qPCR amplify the following genomic regions (build hg18): p21 TSS chr6:36,754,421-36,754,542, p21 +2kb chr6:36,756,871-36,756,972, intergenic chr12: 65,815,182-65,815,318.

4.6.8. ChIP-seq analysis

Chromatin immunoprecipitation and library preparation for sequencing were done as previously described (Avvakumov et al. 2012). Samples were sequenced by 50bp single-reads on either a Genome Analyzer platform (HBO1, BRPF1/2 and input) or a HiSeq 2000 platform (H3K4me3, H3, IgG, ING2 and ING5) (Illumina). Raw sequences were mapped using Bowtie (PMID: 19261174) on build hg18 of the human genome and deposited in the GEO database under accession number GSE47190. HBO1 and input data were previously deposited under accession number GSE33221. Uniquely mapped sequences were kept for downstream analysis. The global profiles at transcription start sites presented in supplementary Fig. 3 were produced using the UCSC genome browser genes definition and the Python package HTseq. We extended the reads to 200 bp to be in line with our sonication protocol. In the case of multiple TSS associated with the same gene, we selected the one with the highest number of H3K4me3 mapped reads within 5,000 bp around the transcription start site. For gene expression level in RKO cells, we used publicly available data from an Affymetrix U133 plus 2.0 chip (PMID: 16300372). The binning of genes by their level of expression was performed by first sorting the log₂ expression level and then subdividing genes in four equal categories (quartiles). The heatmaps presented in Fig. 3 were generated using a custom script in R (<http://www.r-project.org/>). Briefly, we computed the profile for every ChIP-seq experiment for every genes considering 5000 bp on both sides of the TSS. We took the profile around TSS and binned it at every 50 base pairs. We then generated the heatmaps using the binned values. For all the heatmaps, genes are sorted in function of their expression values in the RKO cell line with the most expressed genes at the top of the heatmap (PMID: 16300372).

4.7. Acknowledgments

We wish to thank Céline Roques for experimental help during revisions and Calcul Québec/Compute Canada for the use of their supercomputers. This research is supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-64289 to J.C. and MOP-97957 to X.J.Y.) and the National Institutes of Health (NIH; GM096863 and GM101664 to T.G.K. and GM60489 to S.T.). M.-E.L. is supported by a Fonds de Recherche du Québec–Santé studentship and J.C. is a Canada Research Chair.

4.8. Supplementary Figures

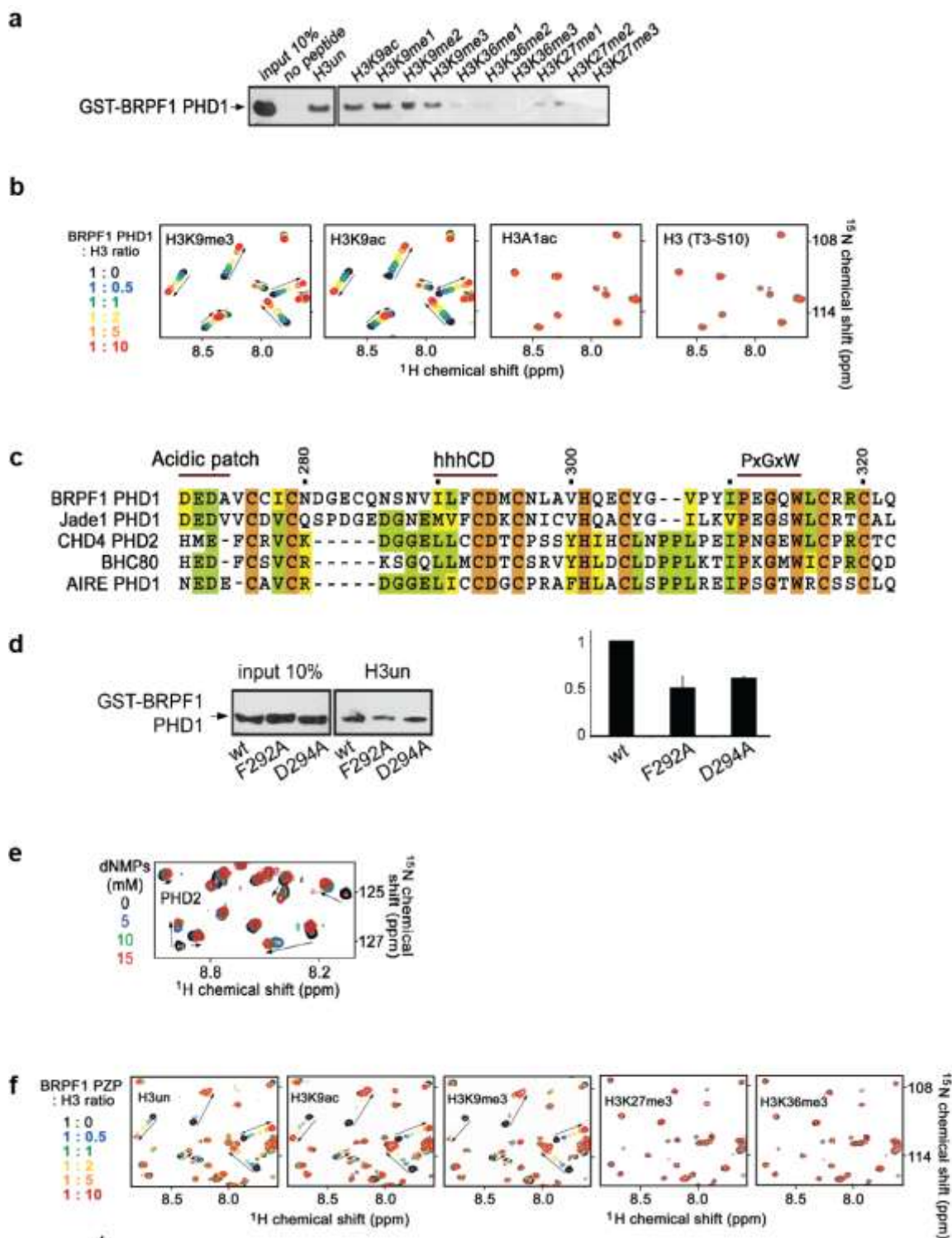


Figure S4-1. Characterization of the two PHD fingers in the PZP domain of BRPF1.

(a) Peptide pull-down assays with different biotinylated peptides and recombinant PHD1 finger fused to GST were analyzed by Western blotting with anti-GST antibody (WB: α -

GST). (b) Superimposed $^1\text{H},^{15}\text{N}$ HSQC spectra of BRPF1 PHD1, collected as indicated H3 peptides were titrated in. The spectrum is color-coded according to the protein-peptide ratio. Addition of H3 (3-10) induced no changes in the NMR spectra of PHD1, implying that this module does not bind H3 lacking the first two N-terminal residues and that the Ala1-Arg2 sequence is required for robust interaction. An lack of any significant resonance perturbations upon titrating H3A1ac indicated that the PHD1 finger is unable to bind this peptide. (c) Alignment of known H3K4me0-binding PHD domains. Amino acid conservation is shown as well as important regions for H3 tail interaction. (d) Peptide pull-down assays with unmodified H3 peptide and two point mutants of recombinant GST-PHD1 were analyzed by Western blotting with anti-GST antibody (WB: α -GST). The F292A and D294A mutations decrease the affinity with the H3 peptide. Quantification is also shown on the right. (e) Superimposed $^1\text{H},^{15}\text{N}$ HSQC spectra of BRPF1 PHD2 (0.1 mM), collected as dNMPs were titrated in. (f) Superimposed $^1\text{H},^{15}\text{N}$ HSQC spectra of BRPF1 PZP, recorded during titration of indicated H3 peptides.

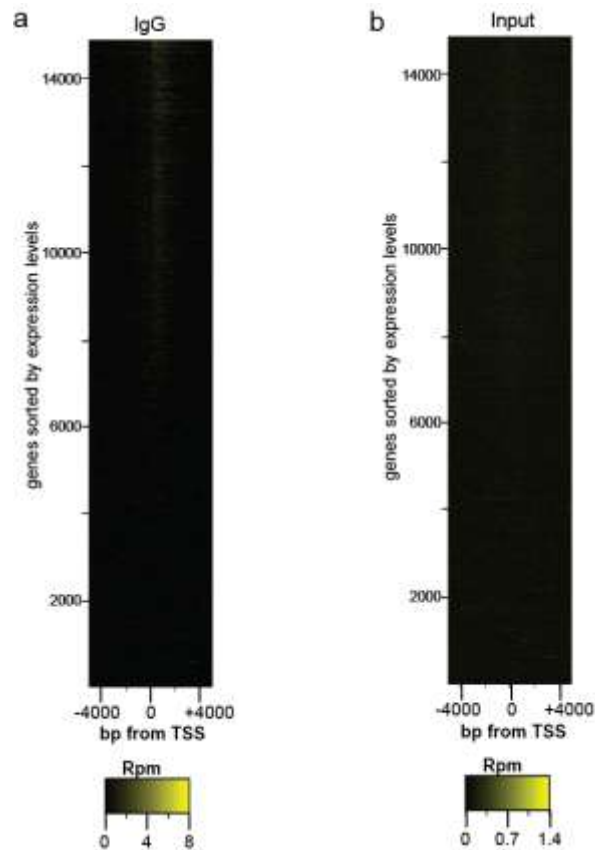


Figure S4-2. Control heatmaps for ChIP-seq signals on +/- 5kb surrounding TSS of genes are shown.

Genes were sorted by gene expression level (see Methods) from high (top) to low (bottom) and the signal were corrected over reads per million (rpm). Heat Maps of Rabbit IgG negative control (a) or input (b).genes in four equal categories (the fourth quartile includes the most highly expressed genes).

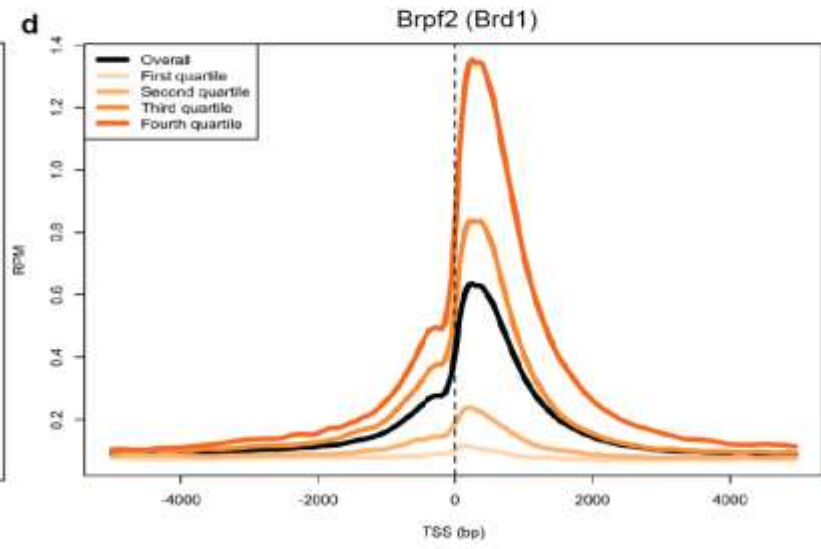
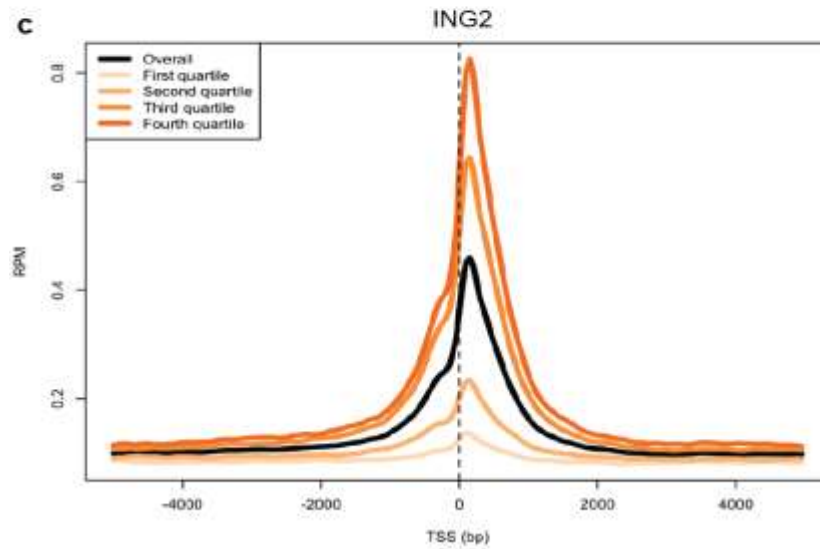
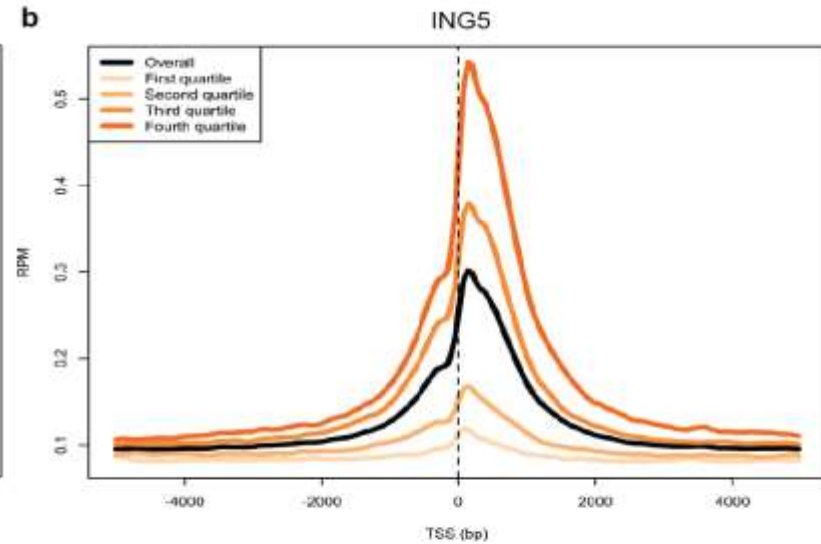
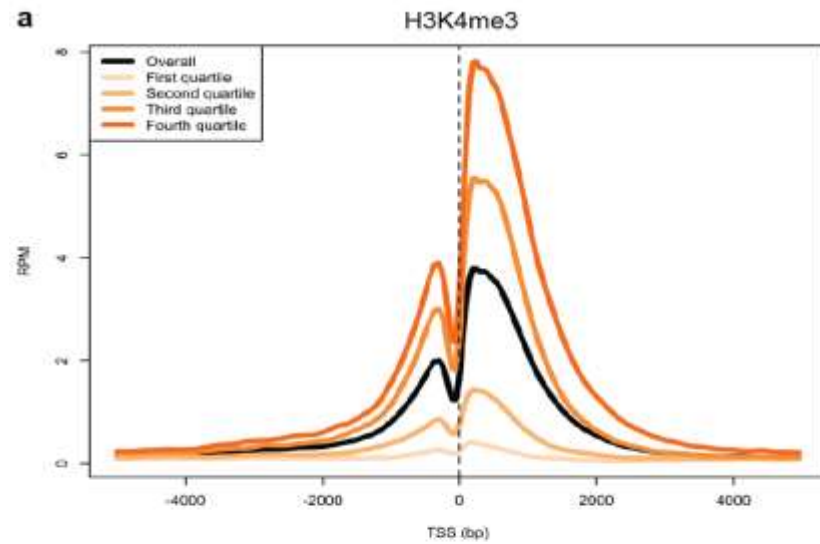


Figure S4-3. MYST subunits ChIP-seq signal intensities around the transcription start site (TSS) of genes in human RKO cells correlates globally with gene expression levels.

ChIP global profiles of (a) H3K4me3 (b) ING5 (c) ING2 and (d) BRPF1/2 were produced using UCSC genome browser gene definition and the Python package (see Methods). The binning of genes by their expression levels in RKO cells was performed by subdividing genes in four equal categories (the fourth quartile includes the most highly expressed genes).

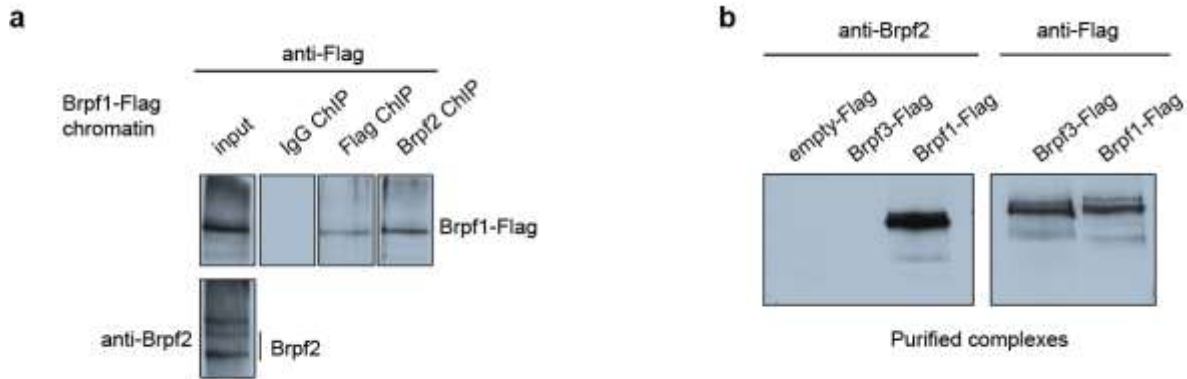


Figure S4-4. BRPF2 antibody recognizes both BRPF2 and BRPF1.

(a) Western blot on IPs (IgG, anti-Flag or anti-BRPF2) performed on chromatin fractions from K562 cells stably expressing BRPF1-Flag. (b) Western blots with anti-Brpf2 and anti-Flag on purified BRPF3 and BRPF1 native complexes from K562 cells (stably expressing BRPF3-Flag or BRPF1-Flag). An empty-Flag K562 cell line was used as a negative control.

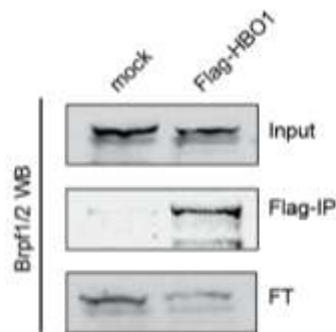
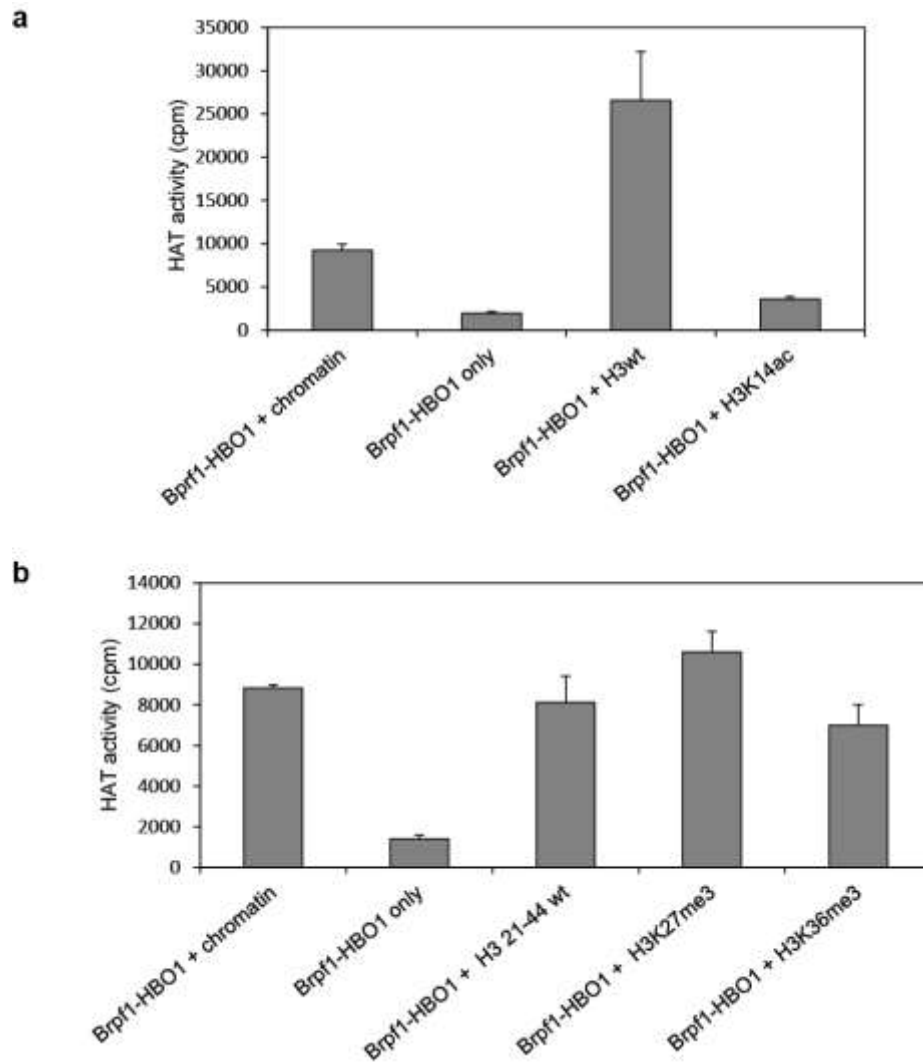


Figure S4-5. BRPF1/2 interacts with HBO1.

293T cells were transfected with the flag-HBO1 or the equivalent mock expression plasmids. Flag IPs were performed on WCE and purified proteins were loaded on SDS-PAGE for detection by WB with BRPF1/2 antibody.



FigureS 4-6. HBO1-BRPF1 complex acetylates H3K14.

HAT assays with the purified HBO1-BRPF1 complex (with ING5 and hEaf6) were performed on chromatin and on (a) H3wt(1-21) and H3K14ac or (b) H3wt(21-44), H3K27me3 and H3K26me3 histone peptides and spotted on membranes for liquid scintillation counting. Values are based on three independent experiments with standard error. Acetylation of H3K14 clearly inhibits global acetylation of the peptide while no significant change was observed with H3K27me and H3K36me3, arguing for H3K23 acetylation.

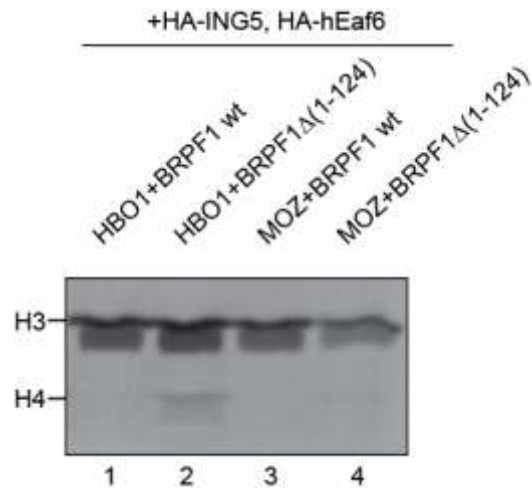


Figure S4-7. Deletion of BRPF1 N-terminus also changes the histone tail specificity of the associated acetyltransferase.

293T cells were cotransfected with the indicated expression plasmids, with HA-tagged catalytic subunits and Flag-tagged scaffold subunits. HA-ING5 and HA-hEaf6 expression plasmids were also cotransfected for each purification. Flag IPs were performed on WCE and were eluted with 3xFlag peptides. Purified complexes were used in HAT assays and acetylated histones were separated by SDS-PAGE and revealed by fluorography. In order to detect changes in acetylation specificity, in contrast to Fig. 6b, we normalized the assays by using the same level of total activity (measured by liquid assay) on chromatin rather than correcting with the activity on free histones.

Chapitre 5

Discussion

5.1. Assemblage des complexes MYST

Les protéines qui composent les complexes MYST acétyltransférases sont très conservées, de la levure à l'humain. Par homologie de séquences, nous avons préalablement identifié deux domaines présents dans les sous-unités d'échafaudage au sein de ces complexes (Doyon et al. 2006). Les domaines I et II (voir figure 3-1B) se retrouvent donc dans EPC1/2, BRPF1/2/3 et JADE1/2/3 et permettent l'association des autres sous-unités à ces protéines. Le domaine I de JADE1 permet la liaison au domaine MYST de la sous-unité enzymatique HBO1, tandis que le domaine II lie les protéines ING4/5 ainsi que hEaf6. De plus, si on divise le domaine II en deux parties (a et b), on note qu'ING4 lie plus précisément le domaine IIb. C'est d'ailleurs cette partie du domaine II qui est perdue dans le variant d'épissage JADE1S, ne permettant donc plus à la protéine de lier ING4/5. Ces différentes interactions permettent donc de définir le cœur tétramérique caractéristique de ces complexes acétyltransférases. Par ailleurs, des domaines équivalents dans la protéine BRPF1 avaient montrés des liaisons comparables à la sous-unité enzymatique MOZ/MORF ainsi qu'à ING5 (Ullah et al. 2008). De façon réciproque, il serait éventuellement intéressant de caractériser la région des protéines INGs capable d'interagir avec le domaine II des sous-unités d'échafaudage. Par contre, nous savons déjà que le domaine PHD de ces protéines ne participe pas à cette interaction (Figure 3-3B-D). Cette région a d'ailleurs déjà été caractérisée dans l'homologue de levure Yng2 et il serait donc intéressant de valider ces résultats chez l'humain (Selleck et al. 2005).

La protéine hEaf6 a besoin de la présence de la sous-unité ING afin de lier le complexe (Figure 3-3C). Comment cette interaction est-elle régulée? Quel est le rôle de cette petite sous-unité présente dans chacun de ces complexes? Le seul élément de réponse que nous possédions pour l'instant vient du fait que hEaf6 possède un domaine à « zipper de leucines » (Figure 3-1B), domaine normalement capable d'interagir avec d'autres protéines. Cette sous-unité, sans être essentielle pour le recrutement du complexe à la chromatine, pourrait donc venir stabiliser l'interaction une fois le complexe lié.

Plusieurs associations entre différentes protéines peuvent être régulées par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, etc.). Un exemple classique se trouve au niveau de l'interaction entre les protéines p53 et MDM2, où la

phosphorylation et l'acétylation de p53 brise l'interaction avec MDM2 et stabilise ainsi la protéine (Moll and Petrenko 2003; Tang et al. 2008). Quant aux protéines qui nous intéressent, nous avons montré que l'acétylation constitutive d'ING4 défavorise la liaison de la protéine au complexe HBO1 (Rossetto *et al.*, soumis à MCB). Comme il existe plusieurs résidus sujets à de telles modifications au sein des domaines I et II ainsi que dans les protéines INGs (certains déjà confirmés par des expériences de spectrométrie de masse), il serait intéressant de voir si d'autres modifications peuvent entraîner des changements d'interactions (Choudhary et al. 2009). De plus, le caractère transitoire des modifications post-traductionnelles permettrait un niveau de régulation supplémentaire simple et rapide au sein de ces complexes, qui pourrait varier en fonction de différents contextes cellulaires (ex. cycle cellulaire). Des mutants mimant une phosphorylation ou une acétylation constitutives (ou au contraire une absence d'acétylation ou de phosphorylation) pourraient donc être utilisés afin de valider de telles hypothèses. Ces modifications pourraient non seulement réguler l'assemblage des complexes, mais également leur activité acétyltransférase ou leur liaison à la chromatine.

5.2. Les domaines de reconnaissance de la chromatine au sein des complexes MYST

Comme déjà mentionné à quelques reprises, presque toutes les sous-unités impliquées dans la formation des complexes acétyltransférases de la famille MYST possèdent un ou des domaines de reconnaissance pour des modifications post-traductionnelles de la chromatine. Nous avons déjà montré auparavant, que le domaine PHD1 du PZP de la protéine JADE1 était dominant dans son interaction avec la chromatine par rapport au domaine PHD2 (Figure 3-5 et (Saksouk et al. 2009)). Nous pouvons donc maintenant affirmer qu'un modèle similaire est aussi vrai pour le domaine PZP de la protéine BRPF1 (Figure 4-1). De plus, tout comme le PHD2 de JADE1, celui de BRPF1 est également requis pour interagir avec la chromatine *in vitro* et *in vivo* (Figure 4-2 et (Saksouk et al. 2009)). Il serait donc intéressant ici de faire des essais de croissance cellulaire similaires à ceux effectués précédemment avec des clones stables HeLa JADE1L Δ PHD2 (Figure 3-6A, B et (Saksouk et al. 2009)). En effet, les cellules exprimant de façon stable la protéine JADE1L WT ont une croissance cellulaire énormément ralentie, alors que les cellules Δ PHD2 voient leur

croissance retrouver un rythme normal par rapport à un contrôle négatif. De plus, ces mêmes cellules voient leur activité de suppresseur de tumeurs diminuée, car on constate une augmentation de la formation de colonies en « agar mou ». On pourrait donc penser que l'utilisation de clones stables exprimant soit la protéine BRPF1 WT ou celle délétée pour le domaine PHD2 permettrait de retrouver des phénotypes analogues. Cependant, nous n'avons pas noté de diminution de la croissance des cellules stables exprimant BRPF1 WT aussi forte que celle observée avec JADE1L.

Également, nous avons montré que le domaine PHD compris dans les protéines ING4/ING5 était celui qui déterminait la localisation globale du complexe à la chromatine, soit au niveau de la marque H3K4me3 présente au site d'initiation de la transcription de plusieurs gènes (Figure 3-4 et 4-3a, b). Il existe donc une « dominance » entre les différents domaines PHD compris dans les sous-unités INGs et JADE1/BRPF1 selon le modèle suivant : PHD INGs > PHD1 > PHD2. Il faut par contre noter que ces domaines PHDs ne sont pas les seuls domaines de reconnaissance de la chromatine présents au sein de ces complexes. Tel que mentionné plus haut, les protéines BRPFs contiennent également un domaine PWWP reconnaissant H3K36me3 ainsi qu'un bromodomaine (Vezzoli et al. 2010). De plus, la sous-unité enzymatique MOZ/MORF possède elle-même un tandem de domaines PHD qui reconnaît H3K14ac (Ali et al. 2012; Qiu et al. 2012).

Des études plus approfondies seront éventuellement nécessaires afin de comprendre comment tous ces domaines, en étant présents simultanément dans le même complexe, s'harmonisent entre eux pour diriger leur recrutement à la chromatine ainsi que leur activité acétyltransférase. Il est par contre très probable que chacun de ces domaines participe, à leur façon, à la stabilisation des complexes aux différents loci génomiques. De simples calculs de thermodynamique nous permettent d'ailleurs de comprendre aisément l'avantage que possède la cellule à détenir de tels complexes quant à leur entropie d'interaction (Ruthenburg et al. 2007a). En effet, la présence de complexes possédant de multiples sous-unités qui interagissent chacune avec la chromatine, permet à la cellule de dépenser beaucoup moins d'énergie que si chacune de ses sous-unités devaient lier la chromatine de façon individuelle. La formation de complexes multi-protéiques est donc en quelque sorte un mode d'économie énergétique pour la cellule (Bannister et al. 2000).

5.3. Rôle des complexes MYST dans la régulation des gènes et de la prolifération cellulaire

Les protéines INGs permettent le recrutement des complexes de la famille MYST au niveau de la marque H3K4me3, présente au site d'initiation de la transcription des gènes. Nous avons montré que les protéines ING4/ING5 sont essentielles pour l'activité de suppresseur de tumeurs du complexe HBO1. Ceci suggère donc que cette activité anti-tumorale passe par la régulation de l'expression de certains gènes, liés par le complexe. Nous avons ainsi comparé à l'aide de micropuces à ADN, l'expression de plusieurs gènes dans une lignée surexprimant la protéine JADE1L par rapport à une lignée contrôle. Cette comparaison nous a permis de constater que plusieurs gènes d'interleukines voyaient leur expression augmentée, ainsi que plusieurs gènes impliqués dans la voie p53. Parmi ces gènes, l'inhibiteur connu du point de contrôle G1/S du cycle cellulaire, p21/CDKN1A, était particulièrement surexprimé (Tableau 3-1). De la même façon, nous avons utilisé des cellules déplétées pour HBO1 (avec un siARN) afin de voir les changements d'expression génique par rapport à une lignée contrôle. À l'opposé, p21/CDKN1A est maintenant réprimée dans ces cellules (Tableau 3-2). Nous avons ainsi déterminé le recoupement entre les gènes qui sont surexprimés dans la lignée JADE1L et diminués dans la lignée siHBO1 (Figure 3-6F) et celui entre les gènes qui sont diminués dans la lignée JADE1L et surexprimés dans la lignée siHBO1 (Figure 3-6G). Nous avons ainsi pu identifier clairement que l'expression des gènes impliqués dans la voie p53 pour le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose est bel et bien dérégulée. De plus, certains gènes impliqués dans la répression transcriptionnelle et la formation d'hétérochromatine, tel que LSD1 (déméthylase de H3K4) sont également dérégulés. Ceci suggère donc que le complexe HBO1-JADE1 est impliqué dans l'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes et permet l'ouverture de la chromatine à ces différents loci.

Puisque nous savons maintenant qu'il existe un complexe HBO1-BRPF1 (discuté en détails plus loin), il serait intéressant d'utiliser le même genre d'approche avec notre lignée stable exprimant la protéine BRPF1. Nous pourrions alors comparer le recoupement entre les gènes qui sont surexprimés/diminués dans ces cellules et ceux dérégulés dans les cellules siHBO1. Ceci nous permettrait d'identifier des voies de signalisation cellulaire différentes ciblées par le complexe HBO1-BRPF1, comparativement à HBO1-JADE1. De plus, des

cellules déplétées pour les protéines MOZ ou MORF pourraient être utilisées de façon analogue au siHBO1 afin de vérifier quelle est l'implication du complexe MOZ/MORF-BRPF1 dans la régulation de la transcription. Il faut toutefois mentionner que, grâce à nos expériences de ChIP-seq dans la lignée RKO, nous savons que les protéines HBO1 et BRPF1 lient les mêmes loci à la grandeur du génome (Figure 4-3e). Puisque cette sous-unité enzymatique peut être à la fois liée à JADE1 et à BRPF1, cela laisse donc croire que les complexes HBO1-BRPF1 ainsi que HBO1-JADE1 se retrouvent aux mêmes endroits. Nous n'avons malheureusement pas d'anticorps assez performant contre la protéine JADE1 afin de vérifier cette information par ChIP-seq. Pouvons-nous quand même espérer obtenir des patrons d'expression différentiels entre ces deux complexes ? Il est fort probable que oui, car chacun peut quand même jouer un rôle plus ou moins essentiel à certains loci, tout en étant liés aux mêmes endroits. Puisque les protéines MOZ/MORF et BRPF1 semblent impliquées davantage dans le développement, il serait intéressant de mener ce genre d'expériences en parallèle dans une lignée cellulaire moins différenciée que les HeLa/RKO ou encore dans des cellules souches embryonnaires. Ces cellules nous aideraient peut-être à faire ressortir davantage de différences dans la régulation de l'expression de certains gènes impliqués dans le développement, comme par exemple les gènes *HOX*.

On note également que la quantité relative de chacune des protéines caractérisées par ChIP-seq est proportionnelle à la quantité de méthylation de H3K4me3 retrouvée aux mêmes endroits. De plus, tout comme il avait déjà été montré pour H3K4me3, les niveaux des complexes MYST acétyltransférases aux sites d'initiation de la transcription corrélerent avec les niveaux d'expression des gènes correspondant (Figure 3-8A, Figure 4-3 et Figure sup. 4-2). Ces données renforcent donc l'idée que ces complexes soient impliqués directement dans la transcription de ces gènes et que les effets observés par les expériences de micropuces à ADN ne reflètent pas nécessairement des conséquences indirectes de la surexpression/délétion de ces protéines. Par ailleurs, ceci est confirmé dans le cas des gènes p21/CDKN1A et Bax, par des essais luciférase utilisant le promoteur de ces gènes. En effet, nous avons noté une hausse significative de l'expression de la luciférase dans des cellules surexprimant les protéines ING3, ING4 ou HBO1, et ce de façon dépendante de la

présence de p53 (Figure 3-7C, D). Malgré ces résultats, il ne faut par contre pas exclure que des effets indirects peuvent avoir lieu.

Dans des expériences complémentaires, nous avons montré que le complexe HBO1 était capable d'acétyler directement la protéine p53 dans sa région C-term *in vitro* (voir Figure A-1 en annexe). De plus, des études de spectrométrie de masse nous ont permis d'identifier la lysine K351 comme étant acétylée par HBO1. Les complexes MOF et TIP60 sont pour leur part capable d'acétyler p53 (tel que décrit aux sections 1.2.2.1 et 1.2.5), mais dans sa région N-term. La région C-term de la protéine possède plusieurs lysines qui ont été montrées acétylées par spectrométrie de masse (K370, K372, K373, K381, K382 et K386). Malgré une redondance évidente entre ces différentes lysines, l'acétylation de la région C-term est connue pour stabiliser la protéine ainsi que sa liaison à l'ADN et en conséquence favorise son activité de facteur de transcription (Brooks and Gu 2011). Il se pourrait donc que la fonction du complexe HBO1 observée dans la voie p53, passe par son activité acétyltransférase afin de stabiliser la protéine.

5.4. Le complexe HBO1-BRPF1

Nous avons confirmé l'existence d'un complexe formé par la sous-unité enzymatique HBO1 et la protéine d'échafaudage BRPF1. Ce complexe avait été observé par Mishima *et al.* avec la protéine BRPF2 (paralogue de BRPF1) dans des cellules K562 (Mishima *et al.* 2011). En utilisant une purification Flag dans des cellules stables exprimant 3xFlag-BRPF1, nous avons pu montrer qu'autant la sous-unité MOZ/MORF que la sous-unité HBO1 se lie à la protéine (Figure 4-4a, b). Ce nouveau complexe, coexiste dans les cellules HeLa avec le complexe HBO1-JADE1 (Figure 4-4c). Il serait intéressant de s'assurer par les mêmes types d'expériences que celles effectuées précédemment pour le complexe HBO1-JADE1, que l'association de la protéine HBO1 à la sous-unité BRPF1 s'effectue de façon similaire, c'est-à-dire via le domaine MYST et le domaine I, respectivement. Mais existerait-il une préférence d'HBO1 pour s'associer aux protéines JADEs ou aux protéines BRPFs ou encore à certains paralogues précis? Pour répondre à cette question, d'autres expériences seraient requises. Par exemple, on pourrait mettre en compétition, en surexpression cellulaire, les protéines HBO1, JADE1 et BRPF1 et vérifier quelle sous-unité est davantage liée à l'enzyme. Une expérience similaire a d'ailleurs déjà été faite par

Mishima *et al.*, où l'on mettrait une compétition des paralogues BRPF1 et BRPF2 pour les sous-unités enzymatiques HBO1 et MOZ (Mishima et al. 2011). Cette compétition a permis d'observer une préférence du paralogue BRPF1 pour MOZ et du paralogue BRPF2 pour HBO1. Nous pouvons par contre affirmer qu'en recréant les différents complexes HBO1-JADE1 et HBO1-BRPF1 en surexpression transitoire, nous n'avons pas vraiment observé de différences quant à la quantité de complexe formé et stabilisé, ce qui ne laisse pas présager de préférence démesurée (Figure 4-5a et données non présentées).

On peut alors se demander de quelle façon est régulée l'association d'HBO1 aux BRPFs ou aux JADEs, surtout s'il n'existe pas de préférence significative. Les niveaux différentiels d'expression de chacune des sous-unités d'échafaudage ou encore de chacune des sous-unités enzymatiques (MOZ/MORF vs HBO1) seraient probablement en partie responsable de la formation préférentielle soit d'un ou l'autre des complexes, selon le type cellulaire. De plus, il faut se rappeler qu'il existe trois paralogues BRPFs (1/2/3) ainsi que trois paralogues JADEs (1/2/3) et que leurs niveaux peuvent eux aussi varier, ce qui vient ajouter de la diversité aux complexes potentiellement formés. Nous avons concentré nos efforts sur les paralogues JADE1 et BRPF1, mais il se peut fort bien que certaines cellules/lignées possèdent davantage des autres paralogues. D'ailleurs, grâce à des expériences préliminaires de purifications de complexes natifs dans des cellules K562, notre laboratoire a pu constater qu'une quantité beaucoup plus grande d'HBO1 liait le paralogue BRPF3, alors que MOZ semblait davantage lier le paralogue BRPF1 dans cette lignée (données non présentées). Il faut donc aussi envisager que l'association peut être régulée par des affinités différentes entre les paralogues. Par contre, il n'est pas à exclure qu'un mode de régulation passant par des modifications post-traductionnelles puisse avoir lieu. La présence de modifications au niveau de certains sites d'interactions (domaine I ou MYST) pourraient sûrement favoriser/défavoriser la formation de certains complexes. Si un tel mode de régulation existe, il se pourrait donc que pour le même type cellulaire, l'association d'HBO1 varie avec ses différentes sous-unités d'échafaudage en réponse à des stress ou en fonction du cycle cellulaire.

Il serait également intéressant d'utiliser les cellules MEF HBO1^{-/-} (Kueh et al. 2011) afin de vérifier quelles sont les sous-unités enzymatiques liées aux différentes protéines

d'échafaudage dans un tel contexte. Est-ce que les JADEs s'associeraient alors avec d'autres enzymes telles que MOZ/MORF ou encore Tip60? De façon générale, existe-t-il une affinité, quoi que beaucoup plus faible, entre toutes les sous-unités enzymatiques et toutes les sous-unités d'échafaudage? Nous avons nous-mêmes noté que dans les cellules HeLa déplétées pour HBO1 (siHBO1) il y a une augmentation de la protéine BRPF1 (Tableau 3-2). Est-ce une façon pour la cellule de compenser en cherchant à créer davantage de complexes avec d'autres sous-unités enzymatiques? Toutes ces questions sont importantes pour bien comprendre la dynamique d'association des complexes de la famille MYST.

Finalement, l'utilisation de notre purification BRPF1 nous a aussi menés vers une autre piste. En effet, en utilisant cette purification qui possède à la fois un mélange des complexes HBO1-BRPF1 et MOZ/MORF-BRPF1, nous avons constaté que seule l'histone H3 était acétylée en utilisant la chromatine comme substrat (Figure 4-4d). De plus, si on regarde le niveau d'acétylation *in vivo* dans ces cellules (HeLa 3xFlag-BRPF1) à un locus bien connu pour être lié par ces complexes, on constate qu'il y a une augmentation significative des niveaux d'acétylation de l'histone H3 par rapport à ceux de l'histone H4 (Figure 4-4e, f, g). Jusqu'à maintenant, la sous-unité catalytique HBO1 était surtout connue pour acétyler majoritairement la queue N-term de l'histone H4. Il était donc étonnant que les deux complexes associés à BRPF1 n'acétylent que H3 sur la chromatine. Se pourrait-il alors que le complexe HBO1-BRPF1 favorise l'acétylation d'H3 vs celle d'H4? Cette question sera adressée en détails dans la section suivante.

5.5. Spécificité de l'activité acétyltransférase des MYST

Il existait jusqu'à maintenant dans la littérature, des données contradictoires concernant l'acétylation par HBO1. Notre laboratoire ainsi que d'autres équipes ont montré qu'HBO1 s'associait à JADE1 et était responsable de la majorité de l'acétylation des lysines K5, 8 et 12 de l'histone H4. En effet, un siHBO1 montre une diminution importante de l'acétylation de ces lysines *in vivo* (Doyon et al. 2006). Plus récemment, une équipe a montré que la déplétion d'HBO1 dans des cellules primaires d'embryons de souris avait au contraire pour effet d'abolir l'acétylation de H3K14, mais ne semblait pas vraiment influencer les niveaux d'acétylation de l'histone H4 (Kueh et al. 2011). Par ailleurs, l'équipe ayant identifié le

complexe HBO1-BRPF2 dans des lymphoblastes humains plaide également pour une acétylation de la lysine 14 de H3 par ce complexe, plutôt que l'acétylation de l'histone H4 (Mishima et al. 2011). Nous avons donc imaginé que l'association de la sous-unité enzymatique HBO1 avec sa protéine d'échafaudage pouvait influencer la spécificité d'acétylation de l'enzyme. En comparant des complexes HBO1-JADE1 vs HBO1-BRPF1 purifiés en surexpression transitoire, nous avons donc montré que l'acétylation était dirigée soit contre H4 ou H3 respectivement (Figure 4-5a, b). De plus, la lysine 23 de l'histone H3 est aussi acétylée par le complexe HBO1-BRPF1 (Figure 4-5c). De façon réciproque, nous avons forcé l'association de la sous-unité enzymatique MOZ avec la protéine JADE1. Cette nouvelle association semble maintenant rediriger l'acétylation de MOZ vers l'histone H4 (Figure 4-6b, ligne 4). Il serait intéressant de tenter d'autres associations telles que Tip60-BRPF1 ou Tip60-JADE1 pour voir si encore une fois les phénotypes sont conservés à travers toute la famille MYST.

Jusqu'à maintenant, nous pensions que la spécificité d'acétylation résidait dans l'enzyme elle-même. Ces résultats démontrent donc que dans un contexte de chromatine, ce ne sont pas les sous-unités enzymatiques en soi qui décident de leurs substrats, mais bien la protéine d'échafaudage à laquelle elles sont associées. Tout comme pour la formation des complexes, les niveaux d'expression des différentes protéines d'échafaudage ou encore des enzymes permettraient donc de réguler l'acétylation dans différents types cellulaires ou encore à différents stades lors du développement. Certaines lignées possédant plus ou moins de l'un ou de l'autre des paralogues de BRPFs ou de JADEs pourraient ainsi moduler l'acétylation des différentes queues N-term des histones, ce qui expliquerait également pourquoi HBO1 stimulait l'acétylation de différentes histones entre certaines lignées cellulaires. On comprend donc que tous les facteurs influençant la liaison entre la sous-unité enzymatique et sa protéine d'échafaudage énumérés dans la section précédente (niveaux d'expression, modifications post-traductionnelles, cycle cellulaire), deviennent importants non seulement pour la formation de ces complexes, mais aussi pour diriger la spécificité d'acétylation dans la cellule. Fait intéressant à noter, malgré l'augmentation de l'acétylation d'H3 observée *in vivo* par expériences d'immunoprécipitation de la chromatine au niveau du promoteur de p21/CDKN1A avec les cellules stables BRPF1, il ne semble pas y avoir d'augmentation d'HBO1 à ce même locus (Figure 4-4h). Il se pourrait

donc tout simplement que la quantité d'HBO1 présente à cet endroit du génome soit déjà saturée et que l'enzyme s'associe tout simplement davantage avec BRPF1 dans ces cellules qu'avec JADE1 dans des cellules contrôles.

Il devenait donc important de comprendre comment les protéines d'échafaudage BRPF1 ou JADE1 pouvaient réguler la spécificité d'acétylation des MYST. Puisque BRPF1 possède deux domaines de reconnaissance de la chromatine (PWWP et bromo) supplémentaires, nous avons considéré que ceux-ci pouvaient être responsables de diriger l'acétylation d'HBO1 vers H3 plutôt que H4, surtout que le domaine PWWP de BRPF1 avait été montré pour lier H3K36me3 (Vezzoli et al. 2010). Cependant, ces deux domaines ne sont pas nécessaires pour acétyler H3 (Figure 4-5d, e). Par alignement des séquences en acides aminés, nous avons mis en évidence une région d'homologie en N-term du domaine basique EPcA, identifié auparavant dans les protéines *enhancer of polycomb* (Figure 4-6a) (Stankunas et al. 1998). Cette région de la protéine Epl1 de levure avait précédemment été montrée essentielle pour l'activité d'acétylation et la liaison de la chromatine par le complexe NuA4 (Selleck et al. 2005; Chittuluru et al. 2011). Par ailleurs, une étude récente a également identifié cette même région d'Epl1 comme étant capable de lier la queue N-term de l'histone H2A (Huang and Tan 2013). Nous avons donc voulu voir si cette région pouvait également être responsable de la spécificité d'acétylation par les protéines d'échafaudage. En utilisant des délétions de domaines, nous avons observé qu'une petite région en N-term des domaines EPcA était effectivement responsable de diriger cette spécificité, autant pour JADE1 que pour BRPF1 (Figure 4-6b). En effet, lorsque l'on mute la partie N-term de JADE1, on voit une perte majeure de l'acétylation d'H4 ainsi que l'apparition de l'acétylation d'H3. De plus, malgré la faible activité des complexes formés avec le mutant N-term de BRPF1, il est également possible d'observer un changement de l'acétylation d'H3 vers H4 (Figure supplémentaire 4-7). Ces données indiquent donc que la partie N-term appartenant au domaine EPcA est importante pour déterminer la spécificité d'acétylation de ces complexes. Des expériences afin d'identifier plus précisément des résidus importants dans ces parties N-term des protéines d'échafaudage pourraient être menées à l'aide de mutants ponctuels.

Cette propriété est également conservée avec la protéine d'échafaudage EPC1, qui perd elle aussi sa spécificité d'acétylation de l'histone H4 en délétant son domaine N-term, mais conserve l'acétylation de l'histone H2A (Figure 4-6c). Ce phénomène est également observé dans le cas de l'homologue de la levure, Epl1 (Figure 4-6d). On pourrait alors imaginer que la partie N-term du domaine EPcA, en liant H2A, permet d'orienter les complexes acétyltransférases TIP60/NuA4 de telle sorte qu'ils acétylent l'histone H4. Il est intéressant de noter que ces expériences avec les protéines EPC1 et Epl1 ont été effectuées respectivement avec de la chromatine humaine et de la chromatine de levure pour obtenir ces résultats. En effet, si on utilise le même mutant Epl1 en présence de chromatine humaine, aucun changement de spécificité n'est observé, simplement une perte d'activité acétyltransférase générale (données non présentées). Le contraire est également vrai, si on utilise le mutant N-term d'EPC1 en présence de chromatine de levure, aucun changement de spécificité n'est observé. Ceci suggère donc que la spécificité d'acétylation guidée par la partie N-term des protéines Epl1/EPC1 dépend de leur chromatine respective et que des différences présentes entre la chromatine humaine et de levure ne permettent pas de recréer cette spécificité. Comme il est possible de recréer *in vitro* des nucléosomes contenant différentes mutations sur les queues N-term des histones, une telle technique pourrait être utilisée pour vérifier quels sont les résidus responsables de cette régulation sur la queue N-term de H2A.

L'acétylation a longtemps été perçue comme étant simplement une marque globale d'ouverture de la chromatine par sa neutralisation de la charge des lysines et sa diminution des interactions histones-ADN. On ne faisait pas alors la discrimination entre l'acétylation des différentes histones. Quelle est donc l'importance d'acétyler plus précisément H3 ou H4 pour les acétyltransférases, tel que nous démontrent nos travaux? Nous savons maintenant que l'acétylation d'H3 n'influence pas de la même façon la structure tertiaire de la chromatine, comparativement à l'acétylation d'H4 (Siino et al. 2003; Wang and Hayes 2008). En effet, alors que l'acétylation d'H3 semble jouer un rôle au niveau de l'accessibilité à l'ADN dans le nucléosome, l'acétylation d'H4 aurait plutôt un rôle qui se répercute sur une plus grande distance et influence la compaction de la chromatine (Wang and Hayes 2008). De plus, une autre raison démontrant l'importance de cibler H3 vs H4 vient du fait que certains bromodomains contenus dans des protéines ont montré une

spécificité pour lier soit des lysines acétylées de la queue N-term d'H3 ou de la queue N-term d'H4. Par exemple, le facteur de transcription TRIM24 possède un bromodomaine capable de lier H3K23ac alors que Brd4 possède un bromodomaine liant H4K16ac (Zippo et al. 2009; Tsai et al. 2010). Il est donc évidemment important pour la fonction cellulaire de ces protéines de réguler l'acétylation d'H3 vs celle d'H4.

5.6. Conclusion

Au cours de mon doctorat, j'ai pu caractériser différents domaines protéiques présents dans les sous-unités des acétyltransférases de la famille MYST. Ces caractérisations ont permis de localiser ces protéines sur le génome entier ainsi que d'établir leur fonction dans la transcription des gènes. Elles ont également permis de comprendre les différentes interactions moléculaires qui existent entre les divers domaines de la même sous-unité ou de sous-unités différentes dans le même complexe. J'ai également révélé un nouveau mécanisme par lequel ces acétyltransférases choisissent leur spécificité de substrat, soit par leur association à différentes sous-unités d'échafaudage. Tous ces résultats démontrent donc qu'il est important de percevoir les MYST acétyltransférases comme des complexes et non comme des protéines individuelles (Tableau 5-1). En effet, la littérature abonde d'expériences qui ne prennent pas en considération cette notion de « complexe ». De plus, il est important d'étudier ces complexes dans un contexte de chromatine (et non d'histones libres) afin d'observer leur spécificité catalytique. Finalement, plusieurs des sous-unités et leurs paralogues possèdent déjà des fonctions dans différents contextes cellulaires (Tableau 5-2) et il sera donc important de déterminer avec quel(s) complexe(s) chaque fonction est associée. Si la reconnaissance, la spécificité d'acétylation ainsi que la fonction cellulaire de ces enzymes passent par l'ensemble de leurs sous-unités, il est donc essentiel de ne pas oublier qu'elles sont associées à d'autres protéines et que ces protéines sont tout aussi importantes pour leur fonctionnement que la sous-unité enzymatique en elle-même.

Complexes	Autres sous-unités confirmées	Domaines protéiques et de reconnaissance de la chromatine		Activité spécifique sur la chromatine
HBO1-JADE(1/2/3)	ING4/5, hEaf6	JADE (1/2/3)	Domaine I : sous-unité catalytique Domaine II : ING5/hEaf6 N-term EPcA : essentiel à la spécificité d'acétylation sur chromatine PZP: H3K4me0	H4K5/8/12ac
		ING4/5	PHD : H3K4me3	
		HBO1	MYST : catalytique et liaison domaine I JADEs	
HBO1-BRPF1	ING4/5, hEaf6	BRPF1	Domaine I : sous-unité catalytique Domaine II : ING5/hEaf6 N-term EPcA: essentiel à la spécificité d'acétylation sur chromatine PZP: H3K4me0 PWWP: H3K36me3 Bromo: H4ac	H3K14/23ac
		ING4/5	PHD: H3K4me3	
		HBO1	MYST : catalytique et liaison domaine I BRPF1	
HBO1-BRPF2^a	ING4, hEaf6	BRPF2	Voir BRPF1	H3K14ac
		ING4	PHD: H3K4me3	
		HBO1	MYST: catalytique et liaison domaine I BRPF2	
MOZ/MORF-BRPF1/2/3	ING5, hEaf6	BRPF1/2/3	Voir BRPF1	H3K14/23ac
		ING5	PHD: H3K4me3	
		MOZ/MORF	MYST : catalytique et liaison domaine I BRPFs Tandem PHD : H3K14ac/H3R2me0 (MORF)	
MOZ-JADE1^b	ING5, hEaf6	JADE1	Voir JADE	H4ac (K5/8/12 ?)
		ING5	PHD: H3K4me3	
		MOZ/MORF	MYST : catalytique et liaison domaine I JADEs Tandem PHD: H3K14ac/H3R2me0	

Tableau 5-1. Résumé des différents domaines protéiques et spécificités des complexes MYST étudiés.

^a Selon Mishimal *et al.* (2011).

^b Vu en surexpression uniquement.

Protéines	Paralogues	Fonctions cellulaires
JADE	JADE1	<ul style="list-style-type: none"> • Transcription • Suppresseur de tumeurs
BRPF	BRPF1	<ul style="list-style-type: none"> • Expression des gènes HOX
	BRPF2	<ul style="list-style-type: none"> • Érythropoïèse
ING	ING4	<ul style="list-style-type: none"> • Voie NF-κB (via expression IκB) • Hypoxie • Prolifération et croissance cellulaire • Suppresseur de tumeurs • Transcription p53/c-myc
	ING5	<ul style="list-style-type: none"> • Réplication • Prolifération et croissance cellulaire • Suppresseur de tumeurs • Transcription p53
HBO1	-	<ul style="list-style-type: none"> • Réplication • Transcription des gènes, en particulier ceux de la voie p53/p21 • Co-activateur transcriptionnel, récepteurs nucléaires hormonaux • Répression des gènes HOX • Suppresseur de tumeurs • Voie NF-κB • Érythropoïèse/ Développement des cellules souches hématopoïétiques
MOZ	-	<ul style="list-style-type: none"> • Expression des gènes HOX et TBX1 • Co-activateur transcriptionnel AML1, p65 (NF-κB) et p21 • Hématopoïèse
MORF	-	<ul style="list-style-type: none"> • Neurogénèse

Tableau 5-2. Résumé des différentes fonctions cellulaires des sous-unités et paralogues des complexes acétyltransférases de la famille MYST principalement étudiés.

Bibliographie

- Abmayr SM, Yao, Tingting, Parmely, Tari and Workman, Jerry L. . 1993. Preparation of nuclear and cytoplasmic Extracts from Mammalian Cells. *Curr Protoc Mol Biol*: 12.11.11-12.11.19.
- Acosta JC, O'Loughlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, Fumagalli M, Da Costa M, Brown C, Popov N et al. 2008. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**: 1006-1018.
- Adkins MW, Carson JJ, English CM, Ramey CJ, Tyler JK. 2007. The histone chaperone anti-silencing function 1 stimulates the acetylation of newly synthesized histone H3 in S-phase. *J Biol Chem* **282**: 1334-1340.
- Adkins MW, Howar SR, Tyler JK. 2004. Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes. *Mol Cell* **14**: 657-666.
- Agalioti T, Chen G, Thanos D. 2002. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* **111**: 381-392.
- Agricola E, Verdone L, Di Mauro E, Caserta M. 2006. H4 acetylation does not replace H3 acetylation in chromatin remodelling and transcription activation of Adr1-dependent genes. *Mol Microbiol* **62**: 1433-1446.
- Aikawa Y, Katsumoto T, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H et al. 2010. PU.1-mediated upregulation of CSF1R is crucial for leukemia stem cell potential induced by MOZ-TIF2. *Nat Med* **16**: 580-585, 581p following 585.
- Akhtar A, Becker PB. 2000. Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in Drosophila. *Mol Cell* **5**: 367-375.
- Alabert C, Groth A. 2012. Chromatin replication and epigenome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 153-167.
- Albulescu LO, Sabet N, Gudipati M, Stepankiw N, Bergman ZJ, Huffaker TC, Pleiss JA. 2012. A quantitative, high-throughput reverse genetic screen reveals novel connections between Pre-mRNA splicing and 5' and 3' end transcript determinants. *PLoS Genet* **8**: e1002530.
- Alekseyenko AA, Peng S, Larschan E, Gorchakov AA, Lee OK, Kharchenko P, McGrath SD, Wang CI, Mardis ER, Park PJ et al. 2008. A sequence motif within chromatin entry sites directs MSL establishment on the Drosophila X chromosome. *Cell* **134**: 599-609.
- Ali M, Yan K, Lalonde ME, Degerny C, Rothbart SB, Strahl BD, Cote J, Yang XJ, Kutateladze TG. 2012. Tandem PHD fingers of MORF/MOZ acetyltransferases display selectivity for acetylated histone H3 and are required for the association with chromatin. *J Mol Biol* **424**: 328-338.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. 1964. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **51**: 786-794.
- Allis CD, Jenuwein, T., Reinberg, D., Caparros, M.L. 2007. *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Altaf M, Utley RT, Lacoste N, Tan S, Briggs SD, Cote J. 2007. Interplay of chromatin modifiers on a short basic patch of histone H4 tail defines the boundary of telomeric heterochromatin. *Mol Cell* **28**: 1002-1014.
- Arita K, Isogai S, Oda T, Unoki M, Sugita K, Sekiyama N, Kuwata K, Hamamoto R, Tochio H, Sato M et al. 2012. Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

- Auger A, Galarneau L, Altaf M, Nourani A, Doyon Y, Utey RT, Cronier D, Allard S, Cote J. 2008. Eaf1 is the platform for NuA4 molecular assembly that evolutionarily links chromatin acetylation to ATP-dependent exchange of histone H2A variants. *Mol Cell Biol* **28**: 2257-2270.
- Avvakumov N, Cote J. 2007a. Functions of myst family histone acetyltransferases and their link to disease. *Sub-cellular biochemistry* **41**: 295-317.
- Avvakumov N, Cote J. 2007b. The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. *Oncogene* **26**: 5395-5407.
- Avvakumov N, Lalonde ME, Saksouk N, Paquet E, Glass KC, Landry AJ, Doyon Y, Cayrou C, Robitaille GA, Richard DE et al. 2012. Conserved molecular interactions within the HBO1 acetyltransferase complexes regulate cell proliferation. *Mol Cell Biol* **32**: 689-703.
- Avvakumov N, Nourani A, Cote J. 2011. Histone chaperones: modulators of chromatin marks. *Mol Cell* **41**: 502-514.
- Bannister AJ, Miska EA, Gorlich D, Kouzarides T. 2000. Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr Biol* **10**: 467-470.
- Bannister AJ, Schneider R, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. 2005. Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *J Biol Chem* **280**: 17732-17736.
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**: 120-124.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**: 823-837.
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhata R, Shilatifard A. 2009. An operational definition of epigenetics. *Genes & development* **23**: 781-783.
- Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Kouzarides T, Schreiber SL. 2002. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8695-8700.
- Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, McMahon S, Karlsson EK, Kulbokas EJ, 3rd, Gingeras TR et al. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**: 169-181.
- Bian C, Xu C, Ruan J, Lee KK, Burke TL, Tempel W, Barsyte D, Li J, Wu M, Zhou BO et al. 2011. Sgf29 binds histone H3K4me2/3 and is required for SAGA complex recruitment and histone H3 acetylation. *The EMBO journal* **30**: 2829-2842.
- Bird AW, Yu DY, Pray-Grant MG, Qiu Q, Harmon KE, Megee PC, Grant PA, Smith MM, Christman MF. 2002. Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature* **419**: 411-415.
- Biswas D, Takahata S, Xin H, Dutta-Biswas R, Yu Y, Formosa T, Stillman DJ. 2008. A role for Chd1 and Set2 in negatively regulating DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **178**: 649-659.
- Black BE, Cleveland DW. 2011. Epigenetic centromere propagation and the nature of CENP-a nucleosomes. *Cell* **144**: 471-479.
- Black JC, Van Rechem C, Whetstone JR. 2012. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell* **48**: 491-507.
- Blus BJ, Wiggins K, Khorasanizadeh S. 2011. Epigenetic virtues of chromodomains. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **46**: 507-526.
- Bonasio R, Tu S, Reinberg D. 2010. Molecular signals of epigenetic states. *Science* **330**: 612-616.
- Bonisch C, Hake SB. 2012. Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? *Nucleic Acids Res* **40**: 10719-10741.
- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y. 2008. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**: 957-967.

- Borrow J, Stanton VP, Jr., Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RS, Civin CI, Distche C, Dube I, Frischauf AM et al. 1996. The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* **14**: 33-41.
- Botuyan MV, Lee J, Ward IM, Kim JE, Thompson JR, Chen J, Mer G. 2006. Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* **127**: 1361-1373.
- Boudreault AA, Cronier D, Selleck W, Lacoste N, Utley RT, Allard S, Savard J, Lane WS, Tan S, Cote J. 2003. Yeast enhancer of polycomb defines global Esa1-dependent acetylation of chromatin. *Genes Dev* **17**: 1415-1428.
- Boyer LA, Latek RR, Peterson CL. 2004. The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 158-163.
- Bozhenok L, Wade PA, Varga-Weisz P. 2002. WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci. *EMBO J* **21**: 2231-2241.
- Brand M, Moggs JG, Oulad-Abdelghani M, Lejeune F, Dilworth FJ, Stevenin J, Almouzni G, Tora L. 2001. UV-damaged DNA-binding protein in the TFTC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation. *EMBO J* **20**: 3187-3196.
- Brooks CL, Gu W. 2011. The impact of acetylation and deacetylation on the p53 pathway. *Protein Cell* **2**: 456-462.
- 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.
- Burke TW, Cook JG, Asano M, Nevins JR. 2001. Replication factors MCM2 and ORC1 interact with the histone acetyltransferase HBO1. *J Biol Chem* **276**: 15397-15408.
- Buscaino A, Kocher T, Kind JH, Holz H, Taipale M, Wagner K, Wilm M, Akhtar A. 2003. MOF-regulated acetylation of MSL-3 in the Drosophila dosage compensation complex. *Mol Cell* **11**: 1265-1277.
- Cai Y, Jin J, Yao T, Gottschalk AJ, Swanson SK, Wu S, Shi Y, Washburn MP, Florens L, Conaway RC et al. 2007. YY1 functions with INO80 to activate transcription. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 872-874.
- Campos EI, Chin MY, Kuo WH, Li G. 2004a. Biological functions of the ING family tumor suppressors. *Cell Mol Life Sci* **61**: 2597-2613.
- Campos EI, Fillingham J, Li G, Zheng H, Voigt P, Kuo WH, Seepany H, Gao Z, Day LA, Greenblatt JF et al. 2010. The program for processing newly synthesized histones H3.1 and H4. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1343-1351.
- Campos EI, Martinka M, Mitchell DL, Dai DL, Li G. 2004b. Mutations of the ING1 tumor suppressor gene detected in human melanoma abrogate nucleotide excision repair. *Int J Oncol* **25**: 73-80.
- Canzio D, Chang EY, Shankar S, Kuchenbecker KM, Simon MD, Madhani HD, Narlikar GJ, Al-Sady B. 2011. Chromodomain-mediated oligomerization of HP1 suggests a nucleosome-bridging mechanism for heterochromatin assembly. *Molecular Cell* **41**: 67-81.
- Carapeti M, Aguiar RC, Goldman JM, Cross NC. 1998. A novel fusion between MOZ and the nuclear receptor coactivator TIF2 in acute myeloid leukemia. *Blood* **91**: 3127-3133.
- Carrozza MJ, Florens L, Swanson SK, Shia WJ, Anderson S, Yates J, Washburn MP, Workman JL. 2005a. Stable incorporation of sequence specific repressors Ash1 and Ume6 into the Rpd3L complex. *Biochim Biophys Acta* **1731**: 77-87; discussion 75-76.
- Carrozza MJ, Li B, Florens L, Sukanuma T, Swanson SK, Lee KK, Shia WJ, Anderson S, Yates J, Washburn MP et al. 2005b. Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* **123**: 581-592.
- Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Cote J. 2003. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* **19**: 321-329.

- Chaffanet M, Gressin L, Preudhomme C, Soenen-Cornu V, Birnbaum D, Pebusque MJ. 2000. MOZ is fused to p300 in an acute monocytic leukemia with t(8;22). *Genes Chromosomes Cancer* **28**: 138-144.
- Chai B, Huang J, Cairns BR, Laurent BC. 2005. Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. *Genes Dev* **19**: 1656-1661.
- Champagne KS, Saksouk N, Pena PV, Johnson K, Ullah M, Yang XJ, Cote J, Kutateladze TG. 2008. The crystal structure of the ING5 PHD finger in complex with an H3K4me3 histone peptide. *Proteins* **72**: 1371-1376.
- Champagne N, Bertos NR, Pelletier N, Wang AH, Vezmar M, Yang Y, Heng HH, Yang XJ. 1999. Identification of a human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem* **274**: 28528-28536.
- Chan EM, Chan RJ, Comer EM, Goulet RJ, 3rd, Crean CD, Brown ZD, Fruehwald AM, Yang Z, Boswell HS, Nakshatri H et al. 2007. MOZ and MOZ-CBP cooperate with NF-kappaB to activate transcription from NF-kappaB-dependent promoters. *Exp Hematol* **35**: 1782-1792.
- Chan HM, La Thangue NB. 2001. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* **114**: 2363-2373.
- Chan HM, Narita M, Lowe SW, Livingston DM. 2005. The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 --> p21 senescence pathway. *Genes Dev* **19**: 196-201.
- Chen C, Nott TJ, Jin J, Pawson T. 2011. Deciphering arginine methylation: Tudor tells the tale. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**: 629-642.
- Chen CC, Carson JJ, Feser J, Tamburini B, Zabaronick S, Linger J, Tyler JK. 2008. Acetylated lysine 56 on histone H3 drives chromatin assembly after repair and signals for the completion of repair. *Cell* **134**: 231-243.
- Chignola F, Gaetani M, Rebane A, Org T, Mollica L, Zucchelli C, Spitaleri A, Mannella V, Peterson P, Musco G. 2009. The solution structure of the first PHD finger of autoimmune regulator in complex with non-modified histone H3 tail reveals the antagonistic role of H3R2 methylation. *Nucleic Acids Res* **37**: 2951-2961.
- Chitalia VC, Foy RL, Bachschmid MM, Zeng L, Panchenko MV, Zhou MI, Bharti A, Seldin DC, Lecker SH, Dominguez I et al. 2008. Jade-1 inhibits Wnt signalling by ubiquitinating beta-catenin and mediates Wnt pathway inhibition by pVHL. *Nat Cell Biol* **10**: 1208-1216.
- Chittuluru JR, Chaban Y, Monnet-Saksouk J, Carrozza MJ, Sapountzi V, Selleck W, Huang J, Utley RT, Cramet M, Allard S et al. 2011. Structure and nucleosome interaction of the yeast NuA4 and Piccolo-NuA4 histone acetyltransferase complexes. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 1196-1203.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**: 834-840.
- Clapier CR, Cairns BR. 2009. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem* **78**: 273-304.
- Coles AH, Gannon H, Cerny A, Kurt-Jones E, Jones SN. 2010. Inhibitor of growth-4 promotes IkappaB promoter activation to suppress NF-kappaB signaling and innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 11423-11428.
- Colla S, Tagliaferri S, Morandi F, Lunghi P, Donofrio G, Martorana D, Mancini C, Lazzaretti M, Mazzeri L, Ravanetti L et al. 2007. The new tumor-suppressor gene inhibitor of growth family member 4 (ING4) regulates the production of proangiogenic molecules by myeloma cells and suppresses hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1alpha) activity: involvement in myeloma-induced angiogenesis. *Blood* **110**: 4464-4475.
- Collins N, Poot RA, Kukimoto I, Garcia-Jimenez C, Dellaire G, Varga-Weisz PD. 2002. An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat Genet* **32**: 627-632.

- Collins RE, Northrop JP, Horton JR, Lee DY, Zhang X, Stallcup MR, Cheng X. 2008. The ankyrin repeats of G9a and GLP histone methyltransferases are mono- and dimethyllysine binding modules. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 245-250.
- Conrad T, Cavalli FM, Holz H, Hallaçli E, Kind J, Ilik I, Vaquerizas JM, Luscombe NM, Akhtar A. 2012. The MOF chromobarrel domain controls genome-wide H4K16 acetylation and spreading of the MSL complex. *Dev Cell* **22**: 610-624.
- Contzler R, Regamey A, Favre B, Roger T, Hohl D, Huber M. 2006. Histone acetyltransferase HBO1 inhibits NF-kappaB activity by coactivator sequestration. *Biochem Biophys Res Commun* **350**: 208-213.
- Cook PJ, Ju BG, Telese F, Wang X, Glass CK, Rosenfeld MG. 2009. Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* **458**: 591-596.
- Corey LL, Weirich CS, Benjamin IJ, Kingston RE. 2003. Localized recruitment of a chromatin-remodeling activity by an activator in vivo drives transcriptional elongation. *Genes Dev* **17**: 1392-1401.
- Costanzi C, Pehrson JR. 1998. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**: 599-601.
- Couture JF, Collazo E, Trievel RC. 2006. Molecular recognition of histone H3 by the WD40 protein WDR5. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 698-703.
- Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA et al. 2010. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 21931-21936.
- Crump JG, Swartz ME, Eberhart JK, Kimmel CB. 2006. Moz-dependent Hox expression controls segment-specific fate maps of skeletal precursors in the face. *Development* **133**: 2661-2669.
- Das C, Lucia MS, Hansen KC, Tyler JK. 2009. CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* **459**: 113-117.
- Daugaard M, Baude A, Fugger K, Povlsen LK, Beck H, Sorensen CS, Petersen NH, Sorensen PH, Lukas C, Bartek J et al. 2012. LEDGF (p75) promotes DNA-end resection and homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*.
- Dawson MA, Kouzarides T. 2012. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* **150**: 12-27.
- de Almeida SF, Carmo-Fonseca M. 2012. Design principles of interconnections between chromatin and pre-mRNA splicing. *Trends in biochemical sciences* **37**: 248-253.
- de la Serna IL, Carlson KA, Imbalzano AN. 2001. Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat Genet* **27**: 187-190.
- de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M et al. 2004. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* **7**: 663-676.
- Deguchi K, Ayton PM, Carapeti M, Kutok JL, Snyder CS, Williams IR, Cross NC, Glass CK, Cleary ML, Gilliland DG. 2003. MOZ-TIF2-induced acute myeloid leukemia requires the MOZ nucleosome binding motif and TIF2-mediated recruitment of CBP. *Cancer Cell* **3**: 259-271.
- Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**: 491-496.
- Dorigo B, Schalch T, Bystricky K, Richmond TJ. 2003. Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J Mol Biol* **327**: 85-96.
- Dormann HL, Tseng BS, Allis CD, Funabiki H, Fischle W. 2006. Dynamic regulation of effector protein binding to histone modifications: the biology of HP1 switching. *Cell Cycle* **5**: 2842-2851.
- Dover J, Schneider J, Tawiah-Boateng MA, Wood A, Dean K, Johnston M, Shilatifard A. 2002. Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J Biol Chem* **277**: 28368-28371.

- Downs JA, Allard S, Jobin-Robitaille O, Javaheri A, Auger A, Bouchard N, Kron SJ, Jackson SP, Cote J. 2004. Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell* **16**: 979-990.
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Cote V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ, Cote J. 2006. ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* **21**: 51-64.
- Doyon Y, Selleck W, Lane WS, Tan S, Cote J. 2004. Structural and functional conservation of the NuA4 histone acetyltransferase complex from yeast to humans. *Mol Cell Biol* **24**: 1884-1896.
- Draker R, Ng MK, Sarcinella E, Ignatchenko V, Kislinger T, Cheung P. 2012. A combination of H2A.Z and H4 acetylation recruits Brd2 to chromatin during transcriptional activation. *PLoS Genet* **8**: e1003047.
- Drane P, Ouararhni K, Depaux A, Shuaib M, Hamiche A. 2010. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev* **24**: 1253-1265.
- Driscoll R, Hudson A, Jackson SP. 2007. Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56. *Science* **315**: 649-652.
- Drogaris P, Villeneuve V, Pomies C, Lee EH, Bourdeau V, Bonneil E, Ferbeyre G, Verreault A, Thibault P. 2012. Histone deacetylase inhibitors globally enhance h3/h4 tail acetylation without affecting h3 lysine 56 acetylation. *Sci Rep* **2**: 220.
- Du J, Kelly AE, Funabiki H, Patel DJ. 2012. Structural basis for recognition of H3T3ph and Smac/DIABLO N-terminal peptides by human Survivin. *Structure* **20**: 185-195.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**: 817-825.
- Elsasser SJ, Huang H, Lewis PW, Chin JW, Allis CD, Patel DJ. 2012. DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. *Nature* **491**: 560-565.
- Ernst J, Kheradpour P, Mikkelsen TS, Shores N, Ward LD, Epstein CB, Zhang X, Wang L, Issner R, Coyne M et al. 2011. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* **473**: 43-49.
- Eustermann S, Yang JC, Law MJ, Amos R, Chapman LM, Jelinska C, Garrick D, Clynes D, Gibbons RJ, Rhodes D et al. 2011. Combinatorial readout of histone H3 modifications specifies localization of ATRX to heterochromatin. *Nature structural & molecular biology* **18**: 777-782.
- Fang J, Chen T, Chadwick B, Li E, Zhang Y. 2004. Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J Biol Chem* **279**: 52812-52815.
- Fazio TG, Kooperberg C, Goldmark JP, Neal C, Basom R, Delrow J, Tsukiyama T. 2001. Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **21**: 6450-6460.
- Felsenfeld G, Groudine M. 2003. Controlling the double helix. *Nature* **421**: 448-453.
- Feng Y, Wang J, Asher S, Hoang L, Guardiani C, Ivanov I, Zheng YG. 2011. Histone H4 acetylation differentially modulates arginine methylation by an in Cis mechanism. *J Biol Chem* **286**: 20323-20334.
- Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD, Bonner WM, Manova K, Burgoyne P, Nussenzweig A. 2003. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* **4**: 497-508.
- Fierz B, Chatterjee C, McGinty RK, Bar-Dagan M, Raleigh DP, Muir TW. 2011. Histone H2B ubiquitylation disrupts local and higher-order chromatin compaction. *Nat Chem Biol* **7**: 113-119.

- Filippakopoulos P, Picaud S, Mangos M, Keates T, Lambert JP, Barsyte-Lovejoy D, Felletar I, Volkmer R, Muller S, Pawson T et al. 2012. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell* **149**: 214-231.
- Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, Morse EM, Keates T, Hickman TT, Felletar I et al. 2010. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* **468**: 1067-1073.
- Fingerman IM, Li HC, Briggs SD. 2007. A charge-based interaction between histone H4 and Dot1 is required for H3K79 methylation and telomere silencing: identification of a new trans-histone pathway. *Genes Dev* **21**: 2018-2029.
- Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H, Allis CD. 2005. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**: 1116-1122.
- Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S. 2003. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* **17**: 1870-1881.
- Flanagan JF, Mi LZ, Chruszcz M, Cymborowski M, Clines KL, Kim Y, Minor W, Rastinejad F, Khorasanizadeh S. 2005. Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* **438**: 1181-1185.
- Flanagan JF, Peterson CL. 1999. A role for the yeast SWI/SNF complex in DNA replication. *Nucleic Acids Res* **27**: 2022-2028.
- Foy RL, Song IY, Chitalia VC, Cohen HT, Saksouk N, Cayrou C, Vaziri C, Cote J, Panchenko MV. 2008. Role of Jade-1 in the histone acetyltransferase (HAT) HBO1 complex. *J Biol Chem* **283**: 28817-28826.
- Fujita N, Jaye DL, Geigerman C, Akyildiz A, Mooney MR, Boss JM, Wade PA. 2004. MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B lymphocyte differentiation. *Cell* **119**: 75-86.
- Furuyama T, Henikoff S. 2009. Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils. *Cell* **138**: 104-113.
- Fyodorov DV, Kadonaga JT. 2002. Dynamics of ATP-dependent chromatin assembly by ACF. *Nature* **418**: 897-900.
- Gambus A, Jones RC, Sanchez-Diaz A, Kanemaki M, van Deursen F, Edmondson RD, Labib K. 2006. GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol* **8**: 358-366.
- Garabedian MV, Noguchi C, Ziegler MA, Das MM, Singh T, Harper LJ, Leman AR, Khair L, Moser BA, Nakamura TM et al. 2012. The double-bromodomain proteins Bdf1 and Bdf2 modulate chromatin structure to regulate S-phase stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **190**: 487-500.
- Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K. 1996. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* **14**: 415-420.
- Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova O, Xu L, Winkler F, Brown E, Barnett GH, Jain RK. 2004. The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature* **428**: 328-332.
- Georgiakaki M, Chabbert-Buffet N, Dasen B, Meduri G, Wenk S, Rajhi L, Amazit L, Chauchereau A, Burger CW, Blok LJ et al. 2006. Ligand-controlled interaction of histone acetyltransferase binding to ORC-1 (HBO1) with the N-terminal transactivating domain of progesterone receptor induces steroid receptor coactivator 1-dependent coactivation of transcription. *Mol Endocrinol* **20**: 2122-2140.
- Gevry N, Chan HM, Laflamme L, Livingston DM, Gaudreau L. 2007. p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* **21**: 1869-1881.

- Ginjala V, Nacerddine K, Kulkarni A, Oza J, Hill SJ, Yao M, Citterio E, van Lohuizen M, Ganesan S. 2011. BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA damage-induced H2A ubiquitination and repair. *Mol Cell Biol* **31**: 1972-1982.
- Ginsburg DS, Govind CK, Hinnebusch AG. 2009. NuA4 lysine acetyltransferase Esa1 is targeted to coding regions and stimulates transcription elongation with Gcn5. *Mol Cell Biol* **29**: 6473-6487.
- Giordano A, Avantaggiati ML. 1999. p300 and CBP: partners for life and death. *J Cell Physiol* **181**: 218-230.
- Gironella M, Malicet C, Cano C, Sandi MJ, Hamidi T, Tauil RM, Baston M, Valaco P, Moreno S, Lopez F et al. 2009. p8/nupr1 regulates DNA-repair activity after double-strand gamma irradiation-induced DNA damage. *J Cell Physiol* **221**: 594-602.
- Goldmark JP, Fazio TG, Estep PW, Church GM, Tsukiyama T. 2000. The Isw2 chromatin remodeling complex represses early meiotic genes upon recruitment by Ume6p. *Cell* **103**: 423-433.
- Goodman RH, Smolik S. 2000. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* **14**: 1553-1577.
- Gorrini C, Squatrito M, Luise C, Syed N, Perna D, Wark L, Martinato F, Sardella D, Verrecchia A, Bennett S et al. 2007. Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature* **448**: 1063-1067.
- Govind CK, Zhang F, Qiu H, Hofmeyer K, Hinnebusch AG. 2007. Gcn5 promotes acetylation, eviction, and methylation of nucleosomes in transcribed coding regions. *Mol Cell* **25**: 31-42.
- Greshock J, Bachman KE, Degenhardt YY, Jing J, Wen YH, Eastman S, McNeil E, Moy C, Wegrzyn R, Auger K et al. Molecular target class is predictive of in vitro response profile. *Cancer Res* **70**: 3677-3686.
- Grienerberger A, Miotto B, Sagnier T, Cavalli G, Schramke V, Geli V, Mariol MC, Berenger H, Graba Y, Pradel J. 2002. The MYST domain acetyltransferase Chameau functions in epigenetic mechanisms of transcriptional repression. *Curr Biol* **12**: 762-766.
- Grimm C, de Ayala Alonso AG, Rybin V, Steuerwald U, Ly-Hartig N, Fischle W, Muller J, Muller CW. 2007. Structural and functional analyses of methyl-lysine binding by the malignant brain tumour repeat protein Sex comb on midleg. *EMBO Rep* **8**: 1031-1037.
- Grosso R, Richter JD. 2011. CPEB control of NF-kappaB nuclear localization and interleukin-6 production mediates cellular senescence. *Mol Cell Biol* **31**: 2707-2714.
- Groth A, Corpet A, Cook AJ, Roche D, Bartek J, Lukas J, Almouzni G. 2007. Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. *Science* **318**: 1928-1931.
- Guarente L. 2000. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev* **14**: 1021-1026.
- Guo Y, Nady N, Qi C, Allali-Hassani A, Zhu H, Pan P, Adams-Cioaba MA, Amaya MF, Dong A, Vedadi M et al. 2009. Methylation-state-specific recognition of histones by the MBT repeat protein L3MBTL2. *Nucleic Acids Res* **37**: 2204-2210.
- Gupta A, Guerin-Peyrou TG, Sharma GG, Park C, Agarwal M, Ganju RK, Pandita S, Choi K, Sukumar S, Pandita RK et al. 2008. The mammalian ortholog of Drosophila MOF that acetylates histone H4 lysine 16 is essential for embryogenesis and oncogenesis. *Mol Cell Biol* **28**: 397-409.
- Gupta A, Sharma GG, Young CS, Agarwal M, Smith ER, Paull TT, Lucchesi JC, Khanna KK, Ludwig T, Pandita TK. 2005. Involvement of human MOF in ATM function. *Mol Cell Biol* **25**: 5292-5305.
- Hakimi MA, Bochar DA, Schmiesing JA, Dong Y, Barak OG, Speicher DW, Yokomori K, Shiekhhattar R. 2002. A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes. *Nature* **418**: 994-998.

- Han J, Zhou H, Horazdovsky B, Zhang K, Xu RM, Zhang Z. 2007. Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication. *Science* **315**: 653-655.
- Han Z, Guo L, Wang H, Shen Y, Deng XW, Chai J. 2006. Structural basis for the specific recognition of methylated histone H3 lysine 4 by the WD-40 protein WDR5. *Mol Cell* **22**: 137-144.
- Hargreaves DC, Crabtree GR. 2011. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res* **21**: 396-420.
- Hassan AH, Prochasson P, Neely KE, Galasinski SC, Chandy M, Carrozza MJ, Workman JL. 2002. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* **111**: 369-379.
- Havasi A, Haegele JA, Gall JM, Blackmon S, Ichimura T, Bonegio RG, Panchenko MV. 2013. Histone acetyl transferase (HAT) HBO1 and JADE1 in epithelial cell regeneration. *Am J Pathol* **182**: 152-162.
- He F, Umehara T, Saito K, Harada T, Watanabe S, Yabuki T, Kigawa T, Takahashi M, Kuwasako K, Tsuda K et al. 2010a. Structural insight into the zinc finger CW domain as a histone modification reader. *Structure* **18**: 1127-1139.
- He HH, Meyer CA, Shin H, Bailey ST, Wei G, Wang Q, Zhang Y, Xu K, Ni M, Lupien M et al. 2010b. Nucleosome dynamics define transcriptional enhancers. *Nat Genet* **42**: 343-347.
- Heintzman ND, Hon GC, Hawkins RD, Kheradpour P, Stark A, Harp LF, Ye Z, Lee LK, Stuart RK, Ching CW et al. 2009. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* **459**: 108-112.
- Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA et al. 2007. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* **39**: 311-318.
- Helbing CC, Veillette C, Riabowol K, Johnston RN, Garkavtsev I. 1997. A novel candidate tumor suppressor, ING1, is involved in the regulation of apoptosis. *Cancer Res* **57**: 1255-1258.
- Heo K, Kim H, Choi SH, Choi J, Kim K, Gu J, Lieber MR, Yang AS, An W. 2008. FACT-mediated exchange of histone variant H2AX regulated by phosphorylation of H2AX and ADP-ribosylation of Spt16. *Mol Cell* **30**: 86-97.
- Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM. 2005. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature* **438**: 1176-1180.
- Horton JR, Upadhyay AK, Qi HH, Zhang X, Shi Y, Cheng X. 2010. Enzymatic and structural insights for substrate specificity of a family of jumonji histone lysine demethylases. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 38-43.
- Howe L, Kusch T, Muster N, Chaterji R, Yates JR, 3rd, Workman JL. 2002. Yng1p modulates the activity of Sas3p as a component of the yeast NuA3 Hhistone acetyltransferase complex. *Mol Cell Biol* **22**: 5047-5053.
- Hsiao PW, Fryer CJ, Trotter KW, Wang W, Archer TK. 2003. BAF60a mediates critical interactions between nuclear receptors and the BRG1 chromatin-remodeling complex for transactivation. *Mol Cell Biol* **23**: 6210-6220.
- Hu L, Li Z, Wang P, Lin Y, Xu Y. 2011. Crystal structure of PHD domain of UHRF1 and insights into recognition of unmodified histone H3 arginine residue 2. *Cell Res* **21**: 1374-1378.
- Huang J, Hsu JM, Laurent BC. 2004. The RSC nucleosome-remodeling complex is required for Cohesin's association with chromosome arms. *Mol Cell* **13**: 739-750.
- Huang J, Tan S. 2013. Piccolo NuA4-catalyzed acetylation of nucleosomal histones: critical roles of an Esa1 Tudor/chromo barrel loop and an Epl1 enhancer of polycomb A (EPcA) basic region. *Mol Cell Biol* **33**: 159-169.
- Huang X, Gao X, Diaz-Trelles R, Ruiz-Lozano P, Wang Z. 2008. Coronary development is regulated by ATP-dependent SWI/SNF chromatin remodeling component BAF180. *Dev Biol* **319**: 258-266.

- Huang Y, Fang J, Bedford MT, Zhang Y, Xu RM. 2006. Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science* **312**: 748-751.
- Huen MS, Grant R, Manke I, Minn K, Yu X, Yaffe MB, Chen J. 2007. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* **131**: 901-914.
- Hung T, Binda O, Champagne KS, Kuo AJ, Johnson K, Chang HY, Simon MD, Kutateladze TG, Gozani O. 2009. ING4 mediates crosstalk between histone H3 K4 trimethylation and H3 acetylation to attenuate cellular transformation. *Mol Cell* **33**: 248-256.
- Huttlin EL, Jedrychowski MP, Elias JE, Goswami T, Rad R, Beausoleil SA, Villen J, Haas W, Sowa ME, Gygi SP. 2010. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* **143**: 1174-1189.
- Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA, Jr., Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD. 2004. Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* **432**: 406-411.
- Hwang WW, Venkatasubrahmanyam S, Ianculescu AG, Tong A, Boone C, Madhani HD. 2003. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell* **11**: 261-266.
- Iizuka M, Matsui T, Takisawa H, Smith MM. 2006. Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Mol Cell Biol* **26**: 1098-1108.
- Iizuka M, Sarmiento OF, Sekiya T, Scrabble H, Allis CD, Smith MM. 2008. Hbo1 Links p53-dependent stress signaling to DNA replication licensing. *Mol Cell Biol* **28**: 140-153.
- Iizuka M, Stillman B. 1999. Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J Biol Chem* **274**: 23027-23034.
- Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, Groisman R, Wang J, Horikoshi M, Scully R, Qin J, Nakatani Y. 2000. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell* **102**: 463-473.
- Ikura T, Tashiro S, Kakino A, Shima H, Jacob N, Amunugama R, Yoder K, Izumi S, Kuraoka I, Tanaka K et al. 2007. DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol* **27**: 7028-7040.
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**: 795-800.
- Iwase S, Xiang B, Ghosh S, Ren T, Lewis PW, Cochrane JC, Allis CD, Picketts DJ, Patel DJ, Li H et al. 2011. ATRX ADD domain links an atypical histone methylation recognition mechanism to human mental-retardation syndrome. *Nature structural & molecular biology* **18**: 769-776.
- Iyer NG, Ozdag H, Caldas C. 2004. p300/CBP and cancer. *Oncogene* **23**: 4225-4231.
- Jacobs SA, Khorasanizadeh S. 2002. Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* **295**: 2080-2083.
- Jacobson RH, Ladurner AG, King DS, Tjian R. 2000. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module.[see comment]. *Science* **288**: 1422-1425.
- Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080.
- Jeong KW, Kim K, Situ AJ, Ulmer TS, An W, Stallcup MR. 2011. Recognition of enhancer element-specific histone methylation by TIP60 in transcriptional activation. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 1358-1365.
- Jeyaprakash AA, Basquin C, Jayachandran U, Conti E. 2011. Structural basis for the recognition of phosphorylated histone h3 by the survivin subunit of the chromosomal passenger complex. *Structure* **19**: 1625-1634.
- Jha S, Shibata E, Dutta A. 2008. Human Rvb1/Tip49 is required for the histone acetyltransferase activity of Tip60/NuA4 and for the downregulation of phosphorylation on H2AX after DNA damage. *Mol Cell Biol* **28**: 2690-2700.

- Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X. 2007. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* **449**: 248-251.
- Jin C, Zang C, Wei G, Cui K, Peng W, Zhao K, Felsenfeld G. 2009. H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet* **41**: 941-945.
- Johmura Y, Osada S, Nishizuka M, Imagawa M. 2008. FAD24 acts in concert with histone acetyltransferase HBO1 to promote adipogenesis by controlling DNA replication. *J Biol Chem* **283**: 2265-2274.
- Jonsson ZO, Jha S, Wohlschlegel JA, Dutta A. 2004. Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. *Mol Cell* **16**: 465-477.
- Joshi AA, Struhl K. 2005. Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol Cell* **20**: 971-978.
- Jung YS, Qian Y, Chen X. 2010. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal* **22**: 1003-1012.
- Kadosh D, Struhl K. 1997. Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* **89**: 365-371.
- Kaji K, Caballero IM, MacLeod R, Nichols J, Wilson VA, Hendrich B. 2006. The NuRD component Mbd3 is required for pluripotency of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* **8**: 285-292.
- Kan PY, Caterino TL, Hayes JJ. 2009. The H4 tail domain participates in intra- and internucleosome interactions with protein and DNA during folding and oligomerization of nucleosome arrays. *Mol Cell Biol* **29**: 538-546.
- Kasten M, Szerlong H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Werner M, Cairns BR. 2004. Tandem bromodomains in the chromatin remodeler RSC recognize acetylated histone H3 Lys14. *EMBO J* **23**: 1348-1359.
- Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I. 2006. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev* **20**: 1321-1330.
- Keogh MC, Kurdistani SK, Morris SA, Ahn SH, Podolny V, Collins SR, Schuldiner M, Chin K, Punna T, Thompson NJ et al. 2005. Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* **123**: 593-605.
- Kim D, Blus BJ, Chandra V, Huang P, Rastinejad F, Khorasanizadeh S. 2010a. Corecognition of DNA and a methylated histone tail by the MSL3 chromodomain. *Nature structural & molecular biology* **17**: 1027-1029.
- Kim J, Kim JA, McGinty RK, Nguyen UT, Muir TW, Allis CD, Roeder RG. 2013. The n-SET domain of Set1 regulates H2B ubiquitylation-dependent H3K4 methylation. *Mol Cell* **49**: 1121-1133.
- Kim JA, Haber JE. 2009. Chromatin assembly factors Asf1 and CAF-1 have overlapping roles in deactivating the DNA damage checkpoint when DNA repair is complete. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1151-1156.
- Kim MY, Ann EJ, Kim JY, Mo JS, Park JH, Kim SY, Seo MS, Park HS. 2007. Tip60 histone acetyltransferase acts as a negative regulator of Notch1 signaling by means of acetylation. *Mol Cell Biol* **27**: 6506-6519.
- Kim S, Chin K, Gray JW, Bishop JM. 2004. A screen for genes that suppress loss of contact inhibition: identification of ING4 as a candidate tumor suppressor gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16251-16256.
- Kim S, Welm AL, Bishop JM. 2010b. A dominant mutant allele of the ING4 tumor suppressor found in human cancer cells exacerbates MYC-initiated mouse mammary tumorigenesis. *Cancer Res* **70**: 5155-5162.
- Kimura A, Umehara T, Horikoshi M. 2002. Chromosomal gradient of histone acetylation established by Sas2p and Sir2p functions as a shield against gene silencing. *Nat Genet* **32**: 370-377.

- Kitabayashi I, Aikawa Y, Nguyen LA, Yokoyama A, Ohki M. 2001. Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein. *EMBO J* **20**: 7184-7196.
- Kizer KO, Phatnani HP, Shibata Y, Hall H, Greenleaf AL, Strahl BD. 2005. A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation. *Mol Cell Biol* **25**: 3305-3316.
- Kleff S, Andrulis ED, Anderson CW, Sternglanz R. 1995. Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J Biol Chem* **270**: 24674-24677.
- Klymenko T, Papp B, Fischle W, Kocher T, Schelder M, Fritsch C, Wild B, Wilm M, Muller J. 2006. A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes & development* **20**: 1110-1122.
- Kobor MS, Venkatasubrahmanyam S, Meneghini MD, Gin JW, Jennings JL, Link AJ, Madhani HD, Rine J. 2004. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* **2**: E131.
- Koerber RT, Rhee HS, Jiang C, Pugh BF. 2009. Interaction of transcriptional regulators with specific nucleosomes across the *Saccharomyces* genome. *Mol Cell* **35**: 889-902.
- Kolas NK, Chapman JR, Nakada S, Ylanko J, Chahwan R, Sweeney FD, Panier S, Mendez M, Wildenhain J, Thomson TM et al. 2007. Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* **318**: 1637-1640.
- Korber P, Barbaric S, Luckenbach T, Schmid A, Schermer UJ, Blaschke D, Horz W. 2006. The histone chaperone Asf1 increases the rate of histone eviction at the yeast PHO5 and PHO8 promoters. *J Biol Chem* **281**: 5539-5545.
- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693-705.
- Kueh AJ, Dixon MP, Voss AK, Thomas T. 2011. HBO1 is required for H3K14 acetylation and normal transcriptional activity during embryonic development. *Mol Cell Biol* **31**: 845-860.
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS. 2008. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**: 1019-1031.
- Kumamoto K, Spillare EA, Fujita K, Horikawa I, Yamashita T, Appella E, Nagashima M, Takenoshita S, Yokota J, Harris CC. 2008. Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res* **68**: 3193-3203.
- Kuo AJ, Song J, Cheung P, Ishibe-Murakami S, Yamazoe S, Chen JK, Patel DJ, Gozani O. 2012. The BAH domain of ORC1 links H4K20me2 to DNA replication licensing and Meier-Gorlin syndrome. *Nature* **484**: 115-119.
- Kuo MH, Brownell JE, Sobel RE, Ranalli TA, Cook RG, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD. 1996. Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* **383**: 269-272.
- Kusch T, Florens L, Macdonald WH, Swanson SK, Glaser RL, Yates JR, 3rd, Abmayr SM, Washburn MP, Workman JL. 2004. Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science* **306**: 2084-2087.
- Kutateladze TG. 2010. Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat Chem Biol* **6**: 507-513.
- Kwon H, Imbalzano AN, Khavari PA, Kingston RE, Green MR. 1994. Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature* **370**: 477-481.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116-120.
- Lacoste N, Utley RT, Hunter JM, Poirier GG, Cote J. 2002. Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone H3 methyltransferase. *J Biol Chem* **277**: 30421-30424.

- Lan F, Collins RE, De Cegli R, Alpatov R, Horton JR, Shi X, Gozani O, Cheng X, Shi Y. 2007. Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression. *Nature* **448**: 718-722.
- Lan F, Nottke AC, Shi Y. 2008. Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 316-325.
- Lange M, Kaynak B, Forster UB, Tonjes M, Fischer JJ, Grimm C, Schlesinger J, Just S, Dunkel I, Krueger T et al. 2008. Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex. *Genes Dev* **22**: 2370-2384.
- Larrieu D, Ythier D, Binet R, Brambilla C, Brambilla E, Sengupta S, Pedoux R. 2009. ING2 controls the progression of DNA replication forks to maintain genome stability. *EMBO Rep* **10**: 1168-1174.
- Larrieu D, Ythier D, Brambilla C, Pedoux R. 2010. ING2 controls the G1 to S-phase transition by regulating p21 expression. *Cell Cycle* **9**: 3984-3990.
- Latham JA, Dent SY. 2007. Cross-regulation of histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 1017-1024.
- Laue K, Daujat S, Crump JG, Plaster N, Roehl HH, Kimmel CB, Schneider R, Hammerschmidt M. 2008. The multidomain protein Brpf1 binds histones and is required for Hox gene expression and segmental identity. *Development* **135**: 1935-1946.
- Leduc C, Claverie P, Eymin B, Col E, Khochbin S, Brambilla E, Gazzeri S. 2006. p14ARF promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation. *Oncogene* **25**: 4147-4154.
- Lee HS, Park JH, Kim SJ, Kwon SJ, Kwon J. 2010. A cooperative activation loop among SWI/SNF, gamma-H2AX and H3 acetylation for DNA double-strand break repair. *EMBO J* **29**: 1434-1445.
- Lee J, Thompson JR, Botuyan MV, Mer G. 2008. Distinct binding modes specify the recognition of methylated histones H3K4 and H4K20 by JMJD2A-tudor. *Nature structural & molecular biology* **15**: 109-111.
- Lee JS, Shukla A, Schneider J, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, Bhaumik SR, Shilatifard A. 2007. Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell* **131**: 1084-1096.
- Lee KK, Workman JL. 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 284-295.
- Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K et al. 2006. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**: 301-313.
- Legube G, Linares LK, Tyteca S, Caron C, Scheffner M, Chevillard-Briet M, Trouche D. 2004. Role of the histone acetyl transferase Tip60 in the p53 pathway. *J Biol Chem* **279**: 44825-44833.
- Lessard J, Wu JI, Ranish JA, Wan M, Winslow MM, Staahl BT, Wu H, Aebersold R, Graef IA, Crabtree GR. 2007. An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development. *Neuron* **55**: 201-215.
- Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC, Allis CD. 2010. Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 14075-14080.
- Li B, Carey M, Workman JL. 2007a. The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**: 707-719.
- Li B, Gogol M, Carey M, Lee D, Seidel C, Workman JL. 2007b. Combined action of PHD and chromo domains directs the Rpd3S HDAC to transcribed chromatin. *Science* **316**: 1050-1054.
- Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**: 1754-1760.

- Li H, Fischle W, Wang W, Duncan EM, Liang L, Murakami-Ishibe S, Allis CD, Patel DJ. 2007c. Structural basis for lower lysine methylation state-specific readout by MBT repeats of L3MBTL1 and an engineered PHD finger. *Mol Cell* **28**: 677-691.
- Li H, Ilin S, Wang W, Duncan EM, Wysocka J, Allis CD, Patel DJ. 2006. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* **442**: 91-95.
- Li J, Santoro R, Koberna K, Grummt I. 2005. The chromatin remodeling complex NoRC controls replication timing of rRNA genes. *EMBO J* **24**: 120-127.
- Li Q, Zhou H, Wurtele H, Davies B, Horazdovsky B, Verreault A, Zhang Z. 2008. Acetylation of histone H3 lysine 56 regulates replication-coupled nucleosome assembly. *Cell* **134**: 244-255.
- Li X, Wu L, Corsa CA, Kunkel S, Dou Y. 2009. Two mammalian MOF complexes regulate transcription activation by distinct mechanisms. *Mol Cell* **36**: 290-301.
- Liang G, Lin JC, Wei V, Yoo C, Cheng JC, Nguyen CT, Weisenberger DJ, Egger G, Takai D, Gonzales FA et al. 2004. Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7357-7362.
- Lickert H, Takeuchi JK, Von Both I, Walls JR, McAuliffe F, Adamson SL, Henkelman RM, Wrana JL, Rossant J, Bruneau BG. 2004. Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature* **432**: 107-112.
- Lin SM, Du P, Huber W, Kibbe WA. 2008. Model-based variance-stabilizing transformation for Illumina microarray data. *Nucleic Acids Res* **36**: e11.
- Liu CP, Xiong C, Wang M, Yu Z, Yang N, Chen P, Zhang Z, Li G, Xu RM. 2012a. Structure of the variant histone H3.3-H4 heterodimer in complex with its chaperone DAXX. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 1287-1292.
- Liu K, Guo Y, Liu H, Bian C, Lam R, Liu Y, Mackenzie F, Rojas LA, Reinberg D, Bedford MT et al. 2012b. Crystal structure of TDRD3 and methyl-arginine binding characterization of TDRD3, SMN and SPF30. *PLoS One* **7**: e30375.
- Liu L, Qin S, Zhang J, Ji P, Shi Y, Wu J. 2012c. Solution structure of an atypical PHD finger in BRPF2 and its interaction with DNA. *J Struct Biol* **180**: 165-173.
- Liu Y, Subrahmanyam R, Chakraborty T, Sen R, Desiderio S. 2007. A plant homeodomain in RAG-2 that binds Hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement. *Immunity* **27**: 561-571.
- Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL. 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.
- Luco RF, Pan Q, Tominaga K, Blencowe BJ, Pereira-Smith OM, Misteli T. 2010. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* **327**: 996-1000.
- Luger K, Mader A, Sargent DF, Richmond TJ. 2000. The atomic structure of the nucleosome core particle. *J Biomol Struct Dyn* **17 Suppl 1**: 185-188.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251-260.
- Ma MK, Heath C, Hair A, West AG. 2011. Histone crosstalk directed by H2B ubiquitination is required for chromatin boundary integrity. *PLoS Genet* **7**: e1002175.
- Macdonald N, Welburn JP, Noble ME, Nguyen A, Yaffe MB, Clynes D, Moggs JG, Orphanides G, Thomson S, Edmunds JW et al. 2005. Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Molecular cell* **20**: 199-211.
- Maier VK, Chioda M, Rhodes D, Becker PB. 2008. ACF catalyses chromatosome movements in chromatin fibres. *EMBO J* **27**: 817-826.

- Mailand N, Bekker-Jensen S, Fastrup H, Melander F, Bartek J, Lukas C, Lukas J. 2007. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* **131**: 887-900.
- Malik HS, Henikoff S. 2003. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* **10**: 882-891.
- Mallete FA, Mattioli F, Cui G, Young LC, Hendzel MJ, Mer G, Sixma TK, Richard S. 2012. RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *EMBO J* **31**: 1865-1878.
- Maltby VE, Martin BJ, Brind'Amour J, Chruscicki AT, McBurney KL, Schulze JM, Johnson IJ, Hills M, Hentrich T, Kobor MS et al. 2012a. Histone H3K4 demethylation is negatively regulated by histone H3 acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 18505-18510.
- Maltby VE, Martin BJ, Schulze JM, Johnson I, Hentrich T, Sharma A, Kobor MS, Howe L. 2012b. Histone H3 Lysine 36 Methylation Targets the Isw1b Remodeling Complex to Chromatin. *Mol Cell Biol*.
- Mansfield RE, Musselman CA, Kwan AH, Oliver SS, Garske AL, Davrazou F, Denu JM, Kutateladze TG, Mackay JP. 2011. Plant homeodomain (PHD) fingers of CHD4 are histone H3-binding modules with preference for unmodified H3K4 and methylated H3K9. *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 11779-11791.
- Margueron R, Justin N, Ohno K, Sharpe ML, Son J, Drury WJ, 3rd, Voigt P, Martin SR, Taylor WR, De Marco V et al. 2009. Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* **461**: 762-767.
- Margueron R, Reinberg D. 2011. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**: 343-349.
- Marteijn JA, Bekker-Jensen S, Mailand N, Lans H, Schwertman P, Gourdin AM, Dantuma NP, Lukas J, Vermeulen W. 2009. Nucleotide excision repair-induced H2A ubiquitination is dependent on MDC1 and RNF8 and reveals a universal DNA damage response. *J Cell Biol* **186**: 835-847.
- Martin DG, Baetz K, Shi X, Walter KL, MacDonald VE, Wlodarski MJ, Gozani O, Hieter P, Howe L. 2006. The Yng1p plant homeodomain finger is a methyl-histone binding module that recognizes lysine 4-methylated histone H3. *Mol Cell Biol* **26**: 7871-7879.
- Martin M, Kettmann R, Dequiedt F. 2007. Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. *Oncogene* **26**: 5450-5467.
- Masumoto H, Hawke D, Kobayashi R, Verreault A. 2005. A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature* **436**: 294-298.
- Matangkasombut O, Buratowski S. 2003. Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol Cell* **11**: 353-363.
- Matthews AG, Kuo AJ, Ramon-Maiques S, Han S, Champagne KS, Ivanov D, Gallardo M, Carney D, Cheung P, Ciccone DN et al. 2007. RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* **450**: 1106-1110.
- McMahon SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD, Cole MD. 1998. The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* **94**: 363-374.
- Merson TD, Dixon MP, Collin C, Rietze RL, Bartlett PF, Thomas T, Voss AK. 2006. The transcriptional coactivator Querkopf controls adult neurogenesis. *J Neurosci* **26**: 11359-11370.
- Micci F, Panagopoulos I, Bjerkehagen B, Heim S. 2006. Consistent rearrangement of chromosomal band 6p21 with generation of fusion genes JAZF1/PHF1 and EPC1/PHF1 in endometrial stromal sarcoma. *Cancer Res* **66**: 107-112.
- Migliori V, Muller J, Phalke S, Low D, Bezzi M, Mok WC, Sahu SK, Gunaratne J, Capasso P, Bassi C et al. 2012. Symmetric dimethylation of H3R2 is a newly identified histone mark

- that supports euchromatin maintenance. *Nature structural & molecular biology* **19**: 136-144.
- Miller CT, Maves L, Kimmel CB. 2004. *moz* regulates Hox expression and pharyngeal segmental identity in zebrafish. *Development* **131**: 2443-2461.
- Min J, Allali-Hassani A, Nady N, Qi C, Ouyang H, Liu Y, MacKenzie F, Vedadi M, Arrowsmith CH. 2007. L3MBTL1 recognition of mono- and dimethylated histones. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 1229-1230.
- Min J, Zhang Y, Xu RM. 2003. Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev* **17**: 1823-1828.
- Minsky N, Shema E, Field Y, Schuster M, Segal E, Oren M. 2008. Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nat Cell Biol* **10**: 483-488.
- Miotto B, Sagnier T, Berenger H, Bohmann D, Pradel J, Graba Y. 2006. Chameau HAT and DRpd3 HDAC function as antagonistic cofactors of JNK/AP-1-dependent transcription during *Drosophila* metamorphosis. *Genes Dev* **20**: 101-112.
- Miotto B, Struhl K. 2008. HBO1 histone acetylase is a coactivator of the replication licensing factor Cdt1. *Genes Dev* **22**: 2633-2638.
- Miotto B, Struhl K. 2010. HBO1 histone acetylase activity is essential for DNA replication licensing and inhibited by Geminin. *Mol Cell* **37**: 57-66.
- Mishima Y, Miyagi S, Saraya A, Negishi M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Katsumoto T, Chiba T et al. 2011. The Hbo1-Brd1/Brpf2 complex is responsible for global acetylation of H3K14 and required for fetal liver erythropoiesis. *Blood* **118**: 2443-2453.
- Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C. 2004. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**: 343-348.
- Mohan KN, Ding F, Chaillet JR. 2011. Distinct roles of DMAP1 in mouse development. *Mol Cell Biol* **31**: 1861-1869.
- Moll UM, Petrenko O. 2003. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res* **1**: 1001-1008.
- Moreau JL, Lee M, Mahachi N, Vary J, Mellor J, Tsukiyama T, Goding CR. 2003. Regulated displacement of TBP from the PHO8 promoter in vivo requires Cbfl and the Isw1 chromatin remodeling complex. *Mol Cell* **11**: 1609-1620.
- Moreno A, Palacios A, Orgaz JL, Jimenez B, Blanco FJ, Palmero I. 2010. Functional impact of cancer-associated mutations in the tumor suppressor protein ING4. *Carcinogenesis* **31**: 1932-1938.
- Morillon A, Karabetsou N, O'Sullivan J, Kent N, Proudfoot N, Mellor J. 2003. Isw1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II. *Cell* **115**: 425-435.
- Moriniere J, Rousseaux S, Steuerwald U, Soler-Lopez M, Curtet S, Vitte AL, Govin J, Gaucher J, Sadoul K, Hart DJ et al. 2009. Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**: 664-668.
- Morrison AJ, Highland J, Krogan NJ, Arbel-Eden A, Greenblatt JF, Haber JE, Shen X. 2004. INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* **119**: 767-775.
- Moyal L, Lerenthal Y, Gana-Weisz M, Mass G, So S, Wang SY, Eppink B, Chung YM, Shalev G, Shema E et al. 2011. Requirement of ATM-dependent monoubiquitylation of histone H2B for timely repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* **41**: 529-542.
- Murr R, Loizou JI, Yang YG, Cuenin C, Li H, Wang ZQ, Hecceg Z. 2006. Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol* **8**: 91-99.
- Musselman. 2012. Molecular basis for H3K36me3 recognition by the Tudor domain of PHF1. *NSMB*.

- Musselman CA, Kutateladze TG. 2011. Handpicking epigenetic marks with PHD fingers. *Nucleic acids research* **39**: 9061-9071.
- Musselman CA, Lalonde ME, Cote J, Kutateladze TG. 2012a. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 1218-1227.
- Musselman CA, Mansfield RE, Garske AL, Davrazou F, Kwan AH, Oliver SS, O'Leary H, Denu JM, Mackay JP, Kutateladze TG. 2009. Binding of the CHD4 PHD2 finger to histone H3 is modulated by covalent modifications. *The Biochemical journal* **423**: 179-187.
- Musselman CA, Ramirez J, Sims JK, Mansfield RE, Oliver SS, Denu JM, Mackay JP, Wade PA, Hagman J, Kutateladze TG. 2012b. Bivalent recognition of nucleosomes by the tandem PHD fingers of the CHD4 ATPase is required for CHD4-mediated repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 787-792.
- Nagashima M, Shiseki M, Miura K, Hagiwara K, Linke SP, Pedoux R, Wang XW, Yokota J, Riabowol K, Harris CC. 2001. DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9671-9676.
- Nagashima M, Shiseki M, Pedoux RM, Okamura S, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Yokota J, Harris CC. 2003. A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis. *Oncogene* **22**: 343-350.
- Nakagawa T, Kajitani T, Togo S, Masuko N, Ohdan H, Hishikawa Y, Koji T, Matsuyama T, Ikura T, Muramatsu M et al. 2008. Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes Dev* **22**: 37-49.
- Nakanishi S, Sanderson BW, Delventhal KM, Bradford WD, Staehling-Hampton K, Shilatifard A. 2008. A comprehensive library of histone mutants identifies nucleosomal residues required for H3K4 methylation. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 881-888.
- Ng HH, Ciccone DN, Morshead KB, Oettinger MA, Struhl K. 2003. Lysine-79 of histone H3 is hypomethylated at silenced loci in yeast and mammalian cells: a potential mechanism for position-effect variegation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1820-1825.
- Niedzialkowska E, Wang F, Porebski PJ, Minor W, Higgins JM, Stukenberg PT. 2012. Molecular basis for phosphospecific recognition of histone H3 tails by Survivin paralogs at inner centromeres. *Mol Biol Cell*.
- Nielsen PR, Nietlispach D, Mott HR, Callaghan J, Bannister A, Kouzarides T, Murzin AG, Murzina NV, Laue ED. 2002. Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature* **416**: 103-107.
- Okada Y, Feng Q, Lin Y, Jiang Q, Li Y, Coffield VM, Su L, Xu G, Zhang Y. 2005. hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell* **121**: 167-178.
- Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin SP, Allis CD et al. 2007. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* **448**: 714-717.
- Ozdemir A, Spicuglia S, Lasonder E, Vermeulen M, Campsteijn C, Stunnenberg HG, Logie C. 2005. Characterization of lysine 56 of histone H3 as an acetylation site in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**: 25949-25952.
- Ozer A, Wu LC, Bruick RK. 2005. The candidate tumor suppressor ING4 represses activation of the hypoxia inducible factor (HIF). *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7481-7486.
- Panagopoulos I, Fioretos T, Isaksson M, Samuelsson U, Billstrom R, Strombeck B, Mitelman F, Johansson B. 2001. Fusion of the MORF and CBP genes in acute myeloid leukemia with the t(10;16)(q22;p13). *Hum Mol Genet* **10**: 395-404.
- Panchenko MV, Zhou MI, Cohen HT. 2004. von Hippel-Lindau partner Jade-1 is a transcriptional co-activator associated with histone acetyltransferase activity. *J Biol Chem* **279**: 56032-56041.

- Papamichos-Chronakis M, Krebs JE, Peterson CL. 2006. Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. *Genes Dev* **20**: 2437-2449.
- Pasque V, Radzishewska A, Gillich A, Halley-Stott RP, Panamarova M, Zernicka-Goetz M, Surani MA, Silva JC. 2012. Histone variant macroH2A marks embryonic differentiation in vivo and acts as an epigenetic barrier to induced pluripotency. *J Cell Sci* **125**: 6094-6104.
- Pena PV, Davrazou F, Shi X, Walter KL, Verkhusha VV, Gozani O, Zhao R, Kutateladze TG. 2006. Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* **442**: 100-103.
- Penicud K, Behrens A. 2013. DMAP1 is an essential regulator of ATM activity and function. *Oncogene*.
- Perez-Campo FM, Borrow J, Kouskoff V, Lacaud G. 2009. The histone acetyl transferase activity of monocytic leukemia zinc finger is critical for the proliferation of hematopoietic precursors. *Blood* **113**: 4866-4874.
- Perry J. 2006. The Epc-N domain: a predicted protein-protein interaction domain found in select chromatin associated proteins. *BMC genomics* **7**: 6.
- Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y et al. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* **12**: 1577-1589.
- Piche B, Li G. 2010. Inhibitor of growth tumor suppressors in cancer progression. *Cell Mol Life Sci* **67**: 1987-1999.
- Pokholok DK, Harbison CT, Levine S, Cole M, Hannett NM, Lee TI, Bell GW, Walker K, Rolfe PA, Herbolsheimer E et al. 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* **122**: 517-527.
- Pollard KJ, Peterson CL. 1997. Role for ADA/GCN5 products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **17**: 6212-6222.
- Portela A, Esteller M. 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* **28**: 1057-1068.
- Pryde F, Jain D, Kerr A, Curley R, Mariotti FR, Vogelauer M. 2009. H3 k36 methylation helps determine the timing of cdc45 association with replication origins. *PLoS One* **4**: e5882.
- Qin S, Jin L, Zhang J, Liu L, Ji P, Wu M, Wu J, Shi Y. 2011. Recognition of unmodified histone H3 by the first PHD finger of Bromodomain-PHD finger protein 2 provides insights into the regulation of histone acetyltransferases MOZ and MORF. *J Biol Chem* **286**: 36944-36955.
- Qiu Y, Liu L, Zhao C, Han C, Li F, Zhang J, Wang Y, Li G, Mei Y, Wu M et al. 2012. Combinatorial readout of unmodified H3R2 and acetylated H3K14 by the tandem PHD finger of MOZ reveals a regulatory mechanism for HOXA9 transcription. *Genes & development* **26**: 1376-1391.
- Rajakumara E, Wang Z, Ma H, Hu L, Chen H, Lin Y, Guo R, Wu F, Li H, Lan F et al. 2011. PHD Finger Recognition of Unmodified Histone H3R2 Links UHRF1 to Regulation of Euchromatic Gene Expression. *Molecular Cell* **43**: 275-284.
- Ramon-Maiques S, Kuo AJ, Carney D, Matthews AG, Oettinger MA, Gozani O, Yang W. 2007. The plant homeodomain finger of RAG2 recognizes histone H3 methylated at both lysine-4 and arginine-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18993-18998.
- Rando OJ, Chang HY. 2009. Genome-wide views of chromatin structure. *Annu Rev Biochem* **78**: 245-271.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD et al. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593-599.
- Rea S, Xouri G, Akhtar A. 2007. Males absent on the first (MOF): from flies to humans. *Oncogene* **26**: 5385-5394.

- Recht J, Tsubota T, Tanny JC, Diaz RL, Berger JM, Zhang X, Garcia BA, Shabanowitz J, Burlingame AL, Hunt DF et al. 2006. Histone chaperone Asf1 is required for histone H3 lysine 56 acetylation, a modification associated with S phase in mitosis and meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6988-6993.
- Reifsnnyder C, Lowell J, Clarke A, Pillus L. 1996. Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases. *Nat Genet* **14**: 42-49.
- Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD. 2003. Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell* **12**: 1591-1598.
- Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, Nardone J, Lee K, Reeves C, Li Y et al. 2007. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* **131**: 1190-1203.
- Robison AJ, Nestler EJ. 2011. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* **12**: 623-637.
- Rodier F, Campisi J. 2011. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* **192**: 547-556.
- Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J. 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* **11**: 973-979.
- Roh TY, Cuddapah S, Cui K, Zhao K. 2006. The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 15782-15787.
- Rokudai S, Aikawa Y, Tagata Y, Tsuchida N, Taya Y, Kitabayashi I. 2009. Monocytic leukemia zinc finger (MOZ) interacts with p53 to induce p21 expression and cell-cycle arrest. *J Biol Chem* **284**: 237-244.
- Rolef Ben-Shahar T, Castillo AG, Osborne MJ, Borden KL, Kornblatt J, Verreault A. 2009. Two fundamentally distinct PCNA interaction peptides contribute to chromatin assembly factor 1 function. *Mol Cell Biol* **29**: 6353-6365.
- Rossetto D, Avvakumov N, Cote J. 2012. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* **7**: 1098-1108.
- Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. 2000. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* **25**: 269-277.
- Rufiange A, Jacques PE, Bhat W, Robert F, Nourani A. 2007. Genome-wide replication-independent histone H3 exchange occurs predominantly at promoters and implicates H3 K56 acetylation and Asf1. *Mol Cell* **27**: 393-405.
- Russell M, Berardi P, Gong W, Riabowol K. 2006. Grow-ING, Age-ING and Die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis. *Exp Cell Res* **312**: 951-961.
- Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J. 2007a. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* **25**: 15-30.
- Ruthenburg AJ, Li H, Milne TA, Dewell S, McGinty RK, Yuen M, Ueberheide B, Dou Y, Muir TW, Patel DJ et al. 2011. Recognition of a Mononucleosomal Histone Modification Pattern by BPTF via Multivalent Interactions. *Cell* **145**: 692-706.
- Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD. 2007b. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 983-994.
- Ruthenburg AJ, Wang W, Graybosch DM, Li H, Allis CD, Patel DJ, Verdine GL. 2006. Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nature structural & molecular biology* **13**: 704-712.
- Saksouk N, Avvakumov N, Champagne KS, Hung T, Doyon Y, Cayrou C, Paquet E, Ullah M, Landry AJ, Cote V et al. 2009. HBO1 HAT complexes target chromatin throughout gene coding regions via multiple PHD finger interactions with histone H3 tail. *Mol Cell* **33**: 257-265.

- Saksouk N, Avvakumov N, Cote J. 2008. (de)MYSTification and INGenuity of tumor suppressors. *Cell Mol Life Sci* **65**: 1013-1018.
- Sanchez R, Zhou MM. 2009. The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr Opin Drug Discov Devel* **12**: 659-665.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**: 407-411.
- Sapountzi V, Cote J. 2011. MYST-family histone acetyltransferases: beyond chromatin. *Cell Mol Life Sci* **68**: 1147-1156.
- Schmitges FW, Prusty AB, Faty M, Stutzer A, Lingaraju GM, Aiwazian J, Sack R, Hess D, Li L, Zhou S et al. 2011. Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks. *Molecular Cell* **42**: 330-341.
- Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* **6**: 73-77.
- Schuetz A, Allali-Hassani A, Martin F, Loppnau P, Vedadi M, Bochkarev A, Plotnikov AN, Arrowsmith CH, Min J. 2006. Structural basis for molecular recognition and presentation of histone H3 by WDR5. *EMBO J* **25**: 4245-4252.
- Scott M, Bonnefin P, Vieyra D, Boisvert FM, Young D, Bazett-Jones DP, Riabowol K. 2001. UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *J Cell Sci* **114**: 3455-3462.
- Selleck W, Fortin I, Sermwittayawong D, Cote J, Tan S. 2005. The *Saccharomyces cerevisiae* Piccolo NuA4 histone acetyltransferase complex requires the Enhancer of Polycomb A domain and chromodomain to acetylate nucleosomes. *Mol Cell Biol* **25**: 5535-5542.
- Shahbazian MD, Grunstein M. 2007. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* **76**: 75-100.
- Shahbazian MD, Zhang K, Grunstein M. 2005. Histone H2B ubiquitylation controls processive methylation but not monomethylation by Dot1 and Set1. *Mol Cell* **19**: 271-277.
- Sharma GG, So S, Gupta A, Kumar R, Cayrou C, Avvakumov N, Bhadra U, Pandita RK, Porteus MH, Chen DJ et al. 2010. MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **30**: 3582-3595.
- Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Pena P, Lan F, Kaadige MR et al. 2006. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**: 96-99.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**: 941-953.
- Shia WJ, Osada S, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, Workman JL. 2005. Characterization of the yeast trimeric-SAS acetyltransferase complex. *J Biol Chem* **280**: 11987-11994.
- Shilatifard A. 2006. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* **75**: 243-269.
- Shim EY, Hong SJ, Oum JH, Yanez Y, Zhang Y, Lee SE. 2007. RSC mobilizes nucleosomes to improve accessibility of repair machinery to the damaged chromatin. *Mol Cell Biol* **27**: 1602-1613.
- Shimada Y, Saito A, Suzuki M, Takahashi E, Horie M. 1998. Cloning of a novel gene (ING1L) homologous to ING1, a candidate tumor suppressor. *Cytogenet Cell Genet* **83**: 232-235.
- Shiseki M, Nagashima M, Pedoux RM, Kitahama-Shiseki M, Miura K, Okamura S, Onogi H, Higashimoto Y, Appella E, Yokota J et al. 2003. p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res* **63**: 2373-2378.
- 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.

- Siino JS, Yau PM, Imai BS, Gatewood JM, Bradbury EM. 2003. Effect of DNA length and H4 acetylation on the thermal stability of reconstituted nucleosome particles. *Biochem Biophys Res Commun* **302**: 885-891.
- Simic R, Lindstrom DL, Tran HG, Roinick KL, Costa PJ, Johnson AD, Hartzog GA, Arndt KM. 2003. Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *EMBO J* **22**: 1846-1856.
- Simon JA, Kingston RE. 2009. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 697-708.
- Skene PJ, Henikoff S. 2013. Histone variants in pluripotency and disease. *Development* **140**: 2513-2524.
- Smith ER, Cayrou C, Huang R, Lane WS, Cote J, Lucchesi JC. 2005. A human protein complex homologous to the Drosophila MSL complex is responsible for the majority of histone H4 acetylation at lysine 16. *Mol Cell Biol* **25**: 9175-9188.
- Smith ER, Pannuti A, Gu W, Steurnagel A, Cook RG, Allis CD, Lucchesi JC. 2000. The drosophila MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation. *Mol Cell Biol* **20**: 312-318.
- Smolle M, Venkatesh S, Gogol M, Li H, Zhang Y, Florens L, Washburn M, Workman J. 2012. Chromatin remodelers Isw1 and Chd1 maintain chromatin structure during transcription by preventing histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* **in press**.
- Smyth GK. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**: Article3.
- 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 U S A* **92**: 1237-1241.
- Sofueva S, Du LL, Limbo O, Williams JS, Russell P. 2010. BRCT domain interactions with phospho-histone H2A target Crb2 to chromatin at double-strand breaks and maintain the DNA damage checkpoint. *Mol Cell Biol* **30**: 4732-4743.
- Soliman MA, Berardi P, Pastyryeva S, Bonnefin P, Feng X, Colina A, Young D, Riabowol K. 2008. ING1a expression increases during replicative senescence and induces a senescent phenotype. *Aging Cell* **7**: 783-794.
- Soliman MA, Riabowol K. 2007. After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. *Trends in biochemical sciences* **32**: 509-519.
- Stankunas K, Berger J, Ruse C, Sinclair DA, Randazzo F, Brock HW. 1998. The enhancer of polycomb gene of Drosophila encodes a chromatin protein conserved in yeast and mammals. *Development* **125**: 4055-4066.
- Stewart GS, Panier S, Townsend K, Al-Hakim AK, Kolas NK, Miller ES, Nakada S, Ylanko J, Olivarius S, Mendez M et al. 2009. The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* **136**: 420-434.
- Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45.
- Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. 2005. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* **123**: 1213-1226.
- Stucki M, Jackson SP. 2006. gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)* **5**: 534-543.
- Su D, Hu Q, Li Q, Thompson JR, Cui G, Fazly A, Davies BA, Botuyan MV, Zhang Z, Mer G. 2012. Structural basis for recognition of H3K56-acetylated histone H3-H4 by the chaperone Rtt106. *Nature* **483**: 104-107.
- Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD. 2005. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13182-13187.

- Sun Y, Jiang X, Xu Y, Ayrapetov MK, Moreau LA, Whetstine JR, Price BD. 2009. Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat Cell Biol* **11**: 1376-1382.
- Sun ZW, Allis CD. 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature* **418**: 104-108.
- Sural TH, Peng S, Li B, Workman JL, Park PJ, Kuroda MI. 2008. The MSL3 chromodomain directs a key targeting step for dosage compensation of the *Drosophila melanogaster* X chromosome. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 1318-1325.
- Suzuki T, Shen H, Akagi K, Morse HC, Malley JD, Naiman DQ, Jenkins NA, Copeland NG. 2002. New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nat Genet* **32**: 166-174.
- Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, McMahon SB. 2006. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* **24**: 841-851.
- Tachiwana H, Osakabe A, Shiga T, Miya Y, Kimura H, Kagawa W, Kurumizaka H. 2011. Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**: 578-583.
- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. 2004. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**: 51-61.
- Taipale M, Rea S, Richter K, Vilar A, Lichter P, Imhof A, Akhtar A. 2005. hMOF histone acetyltransferase is required for histone H4 lysine 16 acetylation in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **25**: 6798-6810.
- Talbert PB, Henikoff S. 2010. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 264-275.
- Tang J, Cho NW, Cui G, Manion EM, Shanbhag NM, Botuyan MV, Mer G, Greenberg RA. 2013. Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 317-325.
- Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W. 2006. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* **24**: 827-839.
- Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y, Gu W. 2008. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* **133**: 612-626.
- Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* **272**: 408-411.
- Taverna SD, Ilin S, Rogers RS, Tanny JC, Lavender H, Li H, Baker L, Boyle J, Blair LP, Chait BT et al. 2006. Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. *Mol Cell* **24**: 785-796.
- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ. 2007. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 1025-1040.
- Teng Y, Yu Y, Waters R. 2002. The *Saccharomyces cerevisiae* histone acetyltransferase Gcn5 has a role in the photoreactivation and nucleotide excision repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in the MFA2 gene. *J Mol Biol* **316**: 489-499.
- Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. 2003. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci* **983**: 84-100.
- Thomas T, Corcoran LM, Gugasyan R, Dixon MP, Brodnicki T, Nutt SL, Metcalf D, Voss AK. 2006. Monocytic leukemia zinc finger protein is essential for the development of long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Genes Dev* **20**: 1175-1186.
- Thomas T, Dixon MP, Kueh AJ, Voss AK. 2008. Mof (MYST1 or KAT8) is essential for progression of embryonic development past the blastocyst stage and required for normal chromatin architecture. *Mol Cell Biol* **28**: 5093-5105.

- Thomas T, Voss AK, Chowdhury K, Gruss P. 2000. Querkopf, a MYST family histone acetyltransferase, is required for normal cerebral cortex development. *Development* **127**: 2537-2548.
- Trewick SC, McLaughlin PJ, Allshire RC. 2005. Methylation: lost in hydroxylation? *EMBO Rep* **6**: 315-320.
- Tripsianes K, Madl T, Machyna M, Fessas D, Englbrecht C, Fischer U, Neugebauer KM, Sattler M. 2011. Structural basis for dimethylarginine recognition by the Tudor domains of human SMN and SPF30 proteins. *Nature structural & molecular biology* **18**: 1414-1420.
- Tsai WW, Wang Z, Yiu TT, Akdemir KC, Xia W, Winter S, Tsai CY, Shi X, Schwarzer D, Plunkett W et al. 2010. TRIM24 links a non-canonical histone signature to breast cancer. *Nature* **468**: 927-932.
- Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. 2007. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**: 355-367.
- Tse C, Sera T, Wolffe AP, Hansen JC. 1998. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* **18**: 4629-4638.
- Tsubota T, Berndsen CE, Erkmann JA, Smith CL, Yang L, Freitas MA, Denu JM, Kaufman PD. 2007. Histone H3-K56 acetylation is catalyzed by histone chaperone-dependent complexes. *Mol Cell* **25**: 703-712.
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. 2006. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**: 811-816.
- Ullah M, Pelletier N, Xiao L, Zhao SP, Wang K, Degerny C, Tahmasebi S, Cayrou C, Doyon Y, Goh SL et al. 2008. Molecular architecture of quartet MOZ/MORF histone acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol* **28**: 6828-6843.
- Unnikrishnan A, Gafken PR, Tsukiyama T. 2010. Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 430-437.
- Unoki M, Kumamoto K, Takenoshita S, Harris CC. 2009. Reviewing the current classification of inhibitor of growth family proteins. *Cancer Sci* **100**: 1173-1179.
- Utlely RT, Cote J. 2003. The MYST family of histone acetyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol* **274**: 203-236.
- Utlely RT, Lacoste N, Jobin-Robitaille O, Allard S, Cote J. 2005. Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and DNA repair by phosphorylation of histone H4. *Mol Cell Biol* **25**: 8179-8190.
- Utlely RT, Owen-Hughes TA, Juan LJ, Cote J, Adams CC, Workman JL. 1996. In vitro analysis of transcription factor binding to nucleosomes and nucleosome disruption/displacement. *Methods in enzymology* **274**: 276-291.
- Vakoc CR, Sachdeva MM, Wang H, Blobel GA. 2006. Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Mol Cell Biol* **26**: 9185-9195.
- van Attikum H, Fritsch O, Hohn B, Gasser SM. 2004. Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* **119**: 777-788.
- van Attikum H, Gasser SM. 2009. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends in cell biology* **19**: 207-217.
- van Leeuwen F, Gafken PR, Gottschling DE. 2002. Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* **109**: 745-756.
- Vardabasso C, Hasson D, Ratnakumar K, Chung CY, Duarte LF, Bernstein E. 2013. Histone variants: emerging players in cancer biology. *Cell Mol Life Sci*.
- Venkatasubrahmanyam S, Hwang WW, Meneghini MD, Tong AH, Madhani HD. 2007. Genome-wide, as opposed to local, antisilencing is mediated redundantly by the euchromatic factors Set1 and H2A.Z. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 16609-16614.

- Venkatesh S, Smolle M, Li H, Gogol M, Saint M, Kumar S, Natarajan K, Workman J. 2012. Set2-mediated histone H3 lysine36 methylation suppresses histone exchange on transcribed genes. *Nature in press*.
- Verdel A, Curtet S, Brocard MP, Rousseaux S, Lemercier C, Yoshida M, Khochbin S. 2000. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol* **10**: 747-749.
- 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.
- Vezzoli A, Bonadies N, Allen MD, Freund SM, Santiveri CM, Kvinlaug BT, Huntly BJ, Gottgens B, Bycroft M. 2010. Molecular basis of histone H3K36me3 recognition by the PWWP domain of Brpf1. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 617-619.
- Vincent JA, Kwong TJ, Tsukiyama T. 2008. ATP-dependent chromatin remodeling shapes the DNA replication landscape. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 477-484.
- Voss AK, Collin C, Dixon MP, Thomas T. 2009. Moz and retinoic acid coordinately regulate H3K9 acetylation, Hox gene expression, and segment identity. *Dev Cell* **17**: 674-686.
- Voss AK, Thomas T. 2009. MYST family histone acetyltransferases take center stage in stem cells and development. *Bioessays* **31**: 1050-1061.
- Voss AK, Vanyai HK, Collin C, Dixon MP, McLennan TJ, Sheikh BN, Scambler P, Thomas T. 2012. MOZ regulates the Tbx1 locus, and Moz mutation partially phenocopies DiGeorge syndrome. *Dev Cell* **23**: 652-663.
- Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. 1999. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* **23**: 62-66.
- Walfridsson J, Khorosjutina O, Matikainen P, Gustafsson CM, Ekwall K. 2007. A genome-wide role for CHD remodelling factors and Nap1 in nucleosome disassembly. *EMBO J* **26**: 2868-2879.
- Walter W, Clynes D, Tang Y, Marmorstein R, Mellor J, Berger SL. 2008. 14-3-3 interaction with histone H3 involves a dual modification pattern of phosphoacetylation. *Mol Cell Biol* **28**: 2840-2849.
- Wang C, Shen J, Yang Z, Chen P, Zhao B, Hu W, Lan W, Tong X, Wu H, Li G et al. 2011. Structural basis for site-specific reading of unmodified R2 of histone H3 tail by UHRF1 PHD finger. *Cell Res* **21**: 1379-1382.
- Wang F, Dai J, Daum JR, Niedzialkowska E, Banerjee B, Stukenberg PT, Gorbsky GJ, Higgins JM. 2010. Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science* **330**: 231-235.
- Wang X, Hayes JJ. 2008. Acetylation mimics within individual core histone tail domains indicate distinct roles in regulating the stability of higher-order chromatin structure. *Mol Cell Biol* **28**: 227-236.
- Wang Y, Li G. 2006. ING3 promotes UV-induced apoptosis via Fas/caspase-8 pathway in melanoma cells. *J Biol Chem* **281**: 11887-11893.
- Wang Y, Reddy B, Thompson J, Wang H, Noma K, Yates JR, 3rd, Jia S. 2009a. Regulation of Set9-mediated H4K20 methylation by a PWWP domain protein. *Molecular cell* **33**: 428-437.
- Wang Z, Zang C, Cui K, Schones DE, Barski A, Peng W, Zhao K. 2009b. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* **138**: 1019-1031.
- Ward IM, Minn K, Jorda KG, Chen J. 2003. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J Biol Chem* **278**: 19579-19582.

- West JD, Marnett LJ. 2005. Alterations in gene expression induced by the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol* **18**: 1642-1653.
- Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M et al. 2006. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* **125**: 467-481.
- Whitehouse I, Rando OJ, Delrow J, Tsukiyama T. 2007. Chromatin remodelling at promoters suppresses antisense transcription. *Nature* **450**: 1031-1035.
- Williams JS, Williams RS, Dovey CL, Guenther G, Tainer JA, Russell P. 2010. gammaH2A binds Brc1 to maintain genome integrity during S-phase. *The EMBO journal* **29**: 1136-1148.
- Winter S, Simboeck E, Fischle W, Zupkovitz G, Dohnal I, Mechtler K, Ammerer G, Seiser C. 2008. 14-3-3 proteins recognize a histone code at histone H3 and are required for transcriptional activation. *EMBO J* **27**: 88-99.
- Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Golshani A, Zhang Y, Greenblatt JF et al. 2003. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* **11**: 267-274.
- Wu CY, Kang HY, Yang WL, Wu J, Jeong YS, Wang J, Chan CH, Lee SW, Zhang X, Lamothe B et al. 2011a. Critical role of monoubiquitination of histone H2AX protein in histone H2AX phosphorylation and DNA damage response. *J Biol Chem* **286**: 30806-30815.
- Wu H, Zeng H, Lam R, Tempel W, Amaya MF, Xu C, Dombrovski L, Qiu W, Wang Y, Min J. 2011b. Structural and histone binding ability characterizations of human PWWP domains. *PLoS One* **6**: e18919.
- Wu J, Huen MS, Lu LY, Ye L, Dou Y, Ljungman M, Chen J, Yu X. 2009. Histone ubiquitination associates with BRCA1-dependent DNA damage response. *Mol Cell Biol* **29**: 849-860.
- Wu L, Lee SY, Zhou B, Nguyen UT, Muir TW, Tan S, Dou Y. 2013. ASH2L regulates ubiquitylation signaling to MLL: trans-regulation of H3 K4 methylation in higher eukaryotes. *Mol Cell* **49**: 1108-1120.
- Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, Kauer M, Tackett AJ, Chait BT, Badenhorst P et al. 2006. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* **442**: 86-90.
- Wysocki R, Javaheri A, Allard S, Sha F, Cote J, Kron SJ. 2005. Role of Dot1-dependent histone H3 methylation in G1 and S phase DNA damage checkpoint functions of Rad9. *Mol Cell Biol* **25**: 8430-8443.
- Xi Q, Wang Z, Zaromytidou AI, Zhang XH, Chow-Tsang LF, Liu JX, Kim H, Barlas A, Manova-Todorova K, Kaartinen V et al. 2011. A poised chromatin platform for TGF-beta access to master regulators. *Cell* **147**: 1511-1524.
- Xie L, Pelz C, Wang W, Bashar A, Varlamova O, Shadle S, Impey S. 2011. KDM5B regulates embryonic stem cell self-renewal and represses cryptic intragenic transcription. *EMBO J* **30**: 1473-1484.
- Xu C, Bian C, Yang W, Galka M, Ouyang H, Chen C, Qiu W, Liu H, Jones AE, Mackenzie F et al. 2010. Binding of different histone marks differentially regulates the activity and specificity of polycomb repressive complex 2 (PRC2). *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Xu C, Cui G, Botuyan MV, Mer G. 2008. Structural basis for the recognition of methylated histone H3K36 by the Eaf3 subunit of histone deacetylase complex Rpd3S. *Structure* **16**: 1740-1750.
- Xu F, Zhang K, Grunstein M. 2005. Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell* **121**: 375-385.
- Xu Y, Price BD. 2011. Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle* **10**: 261-267.
- Yang H, Mizzen CA. 2009. The multiple facets of histone H4-lysine 20 methylation. *Biochem Cell Biol* **87**: 151-161.

- Yang XJ, Seto E. 2008. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 206-218.
- Yang XJ, Ullah M. 2007. MOZ and MORF, two large MYSTic HATs in normal and cancer stem cells. *Oncogene* **26**: 5408-5419.
- Yang Y, Lu Y, Espejo A, Wu J, Xu W, Liang S, Bedford MT. 2010. TDRD3 is an effector molecule for arginine-methylated histone marks. *Mol Cell* **40**: 1016-1023.
- Yoshida T, Hazan I, Zhang J, Ng SY, Naito T, Snippert HJ, Heller EJ, Qi X, Lawton LN, Williams CJ et al. 2008. The role of the chromatin remodeler Mi-2beta in hematopoietic stem cell self-renewal and multilineage differentiation. *Genes Dev* **22**: 1174-1189.
- Ythier D, Larrieu D, Brambilla C, Brambilla E, Pedoux R. 2008. The new tumor suppressor genes ING: genomic structure and status in cancer. *Int J Cancer* **123**: 1483-1490.
- Yu Y, Song C, Zhang Q, DiMaggio PA, Garcia BA, York A, Carey MF, Grunstein M. 2012. Histone H3 lysine 56 methylation regulates DNA replication through its interaction with PCNA. *Mol Cell* **46**: 7-17.
- Yu Y, Teng Y, Liu H, Reed SH, Waters R. 2005. UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8650-8655.
- Yu Y, Waters R. 2005. Histone acetylation, chromatin remodelling and nucleotide excision repair: hint from the study on MFA2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle* **4**: 1043-1045.
- Yuan W, Xu M, Huang C, Liu N, Chen S, Zhu B. 2011. H3K36 methylation antagonizes PRC2-mediated H3K27 methylation. *The Journal of biological chemistry* **286**: 7983-7989.
- Zeng L, Zhang Q, Li S, Plotnikov AN, Walsh MJ, Zhou MM. 2010. Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b. *Nature* **466**: 258-262.
- Zhang P, Du J, Sun B, Dong X, Xu G, Zhou J, Huang Q, Liu Q, Hao Q, Ding J. 2006. Structure of human MRG15 chromo domain and its binding to Lys36-methylated histone H3. *Nucleic Acids Res* **34**: 6621-6628.
- Zhao Q, Rank G, Tan YT, Li H, Moritz RL, Simpson RJ, Cerruti L, Curtis DJ, Patel DJ, Allis CD et al. 2009. PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 304-311.
- Zhou MI, Foy RL, Chitalia VC, Zhao J, Panchenko MV, Wang H, Cohen HT. 2005. Jade-1, a candidate renal tumor suppressor that promotes apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11035-11040.
- Zhou MI, Wang H, Foy RL, Ross JJ, Cohen HT. 2004. Tumor suppressor von Hippel-Lindau (VHL) stabilization of Jade-1 protein occurs through plant homeodomains and is VHL mutation dependent. *Cancer Res* **64**: 1278-1286.
- Zhou MI, Wang H, Ross JJ, Kuzmin I, Xu C, Cohen HT. 2002. The von Hippel-Lindau tumor suppressor stabilizes novel plant homeodomain protein Jade-1. *J Biol Chem* **277**: 39887-39898.
- Zhou Y, Schmitz KM, Mayer C, Yuan X, Akhtar A, Grummt I. 2009. Reversible acetylation of the chromatin remodelling complex NoRC is required for non-coding RNA-dependent silencing. *Nat Cell Biol* **11**: 1010-1016.
- Zhu B, Zheng Y, Pham AD, Mandal SS, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. 2005. Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol Cell* **20**: 601-611.
- Zippo A, Serafini R, Rocchigiani M, Pennacchini S, Krepelova A, Oliviero S. 2009. Histone crosstalk between H3S10ph and H4K16ac generates a histone code that mediates transcription elongation. *Cell* **138**: 1122-1136.

Annexe

Avant-Propos

Puisque le complexe acétyltransférase HBO1 semble réguler la voie cellulaire p21 et que le facteur de transcription p53 en fait partie, nous avons voulu tester si HBO1 pouvait acétyler p53 tout comme le font TIP60 et MOF. Nous avons entrepris des essais d'acétylation de p53 *in vitro*, en utilisant de la protéine GST-p53 recombinante et différents complexes MYST purifiés dans des cellules 293T. Comme le démontre nos résultats, HBO1 acétyle bel et bien la protéine recombinante p53 et de manière beaucoup plus marquée que les complexes TIP60 et MOF (voir Figure A-1).

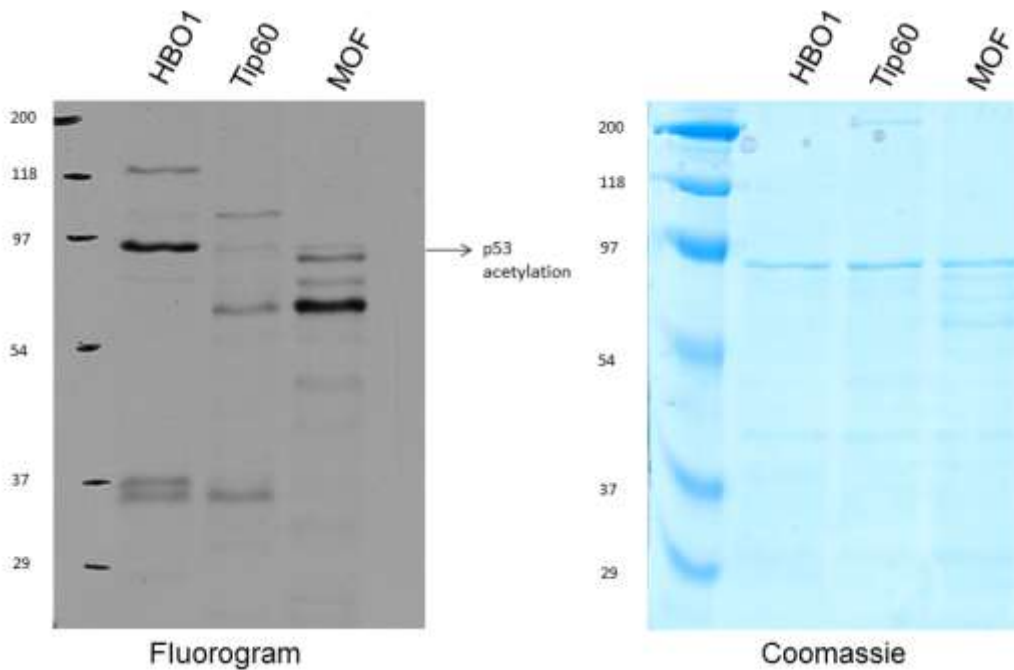


Figure A-1. Acétylation de p53 par les complexes MYST acétyltransférases HBO1, TIP60 et MOF.

Fluorogramme des essais d'acétylation *in vitro* de la protéine GST-p53 recombinante par différents complexes purifiés de la famille MYST. L'acétylation par HBO1 est beaucoup plus marquée que celle des complexes TIP60 et MOF, et ce pour les mêmes activités acétyltransférases (normalisées sur histones libres). Le gel coomassie contrôle est illustré à droite comme contrôle de la quantité de protéine p53.