

Université de Montréal

**Histone H2B-R95A Mutant Identifies the Pheromone
Pathway That Signals Cell Cycle Arrest During
Rapamycin Response**

par

Sami Ayachi

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise en biochimie
Option génétique moléculaire

Décembre 2014

© Sami Ayachi, 2014

Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

**Histone H2B-R95A Mutant Identifies the Pheromone Pathway That Signals Cell
Cycle Arrest During Rapamycin Response**

Présenté par :

Sami Ayachi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Pascal Chartrand

Directeur de recherche : Dindial Ramotar

Membre du jury : Alain Verreault

RÉSUMÉ

La rapamycine est un immunosuppresseur utilisé pour traiter plusieurs types de maladies dont le cancer du rein. Son fonctionnement par l'inhibition de la voie de Tor mène à des changements dans des processus physiologiques, incluant le cycle cellulaire. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la rapamycine conduit à une altération rapide et globale de l'expression génique, déclenchant un remodelage de la chromatine. Nous proposons que les modifications des histones peuvent jouer un rôle crucial dans le remodelage de la chromatine en réponse à la rapamycine. Notre objectif principal est d'identifier d'une banque de mutants d'histone les variantes qui vont échouer à répondre à la rapamycine dans une tentative de réaliser une caractérisation des modifications d'histone critiques pour la réponse à cette drogue. Ainsi, nous avons réalisé un criblage d'une banque de mutants d'histone et identifié plusieurs mutants d'histone dont la résistance à la rapamycine a été altérée. Nous avons caractérisé une de ces variantes d'histone, à savoir H2B, qui porte une substitution de l'alanine en arginine en position 95 (H2B-R95A) et démontré que ce mutant est extrêmement résistant à la rapamycine, et non à d'autres drogues. Des immunoprécipitations ont démontré que H2B-R95A est déficient pour former un complexe avec Spt16, un facteur essentiel pour la dissociation de H2A et H2B de la chromatine, permettant la réplication et la transcription par les ADN et ARN polymérases, respectivement. Des expériences de CHIP-Chip et de micropuce ont démontré que l'arginine 95 de H2B est requise pour recruter Spt16 afin de permettre l'expression d'une multitude de gènes, dont certains font partie de la voie des phéromones. Des évidences seront présentées pour la première fois démontrant que la rapamycine peut activer la voie des phéromones et qu'une défectuosité dans cette voie cause la résistance à cette drogue.

Mots clés: rapamycine, modifications d'histone, remodelage de la chromatine, Spt16, voie de phéromones.

ABSTRACT

Rapamycin is an immunosuppressant used for treating many types of diseases such as kidney carcinomas. It works by inhibiting the Tor signaling pathway leading to changes in physiological processes, including cell cycle arrest. In *Saccharomyces cerevisiae*, rapamycin leads to a rapid and global alteration in gene expression, prompting chromatin remodeling. We propose that histone modification(s) might play a crucial role in remodeling of the chromatin in response to rapamycin. Our main objective is to identify from a histone mutant collection variants that fail to respond to rapamycin in an attempt to characterize histone modifications critical for this drug response. As such, we conducted a screen of the histone mutant collection and identified several hits that showed resistance to rapamycin. We characterized one of the histone variants, namely H2B, carrying alanine substitution at arginine 95 (H2B-R95A) and show that it is extremely resistant to rapamycin, but not to other drugs. Pull downs demonstrated that H2B-R95A was defective in forming a complex with Spt16, an essential factor that is required to disassociate H2A and H2B from the chromatin in order to allow replication and transcription by DNA and RNA polymerases, respectively. ChIP-Chip and microarray experiments showed that arginine 95 of H2B is required to recruit Spt16 to allow expression of several genes, a subset of which are involved in the pheromone signaling pathway. Evidence will be presented to show for the first time that rapamycin can activate the pheromone pathway and that defects in this pathway cause resistance to the drug.

Key words: rapamycin, histone modifications, chromatin remodeling, Spt16, pheromone pathway.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT.....	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xv
CHAPITRE 1	1
1. INTRODUCTION	2
1.1 La régulation de transcription	2
1.1.1 La transcription	2
1.1.1.1 L'initiation	4
1.1.1.1.1 La pré-initiation.....	4
1.1.1.1.2 L'initiation	5
1.1.1.1.3 L'initiation abortive	6
1.1.1.2 L'élongation	7
1.1.1.2.1 L'élongation précoce.....	7
1.1.1.2.2 L'élongation productive	8
1.1.1.2.3 Surmonter la barrière de nucléosomes	9
1.1.1.3 La terminaison.....	11
1.1.2 Le remodelage de la chromatine	11
1.1.2.1 La chromatine	12
1.1.2.2 Le mécanisme de remodelage de la chromatine	12
1.1.2.2.1 Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendant	13
1.1.2.2.2 La modification covalente des histones	15
1.2 La rapamycine et ses protéines ciblées	22
1.2.1 La découverte de la rapamycine.....	22

1.2.2	La rapamycine en recherche clinique.....	22
1.2.3	La découverte de la protéine TOR (<i>Target Of Rapamycin</i>).....	23
1.2.3.1	Caractéristiques moléculaires de la protéine TOR.....	24
1.2.3.2	Le complexe TOR1	26
1.2.3.3	Le complexe TOR2	27
1.3	La voie de signalisation de TOR.....	29
1.3.1	Contrôle de la biosynthèse des protéines et du cycle cellulaire	29
1.3.2	Contrôle de la biogénèse des ribosomes	30
1.4	Projet de recherche.....	30
1.4.1	Mise en contexte	30
1.4.2	Hypothèse.....	31
1.4.3	Objectif.....	32
CHAPITRE 2.....		34
2.	ARTICLE 1.....	35
2.1	AUTHORS' CONTRIBUTIONS	35
2.2	ABSTRACT.....	36
2.3	BACKGROUND	37
2.4	METHODS	40
2.4.1	Yeast strains and growth media	40
2.4.2	Spot test.....	40
2.4.3	FLAG-H2B purification by anti-FLAG affinity gel	40
2.4.4	Western Blot Analysis	41
2.4.5	Silver staining	42
2.4.6	Mass spectrometry	42
2.4.7	Tagging Spt16 with GFP.....	42
2.4.8	Cell Cycle Analysis.....	42
2.4.9	Yeast RNA Extraction: Hot phenol extraction to prepare RNA for Microarray using Affymetric arrays	43
2.5	RESULTS	45

2.5.1	Identification of histone variants with altered cellular response to rapamycine.....	45
2.5.2	Histone variants with telomeric silencing defects as the H2B-R95A were not resistant to rapamycin.....	49
2.5.3	Histone H2B-R95A is defective in recruiting the FACT complex protein Spt16	49
2.5.4	The histone H2B-A84D variant that suppresses spt16-11 phenotypes is resistant to rapamycine	53
2.5.5	The Spt16-E857K variant that is defective in interacting with H2B is resistant to rapamycin.....	53
2.5.6	Microarray analysis reveals that H2B-R95A downregulates key genes in the pheromone pathway.....	56
2.5.7	Genome wide ChIP-Chip identifies the pheromone pathway to be dysregulated by the H2B-R95A variant.....	60
2.5.8	H2B-R95A is defective in α -factor and rapamycin-induced G1 arrest.....	62
2.5.9	The α -factor-stimulated MAP kinases, Kss1 and Fus3, are not activated in the H2B-R95A mutant.....	66
2.5.10	Kss1 and Fus3 are activated by rapamycin in the parent, and not in the H2B-R95A mutant.....	67
2.5.11	STE5 deletion mutants are resistant to rapamycine	69
2.5.12	Rapamycin induces the expression of Ste5-GFP fusion in the parent, but not in the H2B-R95A mutant.....	69
2.5.13	Rapamycin upregulates Fus3 and Far1 and triggers the destruction of the cyclins	72
2.5.14	Ste5 is controlled by the Tor signaling pathway in response to rapamycin.....	74
2.6	Discussion.....	77
	CHAPITRE 3	82
3.	DISCUSSION.....	83
3.1	Résumé des travaux de recherche.....	83
3.2	Critiques des travaux de recherche et directions futures	88
4.	CONCLUSION.....	90
5.	RÉFÉRENCES	92

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Étapes de la transcription	4
Figure 2 : Localisation de la boîte TATA et le recrutement de l'ARN polymérase II par les facteurs de transcription.....	6
Figure 3 : Structure de la rapamycine avec ses régions d'interaction avec TOR et FKBP12.....	24
Figure 4 : Structure de la protéine TOR et de son complexe.	28
Figure 5 : Comparing rapamycin-sensitivity or resistance of the selected histone variants with the respective parent.	48
Figure 6 : SDS-PAGE analysis of immunoprecipitated H2B-FLAG and associated proteins from the indicated strains.	51
Figure 7 : The H2B-R95A variant immunoprecipitates significantly less Spt16.....	52
Figure 8 : Spot test analysis of the histone H2B and Spt16 variants.....	55
Figure 9 : The H2B-R95A variant causes downregulation of genes belonging to the pheromone pathway.	59
Figures 10 : ChIP-Chip Shows that R95A is Defective in Recruiting Spt16 in order to express pheromone genes.....	61
Figure 11 : Comparison of the Cell Cycle profile of the parent (Wt-H2B) and H2B-R95A variant upon treatment with α -factor or rapamycin.	64
Figure 12 : The MAPKs, Fus3 and Kss1, are activated either by α -factor or rapamycin in the Wt-H2B strain, but not in the H2B-R95A variant.	68
Figure 13 : Rapamycin induces the degradation of Slt2 in the parent but not in the mutant R95A	68
Figure 14 : Ste5 mediates a response to rapamycin.....	71

Figure 15 : Rapamycin induces the expression level of Fus 3- and Far1-TAP and triggers the degradation of Cln1 and 2.	73
Figure 16 : Ste5-GFP expression is defective in tor2-DAmP allele and Ste5 mutation is epistatic with tor2-DAmP allele.....	75
Figure 17 : Absence of methylation in H2A-Q105 versus H2B-R95A.....	76
Figure 18: Model explaining the role of R95 in recruiting Spt16 and activating the pheromone genes to stop cells in G1.	91

LISTE DES TABLEAUX

Table 1: Histone variants showing sensitivity or resistance to rapamycin and other agents	47
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
Akt:	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AMPK :	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase
ARN :	Acide ribonucléique
ARNt :	ARN de transfert
ARNm :	ARN messenger
ATM :	Ataxia telangiectasia mutated
ATP :	Adénosine triphosphate
ATR :	ATM and RAD3 related
BRCT:	Breast cancer susceptibility protein C-Terminal
BRD4 :	Bromodomain 4
BRG1 :	BRM/SWI2-related gene 1
CDK9 :	Cyclin dependant kinase 9
CHD :	Chromodomain Helicase DNA binding
Chk1:	CHeckpoint Kinase 1
Cln :	Cycline
CPSF :	Cleavage Polyadenylation Specificity Factor
CstF :	Cleavage Stimulation Factor
Ctk1 :	Carboxy-terminal domain kinase
CycT :	Cycline T
DNA-PK :	DNA-dependent protein kinase
DSIF :	5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole
EGO :	Escape GROwth
ERK :	MAPK3: mitogen-activated protein kinase 3
FACT :	FAcilitates Chromatin Transcription

FACS :	Fluorescence-activated cell sorting
FAD :	Flavine adénine dinucléotide
FAR1:	Factor Arrest1
FAT :	FRAP, ATM et TRRAP
FKBP12 :	FK506 binding protéine 12
FRB :	FKBP–rapamycin-binding region
FUS3:	Cell FUSion
GTP :	Guanosine-5'-triphosphate
HEAT :	Huntingtin, Elongation Factor 3, the A subunit of PP2A, and TOR1
HP1 :	Heterochromatin protein 1
IKK:	Cytokine-activated IkappaB kinases
INO80 :	INOsitol requiring 80
ISWI :	Imitation SWI
JAK2 :	Janus kinase 2
JARID1 :	JumonjiAT-rich interactive domain 1
JHDMI :	JmjC domain-containing histone demethylase 1
Kss1:	Kinase Suppressor of Sst2 mutations
LSD1 :	Lyhsine Specific Demethylation 1
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
Mec1p :	Mitosis entry checkpoint
MCRS1 :	Microspherule protein 1
MLL :	Mixed Lineage Leukemia
MSP58 :	58-kDa Microspherule protein
MST :	Macrophage stimulating protein1
MTA :	Metastasis-associated gene
NCI :	National Cancer Institute

NELF :	Negative elongation factor
NuRD :	Nucleosome Remodeling and Deacetylation
PAF :	RNA Polymerase-Associated Factor 1
PARP :	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PHD:	Plant Homeo Domain
PIKK:	Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase
PKC :	Protein kinase C
Pob3 :	Pol1 binding 1
PolII:	ARN Polymerase II
poly(A) :	Polyadénylation
PRK1:	p53 Regulatory Kinase
PRMTs :	Protein arginine methyltransferases
P-TEFb :	Positive transcription elongation factor b
Rad6:	RADiation sensitive
RrD1:	Resistant to Rapamycin Deletion
RPc :	Rate of close complex
RPo :	Rate of open complex
SANT :	SWI3, ADA2, NCOR and TFIIB' DNA-binding Domain
SEC:	Super Elongation Complex
Ser2 :	Serine requiring 2
SLIDE :	SANT-like ISWI
Spt16 :	Suppressor of Ty 16
SRCAP :	SNF2-related CREB-activator protein
STE2:	Sterile 2
STE5:	Sterile 5
SWI/SNF :	SWItching defective/Sucrose Non Fermenting
TBP :	TATA-binding-protein

TFII:	Transcription factor II
TOR :	Target of rapamycin
TORC1 :	Complexe TOR1
TORC2 :	Complexe TOR2
TRRAP :	Transformation/transcription domain associated protein
UbcH6 :	Ubiquitine-conjugating enzyme human 6
XBP :	Xeroderma Pigmentosum B
WT :	Wild type

REMERCIEMENTS

À mon avis, tout projet de recherche est impossible de se réaliser par une seule personne, d'autant plus que cette personne a besoin du support de plusieurs afin d'atteindre ses objectifs. Je tiens donc tout d'abord à remercier grandement Dr Dindial Ramotar pour m'avoir ouvert la porte de son laboratoire, de me faire confiance et permis de faire mes études avec lui et son équipe au Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont.

Par le fait même, j'aimerais remercier Mme Tara Haribar et Xiaoming Yang pour leur soutien dans les activités quotidiennes du laboratoire. Dans le même ordre d'idées, je salue et remercie Sihem Berra pour la formation qu'elle m'a donnée au début de ma maîtrise, pour les connaissances transmises et sa patience ainsi que Oussman Hale et Salman Harzaghalay pour les bons moments et leur support dans les périodes plus ardues. Je ne peux pas non plus oublier de remercier Salima Daou pour son aide, ses bons conseils et les connaissances scientifiques et techniques qu'elle m'a si gentiment transmises et Dr Kalil Miloudi pour son aide dans les Analyses des résultats de micropuces ainsi que pour sa patience et ses conseils lors de mes présentations orales lors de ma maîtrise.

Ces travaux de recherche ont également bénéficié de la collaboration de Dr François Robert et Dre Célia Jeronimo dans les expériences de ChIP-Chip et leur participation dans ces travaux ainsi que des conseils, de l'expérience et du matériel partagé par Dr Hugo Wurtele. Je désire également remercier Dr Pascal Chartrand et Dr Alain Verreault pour avoir accepté d'être jury de ce mémoire.

Par sa présence dans mon parcours académique, ma formation, ses conseils importants et les connaissances qu'il m'a transmises avec passion, je remercie sincèrement Dr Slim

Bouslema qui était mon supérieur de maîtrise en Algérie et qui a joué un rôle déterminant dans mes études.

Je profite également de cette occasion pour transmettre également de grands remerciements à Michel-Olivier Gratton pour son support, ses conseils, son temps et son aide dans ce mémoire.

Finalement, je remercie Allah du plus profond de mon âme pour avoir accepté mes prières et pour son aide à réaliser mon rêve de faire carrière dans ce domaine et je remercie de tout cœur mes parents pour leur aide, leur soutien inconditionnel, leur confiance en moi et pour m'avoir poussé à suivre mes rêves puisque sans eux, je ne serais pas ici.

Merci à tous.

CHAPITRE 1

Revue de la littérature : Transcription, remodelage de la chromatine, modifications d'histone, TOR et la rapamycine

1. INTRODUCTION

1.1 La régulation de transcription

Pour vivre les cellules ont besoin de pouvoir répondre aux changements dans leur environnement. Cette réponse à ces changements implique la modulation de l'expression des gènes afin d'aider les cellules à s'adapter et continuer de croître dans leur nouvel environnement. L'expression génique est le processus par lequel une information dans le code génétique est utilisée pour produire des protéines ou des ARN. . La régulation de la transcription, de la traduction , du remodelage de la chromatine et de la modification des histones est critique pour l'expression des gènes afin de maintenir les fonctions cellulaires. Un vice dans une de ces étapes causé par l'environnement ou par une mutation peut affecter plusieurs processus cellulaires. Dans ce mémoire, nous allons démontrer comment un environnement contenant un composé chimique, tel que la rapamycine, peut moduler l'expression génique, causer la mort cellulaire et comment une simple mutation d'un résidu d'histone peut affecter des groupes de gènes qui vont permettre aux cellules de devenir résistantes à la rapamycine.

1.1.1 La transcription

La transcription est la première étape de l'expression génique. Cette étape consiste à produire une copie d'une région spécifique de l'acide désoxyribonucléique (ADN) en acide ribonucléique (ARN) en utilisant l'enzyme ARN polymérase. L'ADN et l'ARN sont des acides nucléiques qui utilisent des paires de base complémentaires de nucléotides afin de transmettre une information de l'ADN en ARN. Il y a 3 classes d'ARN polymérase

présentes dans les cellules. Chacune est responsable pour la transcription d'un type d'ARN fonctionnel spécifique : l'ARN polymérase I transcrit les gènes codant pour l'ARN ribosomal, l'ARN polymérase II transcrit les gènes codant pour les ARN messagers (ARNm) et quelques petits ARN nucléaires et micro ARN, et l'ARN polymérase III transcrit les gènes codant les ARN de transfert (ARNt) et d'autres petits ARN.

L'ARN polymérase lit les séquences d'ADN afin de produire des brins d'ADN antiparallèles ou un ARN complémentaire qui inclut le nucléotide uracile, substitué de la thymidine durant la transcription (ce qui est contraire à la réplication de l'ADN). L'ARN polymérase ne peut pas agir seul. Elle a besoin de facteurs de transcription qui contrôlent la transcription de l'information génétique de l'ADN en ARN [1] [2]. Les facteurs de transcription agissent avec d'autres protéines pour former des complexes afin de réaliser divers rôles dont comme activateur, qui facilite le recrutement de l'ARN polymérase, ou comme répresseur, qui bloque le recrutement de l'ARN polymérase et arrête la transcription [3-5]. Le processus de transcription est divisé en plusieurs étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison (Fig. 1).

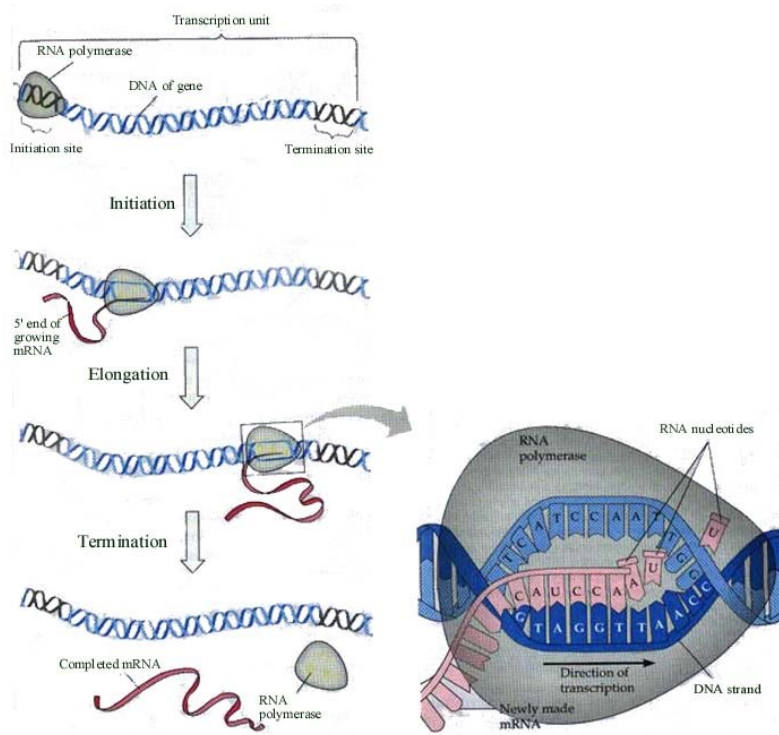


Figure 1 : Étapes de la transcription

1.1.1.1 L'initiation

1.1.1.1.1 La pré-initiation

Dans les cellules eucaryotes, l'ARN polymérase et des facteurs de transcription ont besoin de la présence essentielle d'une séquence promotrice, également appelé promoteur, afin d'initier la transcription. Cette séquence promotrice est une région de l'ADN localisée à une distance de -30 à -70 paires de bases en amont du site de fixation de la transcription. Celle-ci est la région requise pour la fixation du complexe de l'ARN polymérase, des facteurs de transcription, des activateurs et des répresseurs qui vont moduler la transcription.[6]. Le type de promoteur qui est le mieux caractérisé est une courte séquence de l'ADN appelée boîte TATA. Cette séquence est le site de fixation de facteurs de transcription appelé *TATA-binding-protein* (TBP), une sous-unité du facteur de

transcription TFIID qui est un élément de transcription de la machinerie de l'ARN polymérase II qui code pour les gènes codant de l'ARNm. Suite à la fixation de TFIID à la région de la boîte TATA, TFIID recrute plusieurs facteurs de transcription incluant l'ARN polymérase afin de former un complexe de pré-initiation prêt à induire la transcription. À la fin, le complexe de pré-initiation va inclure le promoteur, les facteurs de transcription, l'ARN polymérase, et les protéines activatrices et inhibitrices (Fig. 2) [7-10].

1.1.1.1.2 L'initiation

Chez les bactéries, l'initiation de transcription est simple. Elle débute avec la fixation de l'ARN polymérase à une séquence spécifique de l'ADN. L'initiation de transcription débute par l'association de l'ARN polymérase avec le facteur sigma. Ce complexe appelé holoenzyme se fixe ensuite à une région spécifique du promoteur et induit la transcription. Une fois que l'initiation de l'ARN est terminée, le facteur sigma se dissocie du complexe [11, 12].

L'initiation de la transcription chez les eucaryotes est plus complexe. Elle consiste en une séquence de recrutement de protéines appelés des facteurs de transcription généraux au niveau du promoteur pour déclencher la transcription [13, 14] [10]. La protéine qui forme le premier complexe est le facteur de transcription TFIID qui reconnaît la région de la boîte TATA et s'y fixe [10, 15]. Par la suite, TFIID interagit avec TFIIA pour former le second complexe qui se fixe spécifiquement à la région -42 à -17 paires de bases du promoteur tardif majeur. TFIIB se lie ensuite au second complexe pour former le troisième complexe qui agit comme un pont entre l'ARN polymérase et le promoteur [16]. La liaison de l'ARN polymérase au troisième complexe forme le quatrième et cinquième complexe qui se fixe ensuite au TFIIIE afin de former le sixième complexe [17]. TFIIIE a une activité ATPase

ADN-dépendante qui est requise pour déclencher la transcription [10, 17]. L'ARN polymérase forme un autre complexe avec TFIIF et TFIIH. Ensuite, TFIIH qui a une sous-unité hélicase XPB ADN rend l'ADN accessible et ouvre le complexe ARN polymérase afin d'exposer les brins d'ADN et déclencher l'initiation de la transcription (Fig. 2) [18].

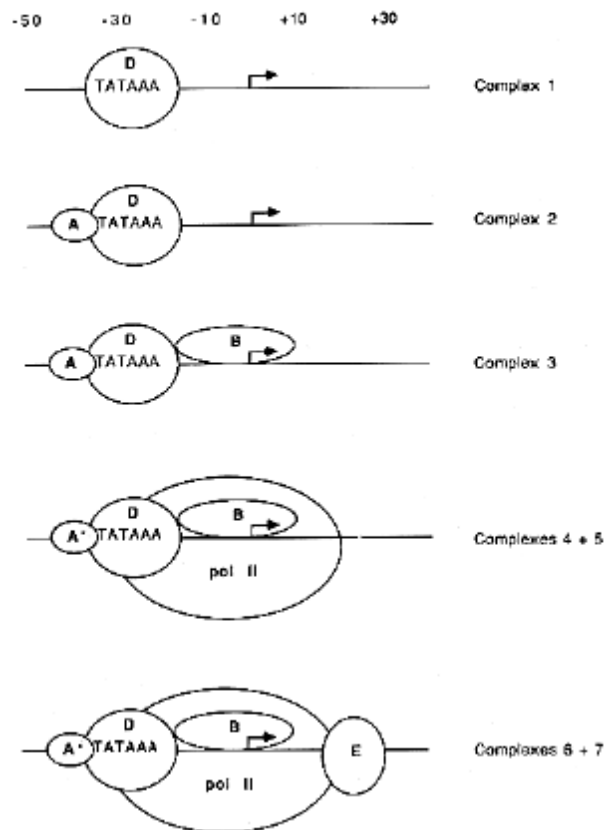


Figure 2 : Localisation de la boîte TATA et le recrutement de l'ARN polymérase II par les facteurs de transcription

Tiré de [16].

1.1.1.1.3 L'initiation abortive

L'étape après l'initiation de la transcription est l'étape d'élongation. Toutefois, avant celle-ci, il y a un processus précis de transcription, appelé la transcription abortive ou l'initiation abortive, qui se déroule chez les cellules procaryote et les eucaryotes [19]. Lors de cette

étape, l'ARN polymérase II produit un ARN court avant la production de l'ARNm codant des gènes. Ce court ARN est composé de 8 à 15 nucléotides [20, 21]. Tout d'abord, l'ARN polymérase II forme un complexe fermé avec le promoteur (RPc). L'ARN polymérase II décompresse ensuite un des ADN présents au site d'initiation afin de former un complexe ouvert avec le promoteur (RPo). Après ces deux étapes, l'ARN polymérase II entre dans les cycles abortifs pour générer un court ARN appelé le complexe d'initiation de la transcription ARN polymérase II-promoteur (RPic). Ce complexe amène à la formation du complexe d'élongation [22], [23]. Avant l'étape d'élongation, l'ARN polymérase sort du stade d'initiation et déclenche la dissociation de certains facteurs de transcriptions généraux. TFIID, TFIIA et TFIIH reste attaché à la région du promoteur pour la ré-initiation [24]. Seulement TFIIIF reste attaché à l'ARN polymérase pour agir comme facteur d'élongation [25, 26].

1.1.1.2 L'élongation

Après l'initiation abortive, le complexe d'élongation est recruté pour activer l'ARN polymérase à la transcription. Il y a deux stades à l'élongation de la transcription : l'élongation précoce et l'élongation productive [27].

1.1.1.2.1 L'élongation précoce

L'élongation précoce est la transition de l'ARN polymérase du promoteur afin d'échapper à l'élongation productive qui implique une étape intermédiaire appelé la pause au promoteur proximal [28]. Après l'initiation, l'ARN polymérase commence à utiliser les nucléotides à l'extrémité 3' afin de prolonger le produit d'ARN. Durant l'étape précoce

d'élongation, l'ARN polymérase transcrit un ARN initial de 20 à 60 nucléotides puis pause entre le promoteur et le premier nucléosome [29]. Cette étape de pause de l'ARN polymérase implique beaucoup de protéines appelées facteurs de pause qui jouent un rôle en stabilisant et phosphorylant l'ARN polymérase [30] [31] [32]. Le facteur d'élongation négative (NELF) et le facteur d'induction de la sensibilité au 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DSIF) sont deux facteurs de pause qui se lient à l'ARN polymérase en état de pause et stable [33]. Le NELF a une sous-unité NLEF-E qui reconnaît l'ARN [34] [35] et le DSIF peut se fixer au produit d'ARN court. Ces facteurs de pause vont permettre le contrôle et le maintien de l'activité de l'ARN polymérase [36] [37].

1.1.1.2.2 L'élongation productive

L'élongation productive est le progrès de l'ARN polymérase sur l'ADN, aussi appelé la sortie vers l'élongation productive puisque c'est la transition efficace de l'ARN polymérase en état de pause vers cette étape [27]. Pendant la fixation de l'ARN polymérase à la région proximale du promoteur, le complexe d'élongation subit deux modifications : la coiffe en 5' de l'ARN naissant et la phosphorylation du complexe d'ARN polymérase en état de pause.

La coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN naissant requiert trois activités enzymatiques : la digestion du triphosphate en 5' de l'ARN, l'ajout de la base guanine en relation 5' à 5' et la méthylation de cette guanine [38]. La coiffe est requise pour protéger le court ARN et pour assurer la transition de l'ARN polymérase de la transcription précoce vers la transcription productive [27]. La phosphorylation de l'ARN polymérase en état de pause est déclenchée par le P-TEFb chez les humains, Ctk1 chez la levure, un complexe de protéine kinase

responsable de la modification de l'ARN polymérase qui recrute des facteurs d'élongation additionnels aidant le processus de l'ARN polymérase [28]. P-TEFb est un complexe hétérodimère composé de deux sous-unités, la cycline T (CycT) et la kinase dépendante de la cycline (CDK9) [39]. Elle a un rôle dans la sortie de l'état de pause et la médiation de l'élongation via la phosphorylation de Ser2 du C-terminal de l'ARN polymérase II et des facteurs de pause DSIF et NELF [40] [41] [34] [42]. Le recrutement de P-TEFb est une étape importante afin de contrôler l'expression des gènes [27]. Il y a plusieurs façons de recruter P-TEFb à l'ARN polymérase II en état de pause : (i) via l'interaction de c-myc avec la sous-unité CycT de P-TEFb [43] [44], (ii) grâce à la protéine bromodomaine BRD4 (reconnaissant l'histone acétylé) qui peut se lier aussi à la sous-unité CycT de P-TEFb [45] [46], et (iii) par la sous-unité MED26 du complexe médiateur qui peut tout d'abord se lier à TFIIF puis se fixer à P-TEFb afin d'assurer la transition de l'ARN polymérase II à l'étape de l'élongation de la transcription [47].

Après l'étape de pause de l'ARN polymérase II, l'élongation ne peut débuter puisque l'ARN polymérase II doit surmonter d'autres barrières avant de débuter la transcription. Ces barrières sont les nucléosomes [27].

1.1.1.2.3 Surmonter la barrière de nucléosomes

Pendant l'élongation, les gènes ont besoin de l'aide des mécanismes qui retirent les nucléosomes et permettent de surmonter la barrière de nucléosome afin de laisser l'ARN polymérase passer sur le corps du gène. Le remodelage de nucléosome, l'échange d'histones et les modifications des histones jouent un rôle majeur dans le processus efficace d'élongation par la ARN polymérase II [27]. Afin de surmonter la barrière de

nucléosome, certains complexes de protéines sont impliqués : le complexe FACT, SPT6, le complexe PAF et PARP.

Le complexe FACT (*FAcilitates Chromatin Transcription*) est une des plus importantes chaperonnes d'histones qui permettent l'ARN polymérase II de surmonter la barrière de nucléosomes [48]. Le complexe FACT est composé de deux protéines, Spt16 et Pob3 [49]. Ce complexe est capable de reconnaître les histones H2A et H2B, les dissocier du nucléosome, mener l'ARN polymérase II à passer sur le corps de gène [50]. Par la suite, il peut aussi associer H2A et H2B au nucléosome une fois que l'ARN polymérase II est passée [51].

SPT6 est une protéine avec une activité histone chaperonne qui peut se lier aux histones H3 et H4 et retire le nucléosome. Sa fonction est de dissocier le nucléosome afin de permettre l'ARN polymérase II de passer sur le corps du gène et de le réassembler après la transcription [52].

Le complexe PAF (*RNA Polymerase-Associated Factor I*) est un des complexe de protéine qui peut s'associer et se déplacer pendant la transcription ainsi que jouer un rôle pendant l'élongation [53]. Le complexe PAF n'est pas connu pour avoir une activité enzymatique mais sert de plateforme afin de recruter certains facteurs d'élongation comme le SEC (*Super Elongation Complex*) et le FACT [54]. Il a été démontré que le complexe PAF joue également un rôle dans la mono-ubiquitination de H2B K123 par Rad6 et UbcH6 et que cette modification de H2B est requise dans la fonction de FACT dans l'élongation [55].

PARP (*Poly (ADP-Ribose) Polymerase*) joue également un rôle à surmonter la barrière de nucléosome mais d'une façon indépendante de la transcription [56]. Il a été démontré que PARP-1 agit en excluant H1 de la stimulation de promoteurs [57].

1.1.1.3 La terminaison

La terminaison de la transcription est une étape où l'ARN polymérase II arrête la transcription, libère l'ARNm et dissocie le complexe d'ARN polymérase II de l'ADN. L'ARN polymérase II reconnaît une section de la séquence d'acides nucléiques qui code pour la fin du gène. Cette séquence envoie un signal au nouvel ARNm de se dissocier du complexe de transcription. Chez les cellules eucaryotes, le signal est reconnu par des facteurs de protéines qui interagissent avec l'ARN polymérase II afin d'induire le processus de terminaison. Une fois que l'ARNm reçoit un message de la polyadénylation (poly(A)), la protéine CPSF (*Cleavage Polyadenylation Specificity Factor*) et CstF (*Cleavage Stimulation Factor*) sont déplacés du domaine carboxyle-terminal de l'ARN polymérase II au signal poly(A) [58]. Cette étape recrute d'autres protéines pour arrêter le transcrit et dissocier l'ARNm du complexe de transcription [59].

1.1.2 Le remodelage de la chromatine

La régulation de la transcription est hautement contrôlée à toutes les étapes, essentiellement à l'étape de l'initiation lorsque les facteurs d'activation et de répression du complexe d'ARN polymérase II de la machinerie transcriptionnelle se fixent aux régions promotrices de l'ADN. L'ADN est compactée dans le noyau cellulaire par des protéines de compaction appelés histones qui forment le nucléosome. Plusieurs nucléosomes ensemble

forment la structure condensée de la chromatine. Cette forme de chromatine ne permet pas l'accès à l'ADN par la machinerie transcriptionnelle. Afin de surmonter cette barrière et accéder à région condensée de l'ADN, un processus connue par le nom de remodelage de la chromatine altère la structure du nucléosome afin d'exposer ces régions spécifiques de l'ADN et le cacher comme processus de régulation de la transcription.

1.1.2.1 La chromatine

La chromatine est une macromolécule composée d'ADN et de protéines histones afin de former un support et emballer le génome en entier. La chromatine contient les informations génétiques héritées des générations précédentes. Elle est formée d'une grappe de nucléosomes qui contiennent 147 paires de base d'ADN. Une unité de nucléosome est enroulé autour d'un octamère d'histone avec 2 copie de chaque dimère de H2A-H2B et H3-H4 (Fig. 3) [60]. La chromatine est composée de deux régions majeures : l'hétérochromatine, une région fortement condensée composée de tous les gènes inactifs, et d'euchromatine, une région ouverte composée de tous les gènes actifs [61].

1.1.2.2 Le mécanisme de remodelage de la chromatine

Le remodelage de la chromatine est un processus dynamique par lequel la structure de la chromatine est modifiée et permet aux protéines de la machinerie transcriptionnelle d'accéder à l'ADN condensé. Une série d'enzymes assiste au remodelage de la structure et modifie la position du nucléosome. Trois mécanismes sont impliqués dans le remodelage de la chromatine : (i) le remodelage ATP-dépendant, (ii) la modification covalente de l'histone impliquant 16 classes de modifications d'histones et (iii) la méthylation de l'ADN

qui altère l'accessibilité de l'ADN. Les mécanismes de remodelage de la chromatine ATP-dépendant incluent quatre familles : la famille SWI/SNF (*SWItching defective/Sucrose Non Fermenting*), la famille ISWI (*Imitation SWI*), la famille NuRD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylation*)/Mi-2/CHD (*Chromodomain Helicase DNA binding*) et la famille INO80 (*INOsitol requiring 80*). Ces mécanismes peuvent fonctionner ensemble ou indépendamment pour modifier la chromatine et assurer l'efficacité de multiples processus tel que la régulation de la transcription, la réplication de l'ADN et la réparation des dommages à l'ADN [62] [63] [60].

1.1.2.2.1 Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendant

Les complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendant sont hautement conservés de la levure à l'humain. Ils contiennent tous une sous-unité catalytique d'ATP et contrôle l'expression des gènes en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour déplacer, retirer ou remplacer un nucléosome, plus spécifiquement les histones [64],[65]. Il est reconnu que ces complexes de protéines comportent des domaines ATPase qui leur permettent de déplacer les nucléosomes ou les histones autour de l'ADN. Cette étape mène à l'altération de la structure du nucléosome, ouvre la chromatine et expose une région de l'ADN pour la transcription[62]. Tel que mentionné précédemment, il y a quatre familles de complexe de remodelage de la chromatine qui contiennent toutes un bromodomaine en carboxyle-terminal se liant aux histones afin de les acétyler [66].

La famille SWI/SNF

SWI/SNF est un complexe composé de 10 à 12 sous-unités dont la composition varie en fonction du type cellulaire [67]. Deux sous-unités de la famille SWI/SNF sont BRM, un

homologue de la protéine brahma chez la drosophile, et BRG1 (*BRM/SWI2-related gene 1*) sont composés d'un bromodomaine situé à l'extrémité carboxy-terminal qui est responsable de se lier aux histones acétylés [66]. Ce complexe en général se lie à la chromatine et déplace le nucléosome en coupant le contact entre l'ADN et l'histone, ce qui a pour conséquence d'exposer l'ADN aux facteurs de transcription. Ce complexe joue un rôle comme suppresseur de tumeur, dans la progression du cycle cellulaire, la réplication de l'ADN, le développement, la différenciation, l'élongation, la signalisation, l'épissage et la réparation des dommages à l'ADN [68] [69] [70]. Les mutations chez les membres du complexe SWI/SNF ont permis d'identifier plusieurs types de cancer ce qui explique pourquoi ce complexe de remodelage de la chromatine est le plus étudié [60]

La famille ISWI

Cette famille a deux membres, SNF2H et SNF2L. Ceux-ci sont composés de deux domaines SANT (*SWI3, ADA2, NCOR and TFIIIB DNA-binding Domain*) et SLIDE (*SANT-like ISWI*) qui sont responsables de l'interaction avec les histones non modifiés [71]. ISWI organise la position des histones afin de moduler la répression et l'activation de la transcription ainsi que l'élongation [72] [73] [74].

La famille Mi-2/NuRD

Le Mi-2/NuRD est un complexe très abondant dans la cellule et unique car il possède deux activités différentes : une activité déacétylase des histones et une activité ATPase qui sert au remodelage de la chromatine. L'activité enzymatique de ce complexe se situe au niveau de deux hélicases, CHD3 et CHD4, qui contiennent un domaine PHD conservé [75][76]. CHD3 et CHD4 possèdent un chromodomaine responsable de reconnaître les histones méthylés comme l'histone H3 méthylée en lysine 4 (H3K4me) [77] [78]. Il a été démontré

que les sous-unités Mi-2beta de NuRD interagissent avec la protéine nucléaire MCRS1 (*Microspherule protein 1*)/MSP58 (*58-kDa Microspherule protein*) afin de moduler la transcription d'ARNr [79]. CHD5 a aussi été démontré d'être un gène suppresseur de tumeurs de 1p36 humain, une région génomique qui est supprimée dans les neuroblastomes et d'autres cancer. Ce suppresseur de tumeur contrôle la prolifération, l'apoptose, et la sénescence via la voie p19(Arf)/p53 [80] MTA1 (*Metastasis-associated gene 1*) est partie du complexe de remodelage NuRD/Mi-2/CHD et contient 2 homologues, MTA2 et MTA3, présent chez le rat et les lignées cellulaires de cancer du sein métastatique humain [81].

La famille INO80

Cette famille inclut INO80, SRCAP (*SNF2-related CREB-activator protein*) et p400, un domaine ATPase *slipt* connu[82]. Chez la levure, les membres de la famille INO80 sont recrutés aux sites de dommage double-brin de l'ADN afin de déclencher la recombinaison homologue et les voies de réparation non homologue de religature d'extrémités. Son recrutement est assujetti à l'interaction entre H2A.X et sa sous-unité Arp4 [83].

1.1.2.2 La modification covalente des histones

Les histones subissent une série de modifications enzymatiques qui catalyse, retire ou ajoute divers éléments chimiques. Ces modifications ont lieu grâce à des complexes de protéines spécifiques qui contiennent des domaines particuliers qui peuvent reconnaître les marques des histones. Ces modifications jouent un rôle majeur dans la régulation de l'ADN de différents processus comme la transcription, la réparation de l'ADN et la réplication [84] [85]. Il y a deux catégories de modifications d'histones: les mécanismes

‘cis’ et les mécanismes ‘trans’. Les mécanismes ‘cis’ altèrent le contact de nucléosomes en changeant la charge des résidus. Par exemple, ce type de mécanisme s’applique dans le cas de l’acétylation (H4K16) et de déacétylation d’histone. D’autre part, les mécanismes ‘trans’ requièrent l’utilisation de “lectrices” non histone qui interagissent avec des modifications spécifiques d’histones et cause la fonction. Par exemple, la méthylation et la déméthylation de marques d’histones sont des mécanismes ‘trans’.

Lors de la modification d’histone, les histones ou le code épigénétique est rédigé par des enzymes appelés “écrivains”, retirés par des enzymes appelées “effaceurs” et reconnues par des enzymes appelées “lectrices”. Ces trois types d’enzymes se fixent via un domaine spécifique requis pour les modifications d’histones [86]. Par exemple, H3K4me3 est écrite par l’histone méthyltransférase MLL (*Mixed Lineage Leukemia*), effacée par la déméthylase JARID1 (*jumonjiAT-rich interactive domain 1*) et lue par les protéines ING via leur homéodomain PHD [87].

Jusqu’à présent, nous avons identifié près de 16 classes de modifications d’histones qui impliquent 67 marques d’histones [88] [60]. Tel que mentionné précédemment, il y a plusieurs modifications et enzymes qui ont été identifiés dans le processus. Toutefois, celles qui ont été étudiées le plus sont la méthylation, la phosphorylation, l’ubiquitination ainsi que l’acétylation, la sumoylation, l’ADP-ribosylation, la déimination et l’isomérisation de la proline. Je traiterai en détail des trois premières modifications mentionnées.

La méthylation

La méthylation est une modification post-traductionnelle qui joue un rôle dans divers processus cellulaires tel que la transduction d’un signal, la réparation de l’ADN, la

transcription, la localisation cellulaire des protéines et le *processing* de l'ARN [89] [90]. La méthylation a lieu spécifiquement sur les résidus d'acides aminés que sont l'arginine, la lysine et l'histidine. Plus de 20 sites de méthylation sur la lysine et l'arginine ont été identifiés jusqu'à ce jour [91]. L'arginine peut être méthylée une ou deux fois par la PRMTs (*Protein arginine methyltransferases*) [92]. La lysine peut être méthylée une, deux ou trois fois par la lysine méthyltransférase. Par exemple, la méthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 est requise pour débiter la réparation de l'ADN [93]. La méthylation ne modifie pas la charge de la molécule comme c'est le cas de l'acétylation ou de la phosphorylation. Elle se lie à des histones non-modifiées et les modifie pour déclencher une fonction [85]. Le résidu d'histone le plus méthylé est la lysine et les plus étudiés sont H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79, et H4K20. La méthylation sur la lysine a différentes fonctions. Par exemple, H3K4, H3K36 et H3K79 sont en relation avec des gènes actifs de l'euchromatine tandis que d'autres, comme H3K9, H3K27 et H4K20, sont en relation avec les régions hétéro-chromatiques du génome. De plus, la méthylation du même résidu peut mener à différentes fonctions. Par exemple, H3K4me_{2/3} induit le site de départ de la transcription de gènes actifs tandis que H3Kme₁ est en relation avec les amplificateurs actifs [94] [95]. Les enzymes spécifiques pour la méthylation de la lysine possèdent un domaine SET conservé qui est responsable de l'activité méthyltransférase. Chez la levure, la protéine Set1 est responsable de la modification de H3Kme₃, une modification qui est importante pour l'activité transcriptionnelle de la région du promoteur [96] [97]. La protéine Set2 est également requise pour la méthylation de H3K36me₃ [98]. Il a été démontré que H3K4 et H3K36 jouent un rôle majeur dans le marquage des promoteurs et des gènes durant la transcription active [91]. Dans le cas de la méthylation, les protéines ou enzymes qui reconnaissent les marques d'histones possèdent un domaine spécifique qui est différent

dépendamment du type d'enzyme et du type de marques d'histone. Ces protéines sont des lecteurs de méthylation d'histones.

Les lecteurs de méthylation d'histones

Les modifications sur la lysine, sont, par exemple, lues et interprétées par des protéines qui ont un domaine spécifique. Ces domaines sont classifiés en deux catégories : la famille royale (domaine tudors, chromodomaine, MBT) et les doigts PHD [99]. Plusieurs de ces lecteurs de méthylation sont impliqués dans le cancer. Par exemple, la perte du chromodomaine chez la protéine HP1 (*heterochromatin protein 1*), qui reconnaît H3K9me, est impliqué dans plusieurs cancers tandis que les doigts PHD, qui reconnaissent H3K4me, sont impliqués en leucémie [100, 101].

La déméthylation

La méthylation des histones est un processus dynamique réversible où chaque marque d'histone méthylée, requise pour l'activation d'un processus, peut être déméthylé afin de réprimer ou arrêter ce processus. [102] [91]. La déméthylation est un processus actif qui implique des protéines spécifique. La première protéine de déméthylation qui a confirmé que la méthylation est réversible est LSD1 (*Lysine Specific Demethylation 1*). LSD1 agit tel qu'un corépresseur de la transcription et cause la mise sous silence de gènes spécifiques [102]. Elle requiert un domaine amine oxydase qui génère de la formaldéhyde en utilisant la flavine adénine dinucléotide (FAD) comme co-facteur et causant la déméthylation de H3K4. La seconde protéine requise pour la déméthylation fait partie de la famille FBXL11, aussi connue sous le nom de JHDMI (*JmjC domain-containing histone demethylase 1*) et KDM2A. Ces protéines transportent un domaine JmjC Fe²⁺ dioxygénase qui est requis pour la déméthylation de H3K36 [103]. En présence de Fe²⁺ et d'alpha-ketogutarate,

JHDM1 déméthyle H3K36 et transforme l'alpha-ketogutarate en formaldéhyde et succinate.

Phosphorylation

La phosphorylation est un mécanisme réversible des protéines qui joue un rôle très important dans la régulation de plusieurs processus dans la cellule [104]. Elle est plus fréquente sur les résidus de la sérine, la thréonine et la tyrosine. La phosphorylation a été particulièrement bien étudiée chez les histones. Dans le cas des histones, la phosphorylation modifie la charge des protéines qui va altérer leurs propriétés ioniques pour changer la structure et la fonction de la chromatine. La phosphorylation des histones est un processus très important qui joue un rôle dans la mitose, l'apoptose, la réparation de l'ADN et la transcription. Cette phosphorylation est divisée en 2 catégories selon la spécificité de la région de l'histone. Certaines sont impliquées dans la régulation de la transcription, tandis que d'autres sont impliquées dans la condensation de la chromatine. Dans ces deux catégories, il y a d'autres modifications d'histones, par exemple H3S10, qui sont aussi impliqués [105]. La phosphorylation des histones est un processus très dynamique comme la modification post-traductionnelle qui est contrôlée par l'activité des protéines kinases et des protéines phosphatases. Jusqu'à présent, les chercheurs ont découvert plusieurs résidus qui sont phosphorylés mais seulement sur les histones H2B et H3.

Chez les cellules de mammifères, l'histone H2B contient deux résidus de sérine qui sont phosphorylés. Le premier résidu est H2B S14 qui est phosphorylé par la kinase MST (*macrophage stimulating protein1*). Cette modification est nécessaire pour déclencher l'apoptose [106]. Le deuxième résidu est H2B S36 qui est phosphorylé par la kinase

AMPK (*5' adenosine monophosphate-activated protein kinase*) [107]. Cette phosphorylation active la transcription lors de stress cellulaire [108].

L'histone H3 contient 6 sites de phosphorylation serine/thréonine (T3/T6/S10/T11/S28/T45) modifiés par des kinases serine/thréonine et un site H3Y41 phosphorylé par une tyrosine kinases [105]. H3T6 a été récemment identifié comme phosphorylation par PKC β (*Protein kinase C beta I*) et sa surexpression peut induire le cancer de prostate [109]. Ces résidus phosphorylés ont deux fonctions différentes. Une de ces fonctions est dans la condensation des chromosomes. Par exemple, dans le cas de H3T3 qui est modifié par la protéine Haspin VRK1, H3S10 qui est modifié par Aurora B VRK1, H3T11 qui est modifié par DIK et H3S28 qui est phosphorylé par Aurora B. L'autre fonction des résidus phosphorylés est dans la transcription et l'apoptose. On peut citer comme exemple de cette fonction H3T6 qui est modifié par PKC, H3S10 qui est modifié par différentes kinases comme PIM1, IKK and Akt, H3T11 qui est modifié par les Chk1 et PRK1, H3S28 qui est modifié par MSK1/2, H3Y41 qui est modifié par JAK2 et H3T45 qui est modifié par PKC [105].

La phosphorylation est, comme les autres modifications, présentes lorsque les kinases ou les phosphatases possèdent des domaines d'interaction qu'on appelle 'lecteurs'. Ceux-ci ont le rôle de reconnaître les résidus à phosphoryler. Par exemple, la protéine MDC1 est recrutée sur les sites de dommages d'ADN double-brins à l'aide de son lecteur, le domaine BRCT [110]. La famille des phosphatase 14-3-3 qui possède un domaine conservé de liaison phosphosérine qui reconnaît les sites de phosphorylation de H3S10ph et H3S28ph est un autre exemple de lecteur [111].

Ubiquitination

Une autre modification des histones est un processus enzymatique réversible qui s'appelle l'ubiquitination et qui fait partie des modifications post-traductionnelles importantes dans la régulation des mécanismes dans la cellule. Ce processus implique des protéines qui s'interagissent avec des protéines cibles pour les substituer, les dégrader ou les activer [112]. Ces protéines impliquées dans cette réaction s'appellent les ubiquitines qui sont composées de 76 acides aminés, conservées de la levure à humain [113]. L'ubiquitination est catalysée par l'action des Ub-activating (E1), Ub-conjugating (E2), et Ub-ligating (E3). Avant l'interaction du E1 avec la protéine cible, le C-terminal de l'ubiquitine doit être activé pour former un isopeptide avec la protéine cible [114]. L'activation du groupe α -carboxyle de l'ubiquitine par E1 est une étape obligatoire pour tous les processus [115]. En effet, l'ubiquitination se déroule en 3 étapes qui commencent par l'activation de l'ubiquitine par E1, étape dépendante de la présence d'ATP, la conjugaison conduite par E2 qui va catalyser le transfert de E1 à E2 par la réaction de trans(thio)estérification, et, pour terminer, par la ligation où le E3 va catalyser la dernière étape de l'ubiquitination pour se lier avec le E2/ubiquitine sur lequel tout le complexe par la suite va se lier afin de déclencher une fonction de dégradation ou d'activation [112].

Les modifications de l'histone par l'ubiquitination jouent un rôle crucial dans la condensation et le remodelage de la chromatine. L'ubiquitination de l'histone a été découvert pour la première fois sur H2A puis sur H2B qui est ubiquitiné dépendamment de H2Aub [116] [117].

1.2 La rapamycine et ses protéines ciblées

1.2.1 La découverte de la rapamycine

La rapamycine est un métabolite naturel et un macrolide avec une propriété lipophile produite par une bactérie de la terre qui s'appelle *Streptomyces hygroscopicus* (Fig.3). Cette bactérie a été collectée en 1965 d'une île qui s'appelle Rapa-Nui, origine de son nom [118]. La rapamycine a été purifiée pour la première fois en 1972 dans un laboratoire de recherche qui s'appelle AYERST à Montréal par le Dr. Suren Sehgal. Grâce à ses recherches, les propriétés immunosuppressives de la rapamycine ont été mises en évidence. Dr Sehgal a observé que cette molécule a une importante capacité à inhiber les cellules tumorales [119]. Par conséquent, il a décidé d'envoyer des échantillons de rapamycine au programme de développement thérapeutique du National Cancer Institute (NCI) afin de réaliser un criblage pour déterminer l'activité anti-tumorale de la rapamycine sur 60 lignées cellulaires tumorales. La rapamycine a pu inhiber la croissance de nombreuses lignes cellulaires tumorales incluant Colon 26, B16 43 mélanocarcinome et EMpendymoblastome [120]. Suite à ces résultats, le NCI a concédé un statut de drogue prioritaire à étudier à la rapamycine.

1.2.2 La rapamycine en recherche clinique

La première propriété découverte chez la rapamycine est celle d'un agent antifongique qui a été écarté puisque la rapamycine avait comme effet indésirable une activité immunosuppressive. Après plusieurs années, les chercheurs ont découvert un effet de la rapamycine sur l'inhibition des cellules T et ont utilisé ses propriétés immunosuppressives dans le traitement du rejet de la greffe. Ces propriétés ont attirés l'attention des grandes

compagnies pharmaceutiques telles que Wyeth-Ayerst et Novartis qui ont synthétisé des dérivés de la rapamycine tel que le CCI-779 et le RAD001 ayant démontrés une grande capacité à inhiber la prolifération de différents types de tumeurs. Par la suite, en 1999, la rapamycine a eu l'approbation clinique en transplantation rénale et comme traitement anti-cancer [118]. Les propriétés anti-tumorales de la rapamycine sont le résultat de sa capacité à bloquer directement la prolifération des cellules cancéreuses et son effet indirect anti-angiogénique, c'est-à-dire sa capacité à réduire la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins qui nourrissent les cellules tumorales [121]. Ainsi, la rapamycine a une vaste implication clinique dans 3 domaines spécifiques : la transplantation d'organe, en oncologie, et dans le traitement de maladies coronariennes.

Ceci ajoute une grande valeur à cette molécule et un intérêt bien particulier à identifier sa cible et comprendre son mécanisme d'action puisque ses implications cliniques nous laissent penser que la protéine ciblée par la rapamycine aurait un rôle très important dans le contrôle de la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire et le contrôle des nutriments [118].

1.2.3 La découverte de la protéine TOR (*Target Of Rapamycin*)

C'est dans la fin des années 1980 que les chercheurs ont commencé à s'intéresser plus au mécanisme d'action de la rapamycine et ses protéines cibles, surtout après avoir découvert sa forte capacité à inhiber le système immunitaire par le blocage des cellules T qui induisent l'arrêt de cycle cellulaire en phase G1 [118]. Certains groupes ont commencé à s'intéresser à ses mécanismes dans les levures [122]. Ils se sont ensuite intéressés aux cellules mammifères [123] ce qui leur ont permis de découvrir que, dans ces deux types d'organismes, la rapamycine lie et inhibe la protéine FKBP12 (*FK506 binding proteine*

12), une protéine peptidyl-prolyl cis trans isomerase [124] De plus, la capacité de la rapamycine à arrêter le cycle cellulaire chez les levures et les cellules mammifères, démontrait que cette protéine est conservée [122] Par la suite, ils ont supprimés le gène FPR1 qui code pour la protéine FKBP pour déterminer si ceci résulterait au même résultat que le traitement avec la rapamycine. Or, ceci n'a eu aucun effet sur la viabilité des cellules, révélant par le fait même que cette protéine n'est pas responsable de la croissance et la prolifération cellulaire (Fig. 3) [125] [126].

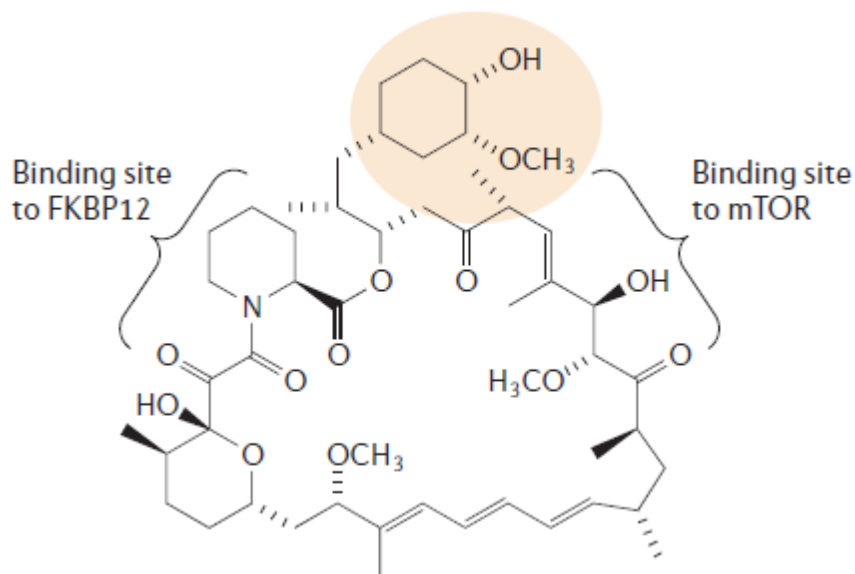


Figure 3 : Structure de la rapamycine avec ses régions d'interaction avec TOR et FKBP12

Figure tirée de [127].

1.2.3.1 Caractéristiques moléculaires de la protéine TOR

TOR1 et TOR2 sont des protéines identiques à 67% possédant une taille de 282 kDa. TOR1 et TOR2 font partie de la famille des protéines kinases sérine/thréonine phosphatidyl inositol (PIKK) (Fig. 4) [128]. Cette famille de protéines inclut également des protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire tel que l'ATM (*ataxia*

telangiectasia mutated), DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*), Mec1p (*mitosis entry checkpoint*), ATR (*ATM and RAD3 related*) et TRRAP (*transformation/transcription domain associated protein*). Toutes ces protéines ont une partie C-terminale homologue à celle des phosphatidyl inositol 3-kinases et 4-kinases sauf que les protéines tel que TOR1 et TOR2 ont une activité protéine kinase et non une activité lipide kinase [129]. Plusieurs groupes ont trouvé que TOR a une activité kinase sérine/thréonine [130] [131] [132]. Toutes les protéines TOR ont des domaines similaires de la partie N-terminale jusqu'à la partie C-terminale. La structure est composée de répétitions HEAT (*Huntingtin, Elongation Factor 3, the A subunit of PP2A, and TOR1*), d'un domaine FAT (*FRAP, ATM and TRRAP*), d'un domaine FRB, d'un domaine kinase et le domaine FATC [133]. Les répétitions HEAT se composent de 20 motifs HEAT. Chaque motif contient 40 résidus qui forment une interaction double et antiparallèle avec hélices alpha [134, 135]. Les répétitions HEAT occupent presque la moitié de la partie N-terminale qui est la partie spécifique pour lier les complexes de protéines qui s'interagissent avec TOR [136]. Le domaine central FAT est composé de 500 résidus tandis que le domaine FATC à l'autre extrémité où se trouve la partie C-terminale se compose de 35 résidus. Ces deux domaines sont toujours en paire et sont toujours présents chez les membres de la famille de PIKK [137] [138]. Le domaine FRB (*FKBP-rapamycin-binding region*) se compose de 100 résidus. Comme son nom l'indique, c'est la région responsable de la liaison avec le complexe FKBP-rapamycine. Les cellules qui contiennent une mutation sur le domaine FRB sont résistantes à la rapamycine (Fig. 4) [126, 139]. TOR1 et TOR2 jouent un rôle important dans le contrôle de la croissance cellulaire. Malgré les grandes similarités au niveau de leur structure, leur fonctionnement n'est pas identique [140, 141]. La suppression des gènes TOR1 et TOR2 ou le traitement à la rapamycine cause un manque de nutriments chez les cellules et l'arrêt du cycle cellulaire en G1 [142]. La suppression de TOR1 seulement n'a

aucun effet. Par contre la suppression de TOR2 cause un arrêt de la croissance des cellules [140, 141]. Ceci signifie que TOR2 a deux fonctions, une fonction est partagée avec TOR1 et l'autre fonction est spécifique à TOR2 [143, 144]. Ces résultats indiquent donc que TOR1 et TOR2 semblent avoir deux voies de signalisations cellulaires différentes et chacun forme un complexe avec différentes protéines [142, 144].

1.2.3.2 Le complexe TOR1

Chez les levures, le complexe TOR1 (TORC1) est en interaction avec plusieurs protéines. Il se compose de TOR1 ou TOR2, Kog1, LST8 et TCO89 [145-147]. Le complexe TORC1 se localise près de la membrane plasmique de la vacuole. Chez la levure la vacuole est le réservoir des nutriments. Cette localisation correspond donc avec la fonction de TORC1 de contrôleur des nutriments [148, 149]. La rapamycine et la malnutrition ont le même effet sur la physiologie des levures. La synthèse protéique diminue, l'autophagie est induite, et le cycle cellulaire est arrêté en G1 [142]. Ces résultats proposent que TOR, précisément TORC1, régule la croissance cellulaire et contrôle les nutriments. Cette proposition a été confirmée par le travail de Beck et Hall qui ont démontré que, en réponse aux nutriments et au carbone, TORC1 active plusieurs facteurs de transcription responsables d'activer les gènes responsables de la réponse aux nutriments [150]. Ceci suggère que l'activité de TORC1 est régulée en réponse aux nutriments.

Un des substrats de TORC1 qui est bien caractérisé est Sch9. Sch9 est directement phosphorylé par TORC1 sur les 6 acides aminés de son partie C-terminale. Sch9 est rapidement déphosphorylé en réponse à la rapamycine et au manque de nutriments. Ces résultats suggèrent fortement que TORC1 et Sch9 jouent un rôle important dans le contrôle des nutriments [149].

L'activité de TORC1 est aussi régulée en réponse au stress. La phosphorylation de Sch9 est dramatiquement diminuée en réponse au stress tel que le stress oxydatif, la température élevée et la caféine [149, 151]. Or, il n'est pas encore connu comment le signal du stress dans l'environnement est transmis dans la cellule.

Le plus important régulateur de TORC1 est le complexe EGO (*Escape GROWth*) qui est composé de 4 protéines : Ego1, Ego3, Gtr1, and Gtr2 [118]. Le complexe EGO se trouve près de la membrane de la vacuole. Il interagit et active TORC1 en réponse aux nutriments. Gtr1 et Gtr2 sont des GTPase de la famille Ras. La combinaison de Gtr1 GTP and Gtr2 GDP active TORC1 par l'interaction du domaine de fixation de Gtr1 dénommé *Nucleotide-binding status* [152]. Ego1 et Ego3 sont les homologues de LAMTOR1 et LAMTOR2/3 chez les vertébrés et fonctionnent ensemble en transmettant le signal à TORC1 lors de la réponse aux nutriments (Fig. 4) [153].

1.2.3.3 Le complexe TOR2

Le complexe TOR2 (TORC2) est un complexe qui n'est pas sensible à la rapamycine puisque la protéine FKBP12, qui forme un complexe avec la rapamycine, lie seulement TOR1 mais non TOR2. TORC2 se compose de TOR2, Avo2, Avo3, Bit61, et Lst8 [145, 147]. Avo1 et Avo3 interagissent avec la région N-terminale de TOR2. Cette interaction est nécessaire pour son intégrité [154]. TORC2 phosphoryle Avo1 et Avo3 mais le but de cette phosphorylation n'est pas encore connu. Lst8 interagit avec le domaine kinase de TOR2. Cette interaction est nécessaire pour l'activité kinase de TOR2 [154]. La plupart des chercheurs suggèrent que TORC2 se localise près de la membrane plasmique [155] TORC2 n'est pas comme TORC1 et ses régulateurs ne sont pas encore identifiés [156]. Il

n'y a aussi aucune évidence que TORC2 joue un rôle dans la régulation des nutriments ou dans la régulation du cycle cellulaire (Fig. 4).

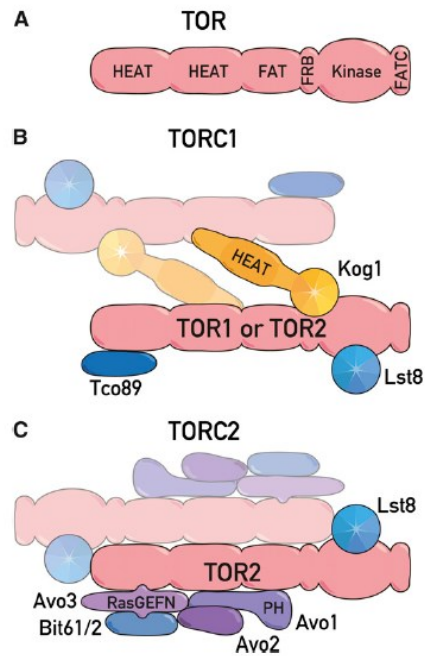


Figure 4 : Structure de la protéine TOR et de son complexe.

A, Structure des domaines conservés de TOR, B Composition du complexe TORC1, C Composition du complexe TORC2. Tiré de [118].

1.3 La voie de signalisation de TOR

1.3.1 Contrôle de la biosynthèse des protéines et du cycle cellulaire

Barbet *et al.* ont démontré que la suppression des deux gènes de TOR (TOR1 et TOR2) ou le traitement avec la rapamycine inhibe la synthèse protéique d'une manière aussi importante que la cycloheximide, un inhibiteur de l'élongation de la traduction. Ce qui est important est que la rapamycine bloque l'initiation de la traduction par l'induction d'une diminution rapide des ribosomes polysomiaux ce qui cause la libération de plus des monosomes [142].

La rapamycine induit aussi l'arrêt de cycle cellulaire par la diminution de la traduction de la Cycline G1 (CLN3) qui est la protéine responsable de la transition du cycle cellulaire de G1 à S. [142].

Berset *et al.* ont démontré pour leur part que le traitement des cellules avec la rapamycine cause une diminution rapide du taux d'eIF4G1 et eIF4G2, les deux isoformes du facteur d'initiation de la traduction eIF4G. Par contre, d'autres facteurs d'initiation de la traduction, par exemple eIF4E et eIF4A, restent inchangés [157].

Ils ont aussi démontré que la rapamycine contrôle la stabilité de la protéine eIF4G plutôt que sa synthèse. eIF4G est une sous unité importante du complexe eIF4F qui est responsable de l'initiation de la traduction des coiffes d'ARNm [158]. Ainsi, sa stabilité est importante pour assurer le bon fonctionnement de la protéine eIF4F. De plus, EAP1 est une protéine capable d'inhiber la traduction dépendante de la coiffe par la compétition avec eIF4G pour la fixation à eIF4G. La suppression du gène EAP1 conduit les cellules à la

résistance à la rapamycine ce qui confirme l'implication de la voie de TOR dans le contrôle de eIF4F [159].

1.3.2 Contrôle de la biogénèse des ribosomes

La voie de TOR régule la synthèse protéique via la biosynthèse des ribosomes prouvée par l'inhibition importante de la transcription de certains ARN en traitant des cellules pendant 24 heures avec la rapamycine. Ce traitement inhibe l'ARN polymérase III, ce qui résulte en une inhibition de la transcription de l'ARNr 5S et de l'ARNtleu. Ce traitement inhibe également l'ARN polymérase I, ce qui résulte en une inhibition de la transcription de l'ARNr 35S [160]. Un autre groupe a démontré que l'ARNm codant pour les protéines ribosomales est rapidement dégradé en réponse à la rapamycine [161]. Ces résultats ont également été soutenus par des analyses du génome des levures qui avait pour but d'observer la modulation de l'expression des gènes en réponse à la rapamycine puisque ces analyses ont révélé une sous expression de beaucoup de gènes codant pour les protéines ribosomales [162, 163].

1.4 Projet de recherche

1.4.1 Mise en contexte

La rapamycine est un métabolite naturel et un macrolide lipophile produit par une bactérie du sol dénommée *Streptomyces hygroscopicus*. Plusieurs années après l'identification de son activité anti-fongique, des chercheurs ont découvert d'autres propriétés importantes de cette drogue comme immunosuppresseur, utilisé comme traitement contre les rejets suite à une allogreffe, et comme inhibiteur de prolifération de cellules T et de cellules tumorales,

utilisé par exemple contre le cancer rénal [121, 164, 165]. Ces propriétés sont la conséquence de l'inhibition d'une protéine kinase sérine/thréonine appelée TOR qui est responsable du contrôle de la croissance cellulaire [139]. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les gènes TOR1 et TOR2 codent pour les protéines Tor1 et Tor2 respectivement [140]. Tel que mentionné précédemment, ces protéines forment chacune un complexe nommée TORC1 et TORC2 qui ont des rôles différents dans la cellules. [136, 145-147]. La rapamycine, pour sa part, forme un complexe avec FKBP12, une isomérase peptidyl prolyl, qui se lie ensuite au domaine FRB de TOR afin de l'inhiber. Cette inhibition affecte de multiples processus dont la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, l'entrée des nutriments et le cycle cellulaire [142],[166]. Son inhibition par la rapamycine cause son arrêt en phase G1 via l'inhibition de la synthèse des protéines [140, 141].

Ainsi, le mécanisme qui dépend de la voie de signalisation de TOR par lequel la rapamycine cause l'arrêt en phase G1 est bien connu. Or, aucun autre mécanisme de la rapamycine qui cause l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 n'a été identifié jusqu'à présent.

1.4.2 Hypothèse

En présence de la rapamycine, l'expression génique est altérée rapidement et globalement puisque plusieurs gènes sont sous-exprimés et d'autres gènes sont surexprimés [167]. Nous avons déjà démontré que Rrd1, une isomérase peptidyle prolyl, est requise pour l'induction de la réponse cellulaire à la rapamycine. Des cellules de levures dépourvues de Rrd1 montre un schéma d'expression génique altérée et affiche une résistance marquée à la rapamycine [167]. Nous avons de plus démontré que Rrd1 est fortement fixé à la chromatine et interagit avec l'ARN polymérase II [168]. Par conséquent, nous proposons

comme hypothèse que la rapamycine cause des modifications aux histones qui altèrent l'expression génique.

1.4.3 Objectif

Notre principal objectif est d'identifier à l'aide d'une collection de mutants d'histones, la variante qui échoue à répondre à la rapamycine dans le but de définir les modifications d'histone critiques à la réponse à cette drogue. Dans ce but, une librairie de mutants d'histone est criblée afin de déterminer quelle mutation est plus sensible ou résistante à la rapamycine. L'autre but est de caractériser la fonction des résidus d'histone.

Ainsi, nous avons réalisé un criblage à grande échelle de la collection de mutants d'histone ce qui a permis d'identifier plusieurs clones positifs qui démontrent, en particulier, une résistance extrême à la rapamycine. Nous avons ensuite caractérisé plus en détail une de ces variantes d'histone sur H2B, qui porte une substitution d'alanine en arginine en position 95 (H2B R95A). H2B R95A présente une résistance à la rapamycine mais non aux autres drogues testées. De plus, tandis que des expériences d'immuno-précipitation démontrent qu'un nombre de protéines sont associées à H2B, une protéine d'approximativement 120kDa en poids est absente chez H2B R95A. Les données de spectrométrie de masse ont identifié cette protéine de 120kDa comme étant Spt16, un facteur essentiel à la dissociation de H2A et H2B de la chromatine afin de permettre la réplication et la transcription de l'ADN par les ARN polymérase, respectivement [169-171]. Nos données de micropuces et de CHIP-Chip démontrent que Arg95 de H2B est requise pour l'occupation de Spt16 et afin de permettre l'expression de gènes clés de la voie de signalisation des phéromones tels que STE5, STE2, FUS3 et FAR1. Ces gènes forment une cascade fonctionnelle via l'activation de STE5 par STE2 qui recrute ensuite la

MAPK kinase Fus3 [172-174]. Cette kinase phosphoryle Far1 et inhibe la fonction des cyclines de G1, Cln1, Cln2 et Cln3, qui sont des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Conformément aux données de FACS, la souche de levure H2B-R95A continue de croître en présence de rapamycine et le cycle de G1 à G2 continue sans problème. Toutefois, la souche sauvage arrête de croître en phase G1 en présence de la rapamycine ce qui explique que le mutant R95 est résistant à cette drogue. De plus, lorsque Ste5-GFP est exprimé dans une souche mutante nulle pour *ste5*, résistante à la rapamycine, la sensibilité à la rapamycine est restaurée. Ces résultats suggèrent donc que la rapamycine peut exploiter la voie de signalisation des phéromones afin d'arrêter les cellules en phase G1. Pour tester cette hypothèse, nous avons traité des cellules avec diverses concentrations de rapamycine et nous avons utilisé un anticorps anti-ERK2, ERK2 étant un homologue de la kinase MAPK Fus3 chez la levure. Fus3 est connue comme étant phosphorylée durant l'accouplement ou en réponse au facteur α [172, 175]. Ceci a permis de démontrer que la kinase MAPK Fus3 est effectivement activée en réponse à la rapamycine comme c'est le cas en présence du facteur α . Par la présente, nous avons aussi mis en évidence que la kinase Tor1 est requise pour l'expression de composantes de la voie de signalisation des phéromones, insinuant que la Tor1 active vraisemblablement un facteur de transcription qui active ces gènes.

CHAPITRE 2

Article 1

Histone H2B-R95A Mutant Identifies the Pheromone Pathway That Signals Cell Cycle Arrest During Rapamycin Response

Sami Ayachi, Célia Jeronima, Hugo Wurtele, François Robert and Dindial Ramotar

Article en préparation

2. ARTICLE 1

2.1 AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All experiments have been performed by Sami Ayachi under the supervision of Dr. Dindial Ramotar except for the ChIP-Chip which was performed by Dr. Celia Jeronimo in Dr. François Robert's laboratory at the *Institut de recherche clinique de Montréal* and the microarray's data analysis performed by Khalil Miloudi in Dr. Mike Sapieha's laboratory, Amine Saadi and Krigger Bijian in Dr. Moulay Alaoui-Jamali laboratory at McGill University.

The manuscript was written by Sami Ayachi and Dr. Dindial Ramotar.

2.2 ABSTRACT

Rapamycin is an immunosuppressant used for treating many types of diseases such as kidney cancer. It works by inhibiting the Tor signaling pathway leading to changes in physiological processes, including cell cycle arrest. In *Saccharomyces cerevisiae*, rapamycin leads to a rapid and global alteration in gene expression, involving chromatin remodeling and histone modification(s). We characterized one of the histone variants (H2B-R95A) and showed that it is extremely resistant to rapamycin. Pull downs demonstrated that H2B-R95A was defective in forming a complex with Spt16, an essential factor that is required for replication. ChIP-Chip and microarray experiments showed that Arg95 of H2B is required to recruit Spt16 to allow expression of several genes, a subset of which are involved in the pheromone signaling pathway. Our data show for the first time that rapamycin can activate the pheromone pathway and that defects in this pathway cause resistance to the drug.

2.3 BACKGROUND

Rapamycin is a natural metabolite and a lipophilic macrolide produced by a soil bacterium called *Streptomyces hygroscopicus*. Many years after identification of its anti-fungal activity, researchers discovered an important propriety of this drug as an immunosuppressant used for allograft rejection treatment of, kidney cancer and as an inhibitor of T-cell and tumor cell proliferation [121, 164, 165]. This property is the consequence of the inhibition of a Ser/Thr kinase protein named Target of rapamycin (TOR) which is responsible for controlling cell growth [139]. In Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, TOR1 and TOR2 genes code for Tor 1 and Tor2 proteins respectively [140]. Each one form a complex called TORC1 and TORC2 which have different functions in the cells [136, 145-147]. Rapamycin forms a complex with a FKBP12, a peptidyl prolyl isomerase, which then binds to TOR's FRB domain and inhibits it. This inhibition affects multiple processes such as cell proliferation, cell growth, control nutrients and cell cycle [142]. Cell cycle progression is important for cell growth and proliferation [166]. Its inhibition by rapamycin causes cells to arrest in G1 phase through protein synthesis inhibition [140, 141] This is caused by blocking translation initiation due to: (i) degradation of eIF4G1 and eIF4G2, two eIF4G isoforms [142, 157], (ii) inhibition of transcription of rRNA 5S and tRNA^{Leu}, which depends on RNA polymerase III, and transcription inhibition of rRNA^{35S}, which depends on RNA polymerase I [160], (iii) decrease of the level of the mRNA coding for the ribosomal proteins [161], (iv) decrease of cyclic protein CLN3, which controls transition from G1 to S phase [142]. Thus, it is well known that the mechanism by which rapamycin causes cells to arrest in G1 depends on the TOR pathway and, until now, no other rapamycin mechanism has been identified to also cause cell cycle arrest in G1. Exposure to rapamycin leads to a rapid and global alteration

in gene expression, where many genes are either downregulated and others are upregulated [167]. We have previously shown that the peptidyl prolyl isomerase Rrd1, is required to mediate cellular response to rapamycin. Yeast cells devoid of Rrd1 show altered gene expression pattern and display striking resistance to rapamycin [167]. We further show that Rrd1 is tightly bound to the chromatin and that it interacts with RNA polymerase II [168]. We propose that rapamycin induces histone modification(s) which signals to the chromatin bound Rrd1 to alter gene expression. Our main objective is to identify from a histone mutant collection variants that fail to respond to rapamycin in an attempt to define the histone modifications critical for this drug response. We will present data from a large scale screen of the histone mutant collection, which identified several hits that showed in particular extreme resistance to rapamycin. We have further characterized one of the histone variants, namely H2B carrying alanine substitution at arginine 95. H2BArg95Ala showed resistance to rapamycin, but not to other drugs. Moreover, while a number of proteins are found associated with H2B in immunoprecipitation experiment, a protein of approximately 120kDa in size was absent with H2BArg95Ala. The data of mass spectrometry identified the 120kDa protein as Spt16, an essential factor that is required to disassociate H2A and H2B from the chromatin in order to allow replication and transcription by DNA and RNA polymerases, respectively [169-171]. Our microarray and ChIP-Chip data show that H2B's Arg95 is required for the occupancy of Spt16 and allow expression of key genes of the pheromone pathway such as STE5 STE2 FUS3 and FAR1. These genes form a functional cascade through the activation of STE5 by STE2 which then recruits the MAPK Kinase FUS3 [172-174]. This kinase phosphorylates Far1 and inhibits the function of the G1 cyclin CLN1 CLN2 and CLN3 proteins involved in cell cycle progression. According to FACS data, the H2B-R95A yeast strain continues to grow in response to rapamycin and cycle from G1 to G2 without any issues. However the wild-type

strain stops to grow in G1 phase in response to rapamycin which may explain the mutant R95A resistance to rapamycin. Also, when we express Ste5-GFP in the rapamycin resistant ste5 null mutant, this strain reacquires rapamycin sensitivity. These results thus suggest that rapamycin may take a pathway other than the common TOR pathway to stop cells in G1 phase. To test this hypothesis we treated cells with different concentrations of rapamycin and used an anti-ERK2 antibody, ERK2 being a homologue of the MAPK Kinase Fus3 in yeast. ERK2 is known to be phosphorylated during mating or in response to α -factor [172, 175]. This allowed us to show that the MAPK Kinase Fus3 is also phosphorylated in response to rapamycin as it is in response to α -factor.

2.4 METHODS

2.4.1 Yeast strains and growth media

The yeast strains used in this work are from SHIMA library, which was created in the laboratory of Dr. Ali Shilatifard (Kansas, USA) [176]. Cells were grown either in YPD medium containing 1% Yeast Extract (MULTICELL), peptone (BIO BASIC INC), and 2% dextrose (BIO BASIC INC), or selective media containing Yeast Nitrogen Base 10 x (DIFCO), 2% dextrose (BIO BASIC INC), supplemented with the amino acids necessary for cells growth depending on the genotype. Solid media was obtained by the addition of 1.5% Agar (MULTICELL).

2.4.2 Spot test

Yeast strains were inoculated in 1 ml of YPD liquid media and were grown overnight at 30°C with agitation. The next day, cells were subcultured in 2 ml at 30 °C on the rotary shaker. After 3-4 hours of subculture, cells reached exponential phase (OD: 0.6). Serial dilutions were performed, and from each one 4 µl were spotted on agar plates containing or not different concentration of the rapamycin. Plates were incubated for two days at 30 °C before being photographed by the ALPHA imager.

2.4.3 FLAG-H2B purification by anti-FLAG affinity gel

Log-phase yeast cells were grown in YPD medium. Cells were resuspended in 4 volumes native cracking buffer (1× PBS, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% Nonidet-P40, 10% glycerol, 50 mM sodium fluoride, 10 mM β-glycerophosphate, 5 mM

sodium pyrophosphate, 5 mM sodium orthovanadate, 1× protease inhibitor cocktail, 2 mM PMSF) and lysed by mechanical shearing using acid-washed glass beads. After separation from glass beads and centrifugation at 16,000× g for 10 min 4 °C, the supernatant was incubated with anti-FLAG M2 affinity gel (SIGMA) for 3 h 4°C, and then washed by native cracking buffer and 1× TBS, three times each. Immunoprecipitates were eluted by elution buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS) for 20 min at 42 °C [177].

2.4.4 Western Blot Analysis

Western blot analysis was performed according to standard protocols. Protein samples were mixed with loading buffer with the following composition (2.5 ml 10% SDS, 3.13 mL Stacking buffer, 2.5 ml glycerol 1.25 ml 2-mercaptoethanol, 10 mg bromophenol blue and water to a final volume of 10 ml) proteins were denature by heating the samples for 10 min at 100 °C. Proteins were loaded onto a 10% SDS polyacrylamide gel, which was run at 100 V. The proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane at 100 V for 1 hour. The membrane was blocked with 5% of skim milk in TBSET (6.05 g Tris-Base, 43.83 g NaCl, 1.85 g of EDTA and 500 µl tween 20 in 500 ml of distilled water and then probed overnight at 4 °C with the indicated mouse monoclonal antibody (FLAG, GFP, ERK1/2) at a concentration of 1/2500 in 5% milk. Three successive washes (10 min each) with TBSET were then performed to wash all excess of the primary antibody. After the last wash, the membrane was incubated for 1 hour with the anti-mouse polyclonal antibody and was followed by 3 washes of 10 min each with TBSET. Finally the membrane was incubated for 1 min in chemiluminescence reagent and developed using a FujiFilm

Intelligent Dark Box and images were acquired with a LAS-3000 camera and the Image Reader LAS-3000 Lite software.

2.4.5 Silver staining

We used the SilverQuest Staining kit of Invitrogen Company. The catalogue number is Cat. no. LC 6070 which clearly outline the steps according to the manufacturer.

2.4.6 Mass spectrometry

Protein bands were excised from the silver stained gels and sent for mass spectrometry determination at Harvard (Boston, USA).

2.4.7 Tagging Spt16 with GFP

The GFP gene and the selection marker was amplified from the plasmid pFA6a-GFP (S65T)-KanMX6 [178], and the fragment with flanking 45 nt homology at the end of the SPT16 gene was transformed into the parent H2B and the mutant H2B-R95A strain. The endogenously tagged SPT16 gene with GFP was confirmed by PCR, and subsequent Western blot analysis to monitor the expression of the Spt16-GFP fusion protein.

2.4.8 Cell Cycle Analysis

For the cell cycle progression, we inoculated cells overnight, the day after we subcultured for 3 to 4 hours followed by the treatment. Samples were taken as indicated in the results and fixed for cell cycle analysis. The fixation step was done by diluting the cells 1/10 in

EtOH70%. Immediately vortex 5 sec and leave 30 minutes at RT. Spin down the fixed cells. Add 500 uL of the buffer 50 mM Tris-HCl pH7.5 + 20 uL RNase solution per tube, incubate O/N at 37°C. Spin cells 1 min at 13 000 rpm, resuspend the pellet in 200 uL of 50 mM Tris-HCl pH 7.5 + 20 uL proteinase K (10 mg/ml) and incubate at 50°C for 30 min. Spin the cells and resuspend again the pellet in 200 uL 50 mM Tris-HCl pH 7.5 followed by brief sonication. Prepare 3 mL Tris-HCl pH 7.5 50mM + 3uL Cytoxgreen + 500 ul of cells uses for the machine FACS for the analysis.

2.4.9 Yeast RNA Extraction: Hot phenol extraction to prepare RNA for Microarray using Affymetric arrays

First day we grow 50 mL of yeast to OD 600 = 0.7, spin down in 50 mL falcon tube and resuspended in 6 mL of ice cold H₂O. Transfer to 15 mL falcon tube, spin again and immersed into liquid nitrogen to snap freeze the cell pellet in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Second day the cell pellet was thawed on ice. Phenol and the TES was pre-warmed at 65°C and 3 mL of the hot acid Phenol:Chloroform (5:1) and 3ml TES was added per 200 OD600 units of the thawed cells. Cells were vortexed, incubated in 65 °C water bath for 1 hour and vortexed every 10 minutes then spin for 20 min. Extract once with acid Phenol:Chloroform (5:1). Extract once with chloroform:Isoamyl alcohol (25:1). Add 30 uL of NaOAc pH 5.2 and 1ml cold EtOH, incubate 30 min at -20°C. Spin 5 minutes at RT. Wash with 500 uL 80% EtOH. Spin 1 min. Dry pellet and resuspend in DEPC-H₂O.

Expect 20-30 ug of RNA per OD600 unit. Make a 1/1000 dilution and measure OD260/280. Adjust concentration to 10 ug/uL. Freeze on dry ice and store at -80°C.

2.5 RESULTS

2.5.1 Identification of histone variants with altered cellular response to rapamycin

A collection of 442 histone variants was created by replacing each amino acid residue of H2A, H2B, H3 and H4 with alanine and introduced on a single copy plasmid into a modified parent strain deleted for both copies of the respective endogenous histone genes [176]. We screened the entire histone mutant collection for those that were either sensitive or resistant to increasing concentrations (from 50 to 200 ng/ml) of rapamycin, incorporated into solid YPD media, using spot test analysis. This screen identified only four variants that showed varying sensitivity to rapamycin, and amongst these the H2A-E65A variant displayed significant sensitivity to rapamycin when compared to the parent (Table 1 and Fig. 5A, showing the selected variants). However, the H2A-E65A variant also showed sensitivity to several other agents such as the DNA damaging agent methyl methane sulfonate (MMS), suggesting that E65A response is not specific towards rapamycin. In addition, the screen identified 21 variants with variable resistance to rapamycin when compared to the respective parent strains (Table 1 and Fig. 5A, showing the selected variants). These mutants were independently tested in liquid cultures and found to display the same phenotypes as on the solid agar (Fig. 5B, shown only the relevant strains---Parent H2B and R95A do growth curve). We tested these 21 rapamycin resistant variants for sensitivity or resistance towards other drugs including the DNA damaging agents MMS and 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO), as well as the environmental toxic metal sodium arsenite (As). Of these 21 variants, 12 showed either sensitivity or resistance to the other agents (Table 1), suggesting that these histone residues could play multiple roles. In fact, an earlier study reported the identification of histone H3-K56A as a variant that was

sensitive to rapamycin using the H3/H4 collection made from a different background, although no other mutants were reported in that study [179]. In contrast, we found that H3-K65A was resistant to rapamycin when compared to its isogenic background (Fig. 5A), as well as sensitive to DNA damaging agents as previously reported (Table 1) [180].

Fig. 5C illustrated the locations of the amino acid residues for the remaining 9 variants that were specifically resistant to rapamycin, but showing parental responses to other agents. Most of these variants were found within histone H4 and located primarily in the N-terminal part of the protein with H4-L22A being more resistant than H4-H18A and H4-R19A (Fig. 5A). The N-terminal tail of H4 makes contact with the H2A/H2B dimer and it plays a major role in gene expression [181]. In the case of histone H3, the two variants were located in the C-terminal half of the protein (Fig. 5C). Only one variant, R95A, was recovered from histone H2B and which exhibited striking resistance to rapamycin amongst all the variants (Fig. 5A). Collectively, the data suggest that there is a narrow set of variants that specifically caused resistance to rapamycin. Since the histone H2B-R95A variant was the most resistant to rapamycin and did not display sensitivity or resistance to other agents, we focused on unraveling its role in response to rapamycin.

Table 1: Histone variants showing sensitivity or resistance to rapamycin and other agents

	RAPAMYCIN		MMS		4NQO		Arsenite	
	Sensitive	Resistant	Sens.	Res.	Sens.	Res.	Sens.	Res.
H2A		L35A				L35A		
		R36A	R36A					
	E65A		E65A		E65A			
		N115A						
		L117A						
		S121A						
H2B		R36A	R36A					R36A
	K49A							
		V47A						
		R95A						
H3	F67A							
		G12A						
		V46A						
		K56A	K56A		K56A			
		S87A			S87A			
		E94A						
H4	Y51A						Y51A	
		H18A						H18A
		R19A						
		I21A						
		L22A						
		R35A	R35A					R35A
		R36A						
		R95A						
		G101A						

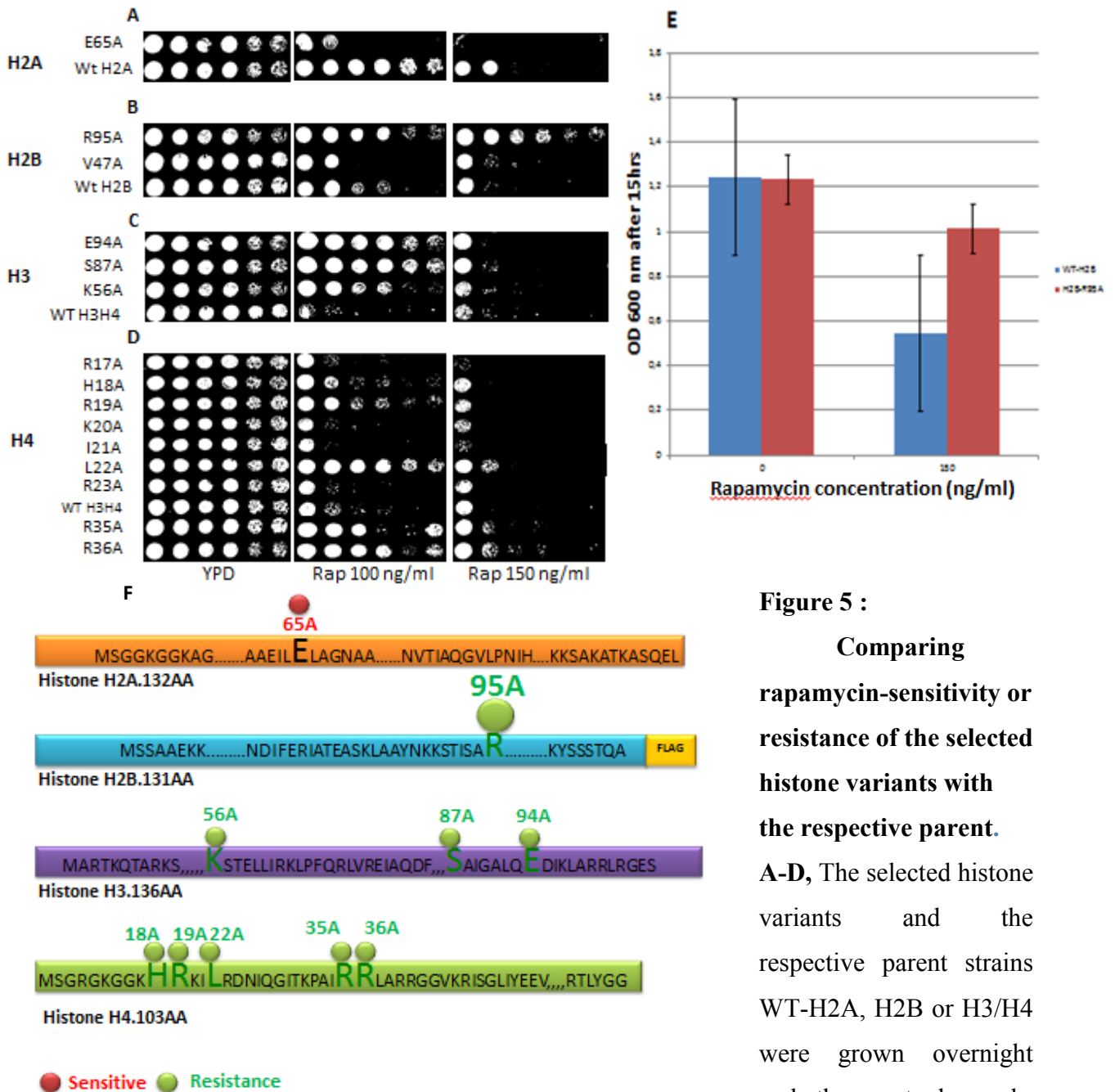


Figure 5 :

Comparing rapamycin-sensitivity or resistance of the selected histone variants with the respective parent.

A-D, The selected histone variants and the respective parent strains WT-H2A, H2B or H3/H4 were grown overnight and the next day sub-

cultured for 4 h then diluted and spotted on YPD solid media without and with different concentrations of rapamycin (0 to 150 ng/ml). Plates were photographed after 48 h of incubation at 30 °C. The data shown are representative of two independent experiments, **E,** Growth of the parent H2B and its derivative H2B-R95A in the absence and presence of rapamycin. The overnight cultures were inoculated at low optical density (OD) in 96 wells plates in a final volume of 200 µl. The OD of the cells was read by a plate reader every 30 min. Results shown are the averages of three independent experiments and the error bars indicate the standard deviation, and **F,** Location of the histone variants causing either sensitivity or resistance to rapamycin. Only histone H2B from the library was tagged with the FLAG epiptope.

2.5.2 Histone variants with telomeric silencing defects as the H2B-R95A were not resistant to rapamycin.

H2B-R95A was previously isolated in a screen for the loss of transcription repression of reporter genes embedded within the silent chromatin regions of the telomere [182] Dai et al showed that the H2B-R95A variant loss telomeric silencing in a region that spans at least 20-kb from the end of the telomere [182]. In addition, the authors described other variants such as H2B-K123, which is ubiquitylated and required for the di- and trimethylation of H3-K4 and H3-K79 and mutations in H2B-K123 caused loss in silencing at rDNA and telomeres [182] We did not recover H2B-K123A, H3-K4A or H3-K79A as variants that were resistant to rapamycin [183]. Thus, the loss of telomeric silencing is not associated with the rapamycin resistant phenotype of H2B-R95A. In addition, the reported H2B-R95A variant also displayed parental sensitivity to MMS, hydroxyurea, 6-azacytidine and camptothecin [182] consistent with our findings that H2B-R95A might indeed respond specifically to rapamycin.

2.5.3 Histone H2B-R95A is defective in recruiting the FACT complex protein Spt16

To explore how H2B-R95A would be involved in the resistance to rapamycin, we examined if there are differences in associated proteins between the parental H2B vs. the H2B-R95A variant, as well as two nearby H2B variants, S93A and R102A, to serve as controls. In the histone mutant collection, H2B carries a FLAG epitope tag and thus simplify the pull down of H2B-R95A with sepharose beads coupled with FLAG monoclonal antibody. Briefly, total protein extracts prepared from exponential growing

cells were incubated with the FLAG beads and after washing the beads, the H2B-FLAG and associated proteins were eluted from the beads (see Materials and Methods) and analyzed by SDS gel stained with silver (Fig. 6). This analysis revealed that one distinct high molecular weight polypeptide band was sharply reduced in the pull down with H2B-R95A, as compared to the parent H2B (Fig. 6). This polypeptide was efficiently pull down by either of the two control variants, H2B-S93A and H2B-R102A (Fig. 6). The corresponding polypeptide band was isolated from the parent and subjected to mass spectrometry, which revealed seven polypeptides that were derived from Spt16. Spt16 belongs to the FACT complex, a conserved histone-binding heterodimer consisting of Spt16 and Pob3, which plays multiple roles including chaperone function that is involved in the disassembly and reassembly of histone H2A-H2B dimer during transcription and replication [184].

In separate experiments, we tagged the *SPT16* gene at the endogenous locus with GFP in both the parent H2B and the H2B-R95A variant strain and examined whether FLAG beads can pull down the Spt16-GFP fusion protein from total cell extracts. As shown in Fig. 7, the H2B-R95A variant was less efficient in pulling down Spt16-GFP, as compared to the parent H2B. No band was pulled down by the H2B-S93A variant as this strain did not carry Spt16 tagged with GFP (Fig. 7). We used a parent strain without FLAG tag H2B as a mock control (Fig. 7). Consistent with these findings several studies demonstrated a physical interaction between H2B and Spt16 [171]. We proposed that Arg95 of H2B is required for the efficient interaction with Spt16, and interruption of this association leads to rapamycin resistance.

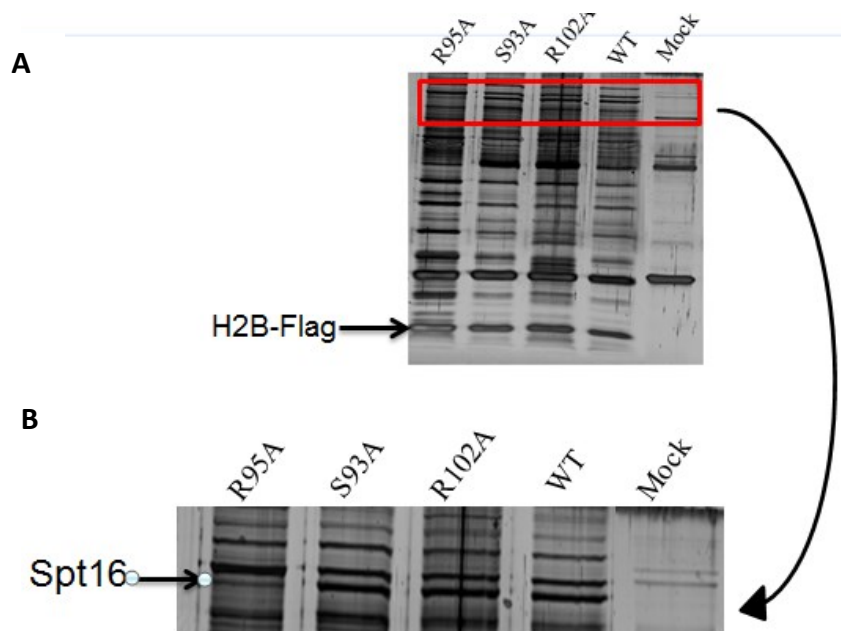


Figure 6 : SDS-PAGE analysis of immunoprecipitated H2B-FLAG and associated proteins from the indicated strains.

The strains expressing Flag-H2B were used for immunopurification of H2B and its associated proteins using anti-FLAG M2 affinity gel (SIGMA). The immunoprecipitates were eluted and the proteins were analyzed by SDS-PAGE and detected by silver staining. The mock purification was done from a strain that has no FLAG tag. **A**, The polypeptide band with reduced staining from the H2B-R95A variant strain was cut from the parent strain or the mutants and identified by mass spectrometry. **B**, The demarcated area is expanded to illuminate the 120 kDa protein with reduced staining intensity.

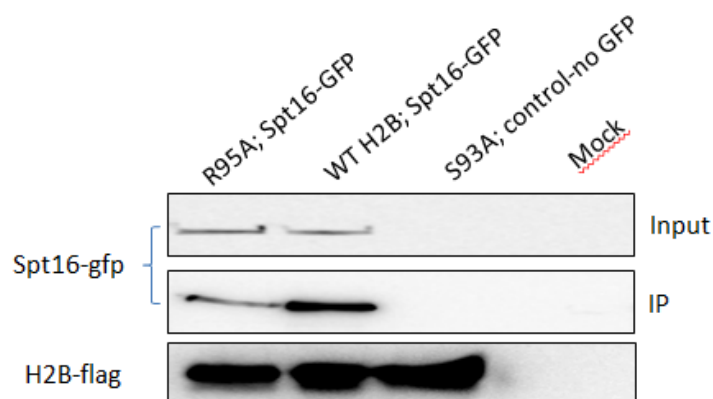


Figure 7 : The H2B-R95A variant immunoprecipitates significantly less Spt16.

The H2B-R95A variant and the parent H2B were tagged at the *SPT16* endogenous locus with GFP, but not the H2B-S93A variant to be served as a control. Total proteins from these strains expressing Flag-H2B were immunoprecipitated using anti-FLAG M2 affinity gel (SIGMA) and the proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blot probed first with anti-GFP to detect Spt16 level, and then with anti-FLAG to detect H2B level. The mock purification was done from a strain lacking FLAG tag.

2.5.4 The histone H2B-A84D variant that suppresses *spt16-11* phenotypes is resistant to rapamycin

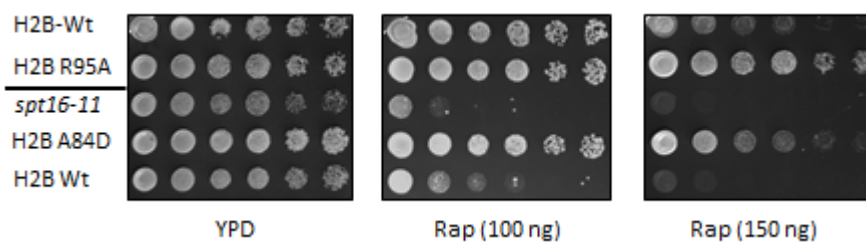
A previous report used a *Ts⁻* allele, *spt16-11*, of *SPT16*, that displayed several phenotypes such as sensitivity to hydroxyurea, which is associated with transcription and replication defects, and hunt for histone gene mutations that can rescue these defects [185]. Several histone mutations were recovered including H2B-A84D that suppressed strongly the *spt16-11* phenotypes and believed to act by weakening the histone dimer:tetramer interface which normally is disrupted by Spt16. Moreover, in vitro analysis revealed that the H2B-A84D variant caused nucleosome instability by enhancing dimer displacement [185]. Consequently, H2B-A84D is unable to maintain mature nucleosome and a repressive chromatin, and as such lead to alter gene expression pattern [186] [187]. We checked if the H2B-A84D mutant with native *SPT16* gene would display altered response to rapamycin. Interestingly, this H2B-A84D variant was resistant to rapamycin as compared to the isogenic parent (Fig. 8A). One possible interpretation of this observation is that the inability to reassemble the histone dimer and formation of nucleosomes may hinder the expression of genes required to mount a response to rapamycin.

2.5.5 The Spt16-E857K variant that is defective in interacting with H2B is resistant to rapamycin.

Stevens et al., (2011) reported the isolation of Spt16 variants that are defective in transcription-linked nucleosome reassembly while maintaining the essential functions of Spt16 [188]. One of the variants Spt16-E857K interacts weakly with histone H2B and this

mutation has been shown to locate in the middle domain of Spt16 (residues 647-950) that have been recently shown to recognize H2A-H2B [188]. As such, Spt16-E857K is unable to reestablish the repressive nucleosome following the elongating RNA pol II and thus interfere with transcription. We tested this mutant for response to rapamycin and observed that it was resistant to the drug as compared to the parent (Fig. 8B). Thus, it appears that a defect in nucleosomal reassembly either by the H2B-A84D variant or the Spt16-E857K inability to reload H2A-H2B dimer will lead to transcriptional defects causing various phenotypes including rapamycin resistance [182]. In accordance with the findings of Dai et al., 2010 that the H2B-R95A variant is defective in regulating a small number of genes under normal growth conditions, we therefore propose that this variant would have a transcriptional defect in response to rapamycin.

A



B

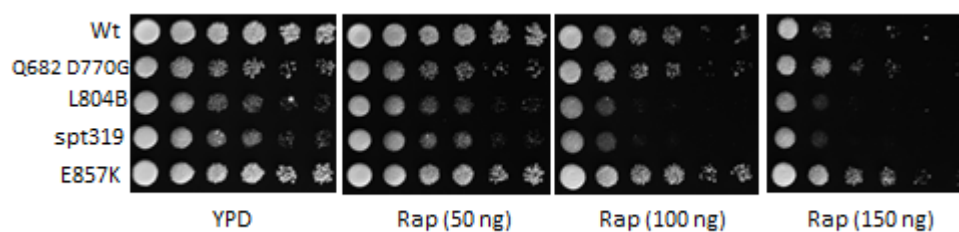


Figure 8 : Spot test analysis of the histone H2B and Spt16 variants.

Strains were grown overnight and sub-cultured the next day for 4 hours then diluted and spotted on YPD solid media without and with different concentrations of rapamycin (0 to 150 ng/ml). Plates were photographed after 48 h of incubation at 30 °C.

2.5.6 Microarray analysis reveals that H2B-R95A downregulates key genes in the pheromone pathway.

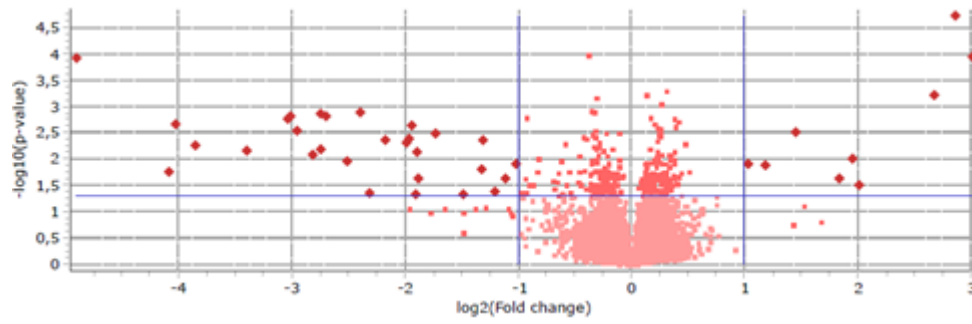
We next compared the expression pattern of genes between the parent and H2B-R95A variant under normal growth conditions and when the cells were treated with rapamycin using microarray analysis. Under normal conditions, at least 9 genes were upregulated by ≥ 1.5 -fold (P_{value} of ≤ 0.05) in the H2B-R95A mutant as compared to the parent (Fig. 9A, B). One of these genes included *IME4* encoding a N6-adenosine methyltransferase involved in methylating mRNA. In addition, at least 29 genes were down regulated in the H2B-R95A variant (Fig. 9B). Interestingly, 12 of these downregulated genes in the H2B-R95A variant belong to the pheromone pathway (Fig. 9C), suggesting that a predominant role of H2B Arg95 is to ensure proper regulation of the pheromone pathway consistent with the observation of Dai et al that this variant has a defect in mating [182].

We conducted a similar analysis with cells treated with rapamycin and found that there were 19 genes that were upregulated and 263 genes that were downregulated in the H2B-R95A variant upon rapamycin treatment (Fig. 9D to 9E). Following GO analysis, it would appear that upon rapamycin treatment the H2B-R95A mutant was unable to also regulate the expression of other genes such as rDNA genes.

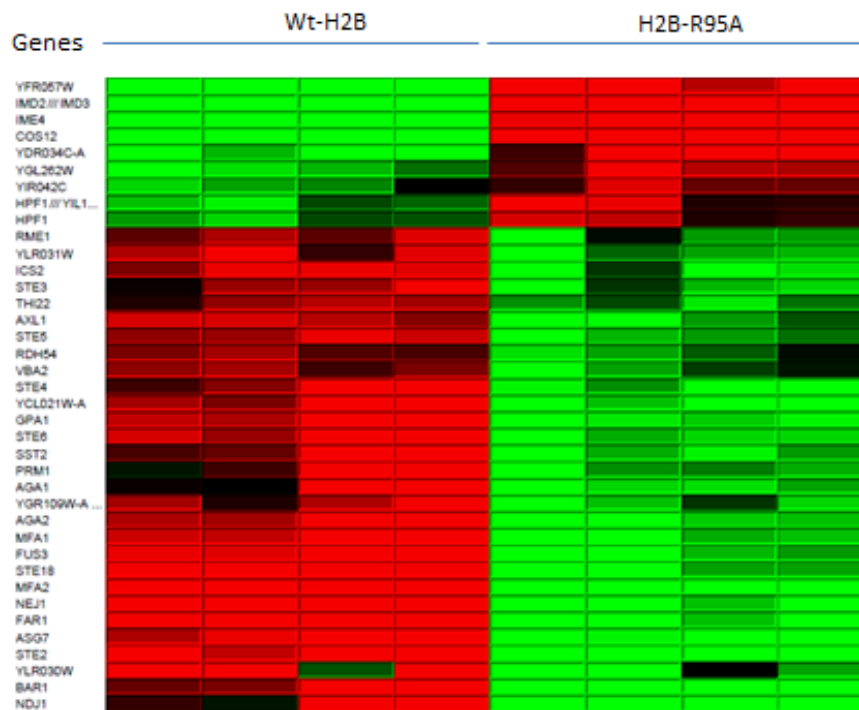
Following rapamycin treatment several known genes were upregulated in both the parent and the H2B-R95A mutant and these genes include DAL3 and DAL80 (Fig 9E) In addition, there were several distinct differences, e.g., while MEP2 was induced nearly 11-fold in the parent following rapamycin treatment, there was no induction detectable in the H2B-R95A variant although Western blot analysis revealed that Mep2 tagged with GFP was instead weakly induced in this variant as compared to the parent.

When we compared only the H2B-R95A following rapamycin treatment, we observed a substantial number of genes, nearly 263 were downregulated in this variant by ≥ 2 -fold. Many of the affected genes belong to the family of ribosomal protein genes that are known to be downregulated via the inhibition of the TORC1 kinase in response to rapamycin treatment. This data suggest that the H2B-R95A variant is unlikely to interrupt signaling along the TORC1 kinase pathway and that the rapamycin resistant phenotype of this variant is due to some other defect.

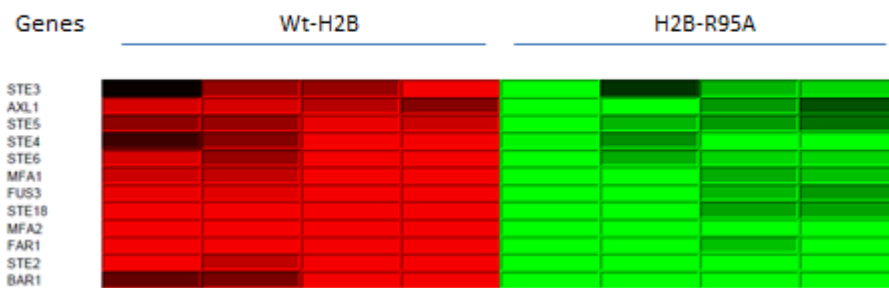
A



B



C



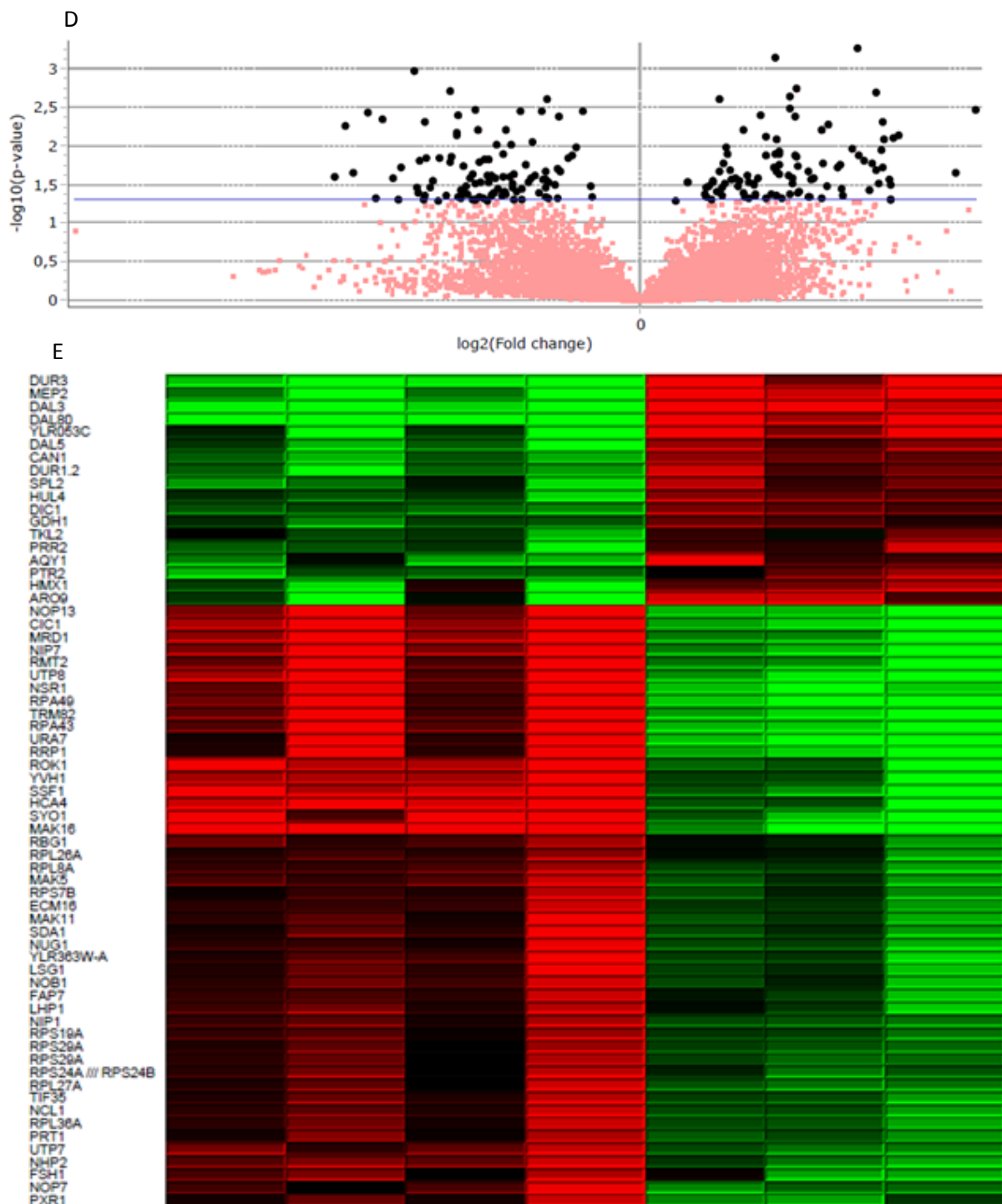


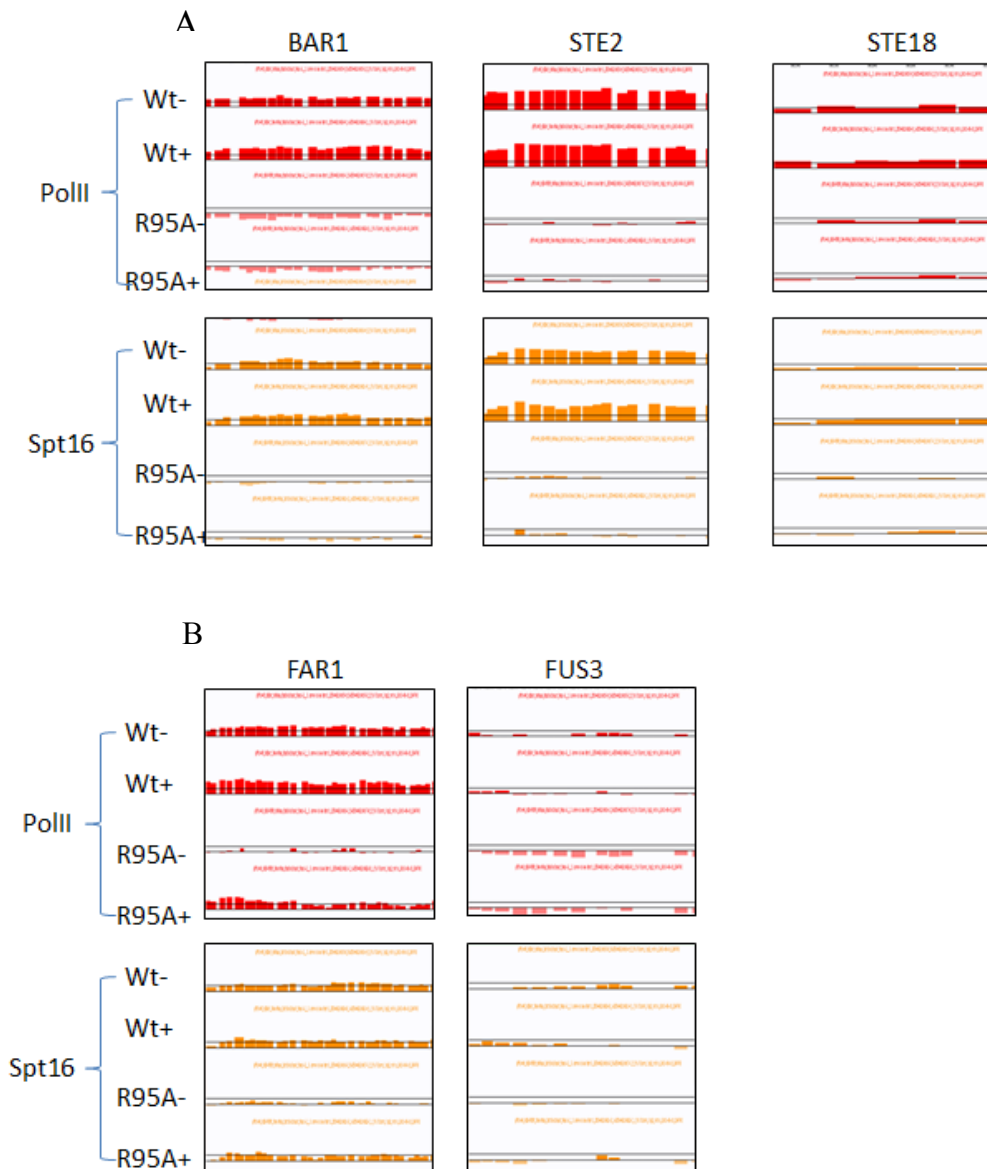
Figure 9 : The H2B-R95A variant causes downregulation of genes belonging to the pheromone pathway.

A, D, Volcano plot showing the genes found by microarray analysis that were either downregulated (left) and upregulated (right) in the mutant H2B-R95A compare to the Wt-H2B. The Fold change is 1.5, P value 0.05. B, E, Heatmap showing the modulation of the expression of the genes in the mutant H2B-R95A. Red represents upregulation and green downregulation of gene expression. C, A specific cluster of downregulated genes belong to the pheromone pathway.

2.5.7 Genome wide ChIP-Chip identifies the pheromone pathway to be dysregulated by the H2B-R95A variant.

To understand more how the pheromones genes are down-regulated in the mutant R95A and what is the relation with the Spt16, we performed a ChIP-Chip in the mutant R95A and in the Wt with and without rapamycin treatment using 2 antibodies anti-Spt16 and anti-PolIII. The results show us that the genes which belong to the pheromones pathway are down-regulated and the level of their transcription is decreasing in the R95A compare to the Wt. This results match with the microarray data and let us believe that the mutant R95A has a problem in mating because of the dysfunction in this pathway. Also the results show that those pheromone genes have a defect to recruit Spt16 and PolIII in the mutant compared to the Wt (Fig. 10) which may suggest that the mutant 95A probably plays a role in the expression of those genes by the recruitment of Spt16 and PolIII at this residue during the transcription.

We also observed in the results of ChIP-Chip experiments that some other genes which do not belong to the pheromone pathway, lose the recruitment of the Spt16 and PolIII when we treat with rapamycin. This could mean that those genes are down-regulated. Some other genes recruit more efficiently Spt16 and PolIII in the presence of rapamycin and their expression level increase. The modulation of the genes in presence of rapamycin confirms the effect of the rapamycine in altering gene expression.



Figures 10 : ChIP-Chip Shows that R95A is Defective in Recruiting Spt16 in order to express pheromone genes.

A-B, The recruitment of Spt16 and PolII in the R95A is low on the pheromone genes comparing to Wt protein and associated chromatin in a living yeast are temporarily fixed, the DNA-protein complexes are then cut into ~500 bp DNA fragments by sonication and DNA fragments associated with the protein(s) of interest are selectively immunoprecipitated from the cell debris using Spt16 and PolII antibody along with cross linked DNA fragments, and the associated DNA fragments are purified and their sequence is determined. (+) is for rapamycin treated and (-) for not treated yeasts.

2.5.8 H2B-R95A is defective in α -factor and rapamycin-induced G1 arrest

Since our ChIP-Chip data indicated that the H2B-R95A mutant was primarily defective in the pheromone signaling pathway, we checked whether this mutant would arrest in the G1 phase upon exposure to α -factor and whether a similar defect would be observed following rapamycin exposure. The exponentially growing cultures were treated with α -factor (4 μ g per ml for 3 h), washed, resuspended in fresh media without α -factor and then aliquots taken at the indicated time to monitor for the cell cycle stages. The asynchronous cell populations for both the parent and the H2B-R95A mutant existed in the G1 and G2 phases (Fig. 11A and B). As expected, following α -factor treatment the parent cells were completely arrested in the G1 phase and re-entered the cell cycle upon removal of the α -factor (Fig. 11A). In contrast, the H2B-R95A mutant failed to arrest in the G1 phase even after prolonged exposure to the α -factor and continued to progress normally in the cell cycle (Fig. 11B), raising the possibility that this variant is indeed defective in the pheromone response pathway.

Since rapamycin is known to arrest cells in the G1 phase, we examined whether the H2B-R95A mutant could be defective in this response. When exponential asynchronous parent cells were treated with rapamycin (200 ng/ml for 30 min), the cells rapidly arrested in the G1 phase (Fig. 11C). These cells remained in the G1 phase even after removing the drug and allowing the cells to recover in fresh media for an additional 2 h (Fig. 11C). In contrast, rapamycin treatment failed to arrest the asynchronous population of the H2B-R95A mutant cells in the G1 phase (Fig. 11D) and the cells were unimpeded by the drug and continued to progress along the cell cycle when compared to the parent. This observation is consistent with the mutant ability to grow in the presence of rapamycin, while the growth of the parent is suppressed (Fig. 5B). The failure of the H2B-R95A

mutant to maintain expression of genes in the pheromone pathway, as well as respond to both α -factor and rapamycin, strongly suggest that rapamycin may use components of the pheromone pathway to transmit signals to arrest the cell cycle in the G1 phase.

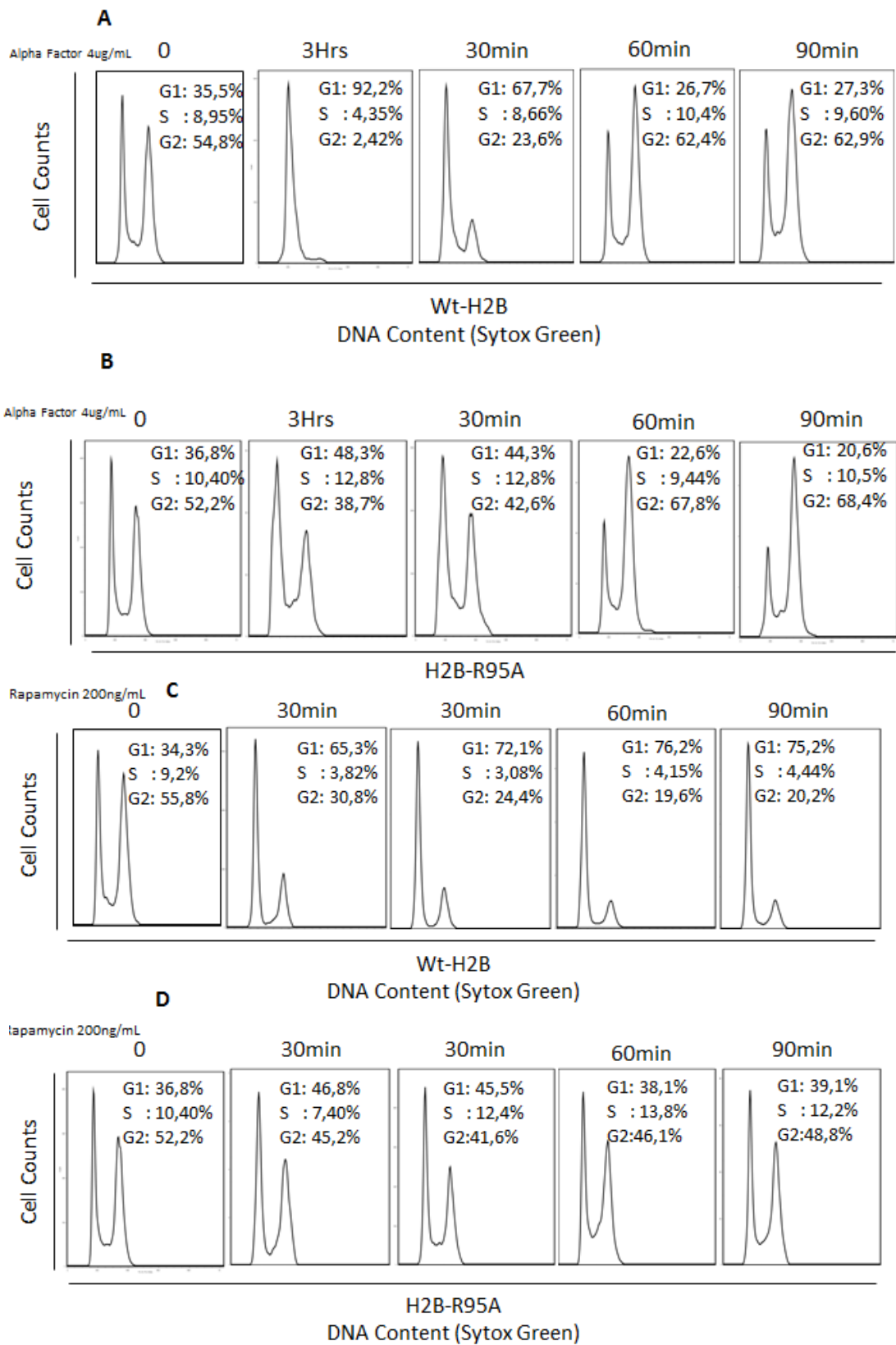


Figure 11 : Comparison of the Cell Cycle profile of the parent (Wt-H2B) and H2B-R95A variant upon treatment with α -factor or rapamycin.

A, B, α -factor induces cell cycle arrest in the Wt-H2B, but not in the H2B-R95A variant strain. Briefly, overnight cells were subcultured for 3 h and samples taken for asynchronous growth, then treated with α factor (4ug/ml for 3 h). Samples taken, then the cells were washed free of the α factor and incubated in fresh media followed by sample collection at the indicated time. The samples were fixed and the DNA was stained using Sytox Green. The cells were analyzed using a FACS and flow Cytomer and the image treated but Flowjo software. The results are representative of two independent analyses. **C, D**, rapamycin induces cell cycle arrest in the Wt-H2B, but not in the H2B-R95A variant strain. For C and D, cells subcultued as in A and B. Samples taken and then treated without and with rapamycin (200 ng/ml for 30 min). Cells were washed free of rapamycin, incubated in fresh media and samples taken at the indicated time. FACS analysis was processed as above.

2.5.9 The α -factor-stimulated MAP kinases, Kss1 and Fus3, are not activated in the H2B-R95A mutant.

In the pheromone response pathway, the scaffold protein Ste5, carrying the associated kinases Ste11, Ste7, Fus3 and Kss1, is recruited by the α -factor receptor Ste2 on the plasma membrane where it brings Ste11 in proximity with another membrane bound complex consisting of the Ste20 kinase [189]. Ste20 phosphorylates the MAPKKK Ste11 that then activates the MAPKK Ste7, which in turn activates the MAPKs Kss1 and Fus3. The activated Fus3 kinase leads to the degradation of the G1 cyclins causing cell cycle arrest. Both Kss1 (43 kDa) and Fus3 (41 kDa) are rapidly activated when the mating type a cells are treated with α -factor and this can be readily observed by Western blot analysis probed with anti-ERK1/2 antibodies [175, 190]. This antibody recognizes the active phosphorylated form of both Kss1 and Fus3, as well as a third MAPK, Slt2, which upon stress is activated to maintain the integrity of the cell wall [189]. We examined whether Kss1 and Fus3 could be activated in the H2B-R95A mutant upon α -factor exposure. While the parent showed a time-dependent activation of both Kss1 and Fus3 in response to α -factor, the H2B-R95A mutant showed no activation of these kinases (Fig. 12A), consistent with the downregulation of components of the pheromone pathway in this mutant. Thus, the inability of the H2B-R95A mutant to arrest in the G1 phase is indeed due to a defect in activating the pheromone pathway by α -factor.

2.5.10 Kss1 and Fus3 are activated by rapamycin in the parent, and not in the H2B-R95A mutant

Since the activation of the MAPKs by α -factor culminated with G1 arrest, we checked whether Kss1 and Fus3 would be similarly activated by rapamycin to trigger cell cycle arrest in the parent. Upon treatment with rapamycin (200 ng per ml), we found that both MAPKs were activated in the parent, although higher concentrations (500 ng) caused disappearance of the MAPKs (Fig. 12B). In contrast, rapamycin did not activate the two MAPKs in the H2B-R95A mutant even when these cells were treated with even higher doses of rapamycin (data not shown). Thus, if components of the pheromone pathway are involved in triggering G1 arrest in response to rapamycin, at least the mechanism appears to be similar to the α -factor-induced arrest and requires the activation of Kss1 and Fus3 by phosphorylation.

It is noteworthy that the H2B-R95A mutant was not as proficient as the parent in the activation of the Slt2 kinase, which is known to respond to various conditions including heat shock, α -factor, oxidative stress, as well as rapamycin (Fig. 12A) [191]. This observation excludes the possibility that the H2B-R95A mutant has a general defect in responding to extracellular stimuli. Interestingly, rapamycin activated the Slt2 kinase in a dose dependent manner in the parent and at high concentrations triggered its disappearance while a lower Mr band appeared, suggesting that rapamycin might induce degradation of Slt2 (Fig. 13) [175, 190]. In contrast, Slt2 was not subjected to degradation in H2B-R95A mutant, and may explain the higher level in the absence of any treatment (Fig. 13). Nonetheless, these findings are indicative of rapamycin activating the cell wall integrity signaling pathway [192-194].

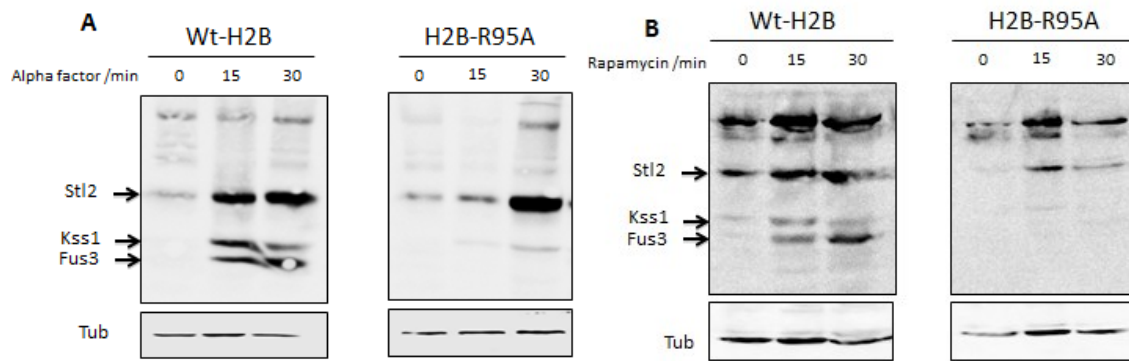


Figure 12 : The MAPKs, Fus3 and Kss1, are activated either by α -factor or rapamycin in the Wt-H2B strain, but not in the H2B-R95A variant.

A, B, Cells were inoculated over night and the next day treated either with α -factor (4 ug/mL) or rapamycin (200 ng/ml), respectively, and samples taken at 0, 15 and 30 min for total protein extraction by trichloroacetic acid (TCA). The proteins were analyzed by Western blot and the membrane probed with anti-Erk1/2 to detect MAPKs [175, 190].

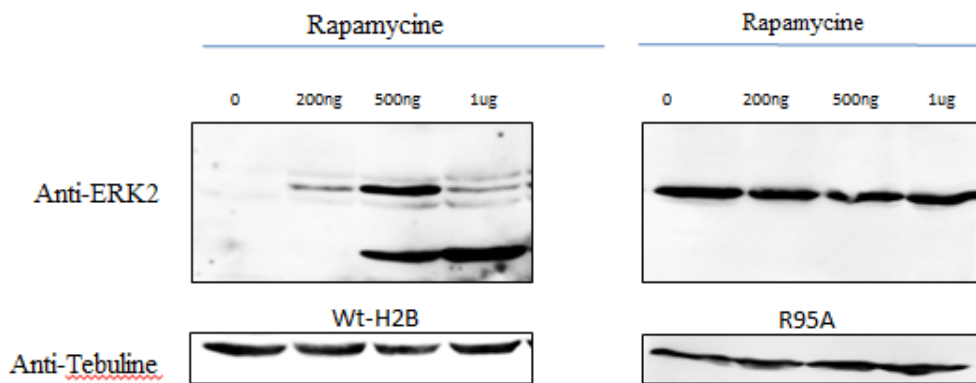


Figure 13 : Rapamycin induces the degradation of Slt2 in the parent but not in the mutant R95A

Cells were inoculated over night and treated the next day with different concentrations of rapamycin (200, 500 and 1000 ng/ml) and samples taken at 30 min for total protein extraction by trichloroacetic acid (TCA). Proteins were analyzed by Western blot and the membrane probed with anti-Erk1/2 to detect MAPKs [175, 190].

2.5.11 STE5 deletion mutants are resistant to rapamycin

The above data clearly indicate that the H2B-R95A mutation caused the downregulation of components of the pheromone pathway, which apparently are required to signal cell cycle arrest in response to rapamycin. Since Ste5 is a crucial component that allows the assembly and communications between the kinases, and mutants deleted for the STE5 gene cannot transmit a signal along the pheromone pathway to activate the MAPKs, we therefore examined if *ste5Δ* mutants would show a rapamycin phenotype. As shown in Fig. 14, the *ste5Δ* mutant displayed striking resistance to rapamycin as compared to the parent. Introduction of a single copy plasmid pSTE5-GFP expressing Ste5 as a GFP fusion protein restored to the *ste5Δ* mutant parental sensitivity to rapamycin (Fig. 14A). Collectively, our data indicate for the first time that yeast cells are indeed using the pheromone pathway to convey cell cycle arrest in response to rapamycin exposure.

2.5.12 Rapamycin induces the expression of Ste5-GFP fusion in the parent, but not in the H2B-R95A mutant.

Because *ste2Δ* mutant lacking the transmembrane α -factor receptor protein showed parental sensitivity to rapamycin, we excluded the possibility that Ste2 recruitment of Ste5 and its associated proteins to the plasma membrane is involved in signaling the response by rapamycin. As such, we checked whether rapamycin could influence Ste5 expression level. Using the plasmid pSTE5-GFP introduced into the *ste5Δ* mutant, we observed that rapamycin (200 ng/ml) caused a time dependent induction of Ste5 with at least 7-fold induction in 30 min. This induction also occurred in the *ste2Δ* mutant excluding a role for Ste2 in the initiation of the signal (data not shown). A similar induction of Ste5-GFP was

observed when the pSTE5-GFP plasmid was introduced into the H2B parent and treated with rapamycin (Fig. 14C). In contrast, Ste5-GFP was not induced in the H2B-R95A mutant when the cells were treated with rapamycin consistent with the ChIP-Chip data that the H2B-R95A variant prevents proper expression of Ste5 (Fig. 14C). Induction of the Ste5-GFP was not observed if the parent cells were treated with α -factor, indicating that the mechanism by which rapamycin exerts its effects is distinct from α -factor. In fact, α -factor has been reported to decrease the mobility of Ste5-GFP caused by increase phosphorylation of its N-terminus and requiring the function of Ste2 [174]. Based on our observations, we propose that rapamycin is stimulating the expression of components of the pheromone pathway, which become activated and serve to signal cell cycle arrest.

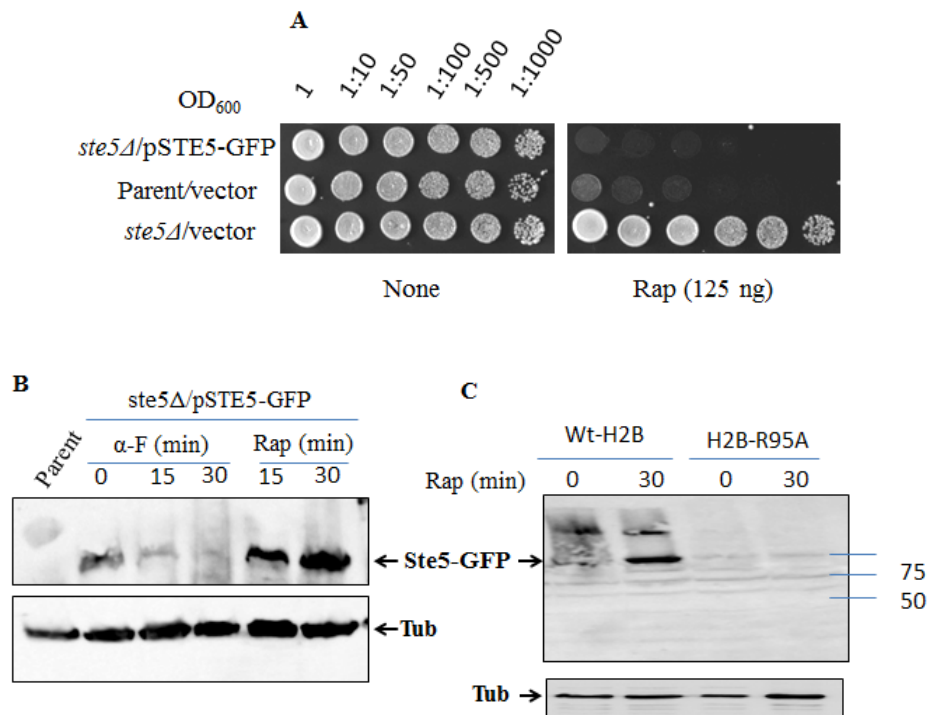


Figure 14 : Ste5 mediates a response to rapamycin.

A, Mutants lacking Ste5 are resistant to rapamycin, but restored to parental sensitivity with the expression of Ste5-GFP. The indicated Cells were grown overnight, subcultured the next day for 4 h and spotted onto YPD solid media without and with different concentrations of rapamycin (0 to 150 ng/ml). Plates were photographed after 48 h of incubation at 30 °C. **B**, Rapamycin induces the expression level of Ste5-GFP. Cells were grown as above and treated with either α factor or rapamycin. Samples taken for protein extraction by TCA, and subjected to SDS-PAGE for Western blot analysis. The membrane was probed with anti-GFP to detect Ste5-GFP. **C**, Ste5-GFP is expressed in the parent, but not in the H2B-R95A variant.

2.5.13 Rapamycin upregulates Fus3 and Far1 and triggers the destruction of the cyclins

To test the above hypothesis, we examined if the downstream components Fus3 and Far1 would be upregulated and correlated with the destruction of the cyclins following rapamycin treatment. To do this, we used the parent strain carrying genes that were tagged with the TAP tag at the endogenous loci of either FUS3, FAR1, CLN1, CLN2 or CLN3 gene. Both Fus3-TAP and Far1-TAP were upregulated by 3- to 5-fold within 60 mins of rapamycin treatment (Fig. 15A), and this coincided with a decreased level of Cln1 and Cln2 as compared to the untreated cells (Fig. 15B). Cln3-TAP could not be monitored as it was undetectable under normal growth conditions. In the case of Cln2-TAP, rapamycin caused the appearance of slower migrating heterogeneous polypeptides of Cln2, which is consistent with the phosphorylation of Cln2 followed by its degradation (Fig. 15B) [195].

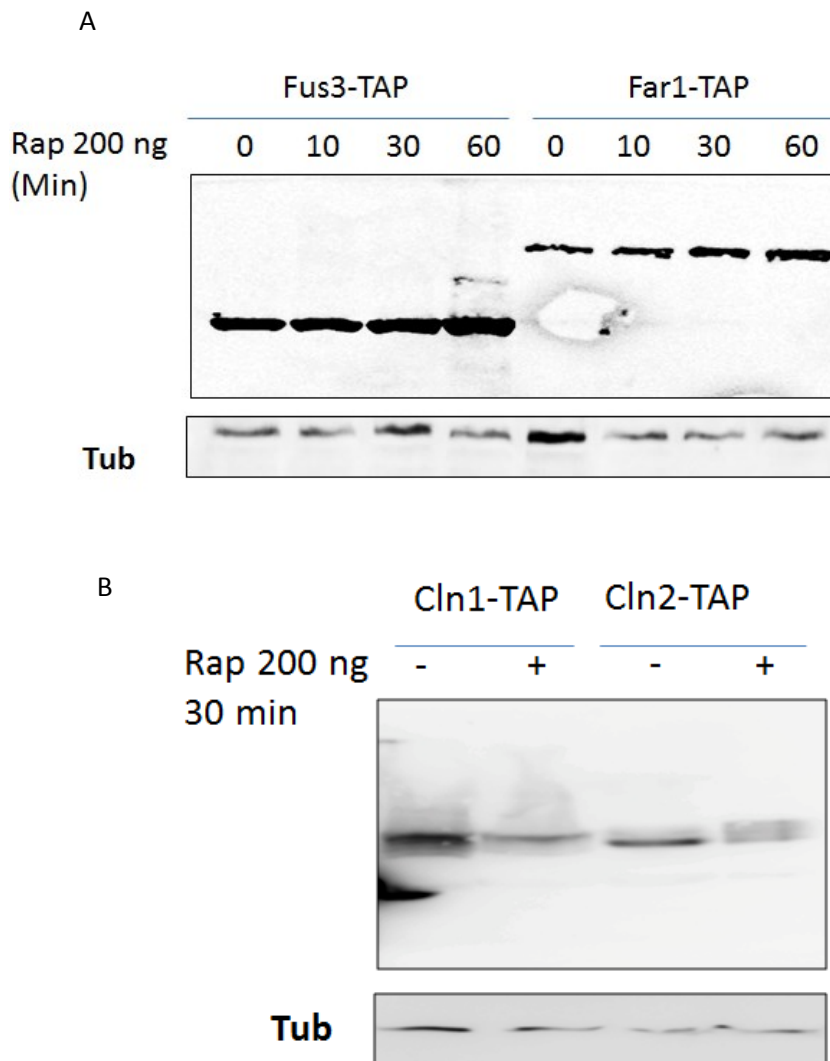


Figure 15 : Rapamycin induces the expression level of Fus 3- and Far1-TAP and triggers the degradation of Cln1 and 2.

The parent strain tagged at the endogenous *FUS3* or *FAR1* locus with TAP tag was treated with rapamycin and samples taken at the indicated time for Western blot analysis probed with anti-PAP to detect the Fus3-TAP or Far1-TAP fusion protein.

2.5.14 Ste5 is controlled by the Tor signaling pathway in response to rapamycin

The inhibition of Torc1 kinase by rapamycin leads to the activation, as well as repression of many genes. We tested whether the induction of Ste5 would depend upon a functional Torc1 signaling pathway. In this experiment, we used the *tor2* allele from the DAmP mutant collection as deletion of the *TOR2* gene leads to inviable cells. This *tor2-DAmP* allele caused resistance to rapamycin as compared to the parent (Fig. 16). Introduction of the pSTE5-GFP plasmid into this *tor2* mutant followed by rapamycin treatment did not induce the expression of the Ste5-GFP protein as compared to the parent (Fig. 16A). Thus, the induction of a key component of the pheromone pathway depends on a functional Torc1 kinase.

To further examine whether Ste5 would exert its function in the same pathway as the Torc1 kinase, we compared the level of rapamycin resistance displayed by the parent, *ste5Δ*, the *tor2-DAmP* mutant and the *ste5Δ tor2-DAmP* double mutant from the same genetic background. While the *ste5Δ* and the *tor2-DAmP* mutants showed nearly the same level of increase resistance to rapamycin when compared to the parent (Fig. 16B), the *ste5Δ tor2-DAmP* double mutant was no more resistant to the drug in comparison to either of the single mutants (Fig. 16B). We interpret these findings to suggest that the pheromone pathway is exploited by the Torc1 signaling pathway to arrest cells in G1 phase in response to rapamycin.

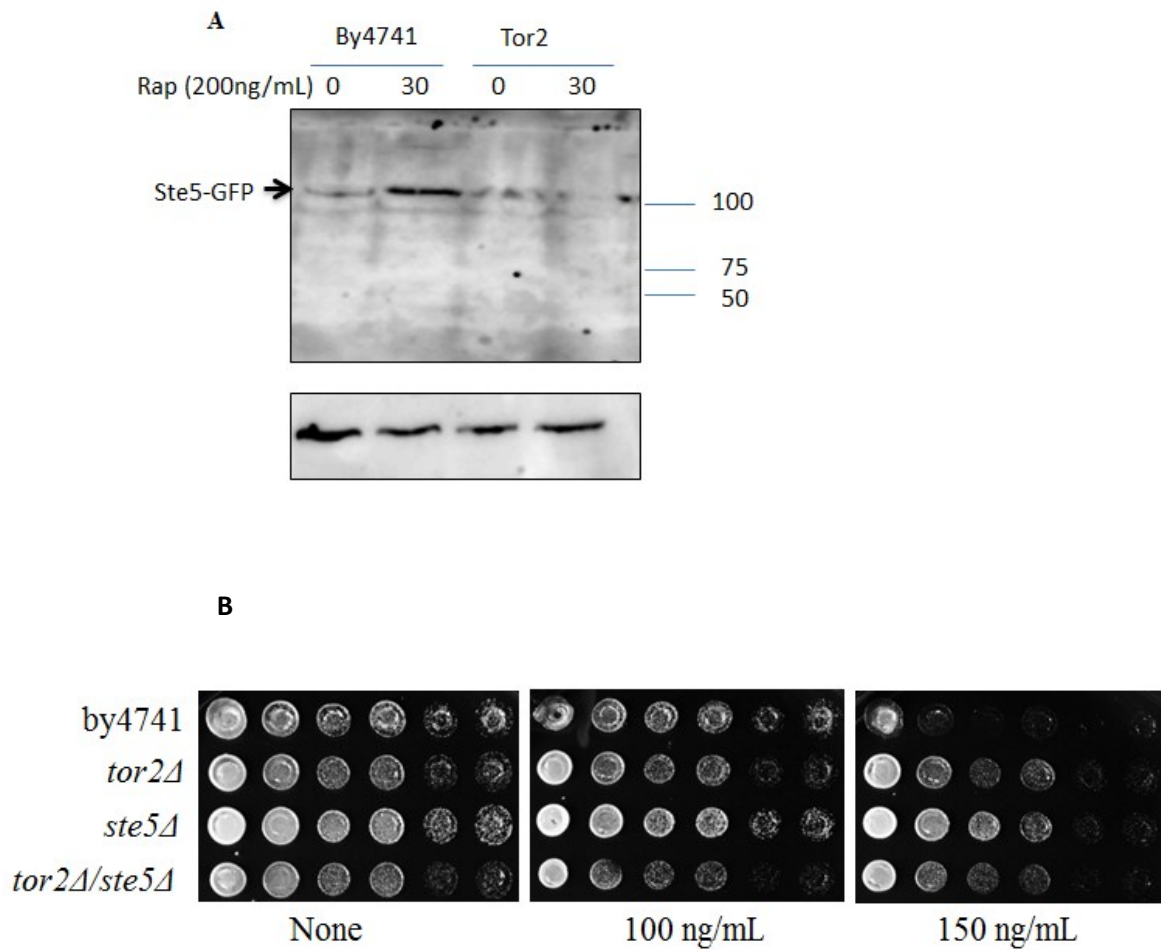


Figure 16 : Ste5-GFP expression is defective in *tor2*-DAmP allele and Ste5 mutation is epistatic with *tor2*-DAmP allele.

A, Ste5-GFP plasmid is expressed in By4741 after a 30 min treatment of rapamycin whereas it cannot be expressed in Tor2 mutant. **B**, Spot test show that *tor2Δ/ste5Δ* double mutant is resistant to rapamycin at the same level than *tor2Δ* and *ste5Δ* single mutants.

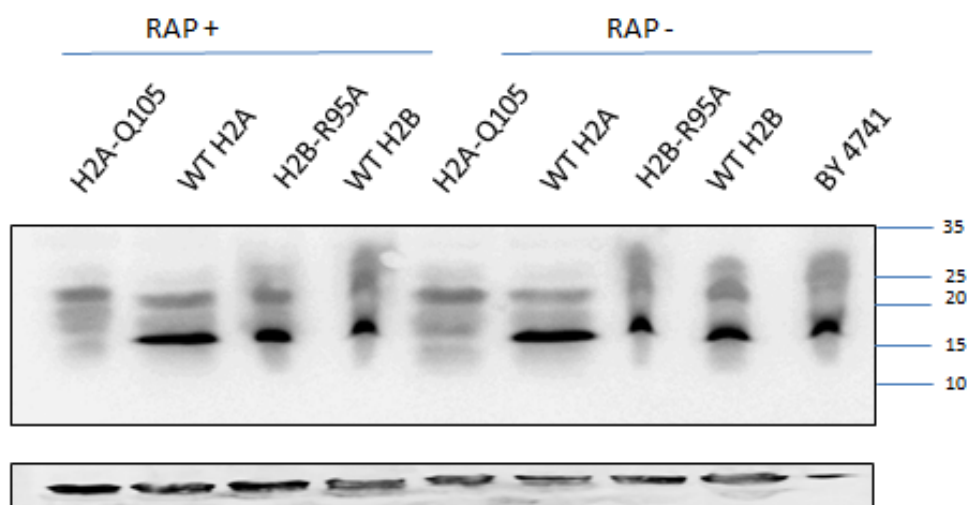


Figure 17 : Absence of methylation in H2A-Q105 versus H2B-R95A

Cells were inoculated over night and treated the next day with rapamycin (**200 ng/ml**), and samples taken at 30 min for total protein extraction by trichloroacetic acid (TCA). The proteins were analyzed by Western blot and the membrane probed with anti-Q105 methylation. .

2.6 Discussion

Our interest in the molecular mechanism of rapamycin resistance led us to perform a thorough screen with the SHIMA histone mutant library to hunt for variants with striking resistance to the drug. While our studies were in progress Chen et al. claimed to conduct a similar screen but the data are not yet reported, making it difficult to draw clear comparison between the independent screens. However, we were unable to reproduce their reported observation that the H3-K56A variant was sensitive to rapamycin under the same growth conditions [179]. Herein, we characterized one of the histone variants H2B-R95A, which exhibit pronounced resistance specifically to rapamycin, suggesting that Arg95 is performing a unique role to mount a response to the drug. Dai et al., identified H2B-R95A as a variant that interrupts telomere silencing within a distance of 20-Kb from the ends of telomere. While the defect in silencing the ends of the telomere may lead to other unidentified phenotypes, it is not linked to rapamycin resistance, as several other variants such as H2B-K123 that caused loss in silencing at rDNA and telomeres were not resistant to rapamycin [182].

We have purified H2B from untreated and rapamycin treated cells and examined in particular Arg95 for methylation and we were unable to identify such modification (Fig. 17), which is consistent with similar undertaking by Dai et al., and finding no evidence for Arg95 methylation [182]. Since H2B-R95A does not have a global effect and only affected a small number of genes, it might be an insignificant amount of H2B that could be methylated at Arg95 following exposure to rapamycin. It is unlikely that the phenotypes of the H2B-R95A variant is the consequence of a loss of the positively charge amino acid residue, as replacing arginine with lysine or with glutamic acid also conferred resistance to

rapamycin. Since both arginine and lysine can undergo methylation, the specific requirement for Arg95 may reflect a unique type of methylation caused by rapamycin.

Our study revealed that Arg95 is needed for efficient recruitment of Spt16, but only at a subset of genes. Studies from our group indicate that Spt16 is closely associated with the elongation RNA Pol II (Celia and Francois group in prep) and thus performs its function to disassemble the H2A-H2B dimer in these subset of genes to promote gene expression. Since the transcription of other genes were not affected, it would imply that Spt16 must be receiving cues from H2B-Arg95 on the pheromone genes to promote gene expression. There are several examples of a unique histone modification that alters a single biological process. A very recent study by Tessarz et al., identified a single glutamine residue (Q105) of yeast H2A that is methylated by the essential Nop1 methyltransferase using a biochemical approach and a modification-specific antibody [196]. The H2A-Q105 methylation is restricted to the nucleolus and is located primarily at the 35S DNA transcription units, as compared to the entire yeast genome [196]. The H2A-Q105 methylation occurs when there is active RNA polymerase I transcription [196]. In fact, H2A-Q105 spans a binding site for the FACT complex Spt16/Pob3 and either H2A-Q105 methylation or the H2A-Q105A variant can disrupt this binding [196]. The H2A-Q105A variant which phenocopied H2A-Q105 methylation increases transcription at the rDNA locus as a result of a more open chromatin due to the loss of nucleosomes along the transcribed rDNA locus. FACT complex is also known to facilitate transcription by binding and disrupting nucleosomes to promote RNA pol II passage, as well as to re-deposit nucleosomes behind the moving polymerases [197, 198]. As such, the authors proposed that H2A-Q105 methylation may block the re-deposition of the nucleosomes leaving an actively open chromatin. Although there are some parallel observations between

the two studies including the findings that a single amino acid substitution H2B-R95A or H2A-Q105A disrupted FACT recruitment and that each mutation affected a specific class of genes, the H2A-Q105A variant did not affect the rapamycin response and showed parental resistance to the drug (Fig. 17). Moreover, the H2A-Q105 methylation status was unaffected by the H2B-R95A variant, eliminating any cross-talk between H2A-Q105 and H2B-R95 due to their independent involvement in the binding to Spt16 [196]. While we found no evidence for H2B-R95 being methylated, a logical explanation for H2B-R95A reduced interaction with Spt16 is that this residue may constitute a region involved in the proper binding of Spt16, as also proposed for H2A-Q105 [196]. In fact, the H3-G34V variant causes a global increase in H3-K36me3 resulting in transcriptional defects [199]. Therefore, the proper binding of Spt16 to the H2B-R95 is required to disrupt the nucleosomes to facilitate RNA PolII transcription at the pheromone genes.

The most significant finding from our study is the discovery that rapamycin exploited the pheromone pathway to arrest the cell cycle in the G1 phase. While it is known that rapamycin treatment leads to cell cycle arrest, it was initially proposed to be an indirect consequence of diminished protein synthesis due to the degradation of translational initiation factors [142, 157]. However, until now the exact mechanism has never been resolved. Our study show for the first time that rapamycin impinges upon the pheromone pathway in two ways (i) triggering the upregulation of the key components of the pathway in a manner that is distinct from α -factor, and (ii) causing the activation by phosphorylation of the MAPKs Kss1 and Fus3, as well as Slt2 in a manner similar to α -factor. It is possible that the activation of the MAPKs may be an indirect effect due to the increase expression level of the gene products. We have shown that that rapamycin lead to the degradation of the cyclins, in particular Cln1 and Cln2, consistent with the activation of Fus3, which is

required to phosphorylate the Far1 kinase. This latter kinase might be involved in mediating the phosphorylation of the cyclins and leading to their degradation as suggested for α -factor-induced cell cycle arrest [200]. We have not directly tested whether either Fus3 or Far1 alone is sufficient or both would be needed to trigger the degradation of the cyclins. However, deletion of the *STE5* gene was completely effective in preventing the degradation of the cyclins in response to rapamycin.

The observation that *ste5 Δ* mutants, but not *ste2 Δ* , were resistant to rapamycin, suggests that the mechanism by which rapamycin transmits a signal via the pheromone pathway precludes the recruitment of Ste5 to the Ste2 receptor on the plasma membrane. Thus, while α -factor binds to Ste2 and initiates the signal to arrest cell cycle in G1, rapamycin intersects the pathway at the level of the Ste5 scaffold protein. We show that the expression levels of Ste5, as well as the docking MAPKs such as Fus3, are induced by rapamycin and thus the mere gene-induction may provide a compensatory mechanism, as opposed to the auto-inhibition by Ste5 on its kinases in the absence of α -factor, leading to the activation of the MAPKs followed by the destruction of the cyclins. We strongly believe that the induction of Ste5 is intimately linked to the Torc1 signaling pathway as the plasmid designed to express Ste5-GFP from its own promoter failed to produce the protein in the *tor2-DAmP*-kinase deficient mutant that displays resistance to rapamycin. Moreover, our genetic evidence establishes an epistatic relationship between Ste5 and the Torc1 kinase pathway. Since rapamycin acts by inhibiting the Torc1 kinase resulting in the translocation of transcription factors such as Gln3 and Msn2,4 from the cytosol to the nucleus to activate or repress their targets, we envision that a similar mechanism involving a transcription factor could be operating to turn on the pheromone genes. This

transcription factor would recruit the RNA PolII machinery and the FACT complex to allow transcription elongation.

CHAPITRE 3

Discussion

3. DISCUSSION

3.1 Résumé des travaux de recherche

Le travail présenté dans ce mémoire de maîtrise met en évidence un nouveau mécanisme de la rapamycine qui clarifie son effet inhibiteur sur le cycle cellulaire des levures. En effet, nous avons découvert, suite à un criblage d'une banque de mutants d'histones, que le résidu arginine en position 95 sur l'histone H2B (H2B-R95A) est le plus résistant à la rapamycine. Ce résidu a attiré notre attention car un groupe a démontré que H2B-R95A joue un rôle important dans les télomères et le *chromatin silencing* [182]. Aussi, ils avaient découvert que cette mutation cause un problème d'accouplement. Cette découverte s'est révélée importante dans le contexte de nos travaux de recherche. Donc, dans le but d'analyser les interactions protéines-protéines, nous avons immunoprécipité le complexe d'histone H2B chez le mutant R95A, la souche Wt et autres mutants. Ceci a permis de mettre en évidence à l'aide de la coloration d'argent une bande absente chez le mutant R95A en comparaison avec le Wt et les autres mutants (Fig. 6). L'identification par spectrométrie de masse de la protéine correspondant à cette bande a révélé que c'était Spt16, une protéine appartenant au complexe FACT. Le rôle de Spt16 est de se déplacer avec l'ARN polymérase II, d'interagir avec les histones H2A et H2B pour altérer les nucléosomes en déplaçant ces histones durant la transcription [50].

Après avoir confirmé l'interaction de Spt16 avec l'histone H2B (Fig. 7), et en prenant en considération le rôle du complexe FACT lors de la transcription, nous avons émis l'hypothèse que H2B-R95A pourrait empêcher l'interaction de Spt16 avec l'histone H2B ce qui engendrerait un dysfonctionnement de la chromatine dans cette région de la mutation. Supposant que ce dysfonctionnement agit lorsque la chromatine est ouverte, nous

pourrions supposer qu'il y aurait une modulation des gènes de cette région ce qui pourrait causer des phénotypes tel que la résistance à la rapamycine. Ainsi, une recherche dans la littérature pour trouver un exemple de mécanisme similaire appuyant notre hypothèse a révélé qu'un groupe de recherche avait déjà démontré qu'une mutation sur le H2B-A84D supprime le phénotype de Spt16-11, rendant ces cellules plus résistante à la chaleur et à l'hydroxyurée [185]. Ce groupe a aussi mis en évidence le degré de compaction de la chromatine chez le mutant étant bien inférieur par rapport à la souche sauvage et que cette mutation empêche l'interaction entre Spt16 et l'histone H2B, rendant la chromatine ouverte [185]. Suite à ces observations, nous avons analysé la sensibilité à la rapamycine de la souche H2B-A84D et découvert que cette souche était également résistante à la rapamycine. Ce résultat a appuyé l'hypothèse que probablement H2B-R95A peut moduler l'expression des gènes par l'ouverture de la chromatine causée par la mutation, où l'arginine 95 serait probablement méthylée. Cette méthylation pourrait être nécessaire pour l'interaction de Spt16 avec l'histone H2B. Une mutation sur R95 pourrait donc affecter la chromatine et moduler l'expression génique, comme par exemple, en sur-exprimant certains gènes comme ceci a été observé dans le cas de H3K4, H3K36, et H3K79 responsables d'activer les gènes localisés dans l'euchromatine [94]. Un autre exemple est H3K4me1 qui est responsable de l'activation des *enhancers* [95]. Or, dans cet exemple, la mutation est sur la lysine et non l'arginine comme chez H2B-R95A mais dans ces 2 cas, le résidu peut être méthylés, ce qui peut contrôler l'expression de certains gènes. Il est à noter que la mutation R95A peut aussi réduire l'expression des gènes comme, par exemple, dans le cas de H3K9 qui cause la répression des gènes localisés sur l'hétéro-chromatine [94].

L'autre hypothèse proposée était que l'absence d'interaction entre Spt16 et l'histone H2B qui cause un dysfonctionnement de la chromatine pourrait être due à une mutation sur un

des résidus de Spt16 et non à une mutation sur l'histone H2B. Ceci signifierait qu'une mutation directement sur Spt16 empêche la liaison avec l'histone H2B, rendant la souche résistante à la rapamycine. Un exemple de ce type de mécanisme a déjà été démontré par Singer *et al.* où une mutation sur le résidu E857K empêche l'interaction entre Spt16 et l'histone H2B [188]. Dans notre cas, nous avons également trouvé que Spt16 interagit faiblement avec l'histone H2B à cause de la mutation R95A et la souche exprimant cette mutation est résistante à la rapamycine. Lorsque nous avons analysé la sensibilité de la souche E857K à la rapamycine, nous avons également démontré que cette souche est résistante. En somme, ces travaux suggèrent que les mutations R95A, E875A, ou H2B A84D dans une souche dont Spt16 est muté, et qui empêche le recrutement efficace de Spt16, rendent les souches résistantes à la rapamycine.

Pour mieux comprendre le mécanisme de la résistance à la rapamycine et analyser la modulation des gènes spécifiquement dans le mutant R95A vs la souche Wt, un micropuce a été réalisé. Ce micropuce a démontré que plusieurs gènes sont surexprimés et plusieurs autres gènes sont sous-exprimés dans le mutant R95A en le comparant au Wt. Par la suite, une *Gene Ontology (GO) Analysis* a été réalisée chez les gènes sous-exprimés et a révélé que certains gènes sous-exprimés dans le mutant R95A sont impliqués dans la voie des phéromones. Ceci signifie qu'il y aurait un défaut d'accouplement dans cette souche, ce qui avait déjà mentionné par Dai *et al.* [182]. Ainsi, une déficience dans la voie des phéromones chez le mutant H2B-R95A suggère que ce résidu serait essentiel à l'expression des gènes de cette voie. Ceci serait un mécanisme particulièrement unique où un seul résidu d'histone serait essentiel pour l'expression d'un groupe de gènes spécifiques.

En résumé, Spt16 interagit faiblement avec l'histone H2B à cause de la mutation R95A ce qui aurait comme conséquence de rendre la souche résistante à la rapamycine et les micropuces ont démontré que la plupart des gènes sous-exprimés dans le mutant R95A font partie de la voie des phéromones. Or, quel est le lien entre la mutation R95A, Spt16, la résistance à la rapamycine et les gènes de la voie des phéromones? Pour répondre à cette question, un ChIP- Chip a été réalisé afin d'analyser la distribution de Spt16 et de l'ARN polymérase II sur le génome, et plus spécifiquement sur les gènes impliqués dans la voie des phéromones. Les résultats du ChIP - Chip ont démontré que l'occupation de Spt16 et de l'ARN polymérase II sur les gènes de la voie des phéromones est très faible dans le mutant R95A par rapport au Wt (Fig. 10). Ceci signifie que l'expression de ces gènes dans le mutant R95A est très faible par rapport au Wt, ce qui concorde avec les résultats du micropuce et permet de faire le lien entre la mutation R95A, Spt16 et les gènes sous-exprimés de la voie des phéromones.

Afin d'élucider le lien avec la résistance à la rapamycine, des recherches ont été entamées dans la littérature afin de mieux comprendre la voie des phéromones. Lors de l'accouplement de deux souches de levure, une molécule qui s'appelle le facteur α est secrétée afin d'arrêter le cycle cellulaire en G1 et permettre aux souches de se reproduire [173]. En réponse au facteur α , un ensemble de protéines interagissent entre elles pour arrêter le cycle cellulaire en G1. Ces protéines s'appellent les « stériles » et sont pour la plupart des kinases [175]. Parmi celles-ci, Ste5, une protéine d'échafaudage, interagit avec les kinases Ste11, Ste7, Fus3 et Kss1. L'activation de ces kinases conduit à l'activation de la protéine Far1 responsable d'inhiber les protéines cyclines Cln1 Cln2 et Cln3 qui conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Dans les résultats de micropuces et de ChIP - Chip, les gènes stériles comme Ste5, Ste18, Fus3 et Far1 sont sous-exprimés dans

le mutant R95A en comparaison au WT. Ceci nous a conduits à penser qu'à l'état normal dans la souche Wt, la rapamycine active la voie des phéromones pour arrêter le cycle cellulaire en G1, rendant ainsi les souches sauvages sensibles à la rapamycine. Par contre, dans le cas de la souche mutante R95A où la plupart des gènes de la voie des phéromones sont sous-exprimés, les protéines cyclines demeurent actives, il n'y a pas d'arrêt du cycle cellulaire et la souche mutante continue à croître et à résister à la rapamycine. Afin de confirmer l'hypothèse que la rapamycine active la voie des phéromones et que le cycle cellulaire ne s'arrête pas en G1 dans la souche R95A, une analyse du cycle cellulaire a été réalisée afin d'observer le cycle cellulaire dans les souches Wt et R95A en réponse à la rapamycine. Tel que mentionné dans l'article présenté dans ce mémoire, en réponse à la rapamycine, la souche Wt s'arrête en G1 mais la souche R95A continue de proliférer, appuyant ainsi notre hypothèse. Nous avons ensuite utilisé un anticorps anti-ERK1/2 de cellules mammifère qui reconnaît les deux MAPK Fus3 and Kss1 [172]. Il est connu que Fus3 et Kss1 sont activés en réponse au facteur α . Or, nous avons également démontré que Fus3 et Kss1 sont activés en réponse à la rapamycine (Fig. 12). Ceci signifie qu'en réponse à la rapamycine, les MAPK Fus3 et Kss1 s'activent pour ensuite activer Far1 qui inhibe les protéines cycline et arrête le cycle cellulaire en G1. De plus, nous avons démontré que la rapamycine active la voie des phéromones par la surexpression de Ste5-GFP (Fig. 14B) et la surexpression de Fus3-TAP et Far1-TAP en présence de la rapamycine (Fig. 15A).

En conclusion, le modèle que nous proposons (Fig. 18) expliquerait qu'en réponse à la rapamycine, dans une souche normale, Spt16 et l'ARN polymérase II interagissent avec l'histone H2B sur l'arginine R95 afin d'induire l'expression des gènes de la voie des phéromones, activer la cascade enzymatique de cette voie ce qui aura comme conséquence

l'inhibition des protéines cycline et l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1. Par contre, dans le cas de la souche mutant R95A, Spt16 et Pol II ne peuvent pas se lier avec l'histone H2B à cause de la mutation, les gènes de la voie des phéromones ne seront pas exprimés, les protéines cyclines ne seront pas inhibées et les cellules vont continuer à proliférer normalement, rendant par conséquent cette souche résistante à la rapamycine.

3.2 Critiques des travaux de recherche et directions futures

Dans le cadre de ces travaux de recherche, certaines améliorations et quelques expériences auraient pu être réalisées afin d'améliorer la qualité des travaux, solidifier les résultats et d'approfondir les connaissances. Par exemple, nous aurions pu tenter d'analyser les modifications post-traductionnelles de l'arginine R95A afin de savoir s'il y a une méthylation qui a lieu puisque l'arginine est connue pour être méthylée. Ceci a été testé par spectrométrie de masse mais les résultats se sont révélés non-concluants. Or, la spectrométrie de masse ne serait pas la méthode la plus spécifique pour analyser les modifications chez les histones puisque, avec la nouvelle technologie, il y a d'autres méthodes plus précises utilisant la bioinformatique qui permettent de détecter les résidus des histones modifiés. Un autre exemple est que nous n'avons pas investigué davantage l'interaction entre Spt16 et l'histone H2B sur le résidu R95A pour déterminer si cette interaction est le résultat d'une modification post-traductionnelle ou une interaction par charge. Idéalement, nous aurions fait une substitution de l'arginine R95 par un résidu de charge positive comme la lysine ou l'acide glutamique pour ensuite réaliser une analyse par spot test afin de déterminer si cette souche a perdu sa résistance à la rapamycine, confirmant par le fait même que l'interaction avec Spt16 est une question de charge.

À ce point-ci, il serait intéressant de déterminer si la rapamycine peut activer la voie de phéromones. En effet, lors de l'exécution du projet, nous avons noté que lors du traitement à la rapamycine les MAPK Fus3 et Kss1 sont activés, Ste5-GFP est surexprimé et la quantité de la protéine détectée par le Western est également augmentée. Ceci a aussi été observé pour Fus3-TAP et Far1-TAP. En approfondissant cette question, il serait possible de déterminer si la rapamycine agit par la même voie, par une voie différente que le facteur α ou par la voie de TOR afin d'activer cette voie. De plus, en considérant que Ste5 est surexprimé en réponse à la rapamycine, on pourrait déterminer si la protéine TOR joue un rôle dans la surexpression de cette protéine? Il serait également très intéressant de savoir s'il y a un facteur de transcription spécifique qui interagit avec le résidu R95 de l'histone H2B afin d'activer l'expression des gènes de phéromones, dont le gène Ste5 particulièrement.

Finalement, il serait aussi intéressant dans de futures expériences d'analyser dans les cellules de mammifères si la rapamycine peut arrêter le cycle cellulaire en G1 en utilisant des protéines kinases qui sont des homologues à ceux impliqués dans la voie des phéromones chez la levure. En effet, compte tenu du fait que la voie de phéromones est inexistante dans les cellules de mammifères, il y a toutefois plusieurs homologues des gènes de phéromones chez les mammifères tel que ERK2, homologue de Kss1 et Fus3, MEK1, homologue de Ste7, MEKK1 homologue de Ste11 [201]. Ces expériences permettraient donc de mieux comprendre les mécanismes de résistance et de sensibilité à la rapamycine chez les cellules de mammifères.

4. CONCLUSION

Ces travaux de recherche ont permis de mettre en évidence pour la première fois que la rapamycine peut activer la voie des phéromones, via des résidus situés sur des histones, afin d'inhiber le cycle cellulaire et arrêter ainsi la prolifération cellulaire et qu'une défectuosité dans cette voie cause la résistance à cette drogue.

Nous espérons que ces recherches permettront dans le futur de mieux comprendre les mécanismes de la résistance à la rapamycine dans les cellules de mammifères ce qui aura un impact positif dans l'amélioration des traitements des patients traités avec cet immunosuppresseur.

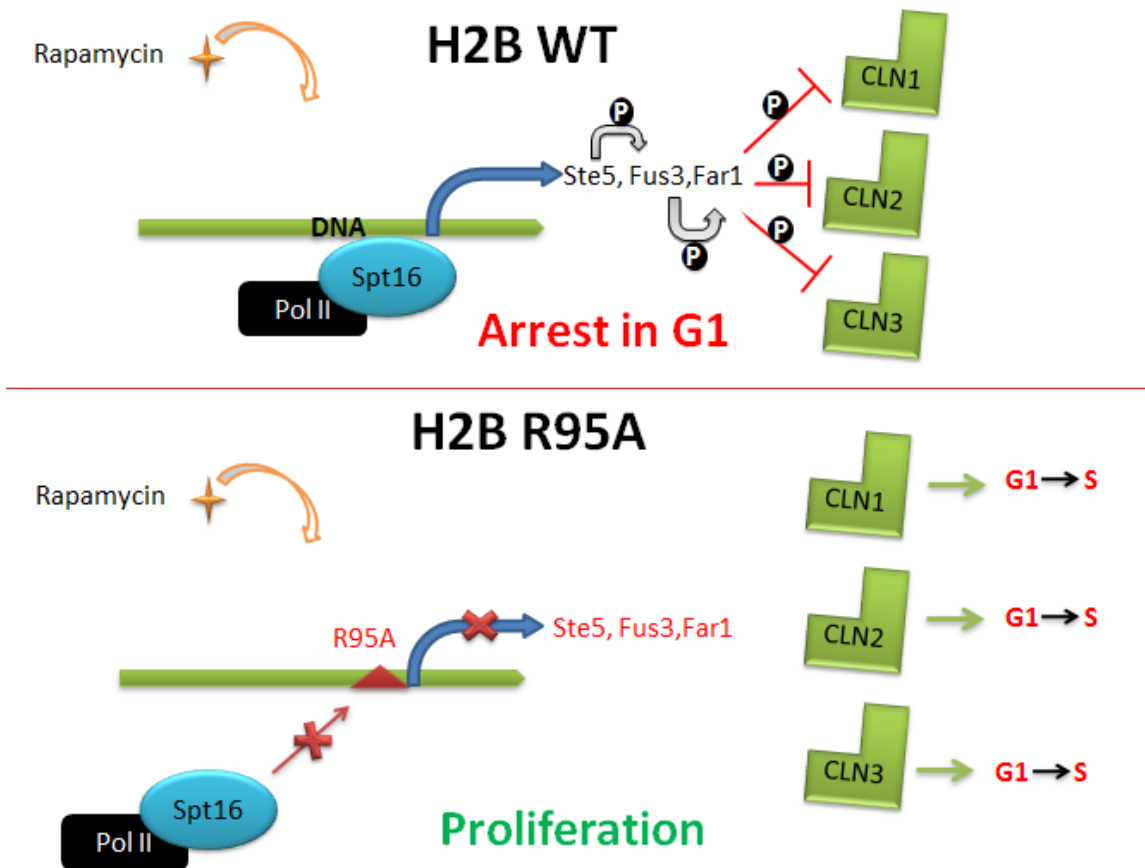


Figure 18: Model explaining the role of R95 in recruiting Spt16 and activating the pheromone genes to stop cells in G1.

5. RÉFÉRENCES

1. Latchman, D.S., *Transcription factors: an overview*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(12): p. 1305-12.
2. Karin, M., *Too many transcription factors: positive and negative interactions*. New Biol, 1990. **2**(2): p. 126-31.
3. Lee, T.I. and R.A. Young, *Transcription of eukaryotic protein-coding genes*. Annu Rev Genet, 2000. **34**: p. 77-137.
4. Nikolov, D.B. and S.K. Burley, *RNA polymerase II transcription initiation: a structural view*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(1): p. 15-22.
5. Roeder, R.G., *The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(9): p. 327-35.
6. Goni, J.R., et al., *Determining promoter location based on DNA structure first-principles calculations*. Genome Biol, 2007. **8**(12): p. R263.
7. Dynlacht, B.D., T. Hoey, and R. Tjian, *Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation*. Cell, 1991. **66**(3): p. 563-76.
8. Kokubo, T., et al., *Molecular cloning of Drosophila TFIID subunits*. Nature, 1994. **367**(6462): p. 484-7.
9. Reinberg, D., M. Horikoshi, and R.G. Roeder, *Factors involved in specific transcription in mammalian RNA polymerase II. Functional analysis of initiation factors IIA and IID and identification of a new factor operating at sequences downstream of the initiation site*. J Biol Chem, 1987. **262**(7): p. 3322-30.
10. Sawadogo, M. and R.G. Roeder, *Factors involved in specific transcription by human RNA polymerase II: analysis by a rapid and quantitative in vitro assay*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(13): p. 4394-8.
11. Gruber, T.M. and C.A. Gross, *Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space*. Annu Rev Microbiol, 2003. **57**: p. 441-66.
12. Sharma, U.K. and D. Chatterji, *Transcriptional switching in Escherichia coli during stress and starvation by modulation of sigma activity*. FEMS Microbiol Rev, 2010. **34**(5): p. 646-57.
13. Matsui, T., et al., *Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II*. J Biol Chem, 1980. **255**(24): p. 11992-6.
14. Samuels, M., A. Fire, and P.A. Sharp, *Separation and characterization of factors mediating accurate transcription by RNA polymerase II*. J Biol Chem, 1982. **257**(23): p. 14419-27.
15. Nakajima, N., M. Horikoshi, and R.G. Roeder, *Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification, genetic specificity, and TATA box-promoter interactions of TFIID*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(10): p. 4028-40.
16. Buratowski, S., et al., *Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II*. Cell, 1989. **56**(4): p. 549-61.

17. Reinberg, D. and R.G. Roeder, *Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Purification and functional analysis of initiation factors IIB and IIE*. J Biol Chem, 1987. **262**(7): p. 3310-21.
18. Tirode, F., et al., *Reconstitution of the transcription factor TFIIF: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7*. Mol Cell, 1999. **3**(1): p. 87-95.
19. Goldman, S.R., R.H. Ebright, and B.E. Nickels, *Direct detection of abortive RNA transcripts in vivo*. Science, 2009. **324**(5929): p. 927-8.
20. Hsu, L.M., *Promoter clearance and escape in prokaryotes*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1577**(2): p. 191-207.
21. Hsu, L.M., *Monitoring abortive initiation*. Methods, 2009. **47**(1): p. 25-36.
22. Revyakin, A., et al., *Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching*. Science, 2006. **314**(5802): p. 1139-43.
23. Sainsbury, S., J. Niesser, and P. Cramer, *Structure and function of the initially transcribing RNA polymerase II-TFIIB complex*. Nature, 2013. **493**(7432): p. 437-40.
24. Yudkovsky, N., J.A. Ranish, and S. Hahn, *A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 225-9.
25. Bengal, E., et al., *Role of the mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(3): p. 1195-206.
26. Tan, S., R.C. Conaway, and J.W. Conaway, *Dissection of transcription factor TFIIF functional domains required for initiation and elongation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(13): p. 6042-6.
27. Kwak, H. and J.T. Lis, *Control of transcriptional elongation*. Annu Rev Genet, 2013. **47**: p. 483-508.
28. Saunders, A., L.J. Core, and J.T. Lis, *Breaking barriers to transcription elongation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 557-67.
29. Rasmussen, E.B. and J.T. Lis, *In vivo transcriptional pausing and cap formation on three Drosophila heat shock genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 7923-7.
30. Marshall, N.F. and D.H. Price, *Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation*. J Biol Chem, 1995. **270**(21): p. 12335-8.
31. Wada, T., et al., *DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs*. Genes Dev, 1998. **12**(3): p. 343-56.
32. Yamaguchi, Y., et al., *NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation*. Cell, 1999. **97**(1): p. 41-51.
33. Lee, C., et al., *NELF and GAGA factor are linked to promoter-proximal pausing at many genes in Drosophila*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(10): p. 3290-300.

34. Fujinaga, K., et al., *Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(2): p. 787-95.
35. Narita, T., et al., *Human transcription elongation factor NELF: identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(6): p. 1863-73.
36. Missra, A. and D.S. Gilmour, *Interactions between DSIF (DRB sensitivity inducing factor), NELF (negative elongation factor), and the Drosophila RNA polymerase II transcription elongation complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(25): p. 11301-6.
37. Martinez-Rucobo, F.W., et al., *Architecture of the RNA polymerase-Spt4/5 complex and basis of universal transcription processivity*. Embo j, 2011. **30**(7): p. 1302-10.
38. Perales, R. and D. Bentley, *"Cotranscriptionality": the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions*. Mol Cell, 2009. **36**(2): p. 178-91.
39. Price, D.H., *P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(8): p. 2629-34.
40. Ramanathan, Y., et al., *Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences*. J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 10913-20.
41. Yamada, T., et al., *P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation*. Mol Cell, 2006. **21**(2): p. 227-37.
42. Kim, J.B. and P.A. Sharp, *Positive transcription elongation factor B phosphorylates hSPT5 and RNA polymerase II carboxyl-terminal domain independently of cyclin-dependent kinase-activating kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 12317-23.
43. Kanazawa, S., et al., *c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis*. Oncogene, 2003. **22**(36): p. 5707-11.
44. Eberhardy, S.R. and P.J. Farnham, *Myc recruits P-TEFb to mediate the final step in the transcriptional activation of the cad promoter*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 40156-62.
45. Yang, Z., et al., *Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4*. Mol Cell, 2005. **19**(4): p. 535-45.
46. Jang, M.K., et al., *The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription*. Mol Cell, 2005. **19**(4): p. 523-34.
47. Takahashi, H., et al., *Human mediator subunit MED26 functions as a docking site for transcription elongation factors*. Cell, 2011. **146**(1): p. 92-104.
48. Orphanides, G., et al., *FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes*. Cell, 1998. **92**(1): p. 105-16.
49. Orphanides, G., et al., *The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins*. Nature, 1999. **400**(6741): p. 284-8.
50. Belotserkovskaya, R., et al., *FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration*. Science, 2003. **301**(5636): p. 1090-3.

51. Xin, H., et al., *yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2A-H2B displacement*. Mol Cell, 2009. **35**(3): p. 365-76.
52. Bortvin, A. and F. Winston, *Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones*. Science, 1996. **272**(5267): p. 1473-6.
53. Shi, X., et al., *Paf1p, an RNA polymerase II-associated factor in Saccharomyces cerevisiae, may have both positive and negative roles in transcription*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(2): p. 669-76.
54. He, N., et al., *Human Polymerase-Associated Factor complex (PAFc) connects the Super Elongation Complex (SEC) to RNA polymerase II on chromatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(36): p. E636-45.
55. Pavri, R., et al., *Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II*. Cell, 2006. **125**(4): p. 703-17.
56. Petesch, S.J. and J.T. Lis, *Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 loci*. Cell, 2008. **134**(1): p. 74-84.
57. Krishnakumar, R., et al., *Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes*. Science, 2008. **319**(5864): p. 819-21.
58. Gruber, A.R., et al., *Cleavage factor Im is a key regulator of 3' UTR length*. RNA Biol, 2012. **9**(12): p. 1405-12.
59. Proudfoot, N.J., A. Furger, and M.J. Dye, *Integrating mRNA processing with transcription*. Cell, 2002. **108**(4): p. 501-12.
60. Dawson, M.A. and T. Kouzarides, *Cancer epigenetics: from mechanism to therapy*. Cell, 2012. **150**(1): p. 12-27.
61. Allis, C.D., et al., *New nomenclature for chromatin-modifying enzymes*. Cell, 2007. **131**(4): p. 633-6.
62. Wang, G.G., C.D. Allis, and P. Chi, *Chromatin remodeling and cancer, Part II: ATP-dependent chromatin remodeling*. Trends Mol Med, 2007. **13**(9): p. 373-80.
63. Teif, V.B. and K. Rippe, *Predicting nucleosome positions on the DNA: combining intrinsic sequence preferences and remodeler activities*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(17): p. 5641-55.
64. Saha, A., J. Wittmeyer, and B.R. Cairns, *Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(6): p. 437-47.
65. Weake, V.M. and J.L. Workman, *Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(6): p. 426-37.
66. Hassan, A.H., et al., *Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes*. Cell, 2002. **111**(3): p. 369-79.
67. Wang, W., et al., *Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex*. Embo j, 1996. **15**(19): p. 5370-82.
68. Bao, Y. and X. Shen, *SnapShot: chromatin remodeling complexes*. Cell, 2007. **129**(3): p. 632.

69. Martens, J.A. and F. Winston, *Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes*. *Curr Opin Genet Dev*, 2003. **13**(2): p. 136-42.
70. Gangaraju, V.K. and B. Bartholomew, *Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling*. *Mutat Res*, 2007. **618**(1-2): p. 3-17.
71. Boyer, L.A., R.R. Latek, and C.L. Peterson, *The SANT domain: a unique histone-tail-binding module?* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(2): p. 158-63.
72. Corona, D.F. and J.W. Tamkun, *Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1677**(1-3): p. 113-9.
73. Badenhorst, P., et al., *Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF*. *Genes Dev*, 2002. **16**(24): p. 3186-98.
74. Morillon, A., et al., *Isw1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II*. *Cell*, 2003. **115**(4): p. 425-35.
75. Denslow, S.A. and P.A. Wade, *The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation*. *Oncogene*, 2007. **26**(37): p. 5433-8.
76. Becker, P.B. and W. Horz, *ATP-dependent nucleosome remodeling*. *Annu Rev Biochem*, 2002. **71**: p. 247-73.
77. Flanagan, J.F., et al., *Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail*. *Nature*, 2005. **438**(7071): p. 1181-5.
78. Sims, R.J., 3rd, et al., *Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(51): p. 41789-92.
79. Shimono, K., et al., *Microspherule protein 1, Mi-2beta, and RET finger protein associate in the nucleolus and up-regulate ribosomal gene transcription*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(47): p. 39436-47.
80. Bagchi, A., et al., *CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36*. *Cell*, 2007. **128**(3): p. 459-75.
81. Bowen, N.J., et al., *Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1677**(1-3): p. 52-7.
82. Bao, Y. and X. Shen, *INO80 subfamily of chromatin remodeling complexes*. *Mutat Res*, 2007. **618**(1-2): p. 18-29.
83. Downs, J.A., et al., *Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites*. *Mol Cell*, 2004. **16**(6): p. 979-90.
84. Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky, *ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1964. **51**: p. 786-94.
85. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 693-705.
86. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.

87. Wang, G.G., C.D. Allis, and P. Chi, *Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications*. Trends Mol Med, 2007. **13**(9): p. 363-72.
88. Tan, M., et al., *Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification*. Cell, 2011. **146**(6): p. 1016-28.
89. Bedford, M.T. and S.G. Clarke, *Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why*. Mol Cell, 2009. **33**(1): p. 1-13.
90. Bedford, M.T. and S. Richard, *Arginine methylation an emerging regulator of protein function*. Mol Cell, 2005. **18**(3): p. 263-72.
91. Mosammaparast, N. and Y. Shi, *Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases*. Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 155-79.
92. Baldwin, R.M., A. Morettin, and J. Cote, *Role of PRMTs in cancer: Could minor isoforms be leaving a mark?* World J Biol Chem, 2014. **5**(2): p. 115-129.
93. Ayrappetov, M.K., et al., *DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014.
94. Barski, A., et al., *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. Cell, 2007. **129**(4): p. 823-37.
95. Heintzman, N.D., et al., *Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression*. Nature, 2009. **459**(7243): p. 108-12.
96. Schneider, R., et al., *Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(1): p. 73-7.
97. Briggs, S.D., et al., *Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, 2001. **15**(24): p. 3286-95.
98. Nimura, K., et al., *A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx2-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome*. Nature, 2009. **460**(7252): p. 287-91.
99. Taverna, S.D., et al., *How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(11): p. 1025-40.
100. Dialynas, G.K., M.W. Vitalini, and L.L. Wallrath, *Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression*. Mutat Res, 2008. **647**(1-2): p. 13-20.
101. Wang, G.G., et al., *Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger*. Nature, 2009. **459**(7248): p. 847-51.
102. Shi, Y., et al., *Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1*. Cell, 2004. **119**(7): p. 941-53.
103. Tsukada, Y., et al., *Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins*. Nature, 2006. **439**(7078): p. 811-6.
104. Barford, D., A.K. Das, and M.P. Egloff, *The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1998. **27**: p. 133-64.

105. Baek, S.H., *When signaling kinases meet histones and histone modifiers in the nucleus*. Mol Cell, 2011. **42**(3): p. 274-84.
106. Cheung, W.L., et al., *Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase*. Cell, 2003. **113**(4): p. 507-17.
107. Baek, Sung H., *When Signaling Kinases Meet Histones and Histone Modifiers in the Nucleus*. Molecular Cell, 2011. **42**(3): p. 274-284.
108. Bungard, D., et al., *Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation*. Science, 2010. **329**(5996): p. 1201-5.
109. Metzger, E., et al., *Phosphorylation of histone H3T6 by PKCbeta(1) controls demethylation at histone H3K4*. Nature, 2010. **464**(7289): p. 792-6.
110. Stucki, M., et al., *MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks*. Cell, 2005. **123**(7): p. 1213-26.
111. Yang, X., et al., *Targeting 14-3-3zeta in cancer therapy*. Cancer Gene Ther, 2012. **19**(3): p. 153-9.
112. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 503-33.
113. Hochstrasser, M., *Ubiquitin-dependent protein degradation*. Annu Rev Genet, 1996. **30**: p. 405-39.
114. Pickart, C.M. and A.T. Vella, *Ubiquitin carrier protein-catalyzed ubiquitin transfer to histones. Mechanism and specificity*. J Biol Chem, 1988. **263**(29): p. 15076-82.
115. Finley, D., et al., *Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(8): p. 5501-9.
116. Goldknopf, I.L., et al., *Isolation and characterization of protein A24, a "histone-like" non-histone chromosomal protein*. J Biol Chem, 1975. **250**(18): p. 7182-7.
117. West, M.H. and W.M. Bonner, *Histone 2B can be modified by the attachment of ubiquitin*. Nucleic Acids Res, 1980. **8**(20): p. 4671-80.
118. Loewith, R. and M.N. Hall, *Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control*. Genetics, 2011. **189**(4): p. 1177-201.
119. Seto, B., *Rapamycin and mTOR: a serendipitous discovery and implications for breast cancer*. Clin Transl Med, 2012. **1**(1): p. 29.
120. Douros, J. and M. Suffness, *New antitumor substances of natural origin*. Cancer Treat Rev, 1981. **8**(1): p. 63-87.
121. Guba, M., et al., *Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor*. Nat Med, 2002. **8**(2): p. 128-35.
122. Heitman, J., et al., *FK 506-binding protein proline rotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(5): p. 1948-52.
123. Brown, E.J., et al., *A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex*. Nature, 1994. **369**(6483): p. 756-8.

124. Michnick, S.W., et al., *Solution structure of FKBP, a rotamase enzyme and receptor for FK506 and rapamycin*. Science, 1991. **252**(5007): p. 836-9.
125. Tanida, I., et al., *Yeast cyclophilin-related gene encodes a nonessential second peptidyl-prolyl cis-trans isomerase associated with the secretory pathway*. Transplant Proc, 1991. **23**(6): p. 2856-61.
126. Cafferkey, R., et al., *Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(10): p. 6012-23.
127. Faivre, S., G. Kroemer, and E. Raymond, *Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(8): p. 671-88.
128. Keith, C.T. and S.L. Schreiber, *PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints*. Science, 1995. **270**(5233): p. 50-1.
129. Kuruvilla, F.G. and S.L. Schreiber, *The PIK-related kinases intercept conventional signaling pathways*. Chem Biol, 1999. **6**(5): p. R129-36.
130. Brunn, G.J., et al., *Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin*. Science, 1997. **277**(5322): p. 99-101.
131. Burnett, P.E., et al., *RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1432-7.
132. Isotani, S., et al., *Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro*. J Biol Chem, 1999. **274**(48): p. 34493-8.
133. Schmelzle, T., S.B. Helliwell, and M.N. Hall, *Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(5): p. 1329-39.
134. Andrade, M.A. and P. Bork, *HEAT repeats in the Huntington's disease protein*. Nat Genet, 1995. **11**(2): p. 115-6.
135. Perry, J. and N. Kleckner, *The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins*. Cell, 2003. **112**(2): p. 151-5.
136. Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall, *TOR signaling in growth and metabolism*. Cell, 2006. **124**(3): p. 471-84.
137. Alarcon, C.M., J. Heitman, and M.E. Cardenas, *Protein kinase activity and identification of a toxic effector domain of the target of rapamycin TOR proteins in yeast*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(8): p. 2531-46.
138. Bosotti, R., A. Isacchi, and E.L. Sonnhammer, *FAT: a novel domain in PIK-related kinases*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(5): p. 225-7.
139. Heitman, J., N.R. Movva, and M.N. Hall, *Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast*. Science, 1991. **253**(5022): p. 905-9.
140. Helliwell, S.B., et al., *TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast*. Mol Biol Cell, 1994. **5**(1): p. 105-18.
141. Kunz, J. and M.N. Hall, *Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**(9): p. 334-8.

142. Barbet, N.C., et al., *TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(1): p. 25-42.
143. Hall, M.N., *The TOR signalling pathway and growth control in yeast*. Biochem Soc Trans, 1996. **24**(1): p. 234-9.
144. Helliwell, S.B., et al., *TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1998. **148**(1): p. 99-112.
145. Loewith, R., et al., *Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control*. Mol Cell, 2002. **10**(3): p. 457-68.
146. Reinke, A., et al., *TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14752-62.
147. Wedaman, K.P., et al., *Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(3): p. 1204-20.
148. Sturgill, T.W., et al., *TOR1 and TOR2 have distinct locations in live cells*. Eukaryot Cell, 2008. **7**(10): p. 1819-30.
149. Urban, J., et al., *Sch9 is a major target of TORC1 in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell, 2007. **26**(5): p. 663-74.
150. Beck, T. and M.N. Hall, *The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors*. Nature, 1999. **402**(6762): p. 689-92.
151. Kuranda, K., et al., *Investigating the caffeine effects in the yeast Saccharomyces cerevisiae brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways*. Mol Microbiol, 2006. **61**(5): p. 1147-66.
152. Binda, M., et al., *The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex*. Mol Cell, 2009. **35**(5): p. 563-73.
153. Kim, J. and K.L. Guan, *Amino acid signaling in TOR activation*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 1001-32.
154. Wullschleger, S., et al., *Molecular organization of target of rapamycin complex 2*. J Biol Chem, 2005. **280**(35): p. 30697-704.
155. Berchtold, D. and T.C. Walther, *TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(5): p. 1565-75.
156. Cybulski, N. and M.N. Hall, *TOR complex 2: a signaling pathway of its own*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(12): p. 620-7.
157. Berset, C., H. Trachsel, and M. Altmann, *The TOR (target of rapamycin) signal transduction pathway regulates the stability of translation initiation factor eIF4G in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4264-9.
158. Goyer, C., et al., *TIF4631 and TIF4632: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(8): p. 4860-74.

159. Cosentino, G.P., et al., *Eap1p, a novel eukaryotic translation initiation factor 4E-associated protein in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4604-13.
160. Zaragoza, D., et al., *Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(8): p. 4463-70.
161. Powers, T. and P. Walter, *Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(4): p. 987-1000.
162. Cardenas, M.E., et al., *The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients*. Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3271-9.
163. Hardwick, J.S., et al., *Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 14866-70.
164. Abraham, R.T. and G.J. Wiederrecht, *Immunopharmacology of rapamycin*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 483-510.
165. Benjamin, D., et al., *Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(11): p. 868-80.
166. Fingar, D.C. and J. Blenis, *Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression*. Oncogene, 2004. **23**(18): p. 3151-71.
167. Douville, J., et al., *The Saccharomyces cerevisiae phosphatase activator RRD1 is required to modulate gene expression in response to rapamycin exposure*. Genetics, 2006. **172**(2): p. 1369-72.
168. Jouvét, N., et al., *Rrd1 isomerizes RNA polymerase II in response to rapamycin*. BMC Mol Biol, 2010. **11**: p. 92.
169. Abe, T., et al., *The histone chaperone facilitates chromatin transcription (FACT) protein maintains normal replication fork rates*. J Biol Chem, 2011. **286**(35): p. 30504-12.
170. Birch, J.L., et al., *FACT facilitates chromatin transcription by RNA polymerases I and III*. Embo j, 2009. **28**(7): p. 854-65.
171. Hondele, M., et al., *Structural basis of histone H2A-H2B recognition by the essential chaperone FACT*. Nature, 2013. **499**(7456): p. 111-4.
172. Strickfaden, S.C., et al., *A mechanism for cell-cycle regulation of MAP kinase signaling in a yeast differentiation pathway*. Cell, 2007. **128**(3): p. 519-31.
173. Tyers, M. and B. Futcher, *Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(9): p. 5659-69.
174. Winters, M.J., et al., *A membrane binding domain in the ste5 scaffold synergizes with gbetagamma binding to control localization and signaling in pheromone response*. Mol Cell, 2005. **20**(1): p. 21-32.

175. Bardwell, L., *A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway*. Peptides, 2004. **25**(9): p. 1465-76.
176. Nakanishi, S., et al., *A comprehensive library of histone mutants identifies nucleosomal residues required for H3K4 methylation*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(8): p. 881-8.
177. Wang, C.Y., et al., *The C-terminus of histone H2B is involved in chromatin compaction specifically at telomeres, independently of its monoubiquitylation at lysine 123*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22209.
178. Longtine, M.S., et al., *Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1998. **14**(10): p. 953-61.
179. Chen, H., et al., *The histone H3 lysine 56 acetylation pathway is regulated by target of rapamycin (TOR) signaling and functions directly in ribosomal RNA biogenesis*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(14): p. 6534-46.
180. Wurtele, H., et al., *Histone H3 lysine 56 acetylation and the response to DNA replication fork damage*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(1): p. 154-72.
181. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
182. Dai, J., et al., *Yin and Yang of histone H2B roles in silencing and longevity: a tale of two arginines*. Genetics, 2010. **186**(3): p. 813-28.
183. Walter, D., A. Matter, and B. Fahrenkrog, *Loss of histone H3 methylation at lysine 4 triggers apoptosis in Saccharomyces cerevisiae*. PLoS Genet, 2014. **10**(1): p. e1004095.
184. Hondele, M., et al., *Structural basis of histone H2A-H2B recognition by the essential chaperone FACT*. Nature, 2013. **499**(7456): p. 111-114.
185. McCullough, L., et al., *Insight into the mechanism of nucleosome reorganization from histone mutants that suppress defects in the FACT histone chaperone*. Genetics, 2011. **188**(4): p. 835-46.
186. Malone, E.A., et al., *Mutations in SPT16/CDC68 suppress cis- and trans-acting mutations that affect promoter function in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(11): p. 5710-7.
187. Rowley, A., R.A. Singer, and G.C. Johnston, *CDC68, a yeast gene that affects regulation of cell proliferation and transcription, encodes a protein with a highly acidic carboxyl terminus*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(11): p. 5718-26.
188. Stevens, J.R., et al., *FACT, the Bur kinase pathway, and the histone co-repressor HirC have overlapping nucleosome-related roles in yeast transcription elongation*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25644.
189. Lamson, R.E., et al., *Dual role for membrane localization in yeast MAP kinase cascade activation and its contribution to signaling fidelity*. Curr Biol, 2006. **16**(6): p. 618-23.
190. Bardwell, L. and K. Shah, *Analysis of mitogen-activated protein kinase activation and interactions with regulators and substrates*. Methods, 2006. **40**(3): p. 213-23.

191. Baltanas, R., et al., *Pheromone-induced morphogenesis improves osmoadaptation capacity by activating the HOG MAPK pathway*. *Sci Signal*, 2013. **6**(272): p. ra26.
192. Lee, K.S., et al., *A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(5): p. 3067-75.
193. Martin, H., et al., *Molecular and functional characterization of a mutant allele of the mitogen-activated protein-kinase gene SLT2(MPK1) rescued from yeast autolytic mutants*. *Curr Genet*, 1996. **29**(6): p. 516-22.
194. Sussman, A., et al., *Discovery of cercosporamide, a known antifungal natural product, as a selective Pkc1 kinase inhibitor through high-throughput screening*. *Eukaryot Cell*, 2004. **3**(4): p. 932-43.
195. Tyers, M., G. Tokiwa, and B. Futcher, *Comparison of the Saccharomyces cerevisiae G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins*. *Embo j*, 1993. **12**(5): p. 1955-68.
196. Tessarz, P., et al., *Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification*. *Nature*, 2014. **505**(7484): p. 564-8.
197. Formosa, T., *The role of FACT in making and breaking nucleosomes*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1819**(3-4): p. 247-55.
198. Avvakumov, N., A. Nourani, and J. Cote, *Histone chaperones: modulators of chromatin marks*. *Mol Cell*, 2011. **41**(5): p. 502-14.
199. Schwartzenuber, J., et al., *Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma*. *Nature*, 2012. **482**(7384): p. 226-31.
200. Pope, P.A. and P.M. Pryciak, *Functional overlap among distinct G1/S inhibitory pathways allows robust G1 arrest by yeast mating pheromones*. *Mol Biol Cell*, 2013. **24**(23): p. 3675-88.
201. Bardwell, L., *A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway*. *Peptides*, 2005. **26**(2): p. 339-50.