



Université de Montréal

**Étude de la collaboration entre les facteurs de  
transcription hématopoïétiques lors du développement et  
de la différenciation des cellules érythroïdes**

par

Julie Ross

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en biologie moléculaire

novembre 2011

© Julie Ross, 2011

Université de Montréal  
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée:

Étude de la collaboration des facteurs de transcription lors du développement et de la  
différenciation des cellules érythroïdes

Présentée par :

Julie Ross

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Julie Lessard, président-rapporteur

Dr Éric Milot, directeur de recherche

Dr Tarik Möröy, membre du jury

Dr Marjorie Brand, examinateur externe

Dr Muriel Aubry, représentant du doyen de la FES

## Résumé

La régulation transcriptionnelle des gènes est cruciale pour permettre le bon fonctionnement des cellules. Afin que les cellules puissent accomplir leurs fonctions, les gènes doivent être exprimés adéquatement dans le bon type cellulaire et au stade de développement et de différenciation approprié. Un dérèglement dans l'expression de un ou plusieurs gènes peut entraîner de graves conséquences sur le destin de la cellule. Divers éléments en *cis* (ex : promoteurs et *enhancers*) et en *trans* (machinerie transcriptionnelle et facteurs de transcription) sont impliqués dans la régulation de la transcription.

Les gènes du locus humain  $\beta$ -globine (hu $\beta$ ) sont exprimés dans les cellules érythroïdes et sont finement régulés lors du développement et de la différenciation. Des mutations dans différentes régions du locus causent entre autres les  $\beta$ -thalassémies. Nous avons utilisé ce modèle bien caractérisé afin d'étudier différents mécanismes de régulation favorisés par les facteurs de transcription qui sont exprimés dans les cellules érythroïdes. Nous nous sommes intéressés à l'importance de l'élément en *cis* HS2 du *Locus control region*. Cet élément possède plusieurs sites de liaison pour des facteurs de transcription impliqués dans la régulation des gènes du locus hu $\beta$ . Nos résultats montrent que HS2 possède un rôle dans l'organisation de la chromatine du locus qui peut être dissocié de son rôle d'*enhancer*. De plus, HS2 n'est pas essentiel pour l'expression à haut niveau du gène  $\beta$  alors qu'il est important pour l'expression des gènes  $\gamma$ . Ceci suggère que le recrutement des différents facteurs au site HS2 lors du développement influence différemment les gènes du locus.

Dans un deuxième temps, nous avons investigué l'importance de HS2 lors de la différenciation des cellules érythroïdes. Il avait été rapporté que l'absence de HS2 influence grandement la potentialisation de la chromatine du gène  $\beta$ . La potentialisation dans les cellules progénitrices favorise l'activation transcriptionnelle du gène dans les cellules matures. Nous avons caractérisé le recrutement de différents facteurs de transcription au site HS2 et au promoteur  $\beta$  dans les cellules progénitrices hématopoïétiques (CPH) ainsi que dans les cellules érythroïdes matures. Nos résultats montrent que le facteur EKLF est impliqué dans la potentialisation de la chromatine et favorise le recrutement des facteurs BRG1, p45 et CBP dans les CPH. L'expression de GATA-1 dans les cellules érythroïdes

matures permet le recrutement de GATA-1 au locus hu $\beta$  dans ces cellules. Ces données suggèrent que la combinaison de EKLF et GATA-1 est requise pour permettre une activation maximale du gène  $\beta$  dans les cellules érythroïdes matures.

Un autre facteur impliqué dans la régulation du locus hu $\beta$  est Ikaros. Nous avons étudié son recrutement au locus hu $\beta$  et avons observé que Ikaros est impliqué dans la répression des gènes  $\gamma$ . Nos résultats montrent aussi que GATA-1 est impliqué dans la répression de ces gènes et qu'il interagit avec Ikaros. Ensemble, Ikaros et GATA-1 favorisent la formation d'un complexe de répression aux promoteurs  $\gamma$ . Cette étude nous a aussi permis d'observer que Ikaros et GATA-1 sont impliqués dans la répression du gène *Gata2*. De façon intéressante, nous avons caractérisé le mécanisme de répression du gène *Hes1* (un gène cible de la voie Notch) lors de la différenciation érythroïde. Similairement à ce qui a été observé pour les gènes  $\gamma$ , *Hes1* est aussi réprimé par Ikaros et GATA-1. Ces résultats suggèrent donc que la combinaison de Ikaros et GATA-1 est associée à la répression de plusieurs de gènes dans les cellules érythroïdes.

Globalement cette thèse rapporte de nouveaux mécanismes d'action de différents facteurs de transcription dans les cellules érythroïdes. Particulièrement, nos travaux ont permis de proposer un modèle pour la régulation des gènes du locus hu $\beta$  lors du développement et de la différenciation. De plus, nous rapportons pour la première fois l'importance de la collaboration entre les facteurs Ikaros et GATA-1 dans la régulation transcriptionnelle de gènes dans les cellules érythroïdes. Des mutations associées à certains des facteurs étudiés ont été rapportées dans des cas de  $\beta$ -thalassémies ainsi que de leucémies. Nos travaux serviront donc à avoir une meilleure compréhension des mécanismes d'action de ces facteurs afin de potentiellement pouvoir les utiliser comme cibles thérapeutiques.

**Mots-clés** :  $\beta$ -globine, facteurs de transcription, chromatine, cellules érythroïdes, *Hes1*, GATA-1, EKLF, NF-E2, Ikaros

## Abstract

Gene transcriptional regulation is crucial for appropriate cell functioning. Genes must be properly expressed in the right cell type as well as at the right developmental and differentiation stage in order to allow the cells to accomplish their functions. Abnormal expression of one or many genes can dramatically influence cell fate. Diverse *cis* (ex : promoters and enhancers) and *trans* (transcriptional machinery and transcription factors) elements are involved in transcriptional regulation.

Genes of the human  $\beta$ -globin ( $h\beta$ ) locus are expressed in erythroid cells and are tightly regulated during development and differentiation. Mutations in several regions of the locus are involved in  $\beta$ -thalassémia. We used this well characterized model in order to study different regulation mechanisms that are mediated by transcription factors expressed in erythroid cells. We were interested in the important role of the *cis* element HS2 from the Locus control region. This region contains several binding sites for transcription factors that are involved in  $h\beta$  locus gene regulation. Our results show that HS2 has a role in chromatin organization of the locus which is distinct from its enhancer function. Moreover, HS2 is not essential for high level  $\beta$  gene expression while it is important for  $\gamma$  gene expression. This suggest that the influence of transcription factors recruited to HS2 varies during development.

Secondly, we investigated HS2 importance during erythroid differentiation. It was reported the HS2 deletion strongly influences chromatin potentiation of  $\beta$  gene. Potentiation in progenitor cells favors gene transcriptional activation in mature cells. We characterized transcription factor recruitment to HS2 and  $\beta$  promoter in hematopoietic progenitor cells (HPC). Our results show that EKLF is involved in chromatin potentiation and favors the recruitment of BRG1, p45 and CBP in HPC. GATA-1 expression in mature erythroid cells allows GATA-1 recruitment to hub locus in these cells. These data suggest that EKLF and GATA-1 combination is required to allow maximal  $\beta$  gene activation in mature erythroid cells.

Another factor involved in hu $\beta$  locus regulation is Ikaros. We studied its recruitment to hu $\beta$  locus and found that Ikaros is involved in  $\gamma$  gene repression. Our data also shows that GATA-1 is involved in the repression of these genes and that it interacts with Ikaros. Together, Ikaros and GATA-1 favors the formation of a repressive complex to  $\gamma$  promoters. In this study, we also observed that Ikaros and GATA-1 are involved in *Gata2* gene repression. Interestingly, we have also characterized the repression mechanism of *Hes1* gene (a Notch target gene) during erythroid differentiation. Similar to what is observed for  $\gamma$  genes, *Hes1* is also repressed by Ikaros and GATA-1. Collectively, our data suggest that Ikaros and GATA-1 combination is associated with the repression of several genes in erythroid cells.

Globally, this thesis reports new mechanisms of action for different transcription factors in erythroid cells. Particularly, our work allows us to propose a model for hu $\beta$  locus gene regulation during development and differentiation. Moreover, we show for the first time that the combination of Ikaros and GATA-1 is relevant for gene regulation in erythroid cells. Several mutations in the transcription factors that we studied were associated with  $\beta$ -thalassemia or leukemia. Our work will thus help to better understand mechanisms of action of these transcription factors in order to potentially use them as therapeutical targets.

**Keywords** :  $\beta$ -globin, transcription factors, chromatin, erythroid cells, Hes1, GATA-1, EKLF, NF-E2, Ikaros

# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux .....	xvii
Liste des figures.....	xviii
Liste des abréviations .....	xxi
Remerciements .....	xxviii
Avant-propos .....	xxx
Chapitre 1 : Introduction .....	1
1.1 La cellule dans l'organisme.....	1
1.2 L'expression des gènes.....	2
1.3 Problématique.....	4
1.3.1 La régulation transcriptionnelle.....	4
1.3.2 Énoncé de la problématique .....	4
1.3.3 Cadre de l'étude.....	4
1.4 Hypothèse et objectif principal.....	5
1.5 Portée scientifique .....	6
1.6 Organisation de la thèse .....	6
 PARTIE I : MISE EN CONTEXTE.....	 10
Chapitre 2 : Cadre théorique.....	10
2.1 Revue de la littérature.....	10
2.1.1 Hématopoïèse .....	10
2.1.1.1 Sites de l'hématopoïèse lors du développement murin .....	11
2.1.1.2 Cellules hématopoïétiques.....	12
2.1.1.3 Engagement vers une lignée.....	15
2.1.1.4 Autorenewement, prolifération et différenciation.....	16
2.1.1.5 Hémopathies .....	18



2.1.2 Érythropoïèse.....	19
2.1.2.1 L'érythropoïèse primitive.....	19
2.1.2.2 L'érythropoïèse définitive.....	20
2.1.2.3 Principales voies de signalisation.....	22
2.1.2.3.1 Voie de l'érythropoïétine.....	23
2.1.2.3.2 Voie du Stem Cell Factor (SCF).....	25
2.1.2.3.3 Voies activées par d'autres cytokines.....	25
2.1.2.3.4 Voies apoptotiques.....	26
2.1.2.3.5 La voie Notch.....	27
2.1.2.4 Les globines.....	29
2.1.2.4.1 Le locus $\alpha$ -globine.....	32
2.1.2.4.2 Le locus $\beta$ -globine.....	33
2.1.2.5 Maladies des cellules érythroïdes.....	35
2.1.2.5.1 L'anémie.....	35
2.1.2.5.2 Maladie de Vaquez (Polycythemia vera; PV).....	37
2.1.2.5.3 Syndromes myélodysplasiques.....	37
2.1.2.5.4 Leucémies myéloïdes aiguës (LMA).....	37
2.1.3 Régulation transcriptionnelle dans les cellules érythroïdes.....	38
2.1.3.1 Principe général de la transcription chez les eucaryotes.....	38
2.1.3.1.1 L'ARN polymérase.....	38
2.1.3.1.2 La transcription par l'ARN polymérase II.....	39
2.1.3.1.3 Les éléments qui influencent la transcription.....	40
2.1.3.1.4 Les éléments de régulation en cis.....	41
2.1.3.1.5 Les facteurs et cofacteurs de transcription.....	44
2.1.3.2 Facteurs de transcription dans les cellules érythroïdes.....	45
2.1.3.2.1 GATA-1.....	47
2.1.3.2.2 KLF1/EKLF.....	49
2.1.3.2.3 IKZF1/Ikaros.....	50
2.1.3.2.4 NF-E2.....	51
2.1.3.3 Cofacteurs de transcription dans les cellules érythroïdes.....	51

2.1.3.3.1 Les enzymes qui modifient la chromatine.....	53
2.1.3.3.2 Enzymes ayant une activité ATPase.....	54
2.1.3.3.3 Autres cofacteurs n'ayant aucune activité enzymatique connue.....	55
2.1.3.4 Importance de la combinaison de facteurs dans la régulation transcriptionnelle.....	55
2.1.3.4.1 Spécificité des complexes transcriptionnels.....	55
2.1.3.4.2 Complexes d'activation dans les cellules érythroïdes.....	56
2.1.3.4.3 Complexes de répression dans les cellules érythroïdes.....	57
2.1.4 Régulation épigénétique.....	60
2.1.4.1 La chromatine.....	61
2.1.4.1.1 Les histones.....	63
2.1.4.1.2 Modifications post-traductionnelles des histones.....	65
2.1.4.1.3 Remodelage de la chromatine.....	69
2.1.4.1.4 Les chaperonnes d'histones.....	70
2.1.4.1.5 Méthylation de l'ADN.....	70
2.1.4.1.6 Mécanismes de formation des types de chromatine.....	71
2.1.4.2 Modulation de la chromatine lors de la différenciation et du développement.....	73
2.1.4.2.1 La chromatine lors de la différenciation.....	73
2.1.4.2.2 La chromatine lors du développement.....	74
2.1.4.3 Effet de positionnement.....	75
2.2 Problématique.....	77
2.1.1 Les facteurs de transcription dans les maladies hématopoïétiques.....	78
2.2.2 Thérapies pour les différents désordres hématopoïétiques.....	78
2.3 Hypothèses et objectifs.....	79
2.3.1 Hypothèse.....	79
2.3.2 Objectif 1 : caractérisation d'un élément de régulation en <i>cis</i> .....	79
2.3.3 Objectif 2 : caractérisation du rôle des facteurs de transcription dans des cellules progénitrices hématopoïétiques.....	80

2.3.4 Objectif 3 : caractérisation du rôle des facteurs de transcription lors de la commutation des globines .....	81
2.3.5 Objectif 4 : Caractérisation des mécanismes de répression impliquant Ikaros à d'autres gènes dans les cellules érythroïdes .....	81
2.4 Limitations de l'étude.....	82
2.4.1 Utilisation de modèles murins .....	83
2.4.2 Utilisation de modèles cellulaires.....	84
2.4.3 Caractérisation d'un petit nombre de gènes .....	84
Chapitre 3 : Cadre expérimental.....	86
3.1 Conception de l'étude.....	86
3.2 Modèles .....	87
3.2.1 Souris.....	87
3.2.1.1 Les souris transgéniques.....	88
3.2.1.1.1 Le locus huβ .....	89
3.2.1.2 Souris déficiente pour un gène (souris <i>knock-out</i> ) .....	90
3.2.1.2.1 Souris déficiente pour EKLF.....	90
3.2.1.2.2 Souris déficiente pour p45.....	91
3.2.1.2.3 Souris déficiente pour Ikaros.....	91
3.2.2 Cellules en culture .....	91
3.2.2.1 Cellules <i>Mouse erythroleukemia</i> (MEL).....	92
3.2.2.2 Cellules GATA-1-erythroid-Estrogen receptor (G1E-ER) .....	93
3.2.2.3 Cellules transgéniques.....	93
3.3 Revue des méthodes .....	94
3.3.1 Détection des ARN messagers .....	94
3.3.2 Étude de la chromatine .....	95
3.3.3 Réaction de polymérisation en chaîne ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ; PCR).....	96
3.3.4 Co-Immunoprécipitation (co-IP).....	96
3.3.5 Marquage cellulaire.....	96

PARTIE II : RÉSULTATS.....	97
Chapitre 4 : Caractérisation d'un élément de régulation en cis.....	98
Article 1: Differential requirement of a distal regulatory region for pre-initiation complex formation at globin gene promoters .....	99
4.1 Abstract .....	100
4.2 Introduction .....	100
4.3 Results .....	103
4.3.1 Globin gene expression in ln2 and $\Delta$ 2B yolk sac EryC .....	103
4.3.2 PIC formation and long-range chromatin interactions at the hu $\beta$ -like globin locus in ln2 and $\Delta$ 2B yolk sac EryC .....	107
4.3.3 PIC formation and long-range chromatin interactions at the hu $\beta$ -globin locus in ln2 and $\Delta$ 2B fetal liver EryC .....	110
4.3.4 Chromatin organization at the hu $\beta$ -globin locus in yolk sac and fetal liver EryC .....	114
4.3.5 Characterization of a $\Delta$ 2B EryC subpopulation expressing the hu $\beta$ -globin gene .....	118
4.4 Discussion .....	121
4.4.1 Influence of HS2 deletion on hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -gene transcriptional enhancement .....	122
4.4.2 HS2 affects human $\beta$ -like globin genes differentially and is involved in locus chromatin organization.....	124
4.5 Materials and methods.....	126
4.5.1 Transgenic mouse lines .....	126
4.5.2 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and quantitative Real-Time PCR (qPCR) assays.....	126
4.5.3 Quantitative RT-PCR (RT-qPCR).....	127
4.5.4 RNA-Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (FISH) .....	128
4.5.5 DNaseI sensitivity assay.....	128
4.5.6 Chromosome conformation capture (3C).....	128
4.5.7 Hemoglobin staining .....	128

4.6 Acknowledgments and funding.....	129
4.7 References .....	130
4.8 Supplementary data.....	138
Chapitre 5 : Caractérisation du rôle des facteurs de transcription dans des cellules progénitrices hématopoïétiques.....	144
Article 2: Lineage-specific activators affect $\beta$ -globin locus chromatin in multipotent hematopoietic progenitors .....	145
5.1 Abstract .....	146
5.2 Introduction .....	146
5.3 Results .....	149
5.3.1 HPC purification and characterization .....	149
5.3.2 Transcriptional activators recruitment at the hu $\beta$ -globin locus in HPC.....	152
5.3.3 Recruitment of histone modifying and chromatin remodeling activities at the hu $\beta$ -globin locus in HPC .....	155
5.3.4 Transcription preinitiation complex assembly and globin gene potentiation in HPC .....	158
5.3.5 Basal levels of globin gene expression in HPC.....	159
5.3.6 Chromatin organization at the hu $\beta$ -globin locus in EryC .....	160
5.3.7 Pol II phosphorylation and transcriptional elongation .....	161
5.4 Discussion .....	163
5.4.1 Transcriptional activators involved in globin gene potentiation in HPC .....	163
5.4.2 TBP and Pol II association to the hu $\beta$ -globin locus in HPC .....	167
5.4.3 Chromatin organization of the hu $\beta$ -globin locus in EryC .....	168
5.5 Materials and methods.....	169
5.5.1 Mouse transgenic lines .....	169
5.5.2 HPC purification and cell culture .....	169
5.5.3 Chromatin immunoprecipitation and duplex PCR analyses.....	169
5.5.4 Reverse Transcriptase PCR and quantitative real-time PCR .....	170
5.6 Acknowledgments and funding.....	170
5.7 Rferences .....	171

5.8 Supplementary data .....	178
Chapitre 6 : Caractérisation du rôle des facteurs de transcription lors de la commutation des globines .....	185
Article 3: Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human $\gamma$ -globin genes.....	186
6.1 Abstract .....	187
6.2 Introduction .....	187
6.3 Results .....	190
6.3.1 Ikaros binds to the hu $\beta$ -globin locus in erythroid cells .....	190
6.3.2 Ikaros modulates HDAC1, BRG1, and Mi-2 recruitment to specific regions of the hu $\beta$ -globin locus.....	195
6.3.3 Ikaros modulates GATA-1 binding at specific sites across the hu $\beta$ -globin locus .....	197
6.3.4 Ikaros contributes to hu $\gamma$ -gene silencing at the time of $\gamma$ -to- $\beta$ globin switching while precluding efficient interaction between $\beta$ LCR and hu $\gamma$ -promoters .....	202
6.4 Discussion .....	205
6.4.1 Ikaros-GATA-1 protein interaction.....	205
6.4.2 Recruitment of Ikaros, GATA-1, FOG-1, Mi-2, and HDAC1 to hu $\gamma$ -promoters at the time of $\gamma$ -to- $\beta$ globin switching .....	207
6.4.3 Ikaros and chromatin looping.....	210
6.5 Materials and methods.....	212
6.5.1 Mouse transgenic lines .....	212
6.5.2 Wright-Giemsa staining .....	213
6.5.3 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and real-time PCR (qPCR) analyses ..	213
6.5.4 Generation of epitope-tagged Ikaros-expressing K562 cells.....	214
6.5.5 Protein immunoprecipitation (IP).....	214
6.5.6 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	215
6.5.7 Chromosome conformation capture (3C).....	215
6.5.8 Semi-quantitative RT-PCR.....	217

6.5.9 Nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assays (EMSA) .....	217
6.6 Acknowledgments and funding .....	218
6.7 References .....	218
Chapitre 7 : Caractérisation des mécanismes de répression impliquant Ikaros à d'autres gènes dans les cellules érythroïdes .....	226
Article 4 : GATA-1-mediated <i>Hes1</i> repression is required for terminal erythroid differentiation .....	227
7.1 Abstract .....	228
7.2 Introduction .....	228
7.3 Results .....	232
7.3.1 Downregulation of <i>Hes1</i> promotes erythroid differentiation .....	232
7.3.2 Notch1 activation of <i>Hes1</i> gene in erythroid cells .....	235
7.3.3 Ikaros is involved in <i>Hes1</i> gene regulation in erythroid cells .....	237
7.3.4 Ikaros favours GATA-1-associated <i>Hes1</i> repression .....	241
7.3.5 EZH2 recruitment to <i>Hes1</i> promoter is GATA-1-dependant .....	245
7.3.6 Ikaros is required for GFI1B recruitment to <i>Hes1</i> promoter .....	248
7.4 Discussion .....	250
7.4.1 Expression levels of <i>Hes-1</i> and erythroid terminal differentiation .....	251
7.4.2 <i>Hes1</i> gene regulation by Ikaros and GATA-1 in EryC .....	252
7.4.3 Chromatin organization and <i>Hes1</i> gene regulation .....	254
7.4.4 <i>Hes1</i> in erythroid differentiation and diseases .....	255
7.5 Materials and methods .....	256
7.5.1 Mouse line .....	256
7.5.2 Cell line .....	257
7.5.3 Wright-Geimsa .....	258
7.5.4 Diaminofluorene and benzidine staining .....	258
7.5.5 RT-PCR and quantitative RT-PCR .....	258
7.5.6 Western blot analysis and protein immunoprecipitation .....	259
7.5.7 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay and quantitative Real-Time PCR assay .....	260

	xv
7.5.8 Cell sorting .....	261
7.5.9 COS-7 cell transfection .....	262
7.6 Acknowledgments and funding .....	262
7.7 References .....	262
7.8 Supplementary data .....	281
PARTIE III : DISCUSSION ET CONCLUSION .....	290
Chapitre 8 : Discussion générale des résultats .....	291
8.1 L'importance de la collaboration entre les facteurs de transcription .....	291
8.1.1 Modèle proposé pour l'activation des gènes du locus hu $\beta$ lors du développement et de la différenciation .....	291
8.1.1.1 Régulation des gènes $\gamma$ lors du développement .....	292
8.1.1.2 Régulation des gènes $\beta$ lors de la différenciation .....	294
8.1.1.3 Modèle proposé .....	296
8.1.2 Modes de régulation des gènes dans les cellules érythroïdes par Ikaros et GATA- 1 .....	298
8.1.3 Implication de la combinaison spécifique de facteurs de transcription .....	299
8.2 Pertinence de l'étude .....	300
8.2.1 Pertinence dans le domaine de recherche .....	301
8.2.1.1 Études du locus hu $\beta$ .....	301
8.2.1.2 Étude des facteurs de transcription à d'autres gènes .....	304
8.2.2 Thérapies visant à corriger une expression anormale des gènes .....	304
Chapitre 9 : Conclusion .....	306
9.1 Conclusions générales .....	306
9.2 Futur du domaine de recherche .....	306
9.3 Perspectives de recherche .....	307
Bibliographie .....	309
Annexe I .....	xxx
Article 5 : Ikaros interacts with P-TEFb and cooperates with GATA-1 to enhance transcription elongation .....	xxxi



	xvi
Abstract .....	xxxii
Introduction .....	xxxii
Results .....	xxxv
Discussion .....	liv
Materials and methods.....	lx
Acknowledgments and funding.....	lxiii
References .....	lxiii
Supplementary data .....	lxxii

## Liste des tableaux

Tableau 1.1. Contribution aux différents articles présentés dans la thèse.....	8
Tableau 2.1. Liste non-exhaustive des facteurs de transcription exprimés dans les cellules érythroïdes ainsi que leur partenaires connus.....	46
Tableau 2.2 Exemples d'enzymes méthyltransférases et leur spécificité .....	68
Tableau 2.3 Exemples d'enzymes qui modulent le PEV .....	76
Table 5.1: Clonal assays in methylcellulose: 150 HPC purified from 13.5 dpc ln2 or ln2 EKLF <sup>-/-</sup> fetal livers were plated onto methylcellulose plates. ....	149
Supplementary Table 7.1. Sequences of oligonucleotides used for RT-PCR analysis .....	288
Supplementary Table 7.2. Sequences of oligonucleotides used for ChIP analysis .....	289

## Liste des figures

Figure 1.1 Rôle central de la cellule dans la fonction d'un tissu.....	1
Figure 2.1. Sites de l'hématopoïèse primitive et définitive.....	12
Figure 2.2. Représentation simplifiée de l'hématopoïèse définitive.....	14
Figure 2.3. Types de divisions cellulaires dans le système hématopoïétique.....	17
Figure 2.4. Différentiation érythroïde au sein de l'îlot érythroblastique.....	22
Figure 2.5. La voie de l'érythropoïétine.....	24
Figure 2.6. La voie Notch.....	28
Figure 2.7. L'hémoglobine et les loci de globines.....	31
Figure 2.8. Interrelation entre les différents éléments qui influencent la transcription par l'ARN polymérase II.....	41
Figure 2.9. Version simplifiée des différents modèles proposés pour l'activation des gènes du locus hu $\beta$ par le LCR.....	43
Figure 2.10. Le <i>GATA-switch</i> .....	48
Figure 2.11. La répression des gènes par les complexes polycomb.....	59
Figure 2.12 La fibre de chromatine et le nucléosome.....	65
Figure 3.1 Résumé des différents modèles utilisés pour répondre aux différents objectifs.	87
Figure 4.1. HS2 deletion affects PIC formation at hu $\gamma$ -promoters and long-range interactions among LCR and hu $\gamma$ -globin genes in e10.5 EryC.....	105
Figure 4.2. Transcription factor and co-factor recruitment at the hu $\beta$ -globin locus in ln2 and $\Delta$ 2B e10.5 EryC.....	109
Figure 4.3. HS2 deletion affects PIC formation at hu $\beta$ -like globin gene promoters and long-range chromatin interactions between LCR and hu $\beta$ -like globin genes in e12.5 EryC.....	111
Figure 4.4. Transcription factor and co-factor recruitment at the hu $\beta$ -globin locus in ln2 and $\Delta$ 2B e12.5 EryC.....	113
Figure 4.5. Effect of HS2 deletion on hu $\beta$ -globin locus chromatin organization in e10.5 EryC.....	115

Figure 4.6. Effect of HS2 deletion on hu $\beta$ -globin locus chromatin organization in e12.5 EryC.....	117
Figure 4.7. HS2 deletion specifically affects hu $\gamma$ -globin gene expression and chromatin organization in HbA <sup>+</sup> e12.5 EryC .....	120
Figure S4.1 Supplementary method .....	138
Figure S4.3. Chromatin organization at the hu $\beta$ -globin locus in e10.5 and e12.5 $\Delta$ 2C EryC .....	143
Figure 5.1: Expression of marker genes in ln2 HPC and ln2 EKLF <sup>-/-</sup> HPC.....	151
Figure 5.2: Histone H3 acetylation, GATA-1, and p45 recruitment at the hu $\beta$ -globin locus in HPC. ....	154
Figure 5.3: CBP, BRG1, TBP, and Pol II recruitment at the hu $\beta$ -globin locus in HPC. ....	157
Figure 5.4: Quantitative real-time RT-PCR of ln2 HPC and ln2 EKLF <sup>-/-</sup> HPC.....	159
Figure 5.5: Chromatin organization at the hu $\beta$ -globin locus in EryC.....	162
Figure 5.6 Model of hu $\beta$ -globin gene potentiation in ln2 HPC. ....	166
Supplementary Figure 5.1A. p45, EKLF, and hu $\beta$ -globin gene expression in ln2 HPC and ln EryC. ....	178
Supplementary Figure 5.1B. Specificity of anti-GATA-1, -p45, -EKLF, and -actin antibodies evaluated by western blot analyses. ....	178
Supplementary Figure 5.2. Histone acetylation in ln2 and ln2 EKLF <sup>-/-</sup> HPC.....	179
Supplementary Figure 5.3. ChIP assays in ln2 HPC and ln2 EKLF <sup>-/-</sup> HPC.....	180
Supplementary Figure 5.4. Histone H3 acetylation, CBP and TBP recruitment at the hu $\beta$ -promoter in ln2 HPC and ln2 p45 <sup>-/-</sup> HPC. ....	181
Supplementary Figure 5.5. Pol II recruitment at $\beta$ maj promoter in ln2 and ln2 EKLF <sup>-/-</sup> cells. ....	182
Supplementary Figure 5.6. Morphological analysis of 13.5 dpc mouse fetal livers. ....	183
Supplementary Figure 5.7. ChIP assays in ln2 EryC and ln2 EKLF <sup>-/-</sup> EryC. ....	183
Supplementary Figure 5.8. Hu $\beta$ - and $\beta$ maj-gene expression in ln2 EryC and ln2 p45 <sup>-/-</sup> EryC.....	184
Figure 6.1: Morphological analysis of ln2 and ln2-Ik <sup>null</sup> fetal livers.....	191

Figure 6.2: Ikaros recruitment to the human $\beta$ -globin locus in ln2 and ln2-Ik <sup>null</sup> 12.5 dpc fetal liver cells. ....	193
Figure 6.3: Binding of Ikaros to exon1-intron 1 junction of hu $\gamma$ -globin genes.....	195
Figure 6.4: Recruitment of chromatin modifying and remodeling activities to the human $\beta$ -globin locus in ln2 and ln2-Ik <sup>null</sup> 12.5 dpc fetal liver cells.....	196
Figure 6.5: Ikaros-GATA-1 interaction.....	199
Figure 6.6: Ikaros and GATA-1 recruitment to the GATA-2 IG promoter in ln2 and ln2-Ik <sup>null</sup> 12.5 dpc fetal liver cells.....	201
Figure 6.7: Physical proximity between $\beta$ LCR and globin gene promoters in ln2 and ln2-Ik <sup>null</sup> 12.5 dpc fetal liver cells.....	204
Figure 6.8: Model of hypothetical Ikaros-dependent repressosome nucleation leading to hu $\gamma$ -gene repression at the time of $\gamma$ -to- $\beta$ globin switching. ....	208
Figure 7.1. <i>Hes1</i> influence on MEL cell differentiation. ....	234
Figure 7.2. <i>Hes1</i> promoter organization in MEL cells.....	236
Figure 7.3. Ikaros involvement in erythroid differentiation of 14.5 dpc fetal liver EryC. .	239
Figure 7.4. GATA1 involvement in <i>Hes1</i> promoter repression in erythroid cells.....	243
Figure 7.5. Regulation of <i>Hes1</i> promoter by EZH2 in EryC. ....	247
Figure 7.6. EZH2-GFI1B interaction .....	249
Figure S7.1. <i>Hes1</i> influence on MEL cell differentiation. ....	281
Figure S7.2. <i>Hes1</i> promoter organisation in MEL cells.....	282
Figure S7.3. Conserved transcription factor binding sites in <i>Hes1</i> promoter. ....	283
Figure S7.4. Factor recruitment to <i>Hes1</i> promoter in 14.5 dpc fetal liver cells.....	284
Figure S7.5. GATA-1 influence on gene expression and <i>Hes1</i> promoter organization in G1E-ER4 cells.....	285
Figure S7.6. Immunoprecipitations of GATA-1-ER and PRC2 components. ....	286
Figure S7.7. Controls for chromatin immunoprecipitations.....	287
Figure 8.1. Résumé de l'activation des gènes du locus hu $\beta$ lors de la différenciation et du développement.....	297

## Liste des abréviations

A :	base nucléotidique adénosine
ABL :	tyrosine kinase ABL
Ac :	acétylation d'un résidu polaire chargé ou d'une protéine (ex : AcH3 = acétylation de l'histone H3)
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AGM :	région Aorte gonades mésonéphros
AKT :	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene</i> (sérine thréonine kinase)
ALAS :	<i>Aminolevulinate synthase</i>
AML1 :	<i>runt-related transcription factor 1</i> (RUNX1)
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ARNr :	ARN ribosomal
ARNt :	ARN de transfert
ATP :	Adénosine triphosphate
Bach1 :	<i>BTB and CNC homology 1</i>
BAF57, 155 :	<i>BRG1 associated factor 57, 155</i>
BCL2 :	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCL11A :	<i>B-cell CLL/lymphoma 11A</i>
BCL-XL :	<i>B-cell lymphoma-extra-large; BCL2-like 1</i>
BCR :	<i>breakpoint cluster region</i>
bHLH :	<i>basic helix-loop-helix</i>
Bmi-1 :	<i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1</i>
BRG1 :	<i>brahma-related gene 1; Smarca4 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4)</i>
bZip :	<i>basic zipper</i>
C :	base nucléotidique cytosine
c.-à-d. :	c'est-à-dire
CBP :	<i>CREB binding protein</i> (Crebbp)

CDK9 :	<i>cyclin-dependent kinase 9</i>
CH <sub>3</sub> :	Groupement méthyle
CHD, CHD4 :	<i>chromodomain helicase/ATPase DNA-binding</i> , 4
ChIP :	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i> ; Immunoprecipitation de chromatine
ChIP-Seq :	<i>chromatin immunoprecipitation-sequencing</i>
CpG :	dinucléotide cytosine phosphoryé-guanine
CPI :	Complexe de pré-initiation de la transcription
CSH :	Cellule souche hématopoïétique
CTD :	<i>C-Terminal domain</i> ; Domaine C-Terminal de la Pol II
DNMT1, 3 :	<i>DNA methyltransferase</i> 1, 3
e :	jour embryonnaire (ex : e10.5 = jour embryonnaire 10.5)
ECFC :	<i>Erythroid colony forming cells</i>
Epo :	Érythropoïétine
EpoR :	Recepteur de l'érythropoïétine
E-RC1 :	<i>Erythroid remodeling complex 1</i>
EryD :	Cellules érythroïdes définitives
EryP :	Cellules érythroïdes primitives
ETS :	<i>E-twenty six</i>
FDCP-Mix :	<i>Factor dependant cell progenitor-Mix</i>
FGT :	Facteurs généraux de transcription
FOG1 :	<i>Friend of GATA-1</i>
G :	base nucléotidique guanine
G1E-ER2, 4 :	<i>GATA-1 erythroid-estrogen receptor</i> 2, 4
GLU :	acide aminé acide glutamique
H2A :	Histone H2A
H2A.X, H2A.Z :	Variants de l'histone H2A
H2B :	Histone H2B
H3 :	Histone H3
H3.3 :	Variant de l'histone H3
H4 :	Histone H4

HDAC1, HDAC2 :	<i>Histone deacetylase 1, 2</i>
Hes1 :	<i>Hairy-enhancer of split 1</i>
HIF2 $\alpha$ :	<i>Hypoxia inducible factor 2<math>\alpha</math></i>
HS :	<i>Hypersensitive site</i> ; site hypersensible à la DNaseI
HS2, HS3 :	<i>Hypersensitive site 2, 3</i>
hu $\beta$ :	Locus humain $\beta$ -globine
ICN :	<i>Intracellular domain of Notch</i> ; sous-unité intracellulaire de Notch
IGF1 :	<i>Insulin-like Growth factor 1</i>
IL-3, IL-6 IL-7:	Interleukine 3, 6, 7
JAK2 :	<i>Janus Kinase 2</i>
K4, 9, 20, 27, 36, 79 :	lysine 4, 9, 20, 27, 36, 79
Kb :	kilobase
kDa :	kiloDalton
KLF1 :	<i>Kruppel-like factor 1</i> (EKLF : <i>erythroid kruppel-like factor</i> )
LAD :	<i>lamina associated domain</i>
LAE :	Leucémie érythroïde aigüe
LCR :	<i>Locus Control Region</i>
LMA :	Leucémie myéloïde aigüe
LZ :	<i>leucine zipper</i>
MAPK :	<i>Mitogen associated protein kinase</i>
MARE :	<i>Maf recognition elements</i>
MBD :	<i>methyl binding domain protein</i>
Me :	méthylation d'un résidu polaire chargé (ex: K4Me = lysine 4 méthylée)
Me1, 2, 3 :	mono, bi, triméthylation
MEL :	<i>Mouse erythroleukemia</i>
SWI/SNF :	<i>switch-sucrose nonfermentable</i>
NK :	<i>Natural Killer cells</i>
NURD :	<i>nucleosome remodeling and deacetylase</i>
O <sub>2</sub> :	Oxygène
PEV :	<i>Position effect variegation</i>



PHbF :	Persistance de l'hémoglobine foetale
PIC :	<i>Preinitiation complex</i>
PMC :	Progéniteur myéloïde commun
PML :	Progéniteur avec un potentiel restreint myéloïde/lymphoïde
PMP :	Progéniteur multipotent
Pol II :	ARN Polymérase II
PRC1, PRC2 :	<i>Polycomb repressive complex 1, 2</i>
PRMT :	<i>protein arginine methyltransferase</i>
P-TEFb :	<i>positive transcription elongation factor b</i>
PV :	<i>Polycythemia vera</i>
PYR :	<i>Pyrimidin rich</i> ; région riche en résidus pyrimidines
Sca-1 :	<i>Stem cell antigen 1</i>
SCF :	<i>Stem cell factor</i>
T :	base nucléotidique Tyrosine
TAF1,3 :	TBP-associated factor 1, 3
TBP :	<i>TATA-binding protein</i>
TFIIA, B, C, D, E, F, G, H :	Facteur général de transcription de la Pol II A, B, C, D, E, F, G, H
VAL :	acide aminé valine
vs :	versus
FT :	facteur de transcription
3C :	capture de conformation chromosomique
FISH :	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> (hybridation <i>in situ</i> )
Co-IP :	co-immunoprécipitation
RT-PCR:	<i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
Ln2 :	<i>line 2</i>
DMEM:	<i>Dulbecco modified Eagle's medium</i>
DMSO:	dimethyl-sulfoxyde
HMBA:	N,N'-Hexaméthylènebisacétamide
UV:	rayons ultra-violets

ADNc:      ADN complémentaire

*À mes amours*

*« C'est une immense ambition  
d'explorer aussi loin que possible  
la nature, la vie l'humain. »*

*- Claude Détraz*

## Remerciements

L'accomplissement de tout ce travail a été possible grâce à l'implication de nombreuses personnes. J'aimerais ici souligner l'importance de la contribution de chacun, en espérant n'oublier personne...

Merci au Dr Éric Milot de m'avoir accueilli dans son laboratoire en tout premier lieu. Merci pour sa confiance, son encadrement, son dévouement, son encouragement, sa compréhension et son support.

Merci au Dr Stefania Bottardi qui a été un mentor remarquable. Merci pour sa confiance, son respect et son dévouement.

Merci à Vincent Bourgoïn pour son aide, sa patience et son écoute.

Merci à Lionel Mavoungou qui m'a donné un sérieux coup de pouce pour le dernier droit de cette thèse.

Merci à tous les autres membres passés et présents du laboratoire Milot pour leur contribution de près ou de loin aux différents projets qui constituent cette thèse. Particulièrement, j'aimerais souligner les différents coauteurs de mes articles : Alex Wollenschlaeger, Natacha Pierre-Charles, Dr Nasser Fotouhi-Ardakani et Farah Zmiri.

Merci aux différents chercheurs du centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont qui m'ont appuyé ou avec qui j'ai eu la chance de collaborer. Particulièrement, merci au Dr Elliot Drobetsky, au Dr El Bachir Affar, au Dr Denis-Claude Roy, Dr Josée Hébert, Dr Giovanni D'Angelo, au Dr Nathalie Labrecque, au Dr Gilbert Bernier, au Dr Euridice Carmona et au Dr Janetta Bijl. J'aimerais aussi souligner la disponibilité et la générosité des différents membres passés et présents de ces laboratoires.

Merci au personnel des différents services du centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Particulièrement, merci à Sophie Ouellette, Nathalie Henley et Martine Dupuis (FACS); merci au personnel du département d'hématologie spéciale de HMR; et merci au personnel de l'animalerie.

Merci aux différents chercheurs provenant d'autres centres de recherche qui ont participé à mon cheminement académique ou avec qui nous avons collaboré. Particulièrement, merci au Dr Richard Bertrand, au Dr Marie Trudel et au Dr Volker Blank.

J'aimerais souligner spécialement l'importance des membres du jury qui ont pris le temps de corriger cette thèse et qui ont aussi participé à certains de mes comités de suivi : Dr Julie Lessard, Dr Tarik Möröy et Dr Marjorie Brand.

Merci aux différentes institutions qui m'ont supporté financièrement par des bourses ou des prix : la fondation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, les programmes de biologie moléculaire de l'Université de Montréal et le Fond de la recherche en santé du Québec.

Merci à mon conjoint François Marcoux qui m'a accompagné dans ce projet depuis le jour un et qui a su montrer une patience et une compréhension sans borne.

Merci à ma famille et belle-famille pour le support et la compréhension. Un merci particulier à mes parents pour le support financier et moral.

Merci à mes amis, scientifiques ou non, qui m'ont permis de conserver un équilibre au cours de ces années de doctorat.

## **Avant-propos**

« Every 4 minutes one person is diagnosed with a blood cancer. [...] Every ten minutes, someone dies from a blood cancer. »

- The Leukemia & Lymphoma Society

« On estime qu'il naît chaque année dans le monde, et en majorité dans les pays à revenu faible ou moyen, plus de 300 000 enfants présentant une forme grave d'hémoglobinopathie. »

- Organisation mondiale de la santé

« Des citoyens en meilleure santé, voilà l'objectif ultime du système de recherche en santé au Québec. »

- Fond de la recherche en santé du Québec

# Chapitre 1 : Introduction

## 1.1 La cellule dans l'organisme

La cellule est l'élément constitutif des différents tissus de l'organisme (Figure 1.1). Chaque cellule possède une ou des fonctions bien spécifiques qui sont hautement régulées à divers niveaux. Plusieurs processus permettent à la cellule d'accomplir ses différents destins en réponse à son environnement ainsi qu'aux variations intracellulaires. Lorsqu'un de ces processus fonctionne de façon anormale, la cellule tente de rétablir l'équilibre. Il arrive malheureusement que ce dérèglement cellulaire modifie le destin ou la fonction de la cellule. S'en suit un déséquilibre dans le tissu et très souvent une pathologie.

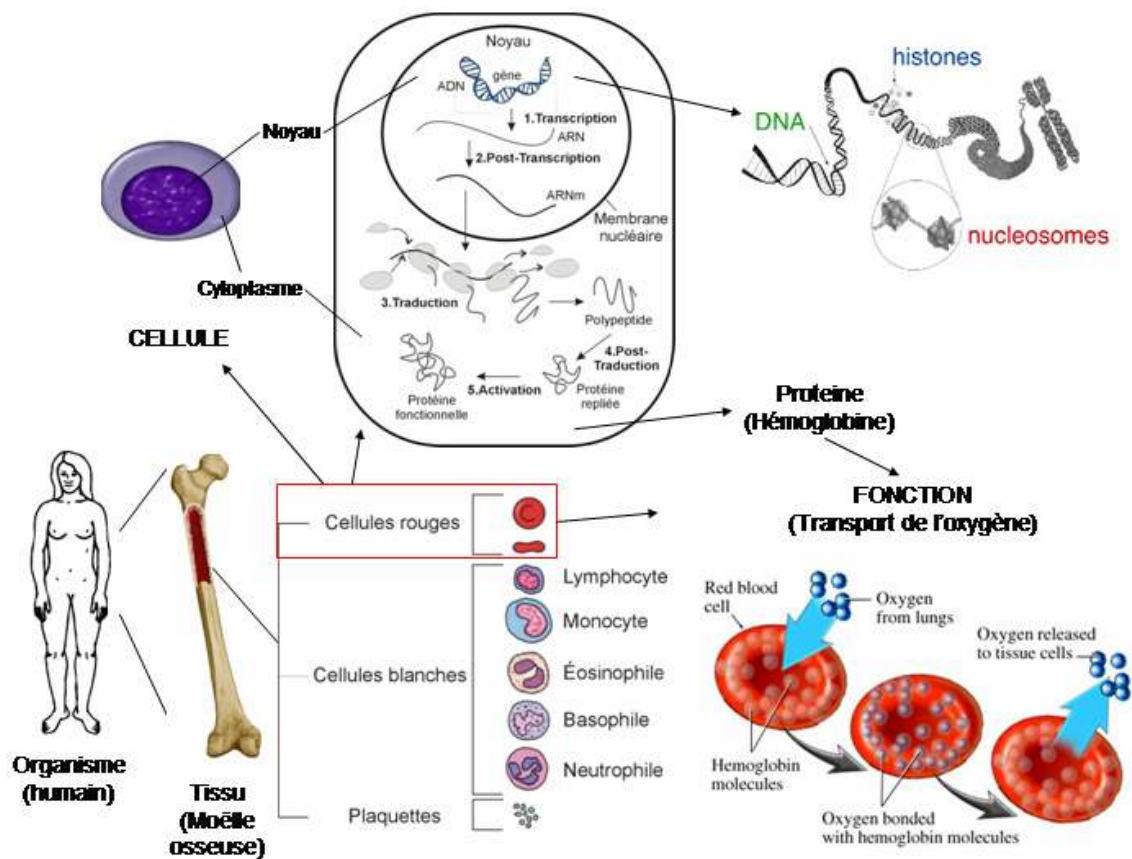


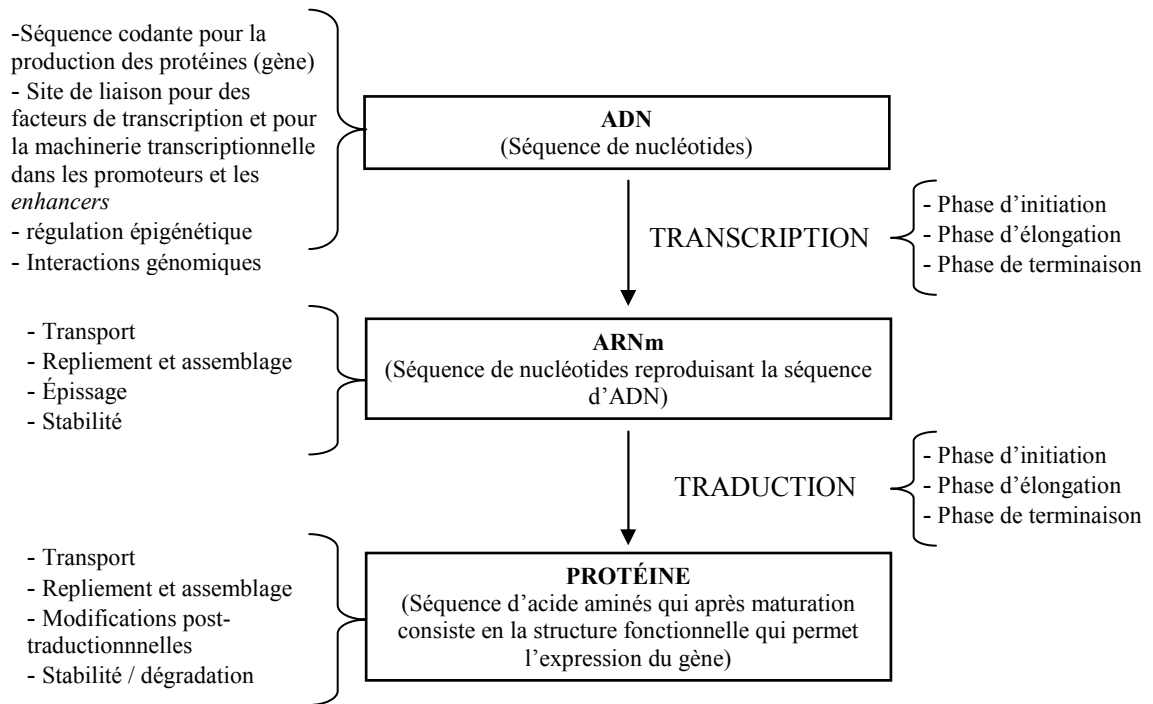
Figure 1.1 Rôle central de la cellule dans la fonction d'un tissu



L'organisme est constitué de plusieurs tissus. Ces différents tissus tel que la moelle osseuse sont formés de différents types cellulaires ayant chacun une ou des fonctions bien précises. Par exemple, les cellules rouges produites dans la moelle osseuse ont comme fonction de transporter l'oxygène dans le sang. Chaque cellule possède habituellement un noyau dans lequel se trouvent les chromosomes. L'ADN contenu dans les chromosomes code pour différentes protéines qui sont impliquées dans la fonction de la cellule. Dans les cellules rouges, les protéines de globines sont produites et permettent la formation de l'hémoglobine qui permet la captation de l'oxygène.

## **1.2 L'expression des gènes**

Les quelques 2 mètres d'ADN contenus dans chacune des cellules de l'organisme sont rigoureusement condensés dans un noyau de 6  $\mu\text{m}$  de diamètre. Tous les gènes requis pour le bon fonctionnement de la cellule sont encodés dans l'ADN. Pour qu'un gène puisse exercer sa fonction, il doit être tout d'abord transcrit en ARNm (ARN messenger) et ensuite traduit en protéine (Figure 1.1). Les différents types de protéines produites par ce processus ont une durée de vie déterminée ainsi qu'une fonction bien définie. Chacune des étapes de l'expression des gènes doit être régulée de façon spécifique pour que les protéines effectuent leur fonction dans les cellules appropriées de l'organisme au moment adéquat (Figure 1.2). La régulation anormale de l'expression des gènes peut entraîner la mort de la cellule. Dans d'autres cas, un défaut d'expression entraîne un fonctionnement anormal de la cellule et peut favoriser le développement d'une maladie.



**Figure 1.2. Étapes de l'expression génique**

Les différents niveaux de régulation sont présentés dans les accolades.

L'expression des gènes se fait habituellement en réponse à un stimulus. Le signal peut provenir de l'intérieur (signal intrinsèque) ou de l'extérieur (signal extrinsèque) de la cellule. Dans tous les cas, le stimulus déclenche une cascade d'événement qui produira une réponse de la cellule qui lui permettra de s'adapter. Il existe une variété de signaux qui peuvent provoquer une modification du destin cellulaire. Un exemple bien connu de signalisation intrinsèque est celle qui est produite par une exposition de la cellule aux rayons ultraviolets. L'irradiation provoque des lésions dans l'ADN qui vont induire l'expression de certains gènes qui ont comme fonction de protéger ou de réparer le génome endommagé. D'autre part, la cellule peut répondre à divers signaux transmis par des molécules circulantes telles que des cytokines ou par des molécules exprimées à la surface de cellules avoisinantes. L'interaction de la molécule (le ligand) avec le récepteur de la cellule cible provoquera l'activation de divers médiateurs du signal. Ceci permettra

d'activer ou réprimer certains gènes dans le noyau qui sont associés à la différenciation, la prolifération ou la survie de la cellule. Ainsi, une régulation anormale de l'un ou plusieurs des niveaux de contrôle de l'expression génique entraîne de graves conséquences sur la fonction et la survie de la cellule.

## **1.3 Problématique**

### **1.3.1 La régulation transcriptionnelle**

La transcription des gènes est une étape cruciale dans l'expression des gènes. Elle consiste en la production des ARNm qui codent pour des protéines. C'est à ce niveau que la cellule détermine quels gènes doivent être exprimés ou réprimés selon les signaux internes et externes qu'elle reçoit.

### **1.3.2 Énoncé de la problématique**

La régulation de la transcription des gènes est complexe et requiert la participation de plusieurs éléments qui doivent être régulés de la bonne manière et au bon moment. La dérégulation d'un de ces éléments peut mener à une expression anormale des gènes et avoir des conséquences sur le destin de la cellule; donc mener à un déséquilibre au niveau d'un tissu et ultimement au développement d'une maladie. Il est nécessaire et important d'étudier les mécanismes normaux de régulation de la transcription des gènes pour mieux comprendre les conséquences d'une régulation anormale.

### **1.3.3 Cadre de l'étude**

L'érythropoïèse est le processus par lequel les cellules érythroïdes (globules rouges) sont produites. La fonction principale des cellules matures est le transport de l'oxygène ( $O_2$ ) dans le sang pour répondre aux besoins des différents tissus. Cette fonction est accomplie grâce à l'expression régulée des gènes de globine qui entrent dans la composition des

molécules d'hémoglobine qui ont la capacité de fixer l'O<sub>2</sub> ainsi que le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Ainsi, un défaut au niveau de la formation ou de la survie des cellules érythroïdes entraîne de graves problèmes pour l'organisme. De plus, une production anormale d'hémoglobine influence grandement la fonction vitale de transport de l'O<sub>2</sub> dans le sang.

Le but de cette thèse est de mieux comprendre l'importance de la combinaison ainsi que le rôle de différents facteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes exprimés dans les cellules érythroïdes. Les premières études sur la régulation transcriptionnelle des gènes de globine remontent aux années 1960s(1,2). Depuis, une quantité impressionnante de données ont été produites et différents modèles ont été proposés. Mais la complexité de la vie est étonnante et plusieurs dogmes ont été revus. Dans ce contexte, notre étude vise à identifier et caractériser de nouvelles fonctions pour différents facteurs connus du système érythroïde.

Une grande partie des travaux présentés dans cette thèse porte sur la régulation du locus humain  $\beta$ -globine (hu $\beta$ ). En plus d'être associé à diverses maladies, ce locus a été extensivement caractérisé et est un modèle de choix pour l'identification de nouvelles fonctions pour les facteurs qui sont impliqués dans sa régulation. De façon intéressante, il est possible d'appliquer ce qui est connu pour la régulation de ce locus à d'autres gènes exprimés dans les cellules érythroïdes.

## **1.4 Hypothèse et objectif principal**

Les facteurs de transcription sont des régulateurs transcriptionnels qui peuvent favoriser ou inhiber la transcription des gènes. Divers facteurs de transcription ont été identifiés dans les cellules érythroïdes. Par contre, la diversité de leur fonction n'est encore que partiellement connue et caractérisée.

Notre hypothèse de travail est que les facteurs de transcription qui sont exprimés dans les cellules érythroïdes peuvent jouer différents rôles en fonction du gène qu'ils régulent ainsi

que du stade de développement ou de différenciation de la cellule. De plus, la combinaison spécifique de différents facteurs semble permettre une régulation fine au niveau des différents gènes cibles. Notre objectif est donc de caractériser l'interrelation entre certains facteurs de transcription dans le contexte du développement et de la différenciation érythroïde.

## **1.5 Portée scientifique**

Globalement, la caractérisation des mécanismes transcriptionnels présentés dans cette thèse permettra d'avoir une meilleure connaissance de la fonction des différents facteurs étudiés dans divers contextes. Cette compréhension est essentielle pour l'élaboration de nouvelles thérapies visant à traiter des maladies impliquant une régulation anormale des facteurs étudiés.

Il existe plusieurs pathologies touchant les cellules érythroïdes : anémies, thalassémies, leucémies et myélodysplasies. Dans certains cas, les causes sont connues mais les mécanismes menant à la maladie ne sont pas toujours clairs. De plus, l'étiologie d'un bon nombre d'hémopathies reste inconnue. Ainsi, une caractérisation approfondie des mécanismes de régulation cellulaire peut aider à mieux comprendre certaines de ces pathologies.

Certains facteurs que nous avons étudiés sont présents dans différents types cellulaires du système hématopoïétique. Les mécanismes que nous avons caractérisés pourraient donc (i) s'appliquer à d'autres types cellulaires et servir de modèle ou (ii) être spécifiques aux cellules érythroïdes et permettre leur utilisation comme cible thérapeutique.

## **1.6 Organisation de la thèse**

Le présent ouvrage est divisé en trois parties principales. La mise en contexte présente de façon détaillée le cadre théorique, les hypothèses et objectifs spécifiques ainsi que

l'approche expérimentale. Les résultats sont composés de quatre articles scientifiques; ma contribution à chacun d'eux est décrite au tableau 1.1. La discussion comprend un retour sur l'interprétation générale des résultats et une conclusion.

Trois des quatre articles de la section résultats ont été publiés dans des journaux scientifiques et ont subi un processus de révision par les pairs. Ils sont présentés sous la forme du manuscrit qui a été accepté pour la publication. L'article du chapitre 7 est présentement en préparation et sera soumis sous peu. Un article supplémentaire pour lequel j'ai fourni une contribution mineure est présenté en annexe. Le tableau 1.1 montre l'ordre dans lequel les papiers sont présentés dans la thèse ainsi que ma contribution à chacun d'eux. L'ordre chronologique n'a pas été respecté pour faciliter la compréhension et le lien entre les différents articles.

**Tableau 1.1. Contribution aux différents articles présentés dans la thèse**

Référence bibliographique	Contribution	Section
<b>Ross J</b> , Bottardi S, Bourgoïn V, Wollenschlaeger A, Drobetsky E, Trudel M, Milot E. (2009) <i>Nucleic Acids Res.</i> 37(16):5295-308	Participation à la conception des expériences Réalisation des expériences Rédaction de la première version du manuscrit	Chapitre 4
Bottardi S*, <b>Ross J*</b> , Pierre-Charles N, Blank V, Milot E. (2006) Lineage-specific activators affect beta-globin locus chromatin in multipotent hematopoietic progenitors. <i>EMBO J.</i> 25(15):3586-95.	Réalisation des expériences Participation à l'élaboration du manuscrit	Chapitre 5
Bottardi S*, <b>Ross J*</b> , Bourgoïn V, Fotouhi-Ardakani N, Affar el B, Trudel M, Milot E. (2009) Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human gamma-globin genes. <i>Mol Cell Biol.</i> 29(6):1526-37.	Participation à la conception des expériences Réalisation des expériences Participation à l'élaboration du manuscrit	Chapitre 6
Ross J, Mavoungou L, Bresnick EH, Milot E. (2011) GATA-1 and Ikaros repress Hes-1 promoter during erythroid differentiation. <i>En préparation</i>	Participation à la conception des expériences Réalisation des expériences Rédaction de la première version du manuscrit	Chapitre 7
Bottardi S, Zmiri FA, Bourgoïn V, <b>Ross J</b> , Mavoungou L, Milot E. (2011) Ikaros interacts with P-TEFb and cooperates with GATA-1 to enhance transcription elongation. <i>Nucleic Acids Res.</i> 39(9):3505-19	Participation technique à la réalisation des expériences	Annexe 1





## **PARTIE I : MISE EN CONTEXTE**

## **Chapitre 2 : Cadre théorique**

Tel que mentionné précédemment, notre étude porte sur la régulation génique induite par la combinaison de certains facteurs de transcription exprimés dans les cellules érythroïdes. Bien que chacun des chapitres de la deuxième partie de la thèse comportent une introduction succincte sur les thèmes abordés dans l'article, le présent chapitre présente une revue de la littérature générale rassemblant les sujets qui ont été étudiés lors des différents projets de la thèse. De plus, la problématique ainsi que les hypothèses et objectifs de la thèse sont détaillés.

### **2.1 Revue de la littérature**

#### **2.1.1 Hématopoïèse**

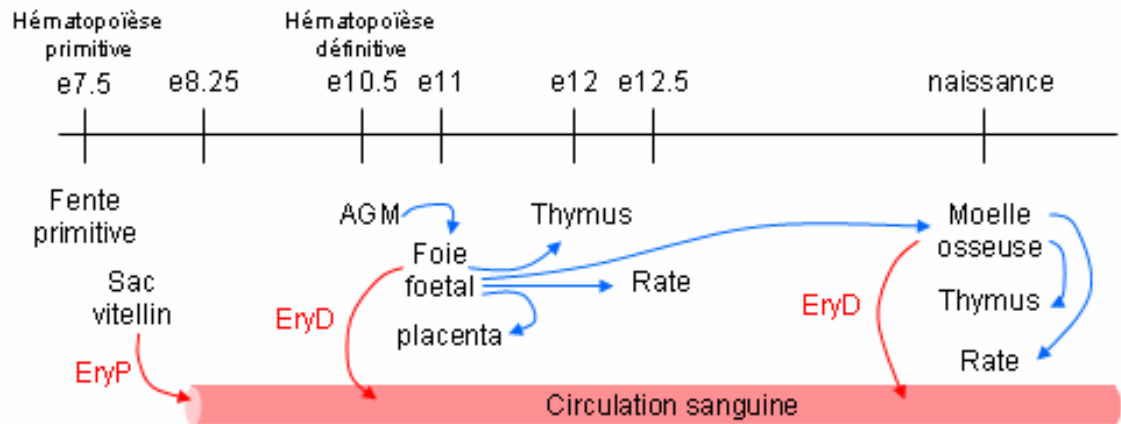
L'hématopoïèse est le processus par lequel toutes les cellules du sang sont produites à partir d'une cellule progénitrice hématopoïétique, la cellule souche hématopoïétique (CSH). Les CSH ont le potentiel de se différencier en toutes les lignées qui constituent le système hématopoïétique(3,4). De plus, les CSH possèdent le potentiel d'autorenouvellement ce qui permet la maintenance d'un pool de cellules hématopoïétiques multipotentes capables de produire les différents types cellulaires sanguins selon les besoins de l'organisme(5). Étant donné la variété de cellules produites lors de l'hématopoïèse ainsi que le rythme auquel les cellules sont renouvelées, ceci en fait l'un des systèmes de différenciation les plus complexes.

Le sang est principalement constitué de plasma et de cellules sanguines matures possédant une courte durée de vie. Les cellules que l'on retrouve dans le sang sont divisées en trois catégories soit les cellules blanches, les cellules rouges et les plaquettes. De façon générale, les cellules blanches, ou leucocytes, servent à protéger l'organisme en combattant les infections ainsi qu'en phagocytant les microorganismes ou les cellules mortes et en digérant les débris. Les cellules blanches sont transportées par le sang mais agissent de façon spécifique au niveau des tissus. Les cellules rouges ou érythrocytes sont le type cellulaire

que l'on retrouve en plus grande quantité dans le sang. Ces cellules peuvent capter l'O<sub>2</sub> et le transporter vers les différents tissus. Les plaquettes sont des fragments cellulaires produits par les mégacaryocytes et leur fonction est de permettre la coagulation du sang pour favoriser la réparation des tissus.

### **2.1.1.1 Sites de l'hématopoïèse lors du développement murin**

Le développement des systèmes hématopoïétiques chez la souris et l'humain est semblable. Puisque nous avons principalement utilisé la souris comme modèle d'étude, seul le développement murin sera décrit. Différentes revues de littérature concernant le développement chez l'humain peuvent être consultés(6-9). Le premier site de production des cellules sanguines est extra-embryonnaire soit au niveau de la fente primitive et par la suite dans le sac vitellin (~ jour e7.5)(10) (Figure 2.1). Jusqu'au jour e10.5 il n'est possible de détecter que des cellules hématopoïétiques primitives dans l'embryon. Le premier site de l'hématopoïèse définitive se situe dans l'embryon au niveau de la région AGM (*Aorta-gonad-mesonephros*) vers le jour e10.5 alors qu'il est possible de détecter les premières CSH définitives(11-13). Des évidences suggèrent toutefois que des CSH seraient présentes au niveau de l'aorte dorsale avant même qu'il y ait circulation(14). À partir du jour e11, les cellules hématopoïétiques définitives sont aussi produites au niveau du sac vitellin, du placenta et dans le foie foetal jusqu'à la naissance(15-18). Chez l'adulte, les principales niches de l'hématopoïèse sont la moelle osseuse, la rate et le thymus. Il est généralement admis que les différents sites de l'hématopoïèse sont colonisés par un pool de CSH produites plus tôt au cours de l'ontogénie(19). Les CSH reçoivent différents signaux de la niche hématopoïétique transmis par des voies de signalisation telles que Wnt, Hedgehog et Notch, ce qui permet de promouvoir la prolifération de ces cellules ainsi que le maintien de leur état indifférencié(20). En réponse à l'environnement, des cellules du stroma présentes dans la moelle osseuse vont sécréter différentes molécules qui vont induire l'activation, la prolifération ou la différenciation des CSH. Les cellules sanguines matures vont ensuite migrer vers le sang.



**Figure 2.1. Sites de l'hématopoïèse primitive et définitive**

Les différents tissus hématopoïétiques sont représentés sur une échelle de temps correspondant approximativement au moment où commence la production de cellules hématopoïétiques dans ce tissu. Il est difficile de déterminer à quel moment un tissu cesse de produire des cellules érythroïdes. Les stades où débute l'hématopoïèse primitive et définitive sont indiqués sur l'échelle. Les flèches rouges indiquent le passage des cellules érythroïdes matures vers la circulation sanguine. Les flèches bleues représentent la migration des CSH vers les différents tissus hématopoïétiques. e : jour du développement embryonnaire; EryP : cellules érythroïdes primitives; EryD : cellules érythroïdes définitives.

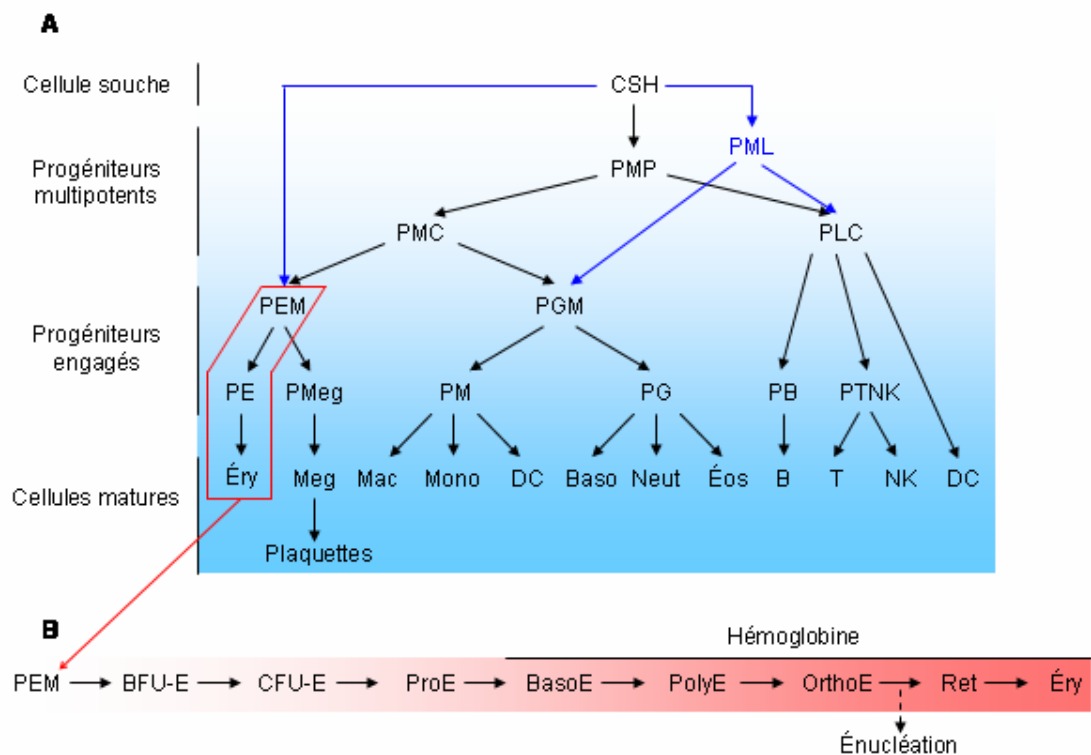
### 2.1.1.2 Cellules hématopoïétiques

Il a été longtemps admis que seules les cellules érythroïdes primitives étaient présentes dans l'embryon au stade pré-somite. Par contre, certaines études ont montré la présence de progéniteurs de macrophages et de mégacaryocytes vers les stades e7.25-e7.5 dans le sac vitellin avant même que la circulation soit mise en place dans l'embryon(10,21). Il n'est toutefois pas clair si ces types cellulaires proviennent de précurseurs communs ou différents. Des progéniteurs ayant un bipotentiel érythroïde/mégacaryocyte ont été observés

dans le sac vitellin suggérant que l'hématopoïèse primitive ne serait pas nécessairement unilignée tel que proposé au départ, mais multilignée(21).

L'hématopoïèse définitive (Figure 2.2) est beaucoup mieux caractérisée. Elle comprend trois grandes catégories de cellules sanguines soit les cellules blanches, les cellules rouges et les plaquettes. L'établissement du système sanguin requiert l'orchestration de différents processus essentiels : la spécification des CSH lors de l'embryogenèse, l'autorenouvellement des CSH, la quiescence des CSH, l'engagement des CSH vers une lignée ainsi que la prolifération et la différenciation des cellules(22-24). Toutes les cellules sanguines proviennent d'un même progéniteur soit la CSH. Cette dernière est multipotente et possède un potentiel d'autorenouvellement limité ce qui permet au système hématopoïétique de se renouveler constamment au cours de la vie de l'organisme. Par opposition aux CSH qui ont le potentiel de ne produire que des cellules hématopoïétiques, les cellules souches embryonnaires sont pluripotentes c.à.d. qu'elles ont une capacité d'autorenouvellement plus importante et qu'elles peuvent se différencier en tous les types cellulaires de l'organisme à l'exception du placenta (25). Seules les cellules du zygote (du stade 1 cellule au stade 16 cellules) ont le potentiel de former un organisme entier (totipotence). Une fois que les CSH se spécifient/différencient pour former les PMP (progéniteurs multipotents), la capacité d'autorenouvellement est perdue. Les PMP peuvent s'engager vers deux lignées principales, soit la lignée lymphoïde et la lignée myéloïde. La lignée lymphoïde permet la production des lymphocytes B et T ainsi que des cellules NK (*Natural Killer*) et dendritiques. Toutes font partie de la catégorie des cellules blanches. La principale fonction des cellules lymphoïdes matures est la protection de l'organisme. La lignée myéloïde permet la production d'une grande variété de types cellulaires faisant parti des trois catégories : les cellules blanches monocytes (macrophages), cellules dendritiques et cellules polynucléées (neutrophiles, éosinophiles et basophiles); les plaquettes (mégacaryocytes) et les cellules rouges (érythrocytes). Les fonctions des cellules myéloïdes couvrent un plus grand éventail passant de l'immunité, à la coagulation, au transport des gaz.

Le modèle classique représentant l'origine des différentes lignées hématopoïétique a été revue à plus d'une reprise(26). Récemment, un progéniteur ayant un potentiel lymphoïde et myéloïde restreint a été identifié(27). À partir de ce progéniteur multipotent amorcé pour la lignée lymphoïde, des lymphocytes T et B ainsi que des granulocytes et des macrophages peuvent être produits. Ce progéniteur aurait un très faible potentiel pour la formation des cellules érythroïdes et mégacaryocytes.



**Figure 2.2. Représentation simplifiée de l'hématopoïèse définitive**

(A) Toutes les cellules hématopoïétiques définitives matures proviennent d'une CSH. Cette dernière a le potentiel de se différencier en progéniteurs multipotents ayant perdu la capacité d'autorenouvellement qui vont à leur tour se différencier en progéniteurs engagés vers une ou deux lignées. Ultimement, chacun de ces progéniteurs va se différencier en précurseur engagé vers une seule lignée et subira différentes étapes de maturation qui résulteront en la production de cellules matures fonctionnelles. Flèches noires : schéma

classique de l'hématopoïèse définitive; Flèches bleues : schéma alternatif de l'hématopoïèse définitive. CSH : cellule souche hématopoïétique; PMP : progéniteur multipotent; PML : progéniteur engagé vers la lignée myéloïde et lymphoïde; PMC : progéniteur myéloïde commun; PLC : progéniteur lymphoïde commun; PEM : progéniteur érythroïde/mégacaryocyte; PGM : progéniteur granulocyte/monocyte; PE : progéniteur érythroïde; PMeg : progéniteur mégacaryocytaire; PM : progéniteur monocytique; PG : progéniteur granulocytique; PB : progéniteur des cellules B; PTNK : progéniteur des cellules T et NK; Éry : érythrocyte; Meg : mégacaryocyte; Mac : macrophage; Mono : monocyte; DC : cellule dendritique; Baso : granulocyte basophile; Neut : granulocyte neutrophile; Éos : granulocyte éosinophile; B : cellule (lymphocyte) B; T : cellule (lymphocyte) T; NK : cellule *Natural killer*. **(B)** Détail des étapes de l'érythropoïèse définitive. Les stades où l'hémoglobine est détectable sont représentés par un trait noir; le moment de l'énucléation est indiqué par une flèche pointillée. BFU-E : *Burst forming unit-erythroid*; CFU-E : *Colony forming unit-erythroid*; ProE: proérythroblaste; BasoE: érythroblaste basophile; PolyE: érythroblaste polychromatophile; OrthoE: érythroblaste orthochromatique; Ret : réticulocyte.

### 2.1.1.3 Engagement vers une lignée

Plusieurs choix s'offrent à une cellule souche lors de son existence. Par exemple, il est possible pour une CSH de s'autorenouveler, de proliférer ou de s'engager vers une lignée et de se différencier. Chacun de ces processus est influencé par des stimuli externes à la cellule ainsi que par un programme de régulation transcriptionnelle précis (extrinsèque vs intrinsèque). Par exemple, le facteur de transcription et proto-oncogène *c-myc* a été associé à la régulation du choix entre l'autorenouvellement et la différenciation des CSH (28). *Bmi-1* est un autre important régulateur de l'autorenouvellement des CSH et est essentiel pour la maintenance des CSH dans la moelle osseuse (29,30).

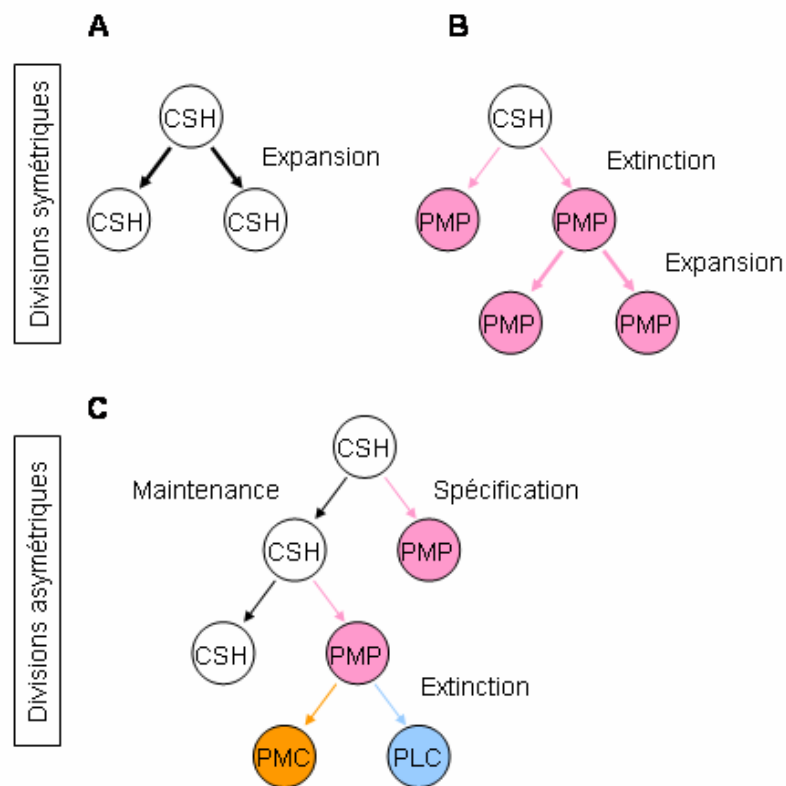
L'engagement vers une lignée est le processus par lequel une cellule multipotente ou progénitrice sera de plus en plus restreinte dans ses possibilités d'engagement vers différentes lignées pour éventuellement se développer en un progéniteur engagé vers une seule lignée. L'engagement d'une cellule moins différenciée (multipotente) vers un destin plus spécifié dépend de plusieurs éléments. Les facteurs de transcription (section 2.1.3.1.5) sont impliqués dans l'expression des gènes associés à l'engagement vers une lignée. Par exemple, le facteur de transcription GATA-1 est associé à l'activation d'un grand nombre de gènes érythroïde-spécifiques, c.-à-d. de gènes qui ne sont exprimés que dans les cellules érythroïdes et qui sont impliqués dans la spécificité et la fonction de ce type cellulaire. Par opposition, le facteur de transcription PU.1 est impliqué dans l'expression de gènes associés à d'autres lignées. L'inhibition de PU.1 dans le contexte de l'engagement vers la lignée érythroïde est donc requise afin de seulement favoriser l'expression des gènes nécessaires à la fonction et à la survie des cellules érythroïdes. De façon intéressante, il a été démontré que dans les CSH, il y a expression à des niveaux basaux de différents gènes associés à différentes lignées. Ce phénomène a été nommé amorçage de lignée (*lineage priming*) et la faible expression des différents gènes serait associée aux différents choix de lignée auxquels la CSH est exposée(31,32). Par la suite, après l'engagement vers une lignée, les différents gènes associés aux autres lignées seront progressivement réprimés caractérisant la perte d'option de destin cellulaire(33,34).

#### **2.1.1.4 Autorenewement, prolifération et différenciation**

L'autorenouvellement, la prolifération et la différenciation sont trois processus essentiels lors de l'hématopoïèse. Ces derniers impliquent la division cellulaire (mitose) qui permet la formation de deux cellules filles à partir d'une cellule mère (Figure 2.3). Le cycle cellulaire représente les différentes étapes par lesquelles une cellule passe avant de se diviser. Les cellules filles peuvent être identiques (expansion, prolifération) ou différentes (différenciation) à la cellule mère. L'autorenouvellement est une particularité des CSH et permet la formation d'une (maintenance) ou deux CSH (prolifération) ayant le même potentiel d'autorenouvellement et de développement que la CSH mère. La prolifération est



le processus par lequel un type cellulaire (CSH ou autre) peut prendre de l'expansion. La prolifération implique une progression rapide dans le cycle cellulaire afin de produire plusieurs cellules filles identiques. Les cellules produites pourront à leur tour effectuer un cycle cellulaire et se diviser. À l'opposé, lors de la différenciation, les cellules filles sont plus spécialisées que la cellule mère et ont un potentiel plus restreint. La différenciation implique généralement un ralentissement ou un arrêt de la progression dans le cycle cellulaire. Tous ces processus impliquent la participation d'une série de régulateurs du cycle cellulaire(35).



**Figure 2.3. Types de divisions cellulaires dans le système hématopoïétique**  
**(A-B)** La division symétrique permet la production de deux cellules filles identiques. L'expansion permet la production de cellules filles identiques à la mère. L'extinction favorise la disparition du type cellulaire de la cellule mère et la production de cellules différenciées (différenciation). **(C)** La division

asymétrique permet la production de deux cellules filles différentes. Ainsi, le type cellulaire de la cellule mère est maintenu et une cellule fille spécifiée est produite. Les flèches noires représentent l'autorenouvellement; les flèches de couleur représentent la différenciation; les flèches épaisses représentent la prolifération. CSH : Cellule souche hématopoïétique; PMP : progéniteur multipotent; PMC : progéniteur myéloïde commun; PLC : progéniteur lymphoïde commun.

Très souvent, lors des différentes étapes de formation des différents types cellulaires hématopoïétiques, une phase d'expansion précède la phase de différenciation(35). Ces deux processus sont directement reliés à l'environnement cellulaire et aux besoins de l'organisme. Classiquement, en réponse à une diminution d'un des types cellulaires hématopoïétiques, des signaux seront envoyés pour promouvoir la prolifération des CSH ainsi que des progéniteurs de ces cellules(20). Ces cellules seront ensuite soumises à d'autres signaux qui induiront leur différenciation en cellules fonctionnelles(36,37).

### **2.1.1.5 Hémopathies**

Le bon fonctionnement du système hématopoïétique est essentiel pour la survie de l'organisme étant donné les fonctions qu'il remplit. Il existe une panoplie de maladies associées au système hématopoïétique qui affectent la production, la fonction ou la durée de vie des cellules sanguines. Un déséquilibre dans le nombre ou la fonction d'un des types cellulaires affecte l'homéostasie du tissu sanguin. Certains troubles affectent particulièrement un type cellulaire comme les anémies (globules rouges), leucopénies (globules blancs) ou thrombopénies (plaquettes). Les causes de ces maladies sont très variées. Il existe aussi plusieurs maladies malignes plus graves affectant une ou plusieurs lignées du système hématopoïétique. C'est le cas des différentes leucémies, syndromes myélodysplasiques et néoplasmes myéloprolifératifs.

## 2.1.2 Érythropoïèse

Les cellules érythroïdes ont une fonction essentielle pour l'organisme, soit le transport de l'O<sub>2</sub> dans le sang. Malheureusement, plusieurs maladies sont liées à une production ou une fonction anormale des globules rouges ce qui peut entraîner de graves conséquences pour l'organisme.

On estime qu'il y a de 4 à 5 millions de cellules rouges en circulation par mm<sup>3</sup> de sang chez l'humain(38). Les cellules érythroïdes matures ont une durée de vie limitée (120 jours chez l'humain(38)) et sont constamment renouvelées grâce à un petit pool de cellules CSH qui prolifèrent et se différencient en réponse à divers stimuli (section 2.1.1.2). Les échanges gazeux dans l'organisme sont à la base de la vie. En effet, chaque cellule utilise de l'O<sub>2</sub> pour produire de l'énergie et fabriquer du CO<sub>2</sub> qui doit être expulsé de l'organisme. Les poumons sont les organes impliqués dans la captation de l'O<sub>2</sub> et le rejet du CO<sub>2</sub> dans l'air. L'O<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub> circulent dans l'organisme grâce aux globules rouges(39). Les globules rouges définitifs sont dépouillés de noyau et sont constitués principalement d'hémoglobine. L'hémoglobine est un complexe protéique formé des chaînes de globines (section 2.1.2.4) ainsi que d'un groupement hème qui contient un ion de fer qui peut fixer l'O<sub>2</sub> (40). La biosynthèse de l'hème ainsi que le métabolisme du fer sont des processus bien caractérisés mais qui ne seront pas décrits ici puisque cela dépasse les champs d'intérêt de cette thèse(41,42).

### 2.1.2.1 L'érythropoïèse primitive

Les premiers précurseurs des cellules érythroïdes sont détectés lors de la gastrulation, peu après la formation du mésoderme. Ces précurseurs érythroïdes primitifs sont caractérisés par leur capacité de produire *in vitro* des colonies appelées EryP-CFC(43). Ces cellules peuvent être observées au niveau de la fente primitive postérieure de l'embryon de souris à partir du jour e7.25 et dans les îlots sanguins à partir du jour e8.25 (10). À partir du jour e9, les EryP-CFC ne sont plus détectables(10). Les précurseurs érythroïdes primitifs proviennent

d'un progéniteur du mésoderme appelé hémangioblaste localisé au niveau postérieur de la fente primitive et caractérisé par l'expression du marqueur *Flk1*(44). Ce dernier possède la capacité de produire des cellules hématopoïétiques ainsi que des cellules endothéliales et des cellules du muscle lisse (44,45). Les cellules hématopoïétiques ainsi que les cellules endothéliales produites au niveau de la fente primitive vont migrer vers le sac vitellin proximal et former tout d'abord une bande sanguine (autrefois identifiée comme plusieurs îlots sanguins) qui sera par la suite ségrégué en plusieurs capillaires juste avant le début de la circulation sanguine vers e8.25(46). Morphologiquement, il est possible d'observer des érythroblastes primitifs nucléés (mégalo blasts) en circulation jusqu'au jour e16.5 et des érythroblastes primitifs énucléés (mégalo cytes) à partir du jour e12.5 jusqu'au jour e18.5 (7). Ces cellules sont facilement différenciables des érythroblastes définitifs puisqu'elles sont près de trois fois plus grosses. De plus, ces cellules primitives peuvent exprimer les globines embryonnaires et adultes(47).

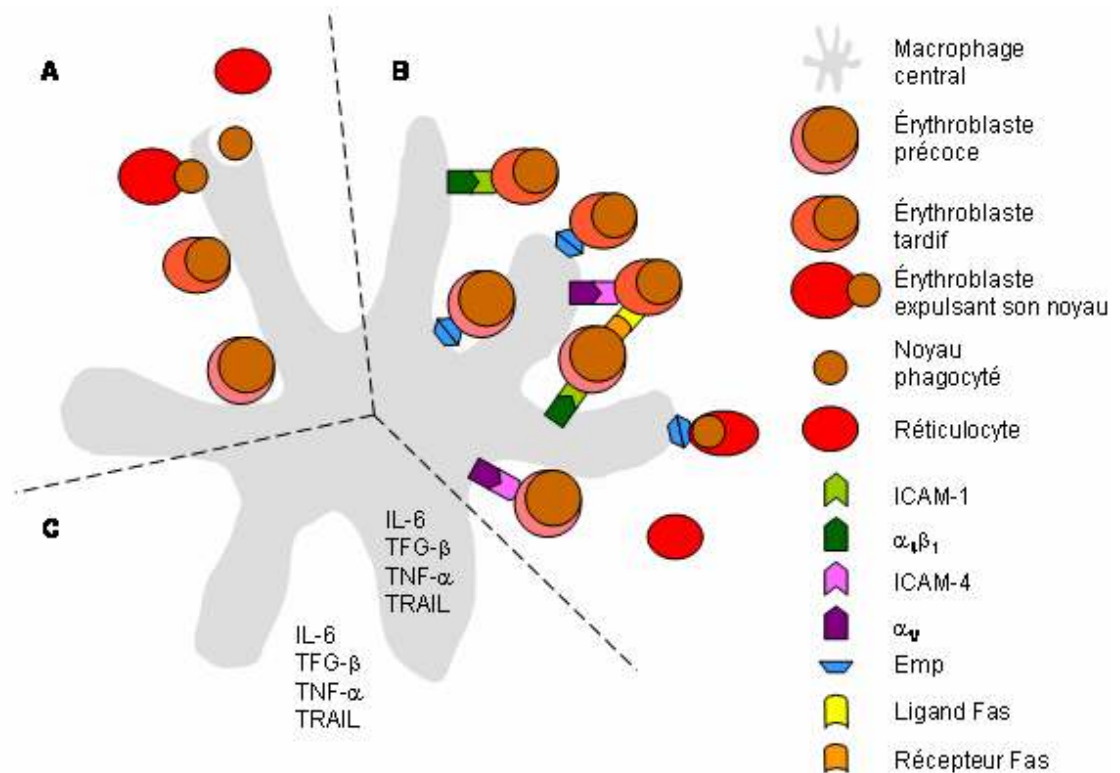
### 2.1.2.2 L'érythropoïèse définitive

Comme toutes les cellules hématopoïétiques définitives matures, les cellules érythroïdes définitives ont pour origine la CSH. Ces cellules subissent l'influence d'une série de facteurs extrinsèques ainsi que de différentes voies de signalisation qui vont induire la différenciation vers la lignée myéloïde et permettre la production du progéniteur myéloïde commun (PMC) (48). Les facteurs permettant la spécification de ce progéniteur sont mal connus. Par contre, il est connu que ces cellules expriment le récepteur c-kit mais n'expriment pas sca-1 ou le récepteur de l'IL-7. Les PMC se différencient rapidement en progéniteur mégacaryocyte-érythroïde (PME). Par la suite, il y aura engagement restreint vers la lignée érythroïde avec l'action de l'érythropoïétine (Epo), de l'IL-3 et du SCF(49). Les deux premiers précurseurs engagés érythroïdes sont le BFU-E (*burst forming unit-erythroid*) et le CFU-E (*colony forming unit-erythroid*) (Figure 2.2). Le CFU-E est considéré comme étant plus mature que le BFU-E et exprime le récepteur à l'Epo (EpoR) de façon plus abondante. Le CFU-E va par la suite se différencier en proérythroblaste qui est le premier précurseur engagé érythroïde identifiable morphologiquement. Tout comme le CFU-E, le proérythroblaste

exprime une grande quantité de EpoR. Séquentiellement, le proérythroblaste va se différencier en érythroblaste basophile, érythroblaste polychromatophile et érythroblaste orthochromatique. Cette série d'étapes de différenciation est caractérisée par une condensation progressive du noyau de la cellule (associée à une condensation de la chromatine), une diminution du nombre de divisions cellulaires et une augmentation de la concentration d'hémoglobine(50). L'érythroblaste orthochromatique va finalement expulser son noyau (énucléation) et devenir un réticulocyte. À son tour, ce dernier expulsera toutes ses organelles pour devenir un globule rouge mature (érythrocyte) qui entrera dans la circulation sanguine et effectuera sa fonction de transport d'O<sub>2</sub>(51). Le globule rouge a une durée de vie d'environ 15 jours chez la souris(49).

À partir du stade CFU-E, l'érythropoïèse se déroule dans un microenvironnement nommé îlot érythroblastique(52). On a retrouvé des îlots érythroblastiques dans divers tissus tels que la moelle osseuse, le foie fœtal et la rate(53). Cette structure est composée d'un macrophage central entouré de quelques cellules érythroïdes à divers stades de différenciation (Figure 2.4). L'importance du macrophage dans la différenciation des cellules érythroïdes est essentielle puisqu'en absence de macrophages, l'érythropoïèse n'est pas possible(54). Le macrophage accomplit plusieurs fonctions dans la maturation des cellules érythroïdes comme au niveau de la promotion de la prolifération des cellules érythroblastes. Particulièrement, l'influence du macrophage sur l'érythropoïèse se fait via un contact cellule-cellule ainsi que par la sécrétion de molécules solubles (Figure 2.4)(55). Les érythroblastes interagissent aussi entre eux afin de réguler la production adéquate de cellules érythroïdes principalement via la voie Fas-Fas ligand(56,57).

Le macrophage est aussi impliqué dans le métabolisme du fer de la cellule érythroïde. Le macrophage produit de la ferritine qui est sécrétée par exocytose et récupérée par endocytose par l'érythroblaste(58). La ferritine sera transformée en fer qui entrera dans la composition de l'hème. Finalement, le macrophage sert aussi à phagocyter le noyau et toutes les organelles expulsées par le réticulocyte à la fin de la différenciation érythroïde(59).



**Figure 2.4. Différentiation érythroïde au sein de l'îlot érythroblastique**  
(Adaptation du modèle de Chasis et Mohandas(55))

(A) Les différents stades de la différenciation sont représentés à partir de l'érythroblaste précoce jusqu'à l'expulsion du noyau et la phagocytose par le macrophage. (B) Les différentes molécules impliquées dans le contact cellule-cellule. Les mécanismes par lesquels les molécules d'adhésion promeuvent la prolifération restent peu connus. (C) Différentes cytokines inhibant l'érythropoïèse peuvent se trouver dans le milieu circulant ou être directement sécrété par le macrophage.

### 2.1.2.3 Principales voies de signalisation

Tel que décrit dans la section précédente, plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la formation des cellules érythroïdes. L'activation de ces voies se fait principalement par un contact entre deux cellules ou par la sécrétion de molécules dans le milieu circulant.

La majorité des voies peuvent influencer le destin cellulaire de plus d'une façon; soit au niveau de la prolifération, de la croissance, de la différenciation ou de la survie.

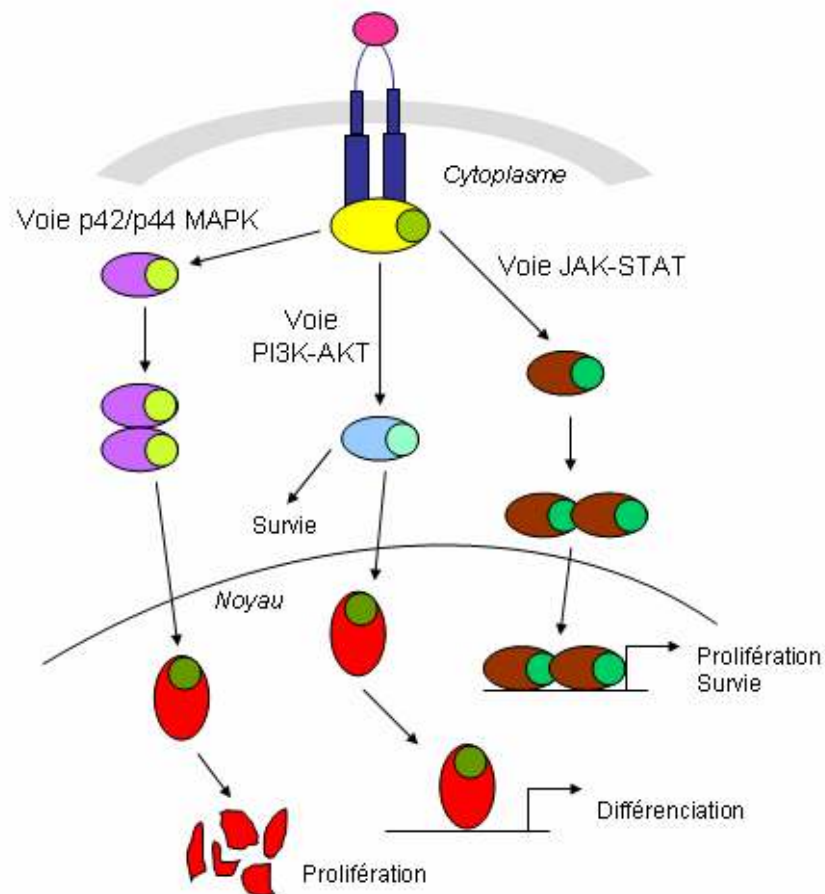
#### 2.1.2.3.1 Voie de l'érythropoïétine

L'Epo est une des molécules les plus importantes pour réguler la production des globules rouges tant au niveau basal qu'en réponse à un stress. L'Epo est produite principalement par le rein chez l'adulte et est régulée par les niveaux d'O<sub>2</sub> dans le sang c.-à-d. l'Epo est produite par le rein pour stimuler/accélérer l'érythropoïèse lors d'une hypoxie(60,61). D'autres tissus comme le cerveau, l'utérus, le coeur ou divers tissus cancéreux ont été identifiés comme des producteurs d'Epo et utilisent cette voie entre autres pour la survie des cellules du tissu(62). Lors du développement, l'Epo est produite au niveau du foie fœtal et favorise la prolifération et la survie des CFU-E fœtaux (63). Basé sur les modèles murins déficients pour l'Epo ou l'EpoR, cette voie de signalisation est nécessaire pour l'érythropoïèse définitive puisque les embryons ne survivent pas au-delà du jour embryonnaire e13(63). Malgré tout, lors de l'érythropoïèse primitive, il est rapporté que l'expression de l'EpoR débute au jour e7.5 dans les îlots sanguins et celle de l'Epo vers le jour e10.25 dans le foie fœtal (64-66).

Les principales fonctions de la voie de l'érythropoïétine lors de l'érythropoïèse sont la promotion de la différenciation, de la prolifération et de la survie des BFU-E et des CFU-E(67) (Figure 2.5). L'EpoR est principalement exprimé au niveau de la membrane cytoplasmique des CFU-E et des proérythroblastes mais aussi des BFU-E et des érythroblastes précoces(67). STAT5 est un facteur de transcription crucial dans la signalisation induite par l'Epo. Une fois activé, il se dimérise et entre au noyau où il active une variété de gènes tels que *Pim-1*, *Oncostatin M*, *Socs3*, *Irp-2*, et *Bcl-xL*(68-70). L'activation de ces différents gènes contribue à la prolifération et la survie des cellules.

Les souris déficientes pour l'Epo ou l'EpoR meurent d'anémies vers les jours e13-e15(63,71). Ces modèles ont toutefois révélés que la voie de l'Epo n'est pas essentielle

pour la formation des CFU-E et BFU-E puisqu'il est possible d'observer la présence de ces types cellulaires dans les foies fœtaux des animaux mutants (63). Le phénotype des souris déficientes pour STAT5 ne reproduit pas celui des souris mutante l'Epo ou l'EpoR. En effet, STAT5 est le médiateur de plusieurs voies de signalisations et n'est pas le seul médiateur de la voie de l'Epo. L'absence de STAT5 n'est pas létale mais montre tout de même quelques effets sur l'hématopoïèse et l'érythropoïèse : diminution du nombre de colonies dans la moelle osseuse, hématopoïèse extramédullaire et anémie fœtale(69,72,73).



**Figure 2.5. La voie de l'érythropoïétine**

L'interaction de l'EpoR (bleu indigo) avec l'Epo (rose) induit une dimérisation des récepteurs. La modification de conformation des récepteurs favorise la phosphorylation (vert) de l'enzyme JAK2 (jaune) (74,75). L'activation de



JAK2 permet l'activation de trois voies de signalisation qui seront impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie (76-78). Des exemples de la fonction de chacune des voies sont représentés. La voie p42/p44 MAPK (mauve) est associée à la phosphorylation de GATA-1 (rouge) ainsi qu'à sa dégradation (79). La voie PI3K-AKT (bleu pâle) favorise aussi la phosphorylation de GATA-1 et est associée à l'activation du gène TIMP-1 (80). La voie JAK-STAT induit la phosphorylation (vert) de STAT5 (brun) permettant l'activation des gènes cibles de STAT5 (voir texte).

#### *2.1.2.3.2 Voie du Stem Cell Factor (SCF)*

Le récepteur du SCF, c-kit, est exprimé sur divers types cellulaires hématopoïétiques. Particulièrement, il est co-exprimé avec l'EpoR sur les BFU-E et les CFU-E (81). Il a été montré que la voie c-kit collabore avec la voie de l'EpoR pour la survie et la prolifération des progéniteurs érythroïdes(82). Le SCF est exprimé par les cellules du foie fœtal ainsi que par les cellules stromales de la moelle osseuse(83,84). Il peut être présenté à un récepteur c-kit sous forme soluble ou associé à la membrane(85). Certaines mutations dans le locus *W* (codant pour c-kit) ou dans le locus *Sl* (codant pour SCF) mènent à un phénotype anémique chez la souris(86,87).

Malgré que la signalisation intracellulaire médiée par la voie SCF/c-kit soit très bien caractérisée, il est encore peu clair de quelle façon cette voie influence la prolifération et la survie des cellules érythroïdes. La voie SCF/c-kit induit la phosphorylation de 5 kinases soit PLC- $\gamma$ , p85a (PI3K), Ras GPase activating protein, SHP2 phosphatase et kinases de la famille Scr (Grb2, Grb7 et Shc)(88-94). p85a est entre autres important pour la formation des BFU-E et CFU-E(95).

#### *2.1.2.3.3 Voies activées par d'autres cytokines*

Plusieurs autres cytokines peuvent collaborer avec l'Epo et le SCF pour influencer la prolifération, la survie et la différenciation des cellules érythroïdes. C'est le cas entre autres

de l'IGF-1 et l'IL-3(96,97). L'activation de ces voies contribuerait par exemple à l'activation des voies MAPK p42/44, STAT5 ou AKT(98,99). L'IGF1 et l'IL-3 ont des effets positifs sur la prolifération des progéniteurs érythroïdes ou des érythroblastes. D'autres cytokines telle le TGF $\beta$  ont plutôt des effets négatifs sur la prolifération des érythroblastes et peuvent favoriser la différenciation(100).

#### *2.1.2.3.4 Voies apoptotiques*

Plusieurs mécanismes apoptotiques sont impliqués dans le contrôle homéostatique de l'érythropoïèse. Normalement, lorsque la voie extrinsèque de l'apoptose est activée, une série de clivages de caspases est initiée et la voie intrinsèque de l'apoptose est à son tour activée menant à l'activation de facteurs proapoptotiques(101). Les caspases sont des enzymes cystéine protéases qui sont impliquées dans le clivage de différentes protéines dans la cellule. Dans les cellules érythroïdes, il a été montré que certaines caspases sont responsables du clivage des facteurs de transcription GATA-1 et TAL-1 lors de la différenciation érythroïde terminale(102,103).

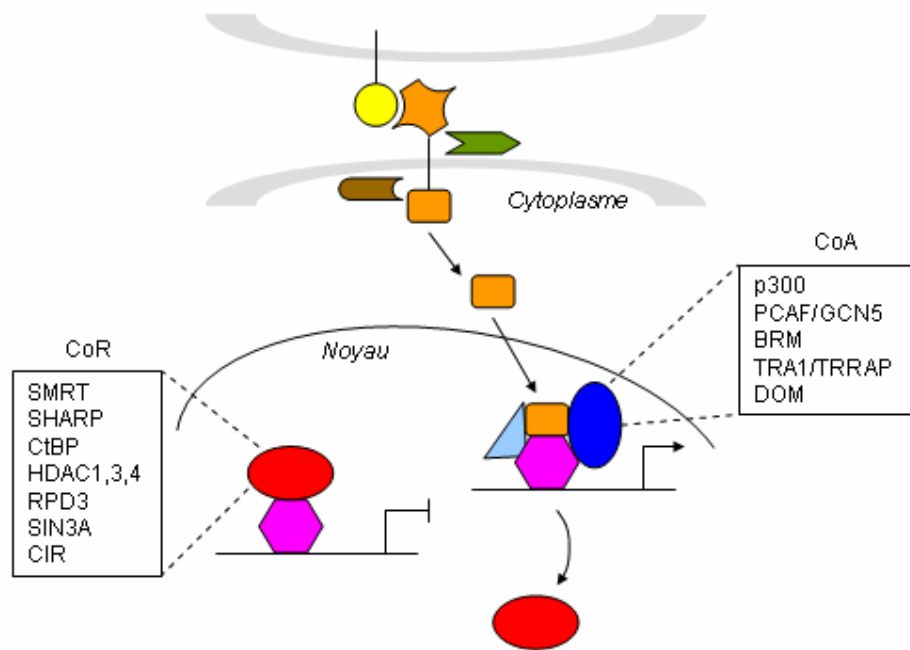
La voie extrinsèque de l'apoptose implique l'activation des récepteurs de mort par leurs ligands. De façon générale, l'activation de ces voies de signalisation induit l'apoptose des cellules, mais semble aussi avoir un effet négatif sur l'érythropoïèse en influençant la prolifération et la maturation des cellules érythroïdes immatures(104). Les récepteurs TNF-R1 (Tumor necrosis facteur receptor 1), Fas et TRAIL-R sont généralement exprimés de façon plus importante sur les cellules érythroïdes immatures, quoi que les niveaux d'expression de ces récepteurs restent significatifs tout au long de la différenciation. Le ligand du TNF-R1, le TNF- $\alpha$ , est sécrété par les CFU-E ainsi que par les macrophages. L'activation de cette voie semblerait influencer particulièrement la formation des BFU-E. FasL est principalement exprimé sur les cellules érythroïdes matures, soit au stade orthochromatique. L'activation de la voie Fas par FasL impliquerait un mécanisme de feedback négatif bloquant la maturation des cellules immatures en présence d'une grande

quantité de cellules matures. Le patron d'expression de TRAIL est similaire à celui de FasL sur les cellules érythroïdes, mais est aussi sécrété par les macrophages.

#### 2.1.2.3.5 La voie Notch

La voie Notch est une voie associée à la différenciation, la prolifération et la survie de plusieurs types cellulaires. Dans le système hématopoïétique, plusieurs groupes ont montré l'importance de la voie Notch dans l'autorenouvellement des CSH(105-107). D'autre part, la voie Notch est clairement impliquée dans l'engagement et la différenciation vers la lignée T(108-110). Quant à la voie érythroïde, la voie Notch semble impliquée dans la prolifération des progéniteurs érythroïdes ainsi qu'au niveau de la différenciation érythroïde(111-124).

Chez les mammifères, 4 récepteurs Notch (Notch1-4) ont été identifiés. Particulièrement, les récepteurs Notch1 et Notch2 ont été associés à l'érythropoïèse et ils sont exprimés sur les CSH, les PMP, les CMP et les MEP (Notch2 seulement) (125). Il semblerait par la suite que l'expression des récepteurs Notch diminue avec la différenciation terminale. En effet, les cellules Ter119+ (marqueur de cellules érythroïdes matures) n'expriment pas les récepteurs Notch1 et Notch2 (126). Les ligands des récepteurs Notch sont de la famille Delta (Delta-like 1, 3 et 4) ou de la famille Jagged (Jagged 1-2). Les ligands sont exprimés à la surface d'une grande variété de types cellulaires. Le fonctionnement de la voie est présenté à la figure 2.6. Plusieurs gènes ont été identifiés comme des cibles de la voie Notch. La famille de gène la plus étudiée est la famille *Hairy enhancer of split* dont *Hes1* est un membre très important(127). Ce dernier est un répresseur de la transcription et serait impliqué dans une série de processus cellulaires tels que la prolifération et la survie. Il est à noter que *Hes1* est aussi régulé par des modes de régulation qui sont indépendants de la voie Notch(128-131).



**Figure 2.6. La voie Notch**

(Adapté de S.J. Bray (132))

L'interaction d'un récepteur Notch (orange) avec son ligand (jaune) induit le clivage extra- et intra-cellulaire du récepteur par des enzymes métalloprotéases de la famille ADAM (vert) et par le complexe  $\gamma$ -sécrétase (brun) (132). La sous-unité intra-cellulaire du récepteur Notch (ICN) est alors relâchée et relocalisée au noyau. ICN agit à titre de co-facteur de transcription dans un complexe nucléé par RBPJ (CSL; rose) dont fait parti le coactivateur Mastermind (bleu pâle). Ce complexe est associé à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles grâce au recrutement d'autres coactivateurs (CoA; bleu foncé). Lorsque le récepteur Notch n'est pas activé, RBPJ s'associe tout de même au promoteur des gènes cible mais il est alors accompagné de corépresseurs (CoR; rouge) et inhibe la transcription(133).

Le rôle de la voie Notch lors de l'érythropoïèse reste encore à clarifier. Plusieurs études en apparence contradictoire complexifient le portrait. Tout d'abord, des études montrent que

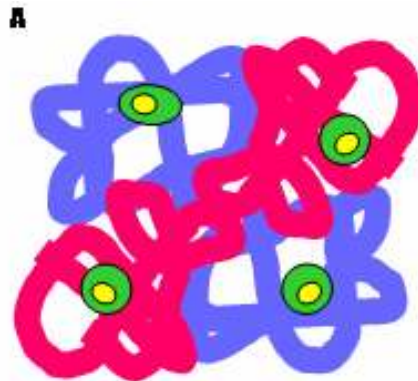
l'activité de la voie Notch inhibe la prolifération des cellules hématopoïétiques progénitrices humaines (CD34+) et murine (FDCP-Mix)(116,123,134). En plus de promouvoir la prolifération des progéniteurs, l'activation de la voie par le ligand Delta 4 influence positivement la formation des BFU-E et promeut la différenciation érythroïde(119,120). Par ailleurs, la voie Notch favorise la différenciation érythroïde des progéniteurs multipotents en collaboration avec la voie du SCF ou de l'EpoR (114,116,123). En contrepartie, plusieurs études rapportent que Notch bloque la différenciation érythroïde. Par exemple, il a été rapporté que la voie Notch inhibe la différenciation érythroïde des K562 (lignée leucémique CML) et des cellules MEL (mouse erythroleukemia; proerythroblastes) par l'inhibition de l'activité de GATA-1 et la maintenance de l'expression de GATA-2(111,113,121,122). L'activation de la voie Notch par le ligand Delta4 dans un modèle de cellules engagées vers la lignée érythroïde (ECFC; *erythroid colony forming cells*) induit aussi un blocage dans la maturation érythroïde (118). De façon intrigante, une diminution de l'expression de ICN1 dans les MEL influence négativement la différenciation érythroïde (111,112). Ainsi, il semblerait que le niveau d'activation de la voie Notch soit impliqué dans la promotion d'une différenciation érythroïde adéquate selon le stade de différenciation. Une expression plus élevée du récepteur Notch dans les progéniteurs serait associée à la prolifération de ces cellules alors que la diminution de l'activation du récepteur favoriserait la différenciation. De façon intéressante, la voie Notch régule aussi l'apoptose dans les cellules érythroïdes(111,117).

#### **2.1.2.4 Les globines**

L'hémoglobine contenue dans les globules rouges permet le transport de l'O<sub>2</sub> dans le sang. Une molécule d'hémoglobine est formée de quatre chaînes de globine ainsi que de quatre molécules d'hème contenant chacune un ion de fer qui séquestre l'O<sub>2</sub> (Figure 2.7). Pour former l'hémoglobine, les cellules érythroïdes doivent mettre en place un programme d'expression génique spécifique qui permettra entre autres l'expression spatio-temporelle des globines et des enzymes de la biosynthèse de l'hème. Contrairement aux gènes de globine qui sont exclusivement exprimés dans les cellules érythroïdes, les gènes de la

biosynthèse de l'hème sont aussi exprimés dans d'autres tissus puisque le cytochrome c, impliqué dans la synthèse d'ATP des mitochondries et médiateur de la voie apoptotique intrinsèque, possède aussi un groupement hème.

Chez l'adulte, la forme la plus fréquente d'hémoglobine, l'hémoglobine A (HbA), est constituée de deux chaînes de globine  $\alpha$  et deux chaînes de globine  $\beta$  (Figure 2.7; (135)). Ces deux chaînes sont d'environ 16 kDa chacune chez l'humain sont arrangées en tétramère. Les gènes qui codent pour ces chaînes se retrouvent sur deux loci distincts soit le locus  $\alpha$ -globine et le locus  $\beta$ -globine. La régulation transcriptionnelle de ces deux loci a été grandement étudiée tant pour la compréhension et le traitement de diverses maladies que parce que ces loci sont des modèles de choix pour l'étude de mécanismes fondamentaux de régulation transcriptionnelle tissu- et développement-spécifique. Des mécanismes de régulation transcriptionnelle en *cis* et en *trans* ainsi que des mécanismes de régulation à distance ont été identifiés aux loci  $\alpha$  et  $\beta$  (section 2.1.3.1.4). Plusieurs mécanismes de régulation transcriptionnelle sont similaires entre les deux loci et de nombreux facteurs de transcription sont connus pour réguler l'expression des gènes des deux loci. De plus, l'expression des gènes des deux loci est co-régulée lors du développement pour permettre une production équilibrée des chaînes de globine qui entreront dans la composition de l'hémoglobine. Par contre, bien que le locus  $\alpha$ -globine soit très bien caractérisé, l'étude du locus  $\beta$ -globine semble avoir suscité plus d'effort de recherche au cours des dernières décennies.



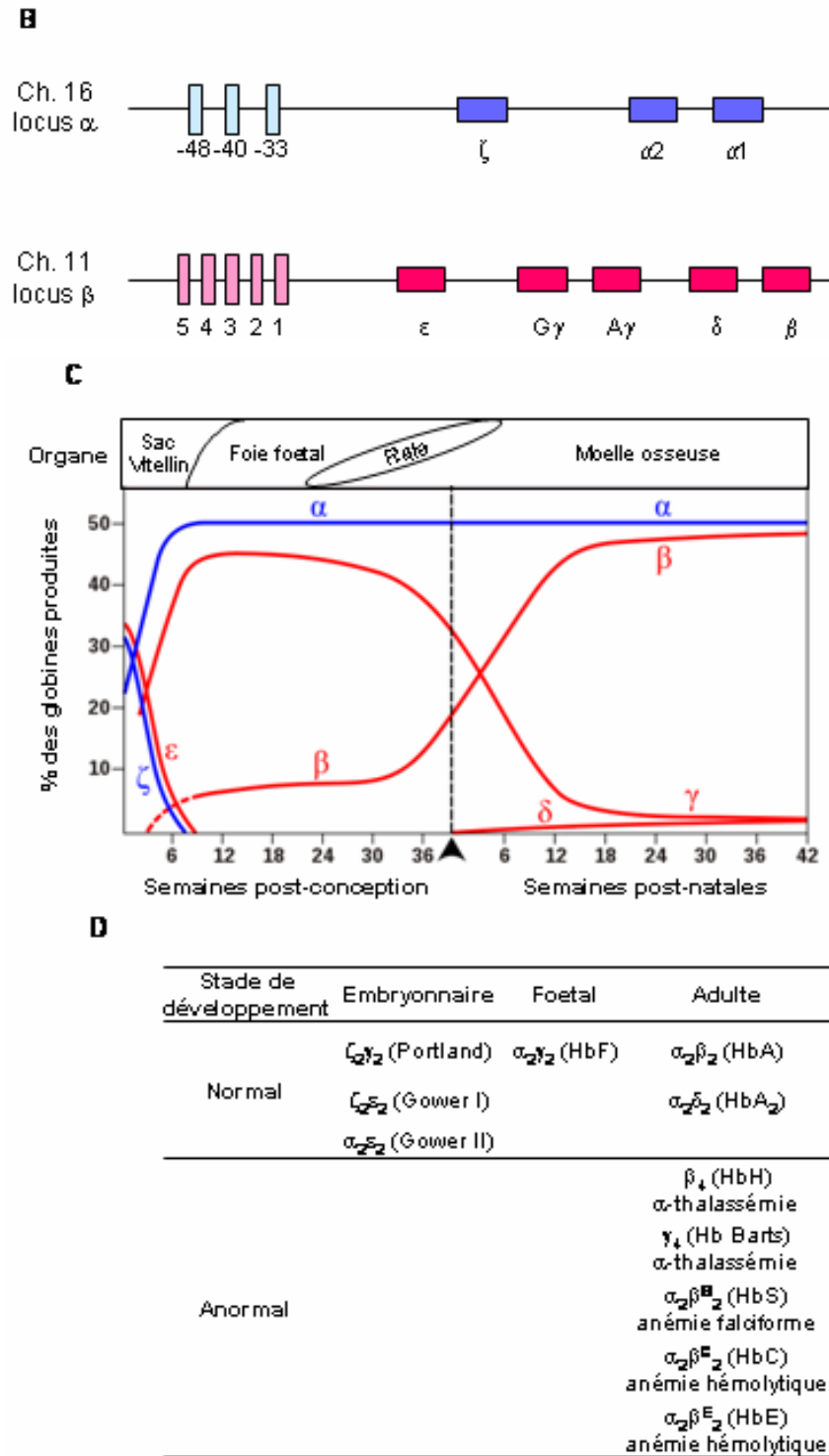


Figure 2.7. L'hémoglobine et les loci de globines

(A) Une molécule d'hémoglobine est formé d'un tétramère de chaînes de globines : deux provenant du locus  $\alpha$ -globine (bleu) et deux provenant du locus  $\beta$ -globine (rouge). Chaque chaînes comporte un groupement hème (vert) et un ion de fer (jaune). (B) Les loci humains  $\alpha$ -globine et  $\beta$ -globine comporte respectivement 3 et 5 gènes qui sont exprimés lors du développement. Chacun des loci possède aussi une région de régulation situé en 5' du locus constitué de région hypersensible à la DNase I (HS). Pour le locus  $\alpha$ -globine sont représentées les régions HS-48 (-48), HS-40 (-40) et HS-33 (-33); pour le locus  $\beta$ -globine sont représentées les régions HS5 (5), HS4 (4), HS3 (3), HS2 (2), HS1 (1). Ch. : Chromosome (C) Niveau d'expression des chaînes de globine lors du développement chez l'humain. Les différents tissus (organes) où sont produites les globines sont indiqués. On observe les commutations  $\zeta$ -à- $\alpha$  et  $\varepsilon$ -à- $\gamma$  au stade embryonnaire et la commutation  $\gamma$ -à- $\beta$  au stade adulte. (D) Types d'hémoglobine formés lors du développement. Les différents types d'hémoglobine caractérisant certaines maladies sont aussi indiqués.

#### 2.1.2.4.1 Le locus $\alpha$ -globine

Le locus  $\alpha$ -globine est situé sur le chromosome 16 chez l'humain et 11 chez la souris. Le locus  $\alpha$  se trouve dans une région particulièrement riche en résidus nucléotidiques GC et est flanqué de plusieurs *housekeeping genes*(136). La taille du locus est d'environ 130 kb(137). La version simplifiée du locus chez l'humain comprend 3 gènes de globine fonctionnels : 5'- $\zeta$ - $\alpha 2$ - $\alpha 1$ -3' (Figure 2.7; (138). Le gène  $\zeta$  est exprimé au stade embryonnaire alors que les gènes  $\alpha 2$  et  $\alpha 1$  sont les principaux gènes exprimés au stade fœtal et chez l'adulte. L'homologie entre les deux gènes  $\alpha$  d'une même espèce est très élevée (>96%) et les chaînes peptidiques sont identiques. Malgré que les deux gènes soient très fortement exprimés, il semblerait que le gène  $\alpha 2$  soit légèrement plus exprimé que le gène  $\alpha 1$ . Le modèle animal privilégié pour l'étude de la régulation du locus  $\alpha$ -globine humain est la souris contenant un locus  $\alpha$  humain qui a été inséré en remplacement du



locus  $\alpha$  murin(139). Ces souris transgéniques expriment normalement les chaînes  $\zeta$  et  $\alpha$  humaines qui forment l'hémoglobine avec les chaînes de globine du locus  $\beta$  murin.

Les promoteurs des gènes  $\zeta$  et  $\alpha$  sont riches en sites de liaison pour des facteurs de transcription tels que GATA-1, NF-E2 et EKLF(140-142). En amont du gène  $\zeta$ , plusieurs régions hypersensibles à la DNaseI (HS) sont aussi connues pour être importantes pour l'expression à haut niveau des gènes du locus. Parmi ceux-ci, on trouve chez l'humain les HS-48, HS-40 et HS-33 qui sont conservés à travers les espèces(143). Ces régions sont considérées comme des *enhancers* situés à distance qui peuvent influencer l'expression des gènes du locus via des interactions intrachromosomiques à distance (*looping*; section 2.1.3.1.4). Le plus important site dans le locus  $\alpha$ -globine est le HS-40 (HS-26 chez la souris) qui est considéré comme l'élément de régulation majeur du locus(144,145). Plusieurs facteurs de transcription s'associent à cette région comme GATA-1, NF-E2 et EKLF(140-142). De plus, la délétion de ce site chez la souris entraîne une diminution de 50% de l'expression des gènes  $\alpha$ (146). Il est intéressant de noter que la majorité des cas de  $\alpha$ -thalassémie soient causées par une délétion de ce site causant une expression anormale des gènes  $\alpha$ -globine(138).

#### 2.1.2.4.2 Le locus $\beta$ -globine

Le locus humain  $\beta$ -globine (hu $\beta$ ) se trouve sur le chromosome 11 et possède une taille d'environ 70 kb. Il comporte 5 gènes exprimés séquentiellement lors du développement et un pseudo gène: 5'- $\epsilon$ -G $\gamma$ -A $\gamma$ - $\psi\beta$ - $\delta$ - $\beta$ -3' (Figure 2.7; (147). De façon similaire au locus  $\alpha$ , il y a présence en amont du gène  $\epsilon$  des HS qui sont impliqués dans la régulation des gènes du locus. Les HS5-HS4-HS3-HS2-HS1 constituent le LCR (*Locus control region*). Les HS2, HS3 et HS4 auraient des fonctions prédominantes sur la promotion de l'expression des gènes du locus(148,149). Chez la souris, le locus se trouve sur le chromosome 7 et comporte 4 gènes : 5'- $\epsilon\gamma$ - $\beta$ h1- $\beta$ maj- $\beta$ min-3'. Le locus murin comporte aussi un LCR composé de 6 HS (HS6 à HS1) mais il a été proposé que la fonction et l'importance des

différents sites HS varie entre la souris et l'humain(150). Par exemple, la délétion du site HS2 dans le locus murin a un effet moins important sur l'expression du gène  $\beta$ maj que la délétion du HS2 humain dans la souris transgénique pour le locus hu $\beta$ (151-155). Un autre aspect intéressant du locus hu $\beta$  est la présence d'éléments *insulators* (5'HS5 et 3'HS1) qui peuvent s'associer au facteur de transcription CTCF et qui auraient comme fonction de « protéger » le locus (voir section 2.1.4.1). Finalement, à la différence du locus  $\alpha$  qui est flanqué de gènes exprimés dans tous les tissus, le locus hu $\beta$  est flanqué des gènes codant pour les récepteurs olfactifs (gènes tissu-spécifiques)(156).

L'expression des gènes du locus hu $\beta$  est régulée lors du développement. Chez l'humain, le gène  $\epsilon$  est exprimé au stade embryonnaire, les gènes  $\gamma$  au stade fœtal et les gènes  $\delta$  et  $\beta$  au stade adulte (après la naissance)(157,158). Les niveaux d'expression de  $\delta$  sont beaucoup plus faibles que les niveaux d'expression de  $\beta$ . Chez la souris, les gènes  $\epsilon\gamma$  et  $\beta h1$  sont exprimés au niveau embryonnaire et les gènes  $\beta$ maj et  $\beta$ min sont exprimés au stade fœtal et adulte. Le passage de l'expression d'un gène du locus à l'autre est appelé commutation (*switch*)(157). Chez l'humain on assiste à deux vagues de commutation :  $\epsilon$ -à- $\gamma$  et  $\gamma$ -à- $\beta$ . Chez la souris on n'observe pas de commutation lors du passage du stade fœtal au stade adulte. Il a toutefois été rapporté qu'un premier *switch* de maturation est observé au stade embryonnaire ( $\beta h1$ -à- $\epsilon\gamma$ ) suivi du *switch*  $\beta h1$ -à- $\beta$ min/maj(47). Un modèle grandement utilisé pour l'étude de la régulation du locus hu $\beta$  est la souris transgénique pour le locus complet (line 2; section 3.2.1.1.1). Chez cette souris, on observe une expression faible du gène  $\epsilon$  au stade embryonnaire ainsi qu'une forte expression des gènes  $\gamma$ . Ensuite, tel qu'observé pour le locus murin, on n'observe qu'une commutation au stade fœtal où on note l'extinction graduelle de l'expression des gènes  $\gamma$  et une augmentation de l'expression des gènes  $\delta$  et  $\beta$ (159).

Tel que décrit pour le locus  $\alpha$ , les promoteurs des différents gènes du locus hu $\beta$  contiennent plusieurs sites de liaison pour des facteurs de transcription tels que GATA-1, EKLF et NF-E2(160). De plus, les différents sites HS sont aussi des régions qui peuvent s'associer à ces

différents facteurs(160). Le LCR, étant situé à distance des promoteurs, possède aussi la capacité d'interagir directement avec les promoteurs du locus par un mécanisme de *looping* afin de favoriser de hauts niveaux d'expression des gènes. D'autres mécanismes ont été décrits permettant aussi de favoriser l'activation des gènes de globine à distance (section 2.1.3.1.4).

### **2.1.2.5 Maladies des cellules érythroïdes**

Étant donné la fonction vitale des cellules érythroïdes, un déséquilibre dans le nombre de cellules ou une fonction anormale de ces cellules peuvent avoir de graves conséquences sur l'organisme. Une des conditions les plus connue est l'anémie qui généralement se définit par une capacité insuffisante des globules rouges à transporter l'O<sub>2</sub> dans le sang pour satisfaire les besoins de l'organisme. Ceci se traduit souvent par une diminution de l'hémoglobine circulante. Il existe un grand nombre de formes d'anémie ayant des causes variées et parfois complexes. À l'opposé de l'anémie, certaines maladies peuvent engendrer une polyglobulie ou plus spécifiquement, une augmentation significative du nombre de globules rouges circulants. Finalement, les maladies malignes tels les cancers ou les syndromes myélodysplasiques peuvent aussi influencer le nombre d'érythrocytes circulants.

#### *2.1.2.5.1 L'anémie*

Il serait très ambitieux de tenter de décrire toutes les formes d'anémies. Certaines étant actuellement l'objet d'importantes recherches seront brièvement décrites.

Une des classes d'anémies se caractérise par un désordre hémolytique causé par une réduction de la durée de vie du globule rouge en circulation. Les hémoglobinopathies telles que les thalassémies sont des maladies héréditaires qui causent une anémie hémolytique due à une anomalie de synthèse de l'hémoglobine. Les thalassémies sont définies par une diminution ou l'absence d'une ou plusieurs chaînes d'hémoglobine(161). Les  $\alpha$ - et  $\beta$ -thalassémies (déficit de la chaîne  $\alpha$  ou  $\beta$ ) font parti des maladies monogéniques héréditaires graves les plus fréquentes dans le monde avec une prévalence marquée dans les pays où la

malaria est endémique(162). Les causes génétiques des  $\alpha$ -thalassémies varient de la recombinaison homologue, à la délétion ou à des mutations dans un des gènes  $\alpha$  causant une production à un niveau anormal de l'ARNm et de la protéine  $\alpha$ -globine. Les formes les plus communes sont causées par une délétion hétérozygote des deux gènes  $\alpha$  qui sont exprimés au stade adulte. L' $\alpha$ -thalassémie induit une augmentation de la production des chaînes  $\gamma$  et  $\beta$  du locus hu $\beta$ (163). Il est donc possible d'observer chez ces patients des formes d'hémoglobine formée de quatre chaînes  $\gamma$  (hémoglobine de Bart) ou de quatre chaînes  $\beta$  (hémoglobine H) (Figure 2.7). Dans les deux cas, ces hémoglobines sont non-fonctionnelles vu leur trop grande affinité pour l'O<sub>2</sub>. Contrairement aux  $\alpha$ -thalassémies, les  $\beta$ -thalassémies sont rarement causées par une délétion du gène  $\beta$ . Par contre, il existe une multitude de mutations dans ce gène ou dans les régions de régulation du locus hu $\beta$  causant une diminution ou une absence de production de la chaîne  $\beta$ -globine(164). Il en résulte habituellement une augmentation de l'expression des chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\alpha$ . Les chaînes  $\alpha$  produites en excès par rapport aux chaînes  $\beta$  vont soit s'associer aux chaînes d'hémoglobine A<sub>2</sub> ou précipiter dans les érythrocytes et causer une érythropoïèse inefficace. Selon le degré de sévérité de la maladie, certains patients produiront assez de chaînes  $\gamma$  qui s'associeront aux chaînes  $\alpha$  (hémoglobine F) (Figure 2.7), mais cette augmentation varie d'une cellule à l'autre.

Outre les thalassémies, il existe une variété d'hémoglobinopathies causant la production de chaînes de globine anormales. C'est le cas de l'anémie à hématie falciforme (*sickle cell anemia*) ou drépanocytose(165). Une mutation à la position 6 de la chaîne  $\beta$  (GLU→VAL) est à l'origine de cette maladie et cause la production d'une chaîne  $\beta$  anormale qui entrera dans la composition de l'hémoglobine S (Figure 2.7). Cette forme d'hémoglobine a tendance à polymériser avec d'autres molécules d'hémoglobine S sous une forme désoxygénée. Ceci fera en sorte que l'érythrocyte sera déformé et aura tendance à bloquer les petits vaisseaux.

Une des façons de corriger les problèmes de production de la chaîne  $\beta$  est l'augmentation des chaînes  $\gamma$ . Une avenue de recherche dans ce domaine est l'étude du syndrome de la persistance de l'hémoglobine foetale (PHbF)(166). La compréhension des causes de ce syndrome pourrait permettre de développer des stratégies pour corriger ou atténuer la  $\beta$ -thalassémie.

#### *2.1.2.5.2 Maladie de Vaquez (Polycythemia vera; PV)*

Cette maladie fait partie des syndromes myéloprolifératifs les plus fréquents. Elle est caractérisée par une polyglobulie essentielle causée par une mutation dans les CSH. La majorité des cas de PV sont associées à une mutation dans le gène JAK2 qui code pour l'enzyme impliquée entre autre dans la signalisation de la voie de l'EpoR(167) (section 2.1.2.3.1). Cette mutation induit une activation constitutive de l'enzyme et interfère avec les processus normaux de prolifération et de différenciation des cellules myéloïdes. Chez plusieurs patients, la PV évolue vers une leucémie myéloïde aiguë.

#### *2.1.2.5.3 Syndromes myélodysplasiques*

Une délétion dans le bras long du chromosome 5 est associée à plusieurs hémopathies. Parmi celles-ci, le syndrome 5q est une classe reconnue de syndromes myélodysplasiques selon l'organisation mondiale de la santé(168). On observe souvent chez ces patients une diminution de précurseurs érythroïdes associée à une baisse de prolifération. Le gène RSP14 est souvent supprimé dans cette maladie et il a été montré qu'une haploinsuffisance de ce gène mène à une augmentation de l'expression de p53 dans les progéniteurs érythroïdes. p53 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose de ces cellules(169).

#### *2.1.2.5.4 Leucémies myéloïdes aiguës (LMA)*

Les leucémies sont des cancers du sang qui peuvent affecter les différentes lignées hématopoïétiques. Plusieurs mutations ont été identifiées comme étant la cause et/ou associées à divers types de leucémies. Il est généralement admis que l'accumulation de plus

d'une mutation est requise pour le développement de la leucémie. De façon générale, les altérations génétiques surviennent dans deux classes de gènes soit au niveau des gènes qui codent pour des facteurs de transcription ou pour des protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire. Les translocations chromosomiques modifient la fonction des protéines impliquées. Dans le cas des translocations AML1-ETO ou PML-RAR $\alpha$ , la fonction des facteurs de transcription AML1 et RAR $\alpha$  est altérée et la protéine de fusion amène une expression aberrante des gènes cibles de ces facteurs de transcription(170). La mutation ponctuelle du gène FLT3 ou la translocation BCR-ABL amènent toutes deux une activité kinase constitutive associée à un signal de prolifération pour la cellule qui exprime ces gènes mutés(171).

La LMA est caractérisée par une accumulation de blastes (cellules hématopoïétiques immatures) dans la moelle osseuse causant une production anormale des différentes cellules myéloïdes matures. Différentes classes de LMA existent selon l'OMS(172). Parmi celles-ci, la leucémie aiguë érythroïde (LAE) est une forme rare qui est divisée en deux catégories soit la leucémie érythroïde pure et l'érythroleucémie(173). La première est caractérisée par la présence de plus de 80% de cellules immatures dans la moelle osseuse appartenant à la lignée érythroïde. Le deuxième cas est un sous-type ayant une composante myéloïde et la moelle de ces patients contient plus de 20% de myéloblastes et plus de 50% de précurseurs érythroïdes. Malheureusement, étant donné le petit nombre d'études portant sur des cas de LAE, très peu de données moléculaires existent pouvant expliquer la cause de ce type de leucémie.

## **2.1.3 Régulation transcriptionnelle dans les cellules érythroïdes**

### **2.1.3.1 Principe général de la transcription chez les eucaryotes**

#### *2.1.3.1.1 L'ARN polymérase*

L'enzyme principale impliquée dans la transcription est l'ARN polymérase. Cette enzyme possède la capacité de lire l'ADN et de produire un ARN correspondant à la séquence d'ADN. Cinq ARN polymérase ont été identifiées jusqu'à présent(174). L'ARN polymérase I est localisée dans les nucléoles et permet la synthèse de plusieurs ARNr (ARN ribosomiaux). Ces ARNr ne sont pas traduits et entrent directement dans la composition du ribosome. L'ARN polymérase II (Pol II) se trouve dans le nucléoplasme et permet la production de tous les ARNm (ARN messagers) qui sont les précurseurs des protéines et qui seront traduits par le ribosome. L'ARN polymérase III se trouve aussi au nucléoplasme et permet la synthèse spécifique de l'ARNr 5S ainsi que des différents ARNt (ARN de transfert). Ces ARN bien particuliers peuvent lier des acides aminés spécifiques et sont utilisés par le ribosome pour la synthèse des protéines à partir des ARNm. Finalement, les ARN polymérase IV et V qui ont été découvertes plus récemment auraient un mécanisme d'action particulier associé à la répression des gènes(175). Ces enzymes ont surtout été étudiées chez la plante.

#### 2.1.3.1.2 La transcription par l'ARN polymérase II

La Pol II possède un rôle central dans l'expression spécifique des ARNm. La fine régulation de l'activité de cette enzyme permet à la cellule de gérer les niveaux des différents ARNm produits à différents moments. De façon générale, la Pol II doit être recrutée au promoteur d'un gène pour être en mesure de le transcrire. Divers éléments peuvent influencer la transcription comme la structure de la chromatine (section 2.1.4.1) ou la présence de facteurs et cofacteurs de transcription (section 2.1.3.1.5). Les promoteurs des gènes sont des éléments de régulation en *cis*, c.-à-d. ce sont des éléments d'ADN adjacent au gène à transcrire impliqués dans sa régulation transcriptionnelle (section 2.1.3.1.4). Parmi les éléments qui peuvent être présents dans un promoteur, la boîte TATA est d'une très grande importance. Cette boîte est le site de liaison pour TBP (*TATA binding protein*) qui est une sous-unité du facteur général de transcription TFIID. De façon générale, le recrutement de TFIID au promoteur est la première étape dans la formation du complexe de préinitiation de la transcription (CPI; *preinitiation complex*, PIC). Ce complexe comprend

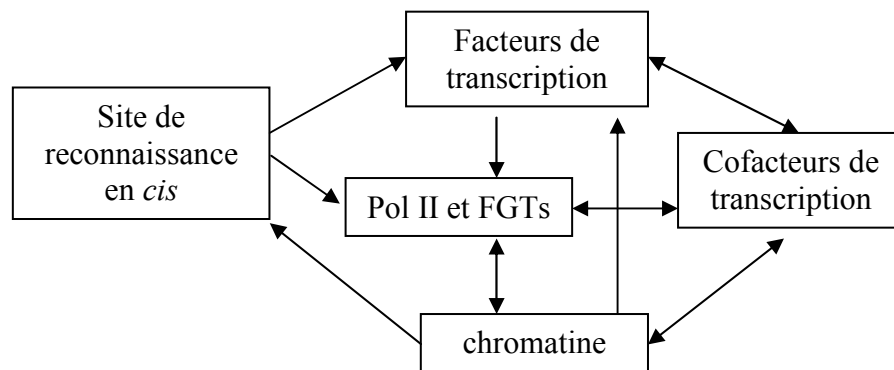
tous les facteurs généraux de transcription (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIH) ainsi que la Pol II(176). L'assemblage des différents facteurs généraux de transcription au niveau du promoteur est un prérequis pour l'initiation de la transcription par la Pol II à un niveau basal. En fait, TFIIH qui est le dernier facteur à être recruté possède une activité kinase permettant la phosphorylation de la sérine 5 du domaine C-terminal de la Pol II (CTD)(177). Un autre élément impliqué dans la phosphorylation du CTD est le complexe Médiateur grâce à l'activité kinase de CDK8(178). Ce complexe possède un grand nombre de sous-unités dont la composition varie selon les promoteurs. La phosphorylation de la sérine 5 du CTD permet l'initiation de la Pol II pour la transcription, mais ne favorise pas nécessairement la transcription active du gène. En effet, la Pol II effectuerait plusieurs cycles de transcription abortive avant de démarrer efficacement la transcription du gène, soit la phase d'élongation(179). De plus, il a été montré que les facteurs DSIF et NELF bloquent l'élongation pour permettre l'étape de *capping* de l'ARNm(180). En d'autres mots, le recrutement de la Pol II au promoteur et l'initiation de la transcription sont dissociés de la transcription active qui débute en réponse à différents stimuli. Plusieurs facteurs ont été identifiés comme des facteurs d'élongation de la Pol II (181). Par exemple, le complexe P-TEFb, qui permet la phosphorylation de la sérine 2 du CTD de la Pol II grâce à l'activité kinase de CDK9, est aussi un important activateur de l'élongation qui favorise le relâchement de DSIF et NELF du promoteur(182). La dernière étape de la transcription par la Pol II est la terminaison, alors que l'ARNm qui a été produit est clivé et subi la polyadénylation par le facteur CPSF(183). L'ARNm sera ensuite transporté au cytoplasme où il subira différentes étapes de maturation et où il sera traduit par le ribosome.

#### *2.1.3.1.3 Les éléments qui influencent la transcription*

L'association de l'ARN Pol II au niveau d'un gène ainsi que l'élongation et la terminaison efficaces tels que décrits à la section précédente sont les étapes essentielles pour la production d'un ARNm. Une série de facteurs peuvent influencer ces différentes étapes pour favoriser ou défavoriser la transcription. Tout d'abord, des éléments encodés par l'ADN (éléments en *cis*; section 2.1.3.1.4) représentent des sites de liaison pour des



facteurs de transcription qui ont la capacité de recruter des cofacteurs de transcription (section 2.1.3.1.5) et/ou des éléments de la machinerie transcriptionnelle (section 2.1.3.1.2). D'autre part, la structure de la chromatine (section 2.1.4.1) influence la capacité des facteurs et cofacteurs de transcription de s'associer à l'ADN. Inversement, les cofacteurs de transcription, une fois recrutés au niveau de la chromatine peuvent influencer la structure de la chromatine ainsi que la stabilité des facteurs de transcription et de la machinerie transcriptionnelle (Figure 2.8).



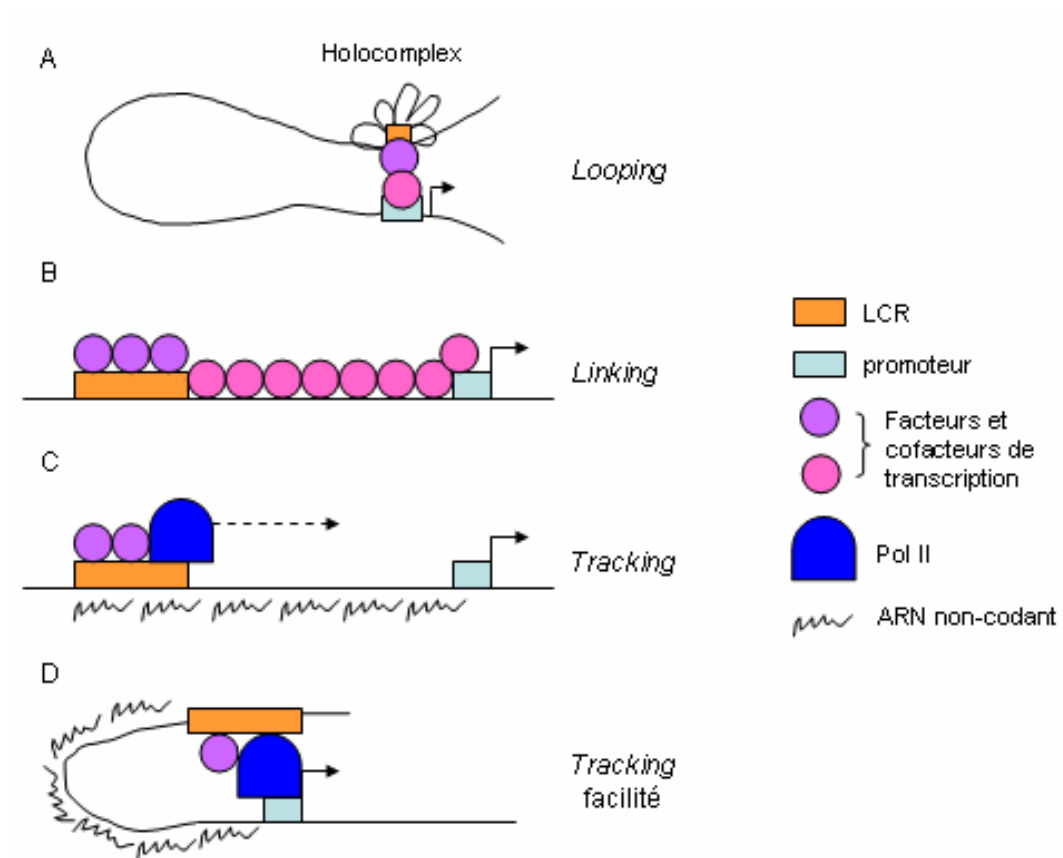
**Figure 2.8. Interrelation entre les différents éléments qui influencent la transcription par l'ARN polymérase II**

#### 2.1.3.1.4 Les éléments de régulation en cis

Les éléments de régulation en *cis* sont encodés dans la séquence d'ADN. Principalement, ce sont les promoteurs des gènes et les régions *enhancers*. L'organisation de la chromatine de ces régions est modulée par les facteurs et cofacteurs de transcription qui s'y associent et influencent directement les niveaux d'expression des gènes sous leur contrôle. Les éléments en *cis* permettent une expression tissu- et développement-spécifique des gènes qui sont sous leur contrôle. Par exemple, le LCR du locus *huβ* (section 2.1.2.4.2) ainsi que les différents promoteurs des gènes du locus permettent l'expression à haut niveau des gènes de globine uniquement dans les cellules érythroïdes. Les promoteurs et le LCR sont aussi impliqués dans la régulation des gènes du locus lors du développement.

La position et l'organisation de la région promotrice d'un gène varient selon le gène. Certains gènes possèdent plus d'un promoteur permettant une régulation plus spécifique selon le tissu ou le stade de développement. Les promoteurs contiennent des sites de reconnaissance pour différents facteurs de transcription ainsi que pour des éléments de la machinerie transcriptionnelle. La quantité et la position de ces éléments sont variables d'un gène à l'autre.

L'activité du promoteur d'un gène n'est souvent pas suffisante pour permettre l'expression à haut niveau du gène. C'est pourquoi il existe des éléments *enhancer* situés de façon proximale ou distale du gène en 5' ou en 3' du gène. Ces régions *enhancers* possèdent une variété de sites de liaison pour des facteurs de transcription et peuvent aussi recruter la machinerie transcriptionnelle. Tout comme les promoteurs, ces régions sont souvent pauvres en nucléosomes. Un exemple d'un tel élément est le LCR du locus *huβ*. En plus des différents facteurs de transcription qui peuvent s'y associer, la Pol II est aussi recrutée au LCR et promeut sa transcription (ARN non-codant)(184,185). La Pol II peut aussi être transférée à partir d'un élément *enhancer* vers un promoteur par différents mécanismes tels que le *looping*, le *linking* ou le *tracking* (186-192)(Figure 2.9). Des évidences expérimentales existent pour chacun des modèles et il est possible que chacun d'eux ne soit pas mutuellement exclusifs.



**Figure 2.9. Version simplifiée des différents modèles proposés pour l'activation des gènes du locus  $hu\beta$  par le LCR**

(A) Les différents HS du LCR peuvent former un *holocomplex* qui est une structure associée à l'activité du LCR. Il est proposé que le LCR puisse entrer en contact avec les promoteurs via des interactions intrachromosomiques à distance. Des facteurs présents au niveau du LCR et des promoteurs favoriseraient ces interactions. (B) Des facteurs initialement recrutés au niveau du LCR permettraient le recrutement d'autres facteurs et cofacteurs entraînant la formation d'une chaîne de facteurs entre le LCR et les promoteurs. Ces facteurs seraient associés à la formation d'une structure de chromatine permissive. (C) Grâce à des facteurs présents au LCR, la Pol II serait recrutée et produirait une série d'ARN non-codant entre le LCR et les promoteurs. (D) Combinaison des modèles présentés en A et en C.

#### 2.1.3.1.5 Les facteurs et cofacteurs de transcription

Les facteurs généraux de transcription (TFII) sont, en théorie, suffisant pour permettre un niveau de transcription basal. Dans différents contextes, la cellule a besoin d'un niveau d'expression génique supérieur afin de combler ses besoins. Des facteurs de transcription activateurs accompagnés de cofacteurs s'associent alors au niveau des promoteurs et des éléments *enhancers* des différents gènes et stimulent de hauts niveaux de transcription. À l'inverse, la cellule peut devoir réprimer de façon transitoire ou définitive un gène dont l'expression n'est pas désirée. Encore une fois des facteurs de transcription accompagnés d'autres cofacteurs seront recrutés aux promoteurs et aux éléments *enhancers* afin de s'assurer que le CPI ne soit pas formé.

Un facteur de transcription est un élément de régulation en *trans* puisqu'il ne fait pas parti de la séquence codante du gène. Il reconnaît normalement une séquence spécifique sur l'ADN que l'on appelle un site de liaison (élément en *cis*). Le facteur de transcription peut donc être recruté spécifiquement au niveau des gènes qui contiennent la séquence spécifique de liaison pour ce facteur. Les promoteurs contiennent plusieurs sites de liaison pour des facteurs de transcription, ce qui favorise la collaboration entre différents facteurs au niveau d'un même promoteur. La présence de plusieurs sites peut aussi amener une compétition pour des sites adjacents ou pour des facteurs capables de lier le même site de liaison. Alors, les niveaux d'expression des différents facteurs de transcription, leurs modifications post-traductionnelles ou leur stabilité modulent la capacité des différents facteurs de transcription à influencer l'expression d'un gène.

Les cofacteurs ne peuvent pas lier directement l'ADN. Ainsi, ils doivent être recrutés par les facteurs de transcription. Ces facteurs ont des rôles très variés. Certains cofacteurs sont impliqués directement dans l'activité d'un facteur de transcription. D'autres vont agir au niveau de la chromatine soit en modifiant les histones ou le patron de méthylation de l'ADN, soit en remodelant la chromatine. Certains cofacteurs sont impliqués directement dans l'activité de l'ARN polymérase II (tel que p-TEFb).

### 2.1.3.2 Facteurs de transcription dans les cellules érythroïdes

Il existe une grande variété de facteurs de transcription. Certains, sont exprimés de façon ubiquitaire. Ils peuvent réguler des gènes transcrits dans plusieurs types cellulaires ainsi que des gènes tissu-spécifiques. D'autres facteurs de transcription sont exprimés exclusivement dans un ou quelques types cellulaires seulement. De la même façon, ces facteurs peuvent réguler des gènes tissu-spécifiques ainsi que des gènes ubiquitaires. Tel que mentionné précédemment, le premier élément important dans la capacité d'un facteur de transcription à réguler un gène est la présence de son site de reconnaissance dans le promoteur et/ou dans les régions *enhancers* de ce gène. Par contre, la présence d'un site de liaison à l'ADN n'implique pas nécessairement le recrutement du facteur à l'ADN. Ainsi, un facteur exprimé spécifiquement dans les cellules érythroïdes peut réguler un gène ubiquitaire. Par contre, ce même gène sera régulé par d'autres facteurs dans un autre tissu où le facteur érythroïde n'est pas exprimé. La combinaison des facteurs de transcription exprimés dans la cellule influence donc la façon dont les gènes cibles sont régulés. Toutefois, malgré qu'un facteur de transcription soit exprimé, il peut subir des modifications post-traductionnelles ou s'associer à des partenaires par des interactions protéines-protéines qui modifieront son activité.

Un très grand nombre de recherches sur les facteurs de transcription dans les cellules érythroïdes ont utilisé les loci  $\alpha$ - et  $\beta$ -globine comme modèle puisqu'ils sont composés de gènes érythroïde-spécifiques. Au départ, les facteurs de transcription identifiés étaient des activateurs de la transcription. Il s'est avéré par la suite que certains de ces facteurs pouvaient aussi être des répresseurs dans les cellules érythroïdes soit à un stade de développement différent, soit à un promoteur différent. D'autres facteurs de transcription ont été initialement identifiés suite à la caractérisation d'une translocation chromosomique associée à une leucémie. De nombreux facteurs de transcription exprimés dans les cellules érythroïdes ont été associés à la régulation transcriptionnelle dans ces cellules (Tableau 2.1). La majorité de ces facteurs jouent un rôle dans la régulation des gènes de globine et

plusieurs influencent aussi l'expression d'autres gènes. Les facteurs qui nous ont particulièrement intéressés dans cette étude seront décrits dans cette section.

**Tableau 2.1. Liste non-exhaustive des facteurs de transcription exprimés dans les cellules érythroïdes ainsi que leur partenaires connus**

Facteur de transcription		Partenaires			
Famille	Nom	Facteur de transcription	Cofacteur activateur	Cofacteur répresseur	CPI
GATA	GATA-1	EKLF		FOG1	
		TAL-1		EZH2	
		PU.1		Mi-2	
		GFI1B	CBP/p300	HDAC1	
		MeCP1	BRG1	HDAC2	
GATA	GATA2	Sp1		ETO-2	
			LDB1	CtBP	
				LSD1	
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (Sp/KLF)	KLF1 (EKLF)	GATA-1	CBP/p300	Mi-2	
			BRG1	mSin3A	
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (Sp/KLF)	Sp1	GATA-1	CBP/p300	HDAC1	
		GATA2			
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (Ikaros)	Ikaros		BRG1	Mi2β	
				HDAC1 et 2	
				mSin3A	
				CtBP	
				LSD1	
C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> (SNAG)	GFI1B	GATA-1		coREST	
				HDAC1	
				HDAC2	
bHLH (classe I)	E12, E47 (E2A)		CBP/p300		
			PCAF		
bHLH (Classe II)	TAL1	E2A	CBP/p300	mSin3a	
		Sp1	PCAF	LSD1	
		GATA-1	LMO2	ETO-2	
		GATA2	LDB1	MTGR1	
		GFI1B	BRG1	HDAC1 et 2	
bHLH (LZ)	USF1, USF2	MAF	PRMT1		
		NF-E2 p45	CBP/p300	Aucun	
		Sp1	PCAF	connu	
			SET1		

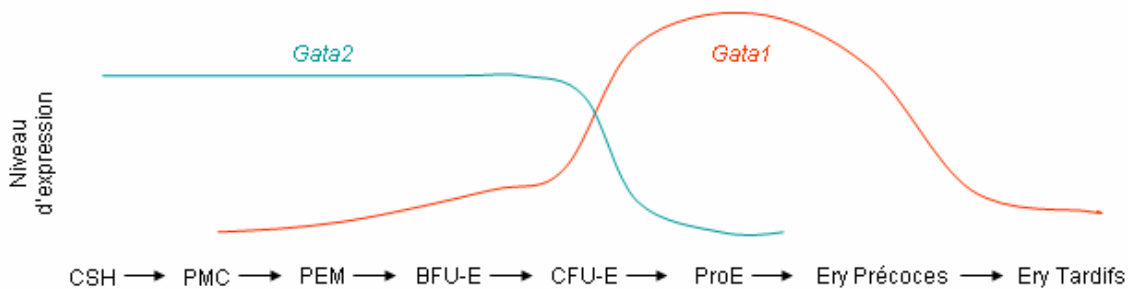
bHLH (classe III)	c-myc	Sp1	CBP/p300	DNMT3A	TBP TFIIF TAF 1B, 2B, 9, 12
ETS	PU.1	MeCP2	CBP/p300	mSin3A HDAC1	TBP
bZip	NFE2 p45		CBP/p300 G9a	G9a	TAF <sub>II</sub> 130
bZip	MafG, MafK		ASH2L/MLL2 CBP/p300		
MBD	MeCP2	PU.1		Mi-2 Sin3 HDACs	

#### 2.1.3.2.1 GATA-1

Les facteurs de la famille GATA, au nombre de 6, lient l'ADN sur la séquence WGATAR. Le facteur GATA-1 a d'abord été catégorisé comme un facteur érythroïde spécifique puisqu'il est exprimé de façon très importante dans les cellules érythroïdes. De plus, les souris déficientes pour GATA-1 meurent très tôt lors du développement (e10.5-e11.5) dû à une érythropoïèse primitive inefficace(193). Par contre, il s'est avéré que GATA-1 est aussi un important régulateur de la mégacaryopoïèse et est aussi exprimé dans les éosinophiles, les mastocytes et les cellules dendritiques(194). GATA-1 est considéré comme un régulateur central de l'érythropoïèse et peut réguler une très grande variété de gènes dans les cellules érythroïdes. La majorité des gènes érythroïdes spécifiques tels que les gènes de globine sont régulés par GATA-1. Plusieurs gènes codant pour des facteurs de transcription sont activés par GATA-1 tels que *Eklf* et *p45* (195,196). D'autre part, plusieurs gènes associés au cycle cellulaire (ex : *p21* (197)) et à l'apoptose (ex : *Bcl-xL* (198)) sont aussi régulés par GATA-1. Des études à grandes échelles ont identifiées plusieurs centaines de sites occupés par GATA-1 dans les cellules érythroïdes (199,200). GATA-1 peut agir tant à titre d'activateur que de répresseur. En effet, il a été montré que GATA-1 peut faire parti de complexes d'activation et de répression de la transcription avec d'autres facteurs de transcription tels que TAL1 ou GFI1B (section 2.1.3.4.1). Les mécanismes cellulaires faisant en sorte que GATA-1 agit à titre d'activateur ou de répresseur à tel ou tel gène sont

encore l'objet de nombreuses études. Plusieurs modifications post-traductionnelles sont connues pour moduler l'activité de GATA-1 telles que l'acétylation, la phosphorylation et la SUMOylation(201-204). Il est rapporté qu'il existe un isoforme ne contenant pas la portion N-terminale de la protéine qui est appelé GATA-1s (GATA-1 short)(205). Malgré que cet isoforme soit exprimé dans les cellules érythroïdes aucun rôle ne lui a été attribué. Cet isoforme est toutefois exprimé de façon prédominante dans les leucémies associées à la trisomie 21 et semble donner un certain avantage sélectif dans cette maladie (206).

GATA-2 est un autre membre de la famille GATA qui est impliqué dans la maintenance du pool de CSH et de progéniteurs(207,208). Lors de la différenciation érythroïde, GATA-2 est impliqué dans l'activation du gène *Gata1*(209). De façon intéressante, GATA-1 agit comme répresseur au gène de *Gata2* et comme activateur à son propre promoteur(210-213). Ce phénomène est connu comme le *GATA-switch* (Figure 2.10; (214-216)). Il semblerait que les niveaux de GATA-1 aux différents stades de la différenciation sont très importants et que de légères variations affectent l'érythropoïèse. En effet, chez la souris, la diminution de 5% ou la surexpression de GATA-1 interfère grandement avec l'érythropoïèse(217,218).



**Figure 2.10. Le *GATA-switch***

Niveau d'expression des facteurs de transcription GATA-1 et GATA-2 lors de l'érythropoïèse. CSH : cellule souche hématopoïétique; PMC : progéniteur myéloïde commun; PEM : progéniteur érythroïde/mégacaryocyte; BFU-E : *Burst forming unit-erythroid*; CFU-E : *Colony forming unit-erythroid*; ProE: proérythroblaste; Ery : érythroblastes.



Le facteur PU.1 est un autre facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'activité de GATA-1 dans l'hématopoïèse. PU.1 bloque l'activité transcriptionnelle de GATA-1 et favorise la formation des cellules myéloïdes(219-221). À l'inverse, GATA-1 empêche le coactivateur c-jun de s'associer à PU.1 ce qui rend PU.1 inactif et favorise la formation des cellules érythroïdes(222). Ainsi, une surexpression de PU.1 bloque la différenciation érythroïde(223).

#### 2.1.3.2.2 *KLF1/EKLF*

Parmi les protéines de la famille Kruppel-like, les facteurs KLF1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 12 et 13 joueraient un rôle lors de l'érythropoïèse (224). L'expression de ces différents facteurs n'est pas exclusive aux cellules érythroïdes à l'exception de KLF1 (EKLF; Erythroid Kruppel-like factor)(225). Ce facteur est le membre le plus important de cette famille dans les cellules érythroïdes et son rôle y est très large. Tout comme GATA-1, il est considéré comme un régulateur essentiel (*master regulator*) de l'érythropoïèse et il peut réguler différents gènes érythroïdes-spécifiques ainsi qu'ubiquitaires(226,227). EKLF est d'ailleurs un partenaire de GATA-1 malgré que ces deux protéines n'aient jamais été observées dans un même complexe protéique(228). Des données de CHIP-seq suggèrent par contre qu'une collaboration entre ces deux facteurs serait envisageable puisque dans près de 50% des sites où EKLF est associé à l'ADN, GATA-1 est aussi associé dans une région de moins d'1 kb (227). En se basant sur le phénotype de la souris déficiente pour EKLF, il semble que ce facteur ne soit pas essentiel pour l'érythropoïèse primitive, malgré qu'il y soit exprimé, puisque les embryons survivent jusqu'au jour e14.5(229). Par contre, EKLF est un important régulateur de l'expression du gène  $\beta$  chez l'adulte(230). De plus, le rôle d'EKLF s'étend à d'autres aspects de la régulation de l'érythropoïèse tel que l'engagement vers la lignée érythroïde, la maintenance de l'expression d'une série de gènes impliqués dans divers processus dans les cellules érythroïdes (ex : Ebp4.9, ASHP, ALAS) ainsi que le contrôle de la sortie du cycle cellulaire lors de la différenciation érythroïde terminale (231). Le rôle principal de EKLF dans la transcription serait à titre d'activateur bien que certains gènes soient réprimés par EKLF(231). Ce dernier peut être acétylé ou phosphorylé ce qui

favorise son activité (232,233). Tous les membres de la famille Kruppel-like reconnaissent des boîtes CACC sur l'ADN. Récemment une séquence consensus (CCNCRCCCN) a été définie malgré que certains gènes régulés par EKLf ne contiennent pas ces motifs (227).

#### 2.1.3.2.3 *IKZF1/Ikaros*

La famille de facteur de transcription Ikaros contient 5 membres (IKZF1-5) qui sont tous exprimés dans le système hématopoïétique. Une caractéristique de ces facteurs est la présence de deux régions contenant des domaines en doigt de zinc, une en N-terminal s'associant à l'ADN au niveau de boîtes GGAAA et une en C-terminal permettant l'homo ou l'hétérodimérisation des facteurs de la famille(234). Le facteur Ikaros (IKZF1) est bien connu pour être impliqué dans le développement du système lymphoïde et peu agir tant comme activateur que comme répresseur transcriptionnel(235-237). Il peut être modifié de façon post-traductionnelle entre autres par phosphorylation et SUMOylation (238,239).

Ikaros est impliqué dans la maintenance des CSH ainsi que dans la formation des BFU-E(240). Dans les cellules érythroïdes, Ikaros a été associé à la régulation du locus  $\beta$ -globine (241,242). Plusieurs isoformes de Ikaros sont connues(243). La particularité de certaines d'entre elles est qu'elles ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN et agissent comme dominant négatif sur les formes plus longues d'Ikaros. Bien qu'une surexpression de ces isoformes courtes soit observée dans différentes leucémies, le rôle biologique de ces isoformes reste inconnu. Il a été montré qu'en surexprimant Ik6 (Ikaros 6; dominant négatif) dans des cellules humaines CD34+, on observe une augmentation de la mort cellulaire par apoptose lorsqu'on induit la différenciation érythroïde (244). De façon apparemment contradictoire, les cellules érythroïdes de moelle osseuse de souris adultes déficientes pour Ikaros semblent être protégées de l'apoptose après un traitement avec un agent chimique (peroxyde d'hydrogène) (245).

#### 2.1.3.2.4 NF-E2

NF-E2 fait partie de la famille bZip (basic-leucine zipper) qui reconnaît le motif AP-1 sur l'ADN (TGASTCA). Ce facteur est un hétérodimère comprenant une sous-unité de 45kDa (p45) qui est principalement exprimée dans les cellules hématopoïétiques ainsi qu'une sous-unité de 18kDa de la famille Maf (MafK ou MafG)(246). Les protéines Maf sont connues pour reconnaître les séquences MARE sur l'ADN(247). NF-E2 est particulièrement bien connu pour son rôle d'activateur transcriptionnel au locus  $\beta$ -globine(248-255). Par contre, le phénotype des souris déficientes pour p45 ne montre pas de défaut au niveau de l'érythropoïèse mais seulement au niveau de la mégacaryopoïèse(256). Il a toutefois été rapporté qu'une déplétion de p45 dans un modèle de cellules érythroleucémiques empêche l'expression des globines(257).

Bach1 est un autre membre de la famille bZip qui peut s'associer avec les protéines Maf. Contrairement à p45, Bach1 est un répresseur transcriptionnel. Il est proposé que lors de la différenciation érythroïde, Bach1 soit tout d'abord associé avec MafK au niveau de l'ADN. Ensuite, Bach1 est dégradé par le protéasome permettant à p45 de prendre la place de Bach1 pour favoriser la transcription (258).

#### 2.1.3.3 Cofacteurs de transcription dans les cellules érythroïdes

L'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription passe de façon générale par ses partenaires. Certains facteurs de transcription ont la faculté de recruter directement des éléments du CPI au niveau de l'ADN mais la majorité d'entre eux recrutent des cofacteurs qui agiront soit directement sur la Pol II ou le plus souvent sur la chromatine. En fait, la modulation de la chromatine (section 2.1.4.1) est directement liée à la régulation de la transcription par la Pol II.

Les cofacteurs, contrairement aux facteurs de transcription ne peuvent pas s'associer directement à l'ADN. C'est pourquoi ils utilisent les facteurs de transcription comme plateforme pour agir au niveau de la chromatine. Plusieurs cofacteurs possèdent une

activité enzymatique leur permettant de moduler la chromatine. D'autres cofacteurs n'ont pas d'activité enzymatique connue, mais sont tout de même associés à l'activation ou la répression transcriptionnelle. Ces cofacteurs peuvent influencer l'activité des facteurs de transcription ou peuvent agir comme pont entre différentes protéines pour maintenir les complexes protéiques en place.

Un aspect intéressant de l'utilisation des cofacteurs pour réguler la transcription est qu'un même facteur de transcription peut s'associer à différents cofacteurs selon le contexte (voir tableau 2.1). Ainsi, un facteur de transcription peut s'associer à l'ADN et être associé à l'activation transcriptionnelle lorsqu'il interagit avec certains cofacteurs ou à la répression transcriptionnelle lorsqu'il s'associe avec d'autres cofacteurs (section 2.1.3.4.1). Les modifications post-traductionnelles des facteurs de transcription peuvent aussi influencer le choix de ses partenaires.

Dans la formation des leucémies, il existe deux grandes catégories de mécanismes impliquant les cofacteurs de transcription. Par exemple, des protéines de fusion impliquant un facteur de transcription résultant d'une translocation chromosomique peuvent être recrutées de façon aberrante au niveau de l'ADN. Très souvent, cette protéine de fusion possède la capacité de recruter des cofacteurs qui vont moduler la Pol II et/ou la chromatine de façon anormale et influenceront la transcription du gène cible (ex : translocation (8;21) produisant AML1-ETO(259)). D'autre part, il a été rapporté que des mutations ponctuelles dans certains cofacteurs sont aussi impliquées dans la régulation anormale de différents gènes dans les cellules leucémiques (ex : EZH2 (260)).

Tout comme pour les facteurs de transcription, un grand nombre de cofacteurs jouent un rôle important dans la régulation des gènes dans les cellules érythroïdes. Certains exemples pertinents seront rapportés ici.

### *2.1.3.3.1 Les enzymes qui modifient la chromatine*

Les modifications post-traductionnelles des histones représentent un mécanisme de régulation épigénétique très important dans la régulation transcriptionnelle des gènes (section 2.1.4.1.2). L'acétylation et la méthylation sont des exemples de telles modifications. Il existe des enzymes qui sont recrutées au niveau des gènes par les facteurs de transcription qui permettent d'ajouter ou de retirer ces modifications (ex : acétyltransférases, déacétylases, méthyltransférases et déméthylases). De façon intéressante, ces enzymes peuvent aussi modifier post-traductionnellement les facteurs de transcription avec lesquels elles interagissent modulant ainsi leur activité.

CBP et PCAF sont des exemples d'enzymes acétyltransférases. Chez la souris, la perte d'une seule allèle du gène codant pour CBP entraîne chez certains animaux une splénomégalie ainsi qu'une diminution de la cellularité de la moelle osseuse associée à une diminution du nombre de cellules érythroïdes, myéloïdes et lymphoïdes (261). CBP régule plusieurs gènes dans les cellules érythroïdes ainsi que les loci  $\alpha$ - et  $\beta$ -globine(262). CBP interagit avec de nombreux facteurs de transcription (tableau 2.1) ainsi qu'avec des composants du CPI (TFIIB, TBP et RNA Pol II)(263). Il a été proposé que CBP serait recruté synergiquement au niveau des gènes érythroïdes par différents facteurs de transcription favorisant la formation ou le maintien du CPI (262). De plus, CBP serait impliqué dans le recrutement d'un large complexe acétyltransférase contenant entre autres PCAF, une autre acétyltransférase(262).

Une famille importante de déacétylase est la famille des HDAC (Histone deacetylase) qui compte plus de 10 membres. Les HDACs sont retrouvés dans différents complexes de répression (section 2.1.3.4.3), malgré qu'il soit rapporté que les HDACs soient nécessaires pour l'activation transcriptionnelle de certains gènes (264,265). Dans les cellules érythroïdes, une grande variété de gènes sont régulés par les HDACs de classe I (HDAC1 et HDAC2) et il a été montré que ces HDACs sont impliqués dans la différenciation érythroïde (266,267).

Les méthyltransférases peuvent être associées à l'activation ou la répression des gènes selon le type de méthylation qu'elles ajoutent (section 2.1.4.1.2). Certaines méthyltransférases telles que EZH2, G9a et SUV39H1 ont été associées à la régulation des gènes dans les cellules érythroïdes (particulièrement les gènes de globine) (251,268,269). De plus, la surexpression de SUV39H1 semble influencer la différenciation et la prolifération des cellules érythroïdes(270).

Peu de déméthylases ont été étudiées dans la régulation transcriptionnelle des cellules érythroïdes. LSD1 et UTX sont deux exemples d'enzymes qui ont été observées au niveau de certains gènes dans ces cellules(251,271,272).

#### *2.1.3.3.2 Enzymes ayant une activité ATPase*

En plus des modifications post-traductionnelles des histones, une autre façon de moduler la structure de la chromatine est le remodelage de la chromatine ATP-dépendant (section 2.1.4.1.3). Il existe différentes familles d'enzyme ayant la capacité de remodeler la chromatine et les enzymes de chacune des familles diffèrent par leur sous-unité catalytique ainsi que par leur mécanisme d'action (273). Ces enzymes font généralement partie de larges complexes protéiques qui seront décrits à la section 2.1.3.4.1. Brg1 fait partie de la famille SWI/SNF et est généralement associé à l'activation transcriptionnelle malgré qu'on retrouve sa présence à certains promoteurs réprimés (274). De façon intéressante, la souris hypomorphe pour Brg1 montre un défaut dans le développement de la lignée érythroïde lors de la gestation dû à une régulation anormale du locus  $\beta$ -globine (275). Une autre famille d'enzyme de remodelage de la chromatine est la famille CHD. Ces derniers sont généralement associés à la répression transcriptionnelle puisqu'ils font partie du complexe NURD (section 2.1.3.4.3). Le facteur CHD4 (Mi2 $\beta$ ) peut interagir avec certains facteurs exprimés dans les cellules érythroïdes (242,276,277). L'ATPase SNF2H fait parti quant à elle de la famille ISWI. Il a été montré que cette enzyme est importante pour la différenciation érythroïde et qu'elle peut interagir avec le facteur GATA-1 dans le contexte du complexe ACF (276,278).

#### *2.1.3.3.3 Autres cofacteurs n'ayant aucune activité enzymatique connue*

Il existe une série de cofacteurs de transcription qui ne sont pas reconnus pour moduler la chromatine directement et qui n'ont pas d'activité enzymatique connue. Ces cofacteurs font pourtant parti de complexe d'activation et de répression (section 2.1.3.4.1) et leur présence est importante pour la régulation des gènes cibles. Le mécanisme de leur mode d'action reste flou, mais il semblerait que ces facteurs peuvent agir comme pont entre différentes protéines d'un complexe. D'autre part, il est clair que le recrutement de ces cofacteurs influence l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription qui les recrute. Les facteurs FOG1, LMO2, LDB1, mSin3a, COREST, CtBP et ETO-2 ont entre autres été rapportés comme des régulateurs important dans les cellules érythroïdes(272,276,279-283).

#### **2.1.3.4 Importance de la combinaison de facteurs dans la régulation transcriptionnelle**

Tel qu'il a été décrit dans la section précédente, plusieurs facteurs de transcription possèdent une activité d'activateur et de répresseur transcriptionnel. Les différents partenaires des facteurs de transcription influencent gradement leur activité transcriptionnelle. La caractérisation d'un grand nombre de complexes multiprotéiques a contribué à mieux comprendre de quelle façon les facteurs de transcription modulent la transcription de leurs gènes cibles. D'autre part, plusieurs facteurs de transcription sont connus pour interagir ensemble (tableau 2.1). Ceci suggère que le corecruitment de différents facteurs de transcription à un même promoteur implique une collaboration entre les différents partenaires.

#### *2.1.3.4.1 Spécificité des complexes transcriptionnels*

Plusieurs facteurs et cofacteurs de transcription sont exprimés dans plus d'un tissu. Leur niveau d'expression peut varier selon le type cellulaire, le stade de développement ou de différenciation. Le niveau d'expression des différents composants d'un complexe transcriptionnel influence la probabilité de la formation de ce complexe et donc son influence potentielle sur la transcription des gènes cibles.

Un même facteur de transcription peut être impliqué à la fois dans l'activation et la répression transcriptionnelle. Ses partenaires influenceront beaucoup la fonction du facteur de transcription à un gène et/ou un moment donné. D'autre part, la balance du niveau d'expression entre les différents partenaires d'interaction est aussi déterminante dans la capacité du facteur de transcription à effectuer sa fonction. Il existe par contre encore des zones d'ombre quant à la classification des complexes d'activation vs répression. Des complexes associés uniquement à l'activation transcriptionnelle ont été trouvés à des gènes réprimés alors que certains gènes actifs transcriptionnellement montrent la présence de complexe de répression. En d'autres mots, il n'est pas rare d'observer la présence simultanée d'éléments activateurs et répresseurs au niveau d'un même gène. Ce phénomène est possiblement impliqué dans la maintenance des niveaux adéquats d'expression ou dans la modulation rapide du niveau de transcription en réponse à un stimulus. Ceci indique qu'en plus du niveau d'expression des différents facteurs d'un complexe dans le noyau, il est important de considérer la capacité du facteur à être recruté au niveau du gène, sa stabilité relative à ce gène ainsi que la présence de facteurs qui pourraient entrer en compétition avec ce facteur.

Un autre aspect important dans la spécificité de la régulation par les facteurs et cofacteurs de transcription est la collaboration entre les facteurs tissu-spécifiques et ubiquitaires. Plusieurs cofacteurs présentés à la section 2.1.3.2 sont exprimés dans plusieurs types cellulaires. Par contre, leur recrutement à différents gènes dépend entre autres des facteurs de transcription qui peuvent être exprimés de façon plus spécifique selon le tissu ou le stade de développement. Dans les cellules érythroïdes, les facteurs de transcription GATA-1, EKLF, TAL-1, GFI1B et Ikaros sont centraux dans la formation des différents complexes transcriptionnels.

#### *2.1.3.4.2 Complexes d'activation dans les cellules érythroïdes*

La plupart des complexes d'activation dans les cellules érythroïdes contiennent GATA-1 puisqu'il régule la majorité des gènes dans les cellules érythroïdes. Une analyse de



différents gènes régulés par GATA-1 permet d'observer la proximité fréquente des sites de liaison de GATA-1 avec des sites de liaison de la famille Kruppel-like(227). De façon intéressante, il a été observé que GATA-1 interagit avec Sp1 et EKLF et que cette interaction a un effet synergique sur l'activation transcriptionnelle *in vitro*(228). Par contre, peu d'études subséquentes ont permis de montrer la pertinence *in vivo* de l'interaction entre GATA-1 et les membres de la famille Kruppel-like.

Un complexe mieux caractérisé dans les cellules érythroïdes est le complexe GATA-1/TAL1/LMO2/LDB1/E2A(284). Ce complexe pentamérique s'associe avec des séquences d'ADN contenant un site de liaison pour GATA-1 ainsi que pour TAL1 à proximité. Plusieurs gènes impliqués dans la régulation des cellules érythroïdes contiennent un motif capable de recruter ce complexe tels que les gènes *Gata1* et *Eklf*(285,286).

L'interaction entre GATA-1 et FOG1 est très importante pour la régulation de plusieurs gènes cibles de GATA-1. D'ailleurs la mutation de FOG1 chez la souris entraîne le même phénotype que chez la souris déficiente pour GATA-1(287). Il existe toutefois des exemples de gènes activés par GATA-1 où FOG1 n'est pas recruté(288). Par exemple, il a été montré que FOG1 ne fait pas partie du complexe pentamérique GATA1/TAL1/LMO2/LDB1/E2A(276).

L'activité d'activateur transcriptionnel de EKLF est attribuée en grande partie à son interaction avec des sous-unités du complexe de remodelage de la chromatine de la famille SWI/SNF (BRG1, BAF155, BAF170, INI1 (BAF47) et BAF57), le complexe E-RC1 (EKLF remodeling complex 1; (289)). Il a été montré que BRG1 et BAF170 s'associent directement au promoteur  $\beta$ -globine alors que le complexe EKLF-BRG1-BAF155 est suffisant pour remodeler la chromatine et favoriser la transcription (290,291).

#### 2.1.3.4.3 Complexes de répression dans les cellules érythroïdes

Plusieurs complexes de répression sont connus pour jouer un rôle important dans la régulation des gènes dans les cellules érythroïdes. Plusieurs de ces complexes ne sont pas

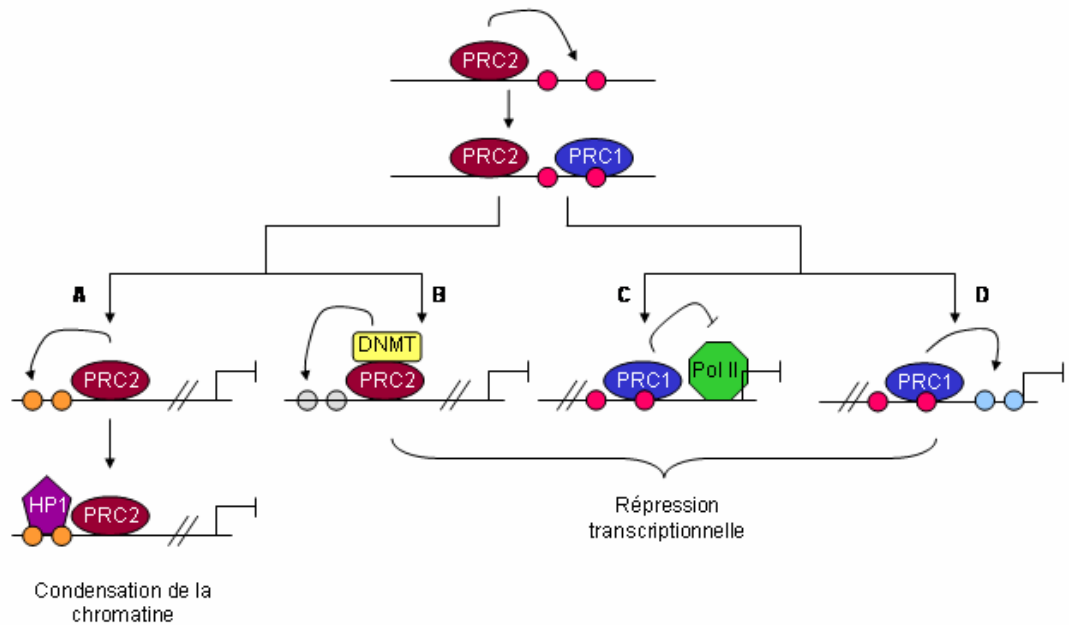
érythroïde spécifique mais sont recrutés au niveau des gènes par des facteurs de transcription tels que GATA-1, TAL1 ou Ikaros.

Le complexe pentamérique contenant GATA-1/TAL1/LMO2/LDB1/E2A décrit plus haut peut être converti en complexe de répression grâce au répresseur ETO-2(281). ETO-2 peut interagir avec différents membres du complexe(281,292). Il n'est pas clair par quel mécanisme ETO-2 peut bloquer l'activité de ce complexe. Une étude propose que ETO-2 peut former deux complexes distincts soit un avec TAL1 et un avec GATA-1(281). Par contre, le corecruitment du complexe pentamérique avec ETO-2 a été observé au moins au niveau du promoteur de *Cbfa2t3*, le gène codant pour ETO-2 (199). Il est à noter que ETO-2 peut interagir avec des corépresseurs tel que mSin3a(293).

Les complexes polycomb (PcG; *polycomb group*) PRC1 et PRC2 sont deux complexes dont les membres ont été étroitement associés au développement normal de l'embryon. En fait, ces deux complexes sont impliqués dans la répression d'une grande variété de gènes dans les différents types cellulaires. Les mécanismes d'action de ces complexes sont décrits à la figure 2.11. L'importance de PRC2 a été récemment investiguée dans les cellules érythroïdes entre autres par la découverte de l'interaction entre deux sous-unité du complexe, EZH2 et Suz12, avec GATA-1 et GFI1B (200).

Gfi1B est principalement un répresseur transcriptionnel dans les cellules érythroïdes. En plus de s'associer à PRC2 et GATA-1, il forme un complexe avec le corépresseur CoREST, la déméthylase LSD1 et les histones déacétylases HDAC1 et HDAC2(294).

Alors que le complexe GATA-1/GFI1B a été proposé comme étant impliqué dans la répression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire lors de la différenciation, le complexe GATA-1/FOG1/MECP1 serait plutôt impliqué dans la répression de gènes favorisant l'état multipotent des cellules non-différenciées (295). MECP1 est un facteur capable de s'associer à l'ADN méthylé(296) (section 2.1.4.1.5).



**Figure 2.11. La répression des gènes par les complexes polycomb**

(Adapté de Sparmann et van Lohuizen (297))

Le complexe PRC2 (contenant entre autres les protéines EED, EZH2, SUZ12) est recruté en premier au niveau du gène cible. L'enzyme méthyltransférase EZH2 permet le recrutement de H3K27Me3 (rouge). Cette modification de l'histone H3 est reconnue par le complexe PRC1 (contenant entre autres les protéines CBX, EDR, RING1 et BMI1) qui est recruté au gène cible. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer de quelle façon les polycomb répriment les gènes cibles. **(A)** En plus d'utiliser l'histone H3 comme substrat, EZH2 (PRC2) peut aussi induire la méthylation de H1K26 (orange) qui favorise le recrutement de HP1 et la condensation de la chromatine (298,299). **(B)** EZH2 (PRC2) peut interagir avec des enzymes ADN méthyltransférases (DNMT) et induire la méthylation de l'ADN (gris) du gène cible réprimant ainsi la transcription (300). **(C)** Le complexe PRC1 a été associé à la répression de l'activité de la Pol II (301). **(D)** BMI1 et RING1A (PRC1) sont impliqués dans l'ubiquitination de H2AK119 (bleu pâle), ce qui est associé à la répression transcriptionnelle (302,303).

La composition du complexe NuRD varie selon le type cellulaire et/ou selon le gène cible. La composition classique du complexe comprend des membres de la famille Mi-2 (CHD4) ayant une activité ATPase, des histones déacétylases (HDAC1 et 2), des protéines de la famille RbAp, des protéines de la famille MBD capable de lier l'ADN méthylé et des protéines de la famille MTA qui confèrerait une certaine spécificité au complexe (304). Dans les cellules érythroïdes, un complexe NuRD s'associant avec FOG1 serait impliqué à la fois dans l'activation et la répression de différents gènes cibles du complexe GATA-1/FOG1. Ce complexe est formé entre autres de CHD4 (Mi-2 $\beta$ ), MBD3, HDAC1 et HDAC2 (305). Un aspect intéressant de la régulation transcriptionnelle par les facteurs GATA-1/FOG1 est le fait que ces facteurs peuvent aussi faire parti d'un autre complexe de répression qui inclue le répresseur CtBP(306). Tant dans le contexte du recrutement du complexe NuRD que de CtBP, il semble que LSD1 soit recruté dans le complexe (307).

Le complexe PYR est un complexe particulier identifié dans les cellules érythroïdes qui comporte aussi des sous-unités du complexe NuRD (242). Ce complexe dont fait parti le facteur de transcription Ikaros comprend les facteurs Mi-2 et HDAC2 (faisant partie de NuRD) mais aussi les facteurs BRG1, BAF57 et BAF155 (faisant parti de SWI/SNF). Ce complexe est principalement impliqué dans la commutation  $\gamma$ -à- $\beta$  globine en favorisant la répression des gènes  $\gamma$  lors du développement.

De façon intéressante, le facteur de transcription EKLF a aussi été identifié comme étant capable de recruter des complexes de répression soit via son interaction avec CHD4 (complexe NuRD) ainsi que via son interaction avec mSin3A et HDAC1 (308).

#### **2.1.4 Régulation épigénétique**

L'intégrité des régions d'ADN en *cis*, tels que les promoteurs et les *enhancers*, influence la transcription des gènes. Ces régions contiennent des sites de liaison pour différents facteurs de transcription ainsi que pour les facteurs généraux de transcription qui permettront la formation du CPI et l'initiation de la transcription. Ainsi, certaines maladies sont

caractérisées par des mutations dans ces régions en *cis* qui influenceront la régulation de la transcription des gènes.

Par opposition à la régulation génique influencée par les séquences d'ADN (mutations, duplications), la régulation épigénétique est indépendante de la séquence d'ADN. Dans les processus normaux de développement et de différenciation, les séquences d'ADN ne changent pas alors que les niveaux d'expression de plusieurs gènes changent. Ces variations sont dues, entre autres, à la régulation épigénétique qui influence la transcription des gènes. D'autre part, en plus des altérations de l'ADN, une régulation épigénétique anormale est associée à un déséquilibre dans l'expression de certains gènes et est observée dans plusieurs maladies.

L'information épigénétique est transmissible de la cellule mère à la cellule fille lors des divisions cellulaires (mitoses et des méioses). Tel que mentionné à la section précédente, plusieurs cofacteurs de transcription possèdent des activités enzymatiques permettant la modification de l'épigénome. Il existe une variété de modifications épigénétiques qui peuvent influencer l'expression des gènes. Parmi celles-ci, on compte les modifications des histones, le remodelage de la chromatine et la méthylation de l'ADN. De plus, il existe différents variants d'histones qui possèdent des fonctions particulières. Chaque type cellulaire est caractérisé par une signature épigénétique spécifique qui doit être transmise lors des divisions cellulaires pour maintenir l'intégrité et l'identité cellulaire.

Parmi les éléments qui peuvent influencer l'organisation de la chromatine, il y a les facteurs qui modifient les histones, les facteurs qui remodelent la chromatine, les variants d'histones et les chaperonnes d'histones.

#### **2.1.4.1 La chromatine**

Il existe plusieurs niveaux de compaction de l'ADN permettant aux 6 milliards de paires de bases d'entrer dans le noyau de la cellule. Chez l'humain, on retrouve deux copies du génome dans 46 chromosomes. Les chromosomes sont des structures constituées

essentiellement de fibres de chromatine. La chromatine est constituée d'ADN enroulée autour de nucléosomes; 146 paires de bases (nucléotides) entourent un nucléosome(309). Il existe classiquement trois grandes formes de chromatine associées à différents états transcriptionnels. L'hétérochromatine constitutive est principalement retrouvée au niveau des centromères et des télomères et est associée à un état condensé stable. Ce type de chromatine est peu permissif à la transcription mais la production de petits ARNs est possible (310,311). L'hétérochromatine facultative est plus dynamique. Ainsi, elle n'est pas permissive à la transcription mais facilement modulable pour permettre la transcription selon différents signaux cellulaires(312). L'euchromatine est le type de chromatine plus décondensé qui est permissif à la transcription. Les différentes structures de chromatine régulent l'accès au promoteur pour les facteurs de transcription ainsi que pour la machinerie transcriptionnelle. Plus récemment, le concept de la chromatine bivalente a émergé. Tel qu'il sera décrit dans les prochaines sections, la chromatine est caractérisée par des marques qui permettent de déterminer son état transcriptionnel et qui sont associées à l'euchromatine ou à l'hétérochromatine. Dans les cellules souches embryonnaires (CSE), il a été montré que plusieurs gènes possèdent des marques associées à l'euchromatine ainsi qu'à l'hétérochromatine(313). Le rôle de cette apparente dualité est encore le sujet d'investigations.

La chromatine a longtemps été catégorisée en chromatine ouverte (euchromatine) et fermée (hétérochromatine). Cette façon de catégoriser la chromatine en structure « ouverte » ou « fermée » ne semble toutefois pas être totalement exacte. Par exemple, il a été évalué que l'hétérochromatine ne serait qu'en moyenne 1.4 fois plus condensée que l'euchromatine (314). D'autre part, certains facteurs de transcription tels que YY1 peuvent aisément s'associer à leurs sites de liaison sur l'ADN dans une chromatine répressive (311,315). Finalement, plusieurs gènes dont l'environnement normal est l'hétérochromatine y sont transcriptionnellement actif(310). Par contre, un gène normalement présent dans l'euchromatine sera très souvent réprimé lorsqu'il est relocalisé dans l'hétérochromatine (ex : PEV; section 2.1.4.3). Ainsi, il semble que chaque type de chromatine fournit

l'environnement requis pour l'expression des gènes qui y sont contenus. Une classification des différents types de chromatine a été proposée selon les différentes marques épigénétiques qui les caractérisent (voir section 2.1.4.1.2).

Selon plusieurs études, la chromatine dans le noyau serait organisée en domaines au niveau nucléaire ainsi qu'au niveau du chromosome lui-même(184). Au niveau nucléaire, certaines régions du noyau sembleraient plus propices à la transcription et on y retrouverait principalement des gènes transcriptionnellement actifs. Ces régions, distantes de la membrane nucléaire, seraient caractérisées par une haute concentration en facteurs de transcription ainsi qu'en Pol II favorisant ainsi la transcription des gènes se trouvant dans ces régions. De façon intéressante, ces domaines peuvent contenir des gènes provenant de différents chromosomes(316). Il existe aussi plusieurs évidences que les gènes inactifs transcriptionnellement sont localisés au niveau de la périphérie du noyau soit dans la lamina nucléaire. Les lamines présentes dans ces régions lient la chromatine ainsi qu'une variété de répresseurs transcriptionnels suggérant que les gènes présents dans ces régions sont soumis à une répression transcriptionnelle. Il a d'ailleurs été montré que ces domaines (lamina-associated domains : LAD) sont pauvres en Pol II ainsi qu'en H3K4Me2 et enrichie en H3K27Me3 (316). De plus, CTCF, un facteur de transcription ayant une activité de protection (*insulator*), a été observé au niveau de plusieurs LAD (316). CTCF n'est toutefois pas uniquement associé aux domaines inactifs transcriptionnellement puisqu'il a aussi été observé au niveau de différents domaines actifs. CTCF possède la capacité de former des boucles intrachromosomiques permettant de maintenir un état actif ou répressif à l'intérieur de la boucle sans être influencé par la chromatine environnante (effet de protection; *insulation*)(317). La formation de compartiments de domaines interchromosomiques ne semble toutefois pas s'appliquer à tous les gènes.

#### 2.1.4.1.1 Les histones

Dans la fibre de chromatine, l'ADN s'enroule autour d'un nucléosome (Figure 2.12). Le nucléosome est un octamère constitué classiquement d'une paire de chacun des différentes

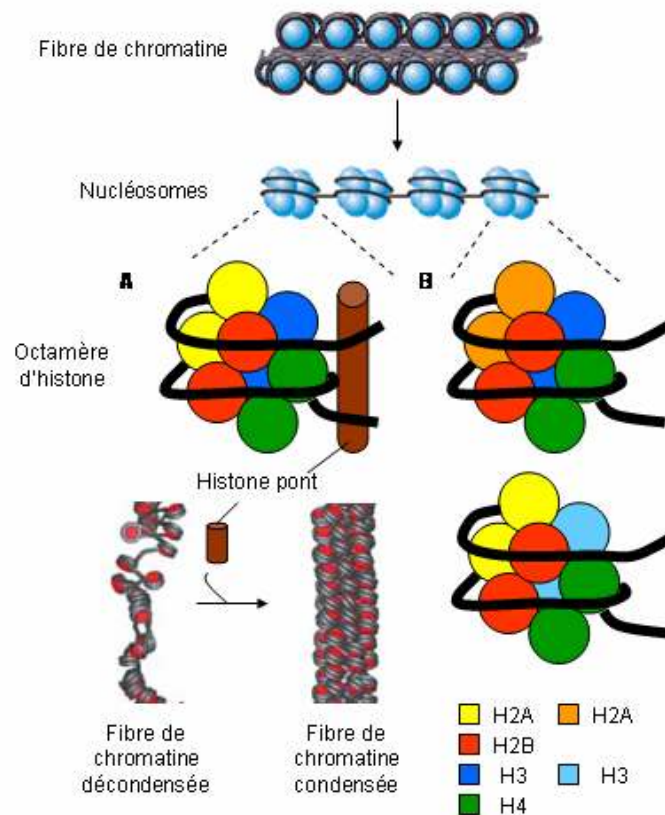
protéines histones (H2A, H2B, H3 et H4) arrangées en dimères (H2A-H2B et H3-H4) et incorporées dans la chromatine principalement lors de la phase S du cycle cellulaire(318). Le niveau d'affinité des histones avec l'ADN dépend en grande partie des modifications post-traductionnelles des histones. Typiquement, les régions régulatrices des gènes (promoteurs et *enhancers*) contiennent une faible concentration en nucléosomes ce qui facilite le recrutement de facteurs de transcription(319). Ceci serait dû à un haut taux de remplacement des histones ainsi qu'à une stabilité moins grande des histones dans ces régions.

Il existe différents variants pour chacune des histones. Ces derniers peuvent être recrutés au niveau de la chromatine dans des contextes précis. Par exemple, le variant H3.3 est présent spécialement lorsque l'ADN est activement transcrit ainsi que dans les régions péricentromériques et télomériques(320-323). H3.3 est particulièrement enrichi en modifications post-traductionnelles associées à la chromatine active telles que H3K4me et H3K36me ainsi que H3Ac(324). À la différence de H3.1, H3.3 est déposé dans la chromatine de façon indépendante de la réplication par le complexe HIRA et ses chaperonnes sont différentes(324). Le rôle de H3.3 dans l'établissement de la chromatine active reste mal connu. Il est suggéré que H3.3 joue un rôle critique dans le maintien du statut de la chromatine tant actif qu'inactif.

Il existe aussi des variants de l'histone H2A. De façon similaire à H3.3, le variant H2A.Z n'est pas déposé de façon dépendante de la réplication et est retrouvé principalement près des sites d'initiation de la transcription et dans les régions péricentromériques. Il a d'ailleurs été montré que les régions pauvres en nucléosomes près des sites d'initiation de la transcription sont enrichies en nucléosomes contenant les variants H3.3 et H2A.Z (325). De plus, H2A.Z serait associé à la mémoire transcriptionnelle ainsi qu'au maintien de l'hétérochromatine lors des divisions cellulaires (326,327). Un autre variant de H2A est l'histone H2A.X qui est présente dans des régions d'ADN qui sont en réparation. En effet, la phosphorylation de H2A.X est associée aux cassures double-brin de l'ADN(328).



L'histone H1 ne fait pas partie intégrante du nucléosome comme les autres histones. En fait, elle est appelée histone pont (*linker histone*) puisqu'elle est impliquée dans l'assemblage du nucléosome et favorise la compaction de la fibre de chromatine. En fait, l'absence de H1 favorise une plus grande distance entre les nucléosomes (329).



**Figure 2.12 La fibre de chromatine et le nucléosome**

La fibre de chromatine est constituée de nucléosomes. La structure du nucléosome comprend un octamère d'histone autour duquel l'ADN (noir) est enroulé. (A) L'histone H1 (histone pont) permet la compaction de la fibre de chromatine. (B) Exemples de nucléosomes contenant des variants d'histones.

#### 2.1.4.1.2 Modifications post-traductionnelles des histones

À la section 2.1.3.3.1, il a été mentionné que certains cofacteurs possèdent une activité enzymatique permettant les modifications post-traductionnelles des histones. Les modifications post-traductionnelles des histones sont un mécanisme de régulation complexe de la transcription permettant de maintenir des niveaux d'expression adéquats. Les modifications associées à l'activation transcriptionnelle sont généralement associées à une chromatine plus permissive à la transcription. À l'inverse, les marques de répression sont associées à une structure de chromatine plus compacte et moins permissive à la transcription.

L'affinité des différentes histones avec l'ADN est très grande(330). Plus l'interaction entre l'histone et l'ADN est importante, moins l'ADN sera transcrit. En effet, le mouvement des nucléosomes sera plus difficile et ceci est défavorable à la transcription. Différentes modifications post-traductionnelles des histones vont permettre de dynamiser les interactions ADN-histone afin de moduler l'accessibilité de l'ADN pour la machinerie transcriptionnelle influençant ainsi les niveaux d'expression des gènes. À ce jour, on compte plus de 8 types de modifications post-traductionnelles des histones dont les plus communes sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitylation et la SUMOylation(331). Les modifications post-traductionnelles peuvent aisément être introduites et retirées par les « écrivains » et les « effaceurs » de la signature épigénétique(332). Les « écrivains » sont les enzymes qui apposent les modifications post-traductionnelles telles que les histones acétyltransférases ou méthylases. Les « effaceurs » sont les enzymes qui vont retirer les modifications telles que les histones déacétylases ou déméthylases (section 2.1.3.3.1).

Une modification post-traductionnelle bien connue est l'acétylation (333-336). Cette modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout d'un groupement acétyle ( $\text{CH}_3\text{-C=O}$ ) sur un résidu polaire chargé d'une protéine. L'acétylation a la propriété de neutraliser la charge positive du résidu (lysine ou arginine) ce qui modifie la conformation tridimensionnelle de l'histone et altère son affinité pour l'ADN qui est chargé

négativement. Différentes lysines des histones H3 et H4 peuvent être acétylées (H3Ac et H4Ac) par des enzymes telles que CBP et PCAF.

Une autre modification post-traductionnelle importante est la méthylation, soit l'ajout d'un ou plusieurs groupements méthyle (CH<sub>3</sub>) au niveau d'un résidu polaire chargé (lysine, arginine ou histidine). Contrairement à l'acétylation qui est toujours associée à une chromatine active transcriptionnellement, les divers degrés de méthylation (mono, bi ou triméthylation) sont associés à différents états transcriptionnels. Certaines études ont montré l'importance de la méthylation des arginines dans le contrôle de la structure de la chromatine. La méthylation des arginines est effectuée par des enzymes de la famille PRMT(337). Différentes lysines peuvent être méthylé sur l'histone H3 (ex : K4, K9, K27, K36 et K79) et l'histone H4 (ex : K20). Plusieurs études à grande échelle ont caractérisé l'importance relative des différents types de méthylation dans la régulation transcriptionnelle (338-340). Par exemple, H3K4me1 se retrouve particulièrement dans les régions *enhancer* actives transcriptionnellement alors que H3K4Me3 est plutôt enrichi au niveau des promoteurs actifs (341). H3K4Me2 ainsi que H3K36Me2,3 sont surtout présents dans les régions transcrites des gènes (342,343). De façon intéressante H3K27me1 est aussi observé dans les régions actives transcriptionnellement alors que H3K27Me2,3 sont particulièrement associés à des régions réprimées (338). L'importance, la fonction et la stabilité des différents degrés de méthylation des histones est encore le sujet de plusieurs investigations. Il a été proposé que H3K4Me3 est plus stable que H3K4Me1,2 et serait impliqué dans la mémoire épigénétique (344). De plus, les enzymes déméthylases spécifiques pour la mono et biméthylation sont différentes des enzymes impliquées dans la déméthylation des histones triméthylées (345). Plusieurs enzymes contenant un domaine SET peuvent méthyler spécifiquement les différentes lysines et sont associées à différentes activités transcriptionnelles (tableau 2.2). Certaines d'entre elles, MLL, G9a, SUV39H1 et EZH2, ont été associées à une forme de cancer(346).

**Tableau 2.2 Exemples d'enzymes méthyltransférases et leur spécificité**

Enzyme	Spécificité	Activité transcriptionnelle
EZH2	H1K26	Répression
EZH2	H3K27	Répression
MLL1,2,3	H3K4	Activation
SUV39H1	H3K9	Répression
G9a	H3K9	Répression
SET2*	H3K36	Activation
DOT1**	H3K79	Activation
SET8	H4K20	Répression

\* Enzyme de levure (*S. Cerevisiea*)

\*\* Ne possède pas de domaine SET

La théorie du code des histones propose que ce soit la combinaison des différentes modifications post-traductionnelles des histones qui déterminera le niveau d'activité transcriptionnelle d'un gène(347). Il semble par contre qu'il est difficile d'établir un code universel puisque certaines combinaisons semblent être plus spécifiques pour différents types de gènes. Plus récemment, une classification des types de chromatine en fonction des modifications post-traductionnelles des histones a été proposée chez la drosophile (348). Selon cette étude, il existe trois catégories de chromatine restrictive soit la chromatine enrichie en H3K9me2 associée aux régions péricentromériques, la chromatine riche en H3K27Me3 associée au recrutement des complexes polycombs et représentative de gènes régulés lors du développement ainsi que la chromatine caractérisée par une forte concentration en histone H1 couvrant près de la moitié du génome et aussi associée à des gènes régulés lors du développement. La chromatine permissive serait séparée en deux catégories : celle enrichie particulièrement en H3K36Me3 associée à des gènes transcriptionnellement actifs peu régulés et celle enrichie en H3K4Me2 associée à des gènes hautement régulés et spécifiques.

#### *2.1.4.1.3 Remodelage de la chromatine*

Certains cofacteurs recrutés au niveau de la chromatine par les facteurs de transcription possèdent une activité enzymatique ATPase leur permettant de remodeler la chromatine. Ces enzymes peuvent briser les liens ADN/nucléosome, déplacer les nucléosomes et participer au retrait ou à l'échange des nucléosomes (ex : remplacement d'histones par des variants; retrait d'histones portant des modifications post-traductionnelles activatrices) (349). Ces mécanismes sont impliqués tant dans l'activation que la répression transcriptionnelle puisqu'ils favorisent des structures plus ou moins permissives de chromatine. Malgré que l'hydrolyse de l'ATP soit essentielle pour ces différentes fonctions, les mécanismes précis d'action de ces enzymes restent encore flous (349).

BRG1 et Mi-2 $\beta$  (CHD4) sont deux enzymes possédant une activité ATPase qui font partie de grands complexes de remodelage. BRG1 fait partie du complexe mSWI/SNF (ou BAF) en association avec une série de protéines BAF(350). La composition du complexe peut varier selon le contexte. mSWI/SNF serait particulièrement associé à une régulation à distance de ses gènes cibles (25). Les mécanismes par lesquels mSWI/SNF remodèle la chromatine incluent le repositionnement par glissement et l'éjection de nucléosomes (351). De façon générale, ceci facilite l'accès pour les facteurs de transcription sur l'ADN qui peuvent recruter des activités enzymatiques qui modifient les histones. Mi-2 $\beta$  fait partie du complexe NuRD (section 2.1.3.4.3). Tout comme le complexe mSWI/SNF, la composition du complexe semble variable et il peut être associé tant à l'activation qu'à la répression des gènes. Le mécanisme d'action de NuRD dans le remodelage des nucléosomes est peu caractérisé. Il est proposé que le complexe est recruté au niveau des gènes transcriptionnellement actifs afin de remodeler la chromatine et de retirer les marques sur les histones associées à l'activité transcriptionnelle (349).

#### *2.1.4.1.4 Les chaperonnes d'histones*

Les chaperonnes sont des protéines qui s'associent à d'autres protéines pour favoriser divers processus tels que leur fonction, leur dégradation ou leur transport. Dans le cas des chaperonnes d'histone, elles sont impliquées dans tous les processus durant l'existence de l'histone. Elles s'associent aux histones dès leur synthèse, facilitent leur transport vers le noyau, favorisent leur association/dissociation à l'ADN et modulent différentes modifications post-traductionnelles. Les chaperonnes d'histone sont impliquées entre autres dans le processus de réplication et de réparation de l'ADN ainsi que lors de la transcription. Les chaperonnes d'histone ont été montrées comme étant des collaboratrices de certaines activités ATPase impliquées dans le remodelage de la chromatine ainsi qu'avec des enzymes capables de modifier post-traductionnellement les histones(352).

#### *2.1.4.1.5 Méthylation de l'ADN*

L'ajout d'un groupement méthyle au niveau d'un dinucléotide CpG par les DNMT est associé à la répression transcriptionnelle(353). Cette modification de l'ADN peut être reconnue par les protéines MBPs(354). Les CpG sont habituellement groupés en îlots et présents dans certains types de promoteurs. Ainsi, les îlots CpG non-méthylés sont associés à l'activité transcriptionnelle. Par contre, une grande proportion des CpG méthylés se retrouve dans des régions génomiques distantes des gènes. La présence de résidus cytosine méthylés influence la transcription soit en bloquant l'accès à certains facteurs de transcription qui ne reconnaissent pas leur site de liaison à l'ADN, soit en recrutant des protéines qui vont bloquer l'accès à d'autres facteurs et favoriser la formation d'une structure de chromatine incompatible avec la transcription(355-357). La méthylation des cytosines de l'ADN est une modification covalente qui est efficacement transmise lors des divisions cellulaires. En effet, l'enzyme DNMT1 reconnaît efficacement l'ADN double-brin hémi-méthylée produite après la synthèse d'un nouveau brin d'ADN lors de la phase S et reproduit le patron de méthylation sur le brin d'ADN qui n'est pas méthylé. La méthylation de l'ADN semble donc être un bon moyen pour la cellule de maintenir la

répression transcriptionnelle. Alors que DNMT1 est associé au maintien des patrons de méthylation, l'enzyme DNMT3a est impliqué dans la méthylation *de novo* de l'ADN. DNMT3a est recruté spécifiquement à l'ADN par des facteurs de transcription spécifiques. Les DNMTs sont capables d'interagir avec d'autres enzymes qui modifient la chromatine comme les HDAC1 et 2 ainsi que SUV39H1(354).

#### *2.1.4.1.6 Mécanismes de formation des types de chromatine*

Les facteurs et cofacteurs de transcription sont très étroitement impliqués dans la formation des différents types de chromatine. Inversement, la structure de la chromatine influence le recrutement de facteurs au niveau de l'ADN.

Une façon classique de voir l'activation transcriptionnelle est tout d'abord l'accès d'un facteur de transcription à son site de liaison à l'ADN à l'intérieur d'une chromatine restrictive. Ce facteur de transcription, en collaboration avec différents partenaires, pourra recruter des cofacteurs qui vont favoriser un relâchement de la structure de la chromatine. Ceci permettra à d'autres facteurs de transcription ainsi qu'au complexe de préinitiation de la transcription d'accéder à l'ADN.

Certaines protéines sont reconnues pour avoir une affinité avec certaines modifications post-traductionnelles des histones. Ce sont les « lecteurs » de l'épigénome(358). L'habilité des différentes protéines à s'associer aux modifications post-traductionnelles des histones dépend de plusieurs facteurs tels que leurs autres partenaires protéiques ou leurs propres modifications post-traductionnelles. Les protéines contenant un bromodomaine reconnaissent les groupements acétyles. Par exemple, l'histone acétyltransférase PCAF s'associe à des résidus acétylés sur les histones H3 et H4 et il a été proposé que cette association favorise l'étalement de l'acétylation des histones dans la région(359,360). Brg1 qui fait partie du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF est une autre protéine qui contient un bromodomaine(361). Les groupements méthyles peuvent être reconnus par des protéines possédant un chromodomaine. Il est généralement observé que ces protéines

ont une meilleure affinité pour les lysines bi ou triméthylées (362,363). Par exemple, les protéines de la famille CHD (aussi impliquées dans le remodelage de la chromatine) s'associent à H3K4me alors que les protéines du complexe PRC1 préfèrent s'associer à H3K27Me (Figure 2.11) (297,364). Un concept qui a émergé de ces observations est que le recrutement des protéines aux modifications post-traductionnelles des histones est plus stable lorsqu'elles s'associent à plus d'un site sur les histones. Par exemple, TAF1 (qui fait parti de TFIID) est un exemple de protéine oligovalente puisqu'elle possède deux bromodomaines qui s'associent à H4K5Ac et à H4K12Ac. De façon intéressante TAF3 qui possède un domaine PHD qui reconnaît H3K4me3 ainsi que deux bromodomaines s'associant à H3K9Ac et H3K14Ac. L'association de ces deux membres du complexe TFIID suggère une coopération trans-histone qui stabilise l'association de TFIID au niveau de la chromatine. Un autre exemple d'une coopération multivalente est l'association de EED à H3K9Me et H3K27Me ainsi que l'association de RbAp48 à H4 qui sont deux sous-unités du complexe PRC2. Finalement, la protéine HP1 avec ses deux chromodomaines est capable de s'associer à H3K9Me sur deux nucléosomes différents ce qui favorise la formation d'hétérochromatine(358).

Le *crosstalk* entre les différentes modifications post-traductionnelles est aussi un élément influençant la signature épigénétique. Par exemple, GCN5 (chez la levure) est recruté au niveau de la chromatine par H3S10P et influence par la suite H3K14Ac. Ceci indique que H3K14Ac est dépendant de H3S10P. De façon similaire, H2BUB1 est requis pour le recrutement de COMPASS et H3K4me(365).

Les différentes structures de chromatine sont des états dynamiques, réversibles et hautement régulés de manière à influencer adéquatement la transcription des gènes pour préserver l'homéostasie cellulaire. Lors du cycle cellulaire, les structures chromatiniennes sont détruites et reformées à chaque division cellulaire. De plus, la régulation épigénétique est influencée par divers stimuli internes et externes à la cellule de manière à influencer la cellule dans son destin. Par exemple, tel que vu à la section 2.1.2.3, diverses voies de signalisation permettent de transmettre des signaux à la cellule afin d'influencer



l'expression des gènes. Les signaux reçus peuvent entre autres moduler l'activité de facteurs de transcription qui par la suite influenceront la chromatine et l'expression des gènes cibles. De façon intéressante, les modifications épigénétiques sont fidèlement transmises après division cellulaire même si le signal original est absent. On appelle ce phénomène la mémoire épigénétique ou mémoire moléculaire(366).

#### **2.1.4.2 Modulation de la chromatine lors de la différenciation et du développement**

Puisque l'état de la chromatine est directement lié au niveau de transcription des gènes, il est important que cet état soit maintenu par la cellule tant que le gène doit être exprimé pour maintenir l'identité de la lignée cellulaire. Ainsi, malgré que lors du cycle cellulaire les chromosomes soient dupliqués, le noyau détruit et que les cellules se divisent (mitose), la structure de la chromatine de plusieurs gènes est maintenue par divers mécanismes. Ceci est particulièrement important pour maintenir la répression de certains gènes associés à la multipotence lors de la différenciation ou encore pour maintenir la répression de gènes tissus spécifiques dans les cellules multipotentes.

##### *2.1.4.2.1 La chromatine lors de la différenciation*

Le processus de différenciation cellulaire permet la spécialisation cellulaire. Les cellules spécialisées peuvent effectuer des fonctions spécifiques dans l'organisme. Généralement, une petite quantité de cellules multipotentes sont présentes dans un tissu et sont capables d'autorenouvellement ainsi que de spécification vers une ou des lignées. C'est le cas des CSH présentées à la section 2.1.1. De façon générale, la chromatine de ces cellules est plus ou moins restrictive et est associée à un niveau d'expression basal d'une série de gènes associés à la différenciation. Le terme potentialisation (*potentiation*) est utilisé pour caractériser ce type de chromatine(367). De plus, il est possible de détecter de faibles niveaux d'expression d'une série de facteurs de transcription tissu-spécifiques. Ce phénomène est appelé « amorçage de lignée » (*lineage priming*)(368). Ainsi, la CSH est prête à se différencier dans n'importe quel type cellulaire hématopoïétique selon les besoins

de l'organisme. Une combinaison de signaux de différenciation induira des changements au niveau de l'activité de certains facteurs de transcription. D'autres verront leur expression augmenter ce qui favorisera l'expression de leurs gènes cibles. Certains de ces facteurs seront impliqués dans la répression, parfois irréversible, de différents gènes qui sont spécifiques à d'autres tissus où aux cellules multipotentes. De façon générale, la chromatine des cellules différenciées est plus réfractaire à la transcription que celle des cellules multipotentes. Tel que mentionné plutôt, le signal de différenciation reçu par la CSH n'est pas nécessairement présent lors des divisions cellulaires subséquentes. Toutefois, les modifications épigénétiques mises en place par les facteurs et cofacteurs de transcription peuvent être maintenues ce qui permet de conserver l'identité cellulaire.

#### *2.1.4.2.2 La chromatine lors du développement*

Les mécanismes de différenciation varient lors du développement. Tel que vu pour l'érythropoïèse à la section 2.1.2, il existe une distinction entre l'érythropoïèse primitive et définitive. Tout d'abord, les cellules multipotentes qui sont à l'origine des cellules différenciées sont différentes chez l'embryon et chez l'adulte. Dans le cas des CSH, elles sont soumises à trois différents programmes d'expression génique impliquant une variation dans l'organisation de la chromatine lors du développement (22). Les CSH se spécialisent très tôt lors du développement, c'est-à-dire qu'elles perdent leur capacité à exprimer des gènes spécifiques à d'autres tissus mis à part les gènes hématopoïétiques. Un facteur de transcription très important dans cette étape est TAL1 qui collaborerait alors avec son partenaire LMO2(369,370). L'absence de l'un ou l'autre de ces facteurs chez la souris empêche la formation du système hématopoïétique. Ceci suggère que ces facteurs sont essentiels dans l'amorçage du programme d'expression des gènes hématopoïétiques.

Par la suite, les CSH doivent s'autorenouveler. Il existe une phase d'autorenouvellement distincte au niveau fœtal (phase d'expansion) et au niveau adulte (phase de maintenance). Ceci suggère encore une fois que la transcription qui influence la chromatine des CSH provenant du foie fœtal vs la moelle osseuse est différent étant donné que les gènes

impliqués dans ces deux mécanismes sont différents. Meis1 a été montré comme étant un important régulateur de l'expansion au niveau fœtal alors Bmi-1 est surtout impliqué dans la maintenance chez l'adulte(29,371). L'importance différentielle des différents facteurs suggère des mécanismes de régulation des gènes différents dans les différents tissus.

Il a été mentionné à la section 2.1.2 que les cellules érythroïdes primitives sont différentes des cellules définitives à plusieurs niveaux. Spécifiquement, les gènes du locus  $\beta$  ont une régulation différentielle dans ces deux types cellulaires. Par exemple, chez l'humain les gènes  $\gamma$  sont exprimés au niveau fœtal et réprimés chez l'adulte. Inversement, le gène  $\beta$  est exprimé au niveau adulte et réprimé au niveau fœtal. Pourtant, les différents facteurs impliqués dans la régulation de ces deux gènes sont exprimés tant dans les cellules provenant du foie ou de la moelle osseuse. Ceci implique donc une régulation précise au niveau de la chromatine afin de diriger les facteurs de transcription ainsi que leurs différents partenaires au bon endroit dans le locus. Toutefois, la concentration des différents facteurs impliqués dans la régulation génique peut aussi influencer la façon dont ces facteurs seront en mesure de réguler les gènes.

#### **2.1.4.3 Effet de positionnement**

L'effet de positionnement est un concept utilisé pour expliquer l'influence de l'environnement chromatinien sur un gène ou un groupe de gène. Le PEV (position effect variegation) est un effet qui est observé lorsqu'un gène normalement retrouvé dans une région d'euchromatine est relocalisé à une jonction entre l'hétérochromatine et l'euchromatine. Ce faisant, l'hétérochromatine présente à proximité va influencer les niveaux d'expression du gène à cause d'un étalement aléatoire de l'hétérochromatine(372). Pour des raisons qui restent encore mal comprises, l'effet de positionnement est variable d'une cellule à l'autre faisant en sorte que l'on peut observer une mosaïque d'expression du gène à l'intérieur d'un même tissu. De plus, le niveau de PEV observé dans un tissu peut varier lors du développement. Ce phénomène a été grandement étudié chez la drosophile lors de réarrangement chromosomique et a permis d'obtenir une meilleure compréhension

des mécanismes de formation de l'hétérochromatine. Il est intéressant de noter que certains gènes qui sont normalement localisés dans l'hétérochromatine peuvent aussi être influencés par un effet de PEV.

Plusieurs études sur le phénomène du PEV ont mené à l'identification de nombreux régulateurs de la chromatine (373). Les modificateurs du PEV sont classés en deux catégories basées sur le phénotype de la mutation dans leur gène. Les mutations qui promeuvent le PEV sont appelées E(var) (*Enhancer of PEV*) alors que les mutations qui défavorisent le PEV sont appelées Su(var) (*Suppressor of PEV*). De façon générale les Su(var) sont associés à la formation d'hétérochromatine (promotion du PEV) alors que les E(var) favorisent l'euchromatine (répression du PEV). Des exemples de différentes enzymes impliquées dans la modification des histones ou le remodelage de la chromatine sont présentés au tableau 2.3.

**Tableau 2.3 Exemples d'enzymes qui modulent le PEV**

Catégorie	Enzyme modifiant la chromatine	Enzyme remodelant la chromatine
Su(var)	Suv39H1	Baz1a
	G9a	Atrx
	EZH2	Baf60
	LSD1	
	HDACs	
E(var)	MLL1	BRG1
	MLL2	SNF2H
	ASH1L	

D'autres études sur le PEV ont utilisé des modèles murins dans lesquels des transgènes ont été introduits (section 3.2.1.1.1). Étant donné la nature stochastique du site d'intégration, il a été observé que l'expression du transgène est fréquemment soumise à l'effet PEV. Ces études ont permis entre autres de démontrer l'importance des régions *enhancers* non seulement pour permettre de haut niveau d'expression du transgène mais aussi pour favoriser une chromatine permissive à la transcription(374). En d'autres mots, la présence

d'un *enhancer* tissu-spécifique en amont d'un transgène permet de prévenir l'effet PEV de façon tissu-spécifique. Plusieurs groupes ont travaillé à caractériser ce phénomène dans le contexte de la recherche sur le traitement des thalassémies. Une meilleure compréhension des mécanismes régulant l'expression des gènes de globine pourrait permettre d'utiliser la thérapie génique pour rétablir l'expression du gène de globine muté. Le PEV est un phénomène important à considérer dans ce contexte.

## 2.2 Problématique

La régulation transcriptionnelle chez les eucaryotes est un processus excessivement complexe. Ce processus permet l'adaptation de la cellule à son environnement et est étroitement lié aux divers destins cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la fonction de la cellule ou l'apoptose. L'homéostasie cellulaire dépend entre autres d'un bon fonctionnement des mécanismes transcriptionnels afin que chaque gène soit exprimé de façon adéquate en tout temps. Un dérèglement à l'un ou l'autre des niveaux de la régulation transcriptionnelle peut perturber l'expression de un ou plusieurs gènes et entraîner de graves conséquences pour la cellule. Ainsi, il est important de bien comprendre les processus normaux de régulation afin de mieux détecter les anomalies dans les différentes maladies. Ces processus incluent la formation du CPI, une activité adéquate des facteurs et cofacteurs de transcription ainsi qu'une régulation épigénétique appropriée. Chacun de ces éléments a été étudié dans divers types cellulaires incluant les cellules érythroïdes. Toutefois, les études portent très souvent sur un aspect précis de la régulation comme par exemple la fonction d'un facteur de transcription à un certain gène. Dans le but d'éventuellement utiliser ces différents facteurs comme cible thérapeutique dans diverses maladies, il est important de comprendre le rôle de la combinaison des différents facteurs de transcription dans divers contextes (ex : développement et différenciation) ainsi que la façon dont ils collaborent avec les autres facteurs. Une connaissance approfondie de la fonction et l'interrelation entre les facteurs et cofacteurs de transcription permettra de mieux cibler les traitements visant à moduler l'expression des gènes.

### **2.1.1 Les facteurs de transcription dans les maladies hématopoïétiques**

Les facteurs de transcription sont centraux dans la régulation transcriptionnelle et épigénétique puisqu'ils influencent l'activité de la Pol II et recrutent diverses activités qui modulent la chromatine. Certaines maladies, telles que les thalassémies, sont causées non pas par une mutation dans un facteur de transcription mais plutôt dans un élément de régulation en *cis* qui peut s'associer à plusieurs facteurs de transcription. Étant donné que ces éléments confèrent une spécificité dans l'expression des gènes qu'ils régulent, il est important de bien caractériser leur mécanisme d'action ainsi que les différents facteurs qui s'y associent.

Certains facteurs ou cofacteurs de transcription sont connus pour être mutés dans certaines leucémies (translocation ou mutation ponctuelle). Dans ce cas, les gènes cibles de ces facteurs sont anormalement régulés. Toutefois, selon les différents complexes dont peut faire partie le facteur, les gènes cibles pourraient être affectés d'une façon différente suggérant que les partenaires des facteurs sont aussi des éléments importants à considérer. Malgré que plusieurs complexes transcriptionnels aient déjà été identifiés dans la littérature, plusieurs complexes restent encore à caractériser.

### **2.2.2 Thérapies pour les différents désordres hématopoïétiques**

Malgré que les thalassémies soient des maladies qui sont étudiées depuis de nombreuses années, les thérapies qui ont été développées pour traiter ces maladies restent laborieuses et/ou inefficaces. En effet, les patients thalassémiques doivent très souvent recevoir plusieurs transfusions sanguines afin de pallier le manque d'hémoglobine dans leur sang. Les transfusions ne permettent pas de guérir la maladie. La thérapie génique qui permettrait de réactiver l'expression du ou des gènes de globine affecté(s) ne semble pas être efficace étant donné la difficulté de maintenir un niveau d'expression du gène satisfaisant(375). Ceci indique qu'il reste encore des éléments mal compris dans la régulation des gènes de globine qui pourraient être associés à la faible efficacité de la thérapie génique.

Une avenue prometteuse dans le traitement des désordres hématopoïétiques est le traitement ciblé à l'aide de petites molécules. Les facteurs de transcription sont des cibles de choix dans ce type de thérapie. C'est pourquoi une meilleure compréhension du fonctionnement des facteurs de transcription est importante dans le contexte du traitement des maladies hématopoïétiques.

## **2.3 Hypothèses et objectifs**

### **2.3.1 Hypothèse**

Les facteurs de transcription permettent l'expression spécifique des gènes lors du développement et de la différenciation. L'hypothèse générale de travail est que la fonction d'un même facteur de transcription peut varier selon le stade de différenciation et/ou de développement de la cellule, et que divers paramètres peuvent influencer l'activité d'un facteur de transcription tels que les modifications post-traductionnelles, les différents partenaires, la localisation cellulaire ou le niveau d'expression. Pour tester notre hypothèse, nous avons utilisé principalement le locus *huβ* qui code pour plusieurs gènes régulés lors du développement. De plus, ces gènes sont aussi régulés lors de la différenciation érythroïde. Notre objectif principal est donc de caractériser l'interrelation entre différents facteurs de transcription dans les cellules érythroïdes lors du développement et de la différenciation.

### **2.3.2 Objectif 1 : caractérisation d'un élément de régulation en *cis***

Tel que décrit à la section 2.1.3.1.4, un élément de régulation en *cis* est caractérisé par la présence de différents sites de reconnaissance pour des facteurs de transcription. Dans certaines pathologies, ces éléments de régulation sont mutés, ce qui fait en sorte que les facteurs s'y associant ne sont pas recrutés adéquatement à l'ADN. Les gènes régulés par un élément *cis* muté sont donc anormalement exprimés et la fonction et/ou l'homéostasie de la cellule est affectée.

Le locus *huβ* est caractérisé par la présence d'un LCR composé de cinq éléments HS. Étant donné que le LCR est un élément de régulation important pour le contrôle de l'expression des gènes du locus, la mutation d'un des HS affecte profondément l'expression des gènes du locus *huβ*. D'après la littérature, les différents HS ont des fonctions individuelles spécifiques et peuvent agir en synergie. Nous avons donc posé comme hypothèse spécifique que l'importance du HS2 est variable selon le gène du locus qui doit être activé, mais que sa fonction est conservée lors du développement.

Pour déterminer l'importance du HS2, nous avons utilisé un modèle murin transgénique pour un locus *huβ* dont le HS2 a été supprimé (section 3.2.1.1.1). Nos objectifs étaient de caractériser, lors du développement (stade e10.5 et stade e12.5), (i) l'expression et la chromatine des gènes du locus, (ii) la formation du CPI aux promoteurs de gènes du locus, (iii) le recrutement des facteurs et cofacteurs de transcription au LCR et aux promoteurs des gènes du locus, (iv) les interactions à distances entre le LCR et les promoteurs.

### **2.3.3 Objectif 2 : caractérisation du rôle des facteurs de transcription dans des cellules progénitrices hématopoïétiques**

Les cellules progénitrices sont caractérisées par leur potentiel à se différencier en différents types cellulaires. Les mécanismes qui favorisent une lignée vs une autre sont peu connus. La spécification vers la lignée érythroïde implique entre autres l'expression à haut niveau du gène  $\beta$  (lors de l'hématopoïèse définitive). Notre groupe a déjà observé que la chromatine du promoteur du gène  $\beta$  est potentialisée dans les CPH pour la transcription à haut niveau dans les cellules érythroïdes matures(376). Notre hypothèse est que dans les CPH, la potentialisation implique les mêmes facteurs de transcription qui sont requis pour l'expression du gène dans les cellules matures.

Pour cette étude, nous avons utilisé un modèle murin transgénique pour le locus *huβ* (section 3.2.1.1.1). Afin de caractériser l'importance de certains facteurs de transcription important, nous avons aussi utilisé des modèles murins déficients pour les facteurs EKLF et



p45 (section 3.2.1.2). Nos objectifs étaient de caractériser, lors de la différenciation (cellules progénitrices hématopoïétiques et cellules érythroïdes matures), (i) l'expression et la chromatine du gène  $\beta$ , (ii) la formation du CPI au promoteur  $\beta$ , (iii) le recrutement des facteurs et cofacteurs de transcription au promoteur  $\beta$ .

### **2.3.4 Objectif 3 : caractérisation du rôle des facteurs de transcription lors de la commutation des globines**

Lors du développement, l'expression des globines passe de  $\gamma$  à  $\delta$  et  $\beta$  (voir section 2.1.2.4.2). Chez la souris transgénique pour le locus hu $\beta$ , la commutation se produit au stade e11.5-e12.5. Chez certains patients ayant une expression anormale de la chaîne  $\beta$ -globine, la réactivation du gène  $\gamma$  est une option thérapeutique intéressante. Par contre, puisque ce gène est normalement réprimé lors du développement, il est important de bien comprendre les mécanismes de répression du gène  $\gamma$  lors du développement. Le facteur de transcription Ikaros a déjà été associé avec ce processus mais son rôle est peu caractérisé. Nous avons posé l'hypothèse que Ikaros est un facteur essentiel à la commutation  $\gamma$ -à- $\beta$ .

Pour déterminer l'importance de Ikaros dans la commutation  $\gamma$ -à- $\beta$ , nous avons utilisé un modèle murin transgénique pour le locus hu $\beta$  et déficient pour la protéine Ikaros (section 3.2.1). Nos objectifs étaient de caractériser, lors de la commutation  $\gamma$ -à- $\beta$  (stade e12.5), (i) l'expression et la chromatine des gènes  $\gamma$ , (ii) le recrutement des facteurs et cofacteurs de transcription aux promoteurs  $\gamma$ , (iii) les interactions à distances entre le LCR et les promoteurs  $\gamma$ .

### **2.3.5 Objectif 4 : Caractérisation des mécanismes de répression impliquant Ikaros à d'autres gènes dans les cellules érythroïdes**

L'étude portant sur la caractérisation du rôle d'Ikaros dans la répression des gènes  $\gamma$  nous a amené à étendre notre étude sur son rôle dans la répression d'autres gènes dans les cellules

érythroïdes. Ikaros est un facteur connu comme étant un important régulateur de plusieurs gènes dans les cellules lymphoïdes. Parmi les gènes régulés par Ikaros qui sont exprimés à la fois dans la lignée lymphoïde et la lignée érythroïde, on trouve certains gènes cibles de la voie Notch. De plus, le rôle de cette voie dans les cellules érythroïdes est peu caractérisé et controversé. Notre hypothèse est que Ikaros peut réguler les gènes cibles de la voie Notch dans les cellules érythroïdes.

Pour déterminer l'importance de Ikaros dans l'expression des gènes cibles de la voie Notch, nous avons utilisé entre autres un modèle murin déficient pour la protéine Ikaros (section 3.2.1.2.3). Nous nous sommes particulièrement intéressés à la régulation du gène *Hes1* lors de la différenciation. Nous avons aussi utilisé un modèle cellulaire de différenciation, les cellules MEL (mouse erythroleukemia; section 3.2.2.1). Finalement, ayant identifié GATA-1 comme un partenaire important de Ikaros (chapitre 6), nous avons aussi utilisé un modèle cellulaire déficient pour GATA-1, les cellules G1E-ER4 (section 3.2.2.2). Nos objectifs étaient de caractériser, lors de la différenciation érythroïde, (i) l'expression et la chromatine du gène *Hes1*, (ii) la formation du CPI au promoteur du gène *Hes1*, (iii) le recrutement des facteurs et cofacteurs de transcription au promoteur *Hes1*.

## 2.4 Limitations de l'étude

Malgré que notre domaine de recherche soit associé aux maladies humaines, il est difficile et coûteux de travailler avec du matériel humain. De plus, l'utilisation de modèles (décrits à la section 3.2) est une manière moins onéreuse et plus éthique permettant de comprendre certains mécanismes moléculaires qui peuvent par la suite être appliqués à l'humain. La presque totalité des expériences qui ont été réalisées dans cette thèse ont été effectuées sur des cellules de souris, soit primaires soit en culture.

Une autre limitation de notre étude se situe au niveau de la caractérisation d'un petit nombre de gènes.

### 2.4.1 Utilisation de modèles murins

Malgré qu'il y ait plusieurs différences entre la souris et l'humain, il a été montré que plusieurs similitudes entre ces deux espèces font de la souris un modèle de choix pour l'étude des mécanismes transcriptionnels applicables à l'humain. Un des avantages de l'utilisation de ce modèle pour notre étude est l'utilisation de souris déficientes pour différentes protéines ainsi que des modèles transgéniques exprimant des gènes humains. D'un point de vue pratique et éthique, il est impossible d'obtenir des cellules humaines primaires déficientes pour les protéines faisant l'objet de nos travaux. De plus, ces modèles ont l'avantage de ne comporter que la mutation d'intérêt diminuant les risques de mauvaise interprétation des résultats.

Nous avons aussi fait usage de souris transgéniques exprimant les gènes du locus *huβ*. Ce modèle est déjà bien caractérisé dans la littérature et plusieurs études font état de plusieurs ressemblances entre la régulation des gènes dans la souris transgénique et chez l'humain. Toutefois, il existe certaines différences auxquelles il faut faire attention. Une des limitations majeures est la commutation des globines qui se produit au stade fœtal dans la souris transgénique alors qu'elle se produit à la naissance chez l'humain. Ainsi, la différence d'environnement pourrait influencer certains mécanismes. Toutefois, la commutation normale chez la souris se produit aussi au stade fœtal. Un autre aspect à prendre en considération est que les gènes  $\gamma$  ne possèdent pas d'homologue spécifique murin, ce qui pourrait faire en sorte que certains mécanismes de régulation pourraient être absent chez la souris. Au chapitre 5, nous avons toutefois pu utiliser des cellules humaines provenant d'aphérèse et avons obtenus des résultats similaires dans les cellules humaines et les cellules de souris transgénique.

De façon intéressante, en croisant nos modèles déficients pour certains facteurs avec nos souris transgéniques pour le locus *huβ*, nous obtenons un bon compromis pour l'étude du rôle de ces facteurs dans la régulation du locus. Ce type d'étude serait impossible chez l'humain.

### **2.4.2 Utilisation de modèles cellulaires**

Pour la dernière portion de notre étude, nous avons utilisé différents modèles cellulaires. Un désavantage majeur de ces cellules par rapport aux cellules primaires est qu'elles sont généralement transformées, c.-à-d. elles possèdent différentes mutations qui leur confèrent un avantage prolifératif. La raison de l'utilisation de ces modèles est la rapidité et le faible coût d'utilisation. Étant donné que nous voulions étudier la différenciation érythroïde, ces modèles sont bien caractérisés pour ce phénomène et permettent rapidement d'obtenir une grande quantité de cellules à utiliser pour les différentes expériences. La différenciation de cellules primaires *in vitro* est aussi possible mais plus laborieuse et la quantité de cellules obtenues est plus faible.

Un avantage de l'utilisation de ces modèles est la facilité de moduler l'expression de différents gènes par différentes méthodes. Il est aussi possible de moduler les gènes de façon transitoire chez la souris, mais encore une fois ce processus est plus laborieux et n'est pas spécifique à un seul type cellulaire. Il faut donc considérer l'utilisation des modèles cellulaires avec précautions. Toutefois, les observations faites dans ces modèles peuvent servir de piste pour une investigation plus approfondie dans un modèle murin par exemple. Dans le cadre de notre étude, nous avons en effet utilisé différents modèles (cellulaires et murins) afin de démontrer que les phénomènes observés sont véritables et ne sont pas dus au choix du modèle.

### **2.4.3 Caractérisation d'un petit nombre de gènes**

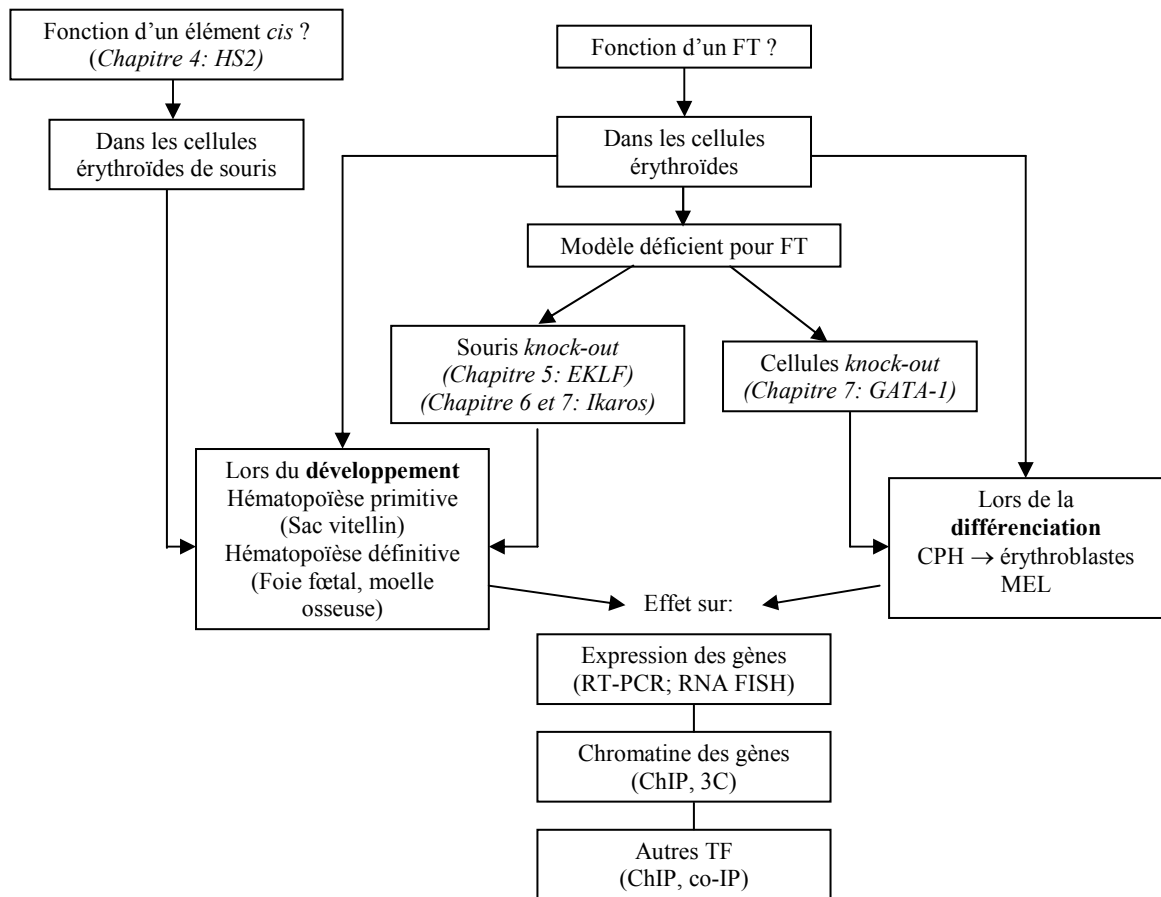
Dans la conception de notre étude, nous avons choisi d'étudier de façon approfondie l'expression d'un petit nombre de gènes dans les cellules érythroïdes. Les observations faites à un gène particulier permettent cependant difficilement de généraliser à plusieurs gènes. Plusieurs études récentes utilisent des méthodes d'analyse à grande échelle pour tenter de comprendre des mécanismes fondamentaux de régulation transcriptionnelle dans un type cellulaire particulier. L'utilisation de ces méthodes d'analyse permet de révéler

l'importance de certains mécanismes de régulation. Il semble toutefois qu'il est difficile de généraliser les mécanismes de régulation à tous les gènes dans un même type cellulaire. Nous croyons que l'étude à petite échelle de la régulation transcriptionnelle permet de comprendre d'une manière ciblée de quelle façon un gène est régulé. Cette compréhension est essentielle dans le contexte où l'on voudrait corriger l'expression de ce gène particulier dans une maladie. De plus, la caractérisation approfondie de la régulation de différents promoteurs dans un même type cellulaire permet d'établir les ressemblances et les différences dans les mécanismes de régulation transcriptionnelle.

## **Chapitre 3 : Cadre expérimental**

### **3.1 Conception de l'étude**

Dans le but d'identifier de nouvelles fonctions pour les différents facteurs de transcription connus dans les cellules érythroïdes, nous avons utilisé dans un premier temps le locus  $\text{hu}\beta$  comme modèle. Étant donné que la régulation de ce locus est bien caractérisée, nous nous sommes concentrés sur l'étude de nouveaux mécanismes de régulation en se basant sur les nombreuses connaissances sur le sujet. Dans un deuxième temps, nous avons tenté de déterminer si les mécanismes identifiés pour le locus  $\text{hu}\beta$  s'appliquent à d'autres gènes dans les cellules érythroïdes.



**Figure 3.1 Résumé des différents modèles utilisés pour répondre aux différents objectifs**

## 3.2 Modèles

### 3.2.1 Souris

L'alignement des génomes humains et murins montrent une homologie de séquence de 85% et 75% dans les régions codantes et régulatrices respectivement(377). Au niveau de la régulation transcriptionnelle, il existe un très grand nombre d'exemples où la fonction d'un gène est la même chez la souris et l'humain. Par exemple, le facteur de transcription GATA-1 est un important régulateur transcriptionnel du promoteur du gène  $\beta$ maj chez la

souris. De façon intéressante, ce même facteur est aussi associé à l'activation du gène  $\beta$  chez l'humain, l'orthologue de  $\beta$ maj.

Plusieurs maladies humaines peuvent être reproduites dans un modèle murin. La mutation, délétion ou surexpression d'un gène peut induire un phénotype s'apparentant à une maladie, illustrant ainsi l'implication de ce gène dans la pathologie. Un bon exemple est la mutation *JAK2V617F* du gène de l'enzyme tyrosine kinase *JAK2* qui a été identifiée entre autres chez des patients atteints de *polycythemia vera* (378). Lorsque cette mutation est introduite chez la souris par transplantation de moëlle osseuse, on observe le développement d'une pathologie s'apparentant au *polycythemia vera* (379).

Pour notre étude, nous avons pris avantage de divers modèles murins pour étudier la régulation de la transcription dans les cellules érythroïdes.

### **3.2.1.1 Les souris transgéniques**

La transgénèse permet l'introduction d'un ou plusieurs gènes dans un organisme (380). Les gènes introduits sont exprimés dans l'organisme hôte de façon régulée. La régulation des transgènes dépend d'une série de facteurs. Habituellement, le gène d'intérêt sera introduit avec ses éléments de régulation en *cis* (promoteur et *enhancer*) afin de favoriser une expression tissu- et développement-spécifique. La présence d'un *enhancer* puissant est essentielle pour contrecarrer l'effet de positionnement (section 2.1.4.3).

La souris transgénique peut être utilisée à différentes fins. Par exemple, l'effet de la surexpression d'un gène peut permettre de mieux comprendre la fonction de ce gène dans l'organisme. Dans le contexte de notre étude, nous avons utilisé un modèle murin contenant le locus *hu $\beta$* . Ce modèle nous permet d'étudier comment le locus est régulé transcriptionnellement.



### 3.2.1.1.1 *Le locus hu $\beta$*

Le locus hu $\beta$  est un locus qui a été énormément étudié et qui est un excellent modèle pour l'étude de la régulation transcriptionnelle dans les cellules érythroïdes. Ce locus est situé sur le chromosome 11 chez l'humain. Les locus murins et aviaires ont aussi été l'objet de plusieurs études. Malgré que plusieurs éléments de régulation du locus humain soient retrouvés dans le locus murin, certaines régions-clées y sont absentes. C'est pourquoi l'utilisation du modèle transgénique pour le locus humain a été préférée dans le cadre de plusieurs études dont la nôtre. Le locus hu $\beta$  est composé de cinq gènes qui sont régulés lors de la différenciation et lors du développement (section 2.1.2.4.2).

La souris transgénique line2 (ln2) a été conçue par la microinjection d'un fragment de 70 kB contenant le locus hu $\beta$  complet, incluant le LCR, dans un ovule de souris fertilisé (159,381). Ce modèle murin qui ne contient qu'une seule copie du transgène permet l'étude des gènes du locus humain, puisqu'ils sont régulés lors du développement et de la différenciation. Particulièrement, le gène  $\beta$  semble régulé de façon très semblable à ses orthologues murins  $\beta_{maj}$  et  $\beta_{min}$ . Son expression débute peu après le jour e11.5 et devient maximale au jour 12.5. Par contre, il semble que les niveaux d'expression du gène embryonnaire  $\epsilon$  soient plutôt faibles par rapport aux gènes embryonnaires murins  $\epsilon\gamma$  et  $\beta h1$ . D'autre part, les gènes  $\gamma$  qui n'ont pas d'orthologue murin, semblent régulés d'une façon différente des gènes embryonnaires ou fœtaux de la souris, suggérant que les mécanismes de régulations des gènes  $\gamma$  sont conservés et spécifiques. Son expression est maximale et beaucoup plus importante que  $\epsilon$  au début du développement (vers e8.5).  $\gamma$  diminue ensuite dramatiquement vers le jour e11.5 alors qu'on observe la commutation des globines (section 2.1.2.4.2).

Une variante du modèle ln2 a été conçue afin d'étudier la fonction précise d'un élément de régulation du LCR(155). Les souris  $\Delta 2B$  et  $\Delta 2C$  contiennent le locus hu $\beta$  avec une mutation (délétion) du site HS2 du LCR. Cette délétion a pour effet d'induire un effet de positionnement c.-à-d. la régulation du locus est anormale et variable d'une cellule à l'autre

pour un même tissu. En fait, lorsqu'un gène ou un locus est intégré dans le génome murin, il est influencé par la chromatine environnante du site d'intégration (effet PEV, section 2.1.4.3). Dans le cas du locus *huβ*, le LCR empêche l'effet de positionnement et favorise une expression normale telle qu'observée chez la souris *ln2*. En mutant le HS2, on retrouve l'effet de positionnement qui est variable d'une lignée à l'autre selon le site d'intégration ( $\Delta 2B$  vs  $\Delta 2C$ ).

### 3.2.1.2 Souris déficiente pour un gène (souris *knock-out*)

La souris *knock-out* peut être utilisée pour déterminer les différentes fonctions d'un gène en particulier(382). L'intégration d'un fragment d'ADN mutant dans le gène d'intérêt de la souris se fait habituellement dans des CSE par recombinaison homologe. Des cellules sont ensuite sélectionnées sur la base du remplacement du gène d'intérêt par le gène mutant et introduites dans un embryon de souris au stade blastocyste. Une lignée de souris mutantes dans lesquelles l'ARNm d'intérêt sera tronqué et ne permettra pas la production de la protéine d'intérêt sera établie. Une souris peut être hétérozygote ou homozygote pour la mutation selon si une ou deux allèles sont inactivées.

Dans le contexte de notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés aux facteurs de transcription impliqués de la régulation des gènes érythroïdes. Nous avons utilisé des modèles de souris *knock-out* pour trois de ces facteurs ce qui nous a permis d'identifier ou de valider différentes fonctions pour ces protéines dans les cellules érythroïdes. Ces modèles *knock-out* ont tous été croisés avec des souris *ln2* afin d'étudier l'importance de ces facteurs sur la régulation du locus *huβ*.

#### 3.2.1.2.1 Souris déficiente pour *EKLF*

Dans ce modèle, le gène murin *Eklf* est inactivé par l'introduction de deux gènes de sélection (*LacZ* et *neo*) après la méthionine 19 du gène (229). Les souris homozygotes pour la mutation ne peuvent survivre au-delà du stade embryonnaire e14 suite à une anémie

sévère causée entre autres par une faible production d'hémoglobine. Ceci suggère que EKLf est important pour les dernières étapes de l'hématopoïèse définitive.

#### 3.2.1.2.2 *Souris déficiente pour p45*

L'absence d'expression de la sous-unité p45 du facteur NF-E2 est due à l'intégration d'une cassette *neo* dans l'exon 3 du gène *p45* (256). Ceci fait en sorte qu'aucun ARNm ou protéine p45 n'est présent dans les cellules. Un faible pourcentage de bébés homozygotes pour la mutation survit à l'accouchement. Ceci est dû à une hémorragie causée par une absence de plaquettes sanguines. Les souris mutantes survivantes souffrent entre autres de thrombopénie et d'une légère anémie(256,383).

#### 3.2.1.2.3 *Souris déficiente pour Ikaros*

Dans la littérature, le modèle que nous avons utilisé est rapporté comme la souris *Ikaros*<sup>null</sup>. L'inactivation du gène *Ikaros* s'est fait par l'introduction d'une cassette *neo* dans l'exon 7 du gène ce qui fait en sorte que la protéine est instable et indétectable dans les cellules (235). Ces souris ont un système immunitaire déficient causé entre autres par une absence de lymphocytes B et une différenciation anormale des lymphocytes T(235). De plus, il a clairement été établi que *Ikaros* influence la formation des CSH et des BFU-E(240). Les lignées myéloïde et érythroïde sont peu affectées dans ces souris.

### 3.2.2 Cellules en culture

Avant même l'utilisation des organismes pluricellulaires en biologie moléculaire, les modèles cellulaires dérivés de tissus animaux étaient utilisés pour l'étude de la régulation des gènes. Le principe consiste à cultiver un type cellulaire (habituellement immortalisé) dans un milieu de culture contenant tous les nutriments nécessaires à la survie et la division cellulaire. En modifiant le milieu de culture, il est possible d'induire différents programmes cellulaires comme la différenciation ou l'apoptose. Tout comme pour les modèles animaux, il est possible de modifier génétiquement les cellules en culture afin d'étudier différents

paramètres. Ce modèle est plus simple à utiliser que l'organisme pluricellulaire mais comporte le désavantage de ne pas toujours refléter de façon précise le comportement d'une cellule à l'intérieur d'un organisme vivant. Pour notre étude, nous avons utilisé différents modèles cellulaires qui récapitulent la différenciation des cellules érythroïdes.

### **3.2.2.1 Cellules *Mouse erythroleukemia* (MEL)**

Tel que décrit au chapitre 2.1.2.5.4, la LAE est caractérisée par une présence anormale de cellules érythroïdes immatures dans la moelle osseuse. Chez la souris, il est possible d'induire cette maladie par une infection avec le complexe du virus de Friend (384). La lignée de cellules MEL 745 est dérivée de cellules malignes isolées de la rate d'un animal infecté par ce virus. Ces cellules sont arrêtées à un stade de différenciation similaire au proérythroblaste et peuvent se diviser en suspension de façon indéfinie dans un milieu de culture tel que le DMEM supplémenté avec du sérum. Le clone C-88 est dérivé de la lignée 745 et est muté pour le gène APRT(385). Les cellules MEL sont indépendantes de l'érythropoïétine pour leur prolifération ou leur différenciation. D'ailleurs leur différenciation peut être induite par divers agents tels les dérivés polaires (DMSO, HMBA), les dérivés puriques (Hypoxanthine), les acides gras (butyrate), diverses formes de radiations (rayons X, UV) ou certains agents antitumoraux (bléomycine, cycloheximide)(386). Le niveau de différenciation spontané est faible ( $> 1\%$ )(387).

Ces cellules comportent certaines anomalies telles que l'expression aberrante de la protéine gp55 (activation constitutive de EpoR), la surexpression du facteur PU.1 (blocage de la différenciation) et une perte de fonction du facteur suppresseur de tumeur p53(388,389). Toutefois, ce modèle est couramment utilisé pour l'étude de la différenciation des cellules érythroïdes vu sa simplicité d'utilisation et parce qu'il permet de récapituler les étapes de la différenciation érythroïde du stade proérythroblaste au stade orthochromatique.

### 3.2.2.2 Cellules GATA-1-erythroid-Estrogen receptor (G1E-ER)

Il est difficile d'étudier l'importance du facteur GATA-1 dans les cellules érythroïdes de souris GATA-1 *knock-out* puisque les embryons meurent très tôt lors du développement embryonnaire (e11). Une alternative au modèle murin provient de CSE déficiente pour GATA-1. Malheureusement, après différenciation érythroïde *in vitro*, ces cellules cessent de se différencier au stade proérythroblaste et meurent par apoptose. Par contre, en surexprimant de façon stable l'antiapoptotique bcl-2, les cellules déficientes pour GATA-1 cessent de se différencier au stade proérythroblaste mais certaines conservent la capacité de proliférer. À partir ces cellules, la lignée G1E fut établie (390). Ces cellules sont dépendantes de l'érythropoïétine et du SCF. De plus, la réexpression de GATA-1 dans ces cellules induit la différenciation en érythroblastes basophiles. Afin de pouvoir travailler avec un modèle inductible, une construction permettant l'expression de GATA-1 fusionné au récepteur de l'estrogène (estrogen receptor; ER) a été introduit dans les cellules G1E (G1E-ER4). Ceci fait en sorte que la protéine de fusion GATA-1-ER se retrouve exclusivement dans le cytoplasme de la cellule et n'influence pas ses gènes cibles. En présence d'estrogène dans le milieu de culture, l'interaction entre la portion ER et la molécule d'estrogène induit un changement conformationnel qui relocalise la protéine de fusion au noyau. Cette relocalisation permet l'activation ou la répression des gènes cibles de GATA-1 et induit la différenciation des cellules. Ce modèle est un outil puissant qui a été grandement utilisé pour caractériser les fonctions de GATA-1.

### 3.2.2.3 Cellules transgéniques

Tel que celui des souris transgéniques, le génome des cellules en culture peut aussi être modifié. Afin de moduler l'expression d'un gène, une cassette doit être introduite dans le génome de la cellule grâce à un vecteur d'expression. Ceci peut être effectué par transfection ou infection. Habituellement, le vecteur d'expression exprimera en plus de la cassette à intégrer, un gène de résistance à une drogue qui sera utilisé pour sélectionner les cellules qui auront intégré l'ADN du vecteur.

Pour diminuer l'expression d'un gène, il est possible de muter le gène d'intérêt par mutagenèse ou *knock-out* (tel que pour les souris). Une alternative plus simple est d'utiliser la technologie du shRNA. Un vecteur exprimant un ARN complémentaire à l'ARNm du gène cible est intégré dans la cellule. Les shRNA vont s'associer à l'ARNm d'intérêt ce qui va entraîner la dégradation de l'ARNm et donc diminuer l'expression du gène.

### **3.3 Revue des méthodes**

Cette section ne vise pas à décrire spécifiquement les protocoles des différentes méthodes mais plutôt de montrer l'importance du choix de ces méthodes dans le contexte de notre étude.

#### **3.3.1 Détection des ARN messagers**

La production des ARNm par la transcription est une des étapes de l'expression des gènes. La détection des ARNm permet donc de mesurer les niveaux d'expression d'un gène au niveau transcriptionnel.

La réaction de transcription inverse consiste en la production d'un ADN complémentaire (ADNc) à partir d'un brin d'ARN. La réaction est effectuée par une enzyme ADN polymérase dépendante de l'ARN (*reverse transcriptase*). La quantité d'ADNc produite est directement proportionnelle à la quantité d'ARN présent dans l'échantillon. Cet ADNc peut être amplifié par PCR (voir plus bas) et quantifié. Cette technique permet donc de mesurer et de comparer les niveaux d'expression d'un gène d'intérêt.

L'hybridation *In Situ* permet de détecter directement un ARNm à l'intérieur d'une cellule. La détection se fait grâce à une sonde d'ARN marquée. Cette technique permet de compter le nombre de cellules qui expriment un gène donné de façon qualitative.

### 3.3.2 Étude de la chromatine

Les techniques permettant l'étude de la chromatine sont fondamentales dans l'étude de la régulation de la transcription des gènes. Tel que mentionné à la section 2.1.4, la conformation de la chromatine est directement liée à l'état d'activation d'un gène. De plus, l'interaction entre les protéines et l'ADN (particulièrement au niveau des régions régulatrices) est essentielle pour la transcription. Ainsi, les mécanismes qui modulent la chromatine sont associés aux variations dans la transcription des gènes. L'étude de la chromatine est un complément important aux méthodes qui permettent de mesurer les niveaux d'ARN messagers. D'ailleurs, il y a eu ces dernières années une progression rapide dans le développement de dérivés des techniques de bases qui sont présentées ici.

L'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) permet de déterminer l'interaction d'une protéine nucléaire avec une région donnée d'ADN en utilisant un anticorps spécifique reconnaissant cette protéine. Le ChIP est très efficace pour caractériser la structure de la chromatine en déterminant la présence des modifications post-traductionnelles des histones dans une région d'ADN d'intérêt. Tel que mentionné au chapitre 2.1.4.1, les différentes modifications des histones sont associées à différents états transcriptionnels des gènes. Le ChIP permet aussi de déterminer la présence des différents facteurs et cofacteurs de transcription au niveau de la chromatine.

Tel que décrit au chapitre 2.1.3.1.4, outre les promoteurs proximaux des gènes, les régions régulatrices des gènes peuvent se trouver à plusieurs kilobases du site d'initiation de la transcription. Une façon pour ces régions distales de réguler la transcription est d'entrer en contact physique avec le gène ou avec son promoteur. Ainsi, la méthode de capture de conformation chromosomique (3C) a été développée afin de détecter les interactions tridimensionnelles de la chromatine. Le 3C permet de déterminer la proximité physique de deux fragments d'ADN dans le noyau.

### **3.3.3 Réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*; PCR)**

Le PCR a été utilisé pour nos travaux dans le cadre de l'analyse des réactions RT, des ChIP et du 3C. Cette méthode simple et rapide permet l'amplification d'une région d'ADN cible à l'aide d'oligonucléotides (amorces) spécifiques pour la région d'intérêt. Cette méthode permet d'amplifier des petites quantités d'ADN afin de les détecter et de les mesurer.

### **3.3.4 Co-Immunoprécipitation (co-IP)**

L'immunoprécipitation de protéine en condition non-dénaturante permet d'enrichir une protéine d'intérêt provenant d'un lysat cellulaire à l'aide d'un anticorps spécifique. On peut ainsi déterminer si deux protéines sont en complexe. La co-IP est un complément intéressant au ChIP.

### **3.3.5 Marquage cellulaire**

La purification des différents types cellulaires hématopoïétiques est une technique essentielle pour caractériser les mécanismes propres à chacun des types cellulaires. Toutes les cellules expriment différentes combinaisons de molécules à leur surface. En utilisant des anticorps spécifiques contre ces différentes combinaisons, il est possible d'identifier et de séparer les différents types cellulaires sur la base du niveau d'expression des différentes molécules. Il est aussi possible de marquer des molécules intracellulaires.



## **PARTIE II : RÉSULTATS**

## Chapitre 4 : Caractérisation d'un élément de régulation en cis

La caractérisation des éléments de régulation en *cis* est un aspect important dans la compréhension de la régulation transcriptionnelle des gènes. Ces régions constituent des éléments importants qui favorisent l'activation transcriptionnelle. Elles comportent une série de sites de liaison pour différents facteurs de transcription. La combinaison des différents facteurs et cofacteurs qui vont s'associer à ces régions régulatrices confèrera une spécificité dans l'activité transcriptionnelle du ou des gènes sous leur contrôle.

La mutation d'un élément de régulation en *cis* peut avoir des effets dramatiques sur l'expression des gènes sous son contrôle. Par exemple, le recrutement de certains facteurs de transcription qui s'y associe normalement sera altéré et ceci influencera l'activité transcriptionnelle du/des gènes. La mutation d'un élément en *cis* permet donc d'évaluer l'importance de cet élément pour la régulation des gènes.

Tel que décrit pour l'objectif 1 (section 2.3.2), nous avons caractérisé l'importance de l'élément HS2 du locus *huβ* lors du développement. Nos résultats ont permis de montrer que tels que décrit dans la littérature, cette région possède deux activités soit la modulation de l'organisation de la chromatine du locus ainsi que la promotion de l'activité transcriptionnelle des gènes du locus. Toutefois, notre étude montre que ces deux activités sont distinctes et que HS2 peut influencer l'un ou l'autre des processus de façon indépendante. De plus, nous montrons que l'influence de HS2 sur les différents gènes du locus lors du développement est variable selon le gène et le stade de développement. La caractérisation approfondie de l'importance de HS2 dans la régulation du locus *huβ* pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies dans le traitement des  $\beta$ -thalassémies.

Les résultats de cette étude qui sont présentés dans le présent chapitre ont été publiés dans la revue *Nucleic Acid Research* en juin 2009. L'article a pour titre : « *Differential requirement of a distal regulatory region for pre-initiation complex formation at globin gene promoters* » et comporte 7 figures ainsi que 3 figures supplémentaires.

## **Article 1: Differential requirement of a distal regulatory region for pre-initiation complex formation at globin gene promoters**

Julie Ross<sup>1</sup>, Stefania Bottardi<sup>1</sup>, Vincent Bourgoïn<sup>1</sup>, Alex Wollenschlaeger<sup>1</sup>, Elliot Drobetsky<sup>1</sup>, Marie Trudel<sup>3</sup>, Eric Milot<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center and Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4;

<sup>2</sup> Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montreal, C.P. Succursale Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3T 3J7;

<sup>3</sup> Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Faculty of Medicine, University of Montreal, 110, avenue des Pins Ouest, Montreal, Quebec H2W 1R7.

\* To whom correspondence should be addressed : Eric Milot, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center and Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

Tel: + 514 252 3551; Fax: + 514 252 3430

Running title: HS2 specifically enhances  $\gamma$ -globin gene transcription

Keywords: Human  $\beta$ -globin  
Chromatin  
Gene regulation  
Distal regulatory region

Word count: 5 962

## 4.1 Abstract

Although distal regulatory regions are frequent throughout the genome, the molecular mechanisms by which they act in a promoter-specific manner remain to be elucidated. The human  $\beta$ -globin locus constitutes an extremely well established multigenic model to investigate this issue. In erythroid cells, the  $\beta$ -globin Locus Control Region (LCR) exerts distal regulatory function by influencing local chromatin organization and inducing high-level expression of individual  $\beta$ -like globin genes. Moreover in transgenic mice expressing the entire human  $\beta$ -globin locus, deletion of LCR-hypersensitive site 2 (HS2) can alter  $\beta$ -like globin gene expression. Here we show that abnormal expression of human  $\beta$ -like globin genes in the absence of HS2 is associated with decreased efficacy of pre-initiation complex formation at the human  $\epsilon$ - and  $\gamma$ -promoters, but not at the  $\beta$ -promoter. This promoter-specific phenomenon is associated with reduced long-range interactions between the HS2-deleted LCR and human  $\gamma$ -promoters. We also find that HS2 is dispensable for high-level human  $\beta$ -gene transcription, whereas deletion of this hypersensitive site can alter locus chromatin organization; therefore the functions exerted by HS2 in transcriptional enhancement and locus chromatin organization are distinct. Overall, our data delineate one mechanism whereby a distal regulatory region provides promoter-specific transcriptional enhancement.

## 4.2 Introduction

The precise regulation of multiple genes through the intermediacy of both proximal and distal *cis*-regulatory regions is prerequisite for normal development and cellular differentiation. Specific transcription factors (TFs) initially bind these regions and favor the recruitment of yet other TFs and co-factors. The combinatorial effect of these factors then modulates chromatin remodeling, covalent modification of histones, and/or long-range chromatin interactions that facilitate either gene-activation or -repression (1-6).

The human  $\beta$ - (hu $\beta$ -) globin locus provides a powerful model to investigate the roles of *cis*-regulatory regions and TFs. This locus is comprised of five developmentally regulated genes: embryonic  $\epsilon$ -, fetal  $^G\gamma$ - and  $^A\gamma$ -, and adult  $\delta$ - and  $\beta$ -globin genes. Mutations affecting either expression of the hu $\beta$ -globin gene, or composition of  $\beta$ -globin chains, can result in  $\beta$ -thalassemia or sickle cell anemia. Treatments for these diseases aim primarily at the transcriptional reactivation of fetal globin genes in adult bone marrow, but are not always efficient (7). As such the development of new molecular therapeutic strategies to stimulate hu $\beta$ -globin locus transcription is considered an important challenge for the future.

Transgenic mice carrying the complete hu $\beta$ -globin locus express the  $\epsilon$ - and  $\gamma$ -genes in primitive erythroid cells (EryC) derived from yolk sac. Around embryonic day 11 (e11) fetal liver EryC primarily express hu $\gamma$ -genes. Soon after, during  $\gamma$ -to- $\beta$ -globin switching,  $\gamma$ -gene transcription progressively decreases which is concomitant with  $\beta$ -gene transcriptional activation (8). In general, specific TFs and cofactors recruited to the  $\beta$ -globin locus influence locus chromatin organization and/or promote long-range chromatin interactions, and as such are critical for timely transcriptional activation/repression of  $\beta$ -like globin genes (9-13). For example, GATA-1 and EKLF recruit the histone acetyltransferase CBP, the histone deacetylase HDAC1 (14-18), and various chromatin remodeling complexes to the locus (18-20). EKLF is required for the recruitment of E-RC1 (erythroid-remodeling complex 1) to adult  $\beta$ -like globin gene promoters (21). The p45 subunit of NF-E2 (p45), another TF important for regulation of the hu $\beta$ -globin locus, can also bind CBP (22), HDAC1, and the chromatin remodeling factor BRG1 (23). Finally, in addition to their roles in facilitating histone covalent modification, GATA-1 and p45 were shown to interact with specific pre-initiation complex (PIC) subunits (24,25).

The erythroid-specific  $\beta$ -globin LCR, composed of five DNaseI hypersensitive sites (HS) located 5' of the locus, induces high-level globin gene expression by mediating long-range chromatin interactions that maintain close proximity between the LCR and active globin gene promoters (26-29). In humans (30) and transgenic mice (31,32), due to position

effects, truncated LCRs are not able to prevent abnormal gene expression as efficiently as complete ones. For instance in EryC derived from transgenic mice lacking HS2, hu $\beta$ -like globin genes are abnormally regulated when the transgene is integrated within pericentromeric regions (31). In murine fetal and adult EryC the abnormal pattern of hu $\beta$ -gene expression is caused by position effect variegation (PEV) (31,33), characterized by stochastic repression of transcription in a subset of cells due to the spreading of heterochromatin from genomic sites adjacent to the transgene (34).

The LCR has been proposed to act as a holocomplex (35,36). Deletion of any among the five HS regions can destabilize this holocomplex thereby preventing long-range chromatin interactions critical for high-level globin gene transcription (37,38). However, molecular dissection of the LCR strongly suggests that each HS exerts distinct functions. For instance HS2 alone can enhance globin gene expression in EryC, although it does not protect transgenes from position effects (39). It has also been reported that globin gene expression can be influenced differentially depending upon the precise HS region deleted (31,36,37,40-43). Indeed transgenic mice carrying an HS2 deletion were characterized by decreased hu $\gamma$ - and hu $\beta$ -globin gene expression in yolk sac-, fetal liver- as well as bone marrow-derived EryC (36), although dissenting studies revealed no significant effect on expression of these genes in early fetal liver EryC (37). Finally, when the endogenous murine HS2 is deleted, embryonic genes are barely affected while the expression of adult genes is decreased by up to 30% (42,44). Therefore, the influence of HS2 over globin gene expression might be variable during ontogeny, and the role of HS2 in mediating transcriptional enhancement remains to be further clarified.

It has been proposed that HS2 is involved in PIC nucleation, since TATA-binding protein (TBP) and the general transcription factor IIB (TFIIB) are recruited to HS2 in both bone marrow hematopoietic progenitor cells and EryC (33,45). In addition, Johnson *et al.* (46) suggested that in EryC, phosphorylated RNA polymerase II (Pol II) is recruited to HS2 and then transferred to globin gene promoters. These data suggest that the LCR, and more specifically HS2, might enhance transcription by facilitating recruitment of PIC

constituents that, in turn, contribute to PIC formation and stability at globin gene promoters. Moreover HS2 was shown to be important for the recruitment of histone modifying complexes and chromatin remodeling activities (47,48), suggesting that in addition to its enhancer activity this hypersensitive site may be involved in locus chromatin organization. However, it is not clear if HS2 promotes PIC formation and chromatin reorganization activities at the same time, or if these events are coordinated separately during development.

Here we have characterized the molecular mechanisms by which HS2 affects globin locus chromatin organization and globin gene expression in EryC isolated from yolk sac at e10.5 and from fetal liver at e12.5. Specifically we investigated (i) recruitment of TFs, chromatin modifying factors, and PIC components, in addition to (ii) long-range chromatin interactions in transgenic mice containing the entire human  $\beta$ -globin locus deleted or not for the HS2 region. Our results demonstrate that HS2-enhancer activity can be exerted in a promoter-specific manner, and that the capacities of HS2 to induce transcriptional enhancement and locus chromatin organization are distinct.

## **4.3 Results**

### **4.3.1 Globin gene expression in ln2 and $\Delta$ 2B yolk sac EryC**

To define the role of HS2 on globin gene expression during ontogeny, we investigated the effect of HS2 deletion on hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -gene expression in e10.5 yolk sac and e12.5 fetal liver EryC derived from ln2 and  $\Delta$ 2B mice. Ln2 transgenic mice carry the 70kb hu $\beta$ -globin locus (Fig. 4.1A), and express high-levels of hu $\beta$ -like globin genes in a developmentally-regulated manner (8). The  $\Delta$ 2B transgenic mice carries the same construct as ln2 except for a deletion of a 742 bp ApaLI-SnaBI fragment encompassing HS2, and they express hu $\beta$ -like globin genes abnormally at all stages of development (31). Accordingly, quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis indicates that in ln2 e10.5 EryC, hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -globin mRNA

levels are, respectively, ~10-fold and ~4-fold higher relative to  $\Delta 2B$  (Fig. 4.1B). The pattern of  $hu\gamma$ -gene expression was also investigated at the single-cell level by RNA Fluorescent *In-Situ* Hybridization (RNA-FISH) using mouse  $\alpha$ -globin transcript as internal control. We observed that  $hu\gamma$ -genes are transcribed in all  $\Delta 2B$  e10.5 EryC because EryC, which can transcribe the endogenous murine  $\alpha$ -globin gene, are also competent in  $hu\gamma$ -gene transcription (Fig. 4.1C). This indicates that in contrast to the PEV expression pattern that characterizes  $hu\beta$ -gene expression in  $\Delta 2B$  e13.5 fetal liver and bone marrow derived EryC (where only 25% of EryC express the  $hu\beta$ -gene) (31), abnormal  $hu\gamma$ -gene expression in  $\Delta 2B$  e10.5 EryC is not attributable to PEV.

Towards understanding the origin of abnormal  $hu\beta$ -like globin gene expression in e10.5 EryC, we investigated  $hu\epsilon$ - and  $hu\gamma$ -primary transcript levels. In addition, since the LCR has been reported to influence transcriptional elongation of globin genes (58), we set out to determine whether the impaired  $hu\epsilon$ - and  $hu\gamma$ -gene expression in  $\Delta 2B$  e10.5 EryC could be related to abnormal transcriptional elongation. We observed that for both genes (i) primary transcript levels decrease in  $\Delta 2B$  cells but do not vary between introns 1 and 2 and (ii) the ratio of primary gene transcripts vs. mRNA is similar in ln2 and  $\Delta 2B$  e10.5 EryC (Fig. 4.1B). Taken together, these results indicate that decreased  $hu\epsilon$ - and  $hu\gamma$ -gene transcription in  $\Delta 2B$  e10.5 EryC is not a consequence of variegated expression, but rather is due to the absence of HS2, which alters expression levels without affecting transcriptional elongation.



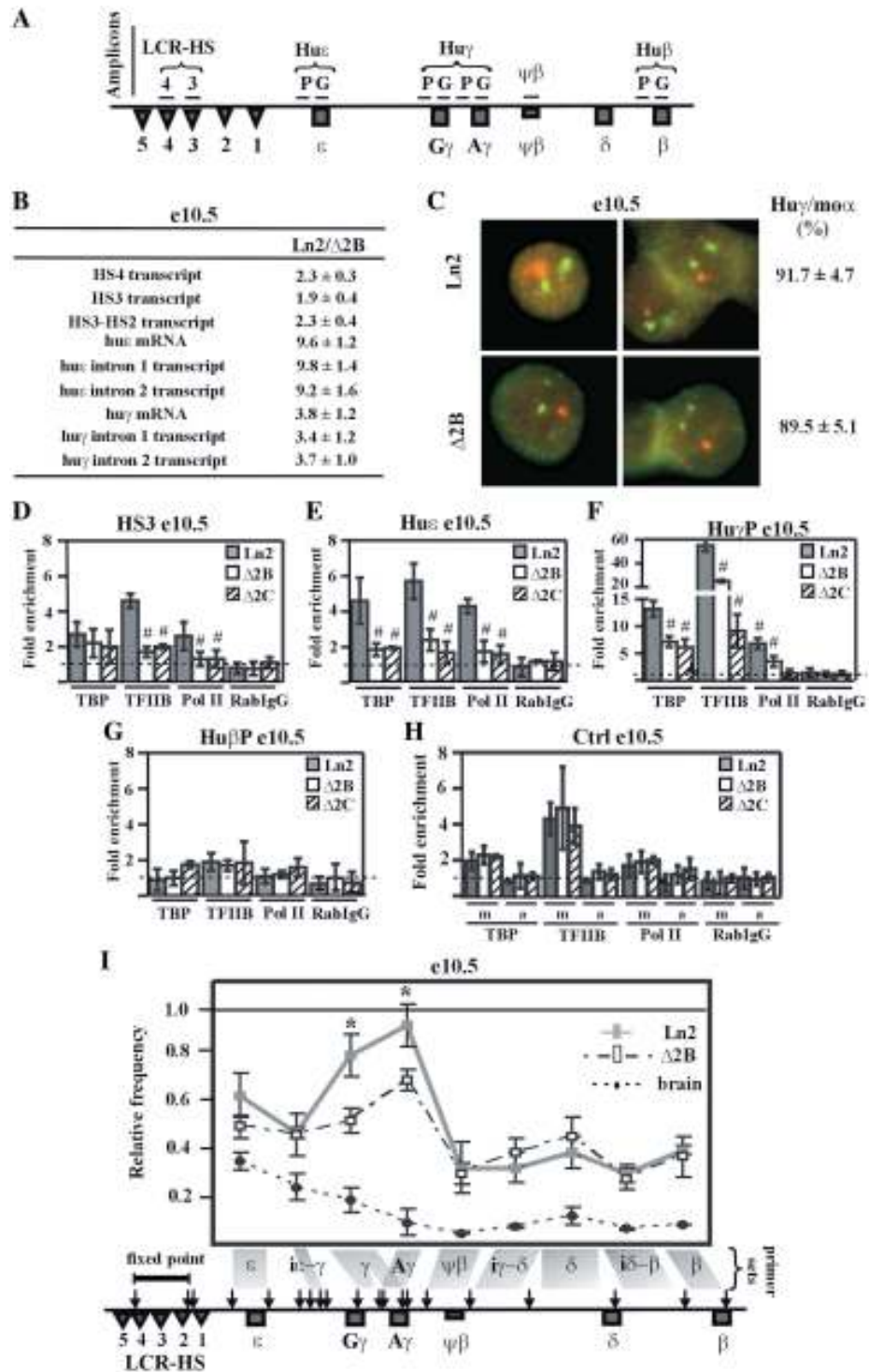


Figure 4.1. HS2 deletion affects PIC formation at huy-promoters and long-range interactions among LCR and huy-globin genes in e10.5 EryC

(A) Schematic representation of the human  $\beta$ -globin locus. Regions (amplicons) analyzed by ChIP are represented by horizontal lines. Due to high sequence similarity at hu $\gamma$ -promoters and at hu $\gamma$ -genes, the same primer sets amplify both the hu $^A\gamma$ - and hu $^G\gamma$ -promoters or genes; (B) RNA purified from ln2 and  $\Delta$ 2B e10.5 yolk sacs (e10.5) was retro-transcribed. Transcript quantification was made by qPCR, and relative levels of transcription (ln2/ $\Delta$ 2B) were calculated according to Pfaffl (52) using mouse actin cDNA as internal control; HS4 or HS3 transcript: HS4 or HS3 primary transcript; HS3-HS2 transcript: primary transcript of the intergenic region between HS3 and HS2; hu $\epsilon$  mRNA: hu $\epsilon$ -globin mRNA transcript; hu $\epsilon$  intron 1 or 2 transcript:  $\epsilon$ -globin intron 1 or 2 primary transcript; hu $\gamma$  mRNA: hu $\gamma$ -globin mRNA transcript; hu $\gamma$  intron 1 or 2 transcript:  $\gamma$ -globin intron 1 or 2 primary transcript (both  $^A\gamma$  and  $^G\gamma$  transcripts are amplified with the primer sets used); (C) Representative example of RNA-FISH on ln2 and  $\Delta$ 2B e10.5 yolk sacs (e10.5). Green signals: mouse  $\alpha$ -globin primary transcript (mo $\alpha$ ; FITC detection); red signals: hu $\gamma$ -globin primary transcript (hu $\gamma$ ; Texas Red detection; both  $^A\gamma$  and  $^G\gamma$  are recognized by the probes); (D-H) ChIP assays were carried out on e10.5 yolk sacs (e10.5; gray bars: ln2; white bars:  $\Delta$ 2B; dashed bars:  $\Delta$ 2C). Immunoprecipitated and input chromatin samples from TBP ChIP were subjected to duplex semi-quantitative hot PCR and from TFIIB, Pol II and RabIgG (rabbit IgG) ChIP to qPCR. Fold enrichment (y-axis) of globin regions relative to the control and input samples are represented by bars, with corresponding standard deviations. A value of 1 (dashed line) indicates no enrichment. The positive control for TBP, TFIIB and Pol II ChIP is represented by m (mouse  $\beta$ -globin HS2; *mHS2/Thp*) and the negative control by a (*amy/Thp*); hash sign (#):  $p \leq 0.05$  according to Student's *t* test (ln2 vs.  $\Delta$ 2B or ln2 vs.  $\Delta$ 2C). The regions analyzed are specified on each graph and the antibodies used for ChIP assays are indicated underneath each graph; (I) 3C

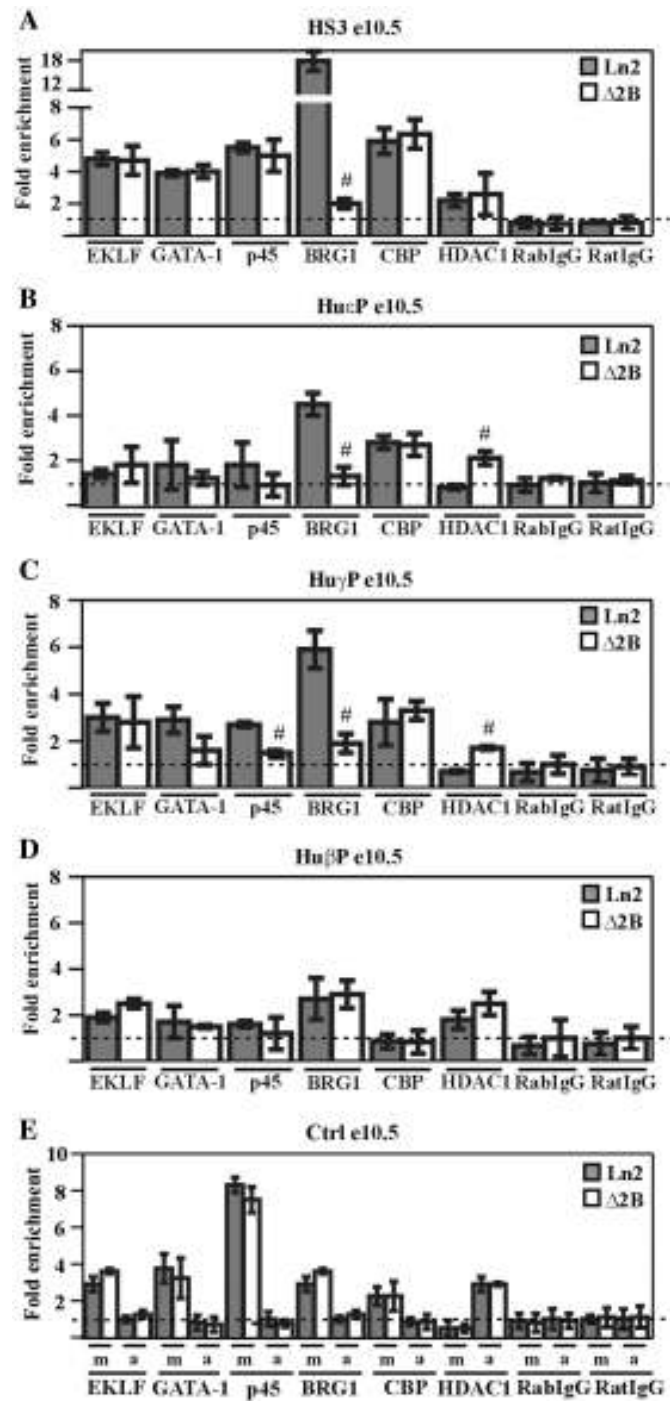
assay performed on e10.5 yolk sacs (e10.5; gray line: ln2; dashed line:  $\Delta$ 2B). 3C ligation products were used as templates for qPCR analysis of the regions indicated on the x-axis. EcoRI digestion sites are shown by vertical arrows on the locus and fragments of interest are delimited by gray boxes. A primer set is formed by the combination of HS4-HS2 primer (fixed point) and one of the following primers:  $\epsilon$ : hu $\epsilon$ -gene; i $\epsilon$ - $\gamma$ : intergenic region between hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -gene;  $\gamma$ : hu<sup>G</sup> $\gamma$ - and hu<sup>A</sup> $\gamma$ -genes; <sup>A</sup> $\gamma$ : hu<sup>A</sup> $\gamma$ -gene;  $\psi\beta$ :  $\psi\beta$  gene; i $\gamma$ - $\delta$ : intergenic region between hu<sup>A</sup> $\gamma$ - and hu $\delta$ -gene;  $\delta$ : hu $\delta$ -gene; i $\delta$ - $\beta$ : intergenic region between hu $\delta$ - and hu $\beta$ -gene;  $\beta$ : hu $\beta$ -gene. Relative cross-linking frequency (y-axis) of the fixed point with globin fragments was defined using naked DNA as control and normalized to mouse actin. A relative frequency of one was attributed to the highest cross-linking frequency; asterisk (\*):  $p \leq 0.001$  according to Student's *t* test (ln2 vs.  $\Delta$ 2B); e12.5 brain cells (dotted line), in which human  $\beta$ -like globin genes are not expressed were used as control.

### 4.3.2 PIC formation and long-range chromatin interactions at the hu $\beta$ -like globin locus in ln2 and $\Delta$ 2B yolk sac EryC

To elucidate the mechanism(s) influencing human globin gene expression in  $\Delta$ 2B e10.5 yolk sac EryC, we first studied PIC formation at hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -promoters. Recruitment of the PIC subunits (59) TBP, TFIIB, and Pol II was assessed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay on ln2 and  $\Delta$ 2B e10.5 EryC. Since regulation of the mouse  $\beta$ -globin locus is normal in all transgenic mouse lines utilized, mouse LCR HS2 was used as positive control, and amylase as negative control, for ChIP assays (Fig. 4.1H). As shown in Fig. 4.1D-F, reduced detection of TBP, TFIIB and Pol II at HS3, hu $\epsilon$ -, and hu $\gamma$ -promoters suggests that PIC formation or stability is aberrant in the absence of HS2 in  $\Delta$ 2B e10.5 EryC.

Since it is proposed that long-range chromatin interactions are important for PIC formation/stability at promoters (46), we analyzed the interactions between the LCR and different regions across the  $\beta$ -globin locus using the chromosomal conformation capture (3C) assay (55). Nuclei were treated with formaldehyde, and the crosslinked genomic DNA digested and ligated. Genomic DNA fragments located in close proximity are more susceptible to ligation, and the frequency of ligation events can be detected by qPCR using appropriate primer sets (Fig. 4.1I). Interestingly, we observed that HS2 deletion specifically affects long-range chromatin interactions between LCR and  $h\upsilon\gamma$ -genes in  $\Delta 2B$  e10.5 EryC (Fig. 4.1I), which is consistent with altered PIC formation at  $h\upsilon\gamma$ -promoters and low-level  $h\upsilon\gamma$ -gene transcription in these cells. Possibly due to their linear proximity, no significant variation in frequency of contact between LCR and the  $h\upsilon\epsilon$ -region could be detected.

In order to further understand the basis for abnormal globin gene expression in  $\Delta 2B$  e10.5 EryC, we investigated EKLF, GATA-1, and p45 recruitment to the  $\beta$ -globin locus (Fig. 4.2A-D). As shown in Fig. 4.2C, only p45 recruitment to  $h\upsilon\gamma$ -promoters is significantly affected in  $\Delta 2B$  cells. Among the cofactors interacting with p45 and capable of influencing locus organization (23), we noted a reduction and increase, respectively, of BRG1 and HDAC1 recruitment to  $h\upsilon\epsilon$ - and  $h\upsilon\gamma$ -promoters (Fig. 4.2B, C). Thus in addition to being important for PIC formation/stability, and for proper long-range chromatin interactions between the LCR and  $h\upsilon\gamma$ -promoters in e10.5 EryC, the presence of HS2 appears to be required to ensure recruitment of p45 and BRG1 to  $h\upsilon\epsilon$ - and  $h\upsilon\gamma$ -promoters. In summary, our results indicate that HS2 is firmly involved in transcriptional enhancement of  $h\upsilon\epsilon$ - and  $h\upsilon\gamma$ -genes in e10.5 EryC.



**Figure 4.2. Transcription factor and co-factor recruitment at the hu $\beta$ -globin locus in Ln2 and  $\Delta$ 2B e10.5 EryC**

(A-E) ChIP assays were carried out on e10.5 yolk sacs (e10.5; gray bars: ln2; white bars:  $\Delta$ 2B); immunoprecipitated and input chromatin samples were subject to qPCR. Fold enrichments were calculated as described in Fig. 4.1 and are indicated on the y-axis; the positive control for EKLF, GATA-1, p45, BRG1 and CBP ChIP is represented by m (*mHS2/Thp*) and for HDAC1 ChIP, by a (*amy/Gapdh*). The negative control for EKLF, GATA-1, p45, BRG1 and CBP ChIP is represented by a (*amy/Thp*) and for HDAC1 ChIP, by m (*mHS2/Thp*). Hash sign (#):  $p \leq 0.05$  according to Student's *t* test (ln2 vs.  $\Delta$ 2B). The regions analyzed are specified on each graph and the antibodies used for ChIP assays are indicated underneath each graph.

### 4.3.3 PIC formation and long-range chromatin interactions at the hu $\beta$ -globin locus in ln2 and $\Delta$ 2B fetal liver EryC

Based on the above results, we investigated whether altered PIC formation and impaired long-range chromatin interactions might also take place in  $\Delta$ 2B e12.5 fetal liver EryC, where huy- and hu $\beta$ -globin genes (both active at this developmental stage (8)) are characterized by a PEV pattern of expression (31). We observed that TBP recruitment to HS3, huy- and hu $\beta$ -promoters is not significantly affected in  $\Delta$ 2B e12.5 EryC, whereas TFIIB recruitment and Pol II loading are clearly less efficient in  $\Delta$ 2B than in ln2 cells (Fig. 4.3C-E). TBP binding was confirmed in another PEV line, namely  $\Delta$ 2C (31), in which the same globin locus as  $\Delta$ 2B is integrated in a restrictive chromosomal environment that allows expression of the hu $\beta$ -globin gene in only 4% of  $\Delta$ 2C EryC (Fig. 4.3C-E and Fig. S4.3C). Recruitment of TBP to a TATA box embedded in restrictive chromatin has been previously documented (60). However, due to reduced TFIIB and Pol II recruitment to globin gene promoters, we believe that TBP binding is not sufficient to promote PIC formation in  $\Delta$ 2B e12.5 EryC.

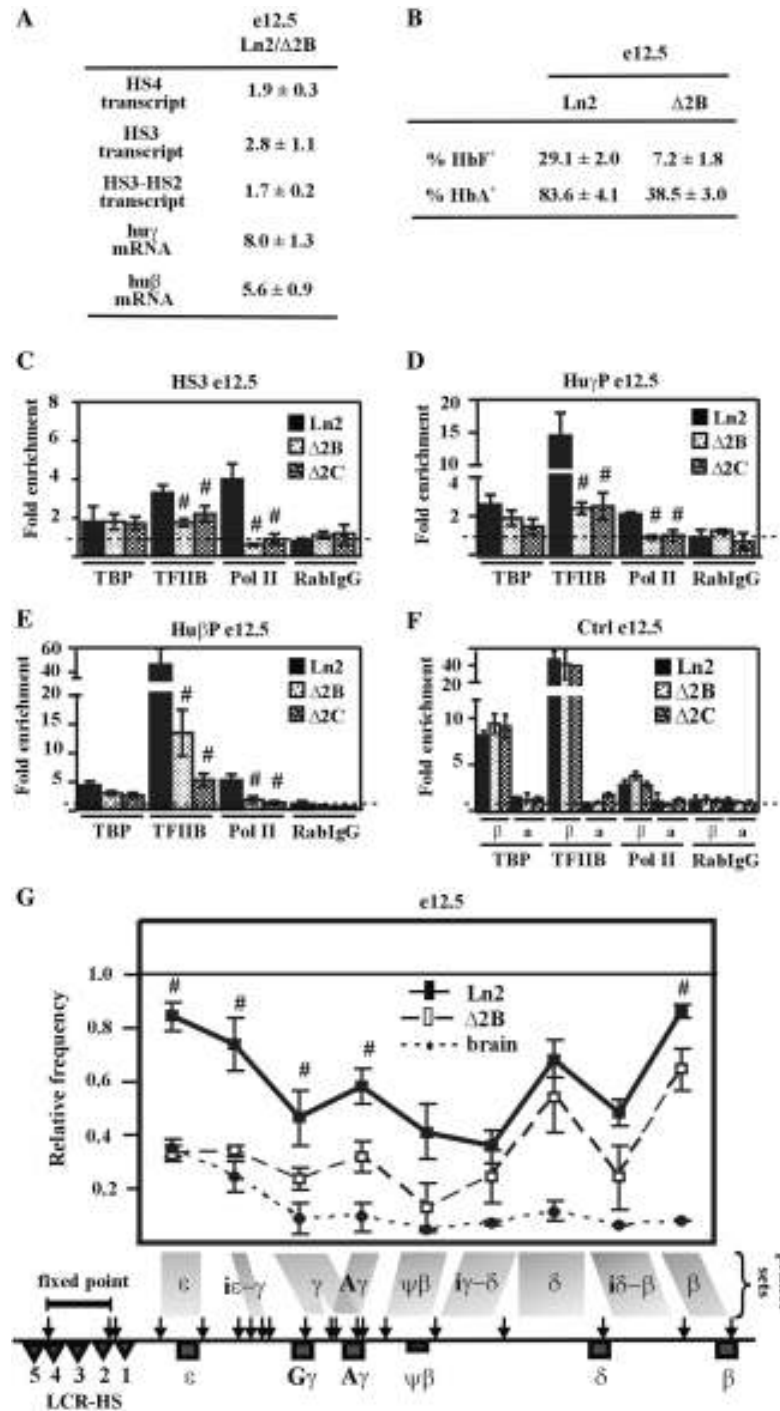


Figure 4.3. HS2 deletion affects PIC formation at hu $\beta$ -like globin gene promoters and long-range chromatin interactions between LCR and hu $\beta$ -like globin genes in e12.5

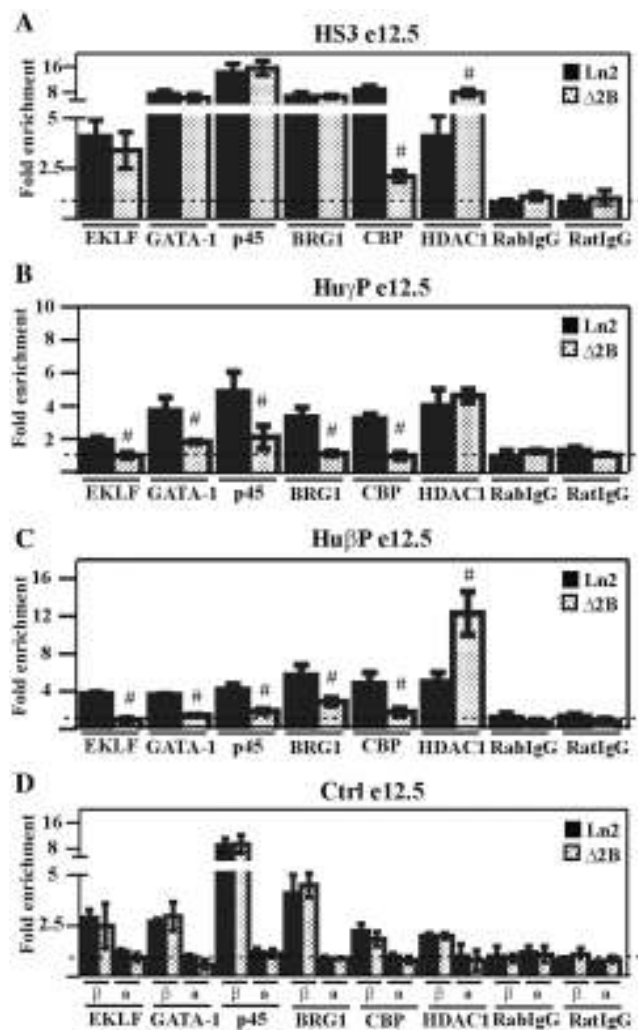
EryC

(A) RNA purified from ln2 and  $\Delta 2B$  e12.5 fetal liver EryC (e12.5) was retro-transcribed. qPCR was performed and analyzed as in Fig. 4.1; (B) e12.5 fetal liver EryC were stained with anti-HbF or anti-HbA antibodies, as detailed in Materials and Methods; (C-F) ChIP assays were carried out on e12.5 fetal liver cells (e12.5; black bars: ln2; dotted bars:  $\Delta 2B$ ; checked bars:  $\Delta 2C$ ). Immunoprecipitated and input chromatin samples from TBP ChIP were subjected to duplex semi-quantitative hot PCR and from TFIIB, Pol II and RabIgG (rabbit IgG) ChIP to qPCR. Immunoprecipitated and input chromatin samples were subject to qPCR. Fold enrichments were calculated as described in Fig. 4.1 and are indicated on the y-axis.  $\beta$  ( *$\beta$ maj*) control replaces mHS2 control for analysis in fetal liver EryC. The regions analyzed are specified on each graph and the antibodies used for ChIP assays are indicated underneath each graph; (G) 3C assay performed on e12.5 fetal liver cells (e12.5; black line: ln2; dashed line:  $\Delta 2B$ ). 3C ligation products were used as templates for qPCR analysis of regions indicated on the x-axis. Relative cross-linking frequency (y-axis) of the fixed-point fragment (HS4-HS2) with hu $\beta$ -globin fragments was defined as in Fig. 4.1.

As shown in Fig. 4.3G, the 3C analysis reveals that even though the LCR is frequently located in close proximity to hu $\gamma$ - and hu $\beta$ -promoter regions in  $\Delta 2B$  e12.5 EryC, such interactions are significantly reduced compared to ln2 cells. Since it has been reported that TFs are important for PIC formation and long-range chromatin interactions, we investigated whether any TFs involved in chromatin organization and/or long-range interactions could be abnormally recruited to the  $\beta$ -globin locus. We observed that EKLf and GATA-1 recruitment to hu $\gamma$ - and hu $\beta$ -promoters is reduced in  $\Delta 2B$  e12.5 EryC compared with the situation for ln2 cells (Fig. 4.4B, C). This correlates with the PEV pattern of hu $\gamma$ - and hu $\beta$ -gene expression in  $\Delta 2B$  e12.5 EryC (Fig. 4.3A, B). p45 can assist GATA-1 during globin gene activation (24), and it is therefore interesting that p45 recruitment is also reduced at both hu $\gamma$ - and hu $\beta$ -promoters (Fig. 4.4B, C). We also observed reduced CBP and increased



HDAC1 recruitment, especially at HS3 and the  $\text{hu}\beta$ -promoter (Fig. 4.4A, C). However, since EKLF, GATA-1, and p45 are equally recruited to HS3 in e12.5 EryC derived from both lines, it is likely that CBP and HDAC1 recruitment to HS3 is facilitated by TFs other than those immediately aforementioned, and that the binding of these yet-to-be identified TFs at HS3 is reduced in  $\Delta 2B$  e12.5 fetal liver EryC. In summary, in  $\Delta 2B$  fetal liver EryC, the PEV expression pattern is primarily associated with pronounced alteration of TFIIB, Pol II, as well as EKLF, GATA-1, and p45 binding to  $\text{hu}\gamma$ - and  $\text{hu}\beta$ -promoters.



**Figure 4.4. Transcription factor and co-factor recruitment at the  $\text{hu}\beta$ -globin locus in Ln2 and  $\Delta 2B$  e12.5 EryC**

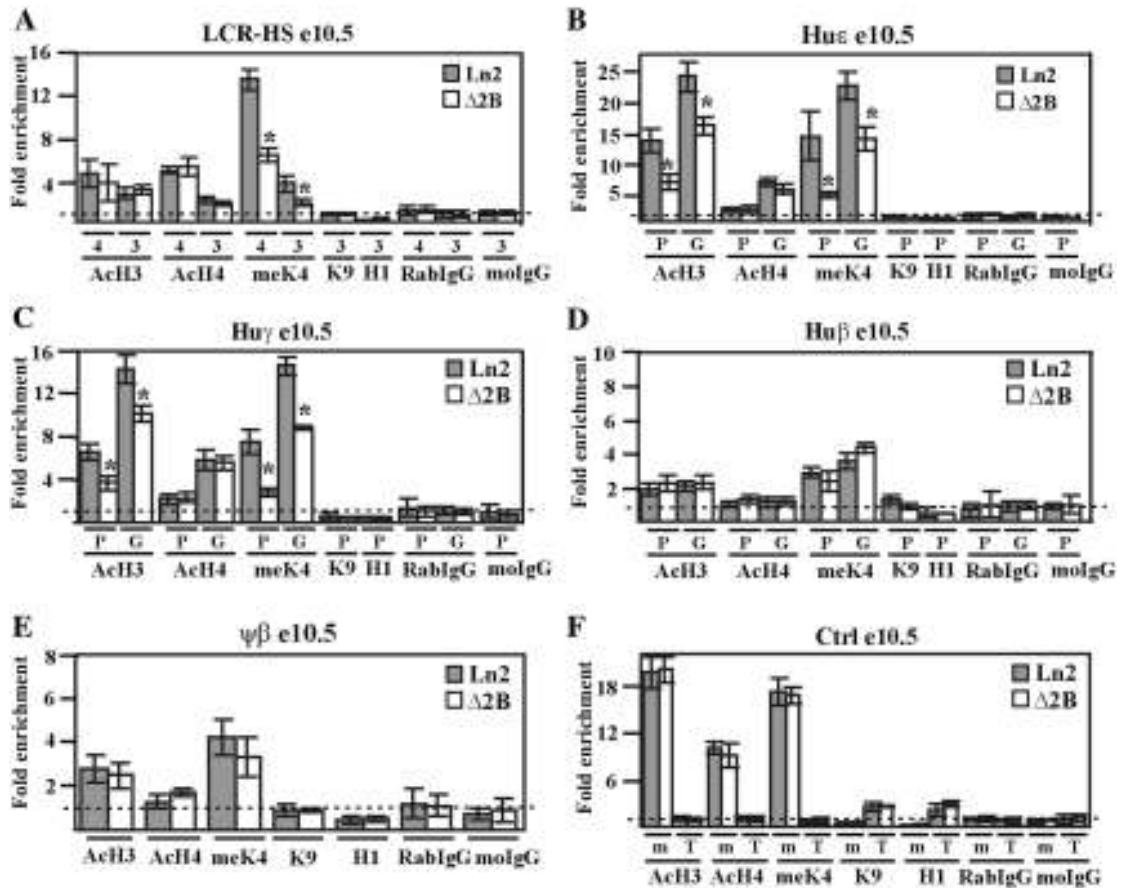
(A-D) ChIP assays were carried out on e12.5 fetal liver EryC (e12.5; black bars: ln2; dotted bars:  $\Delta$ 2B). Immunoprecipitated and input chromatin samples were subject to qPCR. Fold enrichments were calculated as described in Fig. 4.1 and are indicated on the y-axis.  $\beta$  ( *$\beta$ maj*) control replaces mHS2 control for analysis in fetal liver cells. The regions analyzed are specified on each graph and the antibodies used for ChIP assays are indicated underneath each graph.

#### 4.3.4 Chromatin organization at the hu $\beta$ -globin locus in yolk sac and fetal liver EryC

The results presented so far indicate that in  $\Delta$ 2B e10.5 EryC, reduced hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -globin gene expression is not the consequence of PEV; however later during development hu $\gamma$ - and hu $\beta$ -gene expression is subject to PEV in  $\Delta$ 2B EryC (see above and (31,33)). As such it was interesting to investigate whether or not chromatin organization at the  $\Delta$ 2B locus varies in e10.5 vs. e12.5 EryC. We therefore carried out ChIP assays using antibodies directed against di-acetylated histone H3 (AcH3), tetra-acetylated histone H4 (AcH4), or dimethylated histone H3 (meK4), all of which are normally associated with transcriptionally-prone chromatin (61). The active mouse LCR HS2 (m),  *$\beta$  major* promoter ( $\beta$ maj), or the inactive *Thp* gene (T) or amylase promoter (a) were used as controls (Fig. 4.5F and Fig. 4.6E).

Fig. 4.5A-C show that in ln2 e10.5 yolk sac EryC HS4, HS3, and the hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -promoters and genes display, in general, high-levels of AcH3, AcH4 and meK4. Surprisingly, histone AcH4, known to be associated with active chromatin organization independent of gene transcriptional status (62), is very similar in ln2 and  $\Delta$ 2B loci. Moreover AcH3 and meK4 levels at the inactive hu $\beta$ -promoter and gene, as well as at the  $\psi\beta$  intergenic region (Fig. 4.5D, E) are similar in ln2 and  $\Delta$ 2B and only local variations are detected at the LCR, and at the hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -promoters and genes (Fig. 4.5A-C). In both lines histone H3 K9 methylation (meK9) or linker histone H1, both of which are associated

with transcriptionally restricted chromatin (63,64) are not detected across the locus (Fig. 4.5A-E). Finally, chromatin accessibility as assessed by DNaseI sensitivity assay is comparable in Ln2 and  $\Delta$ 2B e10.5 EryC (Fig. S4.2 A-E). In summary, since chromatin organization is very similar in  $\Delta$ 2B and Ln2 cells and manifests no feature of transcriptionally restricted chromatin, it is unlikely that low-level *hu $\epsilon$* - and *hu $\gamma$* -gene expression in  $\Delta$ 2B e10.5 EryC is related to PEV. Rather, the variations observed at the *hu $\epsilon$* - and *hu $\gamma$* -regions in  $\Delta$ 2B vs. Ln2 e10.5 EryC are best explained by altered transcription levels of *hu $\epsilon$* - and *hu $\gamma$* -genes (Fig. 4.1B), rather than by restrictive chromatin organization of the  $\beta$ -globin locus *per se*.



**Figure 4.5. Effect of HS2 deletion on *hu $\beta$* -globin locus chromatin organization in e10.5 EryC**

(A-F) ChIP assays were carried out on e10.5 yolk sacs (e10.5; gray bars: ln2; white bars:  $\Delta$ 2B). Immunoprecipitated and input chromatin samples from AcH3, AcH4 and meK4 ChIP were subjected to duplex quantitative PCR and from meK9, H1, RabIgG and moIgG ChIP were subjected to qPCR. Fold enrichment (y-axis) of globin regions relative to the control and input samples were calculated as described in Fig. 4.1. The negative control for AcH3, AcH4 and meK4 ChIP is represented by T (*Thp/Zfp*) and for H1 and meK9 ChIP, by m (*mHS2/Thp*). The positive control for AcH3, AcH4 and meK4 ChIP is represented by m (*mHS2/Zfp*) and for H1 and meK9 ChIP, by T (*Thp/Gapdh*); asterisks (\*):  $p \leq 0.001$  according to Student's *t* test (ln2 vs.  $\Delta$ 2B). The regions analyzed are specified on each graph and the antibodies used for ChIP assays are indicated underneath each graph; 4 (HS4), 3 (HS3), P (promoter), G (gene); AcH3: di-acetylated histone H3; AcH4: tetra-acetylated histone H4; meK4: di-methylated lysine 4 histone H3; H1: Histone H1; meK9: di-methylated lysine 9 and lysine 27 histone H3.

Chromatin organization was next studied in e12.5 fetal liver EryC. As expected, ChIP assays revealed that throughout the locus AcH3, AcH4, and meK4 are significantly underrepresented in  $\Delta$ 2B vs. ln2 e12.5 EryC, whereas histone H1 recruitment to HS3 and to the hu $\beta$ -promoter is 2- to 3-fold higher in  $\Delta$ 2B compared with ln2 cells (Fig. 4.6A, D). Notably, the level of meK9 at the hu $\beta$ -promoter is 3-fold lower in  $\Delta$ 2B vs. ln2 e12.5 EryC (Fig. 4.6C). This could be explained by the fact that, although frequently observed in repressive chromatin, meK9 has also been associated with  $\beta$ maj active transcription (65) and other transcriptionally active genes (66,67). In accord with our ChIP results, DNaseI sensitivity assays carried out on e12.5 fetal livers revealed that across the locus, chromatin is less accessible in  $\Delta$ 2B than ln2 EryC (Fig. S4.2 F-I). Thus unlike what is observed at e10.5, in  $\Delta$ 2B e12.5 EryC, several regions of the  $\beta$ -globin locus are characterized by decreased histone acetylation levels and H1 enrichment, which together are reminiscent of

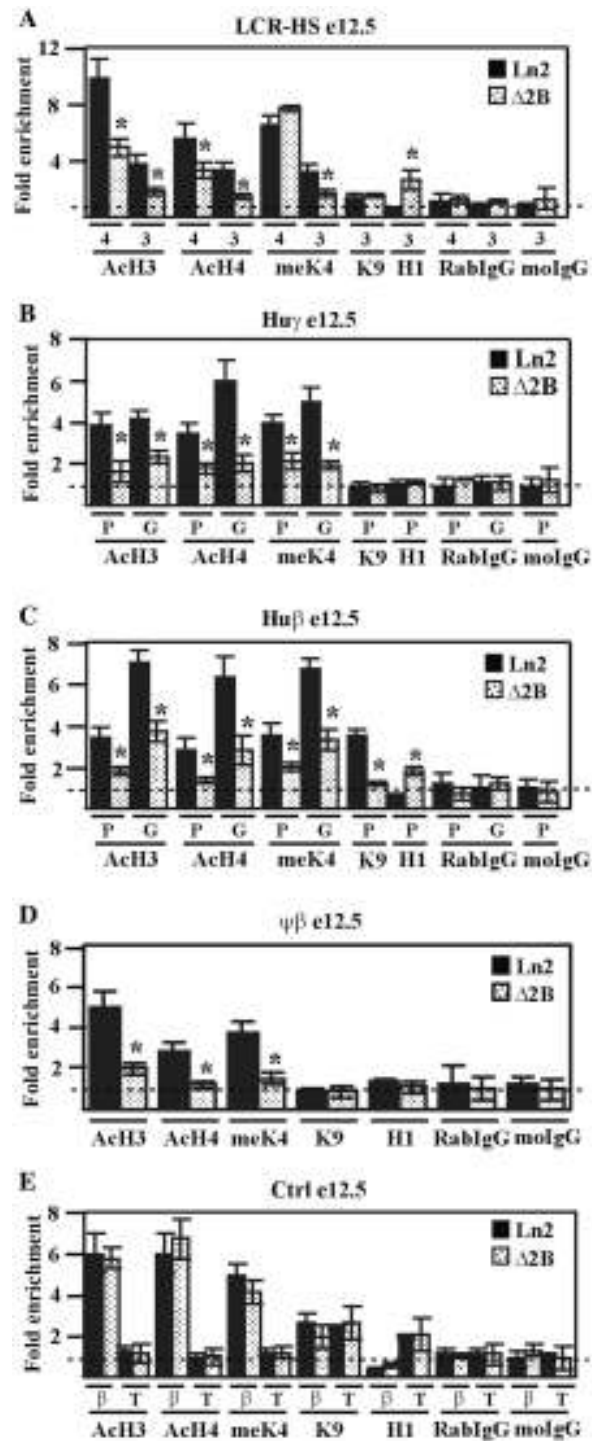


Figure 4.6. Effect of HS2 deletion on huβ-globin locus chromatin organization in e12.5 EryC

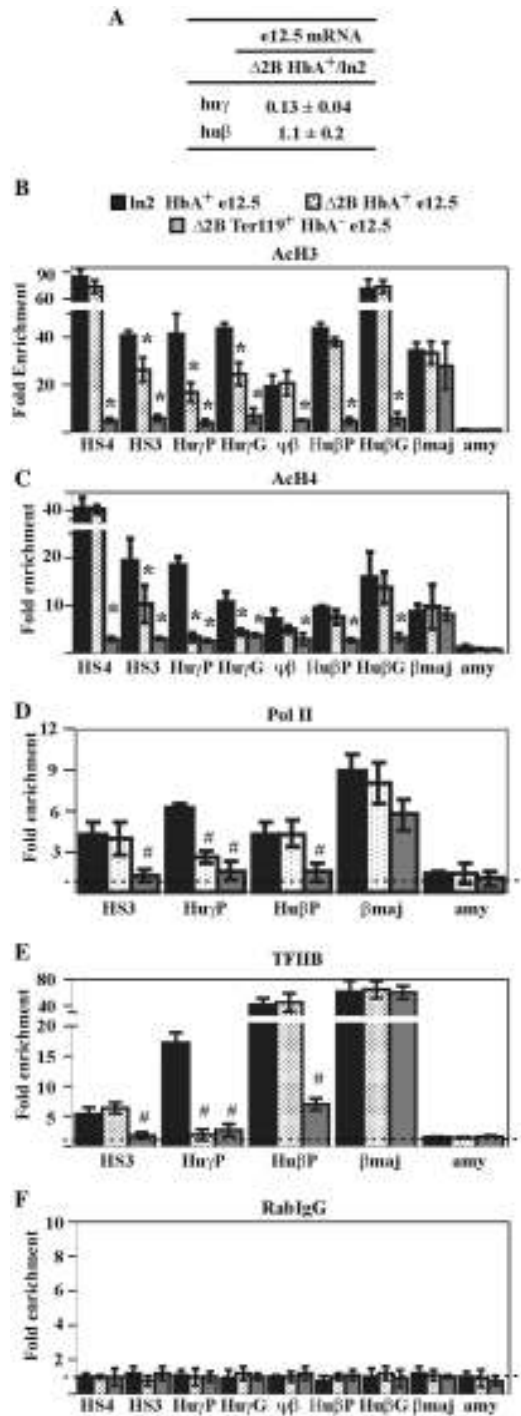
(A-E) ChIP assays were carried out on e12.5 fetal liver EryC (e12.5; black bars: ln2; dotted bars:  $\Delta$ 2B). Immunoprecipitated and input chromatin samples from AcH3, AcH4 and meK4 ChIP were subject to duplex quantitative PCR and from meK9, H1, RabIgG and moIgG ChIP were subjected to qPCR. Fold enrichments were calculated as described in Fig. 4.1 and are indicated on the y-axis.  $\beta$  ( *$\beta$ maj*) control replaces mHS2 control for analysis in fetal liver cells. The regions analyzed are specified on each graph and the antibodies used for ChIP assays are indicated underneath each graph; 4 (HS4), 3 (HS3), P (promoter), G (gene); AcH3: di-acetylated histone H3; AcH4: tetra-acetylated histone H4; meK4: di-methylated lysine 4 histone H3; H1: Histone H1; meK9: di-methylated lysine 9 and lysine 27 histone H3.

a restrictive chromatin organization typical of PEV. Overall, these results support a role for HS2 in locus chromatin organization in e12.5 fetal liver EryC.

### 4.3.5 Characterization of a $\Delta$ 2B EryC subpopulation expressing the hu $\beta$ -globin gene

The results shown thus far provide no information as to whether reduced gene expression, impaired PIC formation, and abnormal chromatin organization at hu $\beta$ -like globin promoters in  $\Delta$ 2B e12.5 EryC might be a consequence of (i) the absence of chromatin remodeling and/or histone modifying activities (due to HS2 deletion) or, (ii) altered HS2-mediated enhancer activity as observed in  $\Delta$ 2B e10.5 EryC. To address this we compared various chromatin-related endpoints in ln2 and  $\Delta$ 2B e12.5 EryC subpopulations that actively transcribe the hu $\beta$ -gene. These cells were isolated using an anti-HbA (adult hemoglobin) antibody specific for the human hemoglobin  $\beta$ -chain (HbA<sup>+</sup>). Hu $\beta$ -like globin gene expression (by RT-qPCR), PIC formation (by Pol II and TFIIB ChIP), and chromatin organization (by AcH3 and AcH4 ChIP and DNaseI sensitivity assay) were compared in HbA<sup>+</sup> cells. As shown in Fig. 4.7A, no significant variation of hu $\beta$ -gene expression was

detected in ln2 vs.  $\Delta 2B$  HbA<sup>+</sup> cells. Accordingly, we observed that chromatin organization (Fig. 4.7B, C; Fig. S4.2 J-L) and PIC formation (Fig. 4.7D, E) at the hu $\beta$ -promoter are similar in ln2 vs.  $\Delta 2B$  HbA<sup>+</sup> cells, while, as expected, PIC formation and histone acetylation levels are remarkably decreased in  $\Delta 2B$  Ter119<sup>+</sup> HbA<sup>-</sup> cells (*i.e.*, EryC not transcribing the hu $\beta$ -globin gene; Fig. 4.7B-E). The above strongly suggests that the absence of HS2 enhancer activity does not affect the efficacy of PIC formation or chromatin organization at the hu $\beta$ -promoter and, furthermore, that HS2 is not required for hu $\beta$ -gene high-level transcription in e12.5 EryC. Surprisingly, hu $\gamma$ -gene transcription is reduced in  $\Delta 2B$  HbA<sup>+</sup> cells (Fig. 4.7A). Consistent with this latter observation, chromatin organization at hu $\gamma$ -genes is impaired in these cells (Fig. 4.7B, C; Fig. S4.2 K) and TFIIIB and Pol II are recruited less efficiently at hu $\gamma$ -promoters (Fig. 4.7D, E). Thus, as for e10.5 EryC, HS2 deletion in e12.5 EryC precludes efficient PIC formation at hu $\gamma$ -promoters, but has no significant effect at the hu $\beta$ -promoter. Since the transcription level of the hu $\beta$ -gene is not affected in  $\Delta 2B$  HbA<sup>+</sup> EryC, even though hu $\beta$ -gene expression is characterized by PEV in  $\Delta 2B$  e12.5 EryC, we conclude that the PEV expression pattern of the hu $\beta$ -gene is not related to absence of HS2-mediated enhancer activity. Instead, impaired recruitment of histone modifying or chromatin remodeling activities to the locus due to HS2 deletion likely facilitates invasion of the locus by restrictive chromatin organization originating at the genomic integration site of the transgene.



**Figure 4.7. HS2 deletion specifically affects h $\alpha\gamma$ -globin gene expression and chromatin organization in HbA<sup>+</sup> e12.5 EryC**



Ln2 and  $\Delta 2B$  e12.5 fetal liver cells were sorted according to hu $\beta$ -globin expression with an antibody recognizing the human  $\beta$ -globin chain of adult hemoglobin (HbA<sup>+</sup>). (A) Equal amounts of RNA purified from  $\Delta 2B$  and Ln2 HbA<sup>+</sup> cells were retro-transcribed. qPCR was performed and analyzed such as in Fig. 4.1; hu $\gamma$ : hu $\gamma$ -globin mRNA; hu $\beta$ : hu $\beta$ -globin mRNA; (B-F) ChIP assays were carried out on Ln2 and  $\Delta 2B$  HbA<sup>+</sup> e12.5 fetal liver cells (black bars: Ln2; dotted bars:  $\Delta 2B$ ) and on  $\Delta 2B$  Ter119<sup>+</sup> HbA<sup>-</sup> e12.5 fetal liver cells (gray bars). Immunoprecipitated and input chromatin samples were subject to qPCR. Fold enrichments were calculated as described in Fig. 4.1 and are indicated on the y-axis. The regions analyzed are specified on each graph and the antibodies used for ChIP assays are indicated underneath each graph.

## 4.4 Discussion

The comparative analysis of hu $\beta$ -like globin gene expression in e10.5 and e12.5 EryC undertaken here reveals that in absence of HS2, the hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -promoters are characterized by impaired PIC formation as well as abnormal recruitment/stability of specific TFs and cofactors. However, at the same time we show that HS2 is not required for hu $\beta$ -gene transcriptional enhancement. Thus, the contribution of HS2 to PIC formation and promoter organization is required for high-level transcription of some but not all globin genes. Finally we demonstrate that in  $\Delta 2B$  e12.5 EryC, HS2 deletion does not affect transcription levels of the hu $\beta$ -gene but does facilitate the induction of abnormal chromatin organization over the locus. The above, taken together, indicate that HS2 functions separately in transcriptional enhancement and locus chromatin organization.

#### **4.4.1 Influence of HS2 deletion on hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -gene transcriptional enhancement**

Here we showed that low-level globin gene transcription in  $\Delta$ 2B e10.5 EryC is a consequence of impaired LCR enhancer activity due to HS2 deletion, and not of disruption of the active locus-wide chromatin organization. Indeed in e10.5 EryC, chromatin at the hu $\beta$ -globin locus is accessible and devoid of heterochromatin marks. The fact that human globin genes manifest a PEV expression pattern in e12.5  $\Delta$ 2B fetal liver EryC but not in e10.5 yolk sac EryC is most likely related to developmental stage-specific spreading of heterochromatin from the  $\beta$ -globin transgene integration site within the mouse genome.

We also showed that in  $\Delta$ 2B e10.5 EryC, variations in histone covalent modifications at hu $\gamma$ -promoters are associated with impaired LCR-hu $\gamma$ -promoter interactions. Such variations might be a consequence of abnormal transcription levels in  $\Delta$ 2B cells, since AcH3 (specifically at the  $\beta$ -globin locus (68)), as well as H3K4 di- and tri-methylation (at various genetic loci (69)), have been associated with high-level gene transcription. Alternatively, variations in histone covalent modifications might be linked to reduced recruitment of enzymatic activities by TFs such as p45 (2), which we showed occurs less efficiently at hu $\gamma$ -promoters in  $\Delta$ 2B compared with In2 cells. In fact, the correlation between these latter variations, abnormal PIC formation, altered LCR/hu $\gamma$ -gene long-range chromatin interactions, and low-level hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -gene transcription, might not be fortuitous. For instance, reduced p45 and BRG1 recruitment to hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -promoters could be responsible for low hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -gene expression levels in  $\Delta$ 2B e10.5 EryC since both p45 and BRG1 are required for efficient Pol II occupancy at globin promoters (19,24,70,71). Moreover recently BRG1 has been shown to affect long-range interactions at the  $\beta$ -globin locus (13). It should be noted that low AcH3 levels at hu $\gamma$ -regions are not related to CBP recruitment (Fig. 4.5C and 4.2C), suggesting that effects on the recruitment/stability of other acetyltransferases binding the  $\beta$ -globin locus, *eg.*, p300 and PCAF (14,72) might be implicated.

Distal regulatory regions can enhance transcription by various means including modulation of both PIC formation and the efficacy of transcriptional elongation. In  $\Delta 2B$  e10.5 EryC, we observed a relatively low frequency of LCR/hu $\gamma$ -gene long-range interactions, decreased recruitment of PIC components to the LCR, as well as altered PIC formation at hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -promoters. Additionally, we did not detect significant variation in TF recruitment at HS3, nor in DNaseI sensitivity at HS3, in accord with what has been reported for the mouse  $\beta$ -globin locus (73). However, we did observe that primary transcription of HS4, HS3, and inter-HS3-HS2 regions is relatively reduced in  $\Delta 2B$  EryC (Fig. 4.1B and 4.3A). Likewise, Pol II and TFIIB loading at HS3 (45) is decreased in these cells (Fig. 4.1D, 4.3C). This indicates that HS2 is required for proper LCR primary transcription as well as for TFIIB and Pol II loading at the LCR. The above data taken together suggest that HS2 influences other regions of the LCR and, most likely, acts in synergy with other LCR hypersensitive sites. As previously proposed (45,74), it is possible that low-level LCR intergenic transcription influences the recruitment of other TFs to HS3 in  $\Delta 2B$  EryC. This is supported by the abnormal recruitment of BRG1 to HS3 in  $\Delta 2B$  e10.5 EryC (Fig. 4.2A). Additionally, as shown for the human growth hormone LCR (75), primary transcription of the  $\beta$ -globin LCR could potentially control its ability to participate in long-range chromatin interactions and gene activation.

Our data demonstrating that *trans*-acting factors are recruited less efficiently to hu $\beta$ -like globin gene promoters in  $\Delta 2B$  e10.5 EryC, *i.e.*, where the locus is not in restrictive chromatin organization, strongly suggests that the HS2-deleted LCR also affects TF and co-factor recruitment or stability at promoters. Since GATA-1 and p45 can be recruited to globin gene promoters in the absence of the LCR (11,76), and are reported to interact with some PIC subunits (24,25), it is likely that the efficacy of PIC formation (which is affected by HS2 deletion in  $\Delta 2B$  e10.5 EryC) influences the stability at least of p45 at hu $\epsilon$ - and hu $\gamma$ -promoters. Thus, we propose that the main function of HS2 in transcriptional enhancement is to promote PIC formation at hu $\epsilon$ - (77) and hu $\gamma$ -promoters. This is consistent with previous observations at the mouse and human  $\beta$ -globin loci, which suggest that LCR-

bound Pol II can be transferred to globin gene promoters, and that HS2 is the major LCR site for recruitment of phosphorylated Pol II (46,71,78).

#### **4.4.2 HS2 affects human $\beta$ -like globin genes differentially and is involved in locus chromatin organization**

The specific roles of the various LCR HS regions have been a matter of debate (31,36,37,41,43,79). In particular is not clear if HS2 promotes PIC formation and chromatin organization activities at the same time, or if these activities are coordinated separately during development. It was reported that in the context of a minimal construct where HS2 is linked to the  $\beta$ -globin gene, this hypersensitive region constitutes a poor modulator of chromatin organization but nonetheless retains significant transcriptional enhancer activity (39). Indeed, chromatin modifying and remodeling activities are recruited to HS2 (3,47,48) and influence chromatin organization across the  $\beta$ -globin locus (47,48). Additionally, HS2 deletion favors abnormal chromatin organization when the transgene is integrated within chromosomal regions marked by heterochromatin (31,32). Thus, a PEV pattern of expression in  $\Delta 2B$  e12.5 EryC could be facilitated by the absence of specific chromatin modifying or remodeling activities normally recruited to HS2 (3,47,48) and/or by reduced efficiency of PIC formation/stability at human  $\beta$ -like globin gene promoters. However, characterization of the  $\Delta 2B$  e12.5 EryC subpopulation expressing the hu $\beta$ -globin gene ( $\Delta 2B$  HbA<sup>+</sup> EryC) indicates that the absence of HS2 affects PIC formation at hu $\gamma$ -promoters, but not at the hu $\beta$ -promoter. Since the hu $\beta$ -gene has a characteristic PEV expression pattern in  $\Delta 2B$  e12.5 fetal liver EryC, but is nonetheless equally transcribed in In2 and  $\Delta 2B$  HbA<sup>+</sup> EryC, it appears that alteration of HS2 enhancer activity is not required for PEV. This also argues in favor of the notion that HS2 enhancer- and chromatin activation-functions exhibit dichotomy with respect to one another (80,81).

HS3 is known to be important for Pol II recruitment to the hu $\beta$ -promoter as well as for long-range chromatin interactions in adult EryC (38,41). Here we show that PIC

components are normally recruited to HS3 in  $\Delta 2B$  HbA<sup>+</sup> EryC but not in  $\Delta 2B$  e10.5 EryC. Based on this, and supported by a previous literature report (41), we propose that HS3, in the absence of HS2, is sufficient to enhance hu $\beta$ -gene transcription, although it is unable to favor proper PIC formation at hu $\gamma$ -promoters.

Finally, we observed that chromatin organization at the  $\beta$ -globin locus is very similar in ln2 and  $\Delta 2B$  HbA<sup>+</sup> EryC, suggesting that chromatin in both cell types is favorable for gene expression. However, chromatin alterations were detected at the hu $\gamma$ -region in  $\Delta 2B$  HbA<sup>+</sup> EryC (Fig. 4.7B, C). Since such alterations correlate with abnormal PIC formation at hu $\gamma$ -promoters (Fig. 4.7D, E), we propose that chromatin organization at globin gene regions (74) is defined by LCR-facilitated recruitment/stability of *trans*-acting factors in direct contact with these regions, as well as by locus wide LCR-mediated effects.

In summary, our data show that HS2 deletion in  $\Delta 2B$  e10.5 cells reduces the level of hu $\gamma$ -gene transcription, even though the  $\beta$ -globin locus maintains normal chromatin organization. Moreover other regions of the LCR cannot compensate for loss of HS2 enhancer activity, which is required in both e10.5 yolk sac and e12.5 fetal liver EryC for high-level expression of the hu $\epsilon$ - (at e10.5) and hu $\gamma$ -genes (at e10.5 and e12.5), but not of the hu $\beta$ -gene. Thus, LCR enhancer activity cannot prevent abnormal globin gene expression due to alteration of chromatin organization. Based on the mechanistic evidence provided here, we propose that deletion of HS2 modifies LCR integrity and precludes efficient long-range interactions between LCR and hu $\gamma$ -promoters, which in turn impairs optimal PIC formation, promoter organization and hence appropriate hu $\gamma$ -gene expression levels.

## **4.5 Materials and methods**

### **4.5.1 Transgenic mouse lines**

Ln2 homozygous embryos (transgene copy number: 2) (8) were collected at e10.5 or e12.5. E10.5 embryos were washed twice in PBS and yolk sacs disrupted and punctured in order to collect blood cells; e12.5 fetal livers were isolated and homogenized in PBS.  $\Delta 2B$  homozygous mice (31) were crossed with CD1 females and EryC from heterozygous  $\Delta 2B$  (transgene copy number: 3) e10.5 yolk sacs or e12.5 fetal livers were isolated as described above. Finally,  $\Delta 2C$  homozygous mice (31) were bred together and homozygous  $\Delta 2C^{+/+}$  (transgene copy number: 2) e10.5 yolk sacs or e12.5 fetal livers were isolated. All animal experiments were conducted in strict accordance with Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines, and approved by the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal care committee.

### **4.5.2 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and quantitative Real-Time PCR (qPCR) assays**

ChIP assays were carried out as per manufacturer's instruction (Millipore). Briefly, cells were crosslinked in 1% formaldehyde for 10 min at 37°C. Cells were then incubated in lysis buffer containing 1 µg/mL aprotinin and 1mM PMSF and sonicated in order to obtain chromatin fragments of 400 bp on average. After centrifugation for 10 min at 13000 rpm, chromatin was diluted 1:10 in the presence of protease inhibitors and pre-cleared for 30 min with salmon sperm DNA/Protein A agarose beads (Millipore). Chromatin fragments were incubated with the appropriate antibodies overnight at 4°C. Beads were then washed with low-salt buffer, high-salt buffer, LiCl buffer, and twice with TE buffer (Millipore). Chromatin fragments were eluted from beads in elution buffer (0.1M NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS). Decrosslinking was carried out for 4 hours at 65°C. Following proteinase K treatment, DNA was phenol-chloroform extracted, precipitated with ethanol and resuspended in water.

Antibodies used were against tetra-acetylated histone H4 (K3, K8, K12 and K16), di-acetylated histone H3 (K9 and K14), di-methylated histone H3 (K4) and HDAC1 (Millipore); TBP (SI-1), TFIIB (C-18), p45 (C-19), GATA-1 (N6), Pol II (N-20), CBP (A-22) and BRG1 (H-88) (Santa Cruz); unmodified histone H1 (B419 AE-4) and di-methylated histone H3 (K9) (Abcam); and polyclonal anti-EKLF (kindly provided by S. Philipsen) (49). All antibodies were raised in rabbit except H1 and GATA-1 which, respectively, were raised in mouse and in rat. Isotype matched IgG (SantaCruz) were used as control. About 1/30<sup>th</sup> of immunoprecipitated and unbound (input) material was used as template for duplex semi-quantitative hot PCR (AcH3, AcH4, meK4 and TBP ChIP) or qPCR (meK9, H1, TFIIB, Pol II, EKLF, GATA-1, p45, BRG1, CBP, HDAC1 and IgG ChIP) with one primer set specific for human  $\beta$ -globin regions (HS3, HS2, hu $\epsilon$ -, hu $\gamma$ -, and hu $\beta$ -globin gene promoters and coding regions) and another primer set specific for the internal control. For duplex quantitative PCR, reactions were performed in parallel under conditions of linear amplification and products were quantified by PhosporImager; *Zfp37* (neural-specific Zinc-finger protein 37) was used as internal control (3,50); *Thp* (Kidney-specific Tamm-Horsfall protein) (51) as negative control; and mouse HS2 (mHS2; e10.5 EryC) or  *$\beta$  major* ( $\beta$ maj; e12.5 EryC), as positive controls. For qPCR, reactions were performed using SYBR Green (Invitrogen) with the iCycler iQ<sup>TM</sup> (BioRad) system; *Thp* was used as internal control, amylase 2.1y (*amy*, (30)) as negative control and mHS2 or  $\beta$ maj as positive controls. Since *Zfp37*, *Thp* and *amy* are repressed in EryC, for H1, meK9 and HDAC1 ChIP, *Thp* was used as positive control relative to *Gapdh* (active in EryC) and mHS2 or  $\beta$ maj were used as negative controls. Quantification was carried out according to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Primer sequences are available on request.

### 4.5.3 Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

Total RNA was isolated by Trizol (Invitrogen) and used for cDNA synthesis with oligo(dT)<sub>12-18</sub> or random primers and SuperScript Reverse Transcriptase III (Invitrogen). qPCR was carried out with QuantiTect probes specific for hu $\beta$ - or hu $\gamma$ -globin cDNA (33).

Intronic or LCR regions and mouse actin or GAPDH transcripts were detected by SYBR Green (Invitrogen). The following equation (52) was employed for quantification and the ratio corrected for transgene copy number:

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

$E_{\text{target}}$ : target qPCR efficiency;  $E_{\text{ref}}$ : control qPCR efficiency; CP: crossing point;  $\Delta\text{CP}_{\text{target}}$ : CP deviation of ln2 vs.  $\Delta\text{2B}$  lines target gene transcript;  $\Delta\text{CP}_{\text{ref}}$ : CP deviation of ln2 vs.  $\Delta\text{2B}$  lines mouse control transcript. Primer sequences are available on request.

#### **4.5.4 RNA-Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)**

RNA-FISH was performed as described in Wijgerde *et al.* (53) and van de Corput *et al.* (54). A detailed procedure is available as supplementary data (Fig. S4.1).

#### **4.5.5 DNaseI sensitivity assay**

DNaseI sensitivity assay was carried out as previously described (50). About 300 000 nuclei were digested with up to 0.3 U of DNaseI (Roche, Indianapolis) for 30 min on ice and purified DNA was used as template for qPCR. Average molecular weight of DNaseI-treated samples was determined by Southern blotting.

#### **4.5.6 Chromosome conformation capture (3C)**

Chromosome conformation capture was carried out as described in Dekker *et al.* (55) and Bottardi *et al.* (56). A detailed procedure is available as supplementary data (Fig. S4.1).

#### **4.5.7 Hemoglobin staining**

Intracellular staining was carried out on e12.5 fetal liver cells isolated from either ln2 or  $\Delta\text{2B}$  mice. Ten to twenty million cells were fixed in 2% formaldehyde for 15 min at room



temperature, and washed once with PBS and once with PBS/5% heat-inactivated FBS (PBS/FBS). For ChIP and DNaseI assays, cells were then permeabilized with 1 ml of PBS/FBS/0.5% saponin for 10 min at room temperature and stained with 20  $\mu$ g of FITC-conjugated anti-HbA antibodies (clone 37-8, Santa Cruz) for 30 min at room temperature. Cells were washed in PBS/FBS/0.5% saponin and then again in PBS/FBS, and sorted by high-speed fluorescence-activated cell sorting (FACS) (FACS Vantage with DIVA option; Becton Dickinson, San Jose, CA). To select for  $\Delta$ 2B EyC which do not express the human hemoglobin  $\beta$ -chain (HbA<sup>-</sup> cells), anti-HbA antibodies were coupled to rat anti-mouse Ter119 antibodies, followed by allophycocyanin (APC)-conjugated goat anti-rat IgG (Leinco Technologies) staining to isolate Ter119<sup>+</sup>HbA<sup>-</sup> cells. Indeed, Ter119 antibody recognizes maturing erythroid cells from the proerythroblast stage onward (57). For variegation study, one million e12.5 fetal liver cells were permeabilized in 90% methanol for 10 min on ice. Cells were then stained with 1  $\mu$ g of either FITC-conjugated anti-HbA antibody (as above) or FITC-conjugated anti-HbF antibody (clone 51-7, Santa Cruz). Cells were washed once in PBS/FBS and analyzed by FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry System (BDIS), San Jose, CA). These anti-HbA and anti-HbF do not cross-react with the murine globin chains (data not shown).

## 4.6 Acknowledgments and funding

We thank J. Philipsen for kindly providing polyclonal anti EKLF antibodies; F. Grosveld for the mouse lines and the PAC148ylox construct; A. Orimoto, H. Beauchemin and N. Henley for technical assistance; E.B. Affar and G. Dellaire for critical reading of the manuscript. E.M. is a scholar of the Fond de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and J.R. is supported by FRSQ Doctoral Training Award.

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research [69055 and 86125 to E.M, 67233 and 85055 to M.T.]

## 4.7 References

1. Dillon, N. and Grosveld, F. (1993) Transcriptional regulation of multigene loci: multilevel control. *Trends Genet*, **9**, 134-137.
2. Kiekhäfer, C.M., Grass, J.A., Johnson, K.D., Boyer, M.E. and Bresnick, E.H. (2002) Hematopoietic-specific activators establish an overlapping pattern of histone acetylation and methylation within a mammalian chromatin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14309-14314.
3. Bottardi, S., Ross, J., Pierre-Charles, N., Blank, V. and Milot, E. (2006) Lineage-specific activators affect beta-globin locus chromatin in multipotent hematopoietic progenitors. *EMBO J*, **25**, 3586-3595.
4. Forsberg, E.C., Johnson, K., Zaboikina, T.N., Mosser, E.A. and Bresnick, E.H. (1999) Requirement of an E1A-sensitive coactivator for long-range transactivation by the beta-globin locus control region. *J Biol Chem*, **274**, 26850-26859.
5. Weissmann, F. and Lyko, F. (2003) Cooperative interactions between epigenetic modifications and their function in the regulation of chromosome architecture. *Bioessays*, **25**, 792-797.
6. Dillon, N. (2006) Gene regulation and large-scale chromatin organization in the nucleus. *Chromosome Res*, **14**, 117-126.
7. Fathallah, H. and Atweh, G.F. (2006) Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 58-62.
8. Strouboulis, J., Dillon, N. and Grosveld, F. (1992) Developmental regulation of a complete 70-kb human beta-globin locus in transgenic mice. *Genes Dev*, **6**, 1857-1864.
9. Splinter, E., Heath, H., Kooren, J., Palstra, R.J., Klous, P., Grosveld, F., Galjart, N. and de Laat, W. (2006) CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. *Genes Dev*, **20**, 2349-2354.
10. Drissen, R., Palstra, R.J., Gillemans, N., Splinter, E., Grosveld, F., Philipsen, S. and de Laat, W. (2004) The active spatial organization of the beta-globin locus requires the transcription factor EKLF. *Genes Dev*, **18**, 2485-2490.

11. Vakoc, C.R., Letting, D.L., Gheldof, N., Sawado, T., Bender, M.A., Groudine, M., Weiss, M.J., Dekker, J. and Blobel, G.A. (2005) Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol Cell*, **17**, 453-462.
12. Song, S.H., Hou, C. and Dean, A. (2007) A positive role for NLI/Ldb1 in long-range beta-globin locus control region function. *Mol Cell*, **28**, 810-822.
13. Kim, S.I., Bultman, S.J., Kiefer, C.M., Dean, A. and Bresnick, E.H. (2009) BRG1 requirement for long-range interaction of a locus control region with a downstream promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 2259-2264.
14. Blobel, G.A., Nakajima, T., Eckner, R., Montminy, M. and Orkin, S.H. (1998) CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2061-2066.
15. Morceau, F., Schnekenburger, M., Dicato, M. and Diederich, M. (2004) GATA-1: friends, brothers, and coworkers. *Ann N Y Acad Sci*, **1030**, 537-554.
16. Chen, X. and Bieker, J.J. (2001) Unanticipated repression function linked to erythroid Kruppel-like factor. *Mol Cell Biol*, **21**, 3118-3125.
17. Zhang, W. and Bieker, J.J. (1998) Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9855-9860.
18. Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Kolodziej, K.E., Guyot, B., Heck, A.J., Vyas, P., de Boer, E., Grosveld, F. and Strouboulis, J. (2005) GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J*, **24**, 2354-2366.
19. Kim, S.I., Bultman, S.J., Jing, H., Blobel, G.A. and Bresnick, E.H. (2007) Dissecting molecular steps in chromatin domain activation during hematopoietic differentiation. *Mol Cell Biol*, **27**, 4551-4565.
20. Armstrong, J.A., Bieker, J.J. and Emerson, B.M. (1998) A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell*, **95**, 93-104.

21. Zhou, D., Pawlik, K.M., Ren, J., Sun, C.W. and Townes, T.M. (2006) Differential binding of erythroid Kruppel-like factor to embryonic/fetal globin gene promoters during development. *J Biol Chem*, **281**, 16052-16057.
22. Hung, H.L., Kim, A.Y., Hong, W., Rakowski, C. and Blobel, G.A. (2001) Stimulation of NF-E2 DNA binding by CREB-binding protein (CBP)-mediated acetylation. *J Biol Chem*, **276**, 10715-10721.
23. Brand, M., Ranish, J.A., Kummer, N.T., Hamilton, J., Igarashi, K., Francastel, C., Chi, T.H., Crabtree, G.R., Aebersold, R. and Groudine, M. (2004) Dynamic changes in transcription factor complexes during erythroid differentiation revealed by quantitative proteomics. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 73-80.
24. Johnson, K.D., Grass, J.A., Boyer, M.E., Kiekhäfer, C.M., Blobel, G.A., Weiss, M.J. and Bresnick, E.H. (2002) Cooperative activities of hematopoietic regulators recruit RNA polymerase II to a tissue-specific chromatin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11760-11765.
25. Amrolia, P.J., Ramamurthy, L., Saluja, D., Tanese, N., Jane, S.M. and Cunningham, J.M. (1997) The activation domain of the enhancer binding protein p45NF-E2 interacts with TAFII130 and mediates long-range activation of the alpha- and beta-globin gene loci in an erythroid cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10051-10056.
26. Tuan, D.Y., Solomon, W.B., London, I.M. and Lee, D.P. (1989) An erythroid-specific, developmental-stage-independent enhancer far upstream of the human "beta-like globin" genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2554-2558.
27. Palstra, R.J., Tolhuis, B., Splinter, E., Nijmeijer, R., Grosveld, F. and de Laat, W. (2003) The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat Genet*, **35**, 190-194.
28. Dean, A. (2006) On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends Genet*, **22**, 38-45.
29. Tolhuis, B., Palstra, R.J., Splinter, E., Grosveld, F. and de Laat, W. (2002) Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell*, **10**, 1453-1465.

30. Forrester, W.C., Epner, E., Driscoll, M.C., Enver, T., Brice, M., Papayannopoulou, T. and Groudine, M. (1990) A deletion of the human beta-globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire beta-globin locus. *Genes Dev*, **4**, 1637-1649.
31. Milot, E., Strouboulis, J., Trimborn, T., Wijgerde, M., de Boer, E., Langeveld, A., Tan-Un, K., Vergeer, W., Yannoutsos, N., Grosveld, F. *et al.* (1996) Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell*, **87**, 105-114.
32. Li, G., Lim, K.C., Engel, J.D. and Bungert, J. (1998) Individual LCR hypersensitive sites cooperate to generate an open chromatin domain spanning the human beta-globin locus. *Genes Cells*, **3**, 415-429.
33. Bottardi, S., Bourgoin, V., Pierre-Charles, N. and Milot, E. (2005) Onset and inheritance of abnormal epigenetic regulation in hematopoietic cells. *Hum Mol Genet*, **14**, 493-502.
34. Henikoff, S. (1990) Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet*, **6**, 422-426.
35. Ellis, J., Tan-Un, K.C., Harper, A., Michalovich, D., Yannoutsos, N., Philipsen, S. and Grosveld, F. (1996) A dominant chromatin-opening activity in 5' hypersensitive site 3 of the human beta-globin locus control region. *EMBO J*, **15**, 562-568.
36. Bungert, J., Tanimoto, K., Patel, S., Liu, Q., Fear, M. and Engel, J.D. (1999) Hypersensitive site 2 specifies a unique function within the human beta-globin locus control region to stimulate globin gene transcription. *Mol Cell Biol*, **19**, 3062-3072.
37. Patrinos, G.P., de Krom, M., de Boer, E., Langeveld, A., Imam, A.M., Strouboulis, J., de Laat, W. and Grosveld, F.G. (2004) Multiple interactions between regulatory regions are required to stabilize an active chromatin hub. *Genes Dev*, **18**, 1495-1509.
38. Fang, X., Xiang, P., Yin, W., Stamatoyannopoulos, G. and Li, Q. (2007) Cooperativeness of the higher chromatin structure of the beta-globin locus revealed by the deletion mutations of DNase I hypersensitive site 3 of the LCR. *J Mol Biol*, **365**, 31-37.

39. Ellis, J., Talbot, D., Dillon, N. and Grosveld, F. (1993) Synthetic human beta-globin 5'HS2 constructs function as locus control regions only in multicopy transgene concatamers. *EMBO J*, **12**, 127-134.
40. Fraser, P., Pruzina, S., Antoniou, M. and Grosveld, F. (1993) Each hypersensitive site of the human beta-globin locus control region confers a different developmental pattern of expression on the globin genes. *Genes Dev*, **7**, 106-113.
41. Fang, X., Sun, J., Xiang, P., Yu, M., Navas, P.A., Peterson, K.R., Stamatoyannopoulos, G. and Li, Q. (2005) Synergistic and additive properties of the beta-globin locus control region (LCR) revealed by 5'HS3 deletion mutations: implication for LCR chromatin architecture. *Mol Cell Biol*, **25**, 7033-7041.
42. Hu, X., Bulger, M., Bender, M.A., Fields, J., Groudine, M. and Fiering, S. (2006) Deletion of the core region of 5' HS2 of the mouse beta-globin locus control region reveals a distinct effect in comparison with human beta-globin transgenes. *Blood*, **107**, 821-826.
43. Jia, C.P., Huang, S.Z., Yan, J.B., Xiao, Y.P., Ren, Z.R. and Zeng, Y.T. (2003) Effects of human locus control region elements HS2 and HS3 on human beta-globin gene expression in transgenic mouse. *Blood Cells Mol Dis*, **31**, 360-369.
44. Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., Hu, M., Martin, D.I., Enver, T., Ley, T.J. and Groudine, M. (1995) Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev*, **9**, 2203-2213.
45. Levings, P.P., Zhou, Z., Vieira, K.F., Crusselle-Davis, V.J. and Bungert, J. (2006) Recruitment of transcription complexes to the beta-globin locus control region and transcription of hypersensitive site 3 prior to erythroid differentiation of murine embryonic stem cells. *FEBS J*, **273**, 746-755.
46. Johnson, K.D., Christensen, H.M., Zhao, B. and Bresnick, E.H. (2001) Distinct mechanisms control RNA polymerase II recruitment to a tissue-specific locus control region and a downstream promoter. *Mol Cell*, **8**, 465-471.

47. Demers, C., Chaturvedi, C.P., Ranish, J.A., Juban, G., Lai, P., Morle, F., Aebersold, R., Dilworth, F.J., Groudine, M. and Brand, M. (2007) Activator-mediated recruitment of the MLL2 methyltransferase complex to the beta-globin locus. *Mol Cell*, **27**, 573-584.
48. Mahajan, M.C., Narlikar, G.J., Boyapaty, G., Kingston, R.E. and Weissman, S.M. (2005) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2, MeCP1, and SWI/SNF form a chromatin remodeling complex at the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 15012-15017.
49. Bottardi, S., Ghiam, A.F., Bergeron, F. and Milot, E. (2007) Lineage-specific transcription factors in multipotent hematopoietic progenitors: a little bit goes a long way. *Cell Cycle*, **6**, 1035-1039.
50. McMorrow, T., van den Wijngaard, A., Wollenschlaeger, A., van de Corput, M., Monkhorst, K., Trimborn, T., Fraser, P., van Lohuizen, M., Jenuwein, T., Djabali, M. *et al.* (2000) Activation of the beta globin locus by transcription factors and chromatin modifiers. *EMBO J*, **19**, 4986-4996.
51. Zhu, X., Cheng, J., Gao, J., Lepor, H., Zhang, Z.T., Pak, J. and Wu, X.R. (2002) Isolation of mouse THP gene promoter and demonstration of its kidney-specific activity in transgenic mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, **282**, F608-617.
52. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
53. Wijgerde, M., Grosveld, F. and Fraser, P. (1995) Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo. *Nature*, **377**, 209-213.
54. van de Corput, M.P. and Grosveld, F.G. (2001) Fluorescence in situ hybridization analysis of transcript dynamics in cells. *Methods*, **25**, 111-118.
55. Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M. and Kleckner, N. (2002) Capturing chromosome conformation. *Science*, **295**, 1306-1311.
56. Bottardi, S., Ross, J., Bourgoïn, V., Fotouhi-Ardakani, N., Affar, E.B., Trudel, M. and Milot, E. (2008) Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human {gamma}-globin genes. *Mol Cell Biol*.

57. Kina, T., Ikuta, K., Takayama, E., Wada, K., Majumdar, A.S., Weissman, I.L. and Katsura, Y. (2000) The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *Br J Haematol*, **109**, 280-287.
58. Sawado, T., Halow, J., Bender, M.A. and Groudine, M. (2003) The beta -globin locus control region (LCR) functions primarily by enhancing the transition from transcription initiation to elongation. *Genes Dev*, **17**, 1009-1018.
59. Thomas, M.C. and Chiang, C.M. (2006) The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **41**, 105-178.
60. Sekinger, E.A. and Gross, D.S. (1999) SIR repression of a yeast heat shock gene: UAS and TATA footprints persist within heterochromatin. *EMBO J*, **18**, 7041-7055.
61. Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41-45.
62. O'Neill, L.P. and Turner, B.M. (1995) Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription-independent manner. *EMBO J*, **14**, 3946-3957.
63. Horn, P.J. and Peterson, C.L. (2006) Heterochromatin assembly: a new twist on an old model. *Chromosome Res*, **14**, 83-94.
64. Thomas, J.O. (1984) The higher order structure of chromatin and histone H1. *J Cell Sci Suppl*, **1**, 1-20.
65. Vakoc, C.R., Mandat, S.A., Olenchok, B.A. and Blobel, G.A. (2005) Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell*, **19**, 381-391.
66. Miao, F. and Natarajan, R. (2005) Mapping global histone methylation patterns in the coding regions of human genes. *Mol Cell Biol*, **25**, 4650-4661.
67. Wiencke, J.K., Zheng, S., Morrison, Z. and Yeh, R.F. (2007) Differentially expressed genes are marked by histone 3 lysine 9 trimethylation in human cancer cells. *Oncogene*.



68. Fathallah, H., Weinberg, R.S., Galperin, Y., Sutton, M. and Atweh, G.F. (2007) Role of epigenetic modifications in normal globin gene regulation and butyrate-mediated induction of fetal hemoglobin. *Blood*, **110**, 3391-3397.
69. Sims, R.J., 3rd and Reinberg, D. (2006) Histone H3 Lys 4 methylation: caught in a bind? *Genes Dev*, **20**, 2779-2786.
70. Gui, C.Y. and Dean, A. (2003) A major role for the TATA box in recruitment of chromatin modifying complexes to a globin gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7009-7014.
71. Vieira, K.F., Levings, P.P., Hill, M.A., Crusselle, V.J., Kang, S.H., Engel, J.D. and Bungert, J. (2004) Recruitment of transcription complexes to the beta-globin gene locus in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, **279**, 50350-50357.
72. Song, C.Z., Keller, K., Murata, K., Asano, H. and Stamatoyannopoulos, G. (2002) Functional interaction between coactivators CBP/p300, PCAF, and transcription factor FKL2. *J Biol Chem*, **277**, 7029-7036.
73. Bender, M.A., Mehaffey, M.G., Telling, A., Hug, B., Ley, T.J., Groudine, M. and Fiering, S. (2000) Independent formation of DnaseI hypersensitive sites in the murine beta-globin locus control region. *Blood*, **95**, 3600-3604.
74. Gribnau, J., Diderich, K., Pruzina, S., Calzolari, R. and Fraser, P. (2000) Intergenic transcription and developmental remodeling of chromatin subdomains in the human beta-globin locus. *Mol Cell*, **5**, 377-386.
75. Ho, Y., Elefant, F., Liebhaber, S.A. and Cooke, N.E. (2006) Locus control region transcription plays an active role in long-range gene activation. *Mol Cell*, **23**, 365-375.
76. Sawado, T., Igarashi, K. and Groudine, M. (2001) Activation of beta-major globin gene transcription is associated with recruitment of NF-E2 to the beta-globin LCR and gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10226-10231.
77. Kim, A. and Dean, A. (2003) A human globin enhancer causes both discrete and widespread alterations in chromatin structure. *Mol Cell Biol*, **23**, 8099-8109.

78. Johnson, K.D., Grass, J.A., Park, C., Im, H., Choi, K. and Bresnick, E.H. (2003) Highly restricted localization of RNA polymerase II within a locus control region of a tissue-specific chromatin domain. *Mol Cell Biol*, **23**, 6484-6493.
79. Bungert, J., Dave, U., Lim, K.C., Lieu, K.H., Shavit, J.A., Liu, Q. and Engel, J.D. (1995) Synergistic regulation of human beta-globin gene switching by locus control region elements HS3 and HS4. *Genes Dev*, **9**, 3083-3096.
80. de Laat, W. and Grosveld, F. (2003) Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub. *Chromosome Res*, **11**, 447-459.
81. Bulger, M. and Groudine, M. (1999) Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev*, **13**, 2465-2477.

## 4.8 Supplementary data

### Figure S4.1 Supplementary method

#### RNA-Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

RNA-FISH was performed as described in Wijgerde *et al.* and van de Corput *et al.* Briefly, 150 000 cells were spotted on poly-L-lysine coated slides and fixed in 4% formaldehyde/5% acetic acid for 20 minutes at room temperature. Slides were then washed in PBS three times for 5 minutes at room temperature, and rinsed twice in 70% ethanol. Slides were pretreated for hybridization with 0.01% pepsin in 0.01M HCl at 37°C for 5 minutes and then washed with water for one minute at room temperature. Slides were fixed for 5 minutes at room temperature in 3.7% formaldehyde in PBS, washed twice in PBS for 5 minutes at room temperature, and dehydrated in 70%, 90% and 100% ethanol for 5 minutes at room temperature. Slides were air dried and incubated with 12µl of hybridization mixture (1ng/µl of each probe, 25% formamide, 2X SSC, 200ng/µl sheared salmon sperm DNA, 5X Denhardtts, 50mM sodium phosphate pH 7.0 and 1mM EDTA) over-night in a humidified chamber (25% formamide and 2X SSC) at 37°C. Human  $\gamma$ -probes (three 50-mers probes spaced > 25 nucleotides apart and located in the first and

second intron; Eurogentech) contained a biotin side chain in the middle, and at the 3' and 5' ends, of the oligonucleotide. Mouse  $\alpha$ -globin probes spanning intronic regions and coupled to digoxigenin were also used. The next day, following hybridization, cells were washed in 2X SSC for 5 minutes at 37°C, three times in 2X SSC for 10 minutes at 37°C, and once with 0.1M Tris pH 7.5, 145mM NaCl, 0.02% Tween-20 at room temperature for 5 minutes. For detection of primary transcripts, cells were covered with 100  $\mu$ l of blocking solution (Tris 0.5M pH 7.5, 0.725M NaCl, 500  $\mu$ l blocking reagent; Boehringer Mannheim) and pre-incubated for 30 minutes at room temperature in a humidified chamber (Tris 0.5M pH 7.5 0.725M NaCl). Slides were then washed twice in 0.1M Tris pH 7.5, 145mM NaCl, 0.02% Tween-20 for 5 minutes at room temperature. Each antibody was diluted in blocking solution, applied to cells for 45 minutes in a humidified chamber at room temperature, and then finally washed with 0.1M Tris pH 7.5, 145mM NaCl, 0.02% Tween-20 twice for 5 minutes at room temperature. Human  $\gamma$ -probe detection was carried out using sheep-anti ( $\alpha$ )-digoxigenin (Cederlane), rabbit- $\alpha$ -sheep-FITC (Sigma), and goat- $\alpha$ -rabbit-FITC (Sigma) antibodies; mouse  $\alpha$ -probe detection was carried out using Avidin-Texas Red (Vector Lab), Biotinylated goat- $\alpha$ -avidin (Vector Lab), and Avidin-Texas Red (Vector Lab). Slides were dehydrated as described above and air dried. Mounting was accomplished using DAPI/DABCO:Vectashield (1:1) in glycerol, and slides were stored in the dark at -20°C. Fluorescent signals were detected with a Leica DMR Fluorescence microscope equipped with Openlab 3.1 digital camera. The percentage of transcribing cells was determined by counting at least 300 cells on 3 different slides.

### **Chromosome conformation capture**

Chromosome conformation capture (3C) was carried out as described in Dekker *et al.* with minor modifications as follows. One 12.5 dpc In2 or  $\Delta$ 2B fetal liver, or 1-2 million 10.5 dpc yolk sac cells, were resuspended in 2 ml DMEM/10% FBS, collected by centrifugation, resuspended in 2 ml DMEM/10% FBS containing 2% formaldehyde, and fixed for 10 minutes at room temperature. The reaction was quenched by addition of ice-cold glycine

(125 mM final) and cells were centrifuged and washed once with ice-cold PBS. Six million cells were then immediately pooled in 5 ml of ice-cold lysis buffer (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.2% Nonidet NP-40) containing protease inhibitors, and agitated for 30 minutes at 4°C. After centrifugation, nuclei were resuspended in 1.1X EcoRI digestion buffer containing 0.3% SDS, and shaken at 37°C for one hour. Triton X-100 (1.8% final) was then added and nuclei incubated as above. Finally, about 1/10<sup>th</sup> of the reaction was incubated with 625 U of EcoRI (Invitrogen) at 37°C overnight with gentle agitation. After this digestion, SDS (1.6% final) was added and the sample further incubated for 20 minutes at 65°C. 2/3<sup>rd</sup> of the sample was then diluted 10-fold in ligation buffer (30 mM Tris pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP) and Triton X-100 added to 1% and incubated at 37°C for one hour with gentle agitation. 7500 Cohesive End Ligation Units of T4 DNA ligase (New England Biolabs) were added to the reaction followed by further incubation for 16 hr at 16°C. The sample was then treated with Proteinase K (Invitrogen) and incubated overnight at 65°C. Finally, after RNaseI treatment, DNA was precipitated and resuspended in TE buffer. About 1/60<sup>th</sup> of each sample volume was used as template for real-time PCR (Sybr Green, Invitrogen).

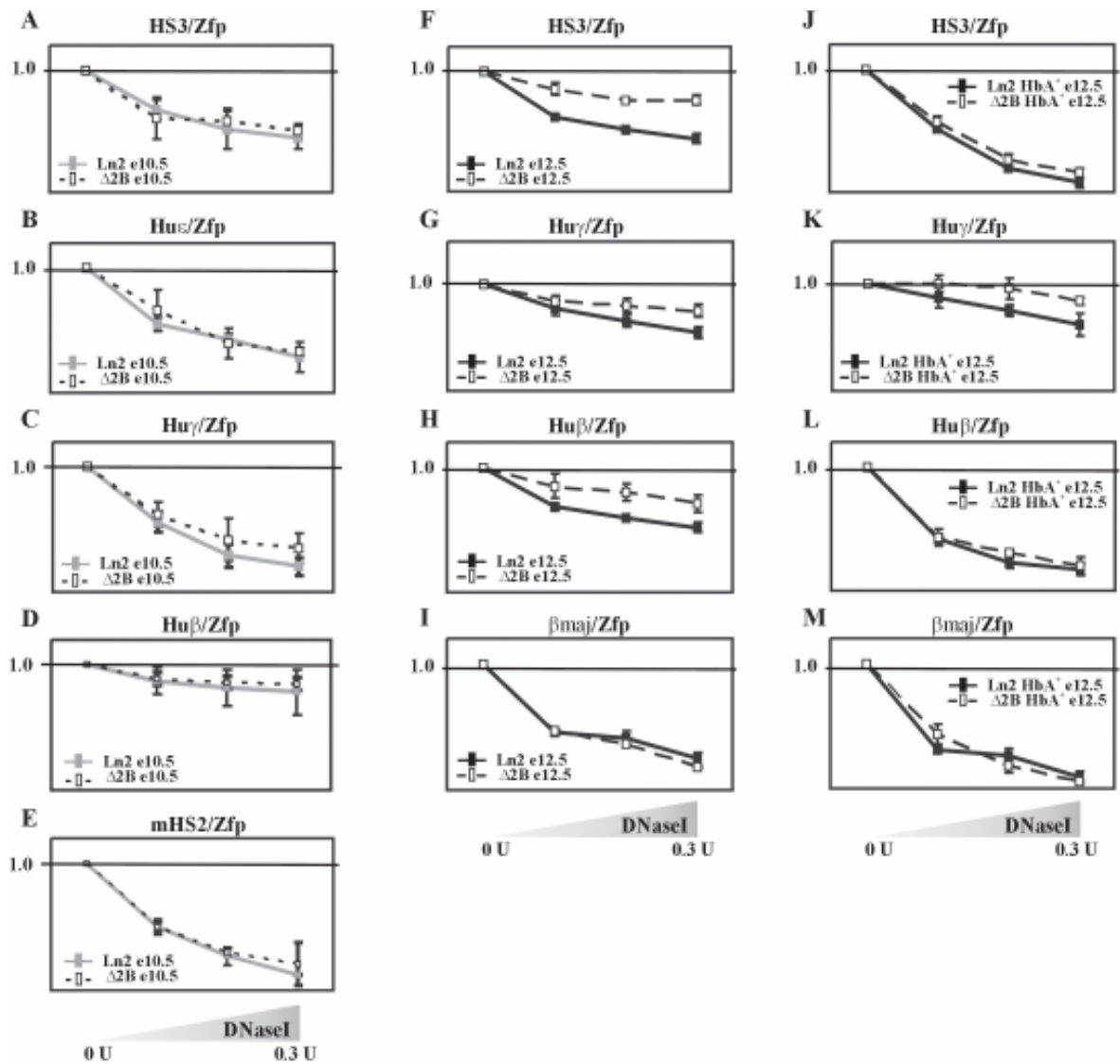
Naked DNA control templates consist of the huβ-globin PAC clone PAC148γlox (Imam *et al.*) together with the mouse actin BAC clone (BACe3.6-actin, BAC PAC resources CHORI). Equimolar amounts of each were digested with EcoRI, ligated, and the DNA precipitated as described above. Enrichment levels were calculated according to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Brain cells from 12.5 dpc embryos were used as negative control.

## References

- Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M. and Kleckner, N. (2002) Capturing chromosome conformation. *Science*, 295, 1306-1311.
- Wijgerde, M., Grosveld, F. and Fraser, P. (1995) Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo. *Nature*, 377, 209-213.

van de Corput, M.P. and Grosveld, F.G. (2001) Fluorescence in situ hybridization analysis of transcript dynamics in cells. *Methods*, 25, 111-118.

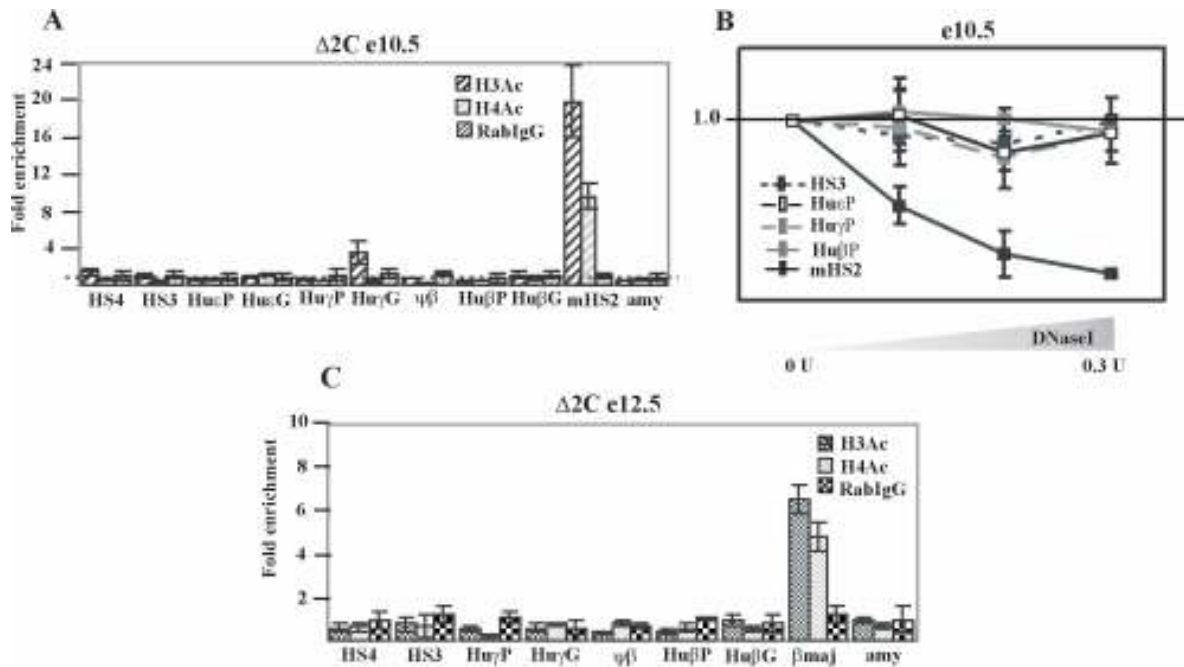
Imam, A. M., Patrinos, G. P., de Krom, M., Bottardi, S., Janssens, R. J., Katsantoni, E., Wai, A. W., Sherratt, D. J. and Grosveld, F. G. (2000) Modification of human beta-globin locus PAC clones by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 28, E65.



**Figure S4.2.** DNaseI sensitivity assay of the *huβ*-globin locus in *Ln2* and  $\Delta 2B$  EryC

PCR-based DNaseI sensitivity assay on e10.5 yolk sacs (A-E), e12.5 fetal liver (F-I) or HbA<sup>+</sup> e12.5 fetal liver (J-M). Each point represents samples of comparable average molecular weight (ranging from 12 kb to 0.5 kb). Intensity of the PCR products was quantified by PhosphorImager and plotted on graphs relative to the input (DNaseI untreated chromatin) sample. Y-axis indicates relative amount of PCR products (globin relative to mouse *Zfp37*); x-axis: increasing DNaseI concentration (ranging from 0 up to 0.3 U). Standard

deviations are indicated by vertical lines; HS3: human HS3; hu $\epsilon$ : human  $\epsilon$ -promoter; hu $\gamma$ : human  $\gamma$ -promoters (including  $\gamma^A$ - and  $\gamma^G$ -promoters); hu $\beta$ : human  $\beta$ -promoter; mHS2: mouse  $\beta$ -globin HS2.



**Figure S4.3. Chromatin organization at the hu $\beta$ -globin locus in e10.5 and e12.5  $\Delta 2C$  EryC**

ChIP assays were carried out on (A)  $\Delta 2C$  e10.5 yolk sac (dashed bars) or (C) e12.5 fetal liver (check bars). Immunoprecipitated and input chromatin samples from AcH3, AcH4 and Rab1gG ChIP were subject to qPCR. Fold enrichments were calculated as described in Fig 4.1 and are indicated on the y-axis.  $\beta$ maj control replaces mHS2 control for analysis in e12.5 EryC. The regions analyzed are specified on the x-axis and the antibodies used for ChIP assays are indicated on each graph. (B) PCR-based DNaseI sensitivity assay was carried out on  $\Delta 2C$  e10.5 yolk sac, such as described in Fig. S4.2.

## **Chapitre 5 : Caractérisation du rôle des facteurs de transcription dans des cellules progénitrices hématopoïétiques**

Le niveau d'expression des différents facteurs de transcription dans les différents types cellulaires érythroïdes sont variables selon le stade de différenciation. Ceci fait en sorte que l'expression des gènes qui sont régulés par ces facteurs est aussi variable. Par exemple, il a été montré que le gène  $\beta$  montre une expression basale dans les CPH. Suite à la différenciation vers la lignée érythroïde, l'expression de ce gène augmente de façon importante.

Afin de déterminer de quelle façon ce gène est régulé dans les CPH, notre groupe s'est intéressé à la régulation épigénétique du gène  $\beta$  dans les CPH. Ils ont démontré que dans ces cellules, l'expression basale du gène  $\beta$  est associée à des modifications épigénétiques caractéristiques de la chromatine permissive au niveau du locus telle que AcH3. Ce phénomène est appelé potentialisation de la chromatine et est associé directement à l'expression à haut niveau du gène  $\beta$  dans les cellules érythroïdes matures.

Pour le deuxième objectif de cette thèse (section 2.3.3), nous avons donc tenté de caractériser par quel mécanisme cette potentialisation de la chromatine est mise en place dans les CPH. Nos résultats montrent que certains facteurs de transcription, tels que EKLF et p45, sont impliqués dans la potentialisation de la chromatine du locus  $\beta$  dans les CPH. En effet, ces facteurs sont exprimés dans les CPH et leur faible niveau d'expression est suffisant pour favoriser une ouverture de la chromatine permettant la potentialisation.

Ces résultats indiquent que certains facteurs de transcription pourraient possiblement être modulés au niveau des cellules progénitrices permettant ainsi de modifier la façon dont un gène est régulé dans les cellules matures.



Les résultats de cette étude qui sont présentés dans le présent chapitre ont été publiés dans la revue *The EMBO Journal* en août 2006. L'article a pour titre : « *Lineage-specific activators affect  $\beta$ -globin locus chromatin in multipotent hematopoietic progenitors* » et comporte 6 figures et 8 figures supplémentaires.

## **Article 2: Lineage-specific activators affect $\beta$ -globin locus chromatin in multipotent hematopoietic progenitors**

Stefania Bottardi\*<sup>1</sup>, Julie Ross\*<sup>1</sup>, Natacha Pierre-Charles<sup>1</sup>, Volker Blank<sup>3,4</sup> and Eric Milot<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Guy-Bernier Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4; <sup>2</sup> Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montreal, C.P. Succursale Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3T 3J7; <sup>3</sup> Lady Davis Institute for Medical Research and <sup>4</sup> Department of Medicine, McGill University, 3755 Cote Sainte-Catherine Road, Montreal, Quebec, Canada H3T 1E2.

<sup>5</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel: +1 5142523551; Fax: +1 5142523430

\* These authors contributed equally to this work.

Character count of the manuscript: 52710

Running title:  $\beta$ -globin activation in hematopoietic progenitors

Subject Category: Chromatin and transcription  
Development

**Keywords:** chromatin/epigenetics/globins/hematopoietic progenitors/transcriptional activators

## 5.1 Abstract

During development, the regulated expression of tissue-specific genes can be preceded by their potentiation that is, by chromatin activation in progenitor cells. For example, the human  $\beta$ -like globin genes are potentiated in a gene- and developmental-specific manner in hematopoietic progenitors. Developmental regulation of human  $\beta$ -gene expression in erythroid cells is mostly determined by transcriptional activators; however it is not clear how gene-specific potentiation is set in hematopoietic progenitors. Using human and transgenic multipotent hematopoietic progenitors, we demonstrate that human  $\beta$ -globin locus activation is characterized by TBP, NF-E2, CBP, and BRG1 recruitment at both the Locus Control Region and human  $\beta$ -gene promoter. Our results further indicate that in hematopoietic progenitors, EKLF influences chromatin organization at the human  $\beta$ -globin locus and is instrumental for human  $\beta$ -gene potentiation. Thus, we show that lineage-specific transcriptional activators expressed at basal levels in progenitor cells can participate in gene potentiation.

## 5.2 Introduction

The expression of lineage-specific genes can be potentiated before transcriptional activation (Bonifer, 1999). Gene potentiation is characterized by an active chromatin organization in multipotent progenitor cells (Jimenez *et al*, 1992; Bottardi *et al*, 2003) and can be accompanied by partial occupancy of gene regulatory regions by transcriptional activators. Gene expression in differentiated cells requires synergy among activators, co-activators, general transcription factors, chromatin remodeling and histone modifying complexes (Struhl, 2005). In hematopoietic stem cells (Ye *et al*, 2003) and in multipotent hematopoietic progenitor cells (Hu *et al*, 1997) the “promiscuous” expression of lineage-specific factors such as PU.1, C/EBP $\alpha$ , PAX5, SCL, GATA-1, GATA-2 and GATA-3 does not alter the biological potential of these cells, but ostensibly provides a proper environment for stochastic lineage commitment mainly by repressing or activating groups

of genes (Cantor and Orkin, 2002; Graf, 2002). However, it is not known if promiscuously expressed transcriptional activators influence gene potentiation in multipotent progenitor cells.

In mammals, the human  $\beta$ - (hu $\beta$ -) globin locus is a well characterized multigenic locus, and therefore a good model to identify mechanisms that control epigenetic regulation of gene expression during hematopoiesis. The hu $\beta$ -globin locus consists of five developmentally regulated genes ( $\epsilon$ - $\gamma^G$ - $\gamma^A$ - $\delta$ - $\beta$ ), whose high-level expression in erythroid cells (EryC) depends upon the Locus Control Region ( $\beta$ LCR) comprised of four erythroid-specific DNaseI hypersensitive sites (HS). The  $\beta$ LCR enhances gene transcription through direct interaction with globin promoters (Carter *et al*, 2002; Tolhuis *et al*, 2002; Palstra *et al*, 2003). Even though DNaseI sensitivity at the endogenous murine locus is not lost when the  $\beta$ LCR is deleted (Bender *et al*, 2000), in EryC the human  $\beta$ LCR is a major determinant of chromatin organization at the hu $\beta$ -globin locus (Grosveld *et al*, 1987). In progenitor cells, the  $\beta$ -globin locus is in an active chromatin organization (Jimenez *et al*, 1992) and potentiation of hu $\beta$ -like genes, most likely mediated by as yet unidentified transcriptional activators, is developmental-specific (Bottardi *et al*, 2003)).

EKLF, GATA-1, and the p45 subunit of NF-E2 (p45) are among the best-characterized transcriptional activators involved in hu $\beta$ -gene regulation in EryC. EKLF is essential for adult  $\beta$ -globin gene transcription and EKLF knockout (KO) mice suffer from severe anemia and die at approximately 14.5 d.p.c. (days *post-coitus*) (Nuez *et al*, 1995; Perkins *et al*, 1995). EKLF binds to  $\beta$ LCR and globin promoters (Bieker, 2001) and it is required for  $\beta$ LCR- $\beta$  major ( $\beta$ maj) gene direct interaction (Drissen *et al*, 2004). EKLF recruits the erythroid-specific SWI/SNF chromatin remodeling complex 1 (E-RC1) to the  $\beta$ -globin locus (Armstrong *et al*, 1998) and the absence of EKLF leads to reduced DNaseI HS formation at the  $\beta$ maj and hu $\beta$ -promoters (Wijgerde *et al*, 1996). GATA-1 binds to  $\beta$ LCR HSs and globin promoters and is critical for primitive and definitive erythroid cell differentiation (Pevny *et al*, 1991; Fujiwara *et al*, 1996). It interacts with CBP, SWI/SNF,

ACF/WCRF and NuRD complexes (Blobel *et al*, 1998; Kadam *et al*, 2000; Hong *et al*, 2005; Rodriguez *et al*, 2005). GATA-1 is also required for  $\beta$ LCR- $\beta$ maj direct interaction (Vakoc *et al*, 2005). NF-E2 is comprised of a ubiquitously expressed subunit, MafK, and the hematopoietic-specific activator p45 (Andrews *et al*, 1993), and it is recruited to mouse and human  $\beta$ LCR and promoter regions (Daftari *et al*, 1999; Forsberg *et al*, 2000; Sawado *et al*, 2001; Leach *et al*, 2003). NF-E2 is necessary for globin gene expression in differentiated MEL (mouse erythroleukemia) cells but p45 KO mice exhibit only mild effects on erythropoiesis and no significant influence on globin gene expression (Shivdasani and Orkin, 1995).

Interestingly EKLF, GATA-1, and p45 are also promiscuously expressed in hematopoietic progenitors (Hu *et al*, 1997). p45 could be involved in priming/potentialization of the mouse  $\alpha$ -globin locus (Anguita *et al*, 2004), whereas PU.1-GATA-1 interaction influences lineage commitment (Cantor and Orkin, 2002; Graf, 2002). However, it has never been investigated whether these factors play roles in developmental-specific potentialization of the hu $\beta$ -gene and globin locus activation in multipotent hematopoietic progenitor cells (HPC).

To understand the molecular events leading to hu $\beta$ -like globin gene potentialization, we studied the influence of promiscuously expressed transcriptional activators on recruitment of general transcription factors as well as chromatin remodeling and histone modifying activities at  $\beta$ LCR HS2, hu $\gamma$ -, and hu $\beta$ -promoter in primary multipotent HPC. Our results, obtained with human cells and transgenic mice expressing the hu $\beta$ -globin locus, suggest that EKLF is instrumental for globin gene potentialization in HPC, facilitating p45, CBP, BRG1, and TBP recruitment at the hu $\beta$ -promoter. Finally, we provide insight into the cooperative role of EKLF and p45 for promoting appropriate chromatin activation in HPC, as well as for Pol II recruitment and subsequent transcriptional elongation in EryC. Based on these results, we suggest a model whereby EKLF is a key regulator of hu $\beta$ -gene potentialization in HPC.

## 5.3 Results

### 5.3.1 HPC purification and characterization

Mouse HPC were isolated from 13.5 dpc fetal livers of line 2 mice (ln2 HPC) which are transgenic for the entire hu $\beta$ -globin locus and express the hu $\beta$ -globin genes normally (Strouboulis *et al*, 1992). Mouse HPC correspond to a Ter119<sup>-</sup>, Gr-1<sup>-</sup>, B220<sup>-</sup>, CD31<sup>high</sup> population, which represents 1-2% of the total fetal liver and does not contain mature or late committed cells (see below). The sorted population was always  $\geq$  98% pure. The hematopoietic potential of these cells was ascertained by *in vitro* clonal assays in methylcellulose (Table 5.1, ln2 HPC). On average, out of 100 colonies, 85 originated from progenitors with multilineage potential (CFU-GEMM: Colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, megakaryocyte, macrophage; CFU-GM: Colony forming unit-granulocyte, megakaryocyte), whereas 15 showed unilineage commitment (BFU-E: Burst forming unit-erythrocyte). No CFU-E (colony forming unit-erythrocyte) was detected.

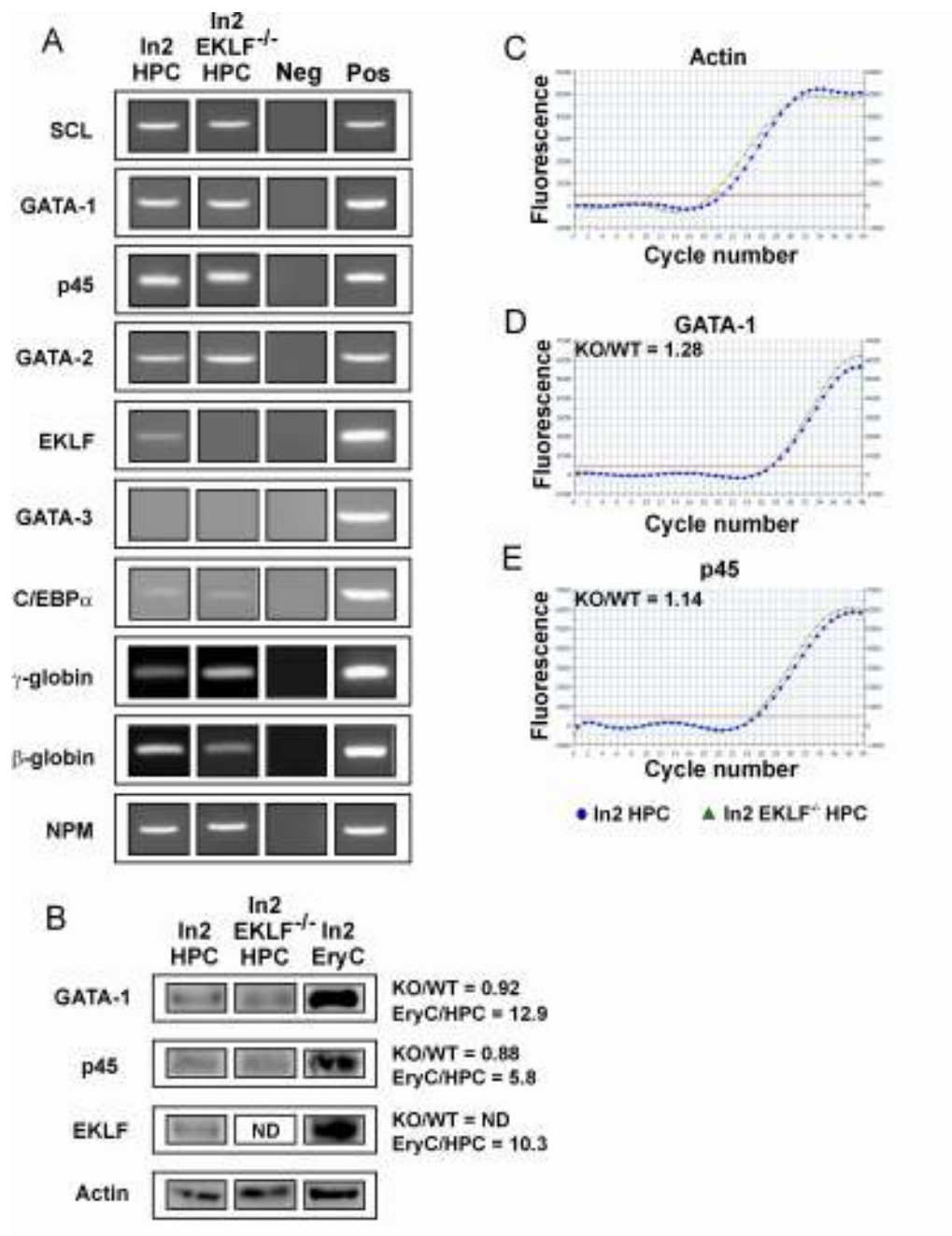
**Table 5.1: Clonal assays in methylcellulose: 150 HPC purified from 13.5 dpc ln2 or ln2 EKLF<sup>-/-</sup> fetal livers were plated onto methylcellulose plates.**

Clonogenic ability of Ter119 <sup>-</sup> , Gr-1 <sup>-</sup> , B220 <sup>-</sup> , CD31 <sup>high</sup> cells				
	CFU-GEMM	CFU-GM	BFU-E	Colonies/10 <sup>3</sup> cells
ln2 HPC	38.9%	44.8%	16.3%	210 $\pm$ 40
ln2 EKLF <sup>-/-</sup> HPC	34%	48.2%	17.8%	240 $\pm$ 35

To further characterize this population, ln2 HPC cDNA was used to study the expression of marker genes. SCL, GATA-1, p45, GATA-2, EKLF, C/EBP $\alpha$  and globin transcripts are all expressed, whereas transcripts corresponding to GATA-3 are not detected (Fig. 5.1A; ln2

HPC). This expression pattern suggests that the Ter119<sup>-</sup>, Gr-1<sup>-</sup>, B220<sup>-</sup>, CD31<sup>high</sup> cell population is mainly composed of multipotent HPC (Akashi *et al*, 2000), namely common myeloid and megakaryocyte/erythrocyte lineage-restricted progenitors, a finding supported by our *in vitro* clonal assays (see above). As evaluated by quantitative real-time reverse transcriptase (RT)-PCR, the levels of p45, EKLF, and huβ-globin mRNA are, respectively, ~7-, ~6- and ~100-fold higher in EryC than in HPC (Supplementary Fig. 5.1). Accordingly, western blot analyses revealed that p45, GATA-1 and EKLF, protein levels are approximately, 12-, 6- and 11-fold higher in EryC than in HPC (Fig. 5.1B).

Since an EKLF KO background is extensively used in this study, we investigated whether the absence of EKLF causes a general failure of cellular differentiation during hematopoiesis because EKLF regulates other genes crucial for final EryC differentiation (Drissen *et al*, 2005). HPC purified from 13.5 d.p.c. ln2 EKLF KO fetal livers (ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC) represent 1-2% of total fetal liver (as observed in ln2 HPC) and, as expected (Nuez *et al*, 1995; Perkins *et al*, 1995), give rise to erythroid colonies in methylcellulose (Table 5.1). Furthermore, the gated populations and marker gene expression analyses (with the exception of globin genes) do not reveal any apparent difference between ln2 HPC and ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC (Fig. 5.1A). In particular, GATA-1 and p45 expression levels, as evaluated by quantitative real-time RT-PCR and Western blot analysis, do not change significantly among the two populations (Fig. 5.1B-E). Thus, the absence of EKLF does not preclude normal hematopoietic differentiation of HPC.



**Figure 5.1: Expression of marker genes in In2 HPC and In2 EKL<sup>F-/-</sup> HPC.** (A) Semi-quantitative RT-PCR performed on equal amounts of RNA purified from In2 HPC or In2 EKL<sup>F-/-</sup> HPC. PCR samples were resolved onto agarose gel.  $\gamma$ -globin: fetal human ( $\gamma$ ) and mouse embryonic ( $\beta$ H1) transcripts;  $\beta$ -

globin: adult human ( $\beta$  and  $\delta$ ) and mouse ( $\beta_{min}$  and  $\beta_{maj}$ ) globin transcripts; NPM: ubiquitously expressed nucleophosmin transcript, used as internal control; Neg: negative control; Pos: positive control; **(B)** Western blot analysis of ln2 HPC, ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC, and ln2 EryC; 5  $\mu$ g of whole cell protein extract were loaded in each lane of a 15% SDS-PAGE. Anti-GATA-1, -p45, and -actin antibodies were purchased from SantaCruz; the anti-EKLF serum used is a generous gift from S. Philipsen. To obtain the indicated ratios, the enrichment of each factor was normalized according to the actin level; **(C-D)** Representative examples of quantitative real-time RT-PCR; the relative level of GATA-1 or p45 gene expression in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC vs. ln2 EKLF HPC were calculated according to Pfaffl (Pfaffl, 2001), using mouse actin as internal control and expressed as KO/WT ratio; *x* axis: cycle number; *y* axis: derivative of SYBR Green fluorescence. Blue dots: ln2 HPC; green triangles: ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC.

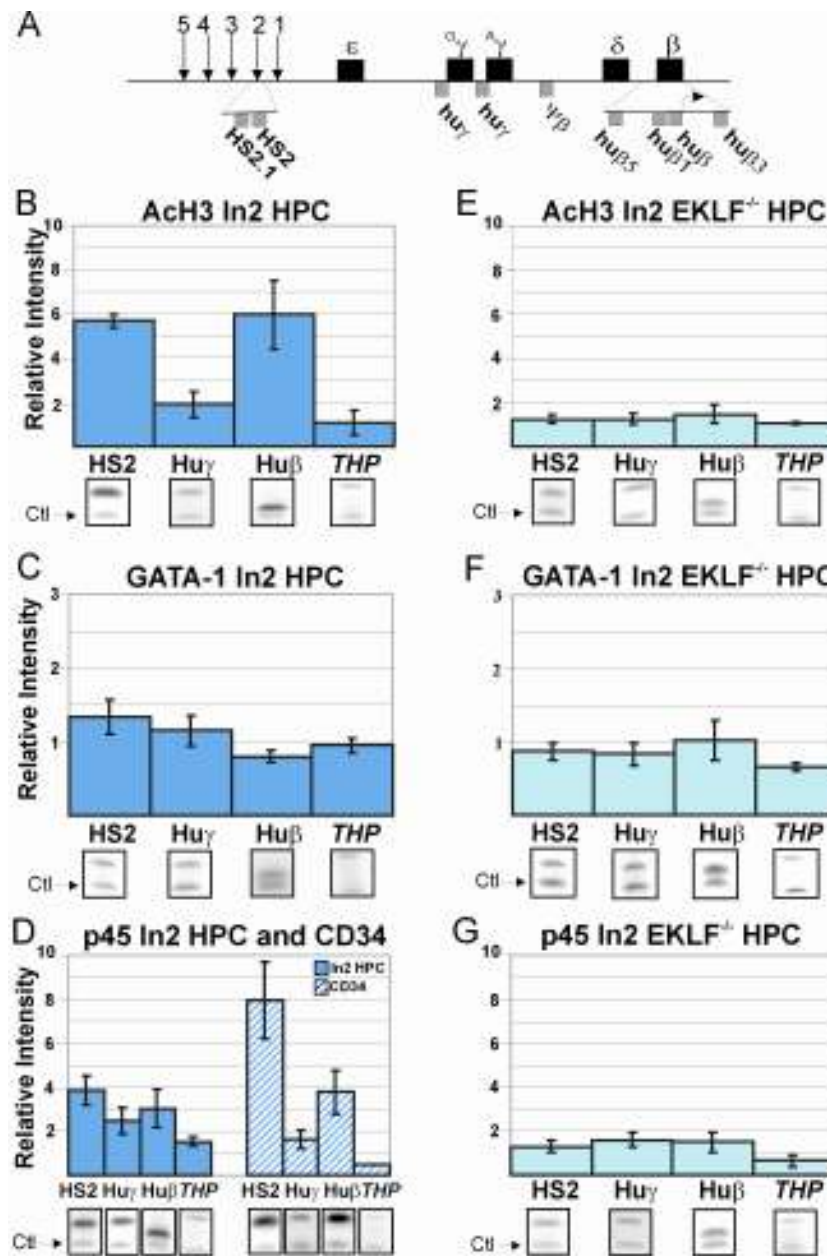
### **5.3.2 Transcriptional activators recruitment at the hu $\beta$ -globin locus in HPC**

Our previous results suggested that in bone marrow-derived ln2 HPC and human CD34<sup>+</sup> cells, chromatin at the hu $\beta$ -globin LCR is in an active state, and the hu $\beta$ -promoter is potentiated for transcriptional activation (Bottardi *et al*, 2003). We now investigate how histone covalent modification and chromatin remodeling activities are recruited at HS2, hu $\beta$ -, and hu $\gamma$ -promoters during hematopoiesis. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed on 13.5 d.p.c. fetal liver-derived hematopoietic cells. In 13.5 d.p.c. fetal livers, the hu $\beta$ -gene is expressed and hu $\gamma$ -genes are mostly silent as judged by the fact that hu $\gamma$ -transcripts represent ~10% of total hu $\beta$ -globin level (Strouboulis *et al*, 1992). HS2 was chosen because it is important for high-level hu $\beta$ -gene expression in EryC (Morley *et al*, 1992), and moreover HS2 deletion can abrogate epigenetic regulation of globin genes in EryC (Milot *et al*, 1996) as well as locus activation in HPC (Bottardi *et al*, 2005).



Histone acetylation of the hu $\beta$ -globin locus in fetal liver ln2 HPC (Fig. 5.2B; Supplementary Fig. 5.2A) is similar to the pattern observed in bone marrow HPC (Bottardi *et al*, 2003), suggesting that  $\beta$ LCR and hu $\beta$ -promoter are in an active/potent chromatin organization also in 13.5 d.p.c. fetal liver HPC. As shown in Fig. 5.2C, GATA-1 is not significantly crosslinked at HS2, hu $\beta$ - or hu $\gamma$ -promoters while, as reported previously (Anguita *et al*, 2004), HS-12 of the mouse  $\alpha$ -globin locus is slightly enriched (Supplementary Fig. 5.3A). p45 is detected at HS2 and hu $\beta$ -promoter in ln2 HPC and in CD34<sup>+</sup> cells (Fig. 5.2D; Supplementary Fig. 5.3B). p45 is also detected at hu $\gamma$ -promoters in ln2 HPC (Fig. 5.2D). Thus, p45 is recruited to the hu $\beta$ -globin locus at early stages of hematopoiesis.

Since EKLF is expressed at basal levels in HPC, we investigated whether it can influence hu $\beta$ -gene potentiation in HPC. Commercially available antibodies against EKLF are not suitable for ChIP analysis (Feng and Kan, 2005). Thus, we used a genetic approach in comparing ln2 HPC with ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC. As shown in Fig. 5.2E, histone H3 acetylation at the hu $\beta$ -globin locus decreases significantly in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC relative to ln2 HPC, whereas no major differences are detected at HS-29 of the mouse  $\alpha$ -globin locus (Supplementary Fig. 5.3C). (Unless specified, “significant” refers to a statistically significant difference between wild type and KO cells, based on unpaired student’s *t* test *P*-values <0.05). As in ln2 HPC, GATA-1 is not detected at HS2 or globin promoters in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC (Fig. 5.2F). p45 binding to HS2 and hu $\beta$ -promoter is significantly affected in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC (Fig. 5.2G), suggesting that EKLF can influence p45 recruitment to these regions and that p45 as well as EKLF participate in locus organization in HPC.



**Figure 5.2: Histone H3 acetylation, GATA-1, and p45 recruitment at the  $\text{hu}\beta$ -globin locus in HPC.**

(A) A map of the  $\text{hu}\beta$ -globin locus; genes are shown as black boxes and the location of  $\beta$ LCR HSs is indicated by arrows. Amplified regions used for ChIP analyses are indicated by grey boxes; (B-G) ChIP assays: immunoprecipitated and unbound (input) chromatin samples were subjected to duplex radioactive

PCR with one primer set specific for hu $\beta$ -globin regions and another primer set specific for mouse *zfp37* (ZFP, Zinc finger protein 37) or human *pax6* (pax6, Paired box protein 6) regulatory regions ('Ctl', indicated by arrows), two genes that are not expressed in hematopoietic cells. All PCR reactions were performed in parallel under conditions of linear amplification. Products were quantified by PhosphorImager. The level of enrichment of globin regions relative to the control and input samples is represented by bars, with their corresponding Standard Deviations. A value of 1 indicates no enrichment. Mouse THP/ZFP or human THP/pax6 controls are included (*THP*, kidney-specific Tamm-Horsfall gene) to confirm that no enrichment is detected at regulatory regions of non-hematopoietic genes. To obviate for weak signals, THP/ZFP PCR reactions were run longer but always in conditions of linear amplification. Representative gel images are shown below each panel; AcH3: anti-acetylated histone H3 antibodies; dark blue bars: ln2 HPC; dark blue hatched bars: human CD34<sup>+</sup> cells; light blue bars: ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC.

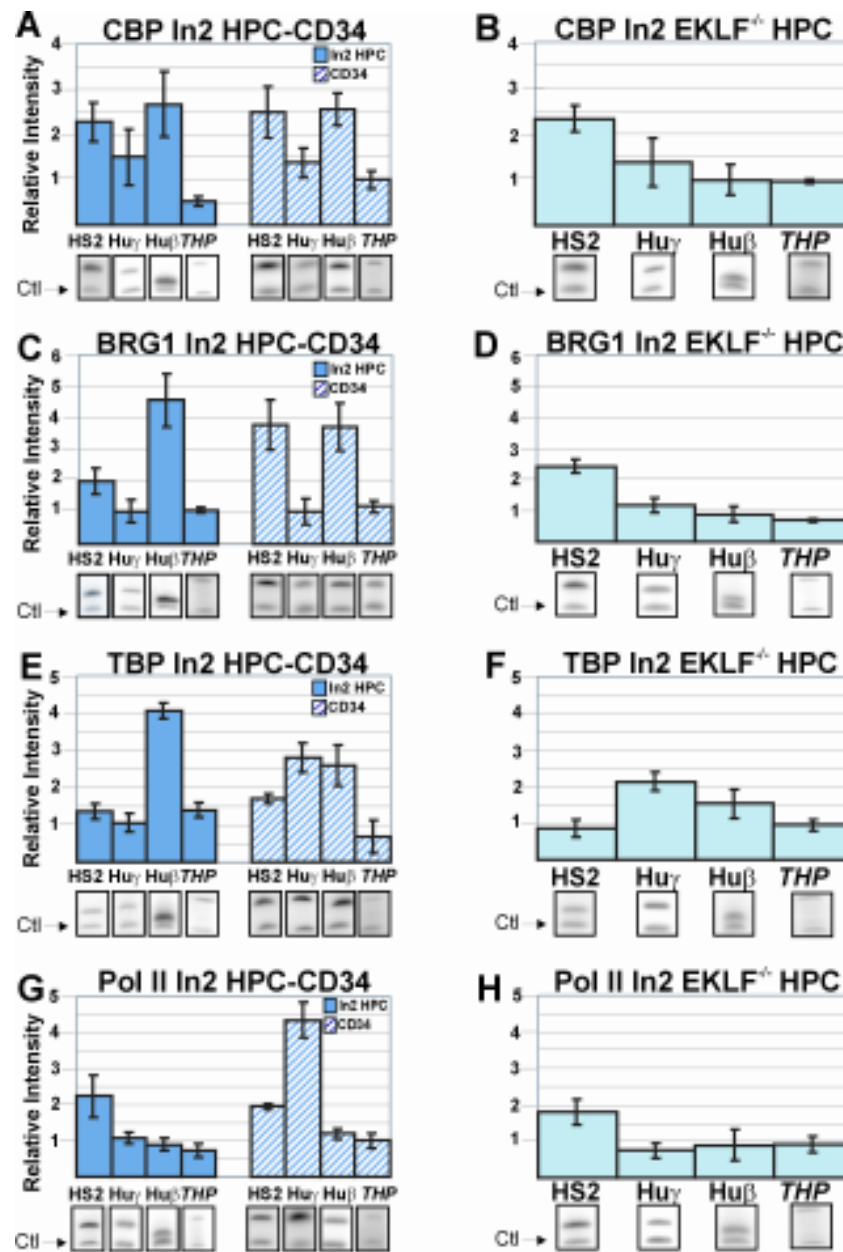
### **5.3.3 Recruitment of histone modifying and chromatin remodeling activities at the hu $\beta$ -globin locus in HPC**

Based on the above results, we investigated whether the role of p45 and EKLF in globin potentiation includes their capacity to recruit histone modifying and chromatin remodeling activities to the globin locus.

CBP is detected at HS2 and hu $\beta$ -promoter in ln2 HPC and CD34<sup>+</sup> cells (Fig. 5.3A; Supplementary Fig. 5.3D). However, CBP binding is significantly reduced at hu $\beta$ -promoter in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC (Fig. 5.3B). p45 (Hung *et al*, 2001) and EKLF (Zhang and Bieker, 1998) interact with and are acetylated by CBP, but unlike p45 (Johnson *et al*, 2001), the ability of EKLF to recruit CBP to any region of the globin locus has never been demonstrated. The fact that in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC H3 acetylation and p45 recruitment are

affected at both HS2 and hu $\beta$ -promoter (Fig. 5.2E, G), whereas CBP binding is reduced only at hu $\beta$ -promoter, suggests that the absence of EKLF could either: (i) directly impede CBP recruitment at the hu $\beta$ -promoter; or (ii) preclude p45 and CBP recruitment at the hu $\beta$ -promoter with consequent hypoacetylation. Therefore the role of p45 in locus acetylation was verified in HPC purified from 13.5 d.p.c. ln2 p45 KO fetal livers (ln2 p45<sup>-/-</sup> HPC). The absence of p45 does not significantly change histone H3 acetylation level at HS2 (data not shown), whereas H3 acetylation and CBP recruitment at the hu $\beta$ -promoter significantly decrease in ln2 p45<sup>-/-</sup> HPC (Supplementary Fig. 5.4). Thus, it appears that p45-mediated recruitment of CBP, which is facilitated by EKLF, contributes to histone acetylation of the hu $\beta$ -promoter in HPC. The detection of histone H3 acetylation at HS2 in ln2 p45<sup>-/-</sup> HPC suggests that other activator/s capable of interacting with histone acetyltransferases can bind HS2 in HPC.

The remodeling complex E-RC1 contains, among other proteins, the yeast homologue BRG1 and EKLF (Armstrong *et al.*, 1998). We therefore wondered whether EKLF might be part of a remodeling complex in HPC. Since the EKLF-BRG1 interaction is sufficient to remodel a chromatin-assembled  $\beta$ -globin promoter (Kadam *et al.*, 2000), and BRG1 is the first among the SWI/SNF components to be recruited to promoter regions, we verified whether EKLF could influence hu $\beta$ -gene potentiation through BRG1 recruitment and hence chromatin remodeling. The comparison between ln2 HPC or CD34<sup>+</sup> cells and ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC (Fig. 5.3C, D) reveals a significant reduction of BRG1 binding at hu $\beta$ -promoter in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC. As expected, BRG1 binding at the c-myc promoter (Nagl *et al.*, 2006) is similar in ln2 HPC vs. ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC (Supplementary Fig. 5.3E). Based on these results, we propose that in HPC EKLF facilitates chromatin remodeling of the hu $\beta$ -promoter through BRG1 recruitment.



**Figure 5.3: CBP, BRG1, TBP, and Pol II recruitment at the hu $\beta$ -globin locus in HPC.**

Ln2 HPC, human CD34<sup>+</sup> cells, or Ln2 EKLFL<sup>-/-</sup> HPC were subjected to ChIP analyses with anti-CBP (A, B), -BRG1 (C, D), -TBP (E, F), or -Pol II (G, H) antibodies. Analysis and quantification of immunoprecipitated samples were performed as described in Fig. 5.2. Dark blue bars: Ln2 HPC; dark blue hatched bars: human CD34<sup>+</sup> cells; light blue bars: Ln2 EKLFL<sup>-/-</sup> HPC.

### 5.3.4 Transcription preinitiation complex assembly and globin gene potentiation in HPC

The preinitiation complex (PIC) includes Pol II, general transcription factors for example TBP, and additional cofactors. Basal levels of hu $\beta$ -gene expression in HPC (Fig. 5.1A) prompted us to ask whether gene potentiation in these cells requires PIC assembly. TBP was detected at hu $\beta$ -promoter in ln2 HPC and CD34<sup>+</sup> cells (Fig. 5.3E). Even though bound to the hu $\gamma$ -promoter in CD34<sup>+</sup> cells (see Discussion), TBP is not found at hu $\gamma$ - (Fig. 5.3E) or hu $\epsilon$ - (data not shown) promoters in ln2 HPC. Thus, globin potentiation in ln2 HPC is developmental-specific and is associated with TBP recruitment at the hu $\beta$ -promoter before the onset of high-level transcriptional activity. This is supported by our results obtained in EKLF KO cells. In EKLF KO mice the switch from  $\gamma$ -to- $\beta$ -globin expression is delayed; indeed around 13.5 d.p.c.  $\gamma$ -globins are expressed in a greater number of fetal liver EryC derived from these mice relative to the situation for wild type counterparts (Perkins *et al*, 1996; Wijgerde *et al*, 1996). Consequently, in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC the TBP binding significantly decreases at hu $\beta$ -promoter, whereas it increases at hu $\gamma$ -promoters (Fig. 5.3F).

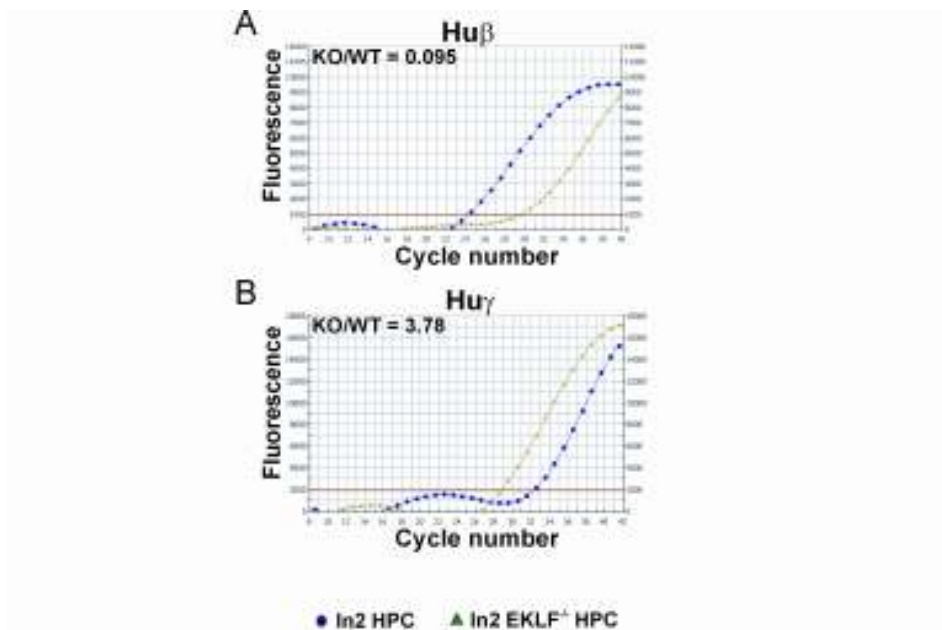
It has been proposed that NF-E2–TAF<sub>II</sub>130 interaction facilitates PIC assembly at globin promoters (Amrolia *et al*, 1997). Accordingly, in ln2 p45<sup>-/-</sup> HPC, TBP recruitment at the hu $\beta$ -promoter is significantly lower than in wild type cells (Supplementary Fig. 5.4). Altogether, these results suggest that EKLF, either directly or through p45, contributes to hu $\beta$ -gene potentiation also by modulating the developmental-specific recruitment of TBP at the hu $\beta$ -promoter in HPC.

ln2 HPC were then subjected to ChIP analyses with an antibody that binds Pol II in a phosphorylation-independent manner. Pol II is detected at HS2, but not at the hu $\beta$ -, hu $\gamma$ - (Fig. 5.3G, H) or  $\beta$ maj- (Supplementary Fig. 5.5) promoters, suggesting that HS2-bound Pol II is not efficiently transferred to globin promoters in ln2 HPC or ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC. However, Pol II is cross-linked at hu $\gamma$ -promoters in CD34<sup>+</sup> cells (see Discussion). Thus, the

presence of TBP but not Pol II suggests that the PIC is partially assembled at the  $\text{hu}\beta$ -promoter and contributes to globin gene potentiation in HPC.

### 5.3.5 Basal levels of globin gene expression in HPC

Globins are expressed at basal levels in multipotent progenitors (Fig. 5.1A) (Hu *et al*, 1997; Bottardi *et al*, 2003). EKLF is essential for  $\text{hu}\beta$ -gene expression in EryC, but it is not known whether EKLF is also important for basal levels of globin gene expression in HPC. By quantitative real-time RT-PCR (Fig. 5.4) we show that  $\text{hu}\beta$ -gene expression is 10-fold lower and  $\text{hu}\gamma$ -gene expression is 4-fold higher in  $\text{ln}2$  EKLF<sup>-/-</sup> HPC than in  $\text{ln}2$  HPC. Thus, fetal liver-derived HPC express  $\text{hu}\beta$ - and  $\text{hu}\gamma$ -globin genes and the absence of EKLF favors  $\text{hu}\gamma$ - to the detriment of  $\text{hu}\beta$ -gene basal levels of expression.



**Figure 5.4: Quantitative real-time RT-PCR of  $\text{ln}2$  HPC and  $\text{ln}2$  EKLF<sup>-/-</sup> HPC.**

Representative examples of  $\text{hu}\gamma$ - and  $\text{hu}\beta$ -gene expression evaluated by real-time RT-PCR. The relative levels of globin gene expression in  $\text{ln}2$  EKLF<sup>-/-</sup> HPC vs.  $\text{ln}2$  HPC were calculated according to Pfaffl (Pfaffl, 2001), using

mouse actin as internal control (as described in Fig. 5.1) and expressed as KO/WT ratios. Blue dots: ln2 HPC; green triangles: ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC.

### 5.3.6 Chromatin organization at the hu $\beta$ -globin locus in EryC

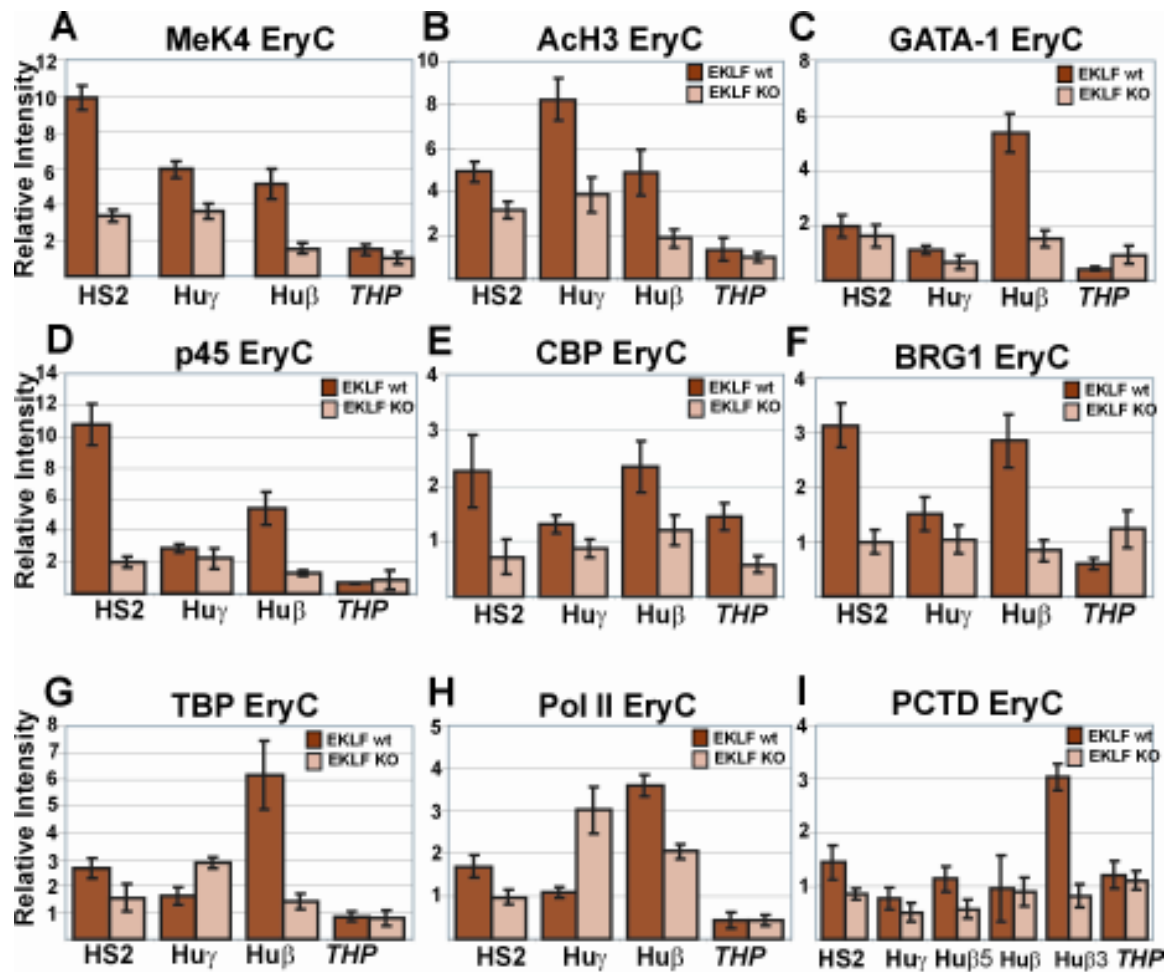
EKLF is required for enucleation and final erythrocyte formation during *in vitro* culture of definitive erythrocytes, whereas EKLF is dispensable for the first steps of erythroid cell differentiation (Table 5.1; Drissen *et al*, 2005). Wright-Giemsa staining of ln2 EKLF wild type or ln2 EKLF KO 13.5 d.p.c. fetal livers revealed that, as expected (Perkins *et al*, 1995), late erythroblasts and enucleated red cells are less represented in 13.5 d.p.c. EKLF KO than wild type fetal liver. However, only minor variations in the ratio of erythroid vs. nonerythroid cells and in the percentage of primitive erythroid cells are observed among the two backgrounds (Supplementary Fig. 5.6). In view of the above, ln2 EKLF wild type (ln2 EryC) as well as ln2 EKLF KO (ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC) 13.5 d.p.c. fetal livers were used for ChIP analyses. First, compared with ln2 EryC, H3 lysine 4 (K4) dimethylation and H3 acetylation levels in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC (Fig. 5.5A, B), though still considerable (except for K4 dimethylation at hu $\beta$ -promoter), are lower at HS2, hu $\gamma$ - and hu $\beta$ -promoters. GATA-1 and p45 are cross-linked to HS2 and hu $\beta$ -promoter in ln2 EryC (Fig. 5.5C, D). However, in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC, GATA-1 recruitment at the hu $\beta$ -promoter (Fig. 5.5C) and p45 recruitment at HS2 and hu $\beta$ -promoter (Fig. 5.5D) are reduced. Likewise, in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC CBP, BRG1, TBP, and Pol II recruitment are affected at HS2 and hu $\beta$ -promoter (Fig. 5.5E-H). Pol II binding is also reduced at the  $\beta$ maj promoter in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC (Supplementary Fig. 5.5). Interestingly, in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC, TBP (Fig. 5.5G) and Pol II (Fig. 5.5H) binding to hu $\gamma$ -promoters is greater than in ln2 EryC. These results are in agreement with previous observations indicating that  $\gamma$ -genes are expressed at higher levels in EKLF KO than EKLF wild type 13.5 d.p.c. fetal livers (Perkins *et al*, 1996; Wijgerde *et al*, 1996). To ascertain the significance ( $P < 0.05$ ) of the variations in histone acetylation as well as p45, CBP, BRG1, and TBP recruitment in ln2 EryC vs. ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC, other regions were analyzed (Supplementary Fig. 5.7 A-D). Since no significant differences are



observed at any of the additional regions analyzed, it is likely that the EKLF effect at the  $\beta$ -globin locus is not related to a global defect in transcriptional activation. Thus, the defect in hu $\beta$ -gene expression documented in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC is most likely due to abnormal recruitment of chromatin proteins and histone modifying/chromatin remodeling activities, transcriptional activators, TBP, and Pol II at the  $\beta$ LCR, and in particular at the hu $\beta$ -globin promoter.

### 5.3.7 Pol II phosphorylation and transcriptional elongation

In the absence of EKLF, transgenic mice carrying the hu $\beta$ -globin locus do not express mouse or human adult globin genes in EryC (Perkins *et al*, 1996; Wijgerde *et al*, 1996). Nonetheless, we detect Pol II at the hu $\beta$ -promoter in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC (Fig. 5.5H). To elucidate this conflicting result, ln2 EryC or ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC were subjected to ChIP analyses with an antibody that recognizes phospho-Ser2 at the C-terminal domain (CTD) of Pol II (PCTD). It is known that the overall phosphorylation level of Pol II increases during transcriptional elongation. In fact, during promoter clearance and elongation, Pol II CTD is phosphorylated and this post-translational modification renders Pol II a transcription- and elongation-competent enzyme. As shown in Fig. 5.5I, PCTD detection at the 3' end of the hu $\beta$ -gene (Hu $\beta$ 3) is significantly lower in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC than in ln2 EryC. This result suggests that in EKLF<sup>-/-</sup> EryC, Pol II is not efficiently phosphorylated on Ser2 and is stalled at the hu $\beta$ -promoter.



**Figure 5.5: Chromatin organization at the hu $\beta$ -globin locus in EryC.**

(A-H) ChIP analyses of In2 EryC (dark orange bars) or In2 EKLf<sup>-/-</sup> EryC (light orange bars). Analysis and quantification of immunoprecipitated samples, as well as antibodies used for ChIP assays are as described in Fig. 5.2 and 5.3; MeK4: anti-lysine 4 dimethylated histone H3 antibodies; PCTD: anti-phospho-Ser2 Pol II CTD antibodies.

## 5.4 Discussion

### 5.4.1 Transcriptional activators involved in globin gene potentiation in HPC

Previous studies have shed light on the importance of EKLF during ontogeny (Xue *et al*, 2004), and for adult  $\beta$ -genes expression in EryC (Nuez *et al*, 1995; Perkins *et al*, 1995; Wijgerde *et al*, 1996). EKLF is not essential for early hematopoietic differentiation. However, observations here and elsewhere that EKLF is promiscuously expressed in multipotent HPC and progenitor cell lines (Hu *et al*, 1997; Fig. 5.1) prompted us to explore whether EKLF is required for hu $\beta$ -gene potentiation in HPC. In EryC, EKLF and BRG1 participate in the remodeling complex E-RC1 (Armstrong *et al*, 1998). Interestingly, EKLF–BRG1 interaction appears to be crucial since the *Brg1* hypomorphic mutant mice exhibit abnormal definitive erythroid cell differentiation, which very much resembles to the phenotype observed in EKLF KO mice (Bultman *et al*, 2005). Since BRG1 recruitment to the hu $\beta$ -promoter in HPC is EKLF-dependent, we postulate that the influence of EKLF on hu $\beta$ -gene potentiation is linked to chromatin remodeling. Chromatin remodeling activity increases hu $\beta$ -promoter accessibility for transcriptional activators as exemplified by the situation for p45, whose binding to the hu $\beta$ -promoter depends upon EKLF.

We previously identified histone H3 hyperacetylation as a hallmark of developmental-specific potentiation of the hu $\beta$ -globin gene in HPC (Bottardi *et al*, 2003; Bottardi *et al*, 2005). We now provide strong evidence that in transgenic and human HPC, histone acetylation at HS2 and hu $\beta$ -promoter correlates with CBP recruitment, which is likely to be facilitated by transcriptional activators. CBP detection at the hu $\beta$ -promoter is impaired in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC and in ln2 p45<sup>-/-</sup> HPC. Since EKLF affects p45 recruitment in HPC, we propose that the influence of EKLF on CBP recruitment at hu $\beta$ -promoter is mediated by p45. Indeed, even if EKLF can interact with p300 and CBP, it would not be able to directly recruit CBP to the locus (Zhang and Bieker, 1998). However, in EryC p45-CBP interaction

(Hung *et al*, 2001) favors histone acetylation at the  $\beta$ maj promoter (Johnson *et al*, 2001), suggesting that p45 can interact with CBP while bound to the locus.

p45 interactions with CBP (Hung *et al*, 2001) and TF<sub>II</sub>130 (Amrolia *et al*, 1997) favor PIC assembly and  $\beta$ -globin gene expression in MEL cells (Johnson *et al*, 2001; Sawado *et al*, 2001). We demonstrate that TBP recruitment at hu $\beta$ -promoter is markedly affected in p45<sup>-/-</sup> HPC. Additionally, disruption of globin gene potentiation in ln2 p45<sup>-/-</sup> HPC is associated with a significant decrease in hu $\beta$ -gene expression in ln2 p45<sup>-/-</sup> EryC, which is, on average, 3-fold lower than in ln2 EryC (Supplementary Fig. 5.8). The influence of p45 on hu $\beta$ -gene expression is particularly intriguing because adult mouse  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin gene expression are not significantly modified in p45 KO mice (Shivdasani and Orkin, 1995; Supplementary Fig. 5.8). The different consequences of p45 KO on the regulation of adult mouse and human  $\beta$ -globin gene may be explained by: (i) variations in the epigenetic regulation of the two  $\beta$ -globin loci during hematopoiesis (Bottardi *et al*, 2003) and; (ii) the fact that in human and transgenic ln2 EryC the hu $\beta$ -globin locus appears to reside in a chromosomal environment more restrictive for transcription compared with its murine counterpart (Forrester *et al*, 1990; Milot *et al*, 1996; Epner *et al*, 1998). Thus, we suggest that p45 is important for hu $\beta$ -gene potentiation and, since p45 is also detected at HS2 and hu $\gamma$ -promoters, possibly also for locus activation in HPC.

MafK can dimerize with different partners (Blank and Andrews, 1997). For instance, p45 is replaced by Bach1 to form a repressive Bach1/MafK complex in erythroid precursors (Brand *et al*, 2004), where p45 expression is mostly abolished (Anguita *et al*, 2004). In ln2 p45<sup>-/-</sup> HPC CBP recruitment and histone acetylation at hu $\beta$ -promoter are impaired. Thus, MafK partners (if any) that replace p45 in these cells do not promote CBP recruitment and subsequent histone acetylation at the hu $\beta$ -promoter.

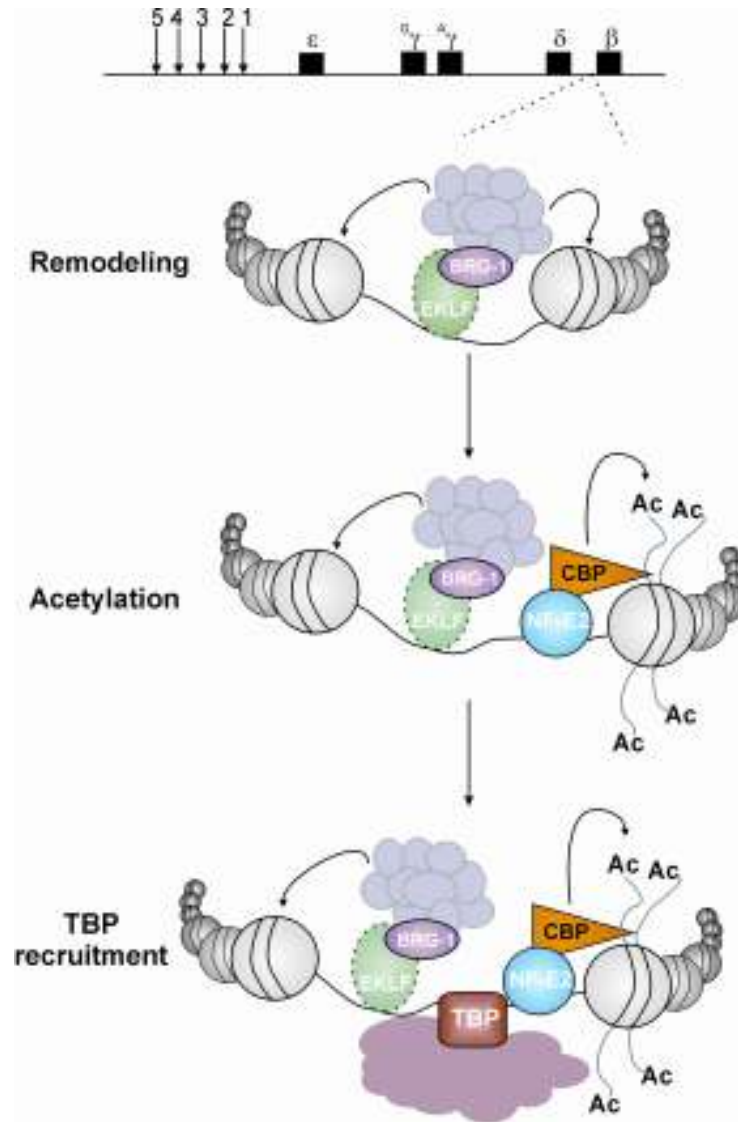
GATA-1 and GATA-2 are expressed in HPC, but neither could be detected by ChIP at either HS2 or hu $\beta$ -promoter in ln2 HPC (Fig. 5.2C and data not shown). Thus, it appears

that the aforementioned factors do not bind to these regions in HPC. However, in HPC, GATA-1 and/or GATA-2 could bind to other regions along the locus or be components of multiprotein complexes (Anguita *et al*, 2004; Rodriguez *et al*, 2005), which might impede their immunoprecipitation by ChIP.

Although the absence of EKLF severely impairs p45, CBP, and BRG1 recruitment to the hu $\beta$ -promoter in HPC, chromatin organization and transcriptional activator recruitment are also affected at the  $\beta$ LCR HS2, which was chosen because of its role in chromatin activation and hu $\beta$ -gene potentiation in HPC (Bottardi *et al*, 2005). In EryC, HS2 requires the presence of EKLF to participate in the active chromatin hub (Drissen *et al*, 2004). However, in EKLF KO EryC, DNase I sensitivity is specifically affected at HS3 (Wijgerde *et al*, 1996). Therefore, we also evaluated the influence of EKLF at HS3 and observed that in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC and ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC BRG1 recruitment is affected at HS3 as well (data not shown). Thus, EKLF action at HS2 might be either direct or indirect and requires the contribution of HS3, particularly in EryC, where HS2 and HS3 have been found to functionally interact.

It has been observed that general transcription factors can bind the mouse  $\lambda 5$  locus in embryonic stem cells and that the recruitment of specific transcription factors occurs in B cells-restricted progenitors (Szutorisz *et al*, 2005). Here, we show that lineage-specific transcriptional activators are recruited at the hu $\beta$ -globin locus in multipotent HPC and they participate in the locus potentiation. Altogether, our results indicate that: (i) EKLF is critical for the recruitment of p45, CBP, and BRG1 at the hu $\beta$ -promoter in HPC; and (ii) these transcriptional activators contribute to locus chromatin activation and hu $\beta$ -gene potentiation in HPC. Based on this we propose a model (Fig. 5.6) where basal-level expression of erythroid-specific transcriptional activators *e.g.*, EKLF and p45, either sequentially or simultaneously, allow appropriate hu $\beta$ -gene potentiation in freshly isolated human and transgenic HPC. Reminiscent of what has been found in other systems with distinct transcriptional activators (Agalioti *et al*, 2002; de la Serna *et al*, 2005), EKLF, p45

(NF-E2), and TBP could cooperate to induce or stabilize a potent chromatin necessary for the recruitment of additional transcriptional activators during differentiation and to support hu $\beta$ -gene expression in EryC.



**Figure 5.6 Model of hu $\beta$ -globin gene potentiation in In2 HPC.**

Schematic representation of hu $\beta$ -gene potentiation in multipotent In2 HPC (see Discussion for more details). Nucleosomes are represented by beads and transcriptional activators are indicated as colored objects.

#### 5.4.2 TBP and Pol II association to the hu $\beta$ -globin locus in HPC

We demonstrate for the first time, that the absence of EKLF in HPC affects basal levels of hu $\beta$ -gene expression and, to some extent, benefits hu $\gamma$ - over hu $\beta$ -gene expression. This is also supported by the preferential recruitment of TBP at hu $\beta$ -promoter in ln2 HPC, and at hu $\gamma$ -promoters in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC. Hu $\beta$ - and hu $\gamma$ -promoters should not compete for  $\beta$ LCR interaction in hematopoietic progenitors (Palstra *et al*, 2003). However, EKLF might contribute to hu $\gamma$ -gene silencing in adult HPC. Indeed, EKLF can interact with Sin3A and histone deacetylase 1 (HDAC1) corepressors, and it can induce repression of a reporter gene in hu $\gamma$ -expressing cell lines (Chen and Bieker, 2004). A similar repression mechanism involving EKLF could take place in HPC.

Since Pol II is not detected at hu $\beta$ - or hu $\gamma$ -promoters in HPC, it is likely that basal levels of hu $\beta$ -gene expression result from a limiting number of Pol II molecules (difficult to detect by ChIP) engaged at the promoter at any given time, and also from stochastic Pol II-hu $\beta$ -promoter interactions. Indeed, only a subset of ln2 HPC express hu $\beta$ - or hu $\gamma$ -genes (Bottardi *et al*, 2003), a circumstance that might further affect ChIP sensitivity. We also demonstrate that Pol II is recruited at  $\beta$ LCR HS2 in multipotent HPC. This observation is reminiscent of what has been observed at the mouse globin  $\beta$ LCR in EryC and cell lines (Johnson *et al*, 2001). The fact that Pol II binding to  $\beta$ LCR HS2 in ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC is not significantly affected suggests that, as in the case of MEL cells (Johnson *et al*, 2003), Pol II-HS2 interaction occurs independently of histone acetylation/methylation patterns or transcriptional status.

Throughout this study, very similar observations were made in ln2 HPC vs. human CD34<sup>+</sup> cells. However, TBP and Pol II binding to hu $\gamma$ -promoters are respectively 3- and 4-fold higher in CD34<sup>+</sup> cells than in ln2 HPC. This discrepancy is likely due to the fact that CD34<sup>+</sup> cells were purified from apheresis samples of normal patients who underwent SCF and G-CSF treatment to increase CD34<sup>+</sup> cell mobilization. SCF can induce  $\gamma$ -globin

expression in adult human erythroblasts (Bhanu *et al*, 2005). Even though we did not detect a significant difference in *huy/huβ*-gene basal levels of expression between CD34<sup>+</sup> cells and ln2 HPC (data not shown), increased TBP and Pol II binding at *huy*-promoters in CD34<sup>+</sup> cells suggests that SCF might modify globin gene potentiation at early stages of hematopoiesis.

### 5.4.3 Chromatin organization of the *huβ*-globin locus in EryC

In 13.5 dpc fetal liver EryC, globin expression is linked to GATA-1, p45, CBP, BRG1, and TBP recruitment at the locus, and to efficient Pol II CTD phosphorylation at the 3' end of *huβ*-gene. Analyses of EKL<sup>F-/-</sup> EryC allowed us to highlight some of the molecular defects associated with EKL<sup>F-/-</sup> ablation. Specifically, H3 acetylation/methylation, GATA-1, p45, CBP, BRG1 and TBP recruitment at HS2 and *huβ*-promoter are significantly affected. These results support and extend previous studies (Wijgerde *et al*, 1996; Armstrong *et al*, 1998) by suggesting that in EryC EKL<sup>F</sup> influences chromatin organization at the *huβ*-promoter and, to a lesser extent, at the βLCR. In addition, the delayed switching from *huy*- to *huβ*-gene expression in the absence of EKL<sup>F</sup> (Perkins *et al*, 1996; Wijgerde *et al*, 1996) correlates well with increased TBP and Pol II binding to the *huy*-promoters in ln2 EKL<sup>F-/-</sup> EryC. However, the fact that in ln2 EKL<sup>F-/-</sup> EryC hyperphosphorylated Pol II is absent at the 3' end of the *huβ*-gene strongly suggests that transcriptional elongation is also impaired in these cells. Accordingly, it has been reported that EKL<sup>F</sup> is important for βLCR-βmaj promoter interactions (Drissen *et al*, 2004) which favor transcriptional elongation (Sawado *et al*, 2001).

In summary, we provide the first evidence that the lineage-associated transcriptional activators EKL<sup>F</sup> and p45, which are expressed at basal levels in multipotent progenitor cells, can be functional and involved in gene potentiation in multipotent HPC, *i.e.*, before transcriptional activation. Finally, based on the results presented here, we propose a model that recapitulates the significant “steps” in the chain of events required to activate



chromatin and to render the hu $\beta$ -globin gene and promoter permissive for transcriptional machinery assembly during hematopoiesis.

## 5.5 Materials and methods

### 5.5.1 Mouse transgenic lines

Homozygous  $ln2$  mice (Strouboulis *et al*, 1992) were bred with CD1 females and  $ln2^{+/-}$  13.5 dpc fetal livers were isolated. Otherwise,  $ln2^{+/+}:EKLF^{+/-}$  (Nuez *et al*, 1995) or  $ln2^{+/+}:p45^{+/-}$  (Shivdasani and Orkin, 1995) mice were crossed with  $EKLF^{+/-}$  or  $p45^{+/-}$  mice respectively and 13.5 dpc  $ln2^{+/-}:EKLF^{-/-}$  or  $ln2^{+/-}:p45^{-/-}$  fetal livers were isolated.

### 5.5.2 HPC purification and cell culture

Human  $CD34^{+}$  cells were purified as previously described (Bottardi *et al*, 2003). Five up to ten 13.5 dpc fetal livers were first incubated with rat anti-Ter119, -B220, and -Gr-1 antibodies (Ab) followed by anti-rat FITC-conjugated Ab. After a brief wash in PBS 5% heat inactivated rat serum, cells were stained with biotinylated anti-CD31 Ab followed by SAV-TC Ab. For *in vitro* clonal assays, HPC were plated onto MethoCult M3434 medium (StemCell Technology) and colony types were scored at day 3 and 14.

### 5.5.3 Chromatin immunoprecipitation and duplex PCR analyses

ChIP assays were carried out using at least  $3 \times 10^5$  HPC or  $10^6$   $CD34^{+}$  cells or EryC, as per manufacturer's instruction (Upstate Biotechnology) and chromatin was reduced in size by sonication in order to obtain fragments of 400-bp average size. Antibodies were raised against acetylated histone H4, H3 or dimethylated (K4) histone H3 (Upstate Biotechnology); TBP (SI-1), NF-E2 (C-19), GATA-1 (N6), Pol II (N-20), CBP (A-22), and BRG1 (H-88) (Santa Cruz); or Ser2 phosphorylated Pol II (H5) (Covance). For the latter, chromatin pre-clearing was carried out with anti-mouse IgM antibodies coupled to agarose

beads (Sigma). On average, 1/30 of each ChIP sample was used in quantitative duplex PCR, as previously described (Bottardi *et al*, 2003). Primer sequences are available on request.

#### **5.5.4 Reverse Transcriptase PCR and quantitative real-time PCR**

Total RNA was extracted by Trizol (Invitrogen), treated with DNaseI-RNase free (Invitrogen) and used for cDNA synthesis with oligo(dT)<sub>15</sub> primers and SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen). Semi-quantitative PCR was carried out with primers specific for murine SCL, GATA-1, p45, GATA-2, EKLF, GATA-3, C/EBP $\alpha$ , NPM, and fetal human ( $\gamma$ ) and mouse embryonic ( $\beta$ H1) globin transcripts (Epner *et al*, 1998) or adult human ( $\beta$  and  $\delta$ ) and mouse ( $\beta$ min and  $\beta$ maj) globin transcripts (Reik *et al*, 1998). Primer sequences are available on request.

Quantitative real-time RT-PCR analysis was carried out as in (Bottardi *et al*, 2005) with minor changes. Total RNA was treated with DNaseI-RNase free (Invitrogen) and used for cDNA synthesis with oligo(dT)<sub>15</sub> primers and SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR was performed with Qiagen QuantiTect probes specific for hu $\beta$ - or hu $\gamma$ -globin cDNA. Mouse actin, GATA-1, p45, EKLF, or  $\beta$ min/ $\beta$ maj globin cDNA were detected by Sybr Green (Bio-Rad). Primer sequences are available on request.

### **5.6 Acknowledgments and funding**

We thank E. Drobetsky, M. Trudel and W. de Laat for useful discussions and critical reading of the manuscript, G. D'Angelo and J. Hebert for Wright-Giemsa staining analysis, D.C. Roy for human apheresis samples, R.A. Shivdasani for kindly providing p45 knock-out mice and V. Bourgoïn and A. Orimoto for technical assistance. V.B. is supported by the CIHR. E.M is a scholar of the CIHR and this work was supported by a grant from the CIHR to E.M.

## 5.7 References

- Agalioti T, Chen G, Thanos D (2002) Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* **111**: 381-392
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**: 193-197
- Amrolia PJ, Ramamurthy L, Saluja D, Tanese N, Jane SM, Cunningham JM (1997) The activation domain of the enhancer binding protein p45NF-E2 interacts with TAFII130 and mediates long-range activation of the alpha- and beta-globin gene loci in an erythroid cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10051-10056
- Andrews NC, Erdjument-Bromage H, Davidson MB, Tempst P, Orkin SH (1993) Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* **362**: 722-728
- Anguita E, Hughes J, Heyworth C, Blobel GA, Wood WG, Higgs DR (2004) Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *Embo J* **23**: 2841-2852
- Armstrong JA, Bieker JJ, Emerson BM (1998) A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell* **95**: 93-104
- Bender MA, Bulger M, Close J, Groudine M (2000) Beta-globin gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous beta-globin locus in mice do not require the locus control region. *Mol Cell* **5**: 387-393
- Bhanu NV, Trice TA, Lee YT, Gantt NM, Oneal P, Schwartz JD, Noel P, Miller JL (2005) A sustained and pancellular reversal of gamma-globin gene silencing in adult human erythroid precursor cells. *Blood* **105**: 387-393

- Bieker JJ (2001) Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem* **276**: 34355-34358
- Blank V, Andrews NC (1997) The Maf transcription factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem Sci* **22**: 437-441
- Blobel GA, Nakajima T, Eckner R, Montminy M, Orkin SH (1998) CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 2061-2066
- Bonifer C (1999) Long-distance chromatin mechanisms controlling tissue-specific gene locus activation. *Gene* **238**: 277-289
- Bottardi S, Aumont A, Grosveld F, Milot E (2003) Developmental stage-specific epigenetic control of human beta-globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation. *Blood* **102**: 3989-3997
- Bottardi S, Bourgoin V, Pierre-Charles N, Milot E (2005) Onset and inheritance of abnormal epigenetic regulation in hematopoietic cells. *Hum Mol Genet* **14**: 493-502
- Brand M, Ranish JA, Kummer NT, Hamilton J, Igarashi K, Francastel C, Chi TH, Crabtree GR, Aebersold R, Groudine M (2004) Dynamic changes in transcription factor complexes during erythroid differentiation revealed by quantitative proteomics. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 73-80
- Bultman SJ, Gebuhr TC, Magnuson T (2005) A Brg1 mutation that uncouples ATPase activity from chromatin remodeling reveals an essential role for SWI/SNF-related complexes in beta-globin expression and erythroid development. *Genes Dev* **19**: 2849-2861
- Cantor AB, Orkin SH (2002) Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* **21**: 3368-3376

- Carter D, Chakalova L, Osborne CS, Dai YF, Fraser P (2002) Long-range chromatin regulatory interactions in vivo. *Nat Genet* **32**: 623-626
- Chen X, Bieker JJ (2004) Stage-specific repression by the EKLF transcriptional activator. *Mol Cell Biol* **24**: 10416-10424
- Daftari P, Gavva NR, Shen CK (1999) Distinction between AP1 and NF-E2 factor-binding at specific chromatin regions in mammalian cells. *Oncogene* **18**: 5482-5486
- de la Serna IL, Ohkawa Y, Berkes CA, Bergstrom DA, Dacwag CS, Tapscott SJ, Imbalzano AN (2005) MyoD targets chromatin remodeling complexes to the myogenin locus prior to forming a stable DNA-bound complex. *Mol Cell Biol* **25**: 3997-4009
- Drissen R, Palstra RJ, Gillemans N, Splinter E, Grosveld F, Philipsen S, de Laat W (2004) The active spatial organization of the beta-globin locus requires the transcription factor EKLF. *Genes Dev* **18**: 2485-2490
- Drissen R, von Lindern M, Kolbus A, Driegen S, Steinlein P, Beug H, Grosveld F, Philipsen S (2005) The erythroid phenotype of EKLF-null mice: defects in hemoglobin metabolism and membrane stability. *Mol Cell Biol* **25**: 5205-5214
- Epner E, Reik A, Cimborra D, Telling A, Bender MA, Fiering S, Enver T, Martin DI, Kennedy M, Keller G, Groudine M (1998) The beta-globin LCR is not necessary for an open chromatin structure or developmentally regulated transcription of the native mouse beta-globin locus. *Mol Cell* **2**: 447-455
- Feng D, Kan YW (2005) The binding of the ubiquitous transcription factor Sp1 at the locus control region represses the expression of beta-like globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9896-9900
- Forrester WC, Epner E, Driscoll MC, Enver T, Brice M, Papayannopoulou T, Groudine M (1990) A deletion of the human beta-globin locus activation region causes a major

alteration in chromatin structure and replication across the entire beta-globin locus. *Genes Dev* **4**: 1637-1649

Forsberg EC, Downs KM, Bresnick EH (2000) Direct interaction of NF-E2 with hypersensitive site 2 of the beta-globin locus control region in living cells. *Blood* **96**: 334-339

Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH (1996) Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12355-12358

Graf T (2002) Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* **99**: 3089-3101

Grosveld F, van Assendelft GB, Greaves DR, Kollias G (1987) Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell* **51**: 975-985

Hong W, Nakazawa M, Chen YY, Kori R, Vakoc CR, Rakowski C, Blobel GA (2005) FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *Embo J* **24**: 2367-2378

Hu M, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C, Enver T (1997) Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* **11**: 774-785

Hung HL, Kim AY, Hong W, Rakowski C, Blobel GA (2001) Stimulation of NF-E2 DNA binding by CREB-binding protein (CBP)-mediated acetylation. *J Biol Chem* **276**: 10715-10721

Jimenez G, Griffiths SD, Ford AM, Greaves MF, Enver T (1992) Activation of the beta-globin locus control region precedes commitment to the erythroid lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10618-10622

Johnson KD, Christensen HM, Zhao B, Bresnick EH (2001) Distinct mechanisms control RNA polymerase II recruitment to a tissue-specific locus control region and a downstream promoter. *Mol Cell* **8**: 465-471

Johnson KD, Grass JA, Park C, Im H, Choi K, Bresnick EH (2003) Highly restricted localization of RNA polymerase II within a locus control region of a tissue-specific chromatin domain. *Mol Cell Biol* **23**: 6484-6493

Kadam S, McAlpine GS, Phelan ML, Kingston RE, Jones KA, Emerson BM (2000) Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev* **14**: 2441-2451

Leach KM, Vieira KF, Kang SH, Aslanian A, Teichmann M, Roeder RG, Bungert J (2003) Characterization of the human beta-globin downstream promoter region. *Nucleic Acids Res* **31**: 1292-1301

Milot E, Strouboulis J, Trimborn T, Wijgerde M, de Boer E, Langeveld A, Tan-Un K, Vergeer W, Yannoutsos N, Grosveld F, Fraser P (1996) Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* **87**: 105-114

Morley BJ, Abbott CA, Sharpe JA, Lida J, Chan-Thomas PS, Wood WG (1992) A single beta-globin locus control region element (5' hypersensitive site 2) is sufficient for developmental regulation of human globin genes in transgenic mice. *Mol Cell Biol* **12**: 2057-2066

Nagl NG, Jr., Zweitzig DR, Thimmapaya B, Beck GR, Jr., Moran E (2006) The c-myc gene is a direct target of mammalian SWI/SNF-related complexes during differentiation-associated cell cycle arrest. *Cancer Res* **66**: 1289-1293

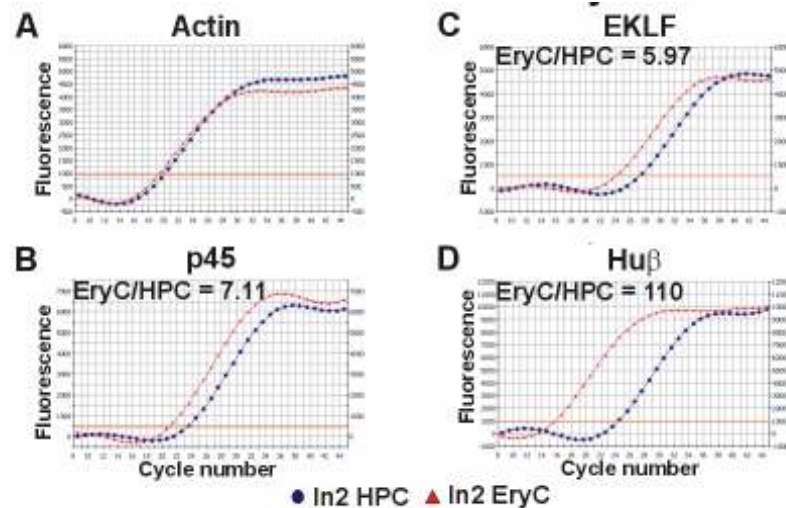
Nuez B, Michalovich D, Bygrave A, Ploemacher R, Grosveld F (1995) Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* **375**: 316-318

- Palstra RJ, Tolhuis B, Splinter E, Nijmeijer R, Grosveld F, de Laat W (2003) The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat Genet* **35**: 190-194
- Perkins AC, Gaensler KM, Orkin SH (1996) Silencing of human fetal globin expression is impaired in the absence of the adult beta-globin gene activator protein EKLF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12267-12271
- Perkins AC, Sharpe AH, Orkin SH (1995) Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* **375**: 318-322
- Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, Orkin SH, Costantini F (1991) Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* **349**: 257-260
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Reik A, Telling A, Zitnik G, Cimborra D, Epner E, Groudine M (1998) The locus control region is necessary for gene expression in the human beta-globin locus but not the maintenance of an open chromatin structure in erythroid cells. *Mol Cell Biol* **18**: 5992-6000
- Rodriguez P, Bonte E, Krijgsveld J, Kolodziej KE, Guyot B, Heck AJ, Vyas P, de Boer E, Grosveld F, Strouboulis J (2005) GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *Embo J* **24**: 2354-2366
- Sawado T, Igarashi K, Groudine M (2001) Activation of beta-major globin gene transcription is associated with recruitment of NF-E2 to the beta-globin LCR and gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10226-10231
- Shivdasani RA, Orkin SH (1995) Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8690-8694



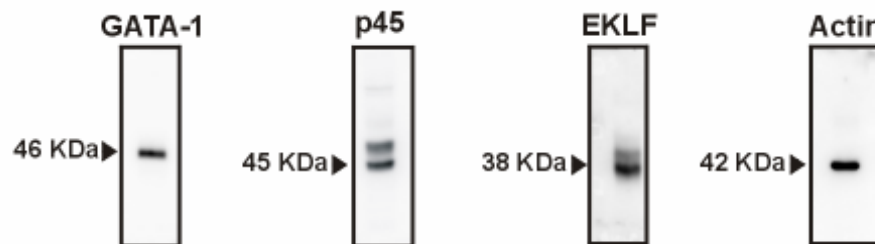
- Strouboulis J, Dillon N, Grosveld F (1992) Developmental regulation of a complete 70-kb human beta-globin locus in transgenic mice. *Genes Dev* **6**: 1857-1864
- Struhl K (2005) Transcriptional activation: mediator can act after preinitiation complex formation. *Mol Cell* **17**: 752-754
- Szutorisz H, Canzonetta C, Georgiou A, Chow CM, Tora L, Dillon N (2005) Formation of an active tissue-specific chromatin domain initiated by epigenetic marking at the embryonic stem cell stage. *Mol Cell Biol* **25**: 1804-1820
- Tolhuis B, Palstra RJ, Splinter E, Grosveld F, de Laat W (2002) Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell* **10**: 1453-1465
- Vakoc CR, Letting DL, Gheldof N, Sawado T, Bender MA, Groudine M, Weiss MJ, Dekker J, Blobel GA (2005) Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol Cell* **17**: 453-462
- Wijgerde M, Gribnau J, Trimborn T, Nuez B, Philipsen S, Grosveld F, Fraser P (1996) The role of EKLF in human beta-globin gene competition. *Genes Dev* **10**: 2894-2902
- Xue L, Chen X, Chang Y, Bieker JJ (2004) Regulatory elements of the EKLF gene that direct erythroid cell-specific expression during mammalian development. *Blood* **103**: 4078-4083
- Ye M, Iwasaki H, Laiosa CV, Stadtfeld M, Xie H, Heck S, Clausen B, Akashi K, Graf T (2003) Hematopoietic stem cells expressing the myeloid lysozyme gene retain long-term, multilineage repopulation potential. *Immunity* **19**: 689-699
- Zhang W, Bieker JJ (1998) Acetylation and modulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9855-9860

## 5.8 Supplementary data



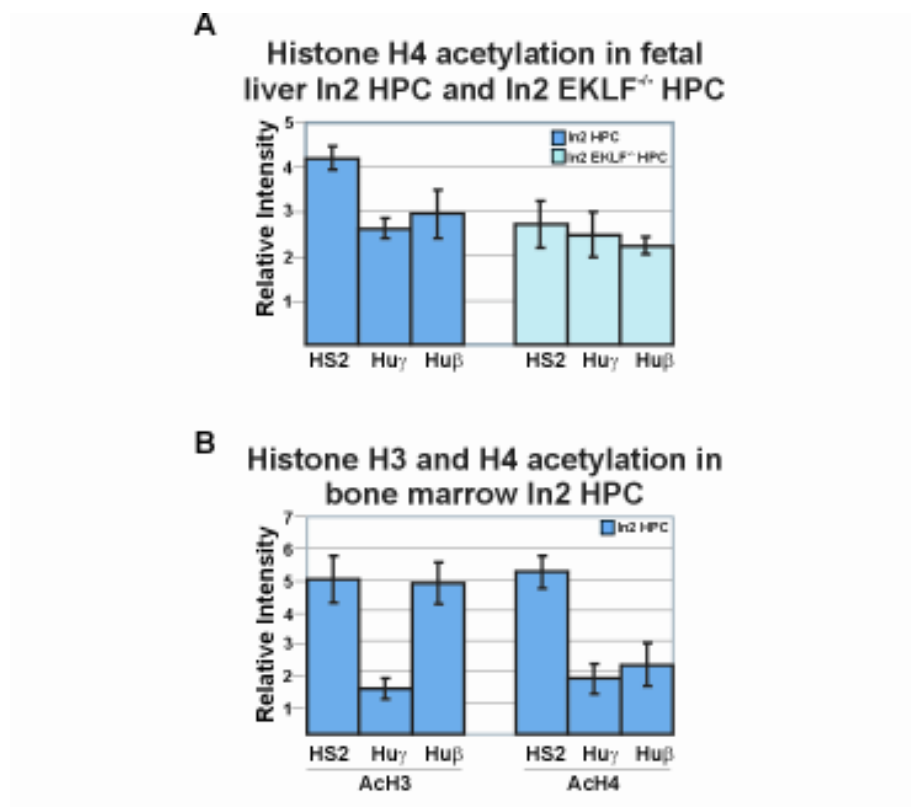
**Supplementary Figure 5.1A. p45, EKLF, and huβ-globin gene expression in In2 HPC and In EryC.**

(A-D) Representative examples of quantitative real-time RT-PCR carried out on In2 HPC (blue circles) and In2 ErC (red triangles). Gene expression levels in In2 EryC relative to In2 HPC were calculated according to Pfaffl (2001) using mouse actin (A) as internal control and expressed as EryC/HPC ratios. X axis: cycle number; y axis: derivative of SYBR Green (A, B, C) or TET (D) fluorescence.



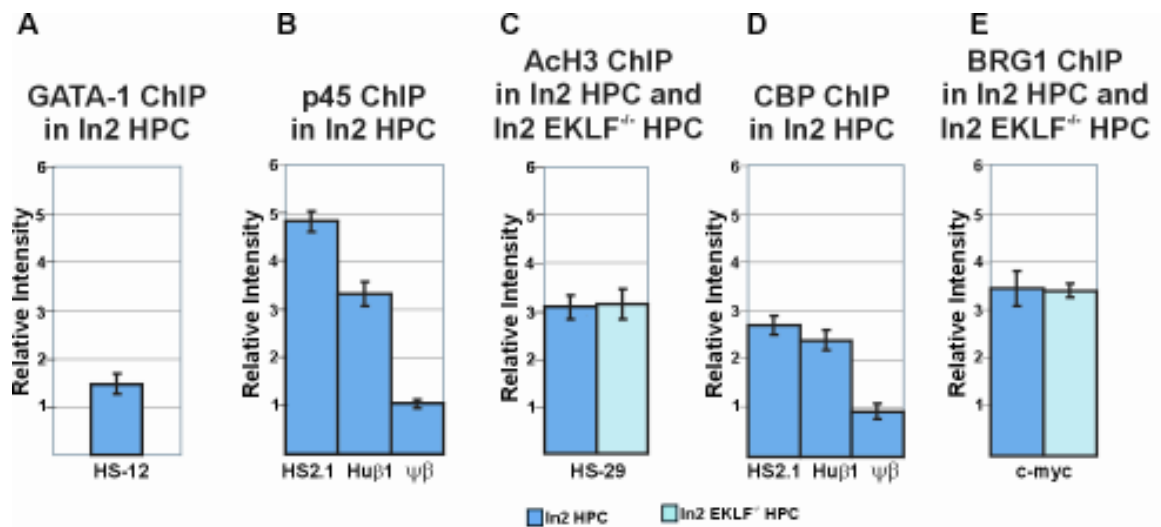
**Supplementary Figure 5.1B. Specificity of anti-GATA-1, -p45, -EKLF, and -actin antibodies evaluated by western blot analyses.**

Representative examples of western blot analyses of whole cell protein extracts from 13.5 dpc *ln2* wild type fetal livers. Anti-GATA-1 and -p45 antibodies were purchased from Santa Cruz; the anti-EKLF serum was a generous gift of S. Philipsen; and the anti-actin antibodies were purchased from Lab Vision. Proteins molecular weights (in KDa) are indicated on the left side of each panel. The detection of a protein doublet for p45 is due to an alternative usage of translational start site (Chan J.Y. et al. (1993) *PNAS* **90**: 11366-11370). Similarly, the presence of an additional EKLF band of higher molecular weight is very likely due to post-translational modification/s of the protein (Ouyang L. et al. (1998) *JBC* **273**: 23019-23025; Zhang W. (1998) *PNAS* **95**:9855-9860).



**Supplementary Figure 5.2. Histone acetylation in *ln2* and *ln2* EKLF<sup>-/-</sup> HPC.** Chip assays of *ln2* HPC or *ln2* EKLF<sup>-/-</sup> HPC were carried out with anti-acetylated histone H3 (AcH3) or H4 (AcH4) antibodies. Immunoprecipitated

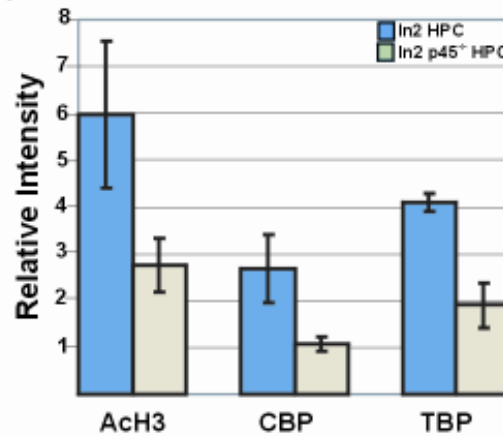
and unbound (input) chromatin samples were subjected to duplex PCR analysis with one primer set specific for hu $\beta$ -globin regions and another primer set specific for mouse ZFP. All PCR reactions were performed in parallel under conditions of linear amplification. Products were quantified by PhosphorImager. The level of enrichment of globin regions relative to the control and input samples is represented by bars with their corresponding Standard Deviations. A value of 1 indicates no enrichment. Dark blue bars: ln2 HPC; light blue bars: ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC.



### Supplementary Figure 5.3. ChIP assays in ln2 HPC and ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC.

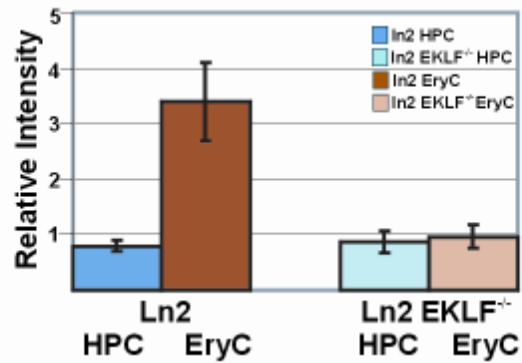
ChIP assays of ln2 HPC or ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC were carried out with anti-GATA-1, -p45, -acetylated histone H3 (AcH3), -CBP, or -BRG1 antibodies. Immunoprecipitated and unbound (input) chromatin samples were subjected to duplex PCR analysis with one primer set specific for hu $\beta$ -globin (HS2.1, hu $\beta$ 1,  $\psi\beta$ ), mouse  $\alpha$ -globin (HS-12, HS-29), or mouse c-myc promoter and another primer set specific for mouse ZFP. HS2.1 and hu $\beta$ 1 are two additional amplicons covering LCR HS2 and hu $\beta$ -promoter regions. All PCR reactions were performed in parallel under conditions of linear amplification. Products

were quantified by PhosphorImager. The level of enrichment of globin and c-myc regions relative to the control and input samples is represented by bars with their corresponding Standard Deviations. A value of 1 indicates no enrichment. Dark blue bars: ln2 HPC; light blue bars: ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC.



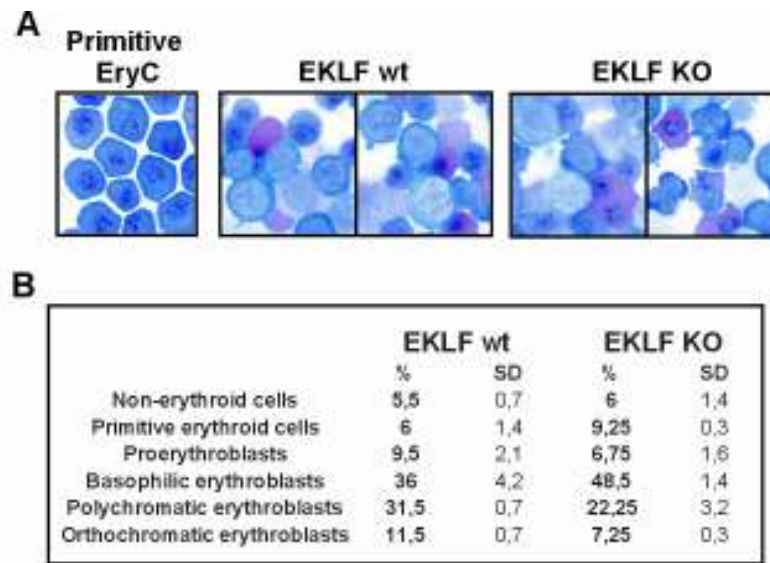
**Supplementary Figure 5.4. Histone H3 acetylation, CBP and TBP recruitment at the hu $\beta$ -promoter in ln2 HPC and ln2 p45<sup>-/-</sup> HPC.**

ChIP assays of ln2 HPC or ln2 p45<sup>-/-</sup> HPC were carried out with anti-acetylated histone H3 (AcH3), -CBP or -TBP antibodies. Immunoprecipitated and unbound (input) chromatin samples were subjected to duplex PCR analysis with one primer set specific for hu $\beta$ -promoter and another primer set specific for mouse ZFP. All PCR reactions were performed in parallel under conditions of linear amplification. Products were quantified by PhosphorImager. The level of enrichment of hu $\beta$ -promoter relative to the control and input samples is represented by bars with their corresponding Standard Deviations. A value of 1 indicates no enrichment. Dark blue bars: ln2 HPC; light green bars: ln2 p45<sup>-/-</sup> HPC.



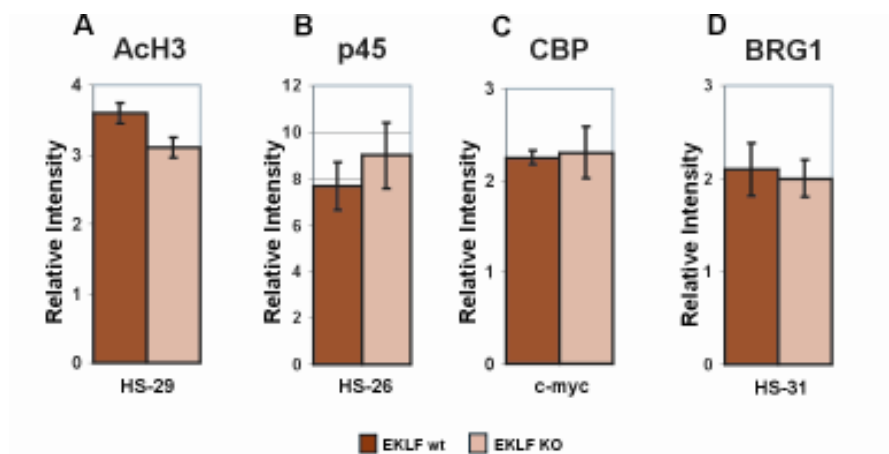
**Supplementary Figure 5.5. Pol II recruitment at  $\beta_{maj}$  promoter in Ln2 and Ln2 EKLF<sup>-/-</sup> cells.**

ChIP assays of Ln2 HPC, Ln2 EryC, Ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC or Ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC were carried out with an antibody specific for the N-terminal region of the large subunit of Pol II. Immunoprecipitated and unbound (input) chromatin samples were subjected to duplex PCR analysis with one primer set specific for mouse  $\beta_{maj}$  promoter and another primer set specific for mouse ZFP. All PCR reactions were performed in parallel under conditions of linear amplification. Products were quantified by PhosphorImager. The level of enrichment of  $\beta_{maj}$  relative to the control and input samples is represented by bars with their corresponding Standard Deviations. A value of 1 indicates no enrichment. Dark blue bars: Ln2 HPC; light blue bars: Ln2 EKLF<sup>-/-</sup> HPC; dark orange bars: Ln2 EryC; light orange bars: Ln2 EKLF<sup>-/-</sup> EryC.



**Supplementary Figure 5.6. Morphological analysis of 13.5 dpc mouse fetal livers.**

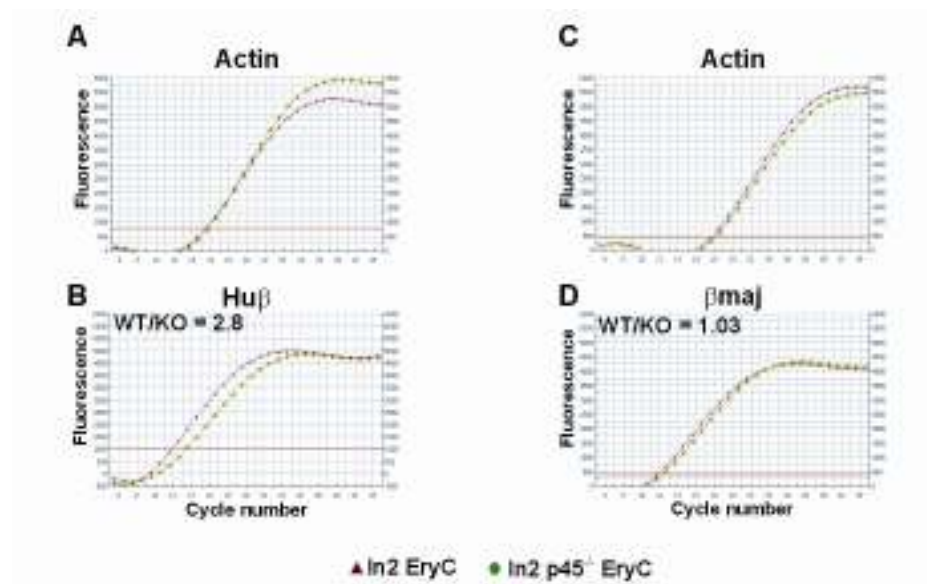
(A) Wright-Geimsa staining of EKLf wild type 9.5 dpc yolk sac and EKLf wild type (middle panel) of EKLf KO (right panel) 13.5 fetal livers; (B) Detailed counting of the different cellular element in the two genetic background of 13.5 fetal livers.



**Supplementary Figure 5.7. ChIP assays in In2 EryC and In2 EKLf<sup>-/-</sup> EryC.**

ChIP assays of In2 EryC or In2 EKLf<sup>-/-</sup> EryC were carried out with anti-acetylated histone H3 (AcH3), -CBP or -BRG1 antibodies. Immunoprecipitated

and unbound (input) chromatin samples were subjected to duplex PCR analysis with one primer set specific for the mouse  $\alpha$ -globin locus, or mouse c-myc promoter and another primer set specific for mouse ZFP. All PCR reactions were performed in parallel under conditions of linear amplification. Products were quantified by PhosphorImager. The level of enrichment of globin and c-myc regions relative to the control and input samples is represented by bars with their corresponding Standard Deviations. A value of 1 indicates no enrichment. Dark orange bars:  $\ln_2$  EryC; light orange bars:  $\ln_2$  EKLF<sup>-/-</sup> EryC.



**Supplementary Figure 5.8. Hu $\beta$ - and  $\beta$ maj-gene expression in  $\ln_2$  EryC and  $\ln_2$  p45<sup>-/-</sup> EryC.**

Representative examples of quantitative real-time RT-PCR carried out on  $\ln_2$  EryC (red triangles) and  $\ln_2$  p45<sup>-/-</sup> EryC (green circles). The relative levels of gene expression in  $\ln_2$  EryC relative to  $\ln_2$  p45<sup>-/-</sup> EryC were calculated according to Pfaffl (2001) using mouse actin (A, C) as internal control and expressed as  $\ln_2$  EryC/ $\ln_2$  p45<sup>-/-</sup> EryC ratios (WT/KO). X axis: cycle number; y axis: derivative of SYBR Green (A, B, D) or TET (B) fluorescence.



## **Chapitre 6 : Caractérisation du rôle des facteurs de transcription lors de la commutation des globines**

La commutation des globines lors du développement consiste en la répression du gène  $\gamma$  et l'activation du gène  $\beta$ . Ce phénomène a été grandement étudié puisque la compréhension des mécanismes permettant la répression des gènes  $\gamma$  permettra de comprendre la persistance de l'hémoglobine fœtale. Par contre, les mécanismes impliqués dans la répression des gènes  $\gamma$  sont encore mal connus. Pour l'objectif 3 (section 2.3.4), nous nous sommes particulièrement intéressés à la combinaison de facteurs et cofacteurs de transcription impliqués dans ce phénomène.

Ikaros est un facteur qui a été identifié comme un potentiel régulateur des gènes  $\gamma$ . Nous avons donc tenté de comprendre par quels mécanismes Ikaros pouvait réguler les gènes  $\gamma$  lors de la commutation des globines. Nous nous sommes particulièrement intéressés à ses différents partenaires afin de déterminer quelles activités enzymatiques dépendantes de Ikaros sont associées à la répression des gènes  $\gamma$ . Nos résultats montrent que Mi-2 ainsi que HDAC1 seraient impliqués dans la répression de  $\gamma$ . D'autre part, nous avons identifié un nouveau partenaire de Ikaros soit le facteur de transcription GATA-1. Cette interaction semble être importante pour la régulation des gènes du locus ainsi que pour la régulation d'autres gènes dans les cellules érythroïdes. Nos résultats suggèrent donc qu'il est important de caractériser l'importance de l'ensemble des facteurs régulant un gène et non seulement un facteur en particulier étant donné que les différents facteurs de transcription semblent s'influencer les uns les autres.

Les résultats de cette étude qui sont présentés dans le présent chapitre ont été publiés dans la revue *Molecular and Cellular Biology* en mars 2009. L'article a pour titre : « Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human  $\gamma$ -globin genes » et comporte 8 figures.

### **Article 3: Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human $\gamma$ -globin genes**

Bottardi, Stefania<sup>1,4</sup>, Ross, Julie<sup>1,4</sup>, Bourgoin, Vincent<sup>1</sup>, Fotouhi-Ardakani, Nasser<sup>1</sup>, Affar, El Bachir<sup>1</sup>, Trudel, Marie<sup>2</sup>, and Eric, Milot<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Maisonneuve Rosemont Hospital Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4; <sup>2</sup>Institut de Recherches Cliniques de Montreal and faculty of Medicine, University of Montreal, 110 ave. des Pins ouest, Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7; <sup>3</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montreal, C.P. Succursale Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3T 3J7

<sup>4</sup>These authors contributed equally to this work

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +1 5142523551; Fax: +1 5142523430

Running title: Ikaros-GATA-1 interaction and gene repression

Keywords: Chromatin; GATA-1; Globin switching; Human  $\beta$ -globin; Ikaros

Word count    Materials and Methods: 1801

Introduction, Results and Discussion: 5381

## 6.1 Abstract

During development and erythropoiesis, globin gene expression is finely modulated through an important network of transcription factors and chromatin modifying activities. In this report we provide *in vivo* evidence that endogenous Ikaros is recruited to the human  $\beta$ -globin locus and targets the histone deacetylase HDAC1 and the chromatin remodeling protein Mi-2 to the human  $\gamma$ -gene promoters, thereby contributing to  $\gamma$ -globin gene silencing at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin gene transcriptional switch. We show for the first time that Ikaros interacts with GATA-1 and enhances binding of the latter to different regulatory regions across the locus. Consistent with these results, we show that the combinatorial effect of Ikaros and GATA-1 impairs close proximity between the Locus Control Region and the human  $\gamma$ -globin genes. Since the absence of Ikaros also affects GATA-1 recruitment to GATA-2 promoter, we propose that the combinatorial effect of Ikaros and GATA-1 is not restricted to globin gene regulation.

## 6.2 Introduction

During hematopoiesis, lineage commitment and differentiation are coordinated by activation as well as repression, of specific genes. Gene regulation is highly dependent on the combinatorial effect of particular transcription factors, which contributes to the establishment of specific transcription factor networks (37, 45). Transcription factors are best known as transcriptional activators, but they can also be involved in gene repression. The variable influence of transcription factors can be explained mainly by their reciprocal interactions and capacity to recruit cofactors such as histone modifying and/or chromatin remodeling activities to gene regulatory regions. The occupancy of target gene promoters by specific combinations of transcription factors and cofactors has been shown to be critical for controlling the expression of several genes in a variety of experimental systems.

The human  $\beta$ - (hu $\beta$ -) globin locus, being the best defined mammalian multigenic locus, provides a useful model to explore the combinatorial effects of transcription factors on tissue- and developmental-specific gene expression. The hu $\beta$ -globin locus contains five developmentally regulated genes ( $\epsilon$ - $\gamma^G$ - $\gamma^A$ - $\gamma$ - $\delta$ - $\beta$ ). The locus control region ( $\beta$ LCR), which is located far upstream of the globin genes, provides high-level globin gene expression in erythroid cells. The  $\beta$ LCR is composed of five DNaseI hypersensitive sites (HSs), which are particularly rich in transcription factor binding sites (15, 24). In erythroid cells, the  $\beta$ LCR favors high-level transcription through close interaction with gene promoters and is a major determinant of locus chromatin conformation (6). Certain transcription factors and cofactors are critical for globin gene regulation and for locus organization. Among these, GATA-1 and its cofactor FOG-1 (Friend of GATA-1) (52), EKLF (9), and NLI/Lbd1 (46) are required for efficient long-range chromatin interactions between  $\beta$ LCR and  $\beta$ -like globin genes thereby promoting high-level globin gene expression. During human ontogeny, hu $\beta$ -like globin genes undergo two important developmental switches, *i.e.*, embryonic-to-fetal in early fetal life and fetal-to-adult ( $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching) just after birth (15). A number of transcription factors are known to play a critical role during  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching. For instance Ikaros, GATA-1, the orphan nuclear receptors TR2 and TR4 and NF-E3/COUP-TFII have been associated with hu $\gamma$ -gene silencing (16, 25, 26, 48, 50).

Ikaros is a hematopoietic transcription factor shown to physically interact with distinct histone-modifying and chromatin remodeling activities such as BRG1, Mi-2, and HDAC1 (11, 47). *In vitro* evidence suggests that Ikaros binds to several regions across the hu $\beta$ -globin locus and is the sequence-specific DNA binding factor of the PYR complex, which binds a pyrimidine stretch (Pyr region) located 1 Kb upstream of the hu $\delta$ -gene (26, 35, 36). *In vivo*, Ikaros is reported to significantly occupy  $\beta$ LCR HS3 (20). The Ikaros transcript is alternatively spliced to generate multiple isoforms (30). Ikaros-1 and Ikaros-2 are most abundantly expressed during development (10). Ikaros null mice ( $Ik^{null}$ ) are null for any Ikaros protein due to a deletion in the last exon, leading to protein instability (54). In  $Ik^{null}$

mice carrying a human mini-locus,  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching is delayed (26, 35), B and T lymphopoiesis and hematopoietic stem cell (HSC) activities are severely affected, and reduction in HSCs leads to decreased BFU-E and CFU-E activities (33). Fetal-to-adult globin switching is also delayed in Ikaros<sup>Plastic</sup> mice harboring a point mutation in the third zinc finger of Ikaros, which selectively disrupts DNA binding (20, 39). Although Ikaros<sup>Plastic</sup> homozygosity is embryonically lethal due to failure of normal erythroblast growth and differentiation (39), fetal erythropoiesis is reported to be unaffected in Ik<sup>null</sup> mice (54). Ikaros has been associated with gene activation mediated by SWI/SNF-like complexes, and it has also been shown to control a number of hematopoietic-specific genes. However, most of the Ikaros proteins in lymphoid cells are present in the repressive NuRD (NUcleosome Remodeling and histone Deacetylase) complex and a small amount is associated with the corepressors Sin3A, Sin3B, Sin3BSF, as well as CtBP, CtIP and Rb (10).

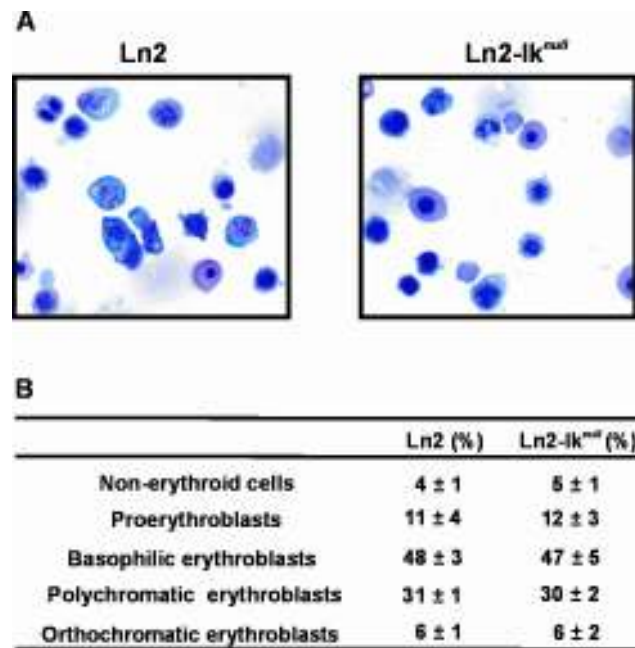
To define the molecular mechanisms of Ikaros-mediated  $\text{hu}\gamma$ -globin gene repression, we investigated Ikaros occupancy at  $\beta$ LCR HS2, HS3, and all the as  $\text{hu}\gamma$ - and  $\text{hu}\beta$ -promoters, which are critical *cis* regulatory regions controlling fetal and adult globin gene expression. Using fetal liver erythroid cells isolated from transgenic mice carrying the whole  $\text{hu}\beta$ -globin locus, we demonstrate *in vivo* that binding of Ikaros to several regions across the  $\text{hu}\beta$ -globin locus modulates the recruitment of distinct cofactors to  $\beta$ LCR and globin gene promoters. In particular, our data strongly suggest that the contribution of Ikaros to  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching (26) is mediated by Ikaros-dependent recruitment of Mi-2 and HDAC1 to  $\text{hu}\gamma$ -promoters, and by reduced efficacy of long-range chromatin interactions between  $\beta$ LCR and  $\text{hu}\gamma$ -promoters. Additionally, we provide novel evidence that Ikaros interacts with GATA-1, a transcription factor essential for erythroid and megakaryocytic development (4), thereby modifying GATA-1 recruitment to HS3,  $\text{hu}\gamma$ -promoters, and Pyr region. Our results elucidate the role of Ikaros in the global repressive mechanism leading to  $\text{hu}\gamma$ -globin gene silencing at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching, hence clarifying an important aspect of this tissue- and developmental-specific process. We also provide the

evidence that other hematopoietic-specific genes can be regulated by the combinatorial effect of Ikaros and GATA-1.

## 6.3 Results

### 6.3.1 Ikaros binds to the hu $\beta$ -globin locus in erythroid cells

It has been shown that Ik<sup>null</sup> adult mice display anemia due to increased destruction of red cells (26), while erythropoiesis is normal at the fetal stage of development (54). Since the Ik<sup>null</sup> background is extensively used in this study, we sought to confirm that the absence of Ikaros does not alter erythroid differentiation in fetal livers. For this purpose, line 2 (Ln2) fetal liver erythroid cells were compared with Ln2-Ik<sup>null</sup> cells. Ln2 transgenic mice carry a 70 Kb DNA fragment containing the entire hu $\beta$ -globin locus, express the human globin genes in a developmental-specific manner, undergo  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching around day 12 *postcoitum* (dpc) (49), and display normal erythroid cell differentiation (data not shown). Wright-Giemsa staining of Ln2 or Ln2-Ik<sup>null</sup> fetal livers revealed that on average 95% of fetal liver population is composed of erythroid cells and that Ln2-Ik<sup>null</sup> samples contain typical proportion of erythroid precursors with no evidence of abnormal red cell morphology (Fig. 6.1). These results, which are the average of three independent experiments, indicate that, as previously reported (54), absence of Ikaros does not preclude normal fetal erythroid cell differentiation and thus, is not expected to induce stress erythropoiesis at the fetal stage of hematopoietic differentiation.



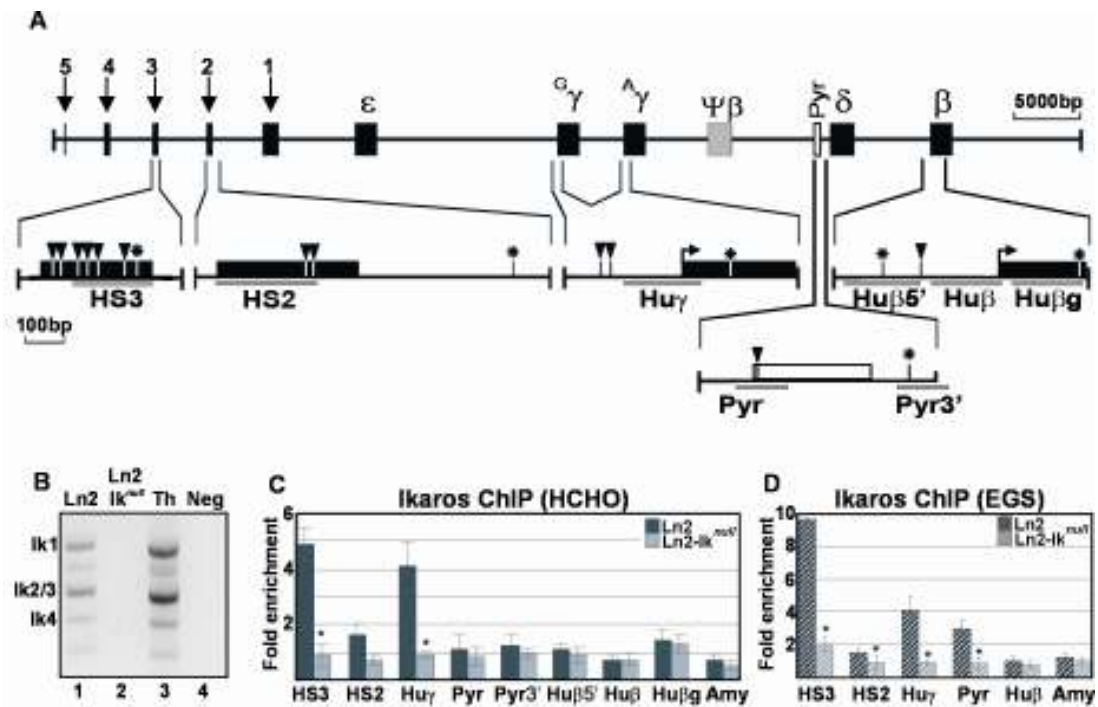
**Figure 6.1: Morphological analysis of Ln2 and Ln2-Ik<sup>null</sup> fetal livers.**

(A) Wright-Giemsa staining of Ln2 (left panel) or Ln2-Ik<sup>null</sup> (right panel) cells; (B) detailed counting of the different cellular elements in the two genetic backgrounds; the percentages represent the average from three independent experiments with corresponding standard errors of the mean.

Previous studies have shown that Ikaros binds the hu $\beta$ -globin locus *in vitro* and, when overexpressed in K562 erythroleukemia cells, which express hu $\gamma$ - but not hu $\beta$ -globin upon induction, Ikaros-1 binds to  $\beta$ LCR HS3 (20, 35). However, the physiological role of Ikaros and the molecular mechanisms modulated by Ikaros during globin switching remain to be defined. In order to better delineate the role of Ikaros, specifically during globin switching, we used 12.5 dpc fetal liver erythroid cells where hu $\gamma$ - and hu $\beta$ -globin are transcribed and Ikaros isoforms are expressed at physiological levels. Using the TGGGAA Ikaros DNA binding consensus sequence, which is also found at TCR- $\alpha$  and - $\beta$  enhancers and at CD4 promoter (30), we identified other potential Ikaros binding sites across the hu $\beta$ -globin locus (data not shown). To validate Ikaros consensus sequences at critical *cis* regulatory regions

implicated in  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching (Fig. 6.2A), we carried out chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays on 12.5 dpc fetal livers isolated from In2 transgenic mice. Endogenous Ikaros, expressed in fetal liver erythroid cells (Fig. 6.2B, lane 1), is efficiently recruited to HS3 and exon 1-intron 1 junction of  $\text{hu}\gamma$ -globin genes (hereafter  $\text{hu}\gamma$ -promoters), as revealed by qPCR on immunoprecipitated material. On the other hand, no significant binding could be detected at the Pyr region (Pyr),  $\text{hu}\beta$ -promoter ( $\text{Hu}\beta$ ), and amylase 2.1y (Amy) promoter used as negative control (Fig. 6.2C). To confirm the absence of relevant Ikaros occupancy at Pyr and  $\text{hu}\beta$ -globin regions, we tested three additional amplicons: a downstream Pyr region ( $\text{Pyr}3'$ ), a proximal  $\text{hu}\beta$ -promoter region ( $\text{Hu}\beta 5'$ ) and the  $\text{hu}\beta$ -gene exon2 ( $\text{Hu}\beta\text{g}$ ). As shown in Fig. 6.2C, the absence of significant binding at these adjacent regions confirms that Ikaros is not recruited to the Pyr region and to the  $\text{hu}\beta$ -promoter *in vivo*. However, since *in vitro* Ikaros binds the Pyr region (35), and Ikaros either directly binds DNA or acts as a cofactor (10), we carried out ChIP analysis using EGS (ethylene glycolbis[succinimidyl succinate]) in combination with formaldehyde (HCHO) as cross-linking agents. EGS is a chemical cross-linker having a longer spacer arm than HCHO (16.1 Å vs. 2 Å). Since EGS is a protein-protein cross-linker, it is useful for detection of proteins indirectly associated with DNA (57). Upon chromatin treatment with HCHO and EGS, Ikaros is detected at HS3,  $\text{hu}\gamma$ -promoters, and the Pyr region, whereas no significant binding is evident at  $\text{hu}\beta$ - and Amy-promoter (Fig. 6.2D). To control for specificity, ChIP assays with Ikaros antibodies were carried out on In2-Ik<sup>null</sup> 12.5 dpc fetal liver cells. As expected, Ikaros is not detected at the tested regions (Fig. 6.2C and D). These results suggest that in 12.5 dpc fetal liver erythroid cells, among the regions tested, Ikaros binds HS3 and  $\text{hu}\gamma$ -promoters, whereas it seems indirectly recruited to the Pyr region.



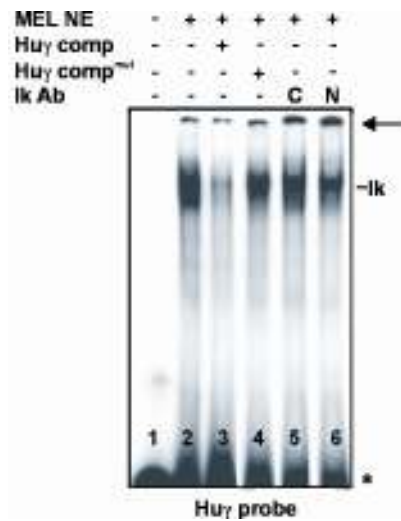


**Figure 6.2: Ikaros recruitment to the human  $\beta$ -globin locus in Ln2 and Ln2-Ik<sup>null</sup> 12.5 dpc fetal liver cells.**

(A) A map of the hu $\beta$ -globin locus; location of  $\beta$ LCR HSs is indicated by arrows; genes are shown as black boxes and Pyr region as a white box; black arrowheads: GATA-1 binding sites; asterisks: potential Ikaros binding sites according to the TGGGAA hexanucleotide consensus sequence; amplicons for ChIP analysis are represented by grey lines depicted underneath each genomic region; (B) RT-PCR performed on equal amounts of RNA purified from Ln2 (lane 1) or Ln2-Ik<sup>null</sup> (lane 2) 12.5 dpc fetal liver cells; Th: thymus control (lane 3); Neg: negative control (lane 4); Ikaros cDNA spliced variants are indicated on the left side of the panel; (C, D) Ikaros ChIP: immunoprecipitated and unbound (input) chromatin samples were used as templates in real-time PCR (qPCR) with primers specific for amylase 2.1y (Amy) promoter or the following hu $\beta$ -globin regions:  $\beta$ LCR HS3 and HS2; hu $\gamma$ -promoters (Hu $\gamma$ ); proximal (Pyr) and distal (Pyr3') Pyr region; proximal (Hu $\beta$ 5') and distal

(Hu $\beta$ ) hu $\beta$ -promoter region; and hu $\beta$ -gene region (Hu $\beta$ g). Quantification was carried out according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, using mouse kidney-specific Tamm-Horsfall protein (Thp) promoter as internal control, since this gene is not expressed in erythroid cells. Mouse Amy/Thp control is included to confirm that no enrichment is observed at regulatory regions of non-hematopoietic genes. Enrichment levels are represented by bars, with their corresponding standard deviations. A value of 1 indicates no enrichment; \*:  $p \leq 0.05$  by Student's *t* test; all data shown are the results of at least four independent ChIP experiments with qPCR reactions from each ChIP performed in triplicate and averaged (standard deviation); (C) formaldehyde (HCHO)-fixed cells; (D) ethylene glycolbis[succinimidyl succinate] (EGS)-fixed cells.

Ikaros direct interaction with the DNA at the hu $\gamma$ -promoters was confirmed by electrophoretic mobility shift assays (EMSA). A 45 bp oligonucleotide spanning the Ikaros consensus binding site at exon 1-intron 1 junction of hu $\gamma$ -globin genes (hu $\gamma$  probe) was end-labeled and incubated with 15  $\mu$ g of MEL nuclear extracts (NE). The hu $\gamma$  probe shows one clear gel mobility shift band (Ik), which is efficiently competed by cold hu $\gamma$  oligonucleotide (Hu $\gamma$  comp) but not by an oligonucleotide containing a mutated (TTGGAA instead of TGGGAA) Ikaros consensus binding site (Hu $\gamma$  comp<sup>mut</sup>) (Fig. 6.3). The presence of Ikaros in the retarded protein complex was confirmed by supershift assays with antibodies specific for the C- or N-terminal region of Ikaros protein. As expected, supershifts are seen with both antibodies (Fig. 6.3; lane 2 vs. 5 and 6), indicating that Ikaros can indeed directly bind its consensus site at the hu $\gamma$ -promoter region.



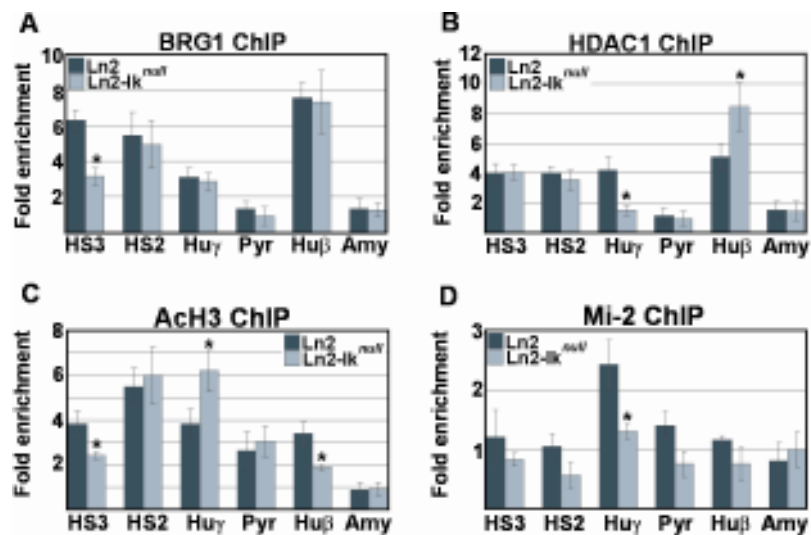
**Figure 6.3: Binding of Ikaros to exon1-intron 1 junction of hu $\gamma$ -globin genes.**

EMSA of exon1-intron 1 junction of hu $\gamma$ -globin genes (Hu $\gamma$  probe) was carried out with 15  $\mu$ g of nuclear extracts (NE) from MEL cells. Ikaros-specific retarded band (Ik) is competed out by 100-fold molar excess of cold double-stranded oligonucleotide (Hu $\gamma$  comp, lane 3) but not by an oligonucleotide containing a mutated (TTGGAA instead of TGGGAA) Ikaros consensus binding site (Hu $\gamma$  comp<sup>mut</sup>, lane 4). Supershift experiments were carried out with antibodies (Ik Ab) raised to the C (C, lane 5) and N (N, lane 6) termini of Ikaros protein. The antibody-shifted complexes are indicated by an arrow; an asterisk indicates free, labeled probe.

### 6.3.2 Ikaros modulates HDAC1, BRG1, and Mi-2 recruitment to specific regions of the hu $\beta$ -globin locus

Biochemical analyses in lymphoid and erythroid cells have demonstrated that Ikaros can interact with chromatin modifying and remodeling proteins, including BRG1, HDAC1, and Mi-2 (21, 35, 36, 47). Therefore, we investigated whether recruitment of these cofactors to the hu $\beta$ -globin locus in 12.5 dpc fetal liver cells is modulated by Ikaros. By ChIP assays, we observed that BRG1 is equally recruited to HS2, hu $\gamma$ -, and hu $\beta$ -promoter in ln2 and in

$\text{ln2-Ik}^{null}$  fetal liver cells (Fig. 6.4A). However, BRG1 is recruited less efficiently to HS3 in  $\text{ln2-Ik}^{null}$  than in  $\text{ln2}$  cells ( $p < 0.05$ ). HDAC1 is recruited more efficiently to  $\text{hu}\gamma$ -promoters and less efficiently to  $\text{hu}\beta$ -promoter in  $\text{ln2}$  than in  $\text{ln2-Ik}^{null}$  cells (Fig. 6.4B). The level of histone H3 acetylation (AcH3) is as predicted, consistent with HDAC1 distribution, since AcH3 level is lower at  $\text{hu}\gamma$ -promoters and higher at  $\text{hu}\beta$ -promoter in  $\text{ln2}$  than in  $\text{ln2-Ik}^{null}$  cells (Fig. 6.4C). Finally, Mi-2 is detected at  $\text{hu}\gamma$ -promoters in  $\text{ln2}$  but not in  $\text{ln2-Ik}^{null}$  cells (Fig. 6.4D). These results reveal that Ikaros binding to the  $\text{hu}\beta$ -globin locus is important for recruitment of chromatin modifying and remodeling activities to  $\beta\text{LCR}$  (BRG1),  $\text{hu}\gamma$ -, and  $\text{hu}\beta$ -promoter (HDAC1 and Mi-2). Thus, Ikaros is likely to contribute to local chromatin conformational changes occurring at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching.



**Figure 6.4: Recruitment of chromatin modifying and remodeling activities to the human  $\beta$ -globin locus in  $\text{ln2}$  and  $\text{ln2-Ik}^{null}$  12.5 dpc fetal liver cells.**

ChIP analysis of  $\text{ln2}$  (black bars) and  $\text{ln2-Ik}^{null}$  (grey bars) cells. Analysis and quantification of immunoprecipitated samples are as described in Fig. 6.2C, D; \*:  $p \leq 0.05$  by Student's  $t$  test; antibodies used are indicated on the top of each panel; AcH3: anti-acetylated (K9, K14) histone H3 antibodies. Black bars:  $\text{ln2}$  cells; grey bars:  $\text{ln2-Ik}^{null}$  cells.

### 6.3.3 Ikaros modulates GATA-1 binding at specific sites across the hu $\beta$ -globin locus

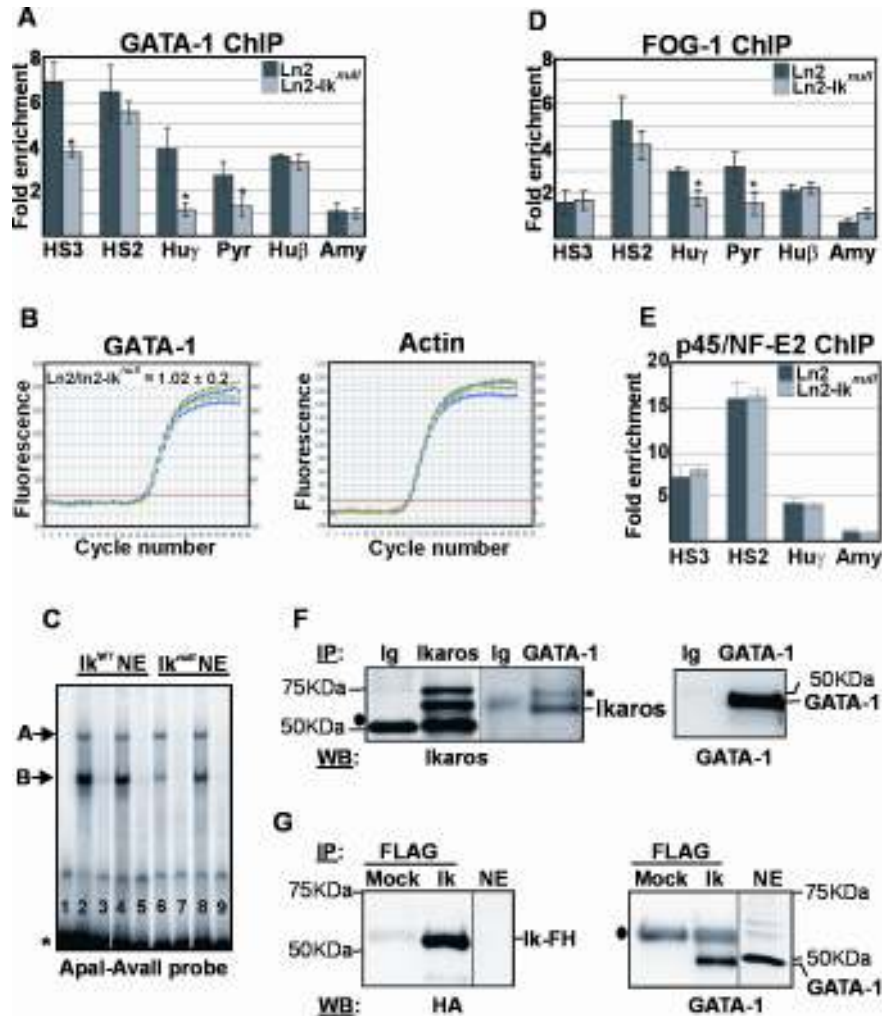
GATA-1 and Ikaros consensus binding sequences are found in close proximity at several regions across the hu $\beta$ -globin locus, including HS3, hu $\gamma$ -, hu $\beta$ -promoter, and Pyr region (Fig. 6.2A). To verify whether GATA-1 binding to these chromosomal regions can be influenced by Ikaros, we carried out ChIP assays with GATA-1 antibodies on ln2 and ln2-Ik<sup>null</sup> 12.5 dpc fetal liver cells. As expected, GATA-1 is detected at HS3, HS2, hu $\gamma$ -, hu $\beta$ -promoter, and Pyr region, but not at the Amy-promoter (Fig. 6.5A). Most interestingly, the absence of Ikaros, which by itself does not modify GATA-1 expression (Fig. 6.5B) (26), affects GATA-1 binding at HS3 and Pyr region and reduces to background level GATA-1 recruitment to hu $\gamma$ -promoters ( $p \leq 0.05$ ; Fig. 6.5A). GATA-1 binding at HS2 ( $p = 0.172$ ), and hu $\beta$ -promoter ( $p = 0.275$ ) does not significantly change between ln2 and ln2-Ik<sup>null</sup> cells (Fig. 6.5A). The influence of Ikaros on GATA-1 direct binding to DNA was further investigated by EMSA, using 5  $\mu$ g of ln2 or ln2-Ik<sup>null</sup> fetal liver NE and a labeled ApaI-AvaII DNA fragment of the hu $\gamma$ -promoter, which contains two GATA-1 binding motifs and one Oct-1 binding motif (ApaI-AvaII probe) (25). As previously reported (25) both Oct-1 (Fig. 6.5C, band A) as well as GATA-1 (Fig. 6.5C, band B) proteins can bind this DNA fragment. However, when equal amount of NE are used in EMSA, GATA-1 but not Oct-1 binding is affected in ln2-Ik<sup>null</sup> relative to ln2 samples (Fig. 6.5C, compare lanes 2 and 4 with lanes 6 and 8). Altogether, these results strongly suggest that Ikaros contributes to GATA-1 recruitment to hu $\gamma$ -promoters and contributes to GATA-1 recruitment and/or stability at HS3 and Pyr region at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching.

We then investigated whether Ikaros could influence the recruitment of FOG-1 (3) to the same genomic sites. ChIP analysis on 12.5 dpc fetal liver cells revealed that FOG-1 recruitment is slightly decreased at hu $\gamma$ -promoters and Pyr region in ln2-Ik<sup>null</sup> (vs. ln2) hence reflecting GATA-1 binding profile at these sites (Fig. 6.5A, D). These results imply that Ikaros contributes to efficient binding of GATA-1 and FOG-1 to hu $\gamma$ -promoters and

Pyr region and indicate that, as observed at the mouse locus (22), GATA-1 binding to HS3 is FOG-1-independent.

In order to investigate whether reduced GATA-1 binding in *ln2-Ik<sup>null</sup>* cells is specifically ascribed to lack of Ikaros or is merely a reflection of a more general alteration of cooperative transcription factor binding to DNA, we analyzed p45/NF-E2 occupancy at HS3, HS2, and *huy*-promoters. We observed that the absence of Ikaros does not alter p45/NF-E2 binding to any of these regions (Fig. 6.5E), further supporting the proposal that the effect of Ikaros on GATA-1 binding is specific. These results indicate that Ikaros modulates GATA-1 binding at precise regions across the *huβ*-globin locus, suggesting a possible interaction between these two proteins. This prompted us to investigate by protein immunoprecipitation (IP) whether Ikaros indeed binds to GATA-1 in *ln2* 12.5 dpc fetal liver erythroid cells. Proteins were immunoprecipitated with antibodies specific for GATA-1, Ikaros or isotype-matched immunoglobulin controls. Western blot (WB) membranes were probed with GATA-1 or Ikaros antibody. In three distinct IP experiments, Ikaros was immunoprecipitated by Ikaros and GATA-1 antibody but not by isotype-matched immunoglobulin (Fig. 6.5F). It is worth noting that another band of ~70 KDa is observed upon Ikaros or GATA-1 IPs and Ikaros WB detection (Fig. 6.5F, asterisk). This band is likely to correspond to Ikaros posttranslational modifications such as phosphorylation (12). The reciprocal IP (IP with Ikaros antibody and WB with GATA-1 antibody) did not allow the detection of any specific band (data not shown). To better characterize Ikaros-GATA-1 interaction, K562 cells were infected with the Moloney murine leukemia virus-based pOZ-FH-N vector, which contains a bicistronic transcriptional unit that allows expression of double epitope-tagged (FLAG and HA; FH) proteins from single transcripts. Notably, the expression levels of pOZ-FH-N epitope-tagged proteins are comparable to the endogenous ones (32). Epitope-tagged Ikaros can be detected by protein IP with anti-FLAG antibody, followed by WB detection with HA antibody (Fig. 6.5G). As expected, after IP of epitope-tagged Ikaros with anti-FLAG antibody, GATA-1 is readily detected by WB, indicating a physical interaction between GATA-1 and Ikaros (Fig. 6.5G). This result is consistent with

the ChIP data and supports the notion that the interaction between Ikaros and GATA-1 contributes to  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching.



**Figure 6.5: Ikaros-GATA-1 interaction.**

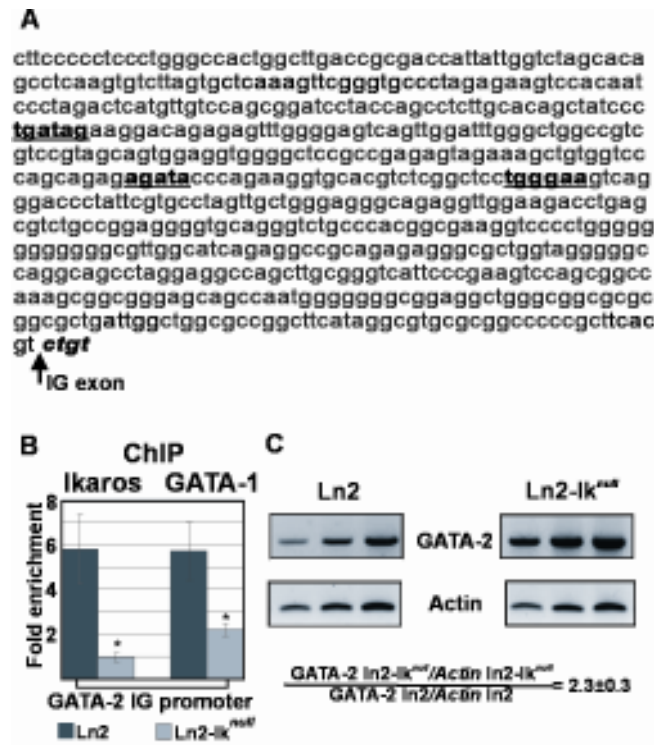
(A, D, E) ChIP analysis of Ln2 (black bars) and Ln2-Ik<sup>null</sup> (grey bars) cells. Analysis and quantification of chromatin immunoprecipitated samples are as described in Fig. 6.2C, D; \*:  $p \leq 0.05$  by Student's *t* test; (B) GATA-1 gene expression. Representative examples of qRT-PCR carried out on Ln2 (blue circles) and Ln2-Ik<sup>null</sup> (green squares) 12.5 dpc fetal liver cells. GATA-1 (left panel) expression levels in Ln2 relative to Ln2-Ik<sup>null</sup> cells were calculated

according to Pfaffl (42) (see also Materials and Methods) using mouse actin (right panel) as internal control and they are expressed as  $\ln 2 / \ln 2 - \text{Ik}^{\text{null}}$  ratio. *X* axis: cycle number; *Y* axis: derivative of SYBR Green fluorescence; (C) EMSA of hu $\gamma$ -promoter AvaI-ApaII fragment (25) (ApaI-AvaII probe) was carried out with 5  $\mu\text{g}$  of nuclear extracts (NE) from  $\ln 2$  ( $\text{Ik}^{\text{WT}}$  NE) or  $\ln 2 - \text{Ik}^{\text{null}}$  ( $\text{Ik}^{\text{null}}$  NE) fetal liver cells; lane 1: no NE; lanes 3, 5, 7, 9: competition with 100-fold molar excess of cold ApaI-AvaII oligonucleotide; A: Oct-1-specific retarded band; B: GATA-1-specific retarded band; \*: free, labeled probe; (F, G) Representative examples of protein immunoprecipitation (IP) on whole cell extracts prepared from  $\ln 2$  12.5 dpc fetal liver cells (F) or pOZ-FH-N or Ikaros-FH K562-infected cells (G). The antibodies used for IP or western blot (WB) assays are indicated at the top and the bottom of the panels, respectively. Ikaros (Ik and Ik-FH) and GATA-1 specific bands are indicated on both sides of the panels; filled circles: contaminating Ig heavy chain band; higher molecular weight Ikaros-1 specific band is indicated by an asterisk; Ig: isotype-matched Ig control; Mock: pOZ-FH-N K562-infected cells; Ik: Ikaros-pOZ-FH-N K562-infected cells; NE: wild type K562 nuclear extracts.

In the attempt to verify whether Ikaros-GATA-1 cooperative binding might occur at other gene regulatory regions, we studied the murine GATA-2 gene promoter, which is regulated by GATA-1 (13). GATA-2 is required for expansion of hematopoietic progenitor cells and is downregulated in erythroid cells (3). The proximal (IG) promoter controls GATA-2 expression in various tissues including erythroid cells (29). The distal (IS) promoter specifically controls GATA-2 expression in hematopoietic progenitors (13). Since DNA sequence analysis of the GATA-2 IG promoter reveals the presence of nearby GATA-1 (TGATAG; AGATA) and Ikaros (TGGGAA) consensus DNA binding sites (Fig. 6.6A), we verified *in vivo* recruitment of GATA-1 and Ikaros to GATA-2 IG promoter by ChIP analysis with Ikaros and GATA-1 specific antibodies. As shown in Fig. 6.6B both proteins can be detected at the GATA-2 IG promoter *in vivo* in  $\ln 2$  erythroid cells, whereas ChIP



analysis in *ln2-Ik<sup>null</sup>* cells revealed that the absence of Ikaros significantly reduces GATA-1 binding. Finally, as observed at huy-globin genes, reduced Ikaros and GATA-1 recruitment to GATA-2 promoter affects GATA-2 silencing in erythroid cells, as indicated by a 2.3-fold increase GATA-2 gene expression in *ln2-Ik<sup>null</sup>* cells relative to *ln2* cells (Fig. 6.6C).



**Figure 6.6: Ikaros and GATA-1 recruitment to the GATA-2 IG promoter in *ln2* and *ln2-Ik<sup>null</sup>* 12.5 dpc fetal liver cells.**

(A) Schematic overview of GATA-2 IG promoter region. In bold and underlined are GATA-1 and Ikaros DNA consensus binding sites; in bold and italics is the beginning of exon IG (29); (B) ChIP analysis of *ln2* (black bars) and *ln2-Ik<sup>null</sup>* (grey bars) cells with Ikaros and GATA-1 specific antibodies. Analysis and quantification of immunoprecipitated samples are as described in Fig. 6.2C, D; \*:  $p \leq 0.05$  by Student's  $t$  test; (C) Representative example of semi-quantitative RT-PCR performed on equal amounts of RNA purified from *ln2* or *ln2-Ik<sup>null</sup>* 12.5 dpc fetal liver cells. Top panel: mouse GATA-2 cDNA; bottom panel: mouse actin cDNA, used as control. Band intensities were

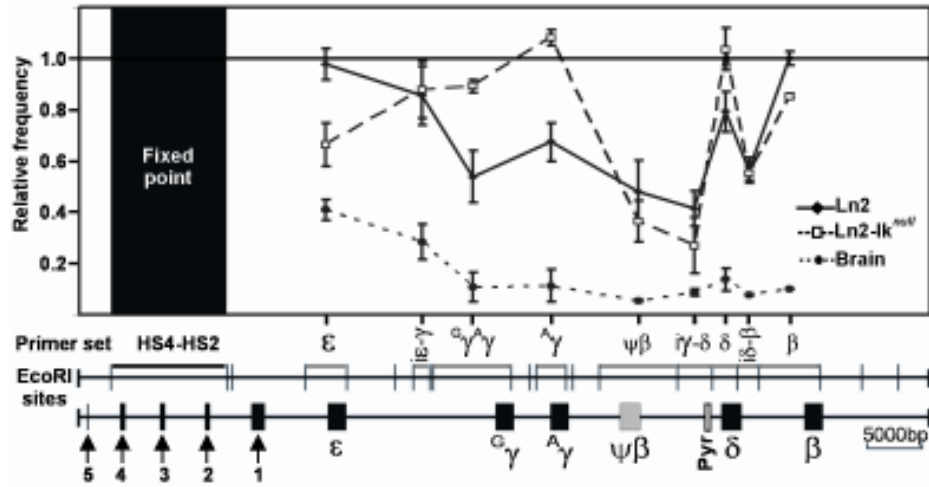
quantified with MultiGauge 2.0 program and the relative level of GATA-2 gene expression was quantified according to the formula depicted underneath the panels.

### **6.3.4 Ikaros contributes to $\text{hu}\gamma$ -gene silencing at the time of $\gamma$ -to- $\beta$ globin switching while precluding efficient interaction between $\beta$ LCR and $\text{hu}\gamma$ -promoters**

Since: (i) Ikaros affects  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching (20, 26); (ii) GATA-1 can repress  $\text{hu}\gamma$ -gene expression when bound at position -175 of the  $\text{hu}^{\text{A}}\gamma$ -promoter (25); and (iii) GATA-1 binding/stability at  $\text{hu}\gamma$ -promoters is decreased in  $\text{ln2-Ik}^{\text{null}}$  fetal liver cells (Fig. 6.5A, C), we evaluated  $\text{hu}\gamma$ - and  $\text{hu}\beta$ -gene expression levels in  $\text{ln2}$  and  $\text{ln2-Ik}^{\text{null}}$  cells by qRT-PCR. Total RNA isolated from fetal liver cells was used for cDNA synthesis. Real-time qPCR was performed with Qiagen QuantiTect probes specific for  $\text{hu}\beta$ -globin or  $\text{hu}\gamma$ -globin cDNA. Mouse actin cDNA was used as a control. The averages of three independent experiments were as follows: for fetal liver cells at 12.5 dpc, the  $\text{ln2-Ik}^{\text{null}}/\text{ln2}$  values were  $2.2 \pm 0.4$  and  $0.6 \pm 0.1$  for  $\text{hu}\gamma$  and  $\text{hu}\beta$  genes, respectively, and for fetal liver cells at 14.5 dpc, the  $\text{ln2-Ik}^{\text{null}}/\text{ln2}$  values were  $3.7 \pm 0.4$  and  $0.5 \pm 0.05$  for  $\text{hu}\gamma$  and  $\text{hu}\beta$  genes, respectively. Thus, at 12.5 dpc,  $\text{hu}\gamma$ -gene expression is 2.2-fold higher  $\text{ln2-Ik}^{\text{null}}$  than in  $\text{ln2}$  cells, and  $\text{hu}\beta$ -gene expression decreases to 0.6-fold in  $\text{ln2-Ik}^{\text{null}}$  cells. To investigate whether Ikaros participates in  $\text{hu}\gamma$ -gene silencing also by affecting long-range interactions at the globin locus at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching, chromosome conformation capture (3C) assay (7) was applied to  $\text{ln2}$  or  $\text{ln2-Ik}^{\text{null}}$  erythroid cells (Fig. 6.7). With this assay, it is possible to determine physical proximity between chromosomal regions that are normally located far apart *in vivo*. Chromatin was digested with EcoRI, randomly ligated with T4 DNA ligase and proximity between  $\beta$ LCR and downstream regulatory regions was assessed by qPCR with primer sets designed to span several site pairs formed upon EcoRI restriction enzyme digestion. This restriction enzyme was chosen based on previous reports

of equal nuclear digestion among different tissues, specifically fetal livers and brains (38). The same report also demonstrated that  $\beta$ LCR HS2-HS4 'fixed' fragment (hereafter HS2-4) is appropriate to investigate how  $\beta$ LCR holocomplex and the distal active genes come in close proximity in fetal liver nuclei. Analysis of the hu $\beta$ -globin locus in 12.5 dpc fetal liver reveals significant cross-linking frequency between the HS2-4 fragment and the active hu $\gamma$ -, hu $\delta$ -, and hu $\beta$ -gene ( $G\gamma^A\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\delta$ , and  $\beta$  regions). The highest cross-linking efficiencies between HS2-4 and  $\varepsilon$  or  $i\varepsilon$ - $\gamma$  closest fragments results from direct correlation between spatial proximity and distance along the linear DNA template rather than productive nuclear chromatin interactions (7). Importantly, relative to ln2, ln2-Ik<sup>null</sup> cells display higher amplification frequencies between HS2-4/ $G\gamma^A\gamma$  as well as HS2-4/ $A\gamma$  fragments. These results indicate that in erythroid cells lacking Ikaros proteins, the  $\beta$ LCR preferentially contacts fetal rather than adult globins at a developmental stage where hu $\gamma$ -gene expression should progressively be extinguished and hu $\beta$ -gene expression should progressively increase. Surprisingly, the low crosslinking frequency between HS2-4 and the EcoRI fragment enclosing the Pyr region ( $i\gamma$ - $\delta$ ) illustrates that this region does not efficiently contact the  $\beta$ LCR in 12.5 dpc fetal liver cells isolated from ln2 or ln2-Ik<sup>null</sup> mice.

To better define the role of Ikaros for hu $\gamma$ -gene silencing during fetal erythropoiesis, hu $\gamma$ -globin gene expression was studied in 14.5 dpc fetal liver erythroid cells. As shown above, hu $\gamma$ -gene expression is 3.7-fold higher in ln2-Ik<sup>null</sup> than ln2 cells, strongly suggesting that Ikaros is necessary for appropriate hu $\gamma$ -gene silencing at the time of globin switching and later on during the fetal stage of definitive erythropoiesis.



**Figure 6.7: Physical proximity between  $\beta$ LCR and globin gene promoters in  $ln2$  and  $ln2-Ik^{null}$  12.5 dpc fetal liver cells.**

Chromosome conformation capture (3C) was applied on formaldehyde-fixed  $ln2$  or  $ln2-Ik^{null}$  12.5 dpc fetal liver cells. Nuclei were digested with *EcoRI* and genomic DNA was ligated and subjected to qPCR with SYBR Green.  $\beta$ LCR HS2-HS4 (HS2-4) *EcoRI* fragment was used as ‘fixed’ fragment and specific primer sets were designed in order to amplify the genomic regions corresponding to the  $\epsilon$  gene ( $\epsilon$ ), inter- $\epsilon$ - $\gamma$  region ( $i\epsilon$ - $\gamma$ ),  $G^A\gamma$  genes ( $G^A\gamma$ ),  $A^A\gamma$  gene ( $A^A\gamma$ ),  $\psi\beta$  region ( $\psi\beta$ ), inter- $\gamma$ - $\delta$  region ( $i\gamma$ - $\delta$ ),  $\delta$  gene ( $\delta$ ), inter- $\delta$ - $\beta$  region ( $i\delta$ - $\beta$ ), and  $\beta$  gene region ( $\beta$ ). Relative crosslinking frequencies ( $Y$  axis) of the ‘fixed’ fragment with globin fragments were defined using naked DNA encompassing the whole hu $\beta$ -globin as control and normalized to endogenous mouse actin. A value of 1 was attributed to the highest crosslinking frequency obtained with  $ln2$  samples; error bars represent standard deviations;  $X$  axis: position across the locus.

## 6.4 Discussion

### 6.4.1 Ikaros-GATA-1 protein interaction

Here we show for the first time that Ikaros and GATA-1 do interact and that in erythroid cells Ikaros contributes to GATA-1 recruitment/stability at HS3,  $\text{hu}\gamma$ -promoters and Pyr region. We also provide evidence that this effect is not limited to the globin locus since Ikaros is recruited to GATA-2 IG promoter, where it affects GATA-1 occupancy and GATA-2 gene expression. Ikaros-GATA-1 interaction has been hypothesized but never reported, perhaps because (i) biochemical purification of Ikaros-associated complexes has been generally carried out in lymphoid cells (10) and, most importantly, because (ii) beside Ikaros interaction with Helios, it is known that Ikaros forms low-stability complexes with other proteins *in vivo*, which might not resist high stringency washes (47). Accordingly, the majority of Ikaros interacting partners have been identified or confirmed by immunoprecipitation of overexpressed chimeric proteins carrying epitope tags.

It has been shown that HS3 and HS2 are important for GATA-1-mediated  $\beta\text{LCR}/\beta$  major long-range chromatin interactions at the mouse globin locus and that submaximal concentration of GATA-1 can still trigger  $\beta\text{LCR}/\beta\text{maj}$  proximity (52). This could explain why, even though GATA-1 binding to HS3 is affected in  $\text{In2-Ik}^{\text{null}}$  cells (Fig. 6.5A) the  $\beta\text{LCR}$  retains the capacity to be in close proximity with the  $\text{hu}\beta$ -promoter (Fig. 6.7). On the other hand, lack of Ikaros leads to reduced GATA-1 binding at  $\text{hu}\gamma$ -promoters, enhanced chromosomal proximity between the  $\beta\text{LCR}$  and  $\text{hu}\gamma$ -regions and delayed  $\text{hu}\gamma$ -gene silencing. Thus, these results suggest that Ikaros and GATA-1 act as transcriptional repressors of  $\text{hu}\gamma$ -genes at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching and that their combinatorial effect at  $\text{hu}\gamma$ -promoters impairs long-range interactions between  $\beta\text{LCR}$  and  $\text{hu}\gamma$ -promoters. Accordingly, it has been shown that GATA-1 binding at position -173 (25) and -566 (16) of the  $\text{hu}\gamma$ -promoters contributes to  $\text{hu}\gamma$ -gene silencing in adult erythroid cells. Analysis of the -566 genomic region reveals the presence of a related Ikaros consensus binding sequence

(TGGGAG) (30). It has been proposed that this, as well as many other low-affinity Ikaros consensus sites, do not bind Ikaros proteins very well. However, low-affinity binding sites can be occupied by Ikaros when present in multiplicity and in proximity. Furthermore, it has been suggested that combination of low- and high-affinity binding sites across a given gene regulatory region might control the global DNA binding affinity of Ikaros (30). It is therefore possible that the low-affinity Ikaros site at position -310 together with the high-affinity Ikaros site at the exon 1-intron 1 junction of *huγ*-globin genes might influence GATA-1 binding to *huγ*-regulatory regions during development, particularly at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching.

In contrast to the Ikaros-dependent GATA-1 binding at HS3 and *huγ*-promoters, GATA-1 recruitment/stability at HS2 and *huβ*-promoter appears to occur independently of Ikaros. This site selectivity might depend on the interaction of Ikaros and/or GATA-1 with other factors. For instance, both Ikaros and “GATA-1-FOG-1” can functionally interact with chromatin remodeling complexes that generally either promote gene activation (SWI/SNF or the SWI/SNF-related ACF complex) or repression (NuRD) (10, 44). Recently, Naito *et al.* (31) demonstrated that during development and lineage specification, Ikaros can promote recruitment of either negative or positive transcriptional regulators to the CD4 silencer. Similarly, it has been shown that GATA-1 and EKLF, two zinc-finger proteins that physically interact, might co-occupy or bind independently the murine globin locus (17, 27).

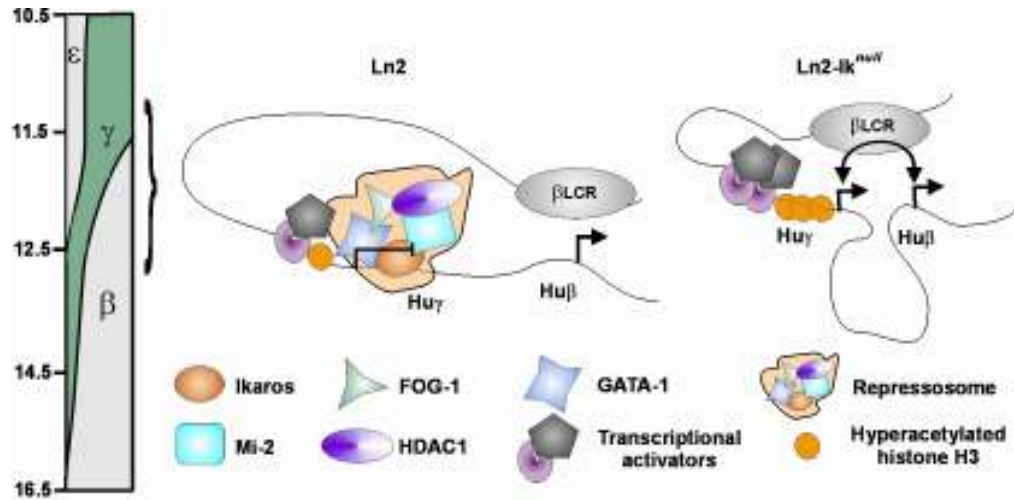
Even though Ikaros is expressed in almost all hematopoietic cells, distinct cell lineages are affected more or less severely in *Ik<sup>null</sup>* mice. The variable phenotypes suggest that Ikaros proteins may carry out specific functions in different hematopoietic cells, perhaps in association with lineage-restricted partners. This is the case for two Ikaros-interacting proteins, Aiolos and Helios, which are predominantly expressed in B-cells and HSC, respectively (19, 53). Accordingly, the interaction with GATA-1 could provide Ikaros with

erythroid-specific functions, by targeting chromatin modifying and remodeling activities to the hu $\beta$ -globin locus and to other loci/genes including GATA-2 IG promoter.

#### **6.4.2 Recruitment of Ikaros, GATA-1, FOG-1, Mi-2, and HDAC1 to hu $\gamma$ -promoters at the time of $\gamma$ -to- $\beta$ globin switching**

Binding of Ikaros to the hu $\beta$ -globin locus has been observed *in vitro* (20, 35). More recently, recruitment of Ikaros to HS3 has also been shown in K562 erythroleukemia cells overexpressing Ikaros-1 (20). However, since: (i) K562 cells can be induced to produce hu $\gamma$ - but not hu $\beta$ -globin globins; (ii) unbalance between Ikaros isoforms (as observed when only one isoform is overexpressed) can modify Ikaros-target gene transcriptional regulation (10); and (iii) Ikaros overexpression is reported to arrest cell cycle at the G1 to S phase transition (2) in addition to favor apoptosis in adult erythroid cells (43), we verified the physiological role of Ikaros in primary erythroid cells. We show that in freshly isolated erythroid cells, endogenous Ikaros (*i.e.*, when expressed at physiological levels) binds *in vivo* to the hu $\beta$ -globin locus and to the GATA-2 IG promoter. Most importantly we shed light on the molecular mechanisms of Ikaros-mediated hu $\gamma$ -gene repression at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching, showing that Ikaros may favor recruitment to the hu $\gamma$ -promoters of a repressosome-like complex containing GATA-1, FOG-1, and the NuRD complex components Mi-2 and HDAC1 (Fig. 6.8). Due to the presence of Mi-2 and HDAC1, two well-known Ikaros interacting partners (47), this complex could locally transform transcriptionally active chromatin into chromatin refractory to transcription. Accordingly, analysis of In2-Ik<sup>null</sup> cells revealed that Ikaros favors HDAC1 recruitment to hu $\gamma$ -promoters, hence reducing histone acetylation level and contributing to hu $\gamma$ -gene silencing at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching. Support for this model also derives from the observation that histone deacetylase inhibitors can reactivate hu $\gamma$ -gene expression in adult erythroid cells (28), suggesting that histone acetylation level is important for hu $\gamma$ -gene transcriptional regulation. The fact that at adulthood  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching is eventually completed

without the contribution of Ikaros (not shown) indicates that Ikaros-mediated repression is an early event leading to *huy*-gene silencing at the fetal stage of development, and that in erythroid cells lacking Ikaros, *huy*-gene silencing eventually occurs by other compensatory mechanisms or by the participation of additional transcription factors (48, 50).



**Figure 6.8: Model of hypothetical Ikaros-dependent repressosome nucleation leading to *huy*-gene repression at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching.**

A hypothetical model of *huy*-globin gene repression mediated by the Ikaros/GATA-1/FOG-1/Mi-2/HDAC1 repressosome (for simplicity, only one of the two *huy*-genes is depicted). Repressosome nucleation at *huy*-promoters requires the presence of Ikaros. In Ln2 cells (Ln2), chromatin conformation at *huy*-region limits transcriptional activator recruitment to *huy*-promoters. Thus, *huy*-genes are progressively and efficiently silenced. However, in Ln2-Ik<sup>null</sup> cells (Ln2-Ik<sup>null</sup>), the repressosome is formed less efficiently and chromatin at *huy*-promoters maintains an accessible conformation, which sustains recruitment of transcriptional activators and coactivators hence, higher *huy*-gene expression. Repressosome nucleation, by reducing chromatin accessibility, progressively decreases the frequency of productive interactions between  $\beta$ LCR and *huy*-promoters. At the same time, several *trans*-activators (like EKLF) and



chromatin modifying activities (like the SWI/SNF related complex, E-RC1), gathered to the hu $\beta$ -promoter, contribute to chromatin activation and facilitate  $\beta$ LCR/hu $\beta$  over  $\beta$ LCR/hu $\gamma$  long-range interactions.

It has been shown that Ikaros physically interacts with Mi-2 and HDAC1 (47). However, it cannot be excluded that reduced recruitment of Mi-2 and HDAC1 to hu $\gamma$ -promoters in In2-Ik<sup>null</sup> cells be also an indirect effect due to reduced GATA-1-FOG-1 occupancy because GATA-1 and FOG-1 are found in a complex also containing Mi-2 and HDAC1 (44). Nonetheless, impaired GATA-1 and FOG-1 binding in In2-Ik<sup>null</sup> cells supports the hypothesis that Ikaros can be required for developmental-specific nucleation of a repressosome at hu $\gamma$ -promoters.

Even though *in vitro* Ikaros binds the Pyr region (35, 36), *in vivo* Ikaros association with this region appears to be indirect (Fig. 6.2C, D). At the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching, the Pyr region does not interact with the  $\beta$ LCR (Fig. 6.7). Additionally, in contrast to what was observed at HS3, hu $\gamma$ - and hu $\beta$ -promoter, histone acetylation is not modified at Pyr region in In2-Ik<sup>null</sup> cells (Fig. 6.4C). These results along with the fact that we could not reveal BRG1, HDAC1 or Mi-2 occupancy at the Pyr region (Fig. 6.4A, B, D) suggest that the recruitment of the PYR complex to this region in 12.5 dpc fetal liver cells might not be a major factor for  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching. Indeed, the PYR complex has been purified in MEL cells, which are proerythroblast-like cells expressing only adult hemoglobin, and PYR activity has been found in 14.5 dpc mouse fetal liver cells (expressing adult globin genes) but not in yolk sac primitive erythroid cells (expressing embryonic globin genes). Thus, without excluding the possibility that the Pyr region could be important for Ikaros-dependent globin gene regulation at specific developmental stages, our results suggest that this region is not a critical target of Ikaros activity at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching.

*In vitro*, PYR complex DNA binding activity copurifies with few SWI/SNF complex subunits (35). Nevertheless, we could not demonstrate any clear involvement of Ikaros as component of a SWI/SNF complex capable of directly contributing to hu $\beta$ -gene activation

at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching. However, we show that in  $\text{In2-Ik}^{\text{null}}$  cells, BRG1 recruitment and histone H3 acetylation levels are reduced at  $\beta$ LCR HS3 (Fig. 6.4A, C). HDAC1 levels are similar in  $\text{In2}$  and  $\text{In2-Ik}^{\text{null}}$  cells, hence it is likely that HS3 hypoacetylation in  $\text{In2-Ik}^{\text{null}}$  cells results from reduced recruitment of histone acetyltransferase activities. Interestingly, it has been shown that GATA-1 favors BRG1 (17) and CBP (23) acetyltransferase occupancy at  $\beta$ LCR HS3 and here we provide evidence that lack of Ikaros proteins significantly affects GATA-1 recruitment to HS3. Therefore, it is possible that reduced BRG1 recruitment and histone H3 acetylation at this region result from the combinatorial effect of Ikaros and GATA-1. Interestingly, even though CBP and BRG1 are recruited less efficiently to HS3,  $\beta$ LCR chromatin organization and long-range chromosomal interactions are not profoundly affected (Fig. 6.7) and *huy*-genes are efficiently expressed (Table I), suggesting that decreased recruitment of these activities does not preclude the formation of active chromatin conformation at HS3.

It is known that several transcription factors and cofactors contribute to chromatin conformation across the  $\beta$ LCR and a few among them, such as p45/NF-E2 and EKLF, can influence GATA-1 occupancy at  $\beta$ LCR and *vice versa*. However, we show that the absence of Ikaros does not alter p45/NF-E2 occupancy at HS3, HS2, and *huy*-promoters (Fig. 6.5E). This result and the fact that BRG1 recruitment to *huy*-promoters is not modified in  $\text{In2-Ik}^{\text{null}}$  cells (Fig. 6.4A), suggest that the effect of Ikaros on GATA-1 DNA binding is specific and is not due to a general modification of chromatin conformation due to the absence of Ikaros.

### 6.4.3 Ikaros and chromatin looping

Long-range chromatin interaction is the mechanism by which  $\beta$ -like globin genes are highly expressed in a developmental- and tissue-specific manner (5, 38, 51). Efficient long-range interactions between  $\beta$ LCR and adult globin genes requires GATA-1 with FOG-1 (52), EKLF (9), NLI/Lbd1 (46), and possibly other as-yet-unidentified transcription factors.

Nonetheless, little is known about the mechanisms and chromatin-associated proteins that actively contribute to impairment of productive long-range interactions between  $\beta$ LCR and globin promoters. Here, we show that Ikaros, by binding to the  $\text{hu}\gamma$ -promoters, can reduce  $\beta$ LCR/ $\text{hu}\gamma$  close proximity at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching. This indirectly suggests that  $\text{hu}\gamma$ -promoter chromatin organization contributes substantially to efficient long-range chromatin interaction with the  $\beta$ LCR and that local chromatin changes are critical for developmental-specific transcriptional silencing of  $\text{hu}\gamma$ -genes. During development, progressive reduction of  $\beta$ LCR/ $\text{hu}\gamma$  proximity, together with the action of several *trans*-activators (like EKLF) gathered to the  $\text{hu}\beta$ -promoter, favor  $\text{hu}\beta$ - over  $\text{hu}\gamma$ -promoters for long-range interactions with the  $\beta$ LCR. In the absence of Ikaros, the switching is delayed and the active chromatin conformation at  $\text{hu}\gamma$ -promoters appears to favor efficient  $\beta$ LCR/ $\text{hu}\gamma$  chromatin contacts for longer periods (Fig. 6.7).

Gene expression studies by microarray have shown that expression of the erythroid transcription factor EKLF decreases to 0.6-fold in  $\text{Ik}^{\text{null}}$  relative to wild type 14.5 dpc fetal liver cells (26). This level of expression is similar to the level observed in EKLF heterozygous null background mice ( $\text{EKLF}^{+/-}$ ), which are viable and appear normal in terms of adult globin gene expression (34, 41). EKLF is required for adult globin gene expression in both mice (34, 41) and humans (55) during fetal and adult erythropoiesis. It has been shown that the decrease in EKLF affects the  $\text{hu}\gamma/\text{hu}\beta$  ratio during globin switching with decreased  $\text{hu}\beta$ - and increased  $\text{hu}\gamma$ -gene expression. However, by 14.5 dpc  $\text{hu}\gamma$ - as well as  $\text{hu}\beta$ -gene expression in mouse fetal livers returns to normal levels (40, 55). Since: (i) in 14.5 dpc fetal liver cells  $\text{hu}\gamma$ -gene silencing is delayed in  $\text{ln2-Ik}^{\text{null}}$  mice whereas it is not affected in  $\text{EKLF}^{+/-}$  animals; and (ii)  $\beta$ LCR/ $\text{hu}\beta$ -gene chromatin interactions are profoundly altered in 12.5 dpc fetal livers isolated from EKLF deficient mice (9), whereas no major changes are observed in 12.5 dpc  $\text{ln2-Ik}^{\text{null}}$  fetal livers (Fig. 6.7), it is unlikely that the results obtained in  $\text{ln2-Ik}^{\text{null}}$  erythroid cells be the mere consequence of reduced level of

EKLF gene expression. Instead, our data suggest that Ikaros can exert a direct and specific effect on  $\text{hu}\gamma$ -gene regulation in fetal liver erythroid cells.

In conclusion, we demonstrate that Ikaros, together with GATA-1, contributes to developmental-specific silencing of  $\text{hu}\gamma$ -genes. The absence of Ikaros delays  $\text{hu}\gamma$ -gene silencing and alters long-range chromatin interactions across the locus, favoring more prolonged productive contacts between  $\beta$ LCR and  $\text{hu}\gamma$ -genes. Based on our results, we propose that Ikaros-dependent nucleation of a repressosome-like complex contributes to progressive reduction of  $\beta$ LCR/ $\text{hu}\gamma$  chromatin interactions by affecting  $\text{hu}\gamma$ -promoter organization (*i.e.* influences transcription factor and cofactor recruitment/stability). Finally, molecular analyses carried out at GATA-2 IG promoter suggest that Ikaros-GATA-1 combinatorial effect is not limited to  $\text{hu}\beta$ -globin gene regulation, but it also affects transcriptional regulation of other hematopoietic genes. Interestingly, Ikaros and GATA-1 take part in transcriptional regulation of the IL-4 gene (14). Thus, by influencing promoter organization and long-range chromatin interactions, Ikaros and GATA-1 combinatorial effects might represent an important mechanism of gene regulation during hematopoiesis.

## 6.5 Materials and methods

### 6.5.1 Mouse transgenic lines

Homozygous  $\text{ln}2$  mice (49) were bred with CD1 females and  $\text{ln}2$  12.5 or 14.5 dpc heterozygous  $\text{ln}2$  fetal livers were isolated. Otherwise, heterozygous Ikaros *null* (54) mice were crossed with homozygous  $\text{ln}2$ :heterozygous Ikaros *null* mice and 12.5 or 14.5 dpc heterozygous  $\text{ln}2$ :homozygous Ikaros *null* ( $\text{ln}2\text{-Ik}^{\text{null}}$ ) fetal livers were isolated. Animals were sacrificed by cervical dislocation. Fetuses were isolated and fetal livers were dissected and then homogenized in PBS by vigorous pipetting. Bone marrow cells were isolated from femurs and humerus of adult transgenic mice by flushing bones in PBS with a 30G needle. Cell clumps were mechanically dissociated by passing cells through a 22G needle. Animal

experiments were conducted in accordance with the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines and approved by the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal care committee.

### **6.5.2 Wright-Giemsa staining**

Ten-to-twenty thousand fetal liver cells were centrifuged on clean glass slides for 7 min at 600 rpm on a Cytospin3 (Shandon) system. Slides were air dried, fixed in 100% methanol for 20 seconds at room temperature, and stained for 5 min at room temperature in Wright-Giemsa stain modified solution (Sigma). Slides were then extensively washed in distilled water and completely dried.

### **6.5.3 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and real-time PCR (qPCR) analyses**

ChIP assays were carried out as per manufacturer's instruction (Upstate Biotechnology) starting with  $10^6$  fetal liver cells. Cells were fixed with 1% HCHO for 10 min at 37°C. HCHO/EGS dual crosslinking was carried out at room temperature, first in 1.5 mM EGS for 30 min and then in 1% HCHO for 10 min; reactions were quenched by the addition of ice-cold glycine (20 mM final) (57). Chromatin was reduced in size by sonication in order to obtain fragments of 400-600 bp in size. Antibodies were raised against acetylated (K9, K14) histone H3 or HDAC1 (Upstate Biotechnology); GATA-1 (N6), BRG1 (H-88), Ikaros (E-20), FOG-1 (M-20), Mi-2 (H-242), or p45/NF-E2 (C-19) (Santa Cruz). About 1/30<sup>th</sup> of immunoprecipitated and unbound (input) material was used as template for qPCR with SYBR Green (Invitrogen) on an iCycler iQ<sup>TM</sup> (Bio-Rad) system, using one primer set specific for the huβ-globin locus or mouse amylase 2.1y (Amy) promoter and another set specific for the mouse kidney-specific Tamm-Horsfall gene promoter (Thp), used as internal control. Amy and Thp are two genes that are not expressed in erythroid cells. Quantification was carried out according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, where  $\Delta\Delta C_t$  corresponds to [ChIP  $C_t$ -Input  $C_t$  of target region]-[ChIP  $C_t$ -Input  $C_t$  of reference region] and  $C_t$  indicates

the cycle threshold (56). To correctly interpret  $C_t$  values obtained by qPCR, the efficiency of all primer set was carefully checked and primer pairs displaying an amplification efficiency ranging from 95% to 102% were chosen. All data shown are the results of at least four independent ChIP experiments with qPCR reactions from each ChIP performed in triplicate and averaged (standard deviation). All primer sets and qPCR conditions are available upon request.

#### **6.5.4 Generation of epitope-tagged Ikaros-expressing K562 cells**

This protocol was exactly as described in Nakatani and Ogryzko (32) but K562 cells were used instead of HeLa cells.

#### **6.5.5 Protein immunoprecipitation (IP)**

For IP of fetal liver cells, ten million cells were lysed in 1 ml of ice-cold RIPA buffer (10mM Tris pH8, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Na-deoxycholate, 1% Nonidet NP-40, 0.1% SDS) containing protease inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma). Samples were rocked for 15 min at 4°C and then centrifuged for 15 min at 15800g at 4°C. Supernatants were pre-cleared with protein G-agarose beads (Upstate). Antibodies or Ig-matched controls were added to pre-cleared protein extracts and samples were rocked overnight at 4°C. IP complexes were collected with protein G-agarose beads and then washed three times with 1 ml of ice-cold RIPA buffer. Samples were recovered by boiling the beads in sample buffer containing  $\beta$ -mercaptoethanol. GATA-1 (N6), Ikaros (E-20) antibodies and isotype-matched Ig were purchased from SantaCruz biotechnology. IP of pOZ-FH-N and Ikaros-FH K562-infected cells was performed as described in Nakatani and Ogryzko (32). Anti-FLAG conjugated agarose beads as well as anti-HA antibodies were purchased from SantaCruz biotechnology.

### 6.5.6 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Total RNA isolated from  $10^6$  mouse fetal liver, thymus or bone marrow cells was extracted with Trizol (Invitrogen) and treated with DNaseI-RNase free (Invitrogen). Reverse transcription reactions were performed with oligo(dT)<sub>15</sub> primers and SuperScript reverse transcriptase (Invitrogen). qPCR was carried out on an iCycler iQ™ (Bio-Rad) system using: (i) SYBR Green (Invitrogen) to detect mouse GATA-1 and mouse actin (used as internal control) cDNA; or (ii) Qiagen QuantiTect (Qiagen) probes specific for huγ-globin or huβ-globin cDNA. To avoid genomic DNA contamination, primers were designed to span intron-exon junctions. All reactions were independently run at least in triplicate. The following equation (42), which takes into account primer efficiencies, was used to quantify huγ-globin, huβ-globin or GATA-1 gene expression relative to mouse actin gene expression:

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

$E_{target}$ : Huγ- or huβ-globin PCR efficiency;  $E_{ref}$ : mouse actin PCR efficiency; CP: crossing point;  $\Delta CP_{target}$ : CP deviation of  $(\ln 2) - (\ln 2 - I_k^{null})$  of huβ-gene or huγ-gene or GATA-1 transcript, and  $\Delta CP_{ref}$ : CP deviation of  $(\ln 2) - (\ln 2 - I_k^{null})$  of mouse actin transcript. Data shown are the results of at least three independent experiments with qPCR reactions from each cDNA performed in triplicate with corresponding standard deviations. All primer sets and qPCR conditions are available upon request.

### 6.5.7 Chromosome conformation capture (3C)

The 3C protocol was basically as previously described (7) with minor modifications. One 12.5 dpc  $\ln 2$  or  $\ln 2 - I_k^{null}$  fetal liver ( $1-2 \times 10^6$  cells on average) was resuspended in 2 ml DMEM/10% FBS; cells were collected by centrifugation, transferred in 2 ml DMEM/10% FBS and fixed with 2% formaldehyde (38) for 10 minutes at room temperature. Reaction

was quenched by the addition of ice-cold glycine (125 mM final); cells were centrifuged and washed once with ice-cold PBS. At this step, 6 million cells were pooled together and nuclei were harvested by lysis of the cells in 5 ml of ice-cold lysis buffer (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.2% Nonidet NP-40) containing protease inhibitors (Sigma), and then rocked for 30 minutes at 4°C. After centrifugation at 1600rpm for 15 min at 4°C, nuclei were resuspended in 1.1X EcoRI digestion buffer, 0.3% SDS and incubated at 37°C for one hour while shaking. Then, Triton X-100 (1.8% final) was added to sequester SDS and nuclei were incubated as above. Finally, to about 1/10<sup>th</sup> of the reaction, 625 U (10% in volume) of EcoRI (Invitrogen) were added and the digestion was carried out at 37°C overnight, with gentle agitation. After digestion, EcoRI restriction enzyme was inactivated by the addition of SDS (1.6% final) and incubation at 65°C for 20 minutes. The sample was then diluted 10 times in ligation buffer (30 mM Tris pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP) containing 1% Triton X-100 and then incubated at 37°C for one hour, with gentle agitation. After incubation, 7500 Cohesive End Ligation Unit of T4 DNA ligase (New England Biolabs) were added to the reaction and ligation was carried out for 16 hr at 16°C. Then, the sample was treated with Proteinase K (Invitrogen) and incubated overnight at 65°C to reverse crosslinks. Finally, after RNaseI (Invitrogen) treatment (at 37°C for 10 min), DNA was purified by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation, and resuspended in TE buffer. About 1/60<sup>th</sup> of each sample was used as template for qPCR with SYBR Green (Invitrogen).

Naked DNA control templates consist of the hu $\beta$ -globin PAC clone PAC148 $\gamma$ lox (18) together with the mouse  $\beta$  actin BAC clone (BACe3.6-actin, BAC PAC resources CHORI), which both span the complete loci. Equimolar amounts of both clones were digested with EcoRI, ligated with T4 DNA ligase and DNA was precipitated as described above. Naked hu $\beta$ -globin locus and murine  $\beta$  actin DNA were used to correct for PCR amplification efficiency of each primer set (all primer efficiencies ranged between 91% and 102%) because these control templates provide all possible ligation products in equimolar amounts. Endogenous  $\beta$  actin locus was used as additional control to correct for differences



in quality and quantity of chromatin templates between different experiments. Brain cells were used as negative control for the 3C assay because globin genes are not expressed in these cells. Enrichment levels were calculated according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method where  $\Delta\Delta C_t$  corresponds to [3C sample  $C_t$ -PAC  $C_t$  of target region (globin locus)]-[3C sample  $C_t$ -PAC  $C_t$  of reference region (actin)] and  $C_t$  indicates the cycle threshold (56). Enrichment levels were obtained from the average of at least three independent experiments. qPCR were run in triplicate and averaged (standard deviation).

### 6.5.8 Semi-quantitative RT-PCR

Semi-quantitative PCR was carried out exclusively to study GATA-2 gene expression in fetal liver samples. Total RNA isolated from  $10^6$  mouse fetal liver cells was extracted with Trizol (Invitrogen) and treated with DNaseI-RNase free (Invitrogen). Reverse transcription reactions were performed with oligo(dT)<sub>15</sub> primers and SuperScript reverse transcriptase (Invitrogen). PCR were carried out with primer sets specific for mouse GATA-2 or actin cDNAs. PCR reactions were resolved onto a 2% agarose gel and band intensities were quantified using a Fuji LAS-3000 system and a MultiGauge 2.0 program. GATA-2 expression levels were calculated according to the following formula  $[(GATA2/Actin)] \ln 2 - Ik^{null}/[(GATA2/Actin)] \ln 2$ . Results were obtained with three independent experiments and PCR reactions from each cDNA sample were performed in triplicate and averaged (standard deviation). Primer sets and PCR conditions are available upon request.

### 6.5.9 Nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Nuclear extracts were prepared as described in Dignam *et al.* (8) from MEL (mouse erythroleukemia) cells or as described in Andrews *et al.* (1) from 12.5 dpc fetal liver cells. For EMSA reactions, 50 ng of sense strand oligonucleotides were end-labelled with  $\gamma^{32}P$ -ATP and T4 Polynucleotide kinase (New England Biolabs). Then 55 ng of complementary anti-sense oligonucleotides were added, the samples heated at 95°C for 5 min and then let cool down to room temperature. Labeled probes were purified by gel filtration through

Sephadex G-50 column (Pharmacia) and  $10^4$  cpm of labeled probe were used for each EMSA reaction. EMSA binding reactions (20  $\mu$ l) were incubated at room temperature for 20 min; then 4  $\mu$ l of loading buffer (0.25% Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol FF, 10% ficoll) were added and samples were resolved onto 5% polyacrylamide gels. Electrophoresis was carried out at 200 V, at room temperature, in 0.5 X Tris-borate buffer. Gels were finally dried and analyzed by Phosphorimager. Binding reactions for the 44 bp ApaI-AvaII probe were carried out as described in Liu *et al.* (25). EMSA reactions for the 45 bp  $\gamma$  exon 1-intron 1 junction of hu $\gamma$ -globin genes (Hu $\gamma$  probe) contained 20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 100 mM KCl, 10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% glycerol. For both probes, 1  $\mu$ g of nonspecific competitor poly(dIdC), 5-15  $\mu$ g of nuclear extracts and, when required, 100-fold molar excess of cold specific competitor oligonucleotides and 1-2  $\mu$ g of antibodies (for supershift assays) were used. Oligonucleotide sequences are available upon request.

## 6.6 Acknowledgments and funding

We thank E. Drobetsky for critical reading of the manuscript, K. Georgopoulos for the Ikaros *null* mouse line, H. Beauchemin for technical advice, and G. D'Angelo for Wright-Giemsa staining analysis. This work was supported by a grant from the Leukemia and Lymphoma Society of Canada and from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) held by E.M.; M.T. is supported by a CIHR grant; J.R. is supported by Fond de la recherche en santé du Québec (FRSQ) Doctoral Training Award; E.B.A. and E.M. are scholars of the FRSQ.

## 6.7 References

1. **Andrews, N. C., and D. V. Faller.** 1991. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **19**:2499.

2. **Avitahl, N., S. Winandy, C. Friedrich, B. Jones, Y. Ge, and K. Georgopoulos.** 1999. Ikaros sets thresholds for T cell activation and regulates chromosome propagation. *Immunity* **10**:333-43.
3. **Cantor, A. B., and S. H. Orkin.** 2005. Coregulation of GATA factors by the Friend of GATA (FOG) family of multitype zinc finger proteins. *Semin Cell Dev Biol* **16**:117-28.
4. **Cantor, A. B., and S. H. Orkin.** 2002. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* **21**:3368-76.
5. **Carter, D., L. Chakalova, C. S. Osborne, Y. F. Dai, and P. Fraser.** 2002. Long-range chromatin regulatory interactions in vivo. *Nat Genet* **32**:623-6.
6. **de Laat, W., and F. Grosveld.** 2003. Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub. *Chromosome Res* **11**:447-59.
7. **Dekker, J., K. Rippe, M. Dekker, and N. Kleckner.** 2002. Capturing chromosome conformation. *Science* **295**:1306-11.
8. **Dignam, J. D., P. L. Martin, B. S. Shastry, and R. G. Roeder.** 1983. Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol* **101**:582-98.
9. **Drissen, R., R. J. Palstra, N. Gillemans, E. Splinter, F. Grosveld, S. Philipsen, and W. de Laat.** 2004. The active spatial organization of the beta-globin locus requires the transcription factor EKLF. *Genes Dev* **18**:2485-90.
10. **Georgopoulos, K.** 2002. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* **2**:162-74.
11. **Gomez-del Arco, P., J. Koipally, and K. Georgopoulos.** 2005. Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol* **25**:2688-97.

12. **Gomez-del Arco, P., K. Maki, and K. Georgopoulos.** 2004. Phosphorylation controls Ikaros's ability to negatively regulate the G(1)-S transition. *Mol Cell Biol* **24**:2797-807.
13. **Grass, J. A., M. E. Boyer, S. Pal, J. Wu, M. J. Weiss, and E. H. Bresnick.** 2003. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8811-6.
14. **Gregory, G. D., S. S. Raju, S. Winandy, and M. A. Brown.** 2006. Mast cell IL-4 expression is regulated by Ikaros and influences encephalitogenic Th1 responses in EAE. *J Clin Invest* **116**:1327-36.
15. **Grosveld, F., N. Dillon, and D. Higgs.** 1993. The regulation of human globin gene expression. *Baillieres Clin Haematol* **6**:31-55.
16. **Harju-Baker, S., F. C. Costa, H. Fedosyuk, R. Neades, and K. R. Peterson.** 2008. Silencing of Agamma-globin gene expression during adult definitive erythropoiesis mediated by GATA-1-FOG-1-Mi2 complex binding at the -566 GATA site. *Mol Cell Biol* **28**:3101-13.
17. **Im, H., J. A. Grass, K. D. Johnson, S. I. Kim, M. E. Boyer, A. N. Imbalzano, J. J. Bieker, and E. H. Bresnick.** 2005. Chromatin domain activation via GATA-1 utilization of a small subset of dispersed GATA motifs within a broad chromosomal region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:17065-70.
18. **Imam, A. M., G. P. Patrinos, M. de Krom, S. Bottardi, R. J. Janssens, E. Katsantoni, A. W. Wai, D. J. Sherratt, and F. G. Grosveld.** 2000. Modification of human beta-globin locus PAC clones by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **28**:E65.

19. **Kelley, C. M., T. Ikeda, J. Koipally, N. Avitahl, L. Wu, K. Georgopoulos, and B. A. Morgan.** 1998. Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr Biol* **8**:508-15.
20. **Keys, J. R., M. R. Tallack, Y. Zhan, P. Papathanasiou, C. C. Goodnow, K. M. Gaensler, M. Crossley, J. Dekker, and A. C. Perkins.** 2008. A mechanism for Ikaros regulation of human globin gene switching. *Br J Haematol* **141**:398-406.
21. **Kim, J., S. Sif, B. Jones, A. Jackson, J. Koipally, E. Heller, S. Winandy, A. Viel, A. Sawyer, T. Ikeda, R. Kingston, and K. Georgopoulos.** 1999. Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* **10**:345-55.
22. **Letting, D. L., Y. Y. Chen, C. Rakowski, S. Reedy, and G. A. Blobel.** 2004. Context-dependent regulation of GATA-1 by friend of GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:476-81.
23. **Letting, D. L., C. Rakowski, M. J. Weiss, and G. A. Blobel.** 2003. Formation of a tissue-specific histone acetylation pattern by the hematopoietic transcription factor GATA-1. *Mol Cell Biol* **23**:1334-40.
24. **Liang, S., B. Moghimi, T. P. Yang, J. Strouboulis, and J. Bungert.** 2008. Locus control region mediated regulation of adult beta-globin gene expression. *J Cell Biochem* **105**:9-16.
25. **Liu, L. R., Z. W. Du, H. L. Zhao, X. L. Liu, X. D. Huang, J. Shen, L. M. Ju, F. D. Fang, and J. W. Zhang.** 2005. T to C substitution at -175 or -173 of the gamma-globin promoter affects GATA-1 and Oct-1 binding in vitro differently but can independently reproduce the hereditary persistence of fetal hemoglobin phenotype in transgenic mice. *J Biol Chem* **280**:7452-9.

26. **Lopez, R. A., S. Schoetz, K. DeAngelis, D. O'Neill, and A. Bank.** 2002. Multiple hematopoietic defects and delayed globin switching in Ikaros null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:602-7.
27. **Lowry, J. A., and J. P. Mackay.** 2006. GATA-1: one protein, many partners. *Int J Biochem Cell Biol* **38**:6-11.
28. **McCaffrey, P. G., D. A. Newsome, E. Fibach, M. Yoshida, and M. S. Su.** 1997. Induction of gamma-globin by histone deacetylase inhibitors. *Blood* **90**:2075-83.
29. **Minegishi, N., J. Ohta, N. Suwabe, H. Nakauchi, H. Ishihara, N. Hayashi, and M. Yamamoto.** 1998. Alternative promoters regulate transcription of the mouse GATA-2 gene. *J Biol Chem* **273**:3625-34.
30. **Molnar, A., and K. Georgopoulos.** 1994. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **14**:8292-303.
31. **Naito, T., P. Gomez-Del Arco, C. J. Williams, and K. Georgopoulos.** 2007. Antagonistic interactions between Ikaros and the chromatin remodeler Mi-2beta determine silencer activity and Cd4 gene expression. *Immunity* **27**:723-34.
32. **Nakatani, Y., and V. Ogryzko.** 2003. Immunoaffinity purification of mammalian protein complexes. *Methods Enzymol* **370**:430-44.
33. **Nichogiannopoulou, A., M. Trevisan, S. Neben, C. Friedrich, and K. Georgopoulos.** 1999. Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med* **190**:1201-14.
34. **Nuez, B., D. Michalovich, A. Bygrave, R. Ploemacher, and F. Grosveld.** 1995. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* **375**:316-8.

35. **O'Neill, D., J. Yang, H. Erdjument-Bromage, K. Bornschlegel, P. Tempst, and A. Bank.** 1999. Tissue-specific and developmental stage-specific DNA binding by a mammalian SWI/SNF complex associated with human fetal-to-adult globin gene switching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:349-54.
36. **O'Neill, D. W., S. S. Schoetz, R. A. Lopez, M. Castle, L. Rabinowitz, E. Shor, D. Krawchuk, M. G. Goll, M. Renz, H. P. Seelig, S. Han, R. H. Seong, S. D. Park, T. Agalioti, N. Munshi, D. Thanos, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and A. Bank.** 2000. An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol Cell Biol* **20**:7572-82.
37. **Orkin, S. H., and L. I. Zon.** 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**:631-44.
38. **Palstra, R. J., B. Tolhuis, E. Splinter, R. Nijmeijer, F. Grosveld, and W. de Laat.** 2003. The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat Genet* **35**:190-4.
39. **Papathanasiou, P., A. C. Perkins, B. S. Cobb, R. Ferrini, R. Sridharan, G. F. Hoyne, K. A. Nelms, S. T. Smale, and C. C. Goodnow.** 2003. Widespread failure of hematolymphoid differentiation caused by a recessive niche-filling allele of the Ikaros transcription factor. *Immunity* **19**:131-44.
40. **Perkins, A. C., K. M. Gaensler, and S. H. Orkin.** 1996. Silencing of human fetal globin expression is impaired in the absence of the adult beta-globin gene activator protein EKLF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:12267-71.
41. **Perkins, A. C., A. H. Sharpe, and S. H. Orkin.** 1995. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* **375**:318-22.
42. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45.

43. **Pulte, D., R. A. Lopez, S. T. Baker, M. Ward, E. Ritchie, C. A. Richardson, D. W. O'Neill, and A. Bank.** 2006. Ikaros increases normal apoptosis in adult erythroid cells. *Am J Hematol* **81**:12-8.
44. **Rodriguez, P., E. Bonte, J. Krijgsveld, K. E. Kolodziej, B. Guyot, A. J. Heck, P. Vyas, E. de Boer, F. Grosveld, and J. Strouboulis.** 2005. GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *Embo J* **24**:2354-66.
45. **Sieweke, M. H., and T. Graf.** 1998. A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr Opin Genet Dev* **8**:545-51.
46. **Song, S. H., C. Hou, and A. Dean.** 2007. A positive role for NLI/Ldb1 in long-range beta-globin locus control region function. *Mol Cell* **28**:810-22.
47. **Sridharan, R., and S. T. Smale.** 2007. Predominant interaction of both Ikaros and Helios with the NuRD complex in immature thymocytes. *J Biol Chem* **282**:30227-38.
48. **Stamatoyannopoulos, G.** 2005. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp Hematol* **33**:259-71.
49. **Strouboulis, J., N. Dillon, and F. Grosveld.** 1992. Developmental regulation of a complete 70-kb human beta-globin locus in transgenic mice. *Genes Dev* **6**:1857-64.
50. **Tanabe, O., D. McPhee, S. Kobayashi, Y. Shen, W. Brandt, X. Jiang, A. D. Campbell, Y. T. Chen, C. Chang, M. Yamamoto, K. Tanimoto, and J. D. Engel.** 2007. Embryonic and fetal beta-globin gene repression by the orphan nuclear receptors, TR2 and TR4. *Embo J* **26**:2295-306.
51. **Tolhuis, B., R. J. Palstra, E. Splinter, F. Grosveld, and W. de Laat.** 2002. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell* **10**:1453-65.



52. **Vakoc, C. R., D. L. Letting, N. Gheldof, T. Sawado, M. A. Bender, M. Groudine, M. J. Weiss, J. Dekker, and G. A. Blobel.** 2005. Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol Cell* **17**:453-62.
53. **Wang, J. H., N. Avitahl, A. Cariappa, C. Friedrich, T. Ikeda, A. Renold, K. Andrikopoulos, L. Liang, S. Pillai, B. A. Morgan, and K. Georgopoulos.** 1998. Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity* **9**:543-53.
54. **Wang, J. H., A. Nichogiannopoulou, L. Wu, L. Sun, A. H. Sharpe, M. Bigby, and K. Georgopoulos.** 1996. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* **5**:537-49.
55. **Wijgerde, M., J. Gribnau, T. Trimborn, B. Nuez, S. Philipsen, F. Grosveld, and P. Fraser.** 1996. The role of EKLF in human beta-globin gene competition. *Genes Dev* **10**:2894-902.
56. **Winer, J., C. K. Jung, I. Shackel, and P. M. Williams.** 1999. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* **270**:41-9.
57. **Zeng, P. Y., C. R. Vakoc, Z. C. Chen, G. A. Blobel, and S. L. Berger.** 2006. In vivo dual cross-linking for identification of indirect DNA-associated proteins by chromatin immunoprecipitation. *Biotechniques* **41**:694, 696, 698.

## **Chapitre 7 : Caractérisation des mécanismes de répression impliquant Ikaros à d'autres gènes dans les cellules érythroïdes**

Notre caractérisation d'un complexe de répression incluant Ikaros impliqué dans la répression des gènes  $\gamma$  nous a poussé à étudier l'importance de la régulation par Ikaros et GATA-1 à d'autres gènes dans les cellules érythroïdes. En effet, cette étude avait pour objectif (objectif 4, section 2.3.5) de déterminer si le mécanisme de régulation par Ikaros et GATA-1 est un mécanisme général de régulation dans les cellules érythroïdes.

Puisque le rôle de la voie Notch est peu caractérisé lors de l'érythropoïèse et que *Hes1* (un important gène cible de la voie) est connu pour être régulé par Ikaros dans les cellules T, nous avons tenté de déterminer comment *Hes1* est régulé dans les cellules érythroïdes. La compréhension de sa régulation peut permettre d'en connaître un peu plus sur sa fonction dans les cellules érythroïdes. Nos résultats montrent que Ikaros et GATA-1 répriment le gène *Hes1* lors de la différenciation érythroïde terminale. Ces résultats corrélerent avec le fait que la déplétion de *Hes1* dans les cellules érythroïdes favorise leur différenciation. Globalement, nos résultats montrent que Ikaros et GATA-1 sont des régulateurs importants dans les cellules érythroïdes et que leur activité combinée est impliquée dans la régulation de différents gènes.

Le manuscrit présenté dans ce chapitre regroupe les résultats que nous avons obtenus lors de cette étude. Nous sommes présentement en phase de correction finale du manuscrit avant de le soumettre à la revue *Blood*. L'article a pour titre : « GATA-1-mediated *Hes1* repression is required for erythroid differentiation » et comporte 6 figures ainsi que 7 figures et 2 tableaux supplémentaires.

## **Article 4 : GATA-1-mediated *Hes1* repression is required for terminal erythroid differentiation**

Julie Ross<sup>1</sup>, Lionel Mavoungou<sup>1</sup>, Emery H. Bresnick<sup>3</sup>, Eric Milot<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center and Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4;

<sup>2</sup> Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montreal, C.P. Succursale Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3T 3J7;

<sup>3</sup> Wisconsin Institutes for Medical Research, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison, Wisconsin 53705, United States of America

\* To whom correspondence should be addressed : Eric Milot, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center and Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4

Tel: + 514 252 3551; Fax: + 514 252 3430

## 7.1 Abstract

Many questions remain unanswered regarding the role of Notch signalling during terminal erythroid differentiation. We investigated the role of *Hes1*, a Notch target gene, during Mouse Erythroleukemia (MEL) cell differentiation. When *Hes1* is depleted using shRNA technology, MEL cell differentiate more rapidly suggesting that *Hes1* interfere with terminal erythroid differentiation. Additionally, using various models including mice, we demonstrate that Ikaros and GATA-1 are regulators of *Hes1* in erythroid cells. Their recruitment to the *Hes1* promoter is associated with the recruitment of EZH2, a histone methyltransferase of the PRC2 complex. Our data provide evidence that GATA-1 is essential for *Hes1* repression while Ikaros functions as a stabilizer of the repressive complex. Furthermore, GATA-1-mediated repression of *Hes1* facilitates terminal erythroid differentiation.

## 7.2 Introduction

Extracellular signaling along with the combined activity of different transcription factors and cofactors is fundamental to provide gene regulation specificity and hence, cell fate (Davidson and Levine, 2008; Scott and Pawson, 2009). Cells are influenced by numerous and diverse signals. For instance, erythroid cell formation (erythropoiesis) is tightly regulated by oxygen tension (hypoxia), iron homeostasis, stress and cytokines (Tsiftoglou et al., 2009). Although erythropoietin receptor (EpoR) activate the best described pathway controlling erythroid cell formation, other signaling pathways including stem cell factor (SCF)/c-kit receptor, wingless-type (Wnt) and Notch are also implicated (Tsiftoglou et al., 2009). In particular, as similar to the EpoR pathway, the Notch pathway is proposed to affect erythroid cell survival, proliferation and differentiation even though its role remains unclear (Dando et al., 2005; Henning et al., 2008; Henning et al., 2007; Ishiko et al., 2005; Lam et al., 2000; Robert-Moreno et al., 2007; Sugimoto et al., 2006; Tachikawa et al., 2006; Zeuner et al.). In mice, *Notch1* knockout ES-derived cells failed to fully contribute to

the formation of definitive hematopoietic stem cells (HSC) during embryonic development (Hadland et al., 2004). Additionally, the Notch pathway is reported to uphold apoptosis in yolk sac and bone marrow erythroid cells (Robert-Moreno et al., 2007).

Classically, when the Notch trans-membrane receptor contacts its ligand, the Notch intracellular domain (NICD) is cleaved by  $\gamma$ -secretase and forms a ternary complex with RBPJ $\kappa$  (CBF1; RBPJ) and the coactivator mastermind-like (MAML) in the nucleus (Nam et al., 2006; Wu and Griffin, 2004). Assembly of this complex at Notch target genes favors transcriptional activation. In absence of Notch signaling, target genes are repressed by RBPJ which is then accompanied by corepressors (Borggreffe and Oswald, 2009; Bray, 2006). Besides this classical view of the Notch pathway, other transcription factors have been reported (described) to influence the regulation of Notch target genes (Fischer and Gessler, 2007; Sanalkumar et al.). For example, it has been shown in *C. elegans* that the GATA factor ELT-2 cooperates with the Notch pathway to regulate the Notch target gene *ref-1* (Neves et al., 2007). In mammalian lymphoid cells, the well studied Notch target gene *Hes1* has been shown to be regulated by different transcription factors including IKZF1 (Ikaros) (Chari and Winandy, 2008; Dumortier et al., 2006; Kathrein et al., 2008; Kleinmann et al., 2008). However, similar to Notch1, the role of *Hes1* in erythroid cells is debated (Kumano et al., 2001; Ishiko et al., 2005; Henning et al., 2007). While it has been proposed that *Hes1* exerts a positive role on erythroid cell differentiation (Henning et al. 2007), others have suggested that *Hes1* represses erythroid cell differentiation (Kumano et al., 2001; Ishiko et al., 2005).

Ikaros is required to sustain normal hematopoiesis in mammals (Ng et al., 2007; Smale and Dorshkind, 2006; Yoshida et al.). In Ikaros null (*Ik<sup>null</sup>*) mouse, the absence of Ikaros results in a severe defect in B- and T-lymphopoiesis and a 30-fold reduction of hematopoietic stem cell (HSC) activity (Georgopoulos et al., 1994; Nichogiannopoulou et al., 1999; Wang et al., 1996, 1999). These mice also display impaired erythropoiesis characterized by reduction of BFU-E (burst forming unit-erythroid) and CFU-E (colony forming unit-erythroid) capacities (Nichogiannopoulou et al., 1999). However, the influence of Ikaros on

erythroid cell formation seems variable during development since at early stage of ontogeny.  $Ik^{null}$  mice do not show significant variation in erythroid cell differentiation, *i.e.*, from proerythroblast onwards or in absolute number of erythroid cells (Bottardi et al., 2009; Bottardi et al.). Nonetheless, adult  $Ik^{null}$  mice display anemia, which is proposed to either result from decreased number of erythroid cell progenitors due to the reduced HSC activity or erythroid cell shortened lifespan (Lopez et al., 2002; Nichogiannopoulou et al., 1999).

Ikaros can activate or repress gene expression in a gene-, tissue- and/or differentiation stage-specific manner (Bottardi et al., 2009; Bottardi et al.; Ernst et al., 1999; Georgopoulos et al., 1994; Harker et al., 2002; Koipally et al., 2002; Koipally et al., 1999; Reynaud et al., 2008; Sabbattini et al., 2001; Sun et al., 1996). Gene regulation imposed by Ikaros is mediated by different nuclear complexes and activities (Georgopoulos, 2002). Indeed, Ikaros interaction with SWI/SNF-like complexes promotes gene activation (Kim et al., 1999; O'Neill et al., 2000). On the other hand, Ikaros association with the NuRD complex, CtBP, CtIP, Rb or with mSin3 family members is reported to favor gene silencing (Kim et al., 1999; Koipally and Georgopoulos, 2000; Koipally and Georgopoulos, 2002; Koipally et al., 1999; Sridharan and Smale, 2007). Interestingly, Ikaros can be observed at heterochromatin foci in the nucleus along with transcriptionally repressed genes (Brown et al., 1997; Cobb et al., 2000).

Of interest here, is the role of Ikaros in erythroid cells where it contributes to human  $\gamma$ -globin (*HBG1-2*) gene repression during  $\gamma$ - to  $\beta$ -globin switch during development (Lopez et al., 2002). We have recently shown that Ikaros physically interacts with the transcription factor GATA-1 (Bottardi et al., 2009). Additionally, using transgenic mice containing the human  $\beta$ -globin locus we found that Ikaros acts as a developmental stage-specific repressor of the  $\gamma$ -globin genes where it nucleates a repressive complex (Bottardi et al., 2009; Bottardi et al.). These studies also showed that the Ikaros-mediated repression is not limited

to  $\gamma$ -globin gene regulation since in primitive as well as definitive erythroid cells, Ikaros is required for repression of *Gata-2* gene.

GATA-1, a preferential partner of Ikaros in erythroid cells, is critical for erythroid cell formation as well as for megakaryocyte and eosinophil development (Crispino, 2005; Ferreira et al., 2005; Orkin et al., 1998). Mice without GATA-1 die of massive proerythroblast cell apoptosis at 10.5-11.5 day post coitus (dpc) (Fujiwara et al., 1996). Additionally, GATA-1 overexpression in erythroid cells blocks cellular differentiation and transgenic mice overexpressing GATA-1 die of anemia at around 13.5 dpc due to inhibition of erythroid cell differentiation during definitive hematopoiesis (Whyatt et al., 2000; Whyatt et al., 1997). Interestingly, GATA-1 is involved in gene regulation of several factors involved in cell cycle, growth and/or differentiation of erythroid cells *e.g. Myb, Myc, Kit, Gata-2, Notch1* and *Eklf* (Bartunek et al., 2003; Crossley et al., 1994; Ferreira et al., 2005; Fujiwara et al., 2009; Grass et al., 2003; Jing et al., 2008; Munugalavadla et al., 2005; Rylski et al., 2003).

Like Ikaros, GATA-1 can interact with cofactors that promote both gene activation and repression. For instance, GATA-1 interacts with histone modifying enzymes and takes part to NuRD as well as SWI/SNF-like complexes (Kadam et al., 2000; Letting et al., 2003; Miccio et al.; Rodriguez et al., 2006). Some of these interactions are facilitated by the GATA-1 cofactor Friend of Gata-1 (FOG1) and accordingly, the GATA-1-FOG1 containing complexes can either favor or repress transcription (Johnson et al., 2007; Pope and Bresnick). Recently, it has been reported that the sumoylation of GATA-1 at lysine K137 favors transcriptional activation of GATA-1-FOG1 target genes (Lee et al., 2009).

The relevance of GATA-1 and Ikaros during erythropoiesis and the possibility that they could be implicated in the regulation of the Notch signaling pathway led us to study their role in the regulation of the important Notch target gene, *Hes1*. We show that Ikaros is recruited to *Hes1* promoter in erythroid cells. Ikaros promotes *Hes1* repression by favoring GATA-1 and GFI1B binding to *Hes1* promoter and GATA-1 mediates the recruitment of

the cofactors FOG1 and the histone H3K27 methylase EZH2. Moreover, our data suggest that *Hes1* repression in erythroid cells is important to mediate terminal erythroid differentiation.

## 7.3 Results

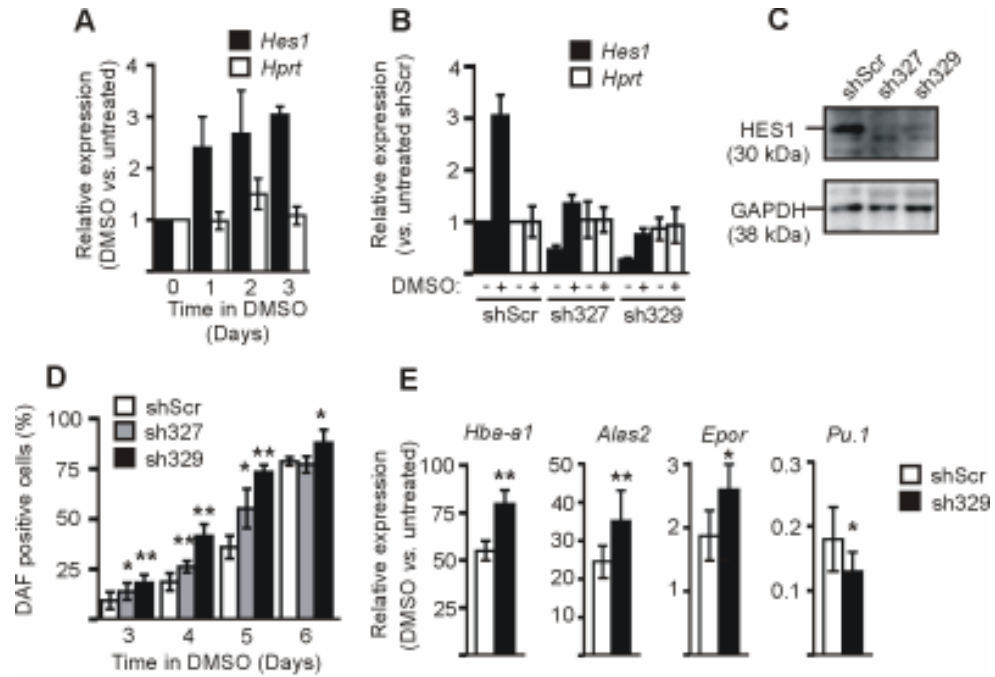
### 7.3.1 Downregulation of *Hes1* promotes erythroid differentiation

We first studied the expression of *Hes1* in mouse erythroleukemia (MEL) cell line (Singer et al., 1974) to clarify the role of this factor in erythroid cells (hereafter: EryC). These well characterized cells are proerythroblast-like cells and are capable to differentiate into orthochromatic normoblasts in presence of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Figure S7.1A;(Friend et al., 1971)). EryC differentiation is supported by the variable expression patterns of specific genes, some of which can be used to characterize MEL cell differentiation (Figure S7.1B; (Fraser and Curtis, 1987; Fukuda et al., 1994; Lin et al., 1998; Orkin and Swerdlow, 1977; Schuetze et al., 1992)). Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) assay revealed that the expression level of *Hes1* is 3-fold higher in DMSO-treated MEL cells than in untreated MEL cells when *Actin* (*Actb*) was used as internal control (Figure 7.1A). Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*Hprt*) expression was used as negative control and showed no modulation by DMSO treatment (Figure 7.1A).

To better understand the implication of *Hes1* regulation during erythroid differentiation, we investigated the effect of *Hes1* downregulation in MEL cells using short hairpin RNA (shRNA) technology. MEL cells were then stably transfected with pLKO.1 vector coding for shRNA directed against *Hes1* mRNA or for a non-specific shRNA (shScr). The expression of *Hes1* was similar in shScr and wild type cells (Figure S7.1C). A decrease of *Hes1* but not *Hprt* expression levels was obtained with two constructions (sh327 and sh329) relative to control cells (shScr; Figure 7.1B). Accordingly, HES1 protein was barely detectable in *Hes1* knockdown cells by Western blot (Figure 7.1C). Then, the ability of MEL cells to undergo erythroid differentiation when HES1 is depleted was tested. As in



control cells, the residual *Hes1* expression is upregulated in knockdown cells after DMSO induction (Figure 7.1B). To assess whether *Hes1* knockdown influence MEL cell differentiation, we performed diaminofluorene (DAF) and benzidine staining of hemoglobin in sh*Hes1* and shScr cells (Kaiho and Mizuno, 1985; Worthington et al., 1987) (Figures 7.1D and S7.1D). Such as shown in figure 7.1D, the slopes of differentiation curves of DAF positive cells in time after DMSO treatment of MEL shSrc vs sh327 and sh329 suggest an increased differentiation of *Hes1* knockdown MEL cells. This is also supported by the variable expression levels of three erythroid specific genes and one hematopoietic specific genes in *Hes1* knockdown cells relative to control cells (Figure 7.1E). Indeed, upon DMSO induction, the upregulation of *Hba-a1*, *Alas2* and *Epor* genes, three genes with higher expression levels in differentiated EryC (Fraser and Curtis, 1987; Lin et al., 1998; Nudel et al., 1977), is significantly enhanced in cells deficient for *Hes1* (Figure 7.1E). Concomitantly, *Sfpil* (*Pu.1*) expression, which is downregulated during erythroid differentiation, is further decreased in *Hes1* knockdown cells (Figure 7.1E; (Schuetze et al., 1992)). This effect of *Hes1* expression levels is specific to differentiating EryC since the relative expression of these genes was not affected in uninduced sh*Hes1* vs. shScr cells (Figure S7.1E). Thus, altogether these results suggest that HES1 depletion promotes DMSO-mediated erythroid differentiation.



**Figure 7.1. *Hes1* influence on MEL cell differentiation.**

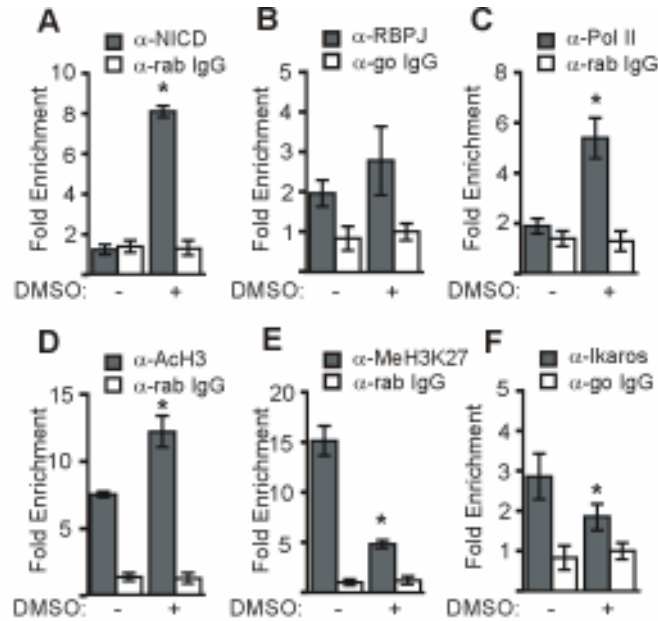
(A) Graphical representation of the relative expression (y-axis) of *Hes1* (black bars) or *Hprt* (negative control; white bars) with corresponding standard deviations in function of the time in DMSO (x-axis). RT-qPCR was performed on MEL cells treated with DMSO and untreated MEL cells and relative expression was calculated according to Pfaffl (Pfaffl, 2001) using *Actin* (*Actb*) as internal control. (B-D) MEL cells were stably transfected with vectors expressing shRNA directed against *Hes1* mRNA (sh*Hes1*: sh327 or sh329) or against scrambled mRNA (ShScr). (B) Graphical representation of the relative expression (y-axis) of *Hes1* or *Hprt* with corresponding standard deviations in function of DMSO treatment. RT-qPCR was performed on untreated cells (-) or cells treated with DMSO for 3 days (+) and relative expression was calculated according to Pfaffl (Pfaffl, 2001) using *Actb* as internal control. (C) Western Blot analysis of HES1 and GAPDH (loading control) expression in whole cell extract of untreated cells. Antibodies used for blot as well as specific bands and their corresponding molecular weight are presented on the panels. (D)

Graphical representation of the percentage of diaminofluorene (DAF) positive cells (y-axis) with corresponding standard deviations in function of the time in DMSO (x-axis). Asterisks (\*:p<0.01; \*\*: p<0.005) represent a significant variation between sh327 or sh329 vs. shScr according to Student's t test. (E) Graphical representation of the relative expression (y-axis) of *Hba-a1*, *Alas2*, *Epor* or *Spfil* (*Pu.1*) with corresponding standard deviations. RT-qPCR was performed on untreated cells or cells treated with DMSO for 3 days (DMSO) and relative expression was calculated according to Pfaffl (Pfaffl, 2001) using *Actb* as internal control. Asterisks (\*:p<0.05; \*\*: p<0.001) represent a significant variation between sh329 vs. shScr according to Student's t test.

### 7.3.2 Notch1 activation of *Hes1* gene in erythroid cells

To characterize how *Hes1* expression is instructed in erythroid cells, we have used the chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay to study *Hes1* regulation in untreated and DMSO-treated MEL cells. Since *Hes1* is a target of Notch, we first assessed the recruitment of components of the Notch activation complex to *Hes1* promoter. Particularly, it has been shown that overexpression of the intracellular domain of Notch1 (NICD) induces an upregulation of *Hes1* in EryC (Henning et al., 2007; Ishiko et al., 2005). Additionally, it has been reported that Notch1 is unregulated in MEL cells after initiation of erythroid differentiation (Shelly et al., 1999). In untreated MEL cells, NICD is not significantly recruited to *Hes1* promoter since a fold enrichment of one is observed relative to a non-target promoter (*Thp*; kidney-specific promoter) (Figure 7.2A). However, an 8-fold enrichment of NICD was detected at *Hes1* promoter in DMSO-treated cells which correlates with *Hes1* upregulation (Figure 7.2A). Antibody specificity was controlled with isotype-matched IgG. Next, we tested the recruitment of RBPJ $\kappa$  (RBPJ) and found that this important regulator of the Notch pathway is present at *Hes1* promoter before and after DMSO treatment of MEL cells. Thus, such as reported in other cell types, RBPJ is

associated with both, transcriptionally activated or repressed *Hes1* gene (Chari et al.; Tanigaki et al., 2004).



**Figure 7.2. *Hes1* promoter organization in MEL cells.**

(A-F) Graphical representation of the recruitment of Notch intracellular domain (NICD), RBPJ $\kappa$  (RBPJ), RNA Polymerase II (Pol II), acetylated histone H3 (AcH3), trimethylated histone H3 lysine 27 (MeH3K27) or Ikaros to *Hes1* promoter expressed in fold enrichment with corresponding standard deviations (see Figure S7.7 for positive and negative controls). CHIP was performed on untreated (-) MEL cells or MEL cells treated with DMSO for 3 days (+) with specific antibodies (grey bars) or isotype-matched immunoglobulin G (IgG; white bars; rab: rabbit; go: goat) and analyzed by qPCR; fold enrichment was calculated using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using *Thp* (Tamm-Horsfall protein) promoter as internal control. Asterisk (\*;  $p < 0.05$ ) represent a significant variation between + vs. - according to Student's t test.

To further understand the transcriptional regulation of *Hes1* during MEL differentiation, we analysed the assembly of the transcription pre-initiation complex (PIC), which is composed of the RNA polymerase II (Pol II) and the general transcription factors (Venters and Pugh, 2009), at *Hes1* promoter. In accordance with higher expression levels of *Hes1*, recruitment of Pol II and TATA-binding protein (TBP) are augmented in differentiated MEL cells (Figure 7.2C and S7.2A). Then, chromatin organization at *Hes1* promoter was defined by analyzing histone H3 post-translational modifications. Lysine 9 and 14 acetylation of H3 (AcH3) is generally enriched at transcriptionally active gene (MacDonald and Howe, 2009) and was found to be significantly increased in differentiated cells (Figure 7.2D). Conversely, trimethylation of lysine 27 of H3 (MeH3K27), which was shown to be associated to the repressed *Hes1* promoter (Kleinmann et al., 2008), is decreased in DMSO-induced MEL cells (Figure 7.2E). Thus, when MEL cells differentiate upon DMSO treatment, augmented *Hes1* expression is associated with NICD recruitment, PIC formation and transcriptionally permissive chromatin organization at *Hes1* promoter.

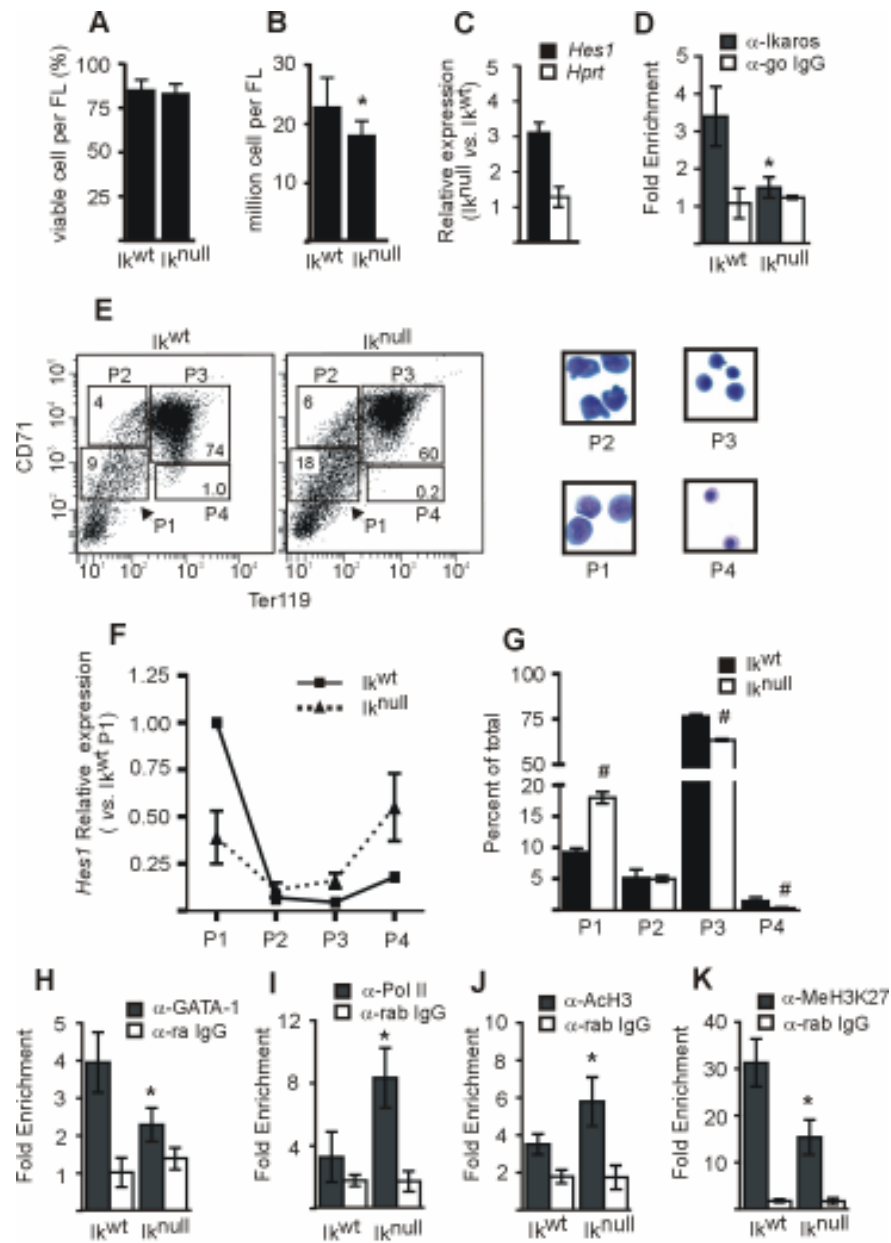
### **7.3.3 Ikaros is involved in *Hes1* gene regulation in erythroid cells**

In lymphoid cells IKZF1 (Ikaros) is involved in *Hes1* gene regulation (Chari and Winandy, 2008; Dumortier et al., 2006; Kathrein et al., 2008; Kleinmann et al., 2008). Interestingly, Ikaros is expressed in erythroid cells (Nakayama et al., 2000; O'Neill et al., 2000) and its expression is maintained MEL cells with no significant variation after 3 days of DMSO induction (Figure S7.2B). Nonetheless, CHIP analysis revealed that Ikaros recruitment to *Hes1* promoter is slightly but significantly reduced upon DMSO treatment (Figure 7.2F), when *Hes1* expression is enhanced (Figure 7.1A).

To define the importance of Ikaros in *Hes1* gene regulation in EryC, we used 14.5 dpc fetal liver erythroid cells (EryC) extracted from mouse embryos that do not express Ikaros protein (Ik<sup>null</sup>, (Georgopoulos et al., 1994)). At this developmental stage, fetal liver is mostly composed of EryC (>80%;(Kina et al., 2000; Socolovsky et al., 2007)). When Ikaros is absent, no significant difference in EryC morphology or viability could be

detected (Bottardi et al., 2009) when compared to wild type fetal liver EryC ( $Ik^{wt}$ ; Figure 7.3A). However, a 25% decrease in the number of cells per fetal liver is noticeable at 14.5 dpc (Figure 7.3B). We hypothesized that if Ikaros is also a repressor of *Hes1* in EryC, we should observe an upregulation of *Hes1* gene in  $Ik^{null}$  fetal liver EryC. As expected, *Hes1* expression is increased in  $Ik^{null}$  relative to  $Ik^{wt}$  fetal liver EryC (Figure 7.3C). Accordingly, Ikaros is recruited to *Hes1* promoter in  $Ik^{wt}$  EryC (Figure 7.3D). These results indicate that Ikaros is directly involved in *Hes1* repression in fetal liver EryC.

To further investigate the reduction of cell number in  $Ik^{null}$  FL, employing fluorescence-activated cell sorting (FACS) we isolated four populations of cells from  $Ik^{null}$  and  $Ik^{wt}$  fetal liver EryC that correspond to different stages of erythroid cell maturation (Socolovsky et al., 2007; Zhang et al., 2003). These populations were selected according to the expression levels of the cell surface markers CD71 (transferrin receptor; expressed on proliferating cells) and Ter119 (erythroid specific) (Figure 7.3E). In the absence of Ikaros we observed an upregulation of *Hes1* in the basophilic/chromatophilic/orthochromatophilic erythroid populations P3 and P4 (Figure 7.3F; as expected from Figure 7.3C). Interestingly, the number of cells in P3 and P4 was reduced in  $Ik^{null}$  vs.  $Ik^{wt}$  fetal liver EryC, suggesting that the absence of Ikaros that leads to abnormal upregulation of *Hes1*, interferes with normal terminal erythroid differentiation (Figure 7.3G). Thus, Ikaros repressive role on *Hes1* favours terminal erythroid differentiation of 14.5 dpc fetal liver EryC. Finally, in  $Ik^{null}$  fetal liver a downregulation of *Hes1* is detectable in the P1 population whereby 90% of the cells are erythroid progenitors (Figure 7.3F). This population contains Burst Forming Unit-Erythroid (BFU-E) and is enriched in erythroid progenitors of the Colony Forming Unit-Erythroid precursors (Zhang et al., 2003). The increased number of cells in that population suggests that *Hes1* and/or Ikaros exert an opposite effect in erythroid progenitors vs. in differentiated EryC (Figure 7.3G).



**Figure 7.3. Ikaros involvement in erythroid differentiation of 14.5 dpc fetal liver EryC.**

(A-B) Ikaros wild type ( $Ik^{wt}$ ) and Ikaros null ( $Ik^{null}$ ) 14.5 dpc fetal livers cells (EryC) were subjected to a viable cell count by trypan blue exclusion. (A) Graphical representation of the percentage of viable cells per fetal liver (FL) for each background with corresponding standard deviation. (B) Graphical

representation of the number of viable cells per FL with corresponding standard deviations. Asterisks (\*:p < 0.001) represent a significant variation between  $Ik^{null}$  vs.  $Ik^{wt}$  according to Student's t test. **(C)** Graphical representation of the relative expression (y-axis) of *Hes1* (black bars) or *Hprt* (white bars) with corresponding standard deviations in  $Ik^{null}$  vs.  $Ik^{wt}$  EryC. Relative expression was calculated according to Pfaffl (Pfaffl, 2001) using *Actb* as internal control. **(D)** Graphical representation of the recruitment of Ikaros to *Hes1* promoter expressed in fold enrichment (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP was performed on  $Ik^{wt}$  or  $Ik^{null}$  cells with  $\alpha$ -Ikaros antibody (dark grey bars) or  $\alpha$ -goat immunoglobulin G ( $\alpha$ -go IgG; white bars) and analyzed by qPCR; fold enrichment was calculated using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using *Thp* (Tamm-Horsfall protein) promoter as internal control (see Figure S7.7 for positive and negative controls). Asterisk (\*:p < 0.05) represent a significant variation between  $Ik^{null}$  vs.  $Ik^{wt}$  according to Student's t test. **(E-G)**  $Ik^{wt}$  and  $Ik^{null}$  FL were collected and sorted on the basis of their level of expression of Ter119 and CD71. **(E) Left:** FACS dot plot representation of the 4 sorted populations; P1: CD71<sup>med</sup>/Ter119<sup>neg/low</sup>; P2: CD71<sup>high</sup>/Ter119<sup>neg/low</sup>; P3: CD71<sup>high</sup>/Ter119<sup>high</sup>; P4: CD71<sup>med</sup>/Ter119<sup>high</sup>. **Right:** Wright-Geimsa-stained cytopsin preparations of sorted FL cells; P1 is enriched in erythroid precursors and proerythroblasts, P2 is enriched in proerythroblasts and early basophilic erythroblasts, P3 is enriched in basophilic and polychromatophilic erythroblasts, P4 is enriched in orthochromatic erythroblasts (Socolovsky et al., 2007). **(F)** Graphical representation of the relative expression of *Hes1* (y-axis) with corresponding standard deviations in each population. Relative expression was calculated according to Pfaffl (Pfaffl, 2001) using *Actb* as internal control. **(G)** Graphical representation of the percentage of cells in each sorted populations of  $Ik^{wt}$  and  $Ik^{null}$ . Hash (#:p < 0.05) represent a significant variation between  $Ik^{null}$  vs.  $Ik^{wt}$  according to Student's t test. **(H-K)** Graphical representation of the recruitment of GATA-1, Pol II, AcH3 or MeH3K27 to *Hes1* promoter expressed in fold



enrichment (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP was performed on Ik<sup>wt</sup> or Ik<sup>null</sup> cells with specific antibodies (dark grey bars) or isotype-matched immunoglobulin G (IgG; white bars; rab: rabbit; go: goat; mo: mouse) and analyzed by qPCR; fold enrichment was calculated using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using *Thp* (Tamm-Horsfall protein) promoter as internal control (see Figure S7.7 for positive and negative controls). Asterisk (\*:p < 0.05) represent a significant variation between Ik<sup>null</sup> vs. Ik<sup>wt</sup> according to Student's t test.

### 7.3.4 Ikaros favours GATA-1-associated *Hes1* repression

We previously reported that in EryC Ikaros collaborates with GATA-1 to induce repression at specific genes (Bottardi et al., 2009). We assessed whether GATA-1 could be involved in *Hes1* promoter repression in EryC. Analysis of *Hes1* promoter revealed the presence of a conserved GATA binding site located at ~100bp downstream of Ikaros/RBPJ binding sites (Figure S7.3). Thus, we investigated the possible recruitment of GATA-1 to *Hes1* promoter by ChIP and found that GATA-1 is recruited to *Hes1* promoter in Ik<sup>wt</sup> fetal liver EryC and in MEL cells (Figures 7.3H and S7.2C). Additionally, GATA-1 recruitment to *Hes1* promoter is significantly impaired in Ik<sup>null</sup> EryC and in DMSO-treated MEL cells (Figures 7.3H and S7.2C). In line with higher levels of *Hes1* expression, Pol II and TBP recruitments are increased in Ik<sup>null</sup> vs. Ik<sup>wt</sup> cells (Figures 7.3I and S7.4A), which suggests that the absence of Ikaros favours formation of the transcription pre-initiation complex (PIC) to *Hes1* promoter. Accordingly, AcH3 is significantly increased while MeH3K27 is decreased in Ik<sup>null</sup> background (Figure 7.3J-K).

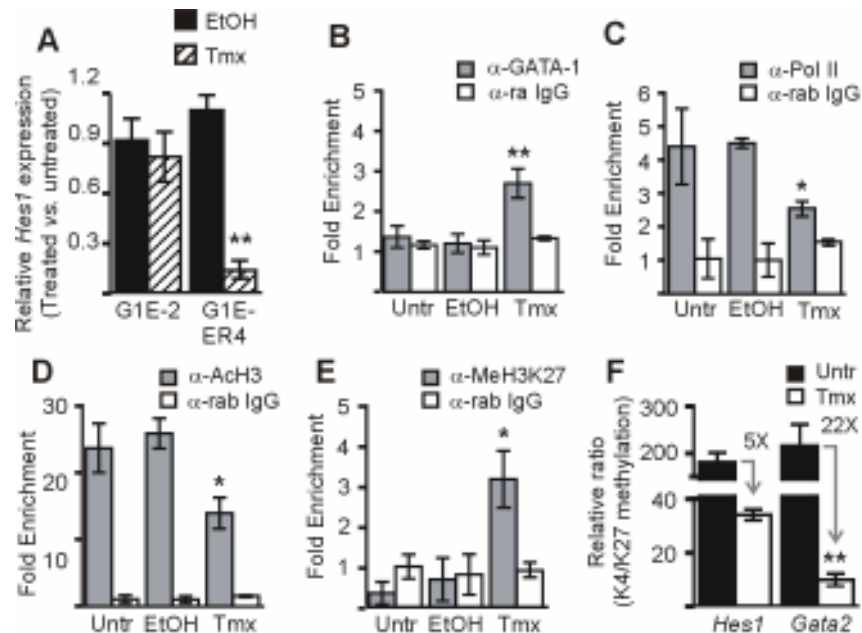
Since Ikaros and GATA-1 are recruited to repressed *Hes1* promoter, we tested the recruitment of components of the previously identified Ikaros-GATA-1-nucleated repressosome (Bottardi et al., 2009). HDAC1, CHD3 (MI-2) and ZFPM1 (FOG1) were then proposed to be critical for transcriptional repression activities of the Ikaros-GATA-1 complex. HDAC1 is an important histone deacetylase that can bind Ikaros or GATA-1 (Kim et al., 1999; Koipally et al., 1999; Rodriguez et al., 2005; Watamoto et al., 2003); MI-

2, a nucleosome remodelling enzyme, can also interact with both Ikaros and GATA-1 (Hong et al., 2005; Kim et al., 1999; Koipally et al., 1999; Rodriguez et al., 2005); and finally, FOG1 is a partner of GATA-1 known to be important for GATA-1 transcriptional activity (Cantor and Orkin, 2002; Letting et al., 2004; Pal et al., 2004). We observed that HDAC1 recruitment to *Hes1* promoter does not fluctuate with *Hes1* expression in fetal liver EryC or in MEL cells (DMSO-treated or not), suggesting that this enzyme is not recruited by Ikaros or GATA-1 to *Hes1* promoter in erythroid cells (Figures S7.2D and S7.4B). However, FOG1 and MI-2 recruitment are compromised in Ik<sup>null</sup> EryC or when MEL are induced by DMSO suggesting that Ikaros and/or GATA-1 could be involved in their recruitment/stability at *Hes1* promoter (Figures S7.2E-F and S7.4C-D).

To test whether GATA-1 is directly involved in *Hes1* repression, we used G1E-ER4 cells, which are deficient for endogenous GATA-1 but express an estrogen-dependant form of GATA-1 (GATA-1 fused to estrogen receptor; GATA-1-ER; (Tsang et al., 1997; Weiss et al., 1997)). To measure the effect of GATA-1 on *Hes1* expression, we added tamoxifen, an antagonist of the estrogen receptor which induces GATA-1-ER nuclear localization. Tamoxifen was preferred to estrogen since *Hes1* gene expression is modulated by  $\beta$ -estradiol (Muller et al.). This treatment results in high-levels of GATA-1 in the nucleus and consequently, GATA-1 target genes are rapidly downregulated or upregulated *i.e.*, GATA-1 can either repress or promote gene expression (Figure S7.5A-B; (Ferreira et al., 2005; Welch et al., 2004)). These changes in gene expression triggers G1E-ER4 cell differentiation into basophilic erythroblasts (Welch et al., 2004). Using this model, we measured the expression of *Hes1* mRNA upon tamoxifen induction by RT-qPCR. Strikingly, *Hes1* is downregulated in G1E-ER4 cells treated with tamoxifen compared to ethanol- (tamoxifen diluent) treated or untreated cells (Figure 7.4A and not shown). Tamoxifen induction had no effect on GATA-1 null parental cell line namely G1E-2 cells (Figure 7.4A).

*Hes1* downregulation which is associated with relocalization of GATA-1-ER in the nucleus, led us to assess the recruitment of GATA-1-ER to *Hes1* promoter by ChIP. Such

as expected, GATA-1-ER is only recruited to *Hes1* promoter in tamoxifen induced cells (Figure 7.4B). Subsequently, ChIP performed with Ikaros antibody in untreated, ethanol- or tamoxifen-treated G1E-ER4 cells showed that GATA-1 is not required for Ikaros recruitment to *Hes1* promoter (Figure S7.5C). To understand how GATA-1 influences the expression of *Hes1*, we assessed whether the PIC assembly is affected at *Hes1* promoter in presence or absence of GATA-1. We found that GATA-1 recruitment precludes efficient formation of the PIC at *Hes1* promoter which correlates with low levels of *Hes1* expression (Figures 7.4C and S7.5D). The influence of GATA-1 on chromatin organization at *Hes1* promoter was also tested. In tamoxifen-treated G1E-ER4, ACh3 was decreased but MeH3K27 was enriched at *Hes1* promoter (Figure 7.4D-E).



**Figure 7.4. GATA1 involvement in *Hes1* promoter repression in erythroid cells.**

(A) Graphical representation of the relative expression (y-axis) of *Hes1* with corresponding standard deviations in EtOH- or tamoxifen (Tmx)-treated vs. untreated G1E-ER4 cells. Relative expression was calculated according to Pfaffl (Pfaffl, 2001) using *Actb* as internal control. (B-E) Graphical representation of the recruitment of GATA-1, Pol II, ACh3 or MeH3K27 to

*Hes1* promoter expressed in fold enrichment (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP was performed on untreated (Untr), EtOH- or tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 cells with specific antibodies (light grey bars) or isotype-matched immunoglobulin G (IgG; white bars; rab: rabbit; go: goat; mo: mouse) and analyzed by qPCR; fold enrichment was calculated using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using *Thp* (Tamm-Horsfall protein) promoter as internal control (see Figure S7.7 for positive and negative controls). Asterisk (\*:p < 0.05) represent a significant variation between Untr vs. Tmx according to Student's t test. (F) Graphical representation of the recruitment of MeH3K4 and MeH3K27 to *Hes1* promoter and *Gata2* enhancer region -2.8 expressed in K4/K27 fold enrichment ratio (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP was performed on untreated (Untr) or tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 cells with specific antibodies and analyzed by qPCR; fold enrichment was calculated using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using *Thp* (Tamm-Horsfall protein) promoter as internal control. Fold decrease between Untr. and Tmx is indicated on the graph. Asterisk (\*\*:p < 0.001) represent a significant variation between *Hes1* vs. *Gata2* according to Student's t test.

The concomitant presence of MeH3K27 along with AcH3 and component of the PIC at repressed *Hes1* promoter in different cell type is intriguing. In ES cells and multipotent progenitor, it is proposed that bivalent chromatin is formed at different promoters to allow low-level of gene expression prior to differentiation (Bernstein et al., 2006; Cui et al., 2009; De Gobbi et al.). Bivalent chromatin, which is define by MeH3K27 (repressive mark) and trimethylation of lysine 4 of H3 (MeH3K4; active mark), had also been observed in differentiated T cells (Barski et al., 2007; Roh et al., 2006). However, during *in vitro* differentiation of CD133+ (human HSC) into CD36+ (early erythroid progenitors) cells, upregulated genes generally loose their MeH3K27 mark (Cui et al., 2009). The presence of bivalent chromatin in late differentiated erythroid cells was never reported, so we measured the levels of MeH3K4 at *Hes1* promoter. In untreated G1E-ER4 cells, the ratio of

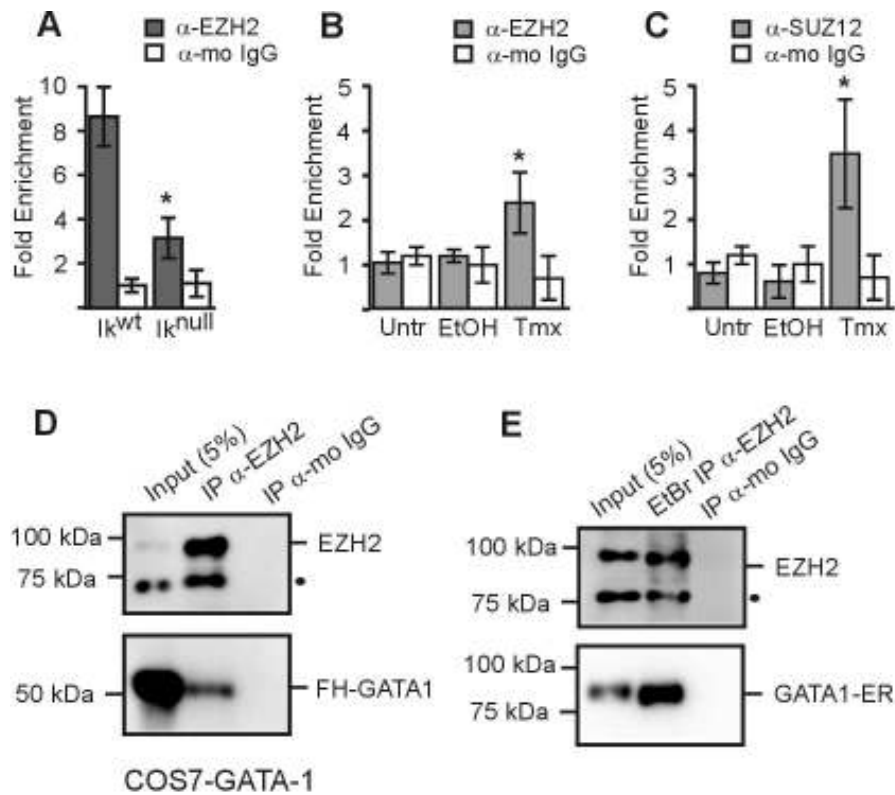
MeH3K4/MeH3K27 (K4/K27) at *Hes1* promoter is as high as the ratio for *Gata2* gene which is highly expressed in these cells (Figure 7.4F). Upon tamoxifen treatment, K4/K27 ratio is decreased 5-fold at *Hes1* promoter while it decreases 22-fold at *Gata2* gene. *Gata2* gene repression during erythroid differentiation is stable and definitive and can be associated with low K4/K27 ratio. However, *Hes1* repression is not definitive since the gene is reactivated during terminal erythroid differentiation (Figure 7.1A). The higher K4/K27 ratio at *Hes1* promoter in differentiated G1E-ER4 cells could then be associated with potential gene reactivation. Altogether, our results show that the recruitment of GATA-1 to *Hes1* promoter is associated with the formation of a bivalent chromatin which alters PIC formation at *Hes1* promoter.

### 7.3.5 EZH2 recruitment to *Hes1* promoter is GATA-1-dependant

As for untreated MEL cells and Ik<sup>wt</sup> fetal liver cells, FOG1 and MI-2 recruitment at *Hes1* promoter are increased in tamoxifen-treated G1E-ER4 when *Hes1* is repressed (Figure S7.5E-F). The recruitment of FOG1 and MI-2 are likely to be insufficient to preclude gene expression since they are not uniquely found at repressed promoters (Johnson et al., 2007; Saether et al., 2007). Since MeH3K27 is enriched at the repressed *Hes1* promoter (Figures 7.2E, 7.3K and 7.4E), we assessed the recruitment of EZH2, a methyltransferase of the Polycomb Repressive Complex 2/3/4 (PRC2/3/4) required for trimethylation of H3K27 in mammalian cells (Cao and Zhang, 2004). EZH2 was recently reported to interact with GATA-1 (Yu et al., 2009). In Ik<sup>wt</sup> fetal liver EryC, tamoxifen-treated G1E-ER4 cells as well as in untreated MEL cells, EZH2 is recruited to the repressed *Hes1* promoter (Figures 7.5A-B and S7.2G). In untreated G1E-ER4, EZH2 is not recruited to *Hes1* promoter which is not enriched in MeH3K27 (Figure 7.5B). Similarly, SUZ12, another component of the PRC2 is only recruited to *Hes1* promoter when GATA-1 is present at *Hes1* in G1E-ER4 cells (Figure 7.5C). Interestingly, EZH2 association with *Hes1* promoter is impaired in Ik<sup>null</sup> EryC and abolished when MEL cells are differentiated (Figures 7.5A and S7.2G). Since we previously showed that *Gata-1* expression is not modulated by the absence of

Ikaros in fetal liver EryC (Bottardi et al., 2009), our results indicates that Ikaros contributes to GATA-1-dependant recruitment of EZH2 and the concomitant *Hes1* promoter repression. Moreover, our data shows that when MEL cells are induced to erythroid differentiation, the upregulation of *Hes1* is associated with impairment of Ikaros, GATA-1, FOG1, MI-2 and EZH2 recruitment to *Hes1* promoter.

EZH2 and SUZ12 can co-immunoprecipitate (IP) with GATA-1 (Figure S7.6; (Yu et al., 2009)). The specificity of EZH2 IP was confirmed by the detection of SUZ12 (another member of the PRC2/3/4 complex (Cao and Zhang, 2004)) as positive control but not CDK9, a negative control (Figure S7.6). Since EZH2 is recruited to *Hes1* promoter only when GATA-1 is present, we asked whether any other haematopoietic factor is required for GATA-1-EZH2 interaction. We induced the expression of GATA-1 in COS-7 cells (a non-hematopoietic cell line) and performed IP with  $\alpha$ -EZH2. GATA-1-EZH2 association was detected in this system (Figure 7.5D). Then, we tested whether DNA template was required for interactions between these factors. Co-IP were performed on cellular lysates treated with DNase 1 and ethidium bromide. Under these conditions, GATA-1-ER and EZH2 proteins interact together showing that DNA is not essential for GATA-1-EZH2 interactions (Figure 7.5E). Therefore, our data suggest that GATA-1 is an important mediator of *Hes1* repression by recruiting EZH2 to *Hes1* promoter.



**Figure 7.5. Regulation of *Hes1* promoter by EZH2 in EryC.**

(A-C) Histograms of the recruitment of EZH2 and SUZ12 to *Hes1* promoter expressed in fold enrichment (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP were performed on Ik<sup>wt</sup> or Ik<sup>null</sup> EryC (A; dark grey bars) and on untreated (Untr), EtOH- or tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 cells (B, C; light grey bars) with  $\alpha$ -EZH2,  $\alpha$ -SUZ12 or isotype-matched immunoglobulin G (IgG; white bars; mo: mouse) and analyzed by qPCR; fold enrichments were calculated with the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  formula whereby *Thp* (Tamm-Horsfall protein) promoter was the internal control (see Figure S7 for positive and negative controls). Asterisks (\*:p < 0.05) indicate significant variations between Ik<sup>null</sup> vs. Ik<sup>wt</sup> or Untr. vs. Tmx according to Student's t test. (D and E) Western blot presenting results obtained after immunoprecipitation (IP) with either the  $\alpha$ -EZH2 or the  $\alpha$ -IgG (isotype-matched immunoglobulin G; mo: mouse). (D) Results of IP made with the  $\alpha$ -EZH2 or  $\alpha$ -IgG in COS7 cells engineered to

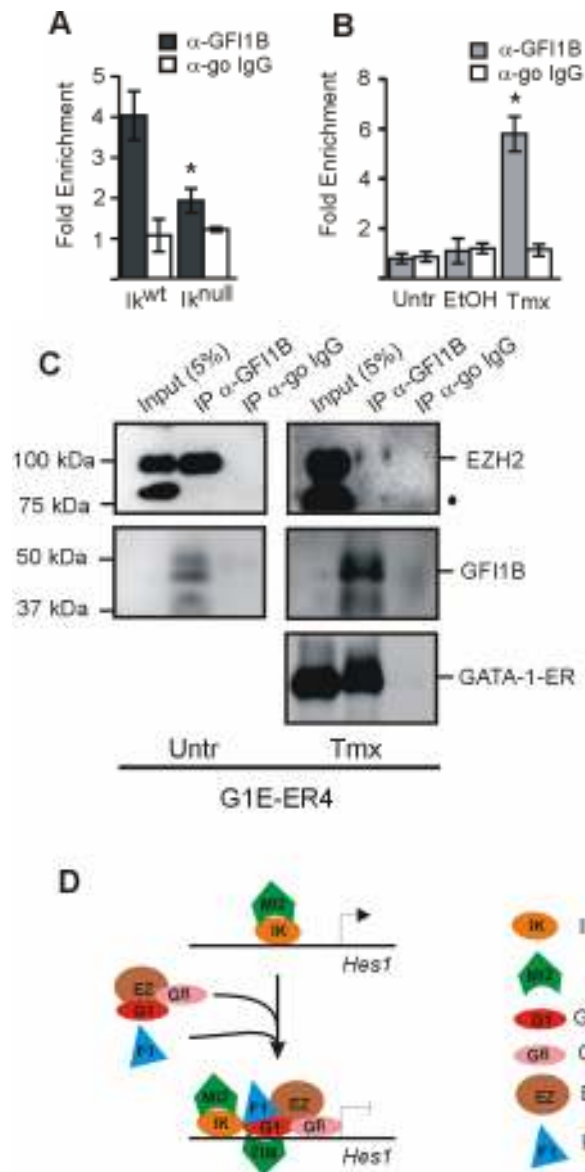
ectopically express GATA-1 protein. (E) Results of IP made with the  $\alpha$ -EZH2 or  $\alpha$ -IgG in tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 treated with ethidium bromide (EtBr) and DNase 1, as indicated on the top of panels. Protein interactions were revealed by immunodetections with specific antibodies; upper membranes:  $\alpha$ -EZH2; lower membranes:  $\alpha$ -GATA-1. Dot (●) is pointing at a band of unknown origin. Specific bands and molecular weight are respectively specified on the right and the left sides of panels.

### 7.3.6 Ikaros is required for GFI1B recruitment to *Hes1* promoter

GFI1B is another transcription factor involved in repression of several genes in erythroid cells. As reported before, GFI1B can immunoprecipitate with GATA-1 and EZH2 in tamoxifen treated G1E-ER4 cells and is important in the recruitment of PRC2/3/4 complex to specific promoters (Yu et al., 2009). Thus, we assessed whether GFI1B could be involved in the recruitment of EZH2 to *Hes1* promoter in erythroid cells. In *Hes1* promoter we found two AATC conserved sites (Figure S7.3), which correspond to potential binding sites for GFI1B (Anguita et al.; Grimes et al., 1996; Tong et al., 1998; Zweidler-Mckay et al., 1996). ChIP analysis showed that GFI1B is recruited to *Hes1* promoter in fetal liver EryC (Figure 7.6A) but, GFI1B recruitment is impaired in absence of Ikaros. Similarly, enrichment of GFI1B was only detected in tamoxifen-induced G1E-ER4 (Figure 7.6B). An IP with  $\alpha$ -GFI1B was performed in untreated G1E-ER4 cells and showed that EZH2 can co-immunoprecipitate with GFI-1B in absence of GATA-1. Since we observed that GATA-1 is essential for the recruitment of GFI1B and EZH2, this result suggests that GATA-1 nucleates a GFI1B and EZH2 containing repressive complex to *Hes1* promoter.

In summary, we show that Ikaros favours *Hes1* repression in erythroid cells by stabilizing the formation of a repressive complex nucleated by GATA-1. The presence of EZH2 in this complex favours MeH3K27 which is associated with a bivalent chromatin state at *Hes1* promoter. The repression of *Hes1* is required to promote erythroid differentiation.





**Figure 7.6. EZH2-GFI1B interaction**

(A-B) Graphical representation of the recruitment of GFI1B to *Hes1* promoter expressed in fold enrichment (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP was performed on Ik<sup>wt</sup> or Ik<sup>null</sup> cells (A) or untreated (Untr), EtOH- or tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 cells (B) with specific antibody (FL cells: dark grey bars; G1E-ER4 cells: light grey bars) or isotype-matched immunoglobulin G (IgG; white bars; go: goat) and analyzed by qPCR; fold

enrichment was calculated using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using *Thp* (Tamm-Horsfall protein) promoter as internal control. Asterisk (\*:p < 0.05) represent a significant variation between  $Ik^{null}$  vs.  $Ik^{wt}$  or Untr vs. Tmx according to Student's t test. (C) Western blot representations of protein interaction between GF11B and EZH2 and GATA1. Total untreated (Untr) or tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 proteins were immunoprecipitated (IP) with specific antibodies or with isotype-matched immunoglobulin G (IgG; go: goat) as indicated on the top of the panel. Protein interactions were revealed by Western Blot with specific antibodies; starting from the upper membrane:  $\alpha$ -EZH2,  $\alpha$ -GF11B and  $\alpha$ -GATA-1 (lower membrane). Specific bands and molecular weight are specified on the right and the left of the panel respectively. Dot (●) represent a non-specific band (D) Summary of the recruitment of transcription factors to Hes1 promoter. Ikaros is initially recruited to Hes1 promoter and upon erythroid differentiation, GATA-1 is recruited which favors the formation of a EZH2-containing repressive complex.

## 7.4 Discussion

Results presented in here suggest that the decreased expression of *Hes1* promotes EryC differentiation (Figure 7.1). Furthermore, the characterization of *Hes1* gene regulation led us to define a novel non-canonical mechanism of *Hes1* regulation whereby Ikaros and GATA-1 are required for the recruitment of Mi-2 and the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), which are involved in *Hes1* repression at critical stage of erythroid cell differentiation; when GATA-1 high-level expression is required for EryC differentiation. We therefore identified a new Gata-1-dependent mechanism involved in control of EryC formation.

#### **7.4.1 Expression levels of *Hes-1* and erythroid terminal differentiation**

Notch is implicated in formation of hematopoietic stem cells. *Ex vivo* or *in vitro*, the constitutive activation of the Notch pathway in early hematopoietic progenitors results in the expansion of these cells without impairment of their capacity to differentiate into lymphoid cells (Stier et al., 2002; Varnum-Finney et al., 2003; Vercauteren and Sutherland, 2004). The Notch pathway is not only affecting hematopoietic progenitor cells since the activation of Notch promotes T- while inhibits B-lymphopoiesis from common progenitor cells (Izon et al., 2002), it influences myeloid cell homeostasis *in vivo* (Kawamata et al., 2002; Radtke et al., 2002) and apoptosis in mouse yolk sac and bone marrow EryC (Robert-Moreno et al., 2007). Finally, although debated, the Notch pathway has also been reported to influence EryC formation (Carlesso et al., 1999; Dando et al., 2005; Henning et al., 2007; Ishiko et al., 2005; Jang et al., 2004; Lam et al., 2000; Robert-Moreno et al., 2007; Sugimoto et al., 2006).

The *Hes1* gene is a critical target of Notch in hematopoietic cells (Kojika and Griffin, 2001). This is exemplified by the fact that the loss of *Hes1* function has been observed in different cases of myeloid dysplasia and leukemia (Alcalay et al., 2003; Kawamata et al., 2002; Qi et al., 2008). The analysis of subpopulations of fetal liver cells corresponding to diverse stages of EryC differentiation which is presented in figure 7.3, reveals a sharp decrease in *Hes1* expression from the early progenitor cell population (P1) to the enriched proerythroblast cell stage of differentiation (P2). The dynamic regulation of *Hes1* during EryC differentiation and especially, the decreased expression of *Hes1* in the population of cells enriched in proerythroblasts is likely to be required for terminal differentiation of EryC since, HES-1 can suppress GATA-1 activity (Ishiko et al., 2005) and GATA-1 has to be expressed at high-levels at this specific stage of EryC differentiation (Pevny et al., 1991; Whyatt et al., 1997). Indeed, in absence of GATA-1, mice die of massive apoptosis of proerythroblast cells between embryonic day e10.5 and e11.5 (Pevny et al., 1995; Pevny et al., 1991; Weiss and Orkin, 1995).

Using a mouse erythroleukemia cell line (MEL cells), we demonstrate that *Hes1* downregulation promotes terminal erythroid differentiation upon DMSO treatment. In Figure 7.1 we show that the knockdown of *Hes-1* significantly increases the percentage of differentiated cells such as detected by DAF staining and by the expression levels of “differentiation marker” genes. Since it has previously been reported that Notch1 downregulation impairs MEL cell differentiation (Shelly et al., 1999) and *Notch1* downregulation should abate *Hes1* transcription, we conclude that *Hes1* downregulation cannot account for the previously reported effect of Notch1 on EryC differentiation. The discrepancy between our results and previous results on Notch1 downregulation could originate from the fact that: (i) Notch1 is a regulator of several target genes in erythroid cells and some of these targets might influence MEL cells differently than *Hes1*; (ii) other Notch receptors such as Notch2 are likely involved in *Hes1* gene regulation in EryC (Zeuner et al.) and (iii) *Hes1* is not solely regulated by the Notch pathway (Chari and Winandy, 2008; Dumortier et al., 2006; Ikawa et al., 2006; Ingram et al., 2008; Jin et al., 2009a; Jin et al., 2009b; Kathrein et al., 2008). The latter is highlighted in this report since we have evidence that Ikaros and GATA-1 are dominant regulators of *Hes1* expression and are required for spontaneous *Hes1* silencing at specific stage during EryC differentiation.

#### **7.4.2 *Hes1* gene regulation by Ikaros and GATA-1 in EryC**

Gata-1 and Ikaros are critical regulators of hematopoiesis and they both influence EryC homeostasis. Many genes are regulated by GATA-1 in EryC (Migliaccio et al., 2005; Morceau et al., 2004; Papetti et al.) but, only few genes regulated by Ikaros have been identified in these cells (Bottardi et al., 2009; Dijon et al., 2008; O'Neill et al., 2000; Pulte et al., 2006). In EryC, the influence of Ikaros on gene regulation has been studied mainly at the  $\beta$ -globin locus (Bottardi et al., 2009; Bottardi et al.; Keys et al., 2008; Lopez et al., 2002; O'Neill et al., 2000). An expression array analysis has provided the evidence that in these cells Ikaros influences the expression of different genes regulating apoptosis (Pulte et al., 2006). Mechanistically, Ikaros can physically interact with GATA-1 and together,

promote silencing of the  $\gamma$ -globin genes in a developmental-stage specific manner in EryC (Bottardi et al., 2009; Bottardi et al.). The combinatorial effect of Ikaros and GATA-1 is also implicated in silencing of the *Gata-2* general promoter in EryC (Bottardi et al., 2009; Bottardi et al.). Observations made at the  $\gamma$ -globin and the *Gata-2* general promoters led us to propose that when implicated in silencing, Ikaros and GATA-1 can nucleate a repressive complex .

Such as detected at the  $\gamma$ -globin and *Gata-2* general promoters, GATA-1 acts together with Ikaros to repress *Hes1* promoter activity in EryC (Bottardi et al., 2009). We demonstrate in here that Ikaros is directly recruited at *Hes1* promoter and *Hes-1* expression is significantly increased in the absence of Ikaros (*i.e.*, Ik<sup>null</sup> fetal liver EryC) (Figure 7.3C). Thus, Ikaros regulates the Notch target gene *Hes1* in EryC. Since it is reported that Ikaros represses *Hes1* gene expression in a dominant manner in lymphoid cells (Chari et al.), Ikaros could also exert a dominant influence over *Hes1* transcriptional regulation in EryC. However, results obtained in G1E-E4 cells indicate that in EryC Ikaros needs to be accompanied by GATA-1 to repress *Hes1* expression (Figure 7.4). In fact, we demonstrate that Ikaros facilitates GATA-1 recruitment at *Hes1* promoter and GATA-1 promotes the attachment of different transcriptional repressors hence, *Hes1* transcriptional repression in EryC. More specifically results collected in the different models used for this study (*i.e.*, fetal liver EryC, G1E-E4 and MEL cells) indicate that Ikaros and GATA-1 are required for the recruitment of the transcriptional repressor Gfi-1B as well as the cofactor Fog-1 and members of the polycomb repressive complex 2 *i.e.*, Suz12 and Ezh2. GATA-1 also enhances the recruitment of the nucleosome remodeling ATPase Mi-2, a subunit of the NuRD chromatin remodeling complex at *Hes1* promoter in these cells.

In the context of GATA-1/FOG-1, such as observed at *Hes1* promoter, Mi-2 can be linked to gene activation or repression (Miccio et al.). Thus, we search for other factors potentially implicated in *Hes1* repression when Ikaros and Gata-1 are present at *Hes1* in EryC. Since the NuRD complex can facilitates the recruitment of the epigenetic modifying complex PRC2 (Morey et al., 2008) and Gata-1 as well as Gfi-1B were previously reported to be

capable of interaction with subunits of PRC2 (Yu et al., 2009), we have looked for indication to define whether PRC2 could be implicated in *Hes1* repression in EryC. Like indicated in figure 7.4, two subunits of the PRC2 namely, Ezh2 and Suz12 are recruited at *Hes1* promoter in a GATA-1-dependent manner in G1E-E4 cells. The implication of PRC2 in *Hes1* repression is further supported by the increased level of H3K27me3 and Ezh2, a histone methyltransferase which specifically tri-methylate H3K27, at the *Hes1* promoter.

Thus, collectively these results support a model (Fig 7.6D) whereby Ikaros facilitates GATA-1 recruitment and subsequently, GATA-1 promotes the recruitment of repressive factors including the PRC2 complex and hence, participates in repression of *Hes1* in EryC.

### **7.4.3 Chromatin organization and *Hes1* gene regulation**

The chromatin organization is mostly set by chromatin remodeling or histone modifying factors. At *Hes1* promoter we identified that the recruitment of the nucleosome remodeling ATPase Mi-2, and the histone methyl-transferase Ezh2 is influenced by Ikaros and Gata-1.

H3K27me3 as been shown to be associated to lineage-specific and dynamically regulated genes (Filion et al., 2010; Sparmann and van Lohuizen, 2006; Young et al., 2011). H3K27 can be easily modified by methylase and demethylase according to the status of the cell and the need in specific gene expression. Our data show that the variation of H3K27me3 enrichment correlates with *Hes1* expression levels. Although H3 acetylation decreases when *Hes1* promoter is silent and enriched in H3K27me3, it remains recruited at a significant level. Since, *Hes1* regulation can be modified rapidly upon the Notch pathway activation in progenitor as well as in differentiated cells like EryC, we then questioned whether the dynamic regulation of *Hes1* could require a chromatin organization reminiscent to bivalent chromatin structure which was first observed and defined in embryonic stem cells (Bernstein et al., 2006). Bivalent chromatin is characterized by the enrichment of H3K27me3 and H3K4me3. These histone post-translational modifications are normally associated with transcriptionally repressive and permissive chromatin (respectively).

Although it has been characterized in embryonic stem cells, it is also present in progenitor and in differentiated cells such as demonstrated in T-lymphoid cells (Roh et al., 2006). Bivalent chromatin can predispose to gene activation as well as inactivation. The resolution of the bivalent chromatin generally occurs during the commitment of cells but it is not always the case. *Hes1* is a dynamically regulated gene and it is reported to be in a bivalent chromatin in ES cells thus, we specifically assessed whether it could be in a chromatin marked by both H3K27me3 and H3K4me3. We found that indeed, *Hes1* is marked by both histone post-translational modifications in EryC. This could be common to genes needed to be reactivation under specific conditions of stress and genes dynamically regulated in differentiated cells.

#### **7.4.4 *Hes1* in erythroid differentiation and diseases**

Gata-1 is required for EryC differentiation and it influences EryC homeostasis. It has been shown that Gata-1 overexpression in EryC block cellular differentiation (Whyatt et al., 2000; Whyatt et al., 1997) and transgenic mice overexpressing Gata-1 die of anemia at around E13.5. These mice are then characterized by the inhibition of definitive EryC differentiation (Whyatt et al., 2000; Whyatt et al., 1997). These phenotypes can be explained by its ability to regulate genes encoding factors controlling cell cycle, growth and/or differentiation *e.g.*, *c-Myb*, *c-Myc*, *c-Kit*, *Gata-2* and *Cyclin D1* genes (Muntean et al., 2007; Rodriguez et al., 2005; Rylski et al., 2003). Interestingly, Gata-1 is involved in a feedback loop mechanisms with *c-myb* during erythroid differentiation since *c-myb* is known to repress the activity of GATA-1 (Takahashi et al., 2000). According to the literature and to our study, *Hes-1* can also be part of a feedback loop mechanism. Indeed, it has been shown that *Hes1* block the activity of GATA-1 (Ishiko et al., 2005). Here, we are presenting here the first evidence that *Hes-1* is also involved in EryC differentiation and directly regulated by Gata-1. Our data support a repressive function for *Hes1* during erythroid terminal differentiation. Interestingly, correlating with this, a recent report showed that gamma secretase inhibitor (which block Notch activation) induce erythroid

differentiation of erythroleukemia cell lines (Okuhashi et al., 2010). Thus, the repression of the Notch target gene *Hes1* by Ikaros and GATA-1 in erythroid cells is likely to favor final steps of erythroid terminal differentiation.

The implication of Ikaros and GATA-1 in the regulation of *Hes1* is relevant for the comprehension of several myeloid blood disorders. For example, GATA-1 mutation is observed in two types of malignant hematopoiesis. GATA-1 mutations affecting interaction between GATA-1 and FOG-1 result in dyserythropoietic anemia and thrombocytopenia (Del Vecchio et al., 2005; Nichols et al., 2000). The second group of GATA-1 mutations results in the exclusive expression of the short form of GATA-1 (GATA-1s) in patients with Down syndrome who develop acute megakaryoblastic leukemia (DS-AMKL) (Greene et al., 2003). Mutations of Ikaros have been observed in blast crisis CML, MPN and AML (Jager et al., 2010; Nakayama et al., 1999; Yagi et al., 2002). Moreover, *Hes1* was associated with blast crisis CML, and upregulated in MDS and AML (Alcalay et al., 2003; Kawamata et al., 2002; Nakahara et al., 2010; Qi et al., 2008). Thus, the understanding that Ikaros and GATA-1 are regulators of *Hes1* is an interesting advance in the comprehension of the development of myeloid disorders associated with defective expression of these factors.

## **7.5 Materials and methods**

### **7.5.1 Mouse line**

We utilized a mouse model characterized by the deletion of the c-terminal part of Ikaros which results in protein instability and the absence of Ikaros protein in all tissues (Ik<sup>null</sup>; Wang 1996 Immunity). Heterozygous Ikaros null (Ik<sup>null/+</sup>) male and female were bred and Ik<sup>wt</sup> or Ik<sup>null</sup> 14.5 dpc fetal liver cells were isolated. Animals were sacrificed by cervical dislocation. Fetal livers were rinsed several times with phosphate-buffered saline (PBS) to remove maternal blood and then, homogenized to form cell suspension in clean PBS. Animal experiments were conducted in accordance with the Canadian Council on Animal



Care (CCAC) guidelines and approved by the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal care committee.

### 7.5.2 Cell line

All cells were grown in a humidified incubator at 37°C with 5% carbon dioxide.

G1E-2 (parental Gata-1 null cell line) and G1E-ER4 (Gata-1 null cell line expressing an inducible Gata-1-ER protein) (Weiss 1997 MCB; Tsang 1997 Cell) were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco) containing 13% Fetal Bovine Serum (FBS; Sigma), 1.7% penicillin-streptomycin (PS; Wisent), 2U/mL erythropoietin (Eprex), 1.1 mM 1-thioglycerol (sigma M6145) and 0.5% conditioned medium from a kit ligand producing CHO cell line. To induce nuclear localization of Gata-1-ER, tamoxifen (Sigma) was added to the culture media at a final concentration of 1 $\mu$ M for 24h. Since tamoxifen is dissolved in ethanol (EtOH), equal volume of EtOH was added to control dishes.

Mouse erythroleukemia (MEL; C-88) cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) containing 10% FBS and 1% PS. To knock-down expression of *Hes1*, pLKO.1 vectors containing short hairpin RNA (shRNA) specific to *Hes1* mRNA or unspecific (scramble; Scr) (Sigma) were transfected by electroporation (GenePulser Xcell, BioRad) in MEL cells. Puromycin (0.3  $\mu$ g/mL) was then added in the culture media to select for cells with stable integration of the pLKO.1 vector and thus, stably express the shRNA. Two different shRNA molecules were used to stably knock-down *Hes1* in MEL cells (sh327 and sh329). The shScramble was also stably integrated in MEL cells (control line: shScr). To induce erythroid differentiation, dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to the culture media at a 2% final concentration.

### 7.5.3 Wright-Geimsa

100 000 to 150 000 MEL or 14.5 dpc FL cells were collected and attached to glass microscope slides by centrifugation for 7 min at 600 rpm at high acceleration in a Cytospin3 centrifuge (Shandon). Slides were air dried, fixed in 100% methanol for 20 s at room temperature, and stained for 5 min at room temperature in Wright-Giemsa stain modified solution (Sigma). Slides were then extensively washed in distilled water and completely dried. Cell morphology was analyzed with a Leica DMRE microscope and images were acquired with Qimaging digital camera and Openlab3.1 software.

### 7.5.4 Diaminofluorene and benzidine staining

100 000 to one million cells were collected and stained with either diaminofluorene solution (0.01% diaminofluorene (sigma; dissolved to 1% in 90% glacial acetic acid (Fisher)) and 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fisher) in 0.2M Tris-HCl pH 7) or benzidine solution (0.42% Benzidine (sigma), 4.2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fisher), 12.8% Glacial Acetic Acid (Fisher) in H<sub>2</sub>O). Positive blue cells were counted on hemacytometer.

### 7.5.5 RT-PCR and quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated by Trizol (Invitrogen) and used for cDNA synthesis with oligo(dT)<sub>12-18</sub> and SuperScript Reverse Transcriptase III (Invitrogen). Semi-quantitative PCR or quantitative real-time PCR (qPCR) were carried out with primer sets specific for *Hba-a1*, *Hbb-b1*; *Alas2*, *Epor*, *Spf1(Pu.1)*, *Hes1*, *Klf1*, or *Bcl2l1* (Primer description and sequences are available as supplementary method). Primer set specific for *Actb* was use as internal control and primer set specific for *Hprt* was used as additional control. The transcripts were either detected on agarose gel with AlphaImager (Cell Biosciences) (semi-quantitative analyses) or stained with SYBR Green (Invitrogen) and analyzed with the iCycler iQ<sup>TM</sup> (BioRad) system (quantitative analyses). The equation of Pfaffl (Pfaffl, 2001) was employed for quantification:

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)}}$$

$E_{target}$ : target qPCR efficiency;  $E_{ref}$ : control qPCR efficiency; CP: crossing point;  $\Delta CP_{target}$ : CP deviation of reference sample vs. test sample target gene transcript;  $\Delta CP_{ref}$ : CP deviation of reference sample vs. test sample control transcript.

Unpaired ‘Student’s t test’ was used to determine the levels of statistical significance (p-value).

### 7.5.6 Western blot analysis and protein immunoprecipitation

Western blots were performed using two million cells collected from the culture media. Cells were lysed in saline solution (1mM PMSF, 150 mM NaCl) and sonicated (Branson, Digital Sonifier). Supernatants collected after centrifugation (10 minutes, 4°C, 10000 rpm) were diluted 1:2 in sample loading buffer (50mM Tris HCl pH6.8, 10% Glycerol, 2% SDS, 0.10% Bromophenol Blue, 0.25%  $\beta$ -mercapto-ethanol). Samples were migrated on SDS-PAGE and transferred on polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Santa Cruz). The membranes were incubated for one hour in a TBS-T-5% milk solution (Tris HCl pH 7.6, KCl, NaCl, 0.5% Tween, 5% milk) and immunoblotted overnight with either HES1 (Millipore), GATA-1 (Santa Cruz), GATA-2 (Santa Cruz) or EZH2 (Santa Cruz) antibody. Membranes were washed in TBS-T and incubated for one hour with a secondary antibody coupled to Horseradish peroxidase (HRP) (eBioscience) directed to the primary antibody; all primary antibodies were raised in mouse with the exception of the anti-Hes1 and the anti-Gata-1 which were raised in rabbit and rat respectively. Membranes were washed again in TBS-T and revealed with Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) on a Fujifilm LAS-4000 luminescent image analyzer. Membranes were subsequently washed with TBS-T and immunoblotted as described above with either GAPDH or ACTIN as loading control or SUZ12 or CDK9 as co-immunoprecipitation (IP) controls.

For IP,  $1.10^7$  cells were collected, rocked for 15 minutes in a Lysis Buffer (150mM NaCl, 20mM HEPES pH 7.9, 0.2mM EDTA, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40, 25% Glycerol, 1mM PMSF, 1μg/ml Aprotinin, protease inhibitors cocktail (sigma #P8340)) and centrifuged for 15 minutes at 14000g at 4°C. Cell lysates were incubated at 4°C for one hour with Protein-G Agarose beads (Upstate) and centrifuged for 1 minute at 10000g. Protein containing supernatants were rocked over night on a rocker with appropriate antibodies (anti Gata-1 clone M-20 (Santa Cruz), anti Ezh2 (Millipore) and isotype matched- immunoglobulins (Santa Cruz)). The next day, immuno-complexes were collected by adding Protein-G Agarose beads for 3 hours followed by a centrifugation for 1 minute at 10000g at 4°C. Beads were washed 3 times with ice cold Lysis Buffer and then immuno-complexes were collected by boiling beads for 5 minutes in a Sample Loading Buffer (50mM Tris HCl pH 6.8, 10% Glycerol, 2% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 0.1% Bromophenol Blue (Bio Basic), 2.5% β-mercapto-ethanol (Sigma)). Half of the IP was loaded on SDS-PAGE and Western blot was performed as described above.

### **7.5.7 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay and quantitative Real-Time PCR assay**

The ChIP assay was carried out as per manufacturer's instruction (Millipore). Briefly, cells were crosslinked in 1% formaldehyde for 10 minutes at 37°C. Cells were then incubated in lysis buffer containing 1μg/mL aprotinin and 1mM PMSF. Then, extracts are sonicated in order to obtain chromatin fragments of 400-800 bp on average (Branson, Digital Sonifier). After centrifugation for 10 minutes at 13000 rpm, chromatin was diluted 1:10 in presence of protease inhibitors and pre-cleared for 30 minutes with salmon sperm DNA/Protein A agarose beads (Millipore). Chromatin fragments were incubated with the appropriate antibodies overnight at 4°C. Beads were then washed with low-salt buffer, high-salt buffer, LiCl buffer, and twice with TE buffer (Millipore). Chromatin fragments were eluted from beads in elution buffer (0.1M NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS). Decrosslinking was carried out for 4 hours at 65°C in 0.2M NaCl. Following proteinase K treatment, DNA was phenol-

chloroform extracted, precipitated with 100% ethanol and re-suspended in water. Antibodies used were directed against diacetylated histone H3 (K9 and K14), trimethylated histone H3 (K27), HDAC1 and EZH2 (AC22) (Millipore); TFIID (TBP; SI-1), Ikaros (E-20), GATA-1 (N6), Pol II (N-20), FOG (M-20), Mi2 (H-242) and RBP-J $\kappa$  (D-20) (Santa Cruz); activated Notch1 (Abcam). GATA-1 antibody was raised in rat, Ikaros, FOG and RBP-J $\kappa$  antibodies were raised in goat, EZH2 antibody was raised in mouse and all other antibodies were raised in rabbit. Isotype matched IgG (SantaCruz) was used as control. About 1/30<sup>th</sup> of immunoprecipitated and unbound (input) material was used as template for quantitative real-time PCR (qPCR) with one primer set specific for *Hes1* promoter and another primer set specific for the internal control (kidney-specific Tamm-Horsfall gene promoter; *Thp*). Control qPCR reaction were also performed to assess the specificity of the ChIP with primer set specific for  $\beta$ -globin HS2,  *$\beta$ maj*, *Gata2* -2.8 and *Gata2* 1G were used as positive controls and *Amy* and  *$\beta$ maj* were used as negative controls (Primer description and sequences are available as supplementary method). Reactions were performed using SYBR Green (Invitrogen) with the iCycler iQ<sup>TM</sup> (BioRad) system. Quantification was carried out according to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method: Fold enrichment =  $2^{-[(Ct_{ChIP_{test}} - Ct_{input_{test}}) - (Ct_{ChIP_{control}} - Ct_{input_{control}})]}$

Ct: threshold cycle; Ct ChIP: Ct value for ChIP sample; Ct input: Ct value for input sample; test: primer set of interest; control: internal control primer set.

Unpaired 'Student's t test' was used to determine the levels of statistical significance (p-value).

### 7.5.8 Cell sorting

Three 14.5 dpc fetal livers were washed and resuspended in PBS/5% heat-inactivated FBS (PBS/FBS). Cells were incubated subsequently for 30 minutes on ice with rat  $\alpha$ -Ter119,  $\alpha$ -rat fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated (BD Pharmingen) and phycoerythrin

(PE)-conjugated  $\alpha$ -CD71 (Biolegends) and sorted by high-speed fluorescence-activated cell sorting (FACS) (FACS Vantage with DIVA option; Becton Dickinson).

### 7.5.9 COS-7 cell transfection

FLAG-HA-Ikaros cDNA was cloned in pEGFP-N1 vector. COS-7 cells were transiently transfected with this construct using the Lipofectamine system, according to the manufacturer's instructions. Cells were harvested 36hr post-transfection. Note that Ikaros is only tagged with FLAG and HA and GFP is not expressed.

## 7.6 Acknowledgments and funding

We thank K. Georgopoulos for the Ikaros *null* mouse line, M. Weiss for the G1E-ER4 cell line. This work was supported by a grant from the Leukemia and Lymphoma Society of Canada and from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) held by E.M.; J.R. is supported by Fond de la recherche en santé du Québec (FRSQ) Doctoral Training Award.

## 7.7 References

Alcalay, M., Meani, N., Gelmetti, V., Fantozzi, A., Fagioli, M., Orleth, A., Riganelli, D., Sebastiani, C., Cappelli, E., Casciari, C., *et al.* (2003). Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J Clin Invest* 112, 1751-1761.

Anguita, E., Villegas, A., Iborra, F., and Hernandez, A. GFI1B controls its own expression binding to multiple sites. *Haematologica* 95, 36-46.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.

- Bartunek, P., Kralova, J., Blendinger, G., Dvorak, M., and Zenke, M. (2003). GATA-1 and c-myb crosstalk during red blood cell differentiation through GATA-1 binding sites in the c-myb promoter. *Oncogene* 22, 1927-1935.
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.
- Borggreffe, T., and Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci* 66, 1631-1646.
- Bottardi, S., Ross, J., Bourgoïn, V., Fotouhi-Ardakani, N., Affar el, B., Trudel, M., and Milot, E. (2009). Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human gamma-globin genes. *Mol Cell Biol* 29, 1526-1537.
- Bottardi, S., Zmiri, F. A., Bourgoïn, V., Ross, J., Mavoungou, L., and Milot, E. Ikaros interacts with P-TEFb and cooperates with GATA-1 to enhance transcription elongation. *Nucleic Acids Res* 39, 3505-3519.
- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 678-689.
- Brown, K. E., Guest, S. S., Smale, S. T., Hahn, K., Merkenschlager, M., and Fisher, A. G. (1997). Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* 91, 845-854.
- Cantor, A. B., and Orkin, S. H. (2002). Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 21, 3368-3376.
- Cao, R., and Zhang, Y. (2004). The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 14, 155-164.

Carlesso, N., Aster, J. C., Sklar, J., and Scadden, D. T. (1999). Notch1-induced delay of human hematopoietic progenitor cell differentiation is associated with altered cell cycle kinetics. *Blood* *93*, 838-848.

Chari, S., Umetsu, S. E., and Winandy, S. Notch target gene deregulation and maintenance of the leukemogenic phenotype do not require RBP-J kappa in Ikaros null mice. *J Immunol* *185*, 410-417.

Chari, S., and Winandy, S. (2008). Ikaros regulates Notch target gene expression in developing thymocytes. *J Immunol* *181*, 6265-6274.

Cobb, B. S., Morales-Alcelay, S., Kleiger, G., Brown, K. E., Fisher, A. G., and Smale, S. T. (2000). Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. *Genes Dev* *14*, 2146-2160.

Crispino, J. D. (2005). GATA1 in normal and malignant hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol* *16*, 137-147.

Crossley, M., Tsang, A. P., Bieker, J. J., and Orkin, S. H. (1994). Regulation of the erythroid Kruppel-like factor (EKLF) gene promoter by the erythroid transcription factor GATA-1. *J Biol Chem* *269*, 15440-15444.

Cui, K., Zang, C., Roh, T. Y., Schones, D. E., Childs, R. W., Peng, W., and Zhao, K. (2009). Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* *4*, 80-93.

Dando, J. S., Tavian, M., Catelain, C., Poirault, S., Bennaceur-Griscelli, A., Sainteny, F., Vainchenker, W., Peault, B., and Lauret, E. (2005). Notch/Delta4 interaction in human embryonic liver CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> cells: positive influence on BFU-E production and LTC-IC potential maintenance. *Stem Cells* *23*, 550-560.



- Davidson, E. H., and Levine, M. S. (2008). Properties of developmental gene regulatory networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 20063-20066.
- De Gobbi, M., Garrick, D., Lynch, M., Vernimmen, D., Hughes, J. R., Goardon, N., Luc, S., Lower, K. M., Sloane-Stanley, J. A., Pina, C., *et al.* Generation of bivalent chromatin domains during cell fate decisions. *Epigenetics Chromatin* *4*, 9.
- Del Vecchio, G. C., Giordani, L., De Santis, A., and De Mattia, D. (2005). Dyserythropoietic anemia and thrombocytopenia due to a novel mutation in GATA-1. *Acta Haematol* *114*, 113-116.
- Dijon, M., Bardin, F., Murati, A., Batoz, M., Chabannon, C., and Tonnelle, C. (2008). The role of Ikaros in human erythroid differentiation. *Blood* *111*, 1138-1146.
- Dumortier, A., Jeannet, R., Kirstetter, P., Kleinmann, E., Sellars, M., dos Santos, N. R., Thibault, C., Barths, J., Ghysdael, J., Punt, J. A., *et al.* (2006). Notch activation is an early and critical event during T-Cell leukemogenesis in Ikaros-deficient mice. *Mol Cell Biol* *26*, 209-220.
- Ernst, P., Hahm, K., Cobb, B. S., Brown, K. E., Trinh, L. A., McCarty, A. S., Merkenschlager, M., Klug, C. A., Fisher, A. G., and Smale, S. T. (1999). Mechanisms of transcriptional regulation in lymphocyte progenitors: insight from an analysis of the terminal transferase promoter. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *64*, 87-97.
- Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M., and Philipsen, S. (2005). GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* *25*, 1215-1227.
- Filion, G. J., van Bommel, J. G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L. D., Brugman, W., de Castro, I. J., Kerkhoven, R. M., Bussemaker, H. J., and van Steensel, B. (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell* *143*, 212-224.

- Fischer, A., and Gessler, M. (2007). Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res* 35, 4583-4596.
- Fraser, P. J., and Curtis, P. J. (1987). Specific pattern of gene expression during induction of mouse erythroleukemia cells. *Genes Dev* 1, 855-861.
- Friend, C., Scher, W., Holland, J. G., and Sato, T. (1971). Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 378-382.
- Fujiwara, T., O'Geen, H., Keles, S., Blahnik, K., Linnemann, A. K., Kang, Y. A., Choi, K., Farnham, P. J., and Bresnick, E. H. (2009). Discovering hematopoietic mechanisms through genome-wide analysis of GATA factor chromatin occupancy. *Mol Cell* 36, 667-681.
- Fujiwara, Y., Browne, C. P., Cunniff, K., Goff, S. C., and Orkin, S. H. (1996). Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12355-12358.
- Fukuda, Y., Fujita, H., Garbaczewski, L., and Sassa, S. (1994). Regulation of beta-globin mRNA accumulation by heme in dimethyl sulfoxide (DMSO)-sensitive and DMSO-resistant murine erythroleukemia cells. *Blood* 83, 1662-1667.
- Georgopoulos, K. (2002). Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat Rev Immunol* 2, 162-174.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143-156.

Grass, J. A., Boyer, M. E., Pal, S., Wu, J., Weiss, M. J., and Bresnick, E. H. (2003). GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8811-8816.

Greene, M. E., Mundschau, G., Wechsler, J., McDevitt, M., Gamis, A., Karp, J., Gurbuxani, S., Arceci, R., and Crispino, J. D. (2003). Mutations in GATA1 in both transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood Cells Mol Dis* *31*, 351-356.

Grimes, H. L., Chan, T. O., Zweidler-McKay, P. A., Tong, B., and Tschlis, P. N. (1996). The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol* *16*, 6263-6272.

Hadland, B. K., Huppert, S. S., Kanungo, J., Xue, Y., Jiang, R., Gridley, T., Conlon, R. A., Cheng, A. M., Kopan, R., and Longmore, G. D. (2004). A requirement for Notch1 distinguishes 2 phases of definitive hematopoiesis during development. *Blood* *104*, 3097-3105.

Harker, N., Naito, T., Cortes, M., Hostert, A., Hirschberg, S., Tolaini, M., Roderick, K., Georgopoulos, K., and Kioussis, D. (2002). The CD8alpha gene locus is regulated by the Ikaros family of proteins. *Mol Cell* *10*, 1403-1415.

Henning, K., Heering, J., Schwanbeck, R., Schroeder, T., Helmbold, H., Schafer, H., Deppert, W., Kim, E., and Just, U. (2008). Notch1 activation reduces proliferation in the multipotent hematopoietic progenitor cell line FDCP-mix through a p53-dependent pathway but Notch1 effects on myeloid and erythroid differentiation are independent of p53. *Cell Death Differ* *15*, 398-407.

- Henning, K., Schroeder, T., Schwanbeck, R., Rieber, N., Bresnick, E. H., and Just, U. (2007). mNotch1 signaling and erythropoietin cooperate in erythroid differentiation of multipotent progenitor cells and upregulate beta-globin. *Exp Hematol* 35, 1321-1332.
- Hong, W., Nakazawa, M., Chen, Y. Y., Kori, R., Vakoc, C. R., Rakowski, C., and Blobel, G. A. (2005). FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *EMBO J* 24, 2367-2378.
- Ikawa, T., Kawamoto, H., Goldrath, A. W., and Murre, C. (2006). E proteins and Notch signaling cooperate to promote T cell lineage specification and commitment. *J Exp Med* 203, 1329-1342.
- Ingram, W. J., McCue, K. I., Tran, T. H., Hallahan, A. R., and Wainwright, B. J. (2008). Sonic Hedgehog regulates Hes1 through a novel mechanism that is independent of canonical Notch pathway signalling. *Oncogene* 27, 1489-1500.
- Ishiko, E., Matsumura, I., Ezoe, S., Gale, K., Ishiko, J., Satoh, Y., Tanaka, H., Shibayama, H., Mizuki, M., Era, T., *et al.* (2005). Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J Biol Chem* 280, 4929-4939.
- Izon, D. J., Punt, J. A., and Pear, W. S. (2002). Deciphering the role of Notch signaling in lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* 14, 192-199.
- Jager, R., Gisslinger, H., Passamonti, F., Rumi, E., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., Harutyunyan, A., Klampfl, T., Olcaydu, D., *et al.* (2010). Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 24, 1290-1298.
- Jang, M. S., Miao, H., Carlesso, N., Shelly, L., Zlobin, A., Darack, N., Qin, J. Z., Nickoloff, B. J., and Miele, L. (2004). Notch-1 regulates cell death independently of differentiation in murine erythroleukemia cells through multiple apoptosis and cell cycle pathways. *J Cell Physiol* 199, 418-433.

Jin, Y. H., Kim, H., Ki, H., Yang, I., Yang, N., Lee, K. Y., Kim, N., Park, H. S., and Kim, K. (2009a). Beta-catenin modulates the level and transcriptional activity of Notch1/NICD through its direct interaction. *Biochim Biophys Acta* 1793, 290-299.

Jin, Y. H., Kim, H., Oh, M., Ki, H., and Kim, K. (2009b). Regulation of Notch1/NICD and Hes1 expressions by GSK-3alpha/beta. *Mol Cells* 27, 15-19.

Jing, H., Vakoc, C. R., Ying, L., Mandat, S., Wang, H., Zheng, X., and Blobel, G. A. (2008). Exchange of GATA factors mediates transitions in looped chromatin organization at a developmentally regulated gene locus. *Mol Cell* 29, 232-242.

Johnson, K. D., Boyer, M. E., Kang, J. A., Wickrema, A., Cantor, A. B., and Bresnick, E. H. (2007). Friend of GATA-1-independent transcriptional repression: a novel mode of GATA-1 function. *Blood* 109, 5230-5233.

Kadam, S., McAlpine, G. S., Phelan, M. L., Kingston, R. E., Jones, K. A., and Emerson, B. M. (2000). Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev* 14, 2441-2451.

Kaiho, S., and Mizuno, K. (1985). Sensitive assay systems for detection of hemoglobin with 2,7-diaminofluorene: histochemistry and colorimetry for erythrodifferentiation. *Anal Biochem* 149, 117-120.

Kathrein, K. L., Chari, S., and Winandy, S. (2008). Ikaros directly represses the notch target gene Hes1 in a leukemia T cell line: implications for CD4 regulation. *J Biol Chem* 283, 10476-10484.

Kawamata, S., Du, C., Li, K., and Lavau, C. (2002). Overexpression of the Notch target genes Hes in vivo induces lymphoid and myeloid alterations. *Oncogene* 21, 3855-3863.

- Keys, J. R., Tallack, M. R., Zhan, Y., Papathanasiou, P., Goodnow, C. C., Gaensler, K. M., Crossley, M., Dekker, J., and Perkins, A. C. (2008). A mechanism for Ikaros regulation of human globin gene switching. *Br J Haematol* *141*, 398-406.
- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., *et al.* (1999). Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* *10*, 345-355.
- Kina, T., Ikuta, K., Takayama, E., Wada, K., Majumdar, A. S., Weissman, I. L., and Katsura, Y. (2000). The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *Br J Haematol* *109*, 280-287.
- Kleinmann, E., Geimer Le Lay, A. S., Sellars, M., Kastner, P., and Chan, S. (2008). Ikaros represses the transcriptional response to Notch signaling in T-cell development. *Mol Cell Biol* *28*, 7465-7475.
- Koipally, J., and Georgopoulos, K. (2000). Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. *J Biol Chem* *275*, 19594-19602.
- Koipally, J., and Georgopoulos, K. (2002). Ikaros-CtIP interactions do not require C-terminal binding protein and participate in a deacetylase-independent mode of repression. *J Biol Chem* *277*, 23143-23149.
- Koipally, J., Heller, E. J., Seavitt, J. R., and Georgopoulos, K. (2002). Unconventional potentiation of gene expression by Ikaros. *J Biol Chem* *277*, 13007-13015.
- Koipally, J., Renold, A., Kim, J., and Georgopoulos, K. (1999). Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *EMBO J* *18*, 3090-3100.

- Kojika, S., and Griffin, J. D. (2001). Notch receptors and hematopoiesis. *Exp Hematol* 29, 1041-1052.
- Lam, L. T., Ronchini, C., Norton, J., Capobianco, A. J., and Bresnick, E. H. (2000). Suppression of erythroid but not megakaryocytic differentiation of human K562 erythroleukemic cells by notch-1. *J Biol Chem* 275, 19676-19684.
- Lee, H. Y., Johnson, K. D., Fujiwara, T., Boyer, M. E., Kim, S. I., and Bresnick, E. H. (2009). Controlling hematopoiesis through sumoylation-dependent regulation of a GATA factor. *Mol Cell* 36, 984-995.
- Letting, D. L., Chen, Y. Y., Rakowski, C., Reedy, S., and Blobel, G. A. (2004). Context-dependent regulation of GATA-1 by friend of GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 476-481.
- Letting, D. L., Rakowski, C., Weiss, M. J., and Blobel, G. A. (2003). Formation of a tissue-specific histone acetylation pattern by the hematopoietic transcription factor GATA-1. *Mol Cell Biol* 23, 1334-1340.
- Lin, T. S., Ishiguro, K., and Sartorelli, A. C. (1998). Role of gp55 in restoring the sensitivity of Friend murine erythroleukemia cells to erythropoietin by exposure to dimethyl sulfoxide. *Oncol Res* 10, 175-184.
- Lopez, R. A., Schoetz, S., DeAngelis, K., O'Neill, D., and Bank, A. (2002). Multiple hematopoietic defects and delayed globin switching in Ikaros null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 602-607.
- MacDonald, V. E., and Howe, L. J. (2009). Histone acetylation: where to go and how to get there. *Epigenetics* 4, 139-143.

Miccio, A., Wang, Y., Hong, W., Gregory, G. D., Wang, H., Yu, X., Choi, J. K., Shelat, S., Tong, W., Poncz, M., and Blobel, G. A. NuRD mediates activating and repressive functions of GATA-1 and FOG-1 during blood development. *EMBO J* 29, 442-456.

Migliaccio, A. R., Rana, R. A., Vannucchi, A. M., and Manzoli, F. A. (2005). Role of GATA-1 in normal and neoplastic hemopoiesis. *Ann N Y Acad Sci* 1044, 142-158.

Morceau, F., Schnekenburger, M., Dicato, M., and Diederich, M. (2004). GATA-1: friends, brothers, and coworkers. *Ann N Y Acad Sci* 1030, 537-554.

Morey, L., Brenner, C., Fazi, F., Villa, R., Gutierrez, A., Buschbeck, M., Nervi, C., Minucci, S., Fuks, F., and Di Croce, L. (2008). MBD3, a component of the NuRD complex, facilitates chromatin alteration and deposition of epigenetic marks. *Mol Cell Biol* 28, 5912-5923.

Muller, P., Crofts, J. D., Newman, B. S., Bridgewater, L. C., Lin, C. Y., Gustafsson, J. A., and Strom, A. SOX9 mediates the retinoic acid-induced HES-1 gene expression in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 120, 317-326.

Muntean, A. G., Pang, L., Poncz, M., Dowdy, S. F., Blobel, G. A., and Crispino, J. D. (2007). Cyclin D-Cdk4 is regulated by GATA-1 and required for megakaryocyte growth and polyploidization. *Blood* 109, 5199-5207.

Munugalavadla, V., Dore, L. C., Tan, B. L., Hong, L., Vishnu, M., Weiss, M. J., and Kapur, R. (2005). Repression of c-kit and its downstream substrates by GATA-1 inhibits cell proliferation during erythroid maturation. *Mol Cell Biol* 25, 6747-6759.

Nakahara, F., Sakata-Yanagimoto, M., Komeno, Y., Kato, N., Uchida, T., Haraguchi, K., Kumano, K., Harada, Y., Harada, H., Kitaura, J., *et al.* (2010). Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 115, 2872-2881.



- Nakayama, H., Ishimaru, F., Avitahl, N., Sezaki, N., Fujii, N., Nakase, K., Ninomiya, Y., Harashima, A., Minowada, J., Tsuchiyama, J., *et al.* (1999). Decreases in Ikaros activity correlate with blast crisis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* *59*, 3931-3934.
- Nakayama, H., Ishimaru, F., Katayama, Y., Nakase, K., Sezaki, N., Takenaka, K., Shinagawa, K., Ikeda, K., Niiya, K., and Harada, M. (2000). Ikaros expression in human hematopoietic lineages. *Exp Hematol* *28*, 1232-1238.
- Nam, Y., Sliz, P., Song, L., Aster, J. C., and Blacklow, S. C. (2006). Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell* *124*, 973-983.
- Neves, A., English, K., and Priess, J. R. (2007). Notch-GATA synergy promotes endoderm-specific expression of ref-1 in *C. elegans*. *Development* *134*, 4459-4468.
- Ng, S. Y., Yoshida, T., and Georgopoulos, K. (2007). Ikaros and chromatin regulation in early hematopoiesis. *Curr Opin Immunol* *19*, 116-122.
- Nichogiannopoulou, A., Trevisan, M., Neben, S., Friedrich, C., and Georgopoulos, K. (1999). Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med* *190*, 1201-1214.
- Nichols, K. E., Crispino, J. D., Poncz, M., White, J. G., Orkin, S. H., Maris, J. M., and Weiss, M. J. (2000). Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet* *24*, 266-270.
- Nudel, U., Salmon, J., Fibach, E., Terada, M., Rifkind, R., Marks, P. A., and Bank, A. (1977). Accumulation of alpha- and beta-globin messenger RNAs in mouse erythroleukemia cells. *Cell* *12*, 463-469.

- O'Neill, D. W., Schoetz, S. S., Lopez, R. A., Castle, M., Rabinowitz, L., Shor, E., Krawchuk, D., Goll, M. G., Renz, M., Seelig, H. P., *et al.* (2000). An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol Cell Biol* *20*, 7572-7582.
- Okuhashi, Y., Itoh, M., Arai, A., Nara, N., and Tohda, S. (2010). Gamma-secretase inhibitors induce erythroid differentiation in erythroid leukemia cell lines. *Anticancer Res* *30*, 4071-4074.
- Orkin, S. H., Shivdasani, R. A., Fujiwara, Y., and McDevitt, M. A. (1998). Transcription factor GATA-1 in megakaryocyte development. *Stem Cells* *16 Suppl 2*, 79-83.
- Orkin, S. H., and Swerdlow, P. S. (1977). Globin RNA synthesis in vitro by isolated erythroleukemic cell nuclei: direct evidence for increased transcription during erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 2475-2479.
- Pal, S., Cantor, A. B., Johnson, K. D., Moran, T. B., Boyer, M. E., Orkin, S. H., and Bresnick, E. H. (2004). Coregulator-dependent facilitation of chromatin occupancy by GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 980-985.
- Papetti, M., Wontakal, S. N., Stopka, T., and Skoultchi, A. I. GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation. *Cell Cycle* *9*, 1972-1980.
- Pevny, L., Lin, C. S., D'Agati, V., Simon, M. C., Orkin, S. H., and Costantini, F. (1995). Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development* *121*, 163-172.
- Pevny, L., Simon, M. C., Robertson, E., Klein, W. H., Tsai, S. F., D'Agati, V., Orkin, S. H., and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* *349*, 257-260.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* *29*, e45.

- Pope, N. J., and Bresnick, E. H. Differential coregulator requirements for function of the hematopoietic transcription factor GATA-1 at endogenous loci. *Nucleic Acids Res* 38, 2190-2200.
- Pulte, D., Lopez, R. A., Baker, S. T., Ward, M., Ritchie, E., Richardson, C. A., O'Neill, D. W., and Bank, A. (2006). Ikaros increases normal apoptosis in adult erythroid cells. *Am J Hematol* 81, 12-18.
- Qi, X., Chen, Z., Liu, D., Cen, J., and Gu, M. (2008). Expression of Dlk1 gene in myelodysplastic syndrome determined by microarray, and its effects on leukemia cells. *Int J Mol Med* 22, 61-68.
- Radtke, F., Wilson, A., Ernst, B., and MacDonald, H. R. (2002). The role of Notch signaling during hematopoietic lineage commitment. *Immunol Rev* 187, 65-74.
- Reynaud, D., Demarco, I. A., Reddy, K. L., Schjerven, H., Bertolino, E., Chen, Z., Smale, S. T., Winandy, S., and Singh, H. (2008). Regulation of B cell fate commitment and immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Ikaros. *Nat Immunol* 9, 927-936.
- Robert-Moreno, A., Espinosa, L., Sanchez, M. J., de la Pompa, J. L., and Bigas, A. (2007). The notch pathway positively regulates programmed cell death during erythroid differentiation. *Leukemia* 21, 1496-1503.
- Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Kolodziej, K. E., Guyot, B., Heck, A. J., Vyas, P., de Boer, E., Grosveld, F., and Strouboulis, J. (2005). GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J* 24, 2354-2366.
- Rodriguez, P., Braun, H., Kolodziej, K. E., de Boer, E., Campbell, J., Bonte, E., Grosveld, F., Philipsen, S., and Strouboulis, J. (2006). Isolation of transcription factor complexes by in vivo biotinylation tagging and direct binding to streptavidin beads. *Methods Mol Biol* 338, 305-323.

- Roh, T. Y., Cuddapah, S., Cui, K., and Zhao, K. (2006). The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 15782-15787.
- Rylski, M., Welch, J. J., Chen, Y. Y., Letting, D. L., Diehl, J. A., Chodosh, L. A., Blobel, G. A., and Weiss, M. J. (2003). GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol Cell Biol* *23*, 5031-5042.
- Sabbattini, P., Lundgren, M., Georgiou, A., Chow, C., Warnes, G., and Dillon, N. (2001). Binding of Ikaros to the lambda5 promoter silences transcription through a mechanism that does not require heterochromatin formation. *EMBO J* *20*, 2812-2822.
- Saether, T., Berge, T., Ledsaak, M., Matre, V., Alm-Kristiansen, A. H., Dahle, O., Aubry, F., and Gabrielsen, O. S. (2007). The chromatin remodeling factor Mi-2alpha acts as a novel co-activator for human c-Myb. *J Biol Chem* *282*, 13994-14005.
- Sanalkumar, R., Dhanesh, S. B., and James, J. Non-canonical activation of Notch signaling/target genes in vertebrates. *Cell Mol Life Sci* *67*, 2957-2968.
- Schuetze, S., Paul, R., Gliniak, B. C., and Kabat, D. (1992). Role of the PU.1 transcription factor in controlling differentiation of Friend erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* *12*, 2967-2975.
- Scott, J. D., and Pawson, T. (2009). Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science* *326*, 1220-1224.
- Shelly, L. L., Fuchs, C., and Miele, L. (1999). Notch-1 inhibits apoptosis in murine erythroleukemia cells and is necessary for differentiation induced by hybrid polar compounds. *J Cell Biochem* *73*, 164-175.
- Singer, D., Cooper, M., Maniatis, G. M., Marks, P. A., and Rifkind, R. A. (1974). Erythropoietic differentiation in colonies of cells transformed by Friend virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *71*, 2668-2670.

- Smale, S. T., and Dorshkind, K. (2006). Hematopoiesis flies high with Ikaros. *Nat Immunol* 7, 367-369.
- Socolovsky, M., Murrell, M., Liu, Y., Pop, R., Porpiglia, E., and Levchenko, A. (2007). Negative autoregulation by FAS mediates robust fetal erythropoiesis. *PLoS Biol* 5, e252.
- Sparmann, A., and van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 846-856.
- Sridharan, R., and Smale, S. T. (2007). Predominant interaction of both Ikaros and Helios with the NuRD complex in immature thymocytes. *J Biol Chem* 282, 30227-30238.
- Stier, S., Cheng, T., Dombkowski, D., Carlesso, N., and Scadden, D. T. (2002). Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood* 99, 2369-2378.
- Sugimoto, A., Yamamoto, M., Suzuki, M., Inoue, T., Nakamura, S., Motoda, R., Yamasaki, F., and Orita, K. (2006). Delta-4 Notch ligand promotes erythroid differentiation of human umbilical cord blood CD34+ cells. *Exp Hematol* 34, 424-432.
- Sun, L., Liu, A., and Georgopoulos, K. (1996). Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J* 15, 5358-5369.
- Tachikawa, Y., Matsushima, T., Abe, Y., Sakano, S., Yamamoto, M., Nishimura, J., Nawata, H., Takayanagi, R., and Muta, K. (2006). Pivotal role of Notch signaling in regulation of erythroid maturation and proliferation. *Eur J Haematol* 77, 273-281.
- Takahashi, T., Suwabe, N., Dai, P., Yamamoto, M., Ishii, S., and Nakano, T. (2000). Inhibitory interaction of c-Myb and GATA-1 via transcriptional co-activator CBP. *Oncogene* 19, 134-140.

- Tanigaki, K., Tsuji, M., Yamamoto, N., Han, H., Tsukada, J., Inoue, H., Kubo, M., and Honjo, T. (2004). Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* *20*, 611-622.
- Tong, B., Grimes, H. L., Yang, T. Y., Bear, S. E., Qin, Z., Du, K., El-Deiry, W. S., and Tschlis, P. N. (1998). The Gfi-1B proto-oncoprotein represses p21WAF1 and inhibits myeloid cell differentiation. *Mol Cell Biol* *18*, 2462-2473.
- Tsang, A. P., Visvader, J. E., Turner, C. A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M. J., Crossley, M., and Orkin, S. H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* *90*, 109-119.
- Tsiftoglou, A. S., Vizirianakis, I. S., and Strouboulis, J. (2009). Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life* *61*, 800-830.
- Varnum-Finney, B., Brashem-Stein, C., and Bernstein, I. D. (2003). Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood* *101*, 1784-1789.
- Venters, B. J., and Pugh, B. F. (2009). How eukaryotic genes are transcribed. *Crit Rev Biochem Mol Biol* *44*, 117-141.
- Vercauteren, S. M., and Sutherland, H. J. (2004). Constitutively active Notch4 promotes early human hematopoietic progenitor cell maintenance while inhibiting differentiation and causes lymphoid abnormalities in vivo. *Blood* *104*, 2315-2322.
- Wang, J. H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A. H., Bigby, M., and Georgopoulos, K. (1996). Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity* *5*, 537-549.

- Watanabe, K., Towatari, M., Ozawa, Y., Miyata, Y., Okamoto, M., Abe, A., Naoe, T., and Saito, H. (2003). Altered interaction of HDAC5 with GATA-1 during MEL cell differentiation. *Oncogene* 22, 9176-9184.
- Weiss, M. J., and Orkin, S. H. (1995). Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9623-9627.
- Weiss, M. J., Yu, C., and Orkin, S. H. (1997). Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol* 17, 1642-1651.
- Welch, J. J., Watts, J. A., Vakoc, C. R., Yao, Y., Wang, H., Hardison, R. C., Blobel, G. A., Chodosh, L. A., and Weiss, M. J. (2004). Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. *Blood* 104, 3136-3147.
- Whyatt, D., Lindeboom, F., Karis, A., Ferreira, R., Milot, E., Hendriks, R., de Bruijn, M., Langeveld, A., Gribnau, J., Grosveld, F., and Philipsen, S. (2000). An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells. *Nature* 406, 519-524.
- Whyatt, D. J., Karis, A., Harkes, I. C., Verkerk, A., Gillemans, N., Elefanty, A. G., Vairo, G., Ploemacher, R., Grosveld, F., and Philipsen, S. (1997). The level of the tissue-specific factor GATA-1 affects the cell-cycle machinery. *Genes Funct* 1, 11-24.
- Worthington, R. E., Bossie-Codreanu, J., and Van Zant, G. (1987). Quantitation of erythroid differentiation in vitro using a sensitive colorimetric assay for hemoglobin. *Exp Hematol* 15, 85-92.
- Wu, L., and Griffin, J. D. (2004). Modulation of Notch signaling by mastermind-like (MAML) transcriptional co-activators and their involvement in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* 14, 348-356.

Yagi, T., Hibi, S., Takanashi, M., Kano, G., Tabata, Y., Imamura, T., Inaba, T., Morimoto, A., Todo, S., and Imashuku, S. (2002). High frequency of Ikaros isoform 6 expression in acute myelomonocytic and monocytic leukemias: implications for up-regulation of the antiapoptotic protein Bcl-XL in leukemogenesis. *Blood* *99*, 1350-1355.

Yoshida, T., Ng, S. Y., and Georgopoulos, K. Awakening lineage potential by Ikaros-mediated transcriptional priming. *Curr Opin Immunol* *22*, 154-160.

Young, M. D., Willson, T. A., Wakefield, M. J., Trounson, E., Hilton, D. J., Blewitt, M. E., Oshlack, A., and Majewski, I. J. (2011). ChIP-seq analysis reveals distinct H3K27me3 profiles that correlate with transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.*

Yu, M., Riva, L., Xie, H., Schindler, Y., Moran, T. B., Cheng, Y., Yu, D., Hardison, R., Weiss, M. J., Orkin, S. H., *et al.* (2009). Insights into GATA-1-mediated gene activation versus repression via genome-wide chromatin occupancy analysis. *Mol Cell* *36*, 682-695.

Zeuner, A., Francescangeli, F., Signore, M., Venneri, M. A., Pedini, F., Felli, N., Pagliuca, A., Conticello, C., and De Maria, R. The Notch2-Jagged1 interaction mediates stem cell factor signaling in erythropoiesis. *Cell Death Differ.*

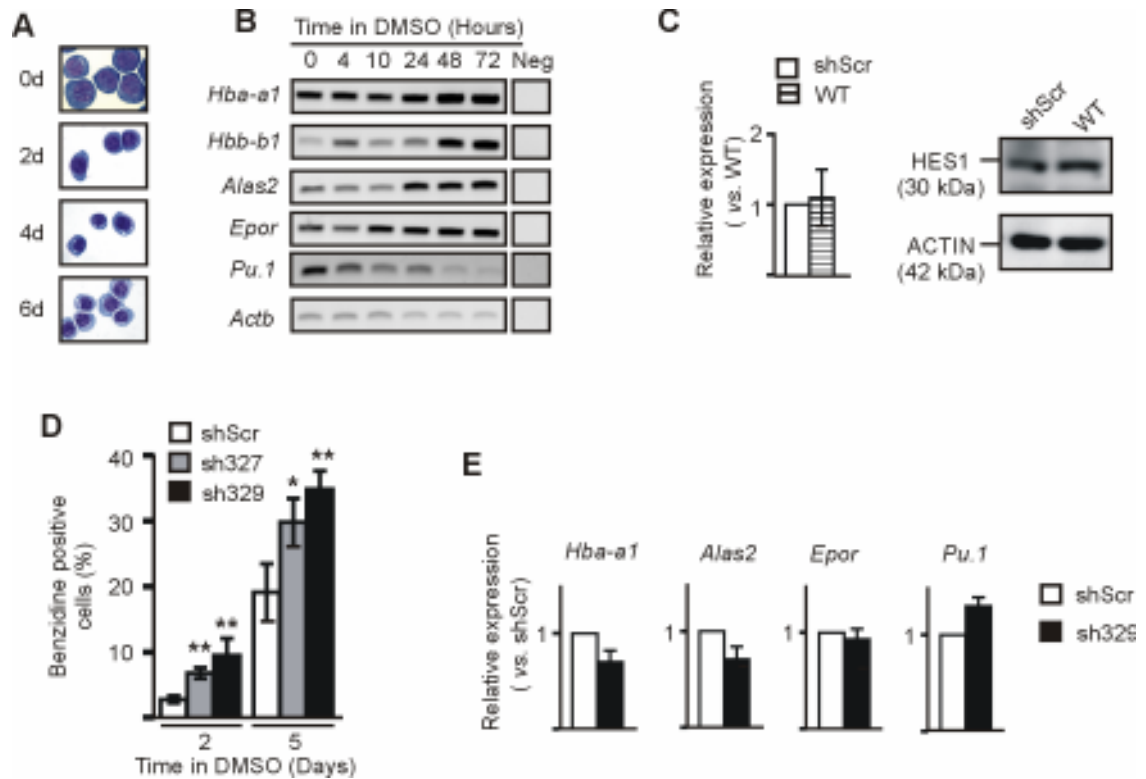
Zeuner, A., Francescangeli, F., Signore, M., Venneri, M. A., Pedini, F., Felli, N., Pagliuca, A., Conticello, C., and De Maria, R. The Notch2-Jagged1 interaction mediates stem cell factor signaling in erythropoiesis. *Cell Death Differ* *18*, 371-380.

Zhang, J., Socolovsky, M., Gross, A. W., and Lodish, H. F. (2003). Role of Ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis by a flow cytometry-based novel culture system. *Blood* *102*, 3938-3946.

Zweidler-Mckay, P. A., Grimes, H. L., Flubacher, M. M., and Tschlis, P. N. (1996). Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* *16*, 4024-4034.



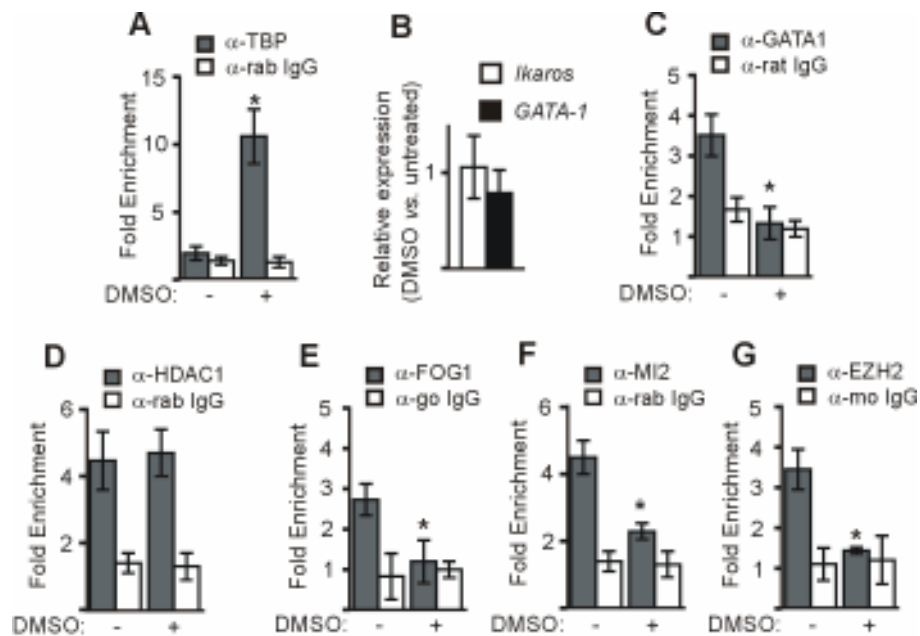
## 7.8 Supplementary data



**Figure S7.1. Hes1 influence on MEL cell differentiation.**

(A) Wright-Geimsa-stained cytopsin preparations of MEL cells treated with DMSO for 0, 2, 4 and 6 days (d). (B) Agarose gel representing mRNA expression of *Hba-a1*, *Hbb-b1*, *Alas2*, *Epor*, *Spf1* (*Pu.1*) and *Actb*. RT-PCR was performed on untreated cells or cells treated with DMSO for different time points as indicated on the top of the panel. Neg: RT-PCR performed on non mRNA template. (C) **Left:** Graphical representation of the relative expression (y-axis) of *Hes1* with corresponding standard deviations. RT-qPCR was performed on wild type (WT) or shScr-transfected MEL cells and relative expression was calculated according to Pfaffl using *Actb* as internal control. **Right:** Western Blot analysis of HES1 and ACTB (loading control) expression in whole cell extract from untreated cells. Antibodies used for blot as well as specific bands and their corresponding molecular weight are presented on the

panels. **(D)** Graphical representation of the percentage of benzidine positive cells (y-axis) with corresponding standard deviations in function of the time in DMSO (x-axis). Asterisks (\*:p<0.01; \*\*: p<0.005) represent a significant variation between sh327 or sh329 vs. shScr according to Student's t test. **(E)** Graphical representation of the relative expression (y-axis) of *Hba-a1*, *Alas2*, *Epor*, *Spfil* (*Pu.1*) with corresponding standard deviations. RT-qPCR was performed on untreated ShScr- or Sh*Hes1* (Sh329)-transfected MEL cells and relative expression was calculated according to Pfaffl using *Actb* as internal control.



**Figure S7.2. *Hes1* promoter organisation in MEL cells**

**(A,C-G)** Graphical representation of the recruitment of TATA-binding protein (TBP), GATA1, HDAC1, FOG1, MI2 or EZH2 to *Hes1* promoter expressed in fold enrichment with corresponding standard deviations (see Figure S7 for positive and negative controls). ChIP was performed on untreated (-) MEL cells or MEL cells treated with DMSO for 3 days (+) with specific antibodies (grey bars) or isotype-matched immunoglobulin G (IgG; white bars; rab: rabbit; go: goat) and analyzed by qPCR; fold enrichment was calculated using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

method using *Thp* (Tamm-Horsfall protein) promoter as internal control. Asterisk (\*;  $p < 0.05$ ) represent a significant variation between + vs. - according to Student's t test. **(B)** Graphical representation of the relative expression (y-axis) of *Ikaros* or *GATA1* with corresponding standard deviations. RT-qPCR was performed on untreated cells or cells treated with DMSO for 3 days and relative expression was calculated according to Pfaffl using *Actb* as internal control.

```

Bos t CAAAGCCAGAGG-GAGAGT-AGCAAAGGGTTAAATCCTTTTGATTGACGTTGTAGCCTCCGGTGCCCTGGGCTCAGGCGCGGCCAT
Rat n CAAAGCCAG-AGG---AGTTAGCAAAGGGTTAAATCCTTTTGATTGACGTTGTAGCCTCCGGTGCCCTGGGCTCAGGCGCGGCCAT
Mus m CAAAGCCAG-AGGAAAGAGT-TAGCAAAGGGTTAAATCCTTTTGATTGACGTTGTAGCCTCCGGTGCCCTGGGCTCAGGCGCGGCCAT
Pan t CAAAGCCAG-AGG-GAGAGT-AGCAAAGGGTTAAATCCTTTTGATTGACGTTGTAGCCTCCGGTGCCCTGGGCTCAGGCGCGGCCAT
Hom s CAAAGCCAG-AGG-GAGAGT-AGCAAAGGGTTAAATCCTTTTGATTGACGTTGTAGCCTCCGGTGCCCTGGGCTCAGGCGCGGCCAT

Bos t TGGCCGCAGACCTTGTGCCTGGCGGCAATGGGGGGGCGCGTCCACGAGCGGTGCCGCGTGTCTCTCTCCATTGGCTGAAAGTTA
Rat n TGGCCGCAGACCTTGTGCCTGGCGGCAATGGGGGGGCGCGTCCACGAGCGGTGCCGCGTGTCTCTCTCCATTGGCTGAAAGTTA
Mus m TGGCCGCAGACCTTGTGCCTGGCGGCAATGGGGGGGCGCGTCCACGAGCGGTGCCGCGTGTCTCTCTCCATTGGCTGAAAGTTA
Pan t TGGCCGCAGACCTTGTGCCTGGCGGCAATGGGGGGGCGCGTCCACGAGCGGTGCCGCGTGTCTCTCTCCATTGGCTGAAAGTTA
Hom s TGGCCGCAGACCTTGTGCCTGGCGGCAATGGGGGGGCGCGTCCACGAGCGGTGCCGCGTGTCTCTCTCCATTGGCTGAAAGTTA

Bos t CTGTGGGAAAGAAAGTTTGGGAAAGTTTTCACACGAGCCGTTCCGCGTGCAGTCCCAGATATATATAGAGGCCGCCAGGGCCTGGG-ATCAC
Rat n CTGTGGGAAAGAAAGTTTGGGAAAGTTTTCACACGAGCCGTTCCGCGTGCAGTCCCAGATATATATAGAGGCCGCCAGGGCCTGGG-ATCAC
Mus m CTGTGGGAAAGAAAGTTTGGGAAAGTTTTCACACGAGCCGTTCCGCGTGCAGTCCCAGATATATATAGAGGCCGCCAGGGCCTGGG-ATCAC
Pan t CTGTGGGAAAGAAAGTTTGGGAAAGTTTTCACACGAGCCGTTCCGCGTGCAGTCCCAGATATATATAGAGGCCGCCAGGGCCT-AGGGAATCAC
Hom s CTGTGGGAAAGAAAGTTTGGGAAAGTTTTCACACGAGCCGTTCCGCGTGCAGTCCCAGATATATATAGAGGCCGCCAGGGCCT-AGGGAATCAC

Bos t ACGGATCCGGAGCTGGTGTGATAACAGCGGAATCCCCGTTACCTCTCTCCTTGGTCTGGAATAGCGCTACGATCACAAAGTAGC
Rat n ACGGATCCGGAGCTGGTGTGATAACAGCGGAATCCCCGTTACCTCTCTCCTTGGTCTGGAATAGCGCTACGATCACAAAGTAGC
Mus m ACGGATCCGGAGCTGGTGTGATAACAGCGGAATCCCCGTTACCTCTCTCCTTGGTCTGGAATAGCGCTACGATCACAAAGTAGC
Pan t ACGGATCCGGAGCTGGTGTGATAACAGCGGAATCCCCGTTACCTCTCTCCTTGGTCTGGAATAGCGCTACGATCACAAAGTAGC
Hom s ACGGATCCGGAGCTGGTGTGATAACAGCGGAATCCCCGTTACCTCTCTCCTTGGTCTGGAATAGCGCTACGATCACAAAGTAGC

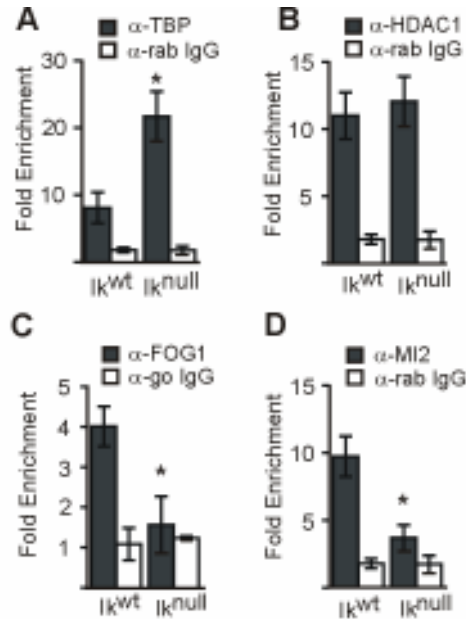
Bos t CA-TAAATAATTATAATAAACCCTCAGCACTTGCTCAGTAGTTTTG---AGAAAAGTATAAAGTATAAGGACATAAAGCAAACA---T
Rat n C-CTAAACA---TAATAAACCCTCA--ACT-GCTCCGTAGTTTTTCTTATGAAAG--CCAAGTAAAGGACGTAACCAAAAAATATT
Mus m C-CTAAACA---TAATAAACCCTCA--ACT-GCTCAGTAGTTTTTCTTATGAAAG--TCAAGTAAAG-GACGTAACCAAAAAAATT
Pan t CACAAA-ATA---TAATAAACCCTCAGCACTTGCTCAGTAGTTTTG---TGAAGTCTCAAGTAAAGAGACACAAA-CAAAAAA-TTCT
Hom s CACAAA-ATA---TAATAAACCCTCAGCACTTGCTCAGTAGTTTTG---TGAAGTCTCAAGTAAAGAGACACAAA-CAAAAAA-TTCT

Bos t -TTTTT---GTGTGAAGAACTCCAAAAATAAAATTCCTCT---AATTGATTAAATAAAAGAAAAA-----GAAAATGCCAGCTGATAT
Rat n -TTTTT----CGTGAAGAACTCCAAAAATAAAATTCCTCTGGGGAATTGA-CAAATAAATAAAAAA-----CGAAAATGCCAGCTGATAT
Mus m ATTTTTTTTTTCGCGTGAAGAACTCCAAAAATAAAATTCCTCTGGGGAATTGA-CAAATAAATAAAAAAATAAAACGAAAATGCCAGCTGATAT
Pan t -TTTT-----CGTGAAGAACTCCAAAAATAAAATTCCTCT---AGAGATTAAATAAATAAAAAAATAAAAGGAAAATGCCAGCTGATAT
Hom s -TTTT-----CGTGAAGAACTCCAAAAATAAAATTCCTCT---AGAGA-TAAATAAATAAAAAAATAAAAGGAAAATGCCAGCTGATAT
    
```

**Figure S7.3. Conserved transcription factor binding sites in *Hes1* promoter.**

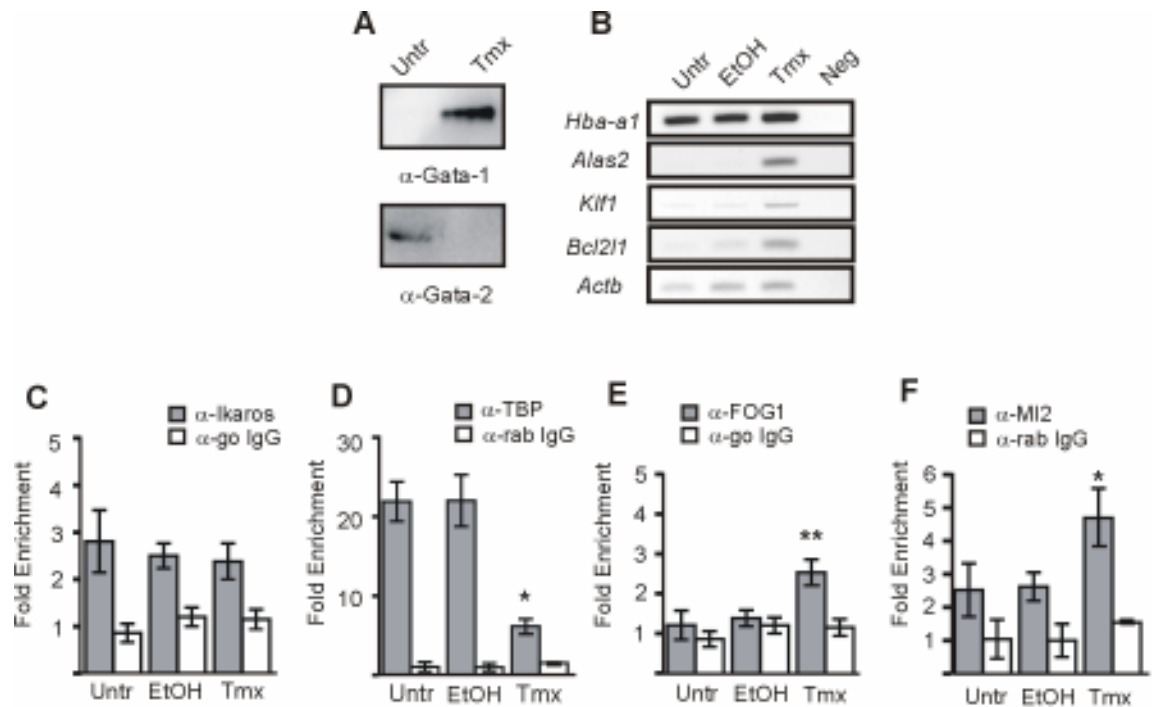
Alignment of *Hes1* promoter from cow (*Bos taurus*; Bos t), rat (*Rattus norvegicus*; Rat n), mouse (*Mus musculus*; Mus m), chimpanzee (*Pan troglodytes*; Pan t) and human (*Homo sapiens*; Hom s). Initiation box (Inr), TATA box and transcription start site (ATG) are indicated in blue, green and

red respectively. Potential binding sites for Ikaros (ref; yellow), GATA-1 (pink) and GFI1B (AATC core is in bold; turquoise) are underlined.



**Figure S7.4. Factor recruitment to *Hes1* promoter in 14.5 dpc fetal liver cells.**

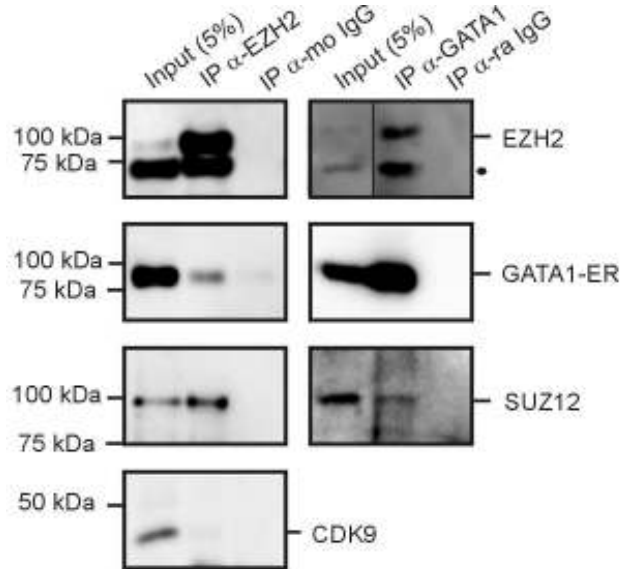
(A-D) Graphical representation of the recruitment of TATA-binding protein (TBP), HDAC1, FOG1 and MI2 to *Hes1* promoter expressed in fold enrichment (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP was performed on *Ik<sup>wt</sup>* or *Ik<sup>null</sup>* cells with specific antibody (dark grey bars) or isotype-matched immunoglobulin G (IgG; white bars) and analyzed by qPCR; fold enrichment was calculated using  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method using *Thp* (Tamm-Horsfall protein) promoter as internal control (see Figure S7 for positive and negative controls). Asterisk (\*:p < 0.05) represent a significant variation between *Ik<sup>null</sup>* vs. *Ik<sup>wt</sup>* according to Student's t test.



**Figure S7.5. GATA-1 influence on gene expression and *Hes1* promoter organization in G1E-ER4 cells.**

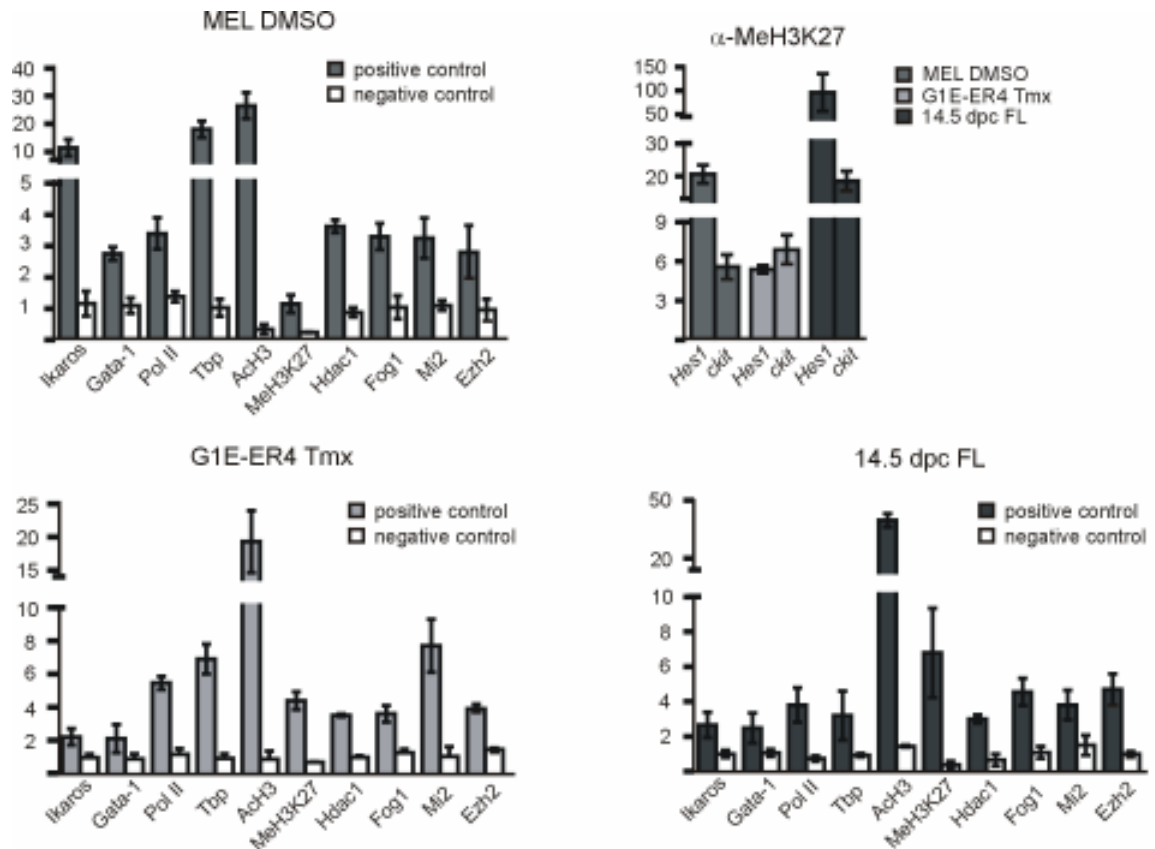
(A) Western Blot analysis of GATA-1 and GATA-2 expression in nuclear protein extract from untreated (Untr) or tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 cells. Antibodies used for blot are indicated on the panels. (B) Agarose gel representing mRNA expression of *Hba-a1*, *Alas2*, *Klf1*, *Bcl2l1* and *Actb*. RT-PCR was performed on untreated (Untr) cells or cells treated with ethanol (EtOH) or tamoxifen (Tmx) as indicated on the top of the panel. Neg: RT-PCR performed on no mRNA template. (C-F) Graphical representation of the recruitment of Ikaros, TATA-binding protein (TBP), FOG1 and MI2 to *Hes1* promoter expressed in fold enrichment (y-axis) with corresponding standard deviations. ChIP was performed on untreated (Untr), EtOH- or Tmx-treated G1E-ER4 cells with specific antibody (light grey bars) or isotype-matched immunoglobulin G (IgG; white bars) and analyzed by qPCR; fold enrichment was calculated using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using *Thp* (Tamm-Horsfall protein) promoter as internal control (see Figure S7 for positive and negative controls).

Asterisk (\*:p < 0.05) represent a significant variation between Tmx vs. Untr according to Student's t test.



**Figure S7.6. Immunoprecipitations of GATA-1-ER and PRC2 components.**

Western blots of protein interactions between EZH2 and its partners or GATA1-ER and its partners. Total tamoxifen (Tmx)-treated G1E-ER4 proteins were immunoprecipitated (IP) with  $\alpha$ -EZH2 or  $\alpha$ -GATA-1 or with their isotype-matched immunoglobulin G (IgG; mo: mouse; ra: rat), as indicated on the top of panels. Protein interactions were revealed by immunodetection with specific antibodies; from top to bottom:  $\alpha$ -EZH2,  $\alpha$ -GATA-1,  $\alpha$ -SUZ12,  $\alpha$ -CDK9. Specific bands and molecular weights are respectively specified on the right and the left sides of panels. Dot (•) is pointing at a non-specific band.



**Figure S7.7. Controls for chromatin immunoprecipitations.**

(A-C) Graphical representation of the recruitment of Ikaros, GATA-1, Pol II, TBP, AchH3, MeH3K27, HDAC1, FOG1 and EZH2 to control regions expressed in fold enrichment with corresponding standard deviations. ChIP was performed on MEL cells treated with DMSO for 3 days (A), Tmx-treated G1E-ER4 cells (B) or 14.5 dpc FL cells (C) with specific antibodies and analyzed by qPCR; fold enrichment was calculated using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method using *Thp* (Tamm-Horsfall protein) promoter as internal control.  $\beta$ -globin HS2 was used as positive control for GATA-1, AchH3 and FOG1 ChIP;  *$\beta$ major* promoter was used as positive control for Pol II and TBP ChIP and as negative control for MeH3K27 and EZH2 ChIP; -2.8 enhancer of *Gata-2* was used as positive control for MeH3K27, HDAC1, MI2 and EZH2 ChIP and 1G enhancer of *Gata-2* was used as positive control for Ikaros ChIP; *amylase* promoter was

used as negative control for Ikaros, GATA-1, Pol II, TBP, AcH3, HDAC1, FOG1 and MI2 ChIP.

Specificity (murine cDNA)	Symbol	direction	Sequence 5'-3'
Hairy and enhancer of split 1	<i>Hes1</i>	F	ACACCGGACAAACCAAAGAC
		R	ATGCCGGGAGCTATCTTTCT
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	<i>Hprt</i>	F	CACAGGACTAGAACACCTGC
		R	GCTGGTGAAAAGGACCTC
Beta actin	<i>Actin</i>	F	ATCGTGGGCCGCCCTAGGCACCA
		R	TCCATGTCGTCCCAGTTGGTAACAA
Hemoglobin alpha adult chain 1	<i>Hb<math>\alpha</math></i>	F	AACTTCAAGCTCCTGAGCCA
		R	GGCAGCTTAACGGTACTTGG
Hemoglobin beta adult major chain	<i>Hb<math>\beta</math></i>	F	AACGATGGCCTGAATCACTT
		R	ACGATCATATTGCCCAGGAG
Aminolevulinic acid synthase 2	<i>Alas</i>	F	GCAGCAGCTATGTTGCTACG
		R	ACAGGTTGGTCCTTGAGTGG
Erythroid Kruppel-like factor	<i>Eklf</i>	F	ACCACCCTGGGACAGTTTCT
		R	GAAGGGTCCTCCGATTTTCAG
B-cell lymphoma-extra large	<i>Bcl-xl</i>	F	GGGATGGAGTAAACTGGGGT
		R	TGCAATCCGACTCACCAATA
Erythropoietin receptor	<i>Epor</i>	F	TACCTCCCCTCCACCTCAC
		R	GCTCTGAGTCTGGGACAAGG
Transcription factor Pu.1	<i>Pu.1</i>	F	CACGTCCTCGATACTCCCAT
		R	GCTGGGGACAAGGTTTGATA

**Supplementary Table 7.1. Sequences of oligonucleotides used for RT-PCR analysis**



Specificity (murine genomic DNA)	Symbol	direction	Sequence 5'-3'
Hairy and enhancer of split 1 gene promoter	<i>Hes1</i>	F	GGAAGTTTCACACGAGCCGT
		R	GCACCAGCTCCAGATCCTGT
Tamm-Horsfall gene promoter	<i>Thp</i>	F	GGTGGATGGTGTGGTCACAAC
		R	GGTCTTGACACACCAGCTTT
Amylase promoter	<i>Amy</i>	F	TCAGTTGTAATTCTCCTTGTAGGG
		R	CCTCCCATCTGAAGTATGTGGGTC
Hypersensitive site 2 from $\beta$ -globin locus	HS2	F	CCTTGCCTGTTCCCTGCTCA
		R	CACATGTGACCTGTCTGCCAG
$\beta$ -major promoter	<i><math>\beta</math>maj</i>	F	CAGTGAGTGGCACAGCATCC
		R	CAGTCAGGTGCACCATGATGT
<i>Gata2</i> -2.8Kb enhancer	<i>Gata2</i> - 2.8	F	GCATGGCCCTGGTAATAGCA
		R	CAGCCGCACCTTCCCTAA
<i>Gata2</i> promoter 1G	<i>Gata2</i> 1G	F	AGATACCCAGAAGGTGCACGTC
		R	GCAGACCCTGCACCCCT
<i>c-kit</i> promoter	<i>c-kit</i>	F	CACCTCCACCATAAGCCGAAT
		R	CTCCTAGACAATAAAGGACAACCA

**Supplementary Table 7.2. Sequences of oligonucleotides used for ChIP analysis**

## **PARTIE III : DISCUSSION ET CONCLUSION**

## **Chapitre 8 : Discussion générale des résultats**

Puisque chaque étude présentée dans les chapitres 4 à 7 a été discutée individuellement, la discussion présentée dans ce chapitre vise à intégrer les différents points communs de nos travaux afin de proposer différents modèles. L'emphase sera mise sur l'importance de la combinaison spécifique des facteurs de transcription dans l'activation ou la répression des gènes dans les cellules érythroïdes.

### **8.1 L'importance de la collaboration entre les facteurs de transcription**

#### **8.1.1 Modèle proposé pour l'activation des gènes du locus hu $\beta$ lors du développement et de la différenciation**

Le locus hu $\beta$  est un bon modèle pour l'étude de la régulation des mécanismes transcriptionnels dans les cellules érythroïdes. En effet, étant donné la bonne connaissance des différents éléments en *cis* et en *trans* qui sont impliqués dans sa régulation, il est possible de caractériser de nouveaux mécanismes ou d'approfondir l'importance de la combinaison de ces différents éléments de régulation.

Nos différentes études portant sur des aspects variés de la régulation transcriptionnelle du locus nous ont permis d'élaborer un modèle expliquant l'importance de différents éléments de régulation pour l'expression des gènes du locus hu $\beta$ . Nos travaux ont principalement porté sur la caractérisation des éléments en *cis* HS2 et HS3 du LCR, les promoteurs des gènes  $\gamma$  et  $\beta$  ainsi que sur les facteurs en *trans* EKLF, GATA-1, NF-E2 et Ikaros. N'excluant pas que d'autres régions et/ou facteurs soient cruciaux pour la régulation du locus, nous croyons que les mécanismes présentés dans cette thèse sont très importants pour la compréhension des maladies impliquant une expression anormale des gènes du locus. De plus, il a été montré à plusieurs reprises que les facteurs de transcription que nous avons

étudiés sont impliqués dans la régulation d'autres gènes dans les cellules érythroïdes suggérant que nos observations sont possiblement applicables à d'autres gènes.

### 8.1.1.1 Régulation des gènes $\gamma$ lors du développement

Tel qu'il a été décrit aux sections 2.1.2.4.2 et 4.2, le LCR possède une activité *enhancer* au niveau des promoteurs des gènes du locus hu $\beta$  ainsi qu'une activité d'organisateur de la chromatine du locus. Le LCR possède différents HS qui peuvent s'associer à différents facteurs de transcription. Les HS du LCR interagissent ensemble, grâce entre autres aux facteurs de transcription qui s'y associe, et forme une structure appelée *holocomplex* (154,391,392). Cette structure est requise pour permettre un bon fonctionnement du LCR, c.-à-d. pour que le LCR puisse activer normalement les gènes du locus. Il est suggéré que la délétion d'une portion du LCR modifie cette structure expliquant en partie de quelle façon les LCR mutés activent de façon moins efficace les gènes du locus (154,155,392). D'autre part, en retirant une région du LCR, les facteurs qui normalement s'y associent sont absents.

Dans la littérature, la fonction des différents HS a été étudiée afin de déterminer les rôles particuliers des différentes régions. Le HS2 possède un rôle important dans l'ouverture de la chromatine du locus (155,393). De plus, plusieurs groupes ont rapporté que HS2 est important pour favoriser la formation du CPI au promoteur  $\beta$  (185,249). Notre étude présentée au chapitre 4 montre que l'activité de HS2 sur l'organisation de la chromatine du locus peu être dissociée de son activité *enhancer* sur les gènes. En effet, dans des cellules où la chromatine du locus n'est pas affectée par un effet PEV, nous avons observé que l'absence de HS2 empêche la formation normale du CPI aux promoteurs des gènes  $\gamma$  tant au stade e10.5 qu'au stade e12.5. En d'autres mots, l'activité *enhancer* de HS2 n'est pas dépendante de sa capacité à ouvrir la structure du locus. Ceci suggère que certains facteurs s'associant à HS2 sont requis pour l'activité *enhancer* de HS2 favorisant l'activation transcriptionnelle des gènes  $\gamma$ . Nos résultats montrent qu'en absence de HS2, le recrutement de p45 et de BRG1 aux promoteurs  $\gamma$  ainsi que les interactions entre le LCR et les

promoteurs  $\gamma$  sont affectés. De façon intéressante, ces deux facteurs favorisent le recrutement de la Pol II aux promoteurs de globine et peuvent s'associer à HS2(253,394-396). L'association de NF-E2 à HS2 avait initialement été associée à l'activité *enhancer* de HS2 (255). Il a récemment été rapporté que p45 est impliqué dans les interactions à distance entre le LCR et les promoteurs  $\gamma$  dans les cellules K562 (248). Un autre mécanisme possible de l'activation des gènes  $\gamma$  par HS2 serait via le recrutement du complexe MLL2 par NF-E2 à HS2 et l'étalement de cette enzyme à travers le locus jusqu'aux promoteurs  $\gamma$  (mécanisme de *linking*) où elle serait activée et favoriserait la présence de H3K4Me3 (associé à l'activité transcriptionnelle) tel qu'il a été proposé dans les cellules MEL et K562 (250,397).

BRG1 est aussi impliqué dans les interactions à distance entre le LCR et les promoteurs du locus (398). Nous avons observé qu'en absence de HS2, le recrutement de BRG1 est anormal aux régions HS3 et aux promoteurs  $\gamma$ . Dans notre étude présentée à l'annexe I, nous montrons que le recrutement de BRG1 à HS3 ainsi qu'aux promoteurs  $\gamma$  au stade e10.5 est influencé par Ikaros. Il est tentant de spéculer que l'absence de HS2 influence le recrutement de Ikaros au locus influençant ainsi le recrutement de BRG1. Nous avons d'ailleurs montré que l'absence de Ikaros, tout comme celle de HS2, diminue la fréquence des interactions entre le LCR et les promoteurs  $\gamma$  au stade e10.5. Ainsi, en plus de promouvoir une activation des gènes  $\gamma$  via un mécanisme de *looping* et/ou *linking*, HS2 influence la structure du LCR de telle sorte que certains facteurs tels que Ikaros et BRG1 puissent promouvoir les interactions à distance avec les promoteurs. Il semble qu'une des façons par lesquelles HS2 influence le LCR soit par la promotion de la transcription de ce dernier. Il a été proposé que la transcription du LCR est associée avec son activité de promotion de la transcription des gènes (184,399). Puisque nous observons que la transcription du LCR est diminuée en absence de HS2, nous croyons que la diminution de production de transcrits du LCR est associée avec un recrutement anormal de facteurs de transcription au LCR. En résumé, HS2 joue un rôle important dans l'activation transcriptionnelle des gènes  $\gamma$  entre autres via le recrutement du facteur p45. De plus, HS2

influence le recrutement d'autres facteurs de transcription à HS3, influençant ainsi les interactions à distance entre le LCR et les promoteurs  $\gamma$ .

Lors de la commutation des globines, les gènes  $\gamma$  sont progressivement réprimés. Nous avons montré au chapitre 6 que Ikaros joue un rôle important dans ce processus. En effet, en absence d'Ikaros, nous observons que l'expression des gènes  $\gamma$  est augmentée au moment de la commutation. Alors que le recrutement de Ikaros au locus est associé à l'activation des gènes  $\gamma$  avant la commutation, nos résultats démontrent que son rôle est modifié au moment de la commutation. En effet, Ikaros est toujours recruté à HS3 et aux promoteurs  $\gamma$ . Toutefois, il favorise, avec GATA-1, la formation d'un complexe de répression aux promoteurs  $\gamma$ . Ce complexe, appelé répressosome, comprend les membres du complexe NuRD Mi-2 et HDAC1. La présence de ce complexe aux promoteurs  $\gamma$  empêche les interactions à distance entre le LCR et les promoteurs. Nous croyons que le recrutement de Ikaros aux promoteurs  $\gamma$  est d'une grande importance dans le choix du promoteur à activer pour le LCR. En effet, Ikaros favorise la formation d'un complexe d'activation et de répression aux gènes  $\gamma$  avant et pendant la commutation des globines respectivement.

### **8.1.1.2 Régulation des gènes $\beta$ lors de la différenciation**

Nous rapportons que HS2 promeut principalement l'activation des gènes  $\gamma$ . Plusieurs études suggèrent que HS3 est un élément crucial dans l'activation du gène  $\beta$  (392,400). De façon intéressante, certaines de nos données montrent effectivement que HS2 n'est pas un *enhancer* essentiel du gène  $\beta$ . La première évidence provient du fait que la délétion de HS2 n'influence pas la formation du CPI et l'expression du gène dans les cellules qui ne sont pas soumises à l'effet du PEV. Ainsi, il semble que HS3 et les autres éléments du LCR puissent palier à la perte de HS2. Dans ce contexte, ils possèdent les activités requises pour permettre l'activation à haut niveau de  $\beta$ . Une de ces activités est vraisemblablement celle de BRG1. En effet, lorsque nous avons évalué l'expression du gène  $\beta$  lors de la

commutation des globines, nous avons observé que le gène  $\beta$  est moins exprimé en absence d'Ikaros. L'absence d'Ikaros est associée avec un recrutement normal de tous les facteurs étudiés au site HS2 alors que le recrutement de BRG1 est affecté au niveau de HS3. Ces résultats suggèrent donc que le recrutement de BRG1 à HS3 est un élément crucial dans la médiation des interactions à distance entre le LCR et les promoteurs. De plus, malgré que plusieurs facteurs importants pour l'activation de  $\beta$  soient présents à HS2, il semble que ce ne soit pas suffisant pour permettre l'activation complète de  $\beta$ . Nous ne pouvons pas exclure que HS2 possède une activité de *linking* au niveau du promoteur  $\beta$ . Toutefois, les variations observées à HS3 en absence d'Ikaros et leurs conséquences sur l'expression des gènes du locus suggèrent que cette activité pourrait être favorisée par HS3 dans le contexte où HS2 est absent.

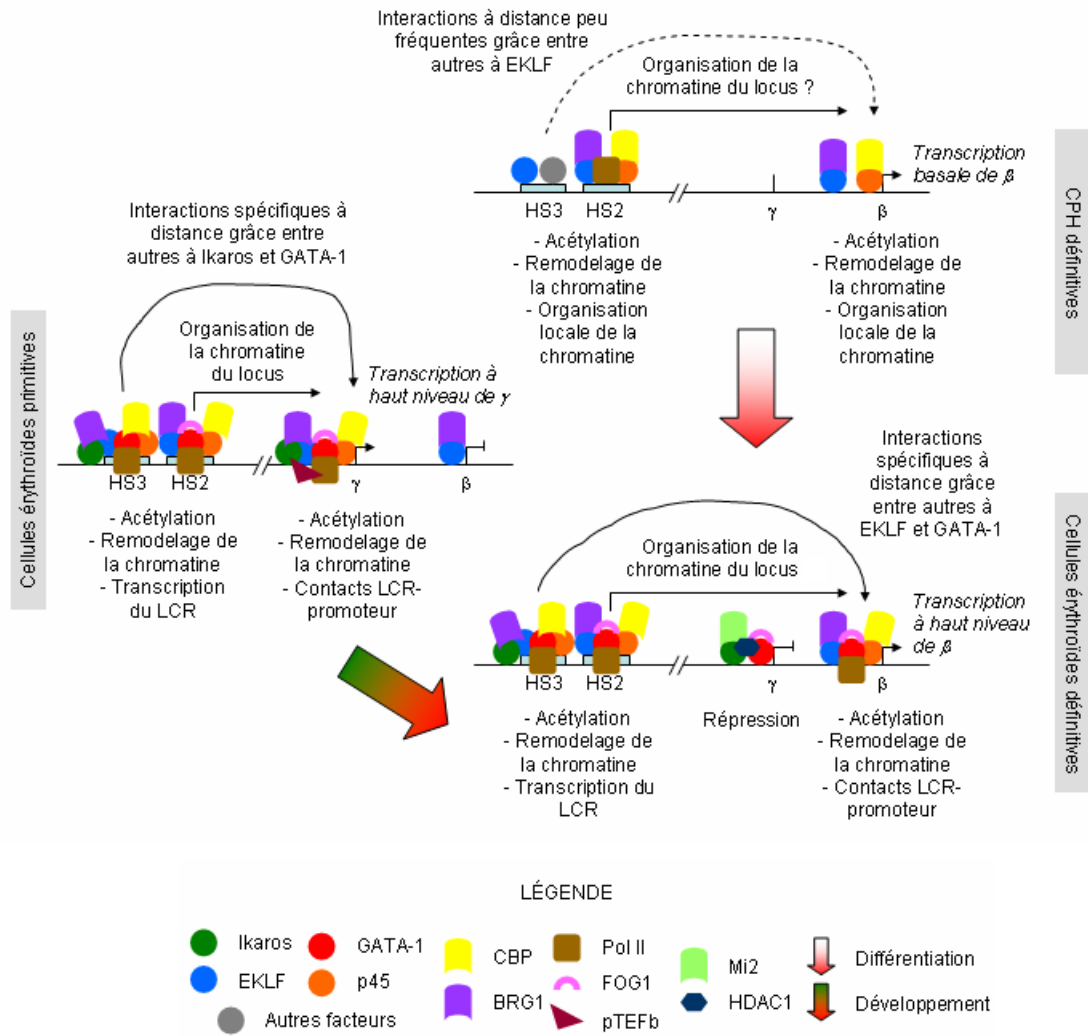
L'importance de EKLf et GATA-1 dans l'activation des gènes  $\beta$  n'est pas à démontrer. En effet, un grand nombre d'étude ont montré que ces facteurs s'associent au LCR ainsi qu'au promoteur  $\beta$  et favorisent son activation transcriptionnelle. EKLf et GATA-1 sont aussi impliqués dans les interactions à distance entre le LCR et le promoteur  $\beta$ . Ces facteurs sont recrutés entre autres à HS2, HS3 et au promoteur  $\beta$ . Notre étude dans les CPH (chapitre 5) montre que EKLf est aussi associé à des niveaux d'expression basale de  $\beta$  dans ces cellules. EKLf favorise le recrutement de BRG1 ainsi que le recrutement de p45 et CBP. Ces facteurs sont impliqués dans la potentialisation de la chromatine du promoteur  $\beta$ . De façon intéressante, une étude de notre laboratoire montre que HS2 est une région importante pour la potentialisation du promoteur  $\beta$  (393). Étant donné que p45 s'associe à HS2 dans les CPH, il est tentant de spéculer que NF-E2 pourrait permettre mécanisme de *linking* associé à la transcription basale du gène  $\beta$ . De plus, il a été rapporté que des interactions peu fréquentes entre le LCR et le promoteur  $\beta$  sont possibles dans les cellules progénitrices. Nous croyons que le recrutement de EKLf à HS3 serait impliqué dans de telles interactions (367). Lors de la différenciation, le recrutement combiné de EKLf et GATA-1 au LCR serait alors associé à des interactions plus fréquentes entre le LCR et le

promoteur  $\beta$  favorisant ainsi un plus haut niveau de transcription de  $\beta$  dans les cellules érythroïdes matures. De plus, le recrutement combiné de GATA-1 et EKLF au promoteur  $\beta$  favoriserait une organisation de la chromatine du promoteur propice aux interactions avec le LCR. Par opposition, le recrutement combiné de Ikaros et GATA-1 aux promoteurs  $\gamma$  promeut une organisation restrictive de la chromatine des promoteurs et défavorise les interactions avec le LCR.

### 8.1.1.3 Modèle proposé

Selon nos données et en se référant à la littérature, nous proposons différentes conclusions. Tout d'abord, HS2 est important pour favoriser une ouverture de la structure de la chromatine du locus  $\mu\beta$ . Le recrutement de p45 à HS2 permet d'organiser la structure de la chromatine favorisant l'activation des gènes  $\gamma$  par les mécanismes de *linking* et/ou *looping* mais n'est pas essentiel pour l'activation transcriptionnelle à haut niveau du gène  $\beta$ . Ensuite, il semble qu'HS3 soit impliqué dans les interactions à distance entre le LCR et les promoteurs à activer et que le recrutement de BRG1 soit important dans ce processus. Finalement, la formation des différents complexes de transcription au niveau des promoteurs joue un rôle important dans la spécificité du promoteur à activer par le LCR. Les complexes formés au LCR sont aussi importants pour son activité permettant entre autres la formation normale du *holocomplex* selon le stade du développement ou de la différenciation.





**Figure 8.1. Résumé de l'activation des gènes du locus hu $\beta$  lors de la différenciation et du développement**

Représentation des différentes combinaisons de facteurs associées aux régions de régulation en *cis* du locus. Voir le texte de la section 8.1.1.

### 8.1.2 Modes de régulation des gènes dans les cellules érythroïdes par Ikaros et GATA-1

L'importance de la combinaison des facteurs Ikaros et GATA-1 au locus *huβ* nous a poussé à investiguer si ces facteurs peuvent réguler d'autres gènes dans les cellules érythroïdes. Nos différents travaux montrent que Ikaros favorise le recrutement de GATA-1 aux promoteurs  $\gamma$ , au promoteur 1G de *Gata2* et au promoteur *Hes1*. De plus, nous observons qu'Ikaros influence le recrutement de FOG1 et Mi-2 aux promoteurs  $\gamma$  ainsi qu'au promoteur *Hes1* lors de la répression de ces promoteurs. Le recrutement de FOG1 ainsi que des éléments du complexe NuRD (MTA2, HDAC1) au promoteur 1G de *Gata2* a déjà été associé à la répression de *Gata2* (277). Puisque Ikaros et GATA-1 s'associent à cette région, il est tentant de proposer que ces facteurs favorisent la répression des gènes  $\gamma$ , *Gata2* et *Hes1* en partie par le recrutement d'éléments du complexe NuRD (Mi2, HDAC1, MTA2).

Lors de notre caractérisation du promoteur *Hes1*, nous avons observé que GATA-1 influence le recrutement de membres du complexe PRC2 (EZH2 et Suz12) favorisant ainsi H3K27Me3. De façon intéressante, il a déjà été montré que les promoteurs  $\gamma$  sont caractérisés par la présence de H3K27Me3 ainsi que par le recrutement de EZH2 et Suz12 lorsqu'ils sont réprimés (268). De plus, H3K27Me3 marque aussi le promoteur 1G de *Gata2* lorsqu'il est réprimé (401). Il est donc possible que l'association de Ikaros et GATA-1 à ces régions soit aussi associée au recrutement de PRC2 comme nous l'avons observé pour *Hes1*.

Notre caractérisation de différents promoteurs régulés par Ikaros et GATA-1 nous permet de proposer un mode de régulation des gènes par ces facteurs dans les cellules érythroïdes. Nos résultats suggèrent qu'Ikaros est un élément important dans l'initiation de la répression de certains gènes par GATA-1. En effet, Ikaros favorise le recrutement et la répression médiée par GATA-1 au niveau des promoteurs qui contiennent un site de liaison pour

Ikaros à proximité de celui de GATA-1. Cette répression serait associée au recrutement d'éléments des complexes NuRD et PRC2.

### **8.1.3 Implication de la combinaison spécifique de facteurs de transcription**

Cette thèse rapporte l'importance de la collaboration entre différents facteurs de transcription exprimés dans les cellules érythroïde pour la régulation des gènes. Particulièrement, nous avons montré de quelle façon EKLF et Ikaros influencent le recrutement d'autres facteurs et cofacteurs au niveau des *enhancers* et des promoteurs des gènes.

EKLF promeut la potentialisation du gène  $\beta$  dans les CPH en collaboration avec p45. Un haut niveau d'expression de ce gène n'est possible qu'en présence de GATA-1, alors que les interactions intrachromosomiques entre le LCR et le promoteur  $\beta$  sont favorisées. Ainsi, la combinaison de EKLF, p45 et GATA-1 est nécessaire pour une expression à haut niveau du gène  $\beta$ . Ikaros est plutôt impliqué dans la régulation des gènes  $\gamma$ . Nous avons montré que la combinaison de Ikaros et GATA-1 aux promoteurs  $\gamma$  est associée à l'activation et la répression de ces gènes selon le stade de développement. Il est intéressant de noter que Ikaros n'est pas recruté au promoteur  $\beta$  suggérant que Ikaros confère une spécificité pour l'activité de GATA-1 aux promoteurs  $\gamma$ .

Tout comme nous l'avons montré pour Ikaros et GATA-1, EKLF et GATA-1 semblent aussi coréguler d'autres gènes que les globines dans les cellules érythroïdes. Alors que nous avons montré différents exemples où Ikaros et GATA-1 favorisent la répression, il semble que la combinaison de EKLF et GATA-1 soit plutôt associée à l'activation transcriptionnelle. Par exemple le gène *Ahsp* qui code pour une protéine importante dans la stabilisation de la chaîne  $\alpha$ -globine lors de l'érythropoïèse est activé par EKLF, GATA-1 et même NF-E2 (402-404). La co-immunoprécipitation de Ikaros et EKLF n'a jamais été rapporté alors que GATA-1 a été montré comme étant un partenaire de ces deux facteurs. Il

est tentant de proposer que les combinaisons Ikaros/GATA-1 et EKLF/GATA-1 soient associées à la régulation de gènes différents. Tout d'abord, Ikaros est exprimé dans les cellules bien avant GATA-1. Ceci supporte un rôle de facilitateur du recrutement de GATA-1 à certains gènes cible. Pour ce qui est de EKLF, il est connu que son expression dépend de GATA-1. De plus, ces deux facteurs régulent une multitude de fonctions cellulaires communes dans les cellules érythroïdes. Ainsi, l'activation de *Eklf* par GATA-1 ainsi que le corecruitment de ces facteurs à différents gènes serait impliqué dans la promotion du destin érythroïde. À l'inverse, le rôle de GATA-1 aux gènes cibles de Ikaros serait, de façon générale, de promouvoir leur répression afin de favoriser la différenciation érythroïde.

## 8.2 Pertinence de l'étude

Le domaine d'étude de cette thèse est la caractérisation de la fonction et de la combinaison spécifique de facteurs de transcription pour la régulation des gènes dans les cellules érythroïdes. Les facteurs de transcription sont des éléments clés dans la régulation transcriptionnelle des gènes. Tel que mentionné dans l'introduction, la régulation adéquate de l'expression des gènes permet le maintien de l'homéostasie cellulaire permettant à la cellule d'accomplir correctement ses fonctions. Un dérèglement dans l'expression d'un ou plusieurs gènes entraîne un fonctionnement anormal de la cellule et très souvent une pathologie.

Afin de bien comprendre comment l'expression de certains gènes est dérégulée, il est important de comprendre comment ces derniers sont régulés lors de différents processus tels que le développement et la différenciation. En comprenant mieux les mécanismes spécifiques de régulation transcriptionnelle, on peut mieux déceler comment certaines maladies se développent et quelle est leur influence sur le tissu affecté. De plus, l'élaboration de thérapies ciblées n'est possible qu'en ayant un portrait détaillé de la fonction des différents composants impliqués dans la régulation transcriptionnelle.

### **8.2.1 Pertinence dans le domaine de recherche**

Les travaux présentés dans cette thèse portent principalement sur la compréhension de mécanismes transcriptionnels dans les cellules érythroïdes. Le locus *huβ* a servi dans le passé à caractériser plusieurs mécanismes transcriptionnels. De façon intéressante, l'étude de ce locus suscite encore beaucoup d'intérêt. Une des plus importantes raisons serait qu'il est encore impossible de traiter adéquatement les patients souffrant de  $\beta$ -thalassémie ou d'anémie falciforme. Un autre aspect non négligeable est la quantité impressionnante de données disponibles sur ce locus qui fait en sorte qu'il est possible de progresser de façon plus approfondie dans la compréhension de la régulation de ce locus. Tel qu'il a déjà été mentionné, les mécanismes identifiés par l'étude du locus *huβ* peuvent s'appliquer à d'autres gènes et pas seulement dans les cellules érythroïdes.

Il reste encore plusieurs aspects de la régulation par les facteurs de transcription à identifier. Ces facteurs jouent des rôles bien précis à différents gènes et sont influencés par différents éléments. Notre étude sur la combinaison entre les différents facteurs de transcription contribue à mieux comprendre comment les facteurs de transcription sont régulés dans les cellules. Différentes combinaisons peuvent moduler l'expression des gènes de façon différente. Ceci fait en sorte que les facteurs de transcription seraient des cibles intéressantes pour corriger de façon plus spécifique une expression anormale des gènes (section 8.2.2).

#### **8.2.1.1 Études du locus *huβ***

Le locus *huβ* est un modèle qui a été extensivement utilisé dans le domaine d'étude de la régulation transcriptionnelle. Ses caractéristiques décrites aux sections 2.1.2.4.2 et 3.2.1.1.1 en font un modèle de choix. Particulièrement, le fait que les gènes du locus soient régulés lors du développement et de la différenciation permet d'aborder différentes facettes de la régulation transcriptionnelle de ce locus. Le locus *huβ* a permis d'étudier des mécanismes

fondamentaux de régulation transcriptionnelle tels que le fonctionnement des éléments *enhancer* et la fonction des facteurs de transcription dans les cellules érythroïdes.

Le LCR du locus  $hu\beta$  est un élément qui s'est avéré être très complexe et la façon dont il fonctionne est encore le sujet de différentes investigations. Notre étude approfondie sur la fonction du HS2 a permis d'apporter des éléments nouveaux sur sa fonction d'*enhancer* étant donné que nous avons montré que cette fonction n'est pas dépendante de la fonction de HS2 dans l'organisation de la chromatine du locus  $hu\beta$ . Cette démonstration est importante pour comprendre le fonctionnement particulier du HS2 mais aussi du LCR dans son ensemble. En effet, les différents HS ont une influence les uns sur les autres et semblent participer à la formation du *holocomplex* (Figure 2.5 et sections 4.2, 6.3.4, 8.1.1.1). Un deuxième élément de notre étude qui est nouveau pour le domaine est que HS2 n'est pas essentiel pour l'activation du gène  $\beta$ . Plusieurs études avaient suggéré que HS2 soit un puissant *enhancer* pour le gène  $\beta$ . Nos résultats montrent toutefois que cette fonction peut être remplie par les autres HS du LCR. Ainsi, nous croyons qu'il est important d'approfondir l'étude des éléments *enhancer* complexes puisque cela nous permet de comprendre spécifiquement leur fonctionnement. Dans un contexte plus général, notre étude s'insère dans le domaine de recherche sur la fonction et la modulation des éléments *enhancer*. En effet, les différentes caractéristiques de HS2 peuvent être retrouvées dans d'autres éléments *enhancer* à d'autres gènes ou loci. De plus, les éléments *enhancer* sont essentiels pour la thérapie génique (section 8.2.2). Étant donné que ce type de thérapie n'est pas encore une thérapie facilement utilisable dû à une mauvaise efficacité, il semble important de poursuivre la recherche permettant de mieux comprendre le fonctionnement des éléments *enhancer*.

Plusieurs facteurs de transcription exprimés dans les cellules érythroïdes ont été découverts grâce au fait qu'ils régulent le locus  $hu\beta$ . Des facteurs comme EKLF, GATA-1 ou NF-E2 sont extrêmement importants pour l'expression du gène  $\beta$ . Rapidement, des études subséquentes ont montrées que ces facteurs régulent toute une série de gènes dans les

cellules érythroïdes. Ceci montre encore une fois que l'étude de la régulation du locus  $\text{hu}\beta$  ouvre la porte à d'autres découvertes pertinentes sur le fonctionnement des cellules érythroïdes. Nos différents travaux lors du développement et de la différenciation des cellules érythroïdes ont permis d'identifier de nouvelles fonctions pour différents facteurs exprimés dans les cellules érythroïdes. Par exemple, nous avons rapporté pour la première fois que EKLf et p45 sont impliqués dans la potentialisation des gènes dans les CPH. La façon dont les gènes sont potentialisés est peu étudiée. Pourtant ce phénomène est à la base de la différenciation et de la spécification cellulaire et nécessite d'autres études plus approfondies. Notre étude est une contribution importante pour le domaine puisque la modulation des facteurs de transcription dans les cellules progénitrices est une avenue prometteuse qui permettrait de corriger un défaut d'expression d'un gène dans les cellules matures.

Un second exemple de nouvelle fonction pour un facteur de transcription est le rôle d'Ikaros dans la répression des gènes  $\gamma$ . En effet, nous rapportons que Ikaros participe avec GATA-1 dans la répression des gènes  $\gamma$  lors de la commutation des globines. Cette démonstration est importante pour deux raisons. Tout d'abord, nous avons montré pour la première fois que Ikaros et GATA-1 sont des partenaires et que Ikaros influence le recrutement de GATA-1 aux promoteurs  $\gamma$ . Ceci indique que Ikaros joue un rôle dans la régulation de l'activité de répresseur de GATA-1. En d'autres termes, la combinaison de Ikaros et GATA-1 est nécessaire pour favoriser la répression des gènes  $\gamma$ . De plus, l'identification de Ikaros comme un répresseur des gènes  $\gamma$  en fait une cible de choix pour moduler l'expression des gènes  $\gamma$ . De façon intéressante, Ikaros et GATA-1 peuvent aussi agir à titre d'activateurs des gènes  $\gamma$  lors du développement (Annexe I). Ainsi, une façon de maintenir l'expression des gènes  $\gamma$  dans les cas de  $\beta$ -thalassémie serait d'empêcher la formation du complexe de répression nucléé par Ikaros.

### 8.2.1.2 Étude des facteurs de transcription à d'autres gènes

Tel qu'il a été mentionné plus tôt, les études sur la régulation du locus *huβ* permettent d'identifier des mécanismes de régulation transcriptionnelle qui peuvent être appliqués à d'autres gènes. Dans le cas de notre étude sur la combinaison de Ikaros et GATA-1 dans la régulation transcriptionnelle, nous avons identifié d'autres gènes (*Gata2* et *Hes1*) comme étant des cibles de ces facteurs. De plus, il semble que le mécanisme de répression de ces gènes par Ikaros et GATA-1 est similaire, suggérant que cette combinaison de facteurs est biologiquement significative. De plus, dans le cas des deux gènes étudiés, la répression transcriptionnelle par Ikaros et GATA-1 favorise la différenciation des cellules érythroïdes. La promotion de la différenciation des cellules peut être utile au niveau thérapeutique dans divers contextes. Encore une fois, la combinaison Ikaros et GATA-1 pourrait être utilisée comme cible thérapeutique afin de promouvoir la répression des gènes cibles et la différenciation des cellules vers la lignée érythroïde.

### 8.2.2 Thérapies visant à corriger une expression anormale des gènes

Une façon de réactiver un gène dont l'expression est affectée par une mutation héréditaire est d'introduire à l'aide d'un vecteur ce gène dans le tissu afin de rétablir l'expression de ce gène. La thérapie génique était donc une avenue prometteuse pour le traitement des thalassémies et de l'anémie falciforme. Les nombreux efforts visant à comprendre comment les locus  $\alpha$ - et  $\beta$ -globine sont régulés étaient entre autres destinés à développer une stratégie pour réactiver le gène muté. Malheureusement, jusqu'à aujourd'hui, la thérapie génique n'obtient que peu de succès en essai clinique entre autres puisque le traitement n'est pas durable et qu'il peut occasionner des problèmes secondaires majeurs. L'identification de facteurs impliqués dans la répression des gènes  $\gamma$  tel que Ikaros peut permettre le développement de stratégies visant à réactiver l'expression de ces gènes chez les patients thalassémiques ou anémiques.



Les nombreuses découvertes dans le domaine de la régulation épigénétique des gènes ont permis de développer de nouvelles stratégies de traitement, particulièrement pour les cancers. En effet, il avait été observé que dans certains cancers, plusieurs gènes étaient inactivés de façon épigénétique à cause d'une déacétylation massive des gènes. Des inhibiteurs d'histones déacétylases ont été développés et sont aujourd'hui utilisés dans le traitement de différents cancers permettant la réactivation des gènes anormalement régulés. Le ciblage d'un cofacteur qui peut réguler une grande variété de gènes n'est pas sans conséquences. Ainsi, il semble que la caractérisation de mécanismes particuliers régulés par des facteurs de transcription spécifiques permettrait l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de diverses maladies.

## Chapitre 9 : Conclusion

### 9.1 Conclusions générales

L'objectif général de cette thèse était de caractériser de nouvelles fonctions pour différents facteurs de transcription en étudiant la combinaison spécifique de facteurs lors de la différenciation et du développement des cellules érythroïdes. Nous rapportons que le facteur de transcription GATA-1 peut agir conjointement et même, s'associer à différents facteurs et cofacteurs de transcription afin de réguler d'une façon spécifique ses différents gènes cibles. La capacité de GATA-1 à réguler des gènes avec EKLF ou Ikaros a particulièrement été étudiée. La spécificité de la combinaison des facteurs varie selon le stade de développement ainsi que lors de la différenciation. Ceci fait en sorte que les gènes sont régulés différemment afin d'être exprimés au bon moment dans le type cellulaire approprié. Nos résultats font aussi état de l'importance des éléments *enhancer* dans la régulation transcriptionnelle. Ceux-ci sont requis pour le recrutement local de différente combinaison de facteurs et cofacteurs de transcription. Le recrutement différentiel des facteurs de transcription à ces éléments est donc impliqué dans la spécificité de l'expression des gènes lors de la différenciation et du développement.

### 9.2 Futur du domaine de recherche

Il est estimé qu'il existe entre 1500 et 2000 gènes codant pour des facteurs de transcription dans les cellules humaines (405). Toutefois, une très petite portion de ces facteurs de transcription a été étudiée au niveau fonctionnel avec un biais pour les facteurs impliqués dans les maladies. Puisque les facteurs de transcription peuvent s'influencer entre eux, il apparaît important d'investiguer les différentes collaborations possibles entre ces facteurs. En effet, les facteurs de transcription n'agissent pas seuls dans la régulation des gènes et une combinaison spécifique de facteurs de transcription est requise pour permettre une expression adéquate des gènes. Notre étude a identifié différentes relations entre certains

facteurs de transcription permettant de mieux comprendre l'importance relative de ces derniers. Il est toutefois important de souligner que certains phénomènes (ex : recrutement de cofacteurs de transcription) n'ont pu être expliqués, ce qui est très probablement dû à la participation d'autres facteurs de transcription dans la régulation des gènes que nous avons étudiés. Ceci montre donc l'importance de poursuivre la caractérisation des différentes interactions fonctionnelles entre les facteurs de transcription.

Les cofacteurs de transcription sont déjà utilisés comme cible thérapeutique (ex : inhibiteur de HDACs). Les cofacteurs peuvent réguler une très grande quantité de gènes ce qui augmente les effets secondaires de la thérapie. Les facteurs de transcription s'associent de façon plus spécifique à certains gènes cibles faisant de ces derniers des cibles intéressantes. Le fait que des modifications post-traductionnelles modifient leur activité fait en sorte qu'il serait possible de cibler de façon précise le facteur d'intérêt. Toutefois, la combinaison de facteurs de transcription caractérise de façon encore plus précise la régulation de certains gènes. Une identification précise des différentes combinaisons possibles ainsi que de leurs différentes fonctions permettra de bien comprendre comment les différents gènes sont régulés. Ainsi, plus les connaissances sur les mécanismes de régulation d'un gène sont grandes, plus il sera facile de développer une stratégie thérapeutique spécifique pour corriger l'expression de ce gène dans une maladie.

### **9.3 Perspectives de recherche**

Malgré que le rôle de plusieurs facteurs de transcription soit l'objet de plusieurs investigations, certaines facettes de leur régulation restent peu explorées. Les facteurs de transcription sont des éléments qui régulent directement certains gènes qui auront une fonction spécifique dans la cellule et qui influenceront son destin. Il est connu que le niveau d'expression des différents facteurs est variable lors du développement et de la différenciation. Toutefois, la façon dont certains facteurs sont régulés par les signaux environnementaux de la cellule reste inconnue. Malgré qu'il soit connu que l'activité de GATA-1 est influencée par la voie JAK/STAT via des modifications post-traductionnelles,

il existe peu d'évidence expliquant de quelle façon l'expression de *Gata1* est augmentée en réponse à l'environnement lors de la différenciation. De plus, il n'est pas clair si l'expression de *Gata1* est influencée par des voies de signalisation telles que l'Epo ou c-kit. Pour ce qui est du gène *Ikzf1* (codant pour Ikaros), il n'est pas connu comment son expression est modulée lors de la différenciation. L'identification de signaux externes influençant son expression pourrait permettre d'expliquer pourquoi les niveaux d'expression de ce gène sont variables d'un tissu hématopoïétique à l'autre.

Une voie de signalisation que nous avons exploré et qui influence la transcription de différents gènes est la voie Notch. L'activation du récepteur par un ligand induit directement une augmentation de l'activité transcriptionnelle de certains gènes cibles. Malgré que tous les récepteurs ne soient pas de potentiels activateurs de la transcription, plusieurs d'entre eux peuvent induire des modifications post-traductionnelles des protéines permettant leur activation ou leur inhibition. Un exemple de médiateur de plusieurs voies de signalisation est la MAPK p38. Il a été montré que la phosphorylation de p38 est impliquée dans la différenciation érythroïde ainsi que dans la régulation des gènes  $\gamma$ . Nous croyons que la caractérisation des mécanismes transcriptionnels influencés par des stimuli externes permettrait de mieux comprendre comment certains facteurs de transcription sont régulés. Cet aspect est important dans le développement de stratégie spécifique visant à corriger des défauts d'expression génique.

## Bibliographie

*Note : Bibliographie pour les chapitres 1-3 et 8-9. Des bibliographies indépendantes sont intégrées aux chapitres 4-7.*

1. Baglioni, C. and Colombo, B. (1964) Control of Hemoglobin Synthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **29**, 347-356.
2. Weatherall, D.J. (1967) The control of haemoglobin synthesis. *Proc R Soc Med*, **60**, 1037-1041.
3. Galloway, J.L. and Zon, L.I. (2003) Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol*, **53**, 139-158.
4. Robin, C., Ottersbach, K., de Bruijn, M., Ma, X., van der Horn, K. and Dzierzak, E. (2003) Developmental origins of hematopoietic stem cells. *Oncol Res*, **13**, 315-321.
5. Keller, G. and Snodgrass, R. (1990) Life span of multipotential hematopoietic stem cells in vivo. *J Exp Med*, **171**, 1407-1418.
6. Tavian, M. and Peault, B. (2005) Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol*, **49**, 243-250.
7. Palis, J. and Yoder, M.C. (2001) Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol*, **29**, 927-936.
8. Tavian, M., Biasch, K., Sinka, L., Vallet, J. and Peault, B. (2010) Embryonic origin of human hematopoiesis. *Int J Dev Biol*, **54**, 1061-1065.
9. Lensch, M.W. and Daley, G.Q. (2004) Origins of mammalian hematopoiesis: in vivo paradigms and in vitro models. *Curr Top Dev Biol*, **60**, 127-196.
10. Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C. and Keller, G. (1999) Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, **126**, 5073-5084.

11. Muller, A.M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F. and Dzierzak, E. (1994) Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity*, **1**, 291-301.
12. Medvinsky, A. and Dzierzak, E. (1996) Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*, **86**, 897-906.
13. de Bruijn, M.F., Speck, N.A., Peeters, M.C. and Dzierzak, E. (2000) Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J*, **19**, 2465-2474.
14. Godin, I., Dieterlen-Lievre, F. and Cumano, A. (1995) Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 773-777.
15. Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A.M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., Ansell, J. and Medvinsky, A. (2002) Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development*, **129**, 4891-4899.
16. Mikkola, H.K., Gekas, C., Orkin, S.H. and Dieterlen-Lievre, F. (2005) Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. *Exp Hematol*, **33**, 1048-1054.
17. Morrison, S.J., Hemmati, H.D., Wandycz, A.M. and Weissman, I.L. (1995) The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10302-10306.
18. Auerbach, R., Huang, H. and Lu, L. (1996) Hematopoietic stem cells in the mouse embryonic yolk sac. *Stem Cells*, **14**, 269-280.
19. Medvinsky, A., Rybtsov, S. and Taoudi, S. (2011) Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development*, **138**, 1017-1031.
20. Blank, U., Karlsson, G. and Karlsson, S. (2008) Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood*, **111**, 492-503.

21. Xu, M.J., Matsuoka, S., Yang, F.C., Ebihara, Y., Manabe, A., Tanaka, R., Eguchi, M., Asano, S., Nakahata, T. and Tsuji, K. (2001) Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood*, **97**, 2016-2022.
22. Lessard, J., Faubert, A. and Sauvageau, G. (2004) Genetic programs regulating HSC specification, maintenance and expansion. *Oncogene*, **23**, 7199-7209.
23. Venezia, T.A., Merchant, A.A., Ramos, C.A., Whitehouse, N.L., Young, A.S., Shaw, C.A. and Goodell, M.A. (2004) Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol*, **2**, e301.
24. Li, J. (2011) Quiescence regulators for hematopoietic stem cell. *Exp Hematol*, **39**, 511-520.
25. Lessard, J.A. and Crabtree, G.R. (2010) Chromatin regulatory mechanisms in pluripotency. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **26**, 503-532.
26. Kawamoto, H., Ikawa, T., Masuda, K., Wada, H. and Katsura, Y. (2010) A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. *Immunol Rev*, **238**, 23-36.
27. Adolfsson, J., Mansson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A. *et al.* (2005) Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, **121**, 295-306.
28. Wilson, A., Murphy, M.J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M.D., Oser, G.M., Pasche, A.C., Knabenhans, C., Macdonald, H.R. and Trumpp, A. (2004) c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*, **18**, 2747-2763.
29. Lessard, J. and Sauvageau, G. (2003) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*, **423**, 255-260.
30. Park, I.K., Qian, D., Kiel, M., Becker, M.W., Pihalja, M., Weissman, I.L., Morrison, S.J. and Clarke, M.F. (2003) Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*, **423**, 302-305.

31. Hu, M., Krause, D., Greaves, M., Sharkis, S., Dexter, M., Heyworth, C. and Enver, T. (1997) Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev*, **11**, 774-785.
32. Akashi, K. (2005) Lineage promiscuity and plasticity in hematopoietic development. *Ann N Y Acad Sci*, **1044**, 125-131.
33. Orkin, S.H. (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*, **1**, 57-64.
34. Metcalf, D. (1999) Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: are our dogmas correct? *Ann N Y Acad Sci*, **872**, 289-303; discussion 303-284.
35. Steinman, R.A. (2002) Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene*, **21**, 3403-3413.
36. Seita, J. and Weissman, I.L. (2010) Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, **2**, 640-653.
37. Ogawa, M. (1993) Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, **81**, 2844-2853.
38. Pal, G.K. and Pal, P. (2005) *Textbook Of Practical Physiology*. Orient Longman Private Ltd, Chennai.
39. Nakamura, T. and Staub, N.C. (1964) Synergism in the Kinetic Reactions of O<sub>2</sub> and Co<sub>2</sub> with Human Red Blood Cells. *J Physiol*, **173**, 161-177.
40. Adamson, J.W. and Finch, C.A. (1975) Hemoglobin function, oxygen affinity, and erythropoietin. *Annu Rev Physiol*, **37**, 351-369.
41. Zhang, A.S. and Enns, C.A. (2009) Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. *J Biol Chem*, **284**, 711-715.
42. Ajioka, R.S., Phillips, J.D. and Kushner, J.P. (2006) Biosynthesis of heme in mammals. *Biochim Biophys Acta*, **1763**, 723-736.
43. Wong, P.M., Chung, S.W., Chui, D.H. and Eaves, C.J. (1986) Properties of the earliest clonogenic hemopoietic precursors to appear in the developing murine yolk sac. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3851-3854.



44. Huber, T.L., Kouskoff, V., Fehling, H.J., Palis, J. and Keller, G. (2004) Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature*, **432**, 625-630.
45. Lugus, J.J., Park, C., Ma, Y.D. and Choi, K. (2009) Both primitive and definitive blood cells are derived from Flk-1+ mesoderm. *Blood*, **113**, 563-566.
46. Ferkowicz, M.J. and Yoder, M.C. (2005) Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. *Exp Hematol*, **33**, 1041-1047.
47. Kingsley, P.D., Malik, J., Emerson, R.L., Bushnell, T.P., McGrath, K.E., Bloedorn, L.A., Bulger, M. and Palis, J. (2006) "Maturation" globin switching in primary primitive erythroid cells. *Blood*, **107**, 1665-1672.
48. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. and Weissman, I.L. (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, **404**, 193-197.
49. Ingley, E., Tilbrook, P.A. and Klinken, S.P. (2004) New insights into the regulation of erythroid cells. *IUBMB Life*, **56**, 177-184.
50. Alter, B.P. (1994) Biology of erythropoiesis. *Ann N Y Acad Sci*, **731**, 36-47.
51. Ji, P., Murata-Hori, M. and Lodish, H.F. (2011) Formation of mammalian erythrocytes: chromatin condensation and enucleation. *Trends Cell Biol*, **21**, 409-415.
52. Bernard, J. (1991) The erythroblastic island: past and future. *Blood Cells*, **17**, 5-10; discussion 10-14.
53. Chasis, J.A. (2006) Erythroblastic islands: specialized microenvironmental niches for erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*, **13**, 137-141.
54. Sadahira, Y., Yasuda, T., Yoshino, T., Manabe, T., Takeishi, T., Kobayashi, Y., Ebe, Y. and Naito, M. (2000) Impaired splenic erythropoiesis in phlebotomized mice injected with CL2MDP-liposome: an experimental model for studying the role of stromal macrophages in erythropoiesis. *J Leukoc Biol*, **68**, 464-470.
55. Chasis, J.A. and Mohandas, N. (2008) Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*, **112**, 470-478.

56. De Maria, R., Testa, U., Luchetti, L., Zeuner, A., Stassi, G., Pelosi, E., Riccioni, R., Felli, N., Samoggia, P. and Peschle, C. (1999) Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood*, **93**, 796-803.
57. Liu, Y., Pop, R., Sadegh, C., Brugnara, C., Haase, V.H. and Socolovsky, M. (2006) Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood*, **108**, 123-133.
58. Leimberg, M.J., Prus, E., Konijn, A.M. and Fibach, E. (2008) Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. *J Cell Biochem*, **103**, 1211-1218.
59. Skutelsky, E. and Danon, D. (1972) On the expulsion of the erythroid nucleus and its phagocytosis. *Anat Rec*, **173**, 123-126.
60. Beru, N., McDonald, J., Lacombe, C. and Goldwasser, E. (1986) Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol*, **6**, 2571-2575.
61. Semenza, G.L., Nejfelt, M.K., Chi, S.M. and Antonarakis, S.E. (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5680-5684.
62. Noguchi, C.T., Wang, L., Rogers, H.M., Teng, R. and Jia, Y. (2008) Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage. *Expert Rev Mol Med*, **10**, e36.
63. Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. and Lodish, H.F. (1995) Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*, **83**, 59-67.
64. McGann, J.K., Silver, L., Liesveld, J. and Palis, J. (1997) Erythropoietin-receptor expression and function during the initiation of murine yolk sac erythropoiesis. *Exp Hematol*, **25**, 1149-1157.
65. Lee, R., Kertesz, N., Joseph, S.B., Jegalian, A. and Wu, H. (2001) Erythropoietin (Epo) and EpoR expression and 2 waves of erythropoiesis. *Blood*, **98**, 1408-1415.
66. Makita, T., Hernandez-Hoyos, G., Chen, T.H., Wu, H., Rothenberg, E.V. and Sucov, H.M. (2001) A developmental transition in definitive erythropoiesis: erythropoietin

expression is sequentially regulated by retinoic acid receptors and HNF4. *Genes Dev*, **15**, 889-901.

67. Krantz, S.B. (1991) Erythropoietin. *Blood*, **77**, 419-434.

68. Menon, M.P., Karur, V., Bogacheva, O., Bogachev, O., Cuetara, B. and Wojchowski, D.M. (2006) Signals for stress erythropoiesis are integrated via an erythropoietin receptor-phosphotyrosine-343-Stat5 axis. *J Clin Invest*, **116**, 683-694.

69. Socolovsky, M., Fallon, A.E., Wang, S., Brugnara, C. and Lodish, H.F. (1999) Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a<sup>-/-</sup>5b<sup>-/-</sup> mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*, **98**, 181-191.

70. Kerenyi, M.A., Grebien, F., Gehart, H., Schifrer, M., Artaker, M., Kovacic, B., Beug, H., Moriggl, R. and Mullner, E.W. (2008) Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1. *Blood*, **112**, 3878-3888.

71. Lin, C.S., Lim, S.K., D'Agati, V. and Costantini, F. (1996) Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev*, **10**, 154-164.

72. Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G. and Ihle, J.N. (1998) Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, **93**, 841-850.

73. Socolovsky, M., Nam, H., Fleming, M.D., Haase, V.H., Brugnara, C. and Lodish, H.F. (2001) Ineffective erythropoiesis in Stat5a<sup>(-/-)</sup>5b<sup>(-/-)</sup> mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood*, **98**, 3261-3273.

74. Watowich, S.S., Yoshimura, A., Longmore, G.D., Hilton, D.J., Yoshimura, Y. and Lodish, H.F. (1992) Homodimerization and constitutive activation of the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 2140-2144.

75. Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O. and Ihle, J.N. (1993) JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*, **74**, 227-236.

76. Lecoq-Lafon, C., Verdier, F., Fichelson, S., Chretien, S., Gisselbrecht, S., Lacombe, C. and Mayeux, P. (1999) Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of GAB1

and its association with SHC, SHP2, SHIP, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood*, **93**, 2578-2585.

77. Miura, Y., Miura, O., Ihle, J.N. and Aoki, N. (1994) Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by the erythropoietin receptor. *J Biol Chem*, **269**, 29962-29969.

78. Okutani, Y., Kitanaka, A., Tanaka, T., Kamano, H., Ohnishi, H., Kubota, Y., Ishida, T. and Takahara, J. (2001) Src directly tyrosine-phosphorylates STAT5 on its activation site and is involved in erythropoietin-induced signaling pathway. *Oncogene*, **20**, 6643-6650.

79. Geest, C.R. and Coffey, P.J. (2009) MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *J Leukoc Biol*, **86**, 237-250.

80. Kadri, Z., Maouche-Chretien, L., Rooke, H.M., Orkin, S.H., Romeo, P.H., Mayeux, P., Leboulch, P. and Chretien, S. (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt induced by erythropoietin renders the erythroid differentiation factor GATA-1 competent for TIMP-1 gene transactivation. *Mol Cell Biol*, **25**, 7412-7422.

81. Testa, U., Fossati, C., Samoggia, P., Masciulli, R., Mariani, G., Hassan, H.J., Sposi, N.M., Guerriero, R., Rosato, V., Gabbianelli, M. *et al.* (1996) Expression of growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors. *Blood*, **88**, 3391-3406.

82. Munugalavada, V. and Kapur, R. (2005) Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol*, **54**, 63-75.

83. Keshet, E., Lyman, S.D., Williams, D.E., Anderson, D.M., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. and Parada, L.F. (1991) Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J*, **10**, 2425-2435.

84. Linenberger, M.L., Jacobson, F.W., Bennett, L.G., Broudy, V.C., Martin, F.H. and Abkowitz, J.L. (1995) Stem cell factor production by human marrow stromal fibroblasts. *Exp Hematol*, **23**, 1104-1114.

85. Toksoz, D., Zsebo, K.M., Smith, K.A., Hu, S., Brankow, D., Suggs, S.V., Martin, F.H. and Williams, D.A. (1992) Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 7350-7354.
86. Dubreuil, P., Rottapel, R., Reith, A.D., Forrester, L. and Bernstein, A. (1990) The mouse W/c-kit locus. A mammalian gene that controls the development of three distinct cell lineages. *Ann N Y Acad Sci*, **599**, 58-65.
87. Broxmeyer, H.E., Maze, R., Miyazawa, K., Carow, C., Hendrie, P.C., Cooper, S., Hangoc, G., Vadhan-Raj, S. and Lu, L. (1991) The kit receptor and its ligand, steel factor, as regulators of hemopoiesis. *Cancer Cells*, **3**, 480-487.
88. Gommerman, J.L., Sittaro, D., Klebasz, N.Z., Williams, D.A. and Berger, S.A. (2000) Differential stimulation of c-Kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential. *Blood*, **96**, 3734-3742.
89. Lennartsson, J., Blume-Jensen, P., Hermanson, M., Ponten, E., Carlberg, M. and Ronnstrand, L. (1999) Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene*, **18**, 5546-5553.
90. Linnekin, D., DeBerry, C.S. and Mou, S. (1997) Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *J Biol Chem*, **272**, 27450-27455.
91. Serve, H., Yee, N.S., Stella, G., Sepp-Lorenzino, L., Tan, J.C. and Besmer, P. (1995) Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor-mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cells. *EMBO J*, **14**, 473-483.
92. Thommes, K., Lennartsson, J., Carlberg, M. and Ronnstrand, L. (1999) Identification of Tyr-703 and Tyr-936 as the primary association sites for Grb2 and Grb7 in the c-Kit/stem cell factor receptor. *Biochem J*, **341 ( Pt 1)**, 211-216.

93. Timokhina, I., Kissel, H., Stella, G. and Besmer, P. (1998) Kit signaling through PI 3-kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *EMBO J*, **17**, 6250-6262.
94. Ueda, S., Mizuki, M., Ikeda, H., Tsujimura, T., Matsumura, I., Nakano, K., Daino, H., Honda Zi, Z., Sonoyama, J., Shibayama, H. *et al.* (2002) Critical roles of c-Kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis: contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration. *Blood*, **99**, 3342-3349.
95. Huddleston, H., Tan, B., Yang, F.C., White, H., Wenning, M.J., Orazi, A., Yoder, M.C., Kapur, R. and Ingram, D.A. (2003) Functional p85alpha gene is required for normal murine fetal erythropoiesis. *Blood*, **102**, 142-145.
96. Ratajczak, J., Zhang, Q., Pertusini, E., Wojczyk, B.S., Wasik, M.A. and Ratajczak, M.Z. (1998) The role of insulin (INS) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in regulating human erythropoiesis. Studies in vitro under serum-free conditions--comparison to other cytokines and growth factors. *Leukemia*, **12**, 371-381.
97. Migliaccio, G., Di Pietro, R., di Giacomo, V., Di Baldassarre, A., Migliaccio, A.R., Maccioni, L., Galanello, R. and Papayannopoulou, T. (2002) In vitro mass production of human erythroid cells from the blood of normal donors and of thalassemic patients. *Blood Cells Mol Dis*, **28**, 169-180.
98. Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y.D., Ellis, L.M. and Semenza, G.L. (2002) Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*, **277**, 38205-38211.
99. Mui, A.L., Wakao, H., O'Farrell, A.M., Harada, N. and Miyajima, A. (1995) Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *EMBO J*, **14**, 1166-1175.
100. Ruscetti, F.W., Akel, S. and Bartelmez, S.H. (2005) Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. *Oncogene*, **24**, 5751-5763.

101. Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, **407**, 770-776.
102. Zeuner, A., Eramo, A., Testa, U., Felli, N., Pelosi, E., Mariani, G., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Condorelli, G., Peschle, C. *et al.* (2003) Control of erythroid cell production via caspase-mediated cleavage of transcription factor SCL/Tal-1. *Cell Death Differ*, **10**, 905-913.
103. De Maria, R., Zeuner, A., Eramo, A., Domenichelli, C., Bonci, D., Grignani, F., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Testa, U. and Peschle, C. (1999) Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, **401**, 489-493.
104. Testa, U. (2004) Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. *Leukemia*, **18**, 1176-1199.
105. Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W.S. and Bernstein, I.D. (2000) Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med*, **6**, 1278-1281.
106. Stier, S., Cheng, T., Dombkowski, D., Carlesso, N. and Scadden, D.T. (2002) Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood*, **99**, 2369-2378.
107. Duncan, A.W., Rattis, F.M., DiMascio, L.N., Congdon, K.L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J.M., Willert, K., Gaiano, N. *et al.* (2005) Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol*, **6**, 314-322.
108. Sultana, D.A., Bell, J.J., Zlotoff, D.A., De Obaldia, M.E. and Bhandoola, A. (2010) Eliciting the T cell fate with Notch. *Semin Immunol*, **22**, 254-260.
109. Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J. and MacDonald, H.R. (2004) Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat Immunol*, **5**, 247-253.
110. Deftos, M.L. and Bevan, M.J. (2000) Notch signaling in T cell development. *Curr Opin Immunol*, **12**, 166-172.
111. Jang, M.S., Miao, H., Carlesso, N., Shelly, L., Zlobin, A., Darack, N., Qin, J.Z., Nickoloff, B.J. and Miele, L. (2004) Notch-1 regulates cell death independently of differentiation in murine erythroleukemia cells through multiple apoptosis and cell cycle pathways. *J Cell Physiol*, **199**, 418-433.

112. Shelly, L.L., Fuchs, C. and Miele, L. (1999) Notch-1 inhibits apoptosis in murine erythroleukemia cells and is necessary for differentiation induced by hybrid polar compounds. *J Cell Biochem*, **73**, 164-175.
113. Lam, L.T., Ronchini, C., Norton, J., Capobianco, A.J. and Bresnick, E.H. (2000) Suppression of erythroid but not megakaryocytic differentiation of human K562 erythroleukemic cells by notch-1. *J Biol Chem*, **275**, 19676-19684.
114. Zeuner, A., Francescangeli, F., Signore, M., Venneri, M.A., Pedini, F., Felli, N., Pagliuca, A., Conticello, C. and De Maria, R. The Notch2-Jagged1 interaction mediates stem cell factor signaling in erythropoiesis. *Cell Death Differ*.
115. Henning, K., Heering, J., Schwanbeck, R., Schroeder, T., Helmbold, H., Schafer, H., Deppert, W., Kim, E. and Just, U. (2008) Notch1 activation reduces proliferation in the multipotent hematopoietic progenitor cell line FDCP-mix through a p53-dependent pathway but Notch1 effects on myeloid and erythroid differentiation are independent of p53. *Cell Death Differ*, **15**, 398-407.
116. Henning, K., Schroeder, T., Schwanbeck, R., Rieber, N., Bresnick, E.H. and Just, U. (2007) mNotch1 signaling and erythropoietin cooperate in erythroid differentiation of multipotent progenitor cells and upregulate beta-globin. *Exp Hematol*, **35**, 1321-1332.
117. Robert-Moreno, A., Espinosa, L., Sanchez, M.J., de la Pompa, J.L. and Bigas, A. (2007) The notch pathway positively regulates programmed cell death during erythroid differentiation. *Leukemia*, **21**, 1496-1503.
118. Tachikawa, Y., Matsushima, T., Abe, Y., Sakano, S., Yamamoto, M., Nishimura, J., Nawata, H., Takayanagi, R. and Muta, K. (2006) Pivotal role of Notch signaling in regulation of erythroid maturation and proliferation. *Eur J Haematol*, **77**, 273-281.
119. Sugimoto, A., Yamamoto, M., Suzuki, M., Inoue, T., Nakamura, S., Motoda, R., Yamasaki, F. and Orita, K. (2006) Delta-4 Notch ligand promotes erythroid differentiation of human umbilical cord blood CD34+ cells. *Exp Hematol*, **34**, 424-432.
120. Dando, J.S., Tavian, M., Catelain, C., Poirault, S., Bennaceur-Griscelli, A., Sainteny, F., Vainchenker, W., Peault, B. and Lauret, E. (2005) Notch/Delta4 interaction in



human embryonic liver CD34+ CD38- cells: positive influence on BFU-E production and LTC-IC potential maintenance. *Stem Cells*, **23**, 550-560.

121. Ishiko, E., Matsumura, I., Ezoe, S., Gale, K., Ishiko, J., Satoh, Y., Tanaka, H., Shibayama, H., Mizuki, M., Era, T. *et al.* (2005) Notch signals inhibit the development of erythroid/megakaryocytic cells by suppressing GATA-1 activity through the induction of HES1. *J Biol Chem*, **280**, 4929-4939.

122. Kumano, K., Chiba, S., Shimizu, K., Yamagata, T., Hosoya, N., Saito, T., Takahashi, T., Hamada, Y. and Hirai, H. (2001) Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression. *Blood*, **98**, 3283-3289.

123. Walker, L., Lynch, M., Silverman, S., Fraser, J., Boulter, J., Weinmaster, G. and Gasson, J.C. (1999) The Notch/Jagged pathway inhibits proliferation of human hematopoietic progenitors in vitro. *Stem Cells*, **17**, 162-171.

124. Cheng, X., Huber, T.L., Chen, V.C., Gadue, P. and Keller, G.M. (2008) Numb mediates the interaction between Wnt and Notch to modulate primitive erythropoietic specification from the hemangioblast. *Development*, **135**, 3447-3458.

125. Sakata-Yanagimoto, M., Nakagami-Yamaguchi, E., Saito, T., Kumano, K., Yasutomo, K., Ogawa, S., Kurokawa, M. and Chiba, S. (2008) Coordinated regulation of transcription factors through Notch2 is an important mediator of mast cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 7839-7844.

126. Walker, L., Carlson, A., Tan-Pertel, H.T., Weinmaster, G. and Gasson, J. (2001) The notch receptor and its ligands are selectively expressed during hematopoietic development in the mouse. *Stem Cells*, **19**, 543-552.

127. Fischer, A. and Gessler, M. (2007) Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res*, **35**, 4583-4596.

128. Ingram, W.J., McCue, K.I., Tran, T.H., Hallahan, A.R. and Wainwright, B.J. (2008) Sonic Hedgehog regulates Hes1 through a novel mechanism that is independent of canonical Notch pathway signalling. *Oncogene*, **27**, 1489-1500.

129. Ikawa, T., Kawamoto, H., Goldrath, A.W. and Murre, C. (2006) E proteins and Notch signaling cooperate to promote T cell lineage specification and commitment. *J Exp Med*, **203**, 1329-1342.
130. Chari, S. and Winandy, S. (2008) Ikaros regulates Notch target gene expression in developing thymocytes. *J Immunol*, **181**, 6265-6274.
131. Aguilera, C., Hoya-Arias, R., Haegeman, G., Espinosa, L. and Bigas, A. (2004) Recruitment of IkappaBalpha to the hes1 promoter is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 16537-16542.
132. Bray, S.J. (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 678-689.
133. Borggrefe, T. and Oswald, F. (2009) The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci*, **66**, 1631-1646.
134. Masuya, M., Katayama, N., Hoshino, N., Nishikawa, H., Sakano, S., Araki, H., Mitani, H., Suzuki, H., Miyashita, H., Kobayashi, K. *et al.* (2002) The soluble Notch ligand, Jagged-1, inhibits proliferation of CD34+ macrophage progenitors. *Int J Hematol*, **75**, 269-276.
135. Rucknagel, D.L. and Winter, W.P. (1974) Duplication of structural genes for hemoglobin alpha and beta chains in man. *Ann N Y Acad Sci*, **241**, 80-92.
136. Higgs, D.R., Vickers, M.A., Wilkie, A.O., Pretorius, I.M., Jarman, A.P. and Weatherall, D.J. (1989) A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. *Blood*, **73**, 1081-1104.
137. Kielman, M.F., Smits, R., Devi, T.S., Fodde, R. and Bernini, L.F. (1993) Homology of a 130-kb region enclosing the alpha-globin gene cluster, the alpha-locus controlling region, and two non-globin genes in human and mouse. *Mamm Genome*, **4**, 314-323.
138. Higgs, D.R., Garrick, D., Anguita, E., De Gobbi, M., Hughes, J., Muers, M., Vernimmen, D., Lower, K., Law, M., Argentaro, A. *et al.* (2005) Understanding alpha-globin gene regulation: Aiming to improve the management of thalassemia. *Ann N Y Acad Sci*, **1054**, 92-102.

139. Wallace, H.A., Marques-Kranc, F., Richardson, M., Luna-Crespo, F., Sharpe, J.A., Hughes, J., Wood, W.G., Higgs, D.R. and Smith, A.J. (2007) Manipulating the mouse genome to engineer precise functional syntenic replacements with human sequence. *Cell*, **128**, 197-209.
140. Anguita, E., Hughes, J., Heyworth, C., Blobel, G.A., Wood, W.G. and Higgs, D.R. (2004) Globin gene activation during haemopoiesis is driven by protein complexes nucleated by GATA-1 and GATA-2. *EMBO J*, **23**, 2841-2852.
141. De Gobbi, M., Anguita, E., Hughes, J., Sloane-Stanley, J.A., Sharpe, J.A., Koch, C.M., Dunham, I., Gibbons, R.J., Wood, W.G. and Higgs, D.R. (2007) Tissue-specific histone modification and transcription factor binding in alpha globin gene expression. *Blood*, **110**, 4503-4510.
142. Vernimmen, D., De Gobbi, M., Sloane-Stanley, J.A., Wood, W.G. and Higgs, D.R. (2007) Long-range chromosomal interactions regulate the timing of the transition between poised and active gene expression. *EMBO J*, **26**, 2041-2051.
143. Hughes, J.R., Cheng, J.F., Ventress, N., Prabhakar, S., Clark, K., Anguita, E., De Gobbi, M., de Jong, P., Rubin, E. and Higgs, D.R. (2005) Annotation of cis-regulatory elements by identification, subclassification, and functional assessment of multispecies conserved sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9830-9835.
144. Vernimmen, D., Marques-Kranc, F., Sharpe, J.A., Sloane-Stanley, J.A., Wood, W.G., Wallace, H.A., Smith, A.J. and Higgs, D.R. (2009) Chromosome looping at the human alpha-globin locus is mediated via the major upstream regulatory element (HS -40). *Blood*, **114**, 4253-4260.
145. Deville, M.A., Ouazana, R., Morle, F. and Bernet, A. (2004) Disruption of the mechanism of long range activation within the human alpha-globin complex. *J Biol Chem*, **279**, 21793-21801.
146. Anguita, E., Sharpe, J.A., Sloane-Stanley, J.A., Tufarelli, C., Higgs, D.R. and Wood, W.G. (2002) Deletion of the mouse alpha-globin regulatory element (HS -26) has an unexpectedly mild phenotype. *Blood*, **100**, 3450-3456.

147. Martin, D.I., Fiering, S. and Groudine, M. (1996) Regulation of beta-globin gene expression: straightening out the locus. *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 488-495.
148. Fraser, P., Pruzina, S., Antoniou, M. and Grosveld, F. (1993) Each hypersensitive site of the human beta-globin locus control region confers a different developmental pattern of expression on the globin genes. *Genes Dev*, **7**, 106-113.
149. Fraser, P., Gribnau, J. and Trimborn, T. (1998) Mechanisms of developmental regulation in globin loci. *Curr Opin Hematol*, **5**, 139-144.
150. Epner, E., Reik, A., Cimborra, D., Telling, A., Bender, M.A., Fiering, S., Enver, T., Martin, D.I., Kennedy, M., Keller, G. *et al.* (1998) The beta-globin LCR is not necessary for an open chromatin structure or developmentally regulated transcription of the native mouse beta-globin locus. *Mol Cell*, **2**, 447-455.
151. Fiering, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., Hu, M., Martin, D.I., Enver, T., Ley, T.J. and Groudine, M. (1995) Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev*, **9**, 2203-2213.
152. Hu, X., Bulger, M., Bender, M.A., Fields, J., Groudine, M. and Fiering, S. (2006) Deletion of the core region of 5' HS2 of the mouse beta-globin locus control region reveals a distinct effect in comparison with human beta-globin transgenes. *Blood*, **107**, 821-826.
153. Alami, R., Bender, M.A., Feng, Y.Q., Fiering, S.N., Hug, B.A., Ley, T.J., Groudine, M. and Bouhassira, E.E. (2000) Deletions within the mouse beta-globin locus control region preferentially reduce beta(min) globin gene expression. *Genomics*, **63**, 417-424.
154. Bungert, J., Tanimoto, K., Patel, S., Liu, Q., Fear, M. and Engel, J.D. (1999) Hypersensitive site 2 specifies a unique function within the human beta-globin locus control region to stimulate globin gene transcription. *Mol Cell Biol*, **19**, 3062-3072.
155. Milot, E., Strouboulis, J., Trimborn, T., Wijgerde, M., de Boer, E., Langeveld, A., Tan-Un, K., Vergeer, W., Yannoutsos, N., Grosveld, F. *et al.* (1996) Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell*, **87**, 105-114.

156. Bulger, M., van Doorninck, J.H., Saitoh, N., Telling, A., Farrell, C., Bender, M.A., Felsenfeld, G., Axel, R. and Groudine, M. (1999) Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human beta-globin loci: the beta-globin genes are embedded within an array of odorant receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5129-5134.
157. Grosveld, F., Antoniou, M., Berry, M., De Boer, E., Dillon, N., Ellis, J., Fraser, P., Hanscombe, O., Hurst, J., Imam, A. *et al.* (1993) The regulation of human globin gene switching. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **339**, 183-191.
158. Blau, C.A. and Stamatoyannopoulos, G. (1994) Hemoglobin switching and its clinical implications. *Curr Opin Hematol*, **1**, 136-142.
159. Strouboulis, J., Dillon, N. and Grosveld, F. (1992) Developmental regulation of a complete 70-kb human beta-globin locus in transgenic mice. *Genes Dev*, **6**, 1857-1864.
160. Fromm, G. and Bulger, M. (2009) A spectrum of gene regulatory phenomena at mammalian beta-globin gene loci. *Biochem Cell Biol*, **87**, 781-790.
161. Schrier, S.L. (1994) Thalassemia: pathophysiology of red cell changes. *Annu Rev Med*, **45**, 211-218.
162. OMS. (2011). Organisation mondiale de la santé, Vol. 2011.
163. Higgs, D.R. and Weatherall, D.J. (2009) The alpha thalassaemias. *Cell Mol Life Sci*, **66**, 1154-1162.
164. Weatherall, D.J. (2001) Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet*, **2**, 245-255.
165. Steinberg, M.H. (2008) Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal*, **8**, 1295-1324.
166. Forget, B.G. (1998) Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N Y Acad Sci*, **850**, 38-44.
167. Vannucchi, A.M. and Guglielmelli, P. (2010) Advances in understanding and management of polycythemia vera. *Curr Opin Oncol*, **22**, 636-641.
168. Boulwood, J., Pellagatti, A., McKenzie, A.N. and Wainscoat, J.S. (2010) Advances in the 5q- syndrome. *Blood*, **116**, 5803-5811.

169. Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F.H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N. *et al.* (2011) Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*, **117**, 2567-2576.
170. Martens, J.H. and Stunnenberg, H.G. (2010) The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia. *FEBS Lett*, **584**, 2662-2669.
171. Banerji, L. and Sattler, M. (2004) Targeting mutated tyrosine kinases in the therapy of myeloid leukaemias. *Expert Opin Ther Targets*, **8**, 221-239.
172. Falini, B., Tiacci, E., Martelli, M.P., Ascani, S. and Pileri, S.A. (2010) New classification of acute myeloid leukemia and precursor-related neoplasms: changes and unsolved issues. *Discov Med*, **10**, 281-292.
173. Hasserjian, R.P., Zuo, Z., Garcia, C., Tang, G., Kasyan, A., Luthra, R., Abruzzo, L.V., Kantarjian, H.M., Medeiros, L.J. and Wang, S.A. (2010) Acute erythroid leukemia: a reassessment using criteria refined in the 2008 WHO classification. *Blood*, **115**, 1985-1992.
174. Archambault, J. and Friesen, J.D. (1993) Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III. *Microbiol Rev*, **57**, 703-724.
175. Haag, J.R. and Pikaard, C.S. (2011) Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 483-492.
176. Hampsey, M. (1998) Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 465-503.
177. Ohkuma, Y. and Roeder, R.G. (1994) Regulation of TFIIF ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. *Nature*, **368**, 160-163.
178. Furumoto, T., Tanaka, A., Ito, M., Malik, S., Hirose, Y., Hanaoka, F. and Ohkuma, Y. (2007) A kinase subunit of the human mediator complex, CDK8, positively regulates transcriptional activation. *Genes Cells*, **12**, 119-132.
179. Hirose, Y. and Ohkuma, Y. (2007) Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression. *J Biochem*, **141**, 601-608.

180. Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J. and Handa, H. (1999) NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*, **97**, 41-51.
181. Sims, R.J., 3rd, Belotserkovskaya, R. and Reinberg, D. (2004) Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev*, **18**, 2437-2468.
182. Peterlin, B.M. and Price, D.H. (2006) Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell*, **23**, 297-305.
183. Ryan, K., Calvo, O. and Manley, J.L. (2004) Evidence that polyadenylation factor CPSF-73 is the mRNA 3' processing endonuclease. *RNA*, **10**, 565-573.
184. Gribnau, J., Diderich, K., Pruzina, S., Calzolari, R. and Fraser, P. (2000) Intergenic transcription and developmental remodeling of chromatin subdomains in the human beta-globin locus. *Mol Cell*, **5**, 377-386.
185. Johnson, K.D., Christensen, H.M., Zhao, B. and Bresnick, E.H. (2001) Distinct mechanisms control RNA polymerase II recruitment to a tissue-specific locus control region and a downstream promoter. *Mol Cell*, **8**, 465-471.
186. Bulger, M. and Groudine, M. (1999) Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev*, **13**, 2465-2477.
187. Fraser, P. and Grosveld, F. (1998) Locus control regions, chromatin activation and transcription. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 361-365.
188. Festenstein, R. and Kioussis, D. (2000) Locus control regions and epigenetic chromatin modifiers. *Curr Opin Genet Dev*, **10**, 199-203.
189. Engel, J.D. and Tanimoto, K. (2000) Looping, linking, and chromatin activity: new insights into beta-globin locus regulation. *Cell*, **100**, 499-502.
190. Li, Q., Harju, S. and Peterson, K.R. (1999) Locus control regions: coming of age at a decade plus. *Trends Genet*, **15**, 403-408.
191. Li, Q., Peterson, K.R., Fang, X. and Stamatoyannopoulos, G. (2002) Locus control regions. *Blood*, **100**, 3077-3086.

192. Zhu, X., Ling, J., Zhang, L., Pi, W., Wu, M. and Tuan, D. (2007) A facilitated tracking and transcription mechanism of long-range enhancer function. *Nucleic Acids Res*, **35**, 5532-5544.
193. Fujiwara, Y., Browne, C.P., Cunniff, K., Goff, S.C. and Orkin, S.H. (1996) Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12355-12358.
194. Kobayashi, M. and Yamamoto, M. (2007) Regulation of GATA1 gene expression. *J Biochem*, **142**, 1-10.
195. Anderson, K.P., Crable, S.C. and Lingrel, J.B. (2000) The GATA-E box-GATA motif in the EKLF promoter is required for in vivo expression. *Blood*, **95**, 1652-1655.
196. Moroni, E., Mastrangelo, T., Razzini, R., Cairns, L., Moi, P., Ottolenghi, S. and Giglioni, B. (2000) Regulation of mouse p45 NF-E2 transcription by an erythroid-specific GATA-dependent intronic alternative promoter. *J Biol Chem*, **275**, 10567-10576.
197. Papetti, M., Wontakal, S.N., Stopka, T. and Skoultchi, A.I. (2010) GATA-1 directly regulates p21 gene expression during erythroid differentiation. *Cell Cycle*, **9**, 1972-1980.
198. Gregory, T., Yu, C., Ma, A., Orkin, S.H., Blobel, G.A. and Weiss, M.J. (1999) GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood*, **94**, 87-96.
199. Fujiwara, T., O'Geen, H., Keles, S., Blahnik, K., Linnemann, A.K., Kang, Y.A., Choi, K., Farnham, P.J. and Bresnick, E.H. (2009) Discovering hematopoietic mechanisms through genome-wide analysis of GATA factor chromatin occupancy. *Mol Cell*, **36**, 667-681.
200. Yu, M., Riva, L., Xie, H., Schindler, Y., Moran, T.B., Cheng, Y., Yu, D., Hardison, R., Weiss, M.J., Orkin, S.H. *et al.* (2009) Insights into GATA-1-mediated gene activation versus repression via genome-wide chromatin occupancy analysis. *Mol Cell*, **36**, 682-695.
201. Hung, H.L., Lau, J., Kim, A.Y., Weiss, M.J. and Blobel, G.A. (1999) CREB-Binding protein acetylates hematopoietic transcription factor GATA-1 at functionally important sites. *Mol Cell Biol*, **19**, 3496-3505.



202. Hernandez-Hernandez, A., Ray, P., Litos, G., Ciro, M., Ottolenghi, S., Beug, H. and Boyes, J. (2006) Acetylation and MAPK phosphorylation cooperate to regulate the degradation of active GATA-1. *EMBO J*, **25**, 3264-3274.
203. Lee, H.Y., Johnson, K.D., Fujiwara, T., Boyer, M.E., Kim, S.I. and Bresnick, E.H. (2009) Controlling hematopoiesis through sumoylation-dependent regulation of a GATA factor. *Mol Cell*, **36**, 984-995.
204. Collavin, L., Gostissa, M., Avolio, F., Secco, P., Ronchi, A., Santoro, C. and Del Sal, G. (2004) Modification of the erythroid transcription factor GATA-1 by SUMO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8870-8875.
205. Calligaris, R., Bottardi, S., Cogoi, S., Apezteguia, I. and Santoro, C. (1995) Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11598-11602.
206. Crispino, J.D. (2005) GATA1 mutations in Down syndrome: implications for biology and diagnosis of children with transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, **44**, 40-44.
207. Tsai, F.Y., Keller, G., Kuo, F.C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F.W. and Orkin, S.H. (1994) An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*, **371**, 221-226.
208. Rodrigues, N.P., Janzen, V., Forkert, R., Dombkowski, D.M., Boyd, A.S., Orkin, S.H., Enver, T., Vyas, P. and Scadden, D.T. (2005) Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood*, **106**, 477-484.
209. Lohmann, F. and Bieker, J.J. (2008) Activation of Eklf expression during hematopoiesis by Gata2 and Smad5 prior to erythroid commitment. *Development*, **135**, 2071-2082.
210. Grass, J.A., Boyer, M.E., Pal, S., Wu, J., Weiss, M.J. and Bresnick, E.H. (2003) GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8811-8816.

211. Tsai, S.F., Strauss, E. and Orkin, S.H. (1991) Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev*, **5**, 919-931.
212. Ohneda, K., Shimizu, R., Nishimura, S., Muraosa, Y., Takahashi, S., Engel, J.D. and Yamamoto, M. (2002) A minigene containing four discrete cis elements recapitulates GATA-1 gene expression in vivo. *Genes Cells*, **7**, 1243-1254.
213. Valverde-Garduno, V., Guyot, B., Anguita, E., Hamlett, I., Porcher, C. and Vyas, P. (2004) Differences in the chromatin structure and cis-element organization of the human and mouse GATA1 loci: implications for cis-element identification. *Blood*, **104**, 3106-3116.
214. Suzuki, N., Suwabe, N., Ohneda, O., Obara, N., Imagawa, S., Pan, X., Motohashi, H. and Yamamoto, M. (2003) Identification and characterization of 2 types of erythroid progenitors that express GATA-1 at distinct levels. *Blood*, **102**, 3575-3583.
215. Kaneko, H., Shimizu, R. and Yamamoto, M. (2010) GATA factor switching during erythroid differentiation. *Curr Opin Hematol*, **17**, 163-168.
216. Bresnick, E.H., Lee, H.Y., Fujiwara, T., Johnson, K.D. and Keles, S. (2010) GATA switches as developmental drivers. *J Biol Chem*, **285**, 31087-31093.
217. Whyatt, D., Lindeboom, F., Karis, A., Ferreira, R., Milot, E., Hendriks, R., de Bruijn, M., Langeveld, A., Gribnau, J., Grosveld, F. *et al.* (2000) An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells. *Nature*, **406**, 519-524.
218. Takahashi, S., Onodera, K., Motohashi, H., Suwabe, N., Hayashi, N., Yanai, N., Nabesima, Y. and Yamamoto, M. (1997) Arrest in primitive erythroid cell development caused by promoter-specific disruption of the GATA-1 gene. *J Biol Chem*, **272**, 12611-12615.
219. Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T. and Skoultchi, A.I. (1999) Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev*, **13**, 1398-1411.

220. Rekhtman, N., Choe, K.S., Matushansky, I., Murray, S., Stopka, T. and Skoultschi, A.I. (2003) PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. *Mol Cell Biol*, **23**, 7460-7474.
221. Zhang, P., Zhang, X., Iwama, A., Yu, C., Smith, K.A., Mueller, B.U., Narravula, S., Torbett, B.E., Orkin, S.H. and Tenen, D.G. (2000) PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood*, **96**, 2641-2648.
222. Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-Aswapati, N., Radomska, H.S., Auron, P.E., Tenen, D.G. and Sun, Z. (1999) Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8705-8710.
223. Oikawa, T., Yamada, T., Kihara-Negishi, F., Yamamoto, H., Kondoh, N., Hitomi, Y. and Hashimoto, Y. (1999) The role of Ets family transcription factor PU.1 in hematopoietic cell differentiation, proliferation and apoptosis. *Cell Death Differ*, **6**, 599-608.
224. Zhang, P., Basu, P., Redmond, L.C., Morris, P.E., Rupon, J.W., Ginder, G.D. and Lloyd, J.A. (2005) A functional screen for Kruppel-like factors that regulate the human gamma-globin gene through the CACCC promoter element. *Blood Cells Mol Dis*, **35**, 227-235.
225. Perkins, A. (1999) Erythroid Kruppel like factor: from fishing expedition to gourmet meal. *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 1175-1192.
226. Hodge, D., Coghill, E., Keys, J., Maguire, T., Hartmann, B., McDowall, A., Weiss, M., Grimmond, S. and Perkins, A. (2006) A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. *Blood*, **107**, 3359-3370.
227. Tallack, M.R., Whittington, T., Yuen, W.S., Wainwright, E.N., Keys, J.R., Gardiner, B.B., Nourbakhsh, E., Cloonan, N., Grimmond, S.M., Bailey, T.L. *et al.* (2010) A global role for KLF1 in erythropoiesis revealed by CHIP-seq in primary erythroid cells. *Genome Res*, **20**, 1052-1063.
228. Merika, M. and Orkin, S.H. (1995) Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLF. *Mol Cell Biol*, **15**, 2437-2447.

229. Nuez, B., Michalovich, D., Bygrave, A., Ploemacher, R. and Grosveld, F. (1995) Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature*, **375**, 316-318.
230. Wijgerde, M., Gribnau, J., Trimborn, T., Nuez, B., Philipsen, S., Grosveld, F. and Fraser, P. (1996) The role of EKLF in human beta-globin gene competition. *Genes Dev*, **10**, 2894-2902.
231. Siatecka, M. and Bieker, J.J. (2011) The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. *Blood*.
232. Zhang, W., Kadam, S., Emerson, B.M. and Bieker, J.J. (2001) Site-specific acetylation by p300 or CREB binding protein regulates erythroid Kruppel-like factor transcriptional activity via its interaction with the SWI-SNF complex. *Mol Cell Biol*, **21**, 2413-2422.
233. Ouyang, L., Chen, X. and Bieker, J.J. (1998) Regulation of erythroid Kruppel-like factor (EKLF) transcriptional activity by phosphorylation of a protein kinase casein kinase II site within its interaction domain. *J Biol Chem*, **273**, 23019-23025.
234. John, L.B. and Ward, A.C. (2011) The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. *Mol Immunol*, **48**, 1272-1278.
235. Wang, J.H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A.H., Bigby, M. and Georgopoulos, K. (1996) Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity*, **5**, 537-549.
236. Ng, S.Y., Yoshida, T. and Georgopoulos, K. (2007) Ikaros and chromatin regulation in early hematopoiesis. *Curr Opin Immunol*, **19**, 116-122.
237. Rebollo, A. and Schmitt, C. (2003) Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunol Cell Biol*, **81**, 171-175.
238. Gomez-del Arco, P., Koipally, J. and Georgopoulos, K. (2005) Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol*, **25**, 2688-2697.
239. Gomez-del Arco, P., Maki, K. and Georgopoulos, K. (2004) Phosphorylation controls Ikaros's ability to negatively regulate the G(1)-S transition. *Mol Cell Biol*, **24**, 2797-2807.

240. Nichogiannopoulou, A., Trevisan, M., Neben, S., Friedrich, C. and Georgopoulos, K. (1999) Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med*, **190**, 1201-1214.
241. Lopez, R.A., Schoetz, S., DeAngelis, K., O'Neill, D. and Bank, A. (2002) Multiple hematopoietic defects and delayed globin switching in Ikaros null mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 602-607.
242. O'Neill, D.W., Schoetz, S.S., Lopez, R.A., Castle, M., Rabinowitz, L., Shor, E., Krawchuk, D., Goll, M.G., Renz, M., Seelig, H.P. *et al.* (2000) An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol Cell Biol*, **20**, 7572-7582.
243. Mullighan, C. and Downing, J. (2008) Ikaros and acute leukemia. *Leuk Lymphoma*, **49**, 847-849.
244. Dijon, M., Bardin, F., Murati, A., Batoz, M., Chabannon, C. and Tonnelle, C. (2008) The role of Ikaros in human erythroid differentiation. *Blood*, **111**, 1138-1146.
245. Pulte, D., Lopez, R.A., Baker, S.T., Ward, M., Ritchie, E., Richardson, C.A., O'Neill, D.W. and Bank, A. (2006) Ikaros increases normal apoptosis in adult erythroid cells. *Am J Hematol*, **81**, 12-18.
246. Andrews, N.C. (1998) The NF-E2 transcription factor. *Int J Biochem Cell Biol*, **30**, 429-432.
247. Motohashi, H., O'Connor, T., Katsuoka, F., Engel, J.D. and Yamamoto, M. (2002) Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene*, **294**, 1-12.
248. Woon Kim, Y., Kim, S., Geun Kim, C. and Kim, A. (2011) The distinctive roles of erythroid specific activator GATA-1 and NF-E2 in transcription of the human fetal {gamma}-globin genes. *Nucleic Acids Res.*
249. Zhou, Z., Li, X., Deng, C., Ney, P.A., Huang, S. and Bungert, J. (2010) USF and NF-E2 cooperate to regulate the recruitment and activity of RNA polymerase II in the beta-globin gene locus. *J Biol Chem*, **285**, 15894-15905.

250. Demers, C., Chaturvedi, C.P., Ranish, J.A., Juban, G., Lai, P., Morle, F., Aebersold, R., Dilworth, F.J., Groudine, M. and Brand, M. (2007) Activator-mediated recruitment of the MLL2 methyltransferase complex to the beta-globin locus. *Mol Cell*, **27**, 573-584.
251. Chaturvedi, C.P., Hosey, A.M., Palii, C., Perez-Iratxeta, C., Nakatani, Y., Ranish, J.A., Dilworth, F.J. and Brand, M. (2009) Dual role for the methyltransferase G9a in the maintenance of beta-globin gene transcription in adult erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 18303-18308.
252. Kiekhäfer, C.M., Boyer, M.E., Johnson, K.D. and Bresnick, E.H. (2004) A WW domain-binding motif within the activation domain of the hematopoietic transcription factor NF-E2 is essential for establishment of a tissue-specific histone modification pattern. *J Biol Chem*, **279**, 7456-7461.
253. Johnson, K.D., Grass, J.A., Boyer, M.E., Kiekhäfer, C.M., Blobel, G.A., Weiss, M.J. and Bresnick, E.H. (2002) Cooperative activities of hematopoietic regulators recruit RNA polymerase II to a tissue-specific chromatin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11760-11765.
254. Sawado, T., Igarashi, K. and Groudine, M. (2001) Activation of beta-major globin gene transcription is associated with recruitment of NF-E2 to the beta-globin LCR and gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10226-10231.
255. Ney, P.A., Sorrentino, B.P., Lowrey, C.H. and Nienhuis, A.W. (1990) Inducibility of the HS II enhancer depends on binding of an erythroid specific nuclear protein. *Nucleic Acids Res*, **18**, 6011-6017.
256. Shivdasani, R.A., Rosenblatt, M.F., Zucker-Franklin, D., Jackson, C.W., Hunt, P., Saris, C.J. and Orkin, S.H. (1995) Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*, **81**, 695-704.
257. Lu, S.J., Rowan, S., Bani, M.R. and Ben-David, Y. (1994) Retroviral integration within the Fli-2 locus results in inactivation of the erythroid transcription factor NF-E2 in Friend erythroleukemias: evidence that NF-E2 is essential for globin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8398-8402.

258. Brand, M., Ranish, J.A., Kummer, N.T., Hamilton, J., Igarashi, K., Francastel, C., Chi, T.H., Crabtree, G.R., Aebersold, R. and Groudine, M. (2004) Dynamic changes in transcription factor complexes during erythroid differentiation revealed by quantitative proteomics. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 73-80.
259. Gelmetti, V., Zhang, J., Fanelli, M., Minucci, S., Pelicci, P.G. and Lazar, M.A. (1998) Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. *Mol Cell Biol*, **18**, 7185-7191.
260. Makishima, H., Jankowska, A.M., Tiu, R.V., Szpurka, H., Sugimoto, Y., Hu, Z., Sauntharajah, Y., Guinta, K., Keddache, M.A., Putnam, P. *et al.* (2010) Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. *Leukemia*, **24**, 1799-1804.
261. Kung, A.L., Rebel, V.I., Bronson, R.T., Ch'ng, L.E., Sieff, C.A., Livingston, D.M. and Yao, T.P. (2000) Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev*, **14**, 272-277.
262. Blobel, G.A. (2002) CBP and p300: versatile coregulators with important roles in hematopoietic gene expression. *J Leukoc Biol*, **71**, 545-556.
263. Blobel, G.A. (2000) CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood*, **95**, 745-755.
264. Qiu, Y., Zhao, Y., Becker, M., John, S., Parekh, B.S., Huang, S., Hendarwanto, A., Martinez, E.D., Chen, Y., Lu, H. *et al.* (2006) HDAC1 acetylation is linked to progressive modulation of steroid receptor-induced gene transcription. *Mol Cell*, **22**, 669-679.
265. Smith, C.L. (2008) A shifting paradigm: histone deacetylases and transcriptional activation. *Bioessays*, **30**, 15-24.
266. Fujieda, A., Katayama, N., Ohishi, K., Yamamura, K., Shibasaki, T., Sugimoto, Y., Miyata, E., Nishi, K., Masuya, M., Ueda, H. *et al.* (2005) A putative role for histone deacetylase in the differentiation of human erythroid cells. *Int J Oncol*, **27**, 743-748.
267. Yamamura, K., Ohishi, K., Katayama, N., Yu, Z., Kato, K., Masuya, M., Fujieda, A., Sugimoto, Y., Miyata, E., Shibasaki, T. *et al.* (2006) Pleiotropic role of histone deacetylases in the regulation of human adult erythropoiesis. *Br J Haematol*, **135**, 242-253.

268. Kim, Y.W. and Kim, A. (2011) Characterization of histone H3K27 modifications in the beta-globin locus. *Biochem Biophys Res Commun*, **405**, 210-215.
269. McMorrow, T., van den Wijngaard, A., Wollenschlaeger, A., van de Corput, M., Monkhorst, K., Trimborn, T., Fraser, P., van Lohuizen, M., Jenuwein, T., Djabali, M. *et al.* (2000) Activation of the beta globin locus by transcription factors and chromatin modifiers. *EMBO J*, **19**, 4986-4996.
270. Czvitkovich, S., Sauer, S., Peters, A.H., Deiner, E., Wolf, A., Laible, G., Opravil, S., Beug, H. and Jenuwein, T. (2001) Over-expression of the SUV39H1 histone methyltransferase induces altered proliferation and differentiation in transgenic mice. *Mech Dev*, **107**, 141-153.
271. Hu, X., Li, X., Valverde, K., Fu, X., Noguchi, C., Qiu, Y. and Huang, S. (2009) LSD1-mediated epigenetic modification is required for TAL1 function and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 10141-10146.
272. Laurent, B., Randrianarison-Huetz, V., Kadri, Z., Romeo, P.H., Porteu, F. and Dumenil, D. (2009) Gfi-1B promoter remains associated with active chromatin marks throughout erythroid differentiation of human primary progenitor cells. *Stem Cells*, **27**, 2153-2162.
273. Narlikar, G.J., Fan, H.Y. and Kingston, R.E. (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*, **108**, 475-487.
274. Xu, Z., Meng, X., Cai, Y., Koury, M.J. and Brandt, S.J. (2006) Recruitment of the SWI/SNF protein Brg1 by a multiprotein complex effects transcriptional repression in murine erythroid progenitors. *Biochem J*, **399**, 297-304.
275. Bultman, S.J., Gebuhr, T.C. and Magnuson, T. (2005) A Brg1 mutation that uncouples ATPase activity from chromatin remodeling reveals an essential role for SWI/SNF-related complexes in beta-globin expression and erythroid development. *Genes Dev*, **19**, 2849-2861.
276. Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Kolodziej, K.E., Guyot, B., Heck, A.J., Vyas, P., de Boer, E., Grosveld, F. and Strouboulis, J. (2005) GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J*, **24**, 2354-2366.



277. Hong, W., Nakazawa, M., Chen, Y.Y., Kori, R., Vakoc, C.R., Rakowski, C. and Blobel, G.A. (2005) FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *EMBO J*, **24**, 2367-2378.
278. Stopka, T. and Skoultchi, A.I. (2003) The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14097-14102.
279. Huang, S. and Brandt, S.J. (2000) mSin3A regulates murine erythroleukemia cell differentiation through association with the TAL1 (or SCL) transcription factor. *Mol Cell Biol*, **20**, 2248-2259.
280. Fox, A.H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J. and Crossley, M. (1999) Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO J*, **18**, 2812-2822.
281. Schuh, A.H., Tipping, A.J., Clark, A.J., Hamlett, I., Guyot, B., Iborra, F.J., Rodriguez, P., Strouboulis, J., Enver, T., Vyas, P. *et al.* (2005) ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Mol Cell Biol*, **25**, 10235-10250.
282. Tsiftoglou, A.S., Vizirianakis, I.S. and Strouboulis, J. (2009) Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life*, **61**, 800-830.
283. Cantor, A.B. and Orkin, S.H. (2002) Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene*, **21**, 3368-3376.
284. Lecuyer, E. and Hoang, T. (2004) SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol*, **32**, 11-24.
285. Anderson, K.P., Crable, S.C. and Lingrel, J.B. (1998) Multiple proteins binding to a GATA-E box-GATA motif regulate the erythroid Kruppel-like factor (EKLF) gene. *J Biol Chem*, **273**, 14347-14354.
286. Nishimura, S., Takahashi, S., Kuroha, T., Suwabe, N., Nagasawa, T., Trainor, C. and Yamamoto, M. (2000) A GATA box in the GATA-1 gene hematopoietic enhancer is a critical element in the network of GATA factors and sites that regulate this gene. *Mol Cell Biol*, **20**, 713-723.

287. Tsang, A.P., Fujiwara, Y., Hom, D.B. and Orkin, S.H. (1998) Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev*, **12**, 1176-1188.
288. Johnson, K.D., Boyer, M.E., Kang, J.A., Wickrema, A., Cantor, A.B. and Bresnick, E.H. (2007) Friend of GATA-1-independent transcriptional repression: a novel mode of GATA-1 function. *Blood*, **109**, 5230-5233.
289. Armstrong, J.A., Bieker, J.J. and Emerson, B.M. (1998) A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell*, **95**, 93-104.
290. Lee, J.S., Lee, C.H. and Chung, J.H. (1999) The beta-globin promoter is important for recruitment of erythroid Kruppel-like factor to the locus control region in erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10051-10055.
291. Kadam, S., McAlpine, G.S., Phelan, M.L., Kingston, R.E., Jones, K.A. and Emerson, B.M. (2000) Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev*, **14**, 2441-2451.
292. Meier, N., Krpic, S., Rodriguez, P., Strouboulis, J., Monti, M., Krijgsveld, J., Gering, M., Patient, R., Hostert, A. and Grosveld, F. (2006) Novel binding partners of Ldb1 are required for haematopoietic development. *Development*, **133**, 4913-4923.
293. Amann, J.M., Nip, J., Strom, D.K., Lutterbach, B., Harada, H., Lenny, N., Downing, J.R., Meyers, S. and Hiebert, S.W. (2001) ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. *Mol Cell Biol*, **21**, 6470-6483.
294. Saleque, S., Kim, J., Rooke, H.M. and Orkin, S.H. (2007) Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and LSD1. *Mol Cell*, **27**, 562-572.
295. Grosveld, F., Rodriguez, P., Meier, N., Krpic, S., Pourfarzad, F., Papadopoulos, P., Kolodziej, K., Patrinos, G.P., Hostert, A. and Strouboulis, J. (2005) Isolation and characterization of hematopoietic transcription factor complexes by in vivo biotinylation tagging and mass spectrometry. *Ann N Y Acad Sci*, **1054**, 55-67.

296. Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L. and Bird, A.P. (1989) Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell*, **58**, 499-507.
297. Sparmann, A. and van Lohuizen, M. (2006) Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 846-856.
298. Kuzmichev, A., Jenuwein, T., Tempst, P. and Reinberg, D. (2004) Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell*, **14**, 183-193.
299. Daujat, S., Zeissler, U., Waldmann, T., Happel, N. and Schneider, R. (2005) HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding. *J Biol Chem*, **280**, 38090-38095.
300. Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.M. *et al.* (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, **439**, 871-874.
301. Wang, L., Brown, J.L., Cao, R., Zhang, Y., Kassis, J.A. and Jones, R.S. (2004) Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell*, **14**, 637-646.
302. Cao, R., Tsukada, Y. and Zhang, Y. (2005) Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell*, **20**, 845-854.
303. Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S. and Zhang, Y. (2004) Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*, **431**, 873-878.
304. Bowen, N.J., Fujita, N., Kajita, M. and Wade, P.A. (2004) Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes. *Biochim Biophys Acta*, **1677**, 52-57.
305. Miccio, A., Wang, Y., Hong, W., Gregory, G.D., Wang, H., Yu, X., Choi, J.K., Shelat, S., Tong, W., Poncz, M. *et al.* (2010) NuRD mediates activating and repressive functions of GATA-1 and FOG-1 during blood development. *EMBO J*, **29**, 442-456.
306. Katz, S.G., Cantor, A.B. and Orkin, S.H. (2002) Interaction between FOG-1 and the corepressor C-terminal binding protein is dispensable for normal erythropoiesis in vivo. *Mol Cell Biol*, **22**, 3121-3128.

307. Snow, J.W. and Orkin, S.H. (2009) Translational isoforms of FOG1 regulate GATA1-interacting complexes. *J Biol Chem*, **284**, 29310-29319.
308. Siatecka, M., Xue, L. and Bieker, J.J. (2007) Sumoylation of EKLF promotes transcriptional repression and is involved in inhibition of megakaryopoiesis. *Mol Cell Biol*, **27**, 8547-8560.
309. Luger, K., Rechsteiner, T.J., Flaus, A.J., Wayne, M.M. and Richmond, T.J. (1997) Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol*, **272**, 301-311.
310. Grewal, S.I. and Elgin, S.C. (2007) Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature*, **447**, 399-406.
311. Grewal, S.I. and Jia, S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*, **8**, 35-46.
312. Trojer, P. and Reinberg, D. (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell*, **28**, 1-13.
313. Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K. *et al.* (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, **125**, 315-326.
314. Sadoni, N., Sullivan, K.F., Weinzierl, P., Stelzer, E.H. and Zink, D. (2001) Large-scale chromatin fibers of living cells display a discontinuous functional organization. *Chromosoma*, **110**, 39-51.
315. Shestakova, E.A., Mansuroglu, Z., Mokrani, H., Ghinea, N. and Bonnefoy, E. (2004) Transcription factor YY1 associates with pericentromeric gamma-satellite DNA in cycling but not in quiescent (G0) cells. *Nucleic Acids Res*, **32**, 4390-4399.
316. Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W. *et al.* (2008) Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, **453**, 948-951.
317. Ohlsson, R., Bartkuhn, M. and Renkawitz, R. (2010) CTCF shapes chromatin by multiple mechanisms: the impact of 20 years of CTCF research on understanding the workings of chromatin. *Chromosoma*, **119**, 351-360.

318. Xu, M. and Zhu, B. (2010) Nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Protein Cell*, **1**, 820-829.
319. Bai, L. and Morozov, A.V. (2010) Gene regulation by nucleosome positioning. *Trends Genet*, **26**, 476-483.
320. Ahmad, K. and Henikoff, S. (2002) The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell*, **9**, 1191-1200.
321. Wong, L.H., McGhie, J.D., Sim, M., Anderson, M.A., Ahn, S., Hannan, R.D., George, A.J., Morgan, K.A., Mann, J.R. and Choo, K.H. (2010) ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Res*, **20**, 351-360.
322. Santenard, A., Ziegler-Birling, C., Koch, M., Tora, L., Bannister, A.J. and Torres-Padilla, M.E. (2010) Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat Cell Biol*, **12**, 853-862.
323. Sakai, A., Schwartz, B.E., Goldstein, S. and Ahmad, K. (2009) Transcriptional and developmental functions of the H3.3 histone variant in *Drosophila*. *Curr Biol*, **19**, 1816-1820.
324. Loyola, A. and Almouzni, G. (2007) Marking histone H3 variants: how, when and why? *Trends Biochem Sci*, **32**, 425-433.
325. Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K. and Felsenfeld, G. (2009) H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet*, **41**, 941-945.
326. Brickner, D.G., Cajigas, I., Fondufe-Mittendorf, Y., Ahmed, S., Lee, P.C., Widom, J. and Brickner, J.H. (2007) H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS Biol*, **5**, e81.
327. Rangasamy, D., Greaves, I. and Tremethick, D.J. (2004) RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 650-655.

328. Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, **273**, 5858-5868.
329. Woodcock, C.L., Skoultschi, A.I. and Fan, Y. (2006) Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res*, **14**, 17-25.
330. Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
331. Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, **21**, 381-395.
332. Gardner, K.E., Allis, C.D. and Strahl, B.D. (2011) Operating on chromatin, a colorful language where context matters. *J Mol Biol*, **409**, 36-46.
333. Tse, C., Sera, T., Wolffe, A.P. and Hansen, J.C. (1998) Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol*, **18**, 4629-4638.
334. Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C. and Ausio, J. (1995) Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J Biol Chem*, **270**, 17923-17928.
335. Cosgrove, M.S., Boeke, J.D. and Wolberger, C. (2004) Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1037-1043.
336. Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R. and Peterson, C.L. (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, **311**, 844-847.
337. Bedford, M.T. and Clarke, S.G. (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell*, **33**, 1-13.
338. Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. and Zhao, K. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, **129**, 823-837.

339. Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.K., Koche, R.P. *et al.* (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, **448**, 553-560.
340. Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Peng, W., Zhang, M.Q. *et al.* (2008) Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet*, **40**, 897-903.
341. Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K.A. *et al.* (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet*, **39**, 311-318.
342. Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (2005) Reversing histone methylation. *Nature*, **436**, 1103-1106.
343. Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R. *et al.* (2005) Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*, **120**, 169-181.
344. Ng, H.H., Robert, F., Young, R.A. and Struhl, K. (2003) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell*, **11**, 709-719.
345. Martin, C. and Zhang, Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 838-849.
346. Varier, R.A. and Timmers, H.T. (2011) Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1815**, 75-89.
347. Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
348. Fillion, G.J., van Bommel, J.G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L.D., Brugman, W., de Castro, I.J., Kerkhoven, R.M., Bussemaker, H.J. *et al.* (2010) Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell*, **143**, 212-224.

349. Hargreaves, D.C. and Crabtree, G.R. (2011) ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res*, **21**, 396-420.
350. Tang, L., Nogales, E. and Ciferri, C. (2010) Structure and function of SWI/SNF chromatin remodeling complexes and mechanistic implications for transcription. *Prog Biophys Mol Biol*, **102**, 122-128.
351. Saha, A., Wittmeyer, J. and Cairns, B.R. (2006) Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 437-447.
352. Avvakumov, N., Nourani, A. and Cote, J. (2011) Histone chaperones: modulators of chromatin marks. *Mol Cell*, **41**, 502-514.
353. Bird, A.P. and Wolffe, A.P. (1999) Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*, **99**, 451-454.
354. Klose, R.J. and Bird, A.P. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*, **31**, 89-97.
355. Watt, F. and Molloy, P.L. (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev*, **2**, 1136-1143.
356. Boyes, J. and Bird, A. (1991) DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*, **64**, 1123-1134.
357. Hendrich, B. and Bird, A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*, **18**, 6538-6547.
358. Yun, M., Wu, J., Workman, J.L. and Li, B. (2011) Readers of histone modifications. *Cell Res*, **21**, 564-578.
359. Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491-496.
360. Brownell, J.E. and Allis, C.D. (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 176-184.



361. Singh, M., Popowicz, G.M., Krajewski, M. and Holak, T.A. (2007) Structural ramification for acetyl-lysine recognition by the bromodomain of human BRG1 protein, a central ATPase of the SWI/SNF remodeling complex. *ChemBiochem*, **8**, 1308-1316.
362. Bernstein, E., Duncan, E.M., Masui, O., Gil, J., Heard, E. and Allis, C.D. (2006) Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol*, **26**, 2560-2569.
363. Flanagan, J.F., Mi, L.Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K.L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F. and Khorasanizadeh, S. (2005) Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature*, **438**, 1181-1185.
364. Hall, J.A. and Georgel, P.T. (2007) CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochem Cell Biol*, **85**, 463-476.
365. Lee, J.S., Smith, E. and Shilatifard, A. (2010) The language of histone crosstalk. *Cell*, **142**, 682-685.
366. Lange, U.C. and Schneider, R. (2010) What an epigenome remembers. *Bioessays*, **32**, 659-668.
367. Bottardi, S., Ghiam, A.F., Bergeron, F. and Milot, E. (2007) Lineage-specific transcription factors in multipotent hematopoietic progenitors: a little bit goes a long way. *Cell Cycle*, **6**, 1035-1039.
368. Luc, S., Buza-Vidas, N. and Jacobsen, S.E. (2008) Delineating the cellular pathways of hematopoietic lineage commitment. *Semin Immunol*, **20**, 213-220.
369. Shivdasani, R.A., Mayer, E.L. and Orkin, S.H. (1995) Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature*, **373**, 432-434.
370. Warren, A.J., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Evans, M.J., Smith, A.J. and Rabbitts, T.H. (1994) The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell*, **78**, 45-57.
371. Hisa, T., Spence, S.E., Rachel, R.A., Fujita, M., Nakamura, T., Ward, J.M., Devor-Henneman, D.E., Saiki, Y., Kutsuna, H., Tessarollo, L. *et al.* (2004) Hematopoietic, angiogenic and eye defects in Meis1 mutant animals. *EMBO J*, **23**, 450-459.

372. Karpen, G.H. (1994) Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 281-291.
373. Fodor, B.D., Shukeir, N., Reuter, G. and Jenuwein, T. (2010) Mammalian Su(var) genes in chromatin control. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **26**, 471-501.
374. Kioussis, D. and Festenstein, R. (1997) Locus control regions: overcoming heterochromatin-induced gene inactivation in mammals. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 614-619.
375. Sadelain, M. (2006) Recent advances in globin gene transfer for the treatment of beta-thalassemia and sickle cell anemia. *Curr Opin Hematol*, **13**, 142-148.
376. Bottardi, S., Aumont, A., Grosveld, F. and Milot, E. (2003) Developmental stage-specific epigenetic control of human beta-globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation. *Blood*, **102**, 3989-3997.
377. Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P. *et al.* (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, **420**, 520-562.
378. James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A. *et al.* (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, **434**, 1144-1148.
379. Wernig, G., Mercher, T., Okabe, R., Levine, R.L., Lee, B.H. and Gilliland, D.G. (2006) Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood*, **107**, 4274-4281.
380. Babinet, C., Morello, D. and Renard, J.P. (1989) Transgenic mice. *Genome*, **31**, 938-949.
381. Strouboulis, J., Dillon, N. and Grosveld, F. (1992) Efficient joining of large DNA fragments for transgenesis. *Nucleic Acids Res*, **20**, 6109-6110.
382. Bernstein, A. and Breitman, M. (1989) Genetic ablation in transgenic mice. *Mol Biol Med*, **6**, 523-530.

383. Shivdasani, R.A. and Orkin, S.H. (1995) Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8690-8694.
384. Friend, C., Patuleia, M.C. and De Harven, E. (1966) Erythrocytic maturation in vitro of murine (Friend) virus-induced leukemic cells. *Natl Cancer Inst Monogr*, **22**, 505-522.
385. Deisseroth, A. and Hendrick, D. (1978) Human alpha-globin gene expression following chromosomal dependent gene transfer into mouse erythroleukemia cells. *Cell*, **15**, 55-63.
386. Rifkind, R.A., Sheffery, M. and Marks, P.A. (1987) Induced erythroleukemia differentiation: cellular and molecular aspects. *Blood Cells*, **13**, 277-284.
387. Antoniou, M. (1991) Induction of Erythroid-Specific Expression in Murine Erythroleukemia (MEL) Cell Lines. *Methods Mol Biol*, **7**, 421-434.
388. D'Andrea, A.D., Moreau, J.F. and Showers, M.O. (1992) Molecular mimicry of erythropoietin by the spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein: the first stage of Friend virus-induced erythroleukemia. *Biochim Biophys Acta*, **1114**, 31-41.
389. Johnson, P. and Benchimol, S. (1992) Friend virus induced murine erythroleukaemia: the p53 locus. *Cancer Surv*, **12**, 137-151.
390. Weiss, M.J., Yu, C. and Orkin, S.H. (1997) Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Mol Cell Biol*, **17**, 1642-1651.
391. Wijgerde, M., Grosveld, F. and Fraser, P. (1995) Transcription complex stability and chromatin dynamics in vivo. *Nature*, **377**, 209-213.
392. Fang, X., Sun, J., Xiang, P., Yu, M., Navas, P.A., Peterson, K.R., Stamatoyannopoulos, G. and Li, Q. (2005) Synergistic and additive properties of the beta-globin locus control region (LCR) revealed by 5'HS3 deletion mutations: implication for LCR chromatin architecture. *Mol Cell Biol*, **25**, 7033-7041.
393. Bottardi, S., Bourgoin, V., Pierre-Charles, N. and Milot, E. (2005) Onset and inheritance of abnormal epigenetic regulation in hematopoietic cells. *Hum Mol Genet*, **14**, 493-502.

394. Kim, S.I., Bultman, S.J., Jing, H., Blobel, G.A. and Bresnick, E.H. (2007) Dissecting molecular steps in chromatin domain activation during hematopoietic differentiation. *Mol Cell Biol*, **27**, 4551-4565.
395. Gui, C.Y. and Dean, A. (2003) A major role for the TATA box in recruitment of chromatin modifying complexes to a globin gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7009-7014.
396. Vieira, K.F., Levings, P.P., Hill, M.A., Crusselle, V.J., Kang, S.H., Engel, J.D. and Bungert, J. (2004) Recruitment of transcription complexes to the beta-globin gene locus in vivo and in vitro. *J Biol Chem*, **279**, 50350-50357.
397. Kim, A., Song, S.H., Brand, M. and Dean, A. (2007) Nucleosome and transcription activator antagonism at human beta-globin locus control region DNase I hypersensitive sites. *Nucleic Acids Res*, **35**, 5831-5838.
398. Kim, S.I., Bultman, S.J., Kiefer, C.M., Dean, A. and Bresnick, E.H. (2009) BRG1 requirement for long-range interaction of a locus control region with a downstream promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 2259-2264.
399. Levings, P.P., Zhou, Z., Vieira, K.F., Crusselle-Davis, V.J. and Bungert, J. (2006) Recruitment of transcription complexes to the beta-globin locus control region and transcription of hypersensitive site 3 prior to erythroid differentiation of murine embryonic stem cells. *FEBS J*, **273**, 746-755.
400. Fang, X., Xiang, P., Yin, W., Stamatoyannopoulos, G. and Li, Q. (2007) Cooperativeness of the higher chromatin structure of the beta-globin locus revealed by the deletion mutations of DNase I hypersensitive site 3 of the LCR. *J Mol Biol*, **365**, 31-37.
401. Snow, J.W., Trowbridge, J.J., Fujiwara, T., Emambokus, N.E., Grass, J.A., Orkin, S.H. and Bresnick, E.H. (2010) A single cis element maintains repression of the key developmental regulator Gata2. *PLoS Genet*, **6**.
402. Pilon, A.M., Nilson, D.G., Zhou, D., Sangerman, J., Townes, T.M., Bodine, D.M. and Gallagher, P.G. (2006) Alterations in expression and chromatin configuration of the alpha hemoglobin-stabilizing protein gene in erythroid Kruppel-like factor-deficient mice. *Mol Cell Biol*, **26**, 4368-4377.

403. Guo-wei, Z., Rui-feng, Y., Xiang, L., Mitchell, W.J., De-pei, L. and Chih-chuan, L. (2010) NF-E2: a novel regulator of alpha-hemoglobin stabilizing protein gene expression. *Chin Med Sci J*, **25**, 193-198.
404. Gallagher, P.G., Liem, R.I., Wong, E., Weiss, M.J. and Bodine, D.M. (2005) GATA-1 and Oct-1 are required for expression of the human alpha-hemoglobin-stabilizing protein gene. *J Biol Chem*, **280**, 39016-39023.
405. Vaquerizas, J.M., Kummerfeld, S.K., Teichmann, S.A. and Luscombe, N.M. (2009) A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet*, **10**, 252-263.

## Annexe I

Suite à l'article présenté au chapitre 6, notre équipe a décidé de poursuivre la caractérisation du rôle de Ikaros et GATA-1 dans la régulation des gènes  $\gamma$  lors du développement. Contrairement à ce que nous avons observé lors de la commutation des globines, Ikaros et GATA-1 sont associés à l'activation des gènes  $\gamma$  plus tôt lors du développement, soit au stade e10.5.

Les résultats de cette étude qui sont présentés dans la présente annexe ont été publiés dans la revue *Nucleic Acid Research* en mai 2011. L'article a pour titre : « Ikaros interacts with P-TEFb and cooperates with GATA-1 to enhance transcription elongation » et comporte 7 figures ainsi que 3 figures supplémentaires.

## **Article 5 : Ikaros interacts with P-TEFb and cooperates with GATA-1 to enhance transcription elongation**

Stefania Bottardi<sup>1</sup>, Farah A. Zmiri<sup>1</sup>, Vincent Bourgoïn<sup>1</sup>, Julie Ross<sup>1</sup>, Lionel Mavoungou<sup>1</sup>, and Eric Milot<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Faculty of Medicine, University of Montreal, 5415 boulevard l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada H1T 2M4; <sup>2</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montreal, C.P. Succursale Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3T 3J7

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +1 5142523551; Fax: +1 5142523430

## Abstract

Ikaros is associated with both gene transcriptional activation and repression in lymphocytes. Ikaros acts also as repressor of human  $\gamma$ -globin ( $hu\gamma$ -) gene transcription in fetal and adult erythroid cells. Whether and eventually, how Ikaros can function as a transcriptional activator in erythroid cells remains poorly understood. Results presented herein demonstrate that Ikaros is a developmental-specific activator of  $hu\gamma$ -gene expression in yolk sac erythroid cells. Molecular analysis in primary cells revealed that Ikaros interacts with Gata-1 and favours Brg1 recruitment to the human  $\beta$ -globin Locus Control Region and the  $hu\gamma$ -promoters, supporting long-range chromatin interactions between these regions. Additionally, we demonstrate that Ikaros contributes to transcription initiation and elongation of the  $hu\gamma$ -genes, since it is not only required for TBP and RNA Polymerase II (Pol II) assembly at the  $hu\gamma$ -promoters but also for conversion of Pol II into the elongation-competent phosphorylated form. In agreement with the latter, we show that Ikaros interacts with Cyclin-dependent kinase 9 (Cdk9), which contributes to efficient transcription elongation by phosphorylating the C-terminal domain of the large subunit of Pol II on Serine 2, and favours Cdk9 recruitment to  $hu\gamma$ -promoters. Our results show that Ikaros exerts dual functionality during gene activation, by promoting efficient transcription initiation and elongation.

## Introduction

The transcription factor Ikaros is widely expressed in hematopoietic cells where it regulates various aspects of hematopoiesis (1,2). Ikaros has been associated with gene activation (3-5), potentiation (6), priming (7), and transcriptional repression (8,9). In proliferating T cells, a high fraction of Ikaros co-purifies with Mi-2, a core component of the NuRD complex (10,11). In addition, Ikaros and Mi-2 control transcriptional regulation of the *Cd4* locus during T cell differentiation (12). Nevertheless, a significant fraction of Ikaros is associated with a Brg1-based SWI/SNF-like complex (10). The relevance of the latter



interaction has been indicated by several observations: (i) Ikaros has been associated with gene activation mediated by SWI/SNF-like complexes in T cells (3); (ii) Ikaros co-fractionates and co-immunoprecipitates with Brg1 (10,13); and (iii) Ikaros and Brg1 are also components of a SWI/SNF-like complex in mouse erythroleukemia (MEL) cells (14).

The human  $\beta$ - (hu $\beta$ -) globin locus has been widely used as a model to explore the effects of transcription factors and co-factors on tissue- and developmental-specific gene expression. The hu $\beta$ -globin locus contains five developmentally regulated genes ( $\epsilon$ - $\gamma^G$ - $\gamma^A$ - $\delta$ - $\beta$ ). The locus control region ( $\beta$ LCR), which is located upstream of the globin genes, provides high-level globin gene expression in erythroid cells (EryC). The  $\beta$ LCR is composed of five DNase I hypersensitive sites (HSs) which are particularly rich in transcription factor binding sites (15). In EryC the  $\beta$ LCR favors high-level transcription through close interaction with gene promoters, and is a major determinant of locus chromatin organization (16). The transcription factors EKLf (17), Ikaros (18), BCL11A (19), GATA-1 and its co-factor FOG-1 (Friend of GATA-1) (20), as well as the nuclear factor NLI/Ldb1 (21) and the chromatin remodeling co-regulator Brg1 (22) have all been shown to be required for efficient long-range chromatin interactions between the  $\beta$ LCR and  $\beta$ -like globin gene promoters.

Beside transcription initiation, modulation of transcription elongation is also likely implicated in globin gene regulation. Indeed, it has been shown that the  $\beta$ LCR enhances the transition from transcription initiation to elongation for the  $\beta$  major globin ( $\beta$ maj) gene (23). Additionally, globin gene expression can be reversibly inhibited by the ATP analog 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) (24,25), an inhibitor of cyclin-dependent kinase 9 (Cdk9) (26). Cdk9 is the catalytic subunit of the positive transcription elongation factor (P-TEFb). Cdk9 contributes to efficient transcription elongation by phosphorylating the C-terminal domain (CTD) of the large subunit of RNA Polymerase II (Pol II) on Ser2 (Pol II phospho Ser2). Several gene-specific regulators interact with P-TEFb but only a very limited number of transcription activators have been shown to recruit it to gene promoters (27). Two Cdk9 isoforms are found in mammalian cells and classified

according to apparent molecular weight, namely Cdk9<sub>42</sub> and Cdk9<sub>55</sub>. In general Cdk9 is essential for definitive but not primitive erythropoiesis in zebrafish (28), and deregulation of the Cdk9 pathway is implicated in the establishment and/or maintenance of a transformed cell phenotype, as documented for a number of human tumors and lymphomas (26).

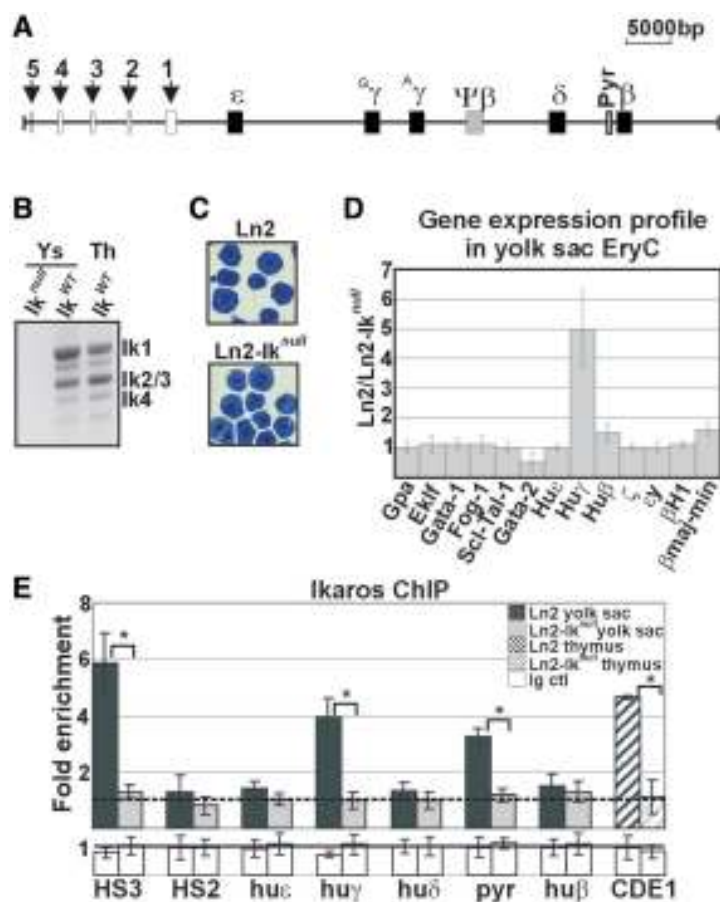
Primitive hematopoiesis is the transient production of large, nucleated erythroid and megakaryocyte progenitors, and takes place in the yolk sac (29). Mouse primitive EryC express the embryonic globin genes  $\epsilon\gamma$  and  $\beta h1$ , whereas the human  $\beta$ -like globin genes expressed at the same stage of development in transgenic mice (carrying the complete hu $\beta$ -globin locus) are the embryonic  $\epsilon$ - (hu $\epsilon$ -) and the fetal  $\gamma$ - (hu $\gamma$ -) genes (30,31). Hu $\gamma$ -genes are transcriptionally silenced in adult definitive EryC by the contribution of several transcription regulators, such as Gata-1 (32,33), Ikaros (18,34) the TR2/TR4 heterodimer (35) that are present throughout primitive as well as definitive erythropoiesis or the recently characterized Bcl11a protein, which however appears to be expressed only in definitive but not primitive, yolk sac-derived EryC (30,36). We have recently shown that Ikaros and Gata-1 cooperate to silence the hu $\gamma$ -genes in EryC at the fetal stage of development when hu $\gamma$ - and hu $\beta$ -genes are expressed (18). To investigate if Ikaros can also act as transcriptional activator in EryC and to define the molecular mechanisms of Ikaros-dependent transcriptional control, we studied the expression profile of hu $\gamma$ -genes in embryonic day 10.5 (e10.5) yolk sac EryC. We used line 2 (ln2) mice, which carry a 70 Kb DNA fragment containing the entire hu $\beta$ -globin locus and express the human  $\beta$ -like globin genes in a developmental-specific manner (31), as well as Ikaros null (Ik<sup>null</sup>) mice that are null for Ikaros proteins due to a deletion in the last exon that leads to protein instability (37). Our results reveal that Ikaros is a transcriptional activator of hu $\gamma$ -gene expression in primitive EryC. We provide the evidence that Ikaros contributes to efficient recruitment of Brg1, Gata-1, Pol II, and Cdk9 to the hu $\gamma$ -promoters, thus supporting active chromatin re-organization, transcription initiation and elongation of the hu $\gamma$ -genes.

## Results

### **Ln2-Iknull e10.5 yolk sacs do not have gross developmental defects**

Primitive EryC are characterized by their large size and expression of embryonic  $\beta$ -like globin genes, *i.e.*,  $\epsilon\gamma$  and  $\beta h1$  in mice, and  $\epsilon$  in humans. In transgenic mice carrying the hu $\beta$ -globin locus (Fig. 1A), such as Ln2 mice, both hu $\gamma$ - and hu $\epsilon$ -genes are expressed in yolk sac EryC (30,31). Ikaros is expressed throughout development in EryC, and can be detected in yolk sac and fetal liver at e11 (2). The DNA-binding isoforms Ikaros-1, -2/3 and -4 are the predominant isoforms expressed in hematopoietic cells (4). To assess the expression pattern of Ikaros isoforms in yolk sac EryC, total RNA was retro-transcribed and cDNA amplified using Ikaros exon 1- and 7-specific primers. As shown in Fig. 1B, Ikaros-1, -2/3, and -4 isoforms are expressed in yolk sac EryC at a relative molecular ratio resembling that observed in adult thymus cells. We then investigated whether erythroid development and differentiation are affected in Ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC. Firstly, we evaluated yolk sac cellularity. Keeping in mind the difficulties associated with quantitative analysis of e10.5 blood cells, no direct correlation between Ikaros genotype and total number of nucleated EryC collected per embryo could be established, suggesting that loss of Ikaros does not generate a quantitative defect of primitive erythropoiesis; also, Ln2-*Ik<sup>null</sup>* embryos were not visibly anemic, had apparently normal morphology, and were indistinguishable from wild-type counterparts (data not shown). Secondly, we performed Wright-Giemsa staining of Ln2 and Ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC. In both genetic backgrounds, embryonic blood was predominated by large basophilic erythroblasts (Fig. 1C), indicating similar erythroid differentiation behaviour in Ln2 vs. Ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC. Thirdly, we evaluated transcript levels of the erythrocyte cell-surface molecule Gpa (Glycophorin A) and the transcription factors Eklf, Gata-1, Fog-1, and Scf/Tal-1, which are co-regulators critical for erythroid differentiation and globin gene expression (39). RT-qPCR analysis revealed that *Gpa*, *Eklf*, *Gata-1*, *Fog-1*, and *Scf/Tal-1* expression levels do not significantly vary between Ln2 and Ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC ( $n \geq 4$ ) whereas, as observed in e12.5 fetal liver EryC (18), loss of Ikaros is associated with increased *Gata-2* levels (Fig. 1D;  $p=0.03$ ).

Overall, these results suggest that loss of Ikaros does not impair yolk sac EryC development or homeostasis.



**Figure 1: Morphological and molecular characterization of Ln2 and Ln2-Iknull yolk sac EryC.**

A) Map of the human  $\beta$ -globin locus; black arrows indicate  $\beta$ LCR HSs; genes are indicated by black boxes; **B**) RT-PCR performed on Ln2-*Ik*<sup>null</sup> (*Ik*<sup>null</sup>), Ln2 (*Ik*<sup>WT</sup>) yolk sac EryC or Ln2 (*Ik*<sup>WT</sup>) thymus (Th) cells; **C**) Wright-Giemsa staining of Ln2 or Ln2-*Ik*<sup>null</sup> yolk sac cells; **D**) RT-qPCR of hematopoietic as well as globin gene transcripts performed on equal amounts of Ln2 and Ln2-*Ik*<sup>null</sup> yolk sac EryC; transcript quantification was calculated according to Pfaffl (73) using mouse *Actin* cDNA as internal control; Ln2/Ln2-*Ik*<sup>null</sup> ratios are plotted as the mean  $\pm$  s.d. of the measurements;  $n \geq 4$ ; **E**) ChIP on Ln2 and Ln2-*Ik*<sup>null</sup> yolk

sac EryC or thymus cells carried out with Ikaros antibodies; immunoprecipitated and input chromatin samples were used as template in qPCR; quantification was carried out according to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method, using mouse kidney-specific Tamm-Horsfall protein (*Thp*) promoter as internal control; fold enrichments ( $y$  axis) of globin regions relative to the control and the input samples are plotted as the mean  $\pm$  s.d. of the measurements; a value of 1 (dashed line) indicates no enrichment; \*:  $p \leq 0.05$  by Student's  $t$  test; hu $\epsilon$ : hu $\epsilon$ -promoter, hu $\gamma$ : hu $\gamma$ -promoters, hu $\delta$ : hu $\delta$ -promoter, pyr: Pyr region; and hu $\beta$ : hu $\beta$ -promoter; dark grey bars: ln2 yolk sac EryC; light grey bars: ln2-*Ik*<sup>null</sup> yolk sac EryC; dark grey dashed bars: ln2 thymus cells; light grey dashed bars: ln2-*Ik*<sup>null</sup> thymus cells; white bars: isotype-matched Ig (Ig ctl).

### **Ikaros-dependent hu $\gamma$ -globin gene expression in yolk sac EryC**

We have recently shown that Ikaros contributes to hu $\gamma$ -gene transcriptional silencing in e12.5 fetal liver EryC (18). To investigate the role of Ikaros in globin gene regulation in yolk sac EryC, levels of hu $\epsilon$ -, hu $\gamma$ -, and hu $\beta$ -gene expression were established by RT-qPCR, using oligo(dT) primers for cDNA synthesis, intron-exon junction sequence-specific primers for qPCR, and *Actin* as internal control. Loss of Ikaros leads to a reduced hu $\gamma$ -gene expression n levels in yolk sac EryC (Fig. 1D;  $p=0.005$ ). Moreover expression of the embryonic hu $\epsilon$ - and mouse  $\zeta$ -,  $\epsilon\gamma$ -, and  $\beta$ H1-globin genes is unchanged in ln2-*Ik*<sup>null</sup> yolk sac EryC ( $n \geq 4$ ), and in these cells we detected only a slight but significant reduction of hu $\beta$ - and mouse  $\beta$  maj/ $\beta$  min globin gene expression ( $n=6$ ;  $p \leq 0.05$ ). Similar results were obtained when *Gpa* was used as internal control. For instance, in ln2 vs. ln2-*Ik*<sup>null</sup> cells, the relative level of hu $\gamma$ -gene expression was 5.9 (s.d. 1.2;  $n=6$ ;  $p=0.05$ ). *Gpa* is an erythroid-specific membrane marker gene used as control to ensure that variations in globin gene expression are not merely due to changes in the number of viable EryC. Altogether, the above data suggest that Ikaros specifically contributes to hu $\gamma$ -gene transcriptional activation in yolk sac EryC.

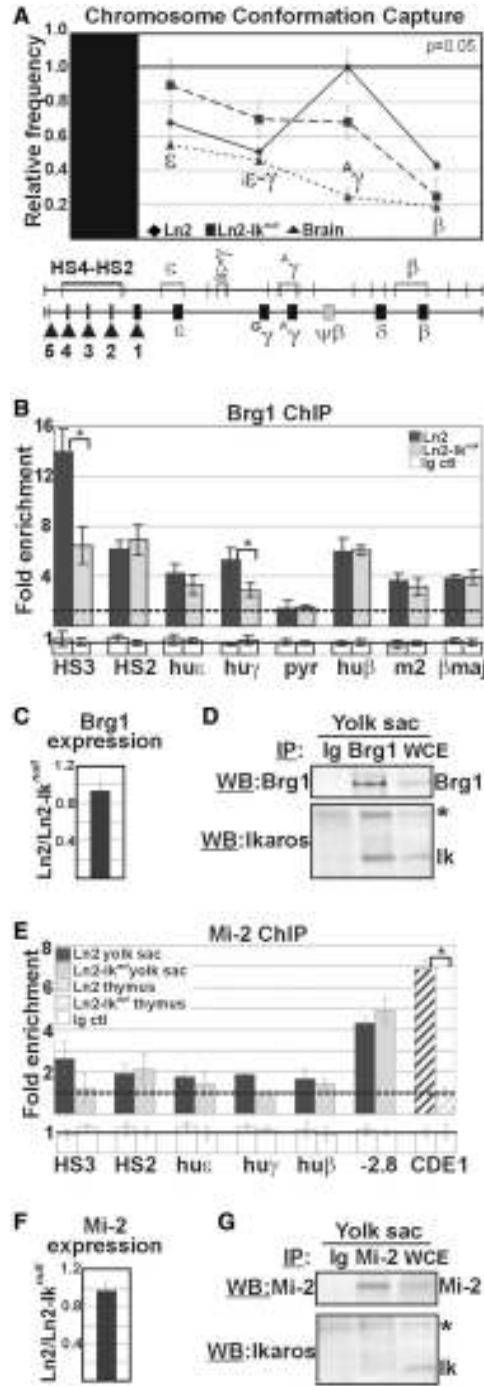
## **Ikaros promotes efficient recruitment of Brg1 to $\beta$ LCR HS3 and *hu $\gamma$* -promoters in ln2 yolk sac EryC**

It has recently been demonstrated that Ikaros is recruited to  $\beta$ LCR HS3 (HS3), *hu $\gamma$* -promoters, and a pyrimidine stretch (Pyr region) located 1 kilobase upstream of the *hu $\delta$* -gene that contributes to *hu $\gamma$* -gene silencing in adult-type erythroid cells; however, Ikaros does not bind to HS2 nor to *hu $\epsilon$* - and *hu $\beta$* -promoters even though the Ikaros consensus sequence, TGGGAA, is found in the latter (data not shown and (1,14,18,40)). To investigate occupancy by Ikaros of these regulatory regions in yolk sac EryC *in vivo*, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis using chromatin isolated from ln2 or ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC and Ikaros antibodies (18). Ikaros is efficiently recruited to HS3, *hu $\gamma$* -promoters, and Pyr region in yolk sac EryC and to *CD4* enhancer 1 region (CD4E1, used as control) in adult thymus cells (12), whereas no significant recruitment was detected at HS2, *hu $\epsilon$* - or *hu $\beta$* -promoter (Fig. 1E).

Ikaros co-fractionates and co-immunoprecipitates with Brg1 (10,13,14), and furthermore acts as a potentiator of gene expression during T-cell development possibly by recruiting Brg1-containing chromatin remodelling complexes to appropriate lineage-specific target genes (4,6). In addition, Brg1 is recruited to mouse HS3, is required for embryonic and adult  $\beta$ -globin gene transcription, erythroblast survival (41,42), and long-range chromatin interactions at the  $\beta$ -globin locus (22). Therefore, we studied the influence of Ikaros, when acting as transcription activator, on long-range chromatin interactions. As such we exploited the Chromosome Conformation Capture (3C) assay to determine the physical proximity between chromosomal regions that are normally located many kilobases apart *in vivo*. Using the  $\beta$ LCR HS4-HS2 region as ‘fixed’ fragment (43), we observed that long-range chromatin interactions between the  $\beta$ LCR and the *hu $\gamma$* -promoters are decreased in ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC (Fig. 2A; n=5; p=0.05). Next, we analyzed *in vivo* recruitment of Brg1 to several regions across the *hu $\beta$* -globin locus by ChIP. Brg1 recruitment to HS3 and *hu $\gamma$* -promoters is reduced in ln2-*Ik<sup>null</sup>* EryC but is not affected at HS2, *hu $\epsilon$* - or *hu $\beta$* -promoters or mouse HS2 and  $\beta$ maj promoter (Fig. 2B). To exclude the possibility that

Ikaros might influence *Brg1* transcription, we compared *Brg1* expression levels in ln2 and ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC by RT-qPCR and found *Brg1* transcription to be essentially unchanged in the two backgrounds (Fig. 2C). Next, we tested whether Ikaros co-immunoprecipitates with Brg1 in yolk sac EryC by protein co-IP assay. Brg1 is immunoprecipitated and recognised by Brg1 antibodies by Western Blot (WB); additionally, Ikaros is detected upon Brg1 IP, thus indicating that Ikaros and Brg1 proteins co-immunoprecipitate in these cells (Fig. 2D).

Ikaros is also known to interact with the nucleosome remodelling ATPase Mi-2 (a subunit of the NuRD chromatin remodelling complex) (10,11), and recruits this co-factor to specific chromatin regions (18). Even though Mi-2 is widely perceived as a transcriptional repressor, the Mi-2-NuRD complex has recently been linked to both gene activation and repression in the case of certain Gata-1/Fog-1 target genes (44). For this reason we investigated *in vivo* recruitment of Mi-2 to the hu $\beta$ -globin locus in ln2 as well as ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC by ChIP. As depicted in Fig. 2E, no significant recruitment of Mi-2 either to HS3, HS2 or to hu $\epsilon$ -, hu $\gamma$ -, and hu $\beta$ -promoters could be detected. Nonetheless under the same experimental conditions, in confirming the technical feasibility of Mi-2 ChIP, we could demonstrate efficient Mi-2 recruitment to the -2.8 kb region upstream of the *Gata-2* promoter in yolk sac EryC (Fig. 2E) (45), the CD4E1 region (12) in freshly-isolated thymic cells (Fig. 2E) , and several regions of the hu $\beta$ -globin locus in EryC isolated from e12.5 fetal livers (18). Due to the possibility that absence of significant Mi-2 recruitment to critical regulatory regions of the hu $\beta$ -globin locus might depend upon lower levels of *Mi-2* expression in ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC, we next examined *Mi-2* gene expression by RT-qPCR. We observed that *Mi-2* expression levels are the same in ln2 and ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC (Fig. 2F). However, under the same stringency conditions that allowed co-IP of Ikaros and Brg1 (150 mM NaCl, 0.5% NP-40), Ikaros and Mi-2 could not be co-immunoprecipitated in yolk sac EryC with specific antibodies (Fig. 2G). These results argue against a direct role of Mi-2 for hu $\gamma$ -gene activation in yolk sac EryC, and rather suggest that the Ikaros-dependent recruitment of Brg1 to hu $\gamma$ -promoters and HS3 is required for efficient hu $\gamma$ -gene expression in these cells.



**Figure 2: Brg1 and Mi-2 recruitment to the hu $\beta$ -globin locus in Ln2 and Ln2-Ik<sup>null</sup> yolk sac EryC.**

A) Ln2 and Ln2-Ik<sup>null</sup> yolk sac EryC were subjected to Chromosome Conformation Capture (3C) assay; nuclei were digested with EcoRI and



genomic DNA was ligated and used as template for qPCR;  $\beta$ LCR HS4-HS2 EcoRI fragment was used as ‘fixed’ point and primer sets were designed in order to amplify the genomic regions corresponding to the  $\epsilon$ -gene ( $\epsilon$ ), inter- $\epsilon$ - $\gamma$  region ( $i\epsilon$ - $\gamma$ ),  $^A\gamma$ -gene ( $^A\gamma$ ), and  $\beta$ -gene ( $\beta$ ) region; relative crosslinking frequencies ( $y$  axis) of the ‘fixed’ fragment with globin fragments were defined using naked DNA encompassing the whole hu $\beta$ -globin as control and normalized to endogenous mouse *Actin*; a value of 1 was attributed to the highest crosslinking frequency; the data are plotted as the mean  $\pm$  s.d. of the measurements of three independent experiments;  $x$  axis: position across the locus; rhomboids: ln2 yolk sac EryC; squares: ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC; triangles: brain cells; **B, E**) ChIP on ln2 and ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC or thymus cells carried out with Brg1 or Mi-2 antibodies; fold enrichments ( $y$ -axis) were calculated as described in Fig. 1E and are plotted as the mean  $\pm$  s.d. of the measurements; a value of 1 (dashed line) indicates no enrichment; \*:  $p \leq 0.05$  by Student’s  $t$  test; hu $\epsilon$ : hu $\epsilon$ -promoter; hu $\gamma$ : hu $\gamma$ -promoters; pyr; Pyr region; hu $\beta$ : hu $\beta$ -promoter; m2: mouse HS2;  $\beta$ maj:  $\beta$ major promoter; -2.8: -2.8 kb region upstream of the *Gata-2* promoter; and CD4E1: *CD4* enhancer 1 region; dark grey bars: ln2 yolk sac EryC; light grey bars: ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC; dark grey dashed bars: ln2 thymus cells; light grey dashed bars: ln2-*Ik<sup>null</sup>* thymus cells; white bars: isotype-matched Ig (Ig ctl); **C, F**) RT-qPCR of *Brg1* and *Mi-2* gene transcripts performed on equal amounts of ln2 and ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC; transcript quantification was calculated according to Pfaffl (73) using mouse *Actin* cDNA as internal control; ln2/ln2-*Ik<sup>null</sup>* ratios are plotted as the mean  $\pm$  s.d. of the measurements; n=6; **D, G**) Protein co-IP of total cell lysates prepared from ln2 yolk sac EryC; cell lysates were immunoprecipitated with Mi-2 or Brg1 antibodies as well as isotype-matched Ig; samples were resolved on SDS-PAGE, immunoblotted, and WB membranes were cut in half; the higher half was probed with either Mi-2 or Brg1 antibodies, whereas the lower half was

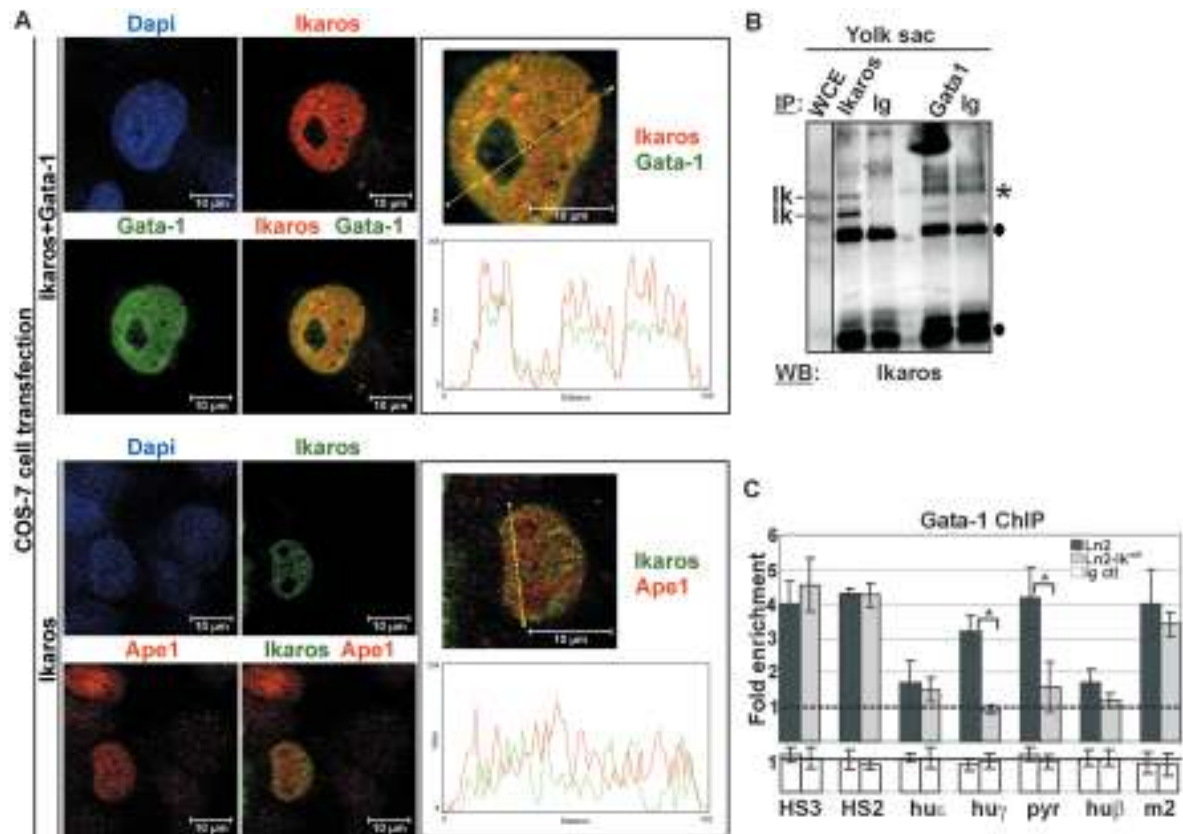
probed with Ikaros antibodies; asterisks indicate contaminating bands; WCE: yolk sac EryC total cell lysate.

## **Ikaros facilitates Gata-1 recruitment to *huy*-regulatory regions in yolk sac EryC**

We previously reported that Ikaros physically interacts with Gata-1 and facilitates Gata-1 recruitment to HS3 and *huy*-promoters in e12.5 fetal liver EryC (18). To better define Ikaros-Gata-1 protein interaction, we first analyzed the subcellular localization of Ikaros and Gata-1 at the single-cell level by immunofluorescence (IF) and confocal microscopy. COS-7 cells, which lack any Ikaros or Gata-1 protein, were transfected with Flag/HA-Ikaros (pCMV-FH-Ik) together with Gata-1 (pCMV-Gata) expression vectors, fixed with formaldehyde, permeabilized and immunolabeled with antibodies specific for HA (*i.e.* Ikaros detection) or Gata-1. Ikaros and Gata-1 were detected using secondary antibodies conjugated to Texas red (TR) or Fluorescein isothiocyanate (FITC) fluorochromes, respectively. The use of cross-absorbed and affinity-purified secondary antibodies minimized background and non-specific reactivity to undetectable fluorescent levels (data not shown). Confocal microscopy analysis revealed that both Ikaros (red signals) and Gata-1 (green signals) have a dominant nuclear localization (Fig. 3A), whereas COS-7 cells transfected with empty vectors (mock control) showed undetectable levels of green or red stain (Supplementary Fig. S2A). Interestingly, the merged image obtained in COS-7 cells that express both Ikaros and Gata-1, leads to the emergence of several yellow nuclear signals per focal plane (Fig. 3A). Physical overlap between Ikaros and Gata-1 was further defined by the ImageJ(®)program, which revealed that the line profile plots and fluorescent peaks of Ikaros and Gata-1 often overlap whereas the fluorescence profiles of Ikaros and Ape1, a nuclear protein that does not interact with Ikaros used as negative control (46), are discordant.

Next, Ikaros-Gata-1 protein interaction was investigated by protein co-IP. Protein lysates of In2 yolk sac EryC were immunoprecipitated with Ikaros or Gata-1 antibodies as well as

isotype-matched rabbit (for Ikaros co-IP) or rat (for Gata-1 co-IP) immunoglobulins (Ig) and immunoblots were probed with Ikaros antibodies. The results show that Ikaros can be immunoprecipitated by Gata-1 antibodies but not by control Ig (Fig. 3B), suggesting that Ikaros and Gata-1 can be part of the same protein complex also in yolk sac EryC.



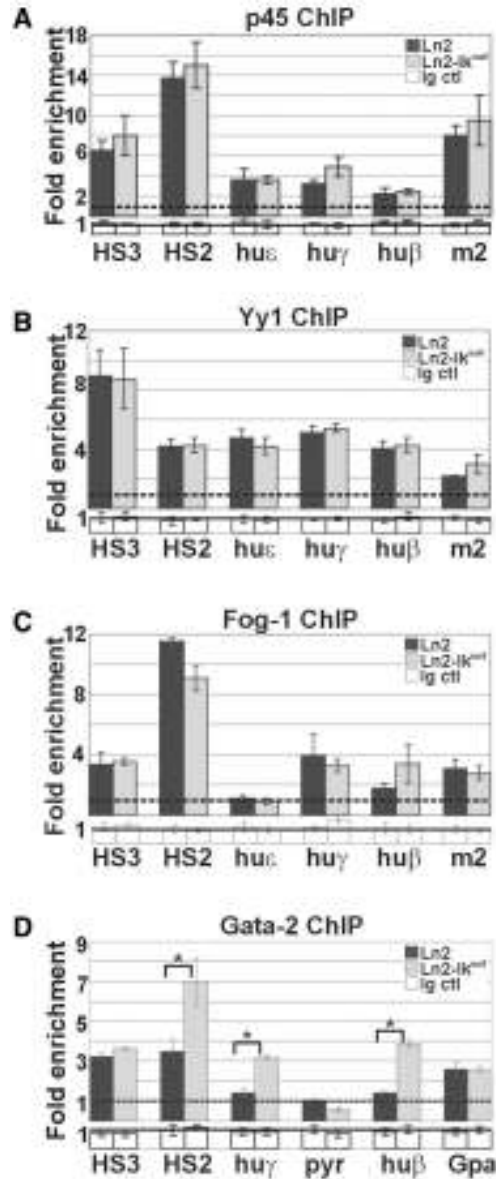
**Figure 3: Ikaros-Gata-1 cooperative binding.**

**A)** Confocal immunofluorescence of COS-7 cells expressing Flag/HA-Ikaros and Gata-1 proteins (Ikaros+Gata-1) or Flag/HA-Ikaros only (Ikaros); Ikaros+Gata-1 transfected cells were stained with mouse antibodies to the HA tag and with rat antibodies to Gata-1; the secondary staining was carried out with TR-conjugated anti-mouse as well as FITC-conjugated anti-rat antibodies; a single COS-7 cell is shown where Ikaros is detected as red signals, Gata-1 as green signals, and Ikaros-Gata-1 co-localization as yellow signals in the magnified merged image; Ikaros transfected cells were stained with rabbit antibodies to the HA tag and with mouse antibodies to Ape1; the secondary

staining was carried out with FITC-conjugated anti-rabbit as well as TR-conjugated anti-mouse antibodies; a single COS-7 cell is shown where Ikaros is detected as green signals and Ape1 as red signals; line profile plots were obtained by the WCIF ImageJ(®) program (NIH); **B**) Protein co-IP of total cell lysates prepared from ln2 yolk sac EryC; cell lysates were immunoprecipitated with Ikaros or Gata-1 antibodies as well as isotype-matched rabbit (for Ikaros co-IP) or rat (for Gata-1 co-IP) Ig and WB was carried out with Ikaros antibodies; filled circles represent Ig bands; asterisks indicate non-specific bands; WCE: yolk sac EryC total cell lysate; **C**) ChIP on ln2 and ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC carried out with Gata-1 antibodies; fold enrichments ( $\gamma$ -axis) were calculated as described in Fig. 1E and are plotted as the mean  $\pm$  s.d. of the measurements; a value of 1 (dashed line) indicates no enrichment; \*:  $p \leq 0.05$  by Student's *t* test; hu $\epsilon$ : hu $\epsilon$ -promoter; hu $\gamma$ : hu $\gamma$ -promoters; pyr: Pyr region; hu $\beta$ : hu $\beta$ -promoter; m2: mouse HS2; dark grey bars: ln2 yolk sac EryC; light grey bars: ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC; white bars: isotype-matched Ig (Ig ctl).

Ikaros-Gata-1 cooperative binding to the hu $\beta$ -globin locus was then investigated by ChIP. In ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC, Gata-1 binding is diminished at hu $\gamma$ -promoters and Pyr region whereas is normal at HS3 and HS2 (Fig. 3C). In order to investigate whether loss of Ikaros specifically decreases Gata-1 binding or induces a more general alteration of transcription factor recruitment, we analyzed p45/Nf-e2 and Yy1 occupancy since these proteins bind to hu $\gamma$ -promoters. No significant difference in p45/Nf-e2 (Fig. 4A) or Yy1 (Fig. 4B) recruitment was detected at tested chromatin regions in ln2 vs ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC. We then examined whether the Ikaros-Gata-1 complex could modulate recruitment of the Gata-specific cofactor Fog-1 by ChIP. Fog-1 is recruited to HS3, HS2, hu $\gamma$ - and hu $\beta$ -promoters in ln2 and, unexpectedly, ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC (Fig. 4C), even though Gata-1 binding to these promoters is close to background levels (Fig. 3C). This outcome suggests that Fog-1 recruitment to hu $\gamma$ - and hu $\beta$ -promoters in ln2-*Ik<sup>null</sup>* cells does not depend solely on Gata-1. Since Gata-1 and Gata-2 (i) bind to the same DNA motifs *in vivo* and *in vitro* (47-49); (ii) function redundantly to promote primitive erythroblast development (50); (iii) exert their

respective functions in a dose-dependent fashion (39,51); and (iv) bind Fog-1 protein (52), we set out to investigate Gata-2 occupancy at globin promoters in *ln2-Ik<sup>null</sup>* EryC. Loss of Ikaros correlates with increased Gata-2 recruitment to HS2, *huγ*-, and *huβ*-promoters, whereas Gata-2 recruitment does not significantly change at the *Gpa* promoter, which was used as a control for Gata-2 binding (Fig. 4D) (53). These results suggest that Ikaros contributes to Gata-1 binding at *huγ*-promoters and Pyr region in *ln2* yolk sac EryC. They also indicate that increased Gata-2/Gata-1 ratio, as observed in absence of Ikaros (Fig. 1D), might enhance the interaction between Fog-1 and Gata-2, thus allowing Gata-2 to efficiently support Fog-1 recruitment to *huγ*-promoters in yolk sac EryC.



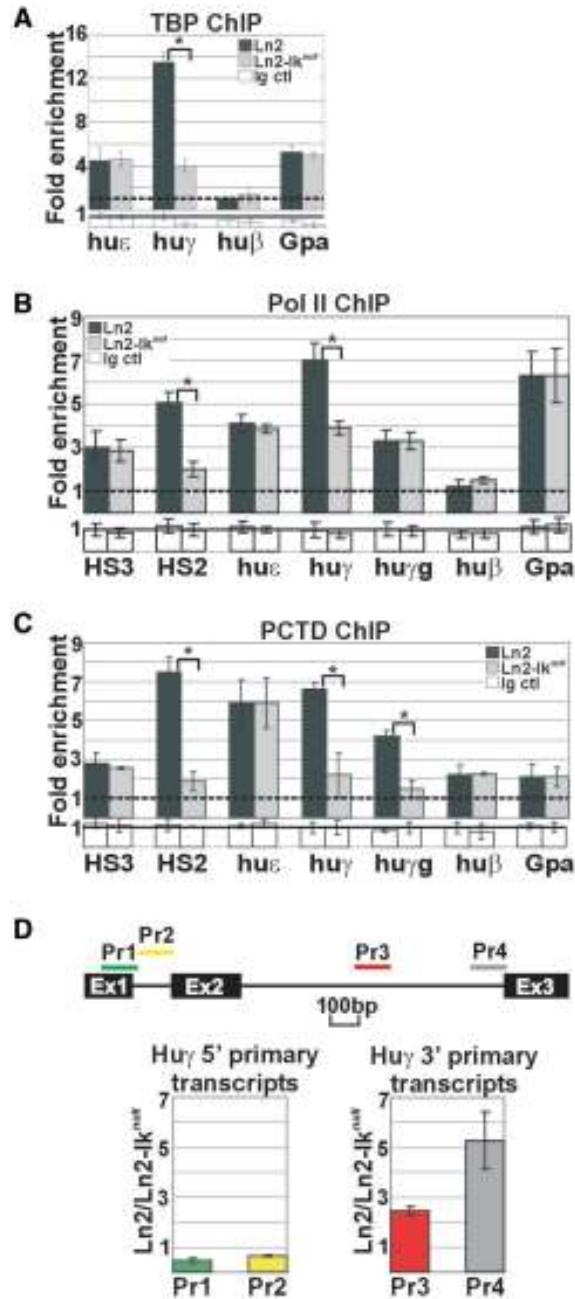
**Figure 4: Recruitment of transcriptional regulators to the hu $\beta$ -globin locus in yolk sac EryC.**

A-D) ChIP on Ln2 and Ln2-Iknull yolk sac EryC carried out with p45/Nf-e2 (p45), Yy1, Fog-1, and Gata-2 antibodies; fold enrichments (y-axis) were calculated as described in Fig. 1E and are plotted as the mean  $\pm$  s.d. of the measurements; a value of 1 (dashed line) indicates no enrichment; \*:  $p \leq 0.05$  by Student's t test; hu $\epsilon$ : hu $\epsilon$ -promoter; hu $\gamma$ : hu $\gamma$ -promoters; hu $\beta$ : hu $\beta$ -promoter; m2: mouse HS2; Gpa: Glycophorin A promoter; dark grey bars: Ln2 yolk sac

EryC; light grey bars: ln2-Iknull yolk sac EryC; white bars: isotype-matched Ig (Ig ctl).

### **Ikaros contributes to efficient PIC assembly and transcription elongation of h $\gamma$ -promoters in ln2 yolk sac EryC**

A critical step during eukaryotic gene transcription is the assembly of the PIC consisting of Pol II and general transcription factors (27). Both chromatin conformation and gene-specific activators influence PIC assembly and hence, transcriptional efficiency. We proceeded to define Ikaros contribution to PIC assembly at the h $\gamma$ -promoters by ChIP. As expected, TBP and Pol II were each efficiently detected at h $\mu$ - and h $\gamma$ -promoters in ln2 yolk sac EryC; in ln2-*Ik*<sup>null</sup> cells, TBP and Pol II recruitment is affected at h $\gamma$ - but not h $\mu$ - or *Gpa*-promoters and Pol II recruitment is also diminished at the HS2 region in ln2-*Ik*<sup>null</sup> yolk sac EryC (Fig. 5A, B). Since Pol II recruitment to h $\gamma$ -promoters is only moderately affected by loss of Ikaros, we examined whether Ikaros could also control the efficiency of transcription elongation by studying: i) levels of Pol II phospho Ser2 (PCTD) recruitment to the h $\gamma$ -genes, because it is known that the levels of this phosphorylated residue is required and increase during transcription elongation (27); ii) the relative levels of h $\gamma$ -globin 5' and 3' primary transcripts, because primary transcript levels accurately reflect the rate of transcription. ChIP assays revealed that PCTD recruitment to HS2 as well as h $\gamma$ -genes and -promoters is significantly affected in absence of Ikaros (Fig. 5C). Primary transcript expression was determined by RT-qPCR using random primers for cDNA synthesis and h $\gamma$ -gene and mouse *Gapdh* intronic sequence-specific primers for qPCR. In line with reduced PCTD occupancy at h $\gamma$  regions, there was an accumulation of transcripts corresponding to the 5' end of the gene and significant reduction of full-length transcripts (Fig. 5D). These results are reminiscent of a gene that initiates transcription without completing elongation, thus supporting a possible role of Ikaros during productive h $\gamma$ -gene transcription elongation.



**Figure 5: PIC assembly at *huy*-genes in *ln2* and *ln2-Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC.**

A-C) ChIP on *ln2* and *ln2-Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC carried out with TBP, Pol II, and Pol II phospho Ser2 (PCTD) antibodies; fold enrichments (y-axis) were calculated as described in Fig. 1E and are plotted as the mean  $\pm$  s.d. of the measurements; a value of 1 (dashed line) indicates no enrichment; \*:  $p \leq 0.05$  by



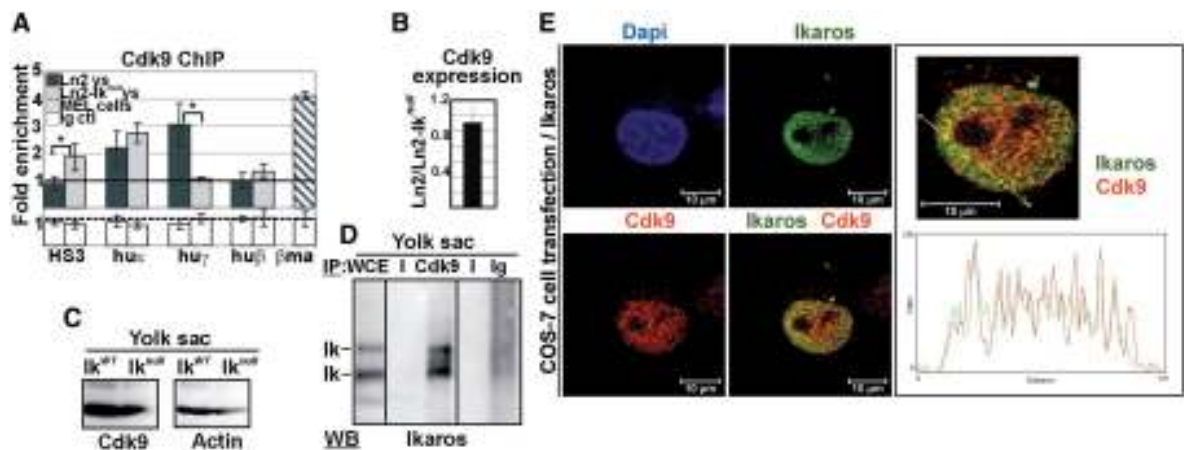
Student's *t* test; huε: huε-promoter; huγ: huγ-promoters; huγg: huγ-genes; huβ: huβ-promoter; Gpa: *Glycophorin A* promoter; dark grey bars: ln2 yolk sac EryC; light grey bars: ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC; white bars: isotype-matched Ig (Ig ctl); **D**) RT-qPCR of huγ-gene 5' and 3' primary transcripts performed on equal amounts of ln2 and ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC using random primers for cDNA synthesis; transcript quantification was calculated according to Pfaffl (73) using the huγ-globin specific primer sets (Pr) depicted as colored bars and mouse *Gapdh* primary transcripts as internal control; ratios are plotted as the mean ± s.d. of the measurements; n≥3; p≤0.05; Ex: indicates the three exons of the huγ-gene.

### **Ikaros interacts with Cdk9**

In higher eukaryotes, Pol II Ser2 phosphorylation is mediated primarily by the Cdk9 catalytic subunit of the P-TEFb complex (27). Considering that the Cdk9 inhibitor DRB is known to affect transcription elongation of huγ-genes (24,25), we investigated whether the P-TEFb complex is involved in huγ-gene transcription elongation and whether Ikaros influences the recruitment of P-TEFb to the huγ-genes. Interestingly, ChIP revealed that Cdk9 is recruited to huε- and huγ-promoters in ln2 yolk sac EryC, and that Cdk9 occupancy is significantly reduced at huγ- but not huε-promoters in ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC (Fig. 6A). To evaluate the significance of the 3-fold enrichment observed in ln2 EryC, we performed ChIP with Cdk9 antibodies in DMSO-induced MEL cells since it has recently been shown that Cdk9 is recruited to the βmaj promoter in these cells (54). The level of Cdk9 enrichment at βmaj promoter in MEL cells is very similar to the occupancy levels of Cdk9 at huγ-promoters in ln2 yolk sac EryC, thus confirming the significance of the results obtained in ln2 yolk sac EryC. Importantly, loss of Ikaros does not modulate the level of Cdk9 transcripts (Fig. 6B) or proteins (Fig. 6C) in yolk sac EryC.

Cdk9 interacts with a number of transcription factors (27). To investigate whether Ikaros and Cdk9 interact in yolk sac EryC, we performed protein co-IP with Cdk9 antibodies or

control Ig. Immunoblots probed with Ikaros antibodies revealed that Ikaros can be immunoprecipitated by Cdk9 antibodies but not by control Ig, hence suggesting that these proteins physically interact (Fig. 6D). To assess Ikaros-Cdk9 interaction at single-cell level, we analyzed the subcellular localization of these proteins by IF and deconvolution microscopy (Fig. 6E). COS-7 cells expressing Flag/HA-Ikaros vector were fixed with formaldehyde, permeabilized and immunolabeled with antibodies specific for HA (*i.e.* Ikaros detection) or Cdk9. Ikaros and Cdk9 were detected using secondary antibodies conjugated to FITC or TR fluorochromes, respectively. COS-7 cells transfected with the empty vector (mock control) showed undetectable levels of green stain (Supplementary Fig. S2B). Confocal microscopy analysis revealed that both Ikaros (green signals) and Cdk9 (red signals) are distributed throughout the nucleus and that these proteins significantly overlap, even though they do not colocalize at each and every nuclear sites, in accordance with known evidence that Cdk9 is present in several other protein complexes (26).



**Figure 6: Ikaros-mediated recruitment of Cdk9 to the huy-genes in yolk sac EryC.**

**A)** ChIP on ln2 and ln2-Ik<sup>null</sup> yolk sac EryC carried out with Cdk9 antibodies; fold enrichments (*y*-axis) were calculated as described in Fig. 1E and are plotted as the mean  $\pm$  s.d. of the measurements; a value of 1 (dashed line) indicates no enrichment; \*:  $p \leq 0.05$  by Student's *t* test; hu $\epsilon$ : hu $\epsilon$ -promoter; hu $\gamma$ : hu $\gamma$ -promoters; hu $\beta$ : hu $\beta$ -promoter;  $\beta$ maj:  $\beta$  major promoter; dark grey bars: ln2 yolk sac EryC; light grey bars: ln2-Ik<sup>null</sup> yolk sac EryC; dark grey dashed

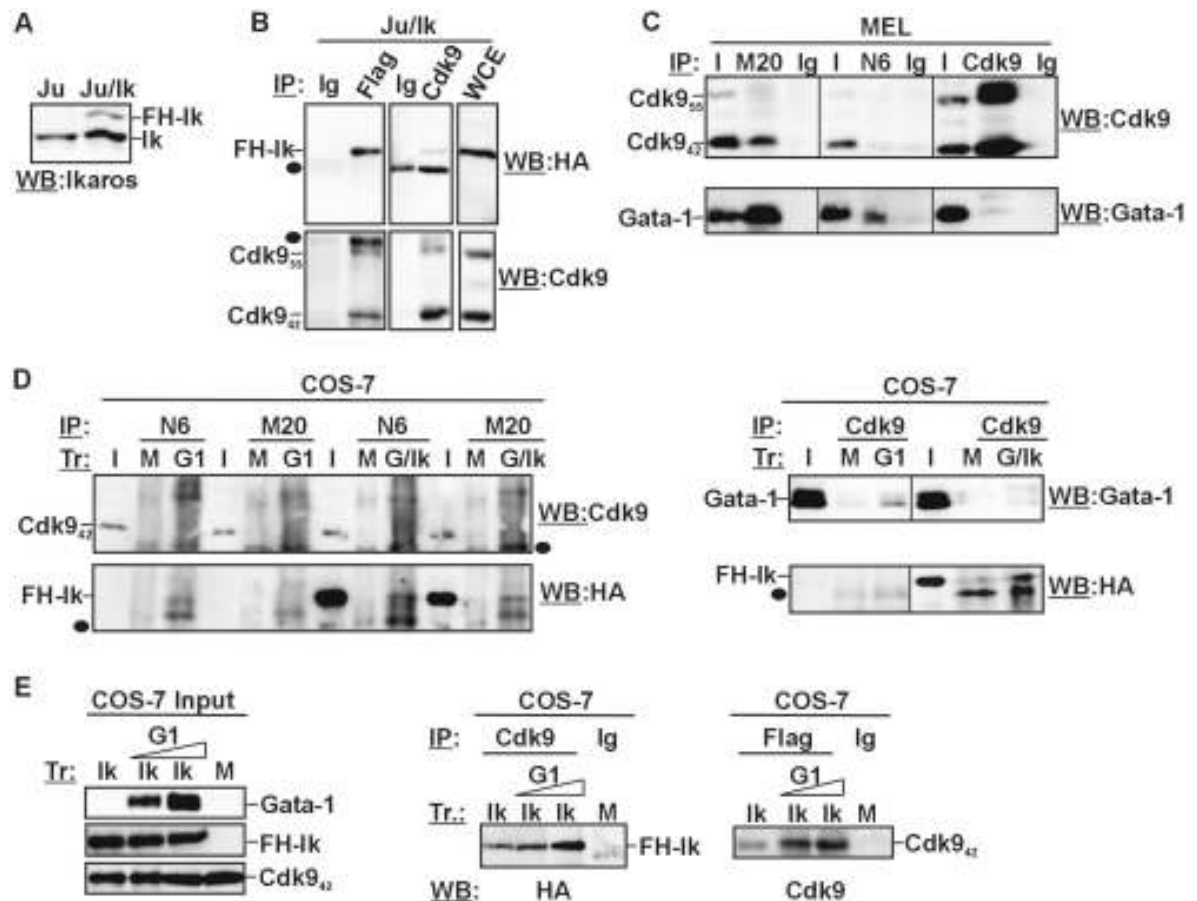
bars: MEL cells; white bars: isotype-matched Ig (Ig ctl); **B**) RT-qPCR of *Cdk9* gene transcripts performed on equal amounts of ln2 and ln2-*Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC; transcript quantification was calculated according to Pfaffl (73) using mouse *Actin* cDNA as internal control; ln2/ln2-*Ik<sup>null</sup>* ratios are plotted as the mean  $\pm$  s.d. of the measurements; n=6; **C**) WB performed on total cell lysates prepared from wild type or *Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC with Cdk9 or Actin antibodies; **D**) protein co-IP of total cell lysates prepared from ln2 yolk sac EryC; cell lysates were immunoprecipitated with Cdk9 antibodies or isotype-matched Ig and WB were carried out with Ikaros antibodies; WCE: yolk sac EryC total cell lysate; **E**) Confocal immunofluorescence of COS-7 cells expressing Flag/HA-Ikaros protein; cells were stained with mouse antibodies to the HA tag and with rabbit antibodies to Cdk9; the secondary staining was carried out with FITC-conjugated anti-mouse as well as TR-conjugated anti-rabbit antibodies; a single COS-7 cell is shown where Ikaros is detected as green signals, Cdk9 as red signals, and Ikaros-Cdk9 co-localization as yellow signals in the magnified merged image; line profile plots of Ikaros (in green) and Cdk9 (in red) were obtained by the WCIF ImageJ(®) program (NIH).

Since Ikaros is known to act as transcriptional repressor and activator of specific genes in T lymphocytes, it was intriguing to know whether Ikaros could possibly interact with Cdk9 in the T lymphocyte-like Jurkat cell line. Jurkat cells were stably transfected with the pOZN-FH-Ik expression vector that contains a bicistronic transcriptional unit, which allows expression of two proteins from a single transcript. This design ensures tight coupling between expression of the gene of interest and the selection marker, the interleukin-2 receptor  $\alpha$  chain (IL2R $\alpha$ ) (18,38). Three rounds of magnetic affinity sorting with antibodies against the IL-2 $\alpha$  receptor were sufficient to obtain a pure population of Jurkat cells (namely, Ju/Ik clone) that express Flag/HA-Ikaros at lower levels than endogenous Ikaros (Fig. 7A). Total cell lysates were immunoprecipitated with Flag, Cdk9 antibodies or control Ig and WB performed with HA or Cdk9 antibodies. As shown in Fig. 7B, Flag/HA-Ikaros is immunoprecipitated by both Flag and Cdk9 antibodies. As well, Cdk9 is

immunoprecipitated by both Flag and Cdk9 antibodies, indicating that Ikaros and Cdk9 are part of the same protein complex. These results suggest that the Ikaros-Cdk9 interaction can also occur in lymphoid cells and does not require Ikaros overexpression because Flag/HA-Ikaros is expressed at lower levels than endogenous Ikaros.

Since Ikaros interacts with Gata-1 (18) (Fig. 3B), and Gata-1 has been shown to interact with the P-TEFb component Cyclin T1 (CycT1) in megakaryocytes (55), we sought to investigate whether Gata-1 could interact with Cdk9 in mouse erythroleukemic MEL cells. Protein co-IP revealed that Cdk9 can be efficiently immunoprecipitated by one out of two antibodies tested directed against Gata-1 (clone M20) and that Gata-1 is immunoprecipitated, even though weakly, by Cdk9 antibodies (Fig. 7C), thus indicating that Gata-1 and Cdk9 are part of the same protein complex in MEL cells. Next, we asked whether Gata-1 could either interfere with or enhance the interaction between Ikaros and Cdk9. To this end, COS-7 cells were transfected with pCMV-FH-Ik, pCMV-Gata-1 or pCMV-FH-Ik together with pCMV-Gata-1 expression plasmid. Cell lysates were immunoprecipitated with Gata-1 (N6 as well as M20 clone), Cdk9, Flag antibodies or control Ig and precipitated proteins were analyzed by WB with Cdk9, HA or Gata-1 antibodies. As expected, Ikaros and Gata-1 interact in COS-7 transfected cells that express both proteins, as revealed by Gata-1 co-IP and WB detection with anti-HA antibodies (Fig. 7D, bottom panel). However, in COS-7 cells that express either Gata-1 or Gata-1 together with Flag/HA-Ikaros, Gata-1 is not detected upon Cdk9 co-IP nor is Cdk9 detected upon Gata-1 co-IP (Fig. 7D), thus suggesting that Gata-1 and Cdk9 do not stably interact in non-hematopoietic, COS-7 cells. Using the same transfected cells and under the same stringency conditions, Flag/HA-Ikaros is detected upon Cdk9 co-IP and Cdk9 is detected upon Flag co-IP (Fig. 7D, E), indicating that Ikaros and Cdk9 co-immunoprecipitate also in COS-7 cells and that additional hematopoietic-specific proteins are not required for this interaction. It is to notice that the interaction between Ikaros and Cdk9 can be maintained at higher stringency conditions, *i.e.* 200mM NaCl or 1% NP-40 (Supplementary Fig. S3A). Interestingly, Gata-1 appears to increase the degree of Ikaros-Cdk9 interaction, since the intensity of the immunoprecipitated bands is proportional to the levels of Gata-1 expression

(Fig. 7E). Altogether, these data indicate that (i) Ikaros and Gata-1 interact also in COS-7 transfected cells; (ii) Gata-1 interacts with Cdk9 in erythroid cells; (iii) Ikaros interacts with Cdk9 in erythroid, lymphoid as well as COS-7 transfected cells; and (iv) Ikaros-Cdk9 interaction does not require Gata-1 even though Gata-1 appears to enhance the strength of this interaction.



**Figure 7: Ikaros interacts with Cdk9 in Jurkat and COS-7 cell lines.**

**A)** WB performed on total cell lysates prepared from Jurkat cells (Ju) or Jurkat cells stably transfected with the pOZN-FH-Ik expression vector (Ju/Ik); endogenous (Ik) as well as double Flag/HA-Ikaros-specific bands (FH-Ik) are indicated; **B)** Protein co-IP of total cell lysates prepared from Ju/Ik cells; filled circles represent Ig bands; WCE: Ju/Ik total cell lysate; **C)** Protein co-IP of total cell lysates prepared from MEL cells; I: Input; M20: anti-Gata-1 antibodies, clone M20; N6: anti-Gata-1 antibodies, clone N6; Ig: isotype-

matched Ig; **D, E**) Protein co-IP of total cell lysates prepared from COS-7 cells transfected (Tr) with empty vector (mock, M), Flag/HA-Ikaros (Ik), Gata-1 (G1) or Flag/HA-Ikaros together with Gata-1 (G/Ik); antibodies used for protein co-IP (IP) and Western Blot (WB) are indicated on each panel; I: Input; M20: anti-Gata-1 antibodies, clone M20; N6: anti-Gata-1 antibodies, clone N6; filled circles represent Ig bands.

## Discussion

In the present study we have shown that Ikaros acts as a stage-specific activator of *huy*-genes in yolk sac EryC by (i) favouring Brg1 and Gata-1 recruitment to *huy*-promoters and contributing to chromatin interaction between the  $\beta$ LCR and these promoters; (ii) supporting efficient PIC assembly and Cdk9 recruitment to *huy*-promoters and hence, Pol II Ser2 phosphorylation which is required for transcription elongation. This suggests that through combined action with transcription factor and co-factor partners, Ikaros can exert control over both transcription initiation and elongation.

## Ikaros and mouse embryonic development

Previous analysis of *Ik<sup>null</sup>* mice highlighted the importance of Ikaros for the regulation of hematopoietic genes (7). In particular *Scl/Tal-1*, *Flk-2* receptor, and *c-kit* receptor gene expression is affected in *Ik<sup>null</sup>* bone marrow hematopoietic stem cells (HSC) (56). However, in *Ik<sup>null</sup>* fetal liver EryC, *Scl/Tal-1* expression levels are unchanged, whereas *Eklf* and *Gata-2* expression levels are, respectively, decreased and increased (18,34). Finally, in *Ik<sup>null</sup>* yolk sac EryC, we report that *Eklf*, *Gata-1*, *Fog-1*, and *Scl/Tal-1* expression levels are unchanged, whereas *Gata-2* is overexpressed. Therefore Ikaros, likely in association with specific chromatin regulators, can activate or repress a variety of hematopoietic-specific genes in a cell type- and developmental stage-specific manner.

Ikaros is essential for specification in lymphoid lineages, and inactivation of this protein exerts a profound effect on the production and differentiation of fetal lymphocyte

progenitors (37). However, recent studies have identified Ikaros as an important regulator of lympho-myeloid lineage decisions in early hematopoietic progenitor cells (7). Ikaros can also influence erythroid cell differentiation. For example, adult *Ik<sup>null</sup>* mice display extramedullary hematopoiesis, bone marrow hypoplasia, and slight reduction in the number of BFU-E (Burst-Forming Unit Erythroid) and CFU-E (Colony-Forming Unit Erythroid) progenitors; however reduced CFU-E and BFU-E activity is reported to be mainly due to a deficit in the HSC population rather than aberrant erythroid differentiation (56). Accordingly, erythropoiesis appears to be normal at earlier stages of development in fetal liver (18,37) and yolk sac (this work) isolated from *Ik<sup>null</sup>* mice where erythroid differentiation progresses to the point of producing *Gpa* transcripts, normal numbers of maturing proerythroblasts and typical levels of murine globin gene transcripts. Based on these findings, we conclude that reduced levels of *huy*-gene expression in *ln2-Ik<sup>null</sup>* cells is not the consequence of impaired erythroid differentiation or maturation, and hence that Ikaros is recruited to, and directly contributes to regulation of, the *huy*-genes in yolk sac EryC.

### **Ikaros, Brg1, and Gata-1 cooperate to control *huy*-gene expression in yolk sac EryC**

We have recently shown that Ikaros participates to *huy*-gene silencing at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching which takes place at approximately e12 in transgenic *ln2* fetal liver by targeting a Gata-1/Fog-1/Hdac1/Mi-2-containing multiprotein complex to *huy*-promoters (18). Here we have shown that Ikaros, along with Gata-1 and Brg1, rather contributes to *huy*-gene expression at an earlier developmental stage, *i.e.* in e10.5 yolk sac EryC. The observation that Ikaros can act as transcription activator and repressor for the same gene in a stage- and cell-specific manner is reminiscent of previous studies showing that Ikaros represses *Il4* expression in mast cells (57), but activates that gene in Th2 cells, and also appears to exert distinct effects on *Il4* and *Ifn $\gamma$*  gene expression in the same cell type (Th1 and Th2) (58). The ability of Ikaros to preferentially interact with Mi-2, Brg1 or other known Ikaros co-regulators, and hence, to direct them to distinct gene regulatory regions,

might depend on Ikaros post-translational modifications. Indeed, sumoylated Ikaros preferentially interacts with Brg1 vs. Mi-2 (13). Thus, increased sumoylation levels in yolk sac relative to fetal liver EryC could account for the tendency of Ikaros to interact with Brg1, and possibly act as transcription activator. This could not be directly addressed since sumoylation is a highly dynamic process and a suitable cellular model for human primitive EryC is currently unavailable. A second, non-mutually exclusive explanation for different levels of Ikaros interaction with Mi-2 vs. Brg1 is that expression of these co-regulators might fluctuate during development. In accordance with such hypothesis, we observed that Brg1 is expressed at higher levels in yolk sac than fetal liver EryC, whereas Mi-2 expression is higher in fetal liver EryC (Supplementary Fig. S3B). Brg1 is the principal catalytic subunit of a SWI/SNF-like complex in Ter119<sup>+</sup> EryC, and is essential for viability in mice (59). The use of hypomorphic (41) and conditional *Brg1*<sup>null</sup> mutations (42) have demonstrated that Brg1 is required for chromatin remodelling during both embryonic and adult  $\beta$ -globin gene transcription, and for maximal Pol II occupancy at the mouse  $\beta$ maj promoter (60). A number of transcription factors are known to bind and recruit Brg1 to the globin locus (40,61-63); nonetheless using a Gata-1-inducible cell line, Kim *et al.* (22) reported that Gata-1 recruits Brg1 to the adult  $\beta$ maj promoter more rapidly than other transcription factors tested.

The current results, together with previous published data (18), indicate that Gata-1 is a relevant Ikaros-interacting transcription factor and their combined effect is required for globin gene regulation in EryC. Indeed, Gata-1 and Ikaros are recruited *in vivo* to the hu $\beta$ -globin locus, influence long-range chromatin interactions, contribute to hu $\gamma$ -gene regulation and co-immunoprecipitate *in vivo* in primary yolk sac (herein) and fetal liver (18) EryC. Gata-1 has been associated to both hu $\gamma$ -gene activation and repression, depending on the experimental model. For instance, Gata-1 contributes to hu $\gamma$ -gene silencing at the time of  $\gamma$ -to- $\beta$  globin switching in mouse fetal liver (18) or in adult (32,33) EryC. By cooperating with BCL11a and SOX6, GATA-1 has recently been shown to contribute to hu $\gamma$ -gene silencing in adult human erythroid progenitors (19) and interestingly, Bcl11a is not expressed either in wild type (30) or *Ik*<sup>null</sup> primitive EryC (Supplementary Fig. S3C).



However, GATA-1 has also been associated with  $\text{h}\gamma$ -gene activation (64). Finally GATA-1 overexpression in K562 cells does not change  $\text{h}\gamma$ -gene expression (65).

Despite the fact that Ikaros does not affect Gata-1 occupancy at  $\beta$ LCR HS2, recruitment of Gata-2 and Pol II to this region is significantly increased and decreased, respectively, in  $\text{ln2-Ik}^{null}$  yolk sac EryC. It has recently been reported that Gata-1 occupancy at the well-defined -1.8 kb site of the *Gata-2* locus is associated with Pol II expulsion and stable gene repression (66). Therefore, it is possible that, similarly to Gata-1 at the -1.8 kb site of the *Gata-2* locus, increased Gata-2 occupancy at  $\beta$ LCR HS2 of the  $\text{hu}\beta$ -globin locus could partially display Pol II at this distal regulatory element.

In conclusion, even though we cannot exclude that Ikaros may also facilitate  $\text{h}\gamma$ -gene expression indirectly, *e.g.* by contributing to Gata-2 gene repression in yolk sac EryC, our data indicate that Ikaros directly contributes to  $\text{h}\gamma$ -gene expression mainly by conferring Gata-1 occupancy at  $\text{h}\gamma$ -promoters (see below) and, together with Brg1, by stabilizing  $\text{h}\gamma$ -promoter chromatin activation.

### **Ikaros promotes efficient $\text{h}\gamma$ -gene transcription elongation**

Here we show that lack of Ikaros affects TBP and Pol II recruitment to  $\text{h}\gamma$ -promoters, and reduces Pol II Ser2 phosphorylation levels. Ikaros can interact with components of the basal transcription machinery such as TBP and TFIIB (67), and with Brg1, which is critical for long-range chromatin interaction and, such as reported (60), Pol II transfer. Even though transcription elongation has been regarded as an important regulatory step for  $\beta$ -like globin gene regulation (23,68,69), the severe reduction of Pol II Ser2 phosphorylation levels observed at  $\text{h}\gamma$ -promoters in  $\text{ln2-Ik}^{null}$  yolk sac EryC was unanticipated in light of known properties of Ikaros. Our results indicate that Ikaros not only participates in PIC assembly but in addition contributes to Pol II Ser2 phosphorylation by recruiting the P-TEFb component Cdk9 to  $\text{h}\gamma$ -gene promoters.

Cdk9 expression levels increase in terminally differentiated cells (26). However in the human erythroleukemic K562 cell line, Cdk9 knockdown induces erythroid differentiation (55), whereas erythroid differentiation of MEL cells does not lead to Cdk9<sub>42</sub> downregulation and in fact, engenders upregulation of Cdk9<sub>55</sub> (28). The reason for these discrepancies is not known, but it might depend on the intrinsic limitations of studying erythroid differentiation using transformed cell lines. Here we show that levels of Cdk9 expression are very similar in In2 and In2-*Ik<sup>mut</sup>* yolk sac EryC and also in yolk sac EryC when compared to fetal liver EryC (Supplementary Fig. S3D). We studied Ikaros-Cdk9 protein interaction in cells expressing predominantly Cdk9<sub>42</sub> (yolk sac EryC and COS-7 cells) or both isoforms (Jurkat cells) and based on our results we conclude that Ikaros preferentially interacts with Cdk9<sub>42</sub>.

Lack of Ikaros leads to increased and reduced Cdk9 recruitment to HS3 and huy-promoters respectively, and correlates with reduced long-range chromatin interactions between the  $\beta$ LCR and the huy-promoters. It is therefore possible that, as proposed for Pol II (70), Cdk9 first accumulates at the  $\beta$ LCR and then, is transferred to the huy-promoters when the two regulatory regions are in closer proximity. It is widely accepted that developmental control of gene expression can be associated with poised Pol II and the distribution of Pol II across *Drosophila* and human genomes have provided evidence that elongation control might direct the pattern of gene expression during development (71). In mammalian cells, the P-TEFb complex accounts for most of Pol II Ser2 phosphorylation activity (26) and therefore is the best-known activity capable of reactivating poised Pol II (27). Thus, Ikaros-dependent Cdk9 transfer to huy-promoters might be important for the transition from poised Pol II to productive elongation at the huy-genes.

Recruitment of P-TEFb to highly acetylated gene promoters can be mediated by the bromodomain protein Brd4, which interacts directly with CycT1 (27). However, certain transcription factors, *e.g.*, c-Myc, CIITA, NF- $\kappa$ B, MyoD, STAT3, and the androgen receptor have been shown to recruit P-TEFb to defined promoter regions by interacting with either CycT1 or Cdk9 ((26,72) and references herein) and recently Ldb1 has been

shown to recruit P-TEFb to multiple regions of the mouse  $\beta$ -globin locus (54). Interestingly, GATA-1 is reported to interact with CYCT1 in a megakaryocyte-like cell line whereas GATA-1 interaction with CDK9 in the same cells was not addressed (55). Gata-1 and Cdk9 do co-immunoprecipitate in MEL cells but not in COS-7 cells expressing Gata-1 or Gata-1 together with Ikaros, under the same stringency conditions that allow co-IP of Ikaros and Cdk9. However, co-IP experiments performed in COS-7 cells expressing Ikaros and Gata-1 suggest that the interaction between Ikaros and Cdk9 is enhanced by Gata-1. Thus, it appears that Ikaros can interact with Cdk9 in several cell lines, whereas Gata-1 interaction with Cdk9 would rather necessitate an erythroid environment. Interestingly, even in absence of a detectable interaction between Gata-1 and Cdk9 in COS-7 cells, the presence of Gata-1 can enhance the strength of the interaction between Ikaros and Cdk9. Whether the erythroid-specific association of Ikaros, Gata-1 and Cdk9 depends upon their relative level of expression or post-translational modifications or the presence of additional erythroid-specific proteins is thus far unknown. Nevertheless, it is tempting to assume that *in vivo* cooperation between Ikaros and Gata-1 is designed to facilitate Pol II Ser2 phosphorylation, possibly by targeting two distinct components of the P-TEFb complex to *hu $\gamma$* -gene promoters.

Based on our results we propose that the recruitment of Ikaros to *hu $\gamma$* -promoters in yolk sac EryC, promotes stable PIC formation and contributes to Cdk9 recruitment, which leads to efficient transcription elongation of the *hu $\gamma$* -genes. Therefore, unlike Ldb1-dependent recruitment of P-TEFb that occurs at multiple regions of the mouse  $\beta$ -globin locus (54), our results suggest that Ikaros contributes to Cdk9/P-TEFb recruitment specifically to promoters of the transcriptionally active *hu $\gamma$* -genes. According to the observation that Ikaros and Cdk9 co-immunoprecipitate also in lymphoid-like cells (Fig. 7B), it is likely that Ikaros influences transcription elongation in a similar manner at other transcriptionally active Ikaros target genes and in other hematopoietic cells.

In conclusion, we show that Ikaros contributes to efficient transcription initiation and elongation of the *hu $\gamma$* -genes in primitive EryC. As such, this study contributes to a better

understanding of the molecular mechanisms of Ikaros action to control gene expression in hematopoietic cells. Therefore, results presented in here should provide a basis for understanding malignant hematopoietic processes characterized by Ikaros- or GATA-1-dependent gene dysregulation.

## **Materials and methods**

### **Transgenic mouse lines**

All mutant embryos were compared with wild type littermates, to reduce difference in genetic background or developmental stage. Embryos were genotyped by PCR as described in (37). Homozygous *ln2* ( $ln2^{+/+}$ ) (31): heterozygous Ikaros ( $Ik^{null+/-}$ ) (37) mice were bred with  $ln2^{-/-};Ik^{null+/-}$  females in order to avoid contamination of embryos with adult blood of the mother, and  $ln2^{+/-};Ik^{Wt}$  (*ln2*) or  $ln2^{+/-};Ik^{null/-}$  (*ln2-Ik<sup>null</sup>*) e10.5 yolk sacs were isolated. Animals were sacrificed by cervical dislocation. Yolk sacs were rinsed several times with phosphate-buffered saline (PBS) to remove maternal blood. Blood was collected by piercing and compressing the yolk sac with forceps. Animal experiments were conducted in accordance with the Canadian Council on Animal Care (CCAC) guidelines and approved by the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal care committee.

### **Wright-Giemsa staining**

This protocol was carried out as previously described (18).

### **Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and quantitative real-time PCR (qPCR) analyses**

ChIP procedure and quantification were as previously described (18) starting with  $5 \times 10^5$  e10.5 yolk sac EryC. Cells were fixed with 1% formaldehyde for 10 min at 37°C. Chromatin was reduced in size by sonication in order to obtain fragments of 400-500 bp. About 1/30<sup>th</sup> of immunoprecipitated and unbound (input) material was used as template for

qPCR with SYBR Green (Invitrogen) on an iCycler iQ<sup>TM</sup> (Bio-Rad) system; the kidney-specific Tamm-Horsfall gene promoter (*Thp*) was used as internal control. All data shown are the results of at least four independent ChIP experiments with qPCR reactions from each ChIP performed in triplicate; the data are plotted as the mean  $\pm$  standard deviation (s.d.) of the measurements.

### **Protein analysis**

Western blot (WB) and co-immunoprecipitation (co-IP) analyses were basically as previously described (18) using  $5 \times 10^6$  e10.5 yolk sac EryC,  $1 \times 10^6$  COS-7 cells or  $10 \times 10^6$  Jurkat cells. Cells were lysed in 1 ml/ $10^7$  cells of ice-cold lysis buffer (20mM Hepes pH8.0, 25% glycerol, 0.2 mM EDTA, 150mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40) containing protease inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail; Sigma). Where detailed, co-IP washing buffers contained higher salt (200 mM) or NP-40 (1%) concentration. Ikaros proteins were not detected by WB in yolk sac EryC co-IP input samples, which represents 2% volume of the total lysate, *i.e.* approximately  $10^5$  yolk sac EryC. Therefore, more concentrated yolk sac protein lysates, *i.e.*  $2.5 \times 10^6$  yolk sac EryC per lane, were loaded onto SDS-PAGE in order to identify Ikaros-specific proteins.

### **Cell transfection**

Cells were transfected with murine Ikaros 2 cDNA, which is, together with Ikaros-1, the most abundantly expressed isoform in hematopoietic cells (4) and/or murine Gata-1. Stable Jurkat cell clones were obtained by retroviral transduction of wild type Jurkat cells with the pOZN-FH-Ik expression vector (18), which allows expression of Ikaros in double N-terminally epitope-tagged (Flag and Hemoagglutinin -FH-) fusion protein. Plasmid characteristic, cell transfection and selection were carried out as described in Nakatani *et al.* (38). COS-7 cells were transiently transfected with Flag/HA Ikaros (pCMV-FH-Ik) or with Gata-1 (pCMV-Gata) CMV-based expression vector using the FuGene system (FuGene 6, Roche), according to the manufacturer's instructions. Cells were harvested 36 hr post-transfection.

## **Immunofluorescence (IF)**

For IF studies, transiently transfected COS-7 cells were seeded on glass slide 24 hr post-transfection and allowed to adhere for additional 12 hr. Cells were then fixed in 4% formaldehyde for 30 min at RT, washed once in PBS and subjected to heat-mediated antigen retrieval treatment. Slides were heated three times to 90°C for 2 min in the retrieval solution (10 mM Citric acid pH 6.0, 0.05% Tween-20) and then allowed to cool down for 20 min at RT. Next, slides were treated with PBS/0.5% Triton for 20 min at RT, washed twice in PBS, and blocked in PBS/0.5% NFDM. Primary (listed in Supplementary Fig. S1) as well as secondary antibodies (all from Jackson ImmunoResearch) were diluted in PBS containing 0.1% Bovine Serum Albumin and 0.01% Triton. The use of cross-absorbed and affinity-purified secondary antibodies minimized background and non-specific reactivity to undetectable fluorescent levels (data not shown). Slides were dehydrated by treatment with 70%, 90% and 100% ethanol and covered with Dapi-Dabco:Vectashield solution (1:1) in glycerol. Images were acquired with a LSM 510 META Zeiss confocal microscope with z-resolution of 200  $\mu$ M equipped with Zeiss LSM Image Browser. Red-green-blue (RGB) profiles were generated by the WCIF ImageJ(®) program (NIH).

## **Quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR)**

Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen) and treated with DNaseI-RNase free (Invitrogen). Reverse transcription reactions were performed with oligo(dT)<sub>15</sub> or random primers and SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen). qPCR was carried out on an iCycler iQ<sup>TM</sup> (Bio-Rad) system using specific primer sets; quantification was carried out as previously reported (18). Data shown are the results of at least five independent experiments with qPCR reactions from each cDNA performed in triplicate; the data are expressed as the mean  $\pm$  s.d. of the measurements.

## **Chromosome conformation capture (3C)**

The 3C protocol was basically as previously described (18) using  $1-2 \times 10^6$  e10.5 yolk sac EryC; data shown are the results of five independent experiments with qPCR reactions from each 3C reaction performed in triplicate; the data are plotted as the mean  $\pm$  s.d. of the measurements.

### **Statistical analysis**

Unpaired 'Student's t test' was used to determine the level of statistical significance (p-value).

### **Primer sequences and antibodies**

Primer sequences and antibodies are published as Supplementary Fig. S1.

### **Acknowledgments and funding**

We thank A. Dean and E. Drobetsky for critical reading of the manuscript, K. Georgopoulos for the Ikaros *null* mouse line, F. Grosveld for In2 mouse line, and G. D'Angelo for Wright-Giemsa staining analysis.

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) [MOP 97738] held by E.M.; J.R. and E.M. are supported by Fond de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

### **References**

1. Keys, J.R., Tallack, M.R., Zhan, Y., Papathanasiou, P., Goodnow, C.C., Gaensler, K.M., Crossley, M., Dekker, J. and Perkins, A.C. (2008) A mechanism for Ikaros regulation of human globin gene switching. *Br J Haematol*, **141**, 398-406.
2. Ng, S.Y., Yoshida, T. and Georgopoulos, K. (2007) Ikaros and chromatin regulation in early hematopoiesis. *Curr Opin Immunol*, **19**, 116-122.

3. Harker, N., Naito, T., Cortes, M., Hostert, A., Hirschberg, S., Tolaini, M., Roderick, K., Georgopoulos, K. and Kioussis, D. (2002) The CD8alpha gene locus is regulated by the Ikaros family of proteins. *Mol Cell*, **10**, 1403-1415.
4. Molnar, A. and Georgopoulos, K. (1994) The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol*, **14**, 8292-8303.
5. Sun, L., Liu, A. and Georgopoulos, K. (1996) Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *Embo J*, **15**, 5358-5369.
6. Koipally, J., Heller, E.J., Seavitt, J.R. and Georgopoulos, K. (2002) Unconventional potentiation of gene expression by Ikaros. *J Biol Chem*, **277**, 13007-13015.
7. Yoshida, T., Ng, S.Y. and Georgopoulos, K. Awakening lineage potential by Ikaros-mediated transcriptional priming. *Curr Opin Immunol*, **22**, 154-160.
8. Koipally, J., Renold, A., Kim, J. and Georgopoulos, K. (1999) Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *Embo J*, **18**, 3090-3100.
9. Sabbattini, P., Lundgren, M., Georgiou, A., Chow, C., Warnes, G. and Dillon, N. (2001) Binding of Ikaros to the lambda5 promoter silences transcription through a mechanism that does not require heterochromatin formation. *Embo J*, **20**, 2812-2822.
10. Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T. *et al.* (1999) Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity*, **10**, 345-355.
11. Sridharan, R. and Smale, S.T. (2007) Predominant interaction of both Ikaros and Helios with the NuRD complex in immature thymocytes. *J Biol Chem*, **282**, 30227-30238.
12. Naito, T., Gomez-Del Arco, P., Williams, C.J. and Georgopoulos, K. (2007) Antagonistic interactions between Ikaros and the chromatin remodeler Mi-2beta determine silencer activity and Cd4 gene expression. *Immunity*, **27**, 723-734.



13. Gomez-del Arco, P., Koipally, J. and Georgopoulos, K. (2005) Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol*, **25**, 2688-2697.
14. O'Neill, D.W., Schoetz, S.S., Lopez, R.A., Castle, M., Rabinowitz, L., Shor, E., Krawchuk, D., Goll, M.G., Renz, M., Seelig, H.P. *et al.* (2000) An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol Cell Biol*, **20**, 7572-7582.
15. Kiefer, C.M., Hou, C., Little, J.A. and Dean, A. (2008) Epigenetics of beta-globin gene regulation. *Mutat Res*, **647**, 68-76.
16. de Laat, W. and Grosveld, F. (2003) Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub. *Chromosome Res*, **11**, 447-459.
17. Drissen, R., Palstra, R.J., Gillemans, N., Splinter, E., Grosveld, F., Philipsen, S. and de Laat, W. (2004) The active spatial organization of the beta-globin locus requires the transcription factor EKLF. *Genes Dev*, **18**, 2485-2490.
18. Bottardi, S., Ross, J., Bourgoin, V., Fotouhi-Ardakani, N., Affar el, B., Trudel, M. and Milot, E. (2009) Ikaros and GATA-1 combinatorial effect is required for silencing of human gamma-globin genes. *Mol Cell Biol*, **29**, 1526-1537.
19. Xu, J., Sankaran, V.G., Ni, M., Menne, T.F., Puram, R.V., Kim, W. and Orkin, S.H. Transcriptional silencing of {gamma}-globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes Dev*, **24**, 783-798.
20. Vakoc, C.R., Letting, D.L., Gheldof, N., Sawado, T., Bender, M.A., Groudine, M., Weiss, M.J., Dekker, J. and Blobel, G.A. (2005) Proximity among distant regulatory elements at the beta-globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol Cell*, **17**, 453-462.
21. Song, S.H., Hou, C. and Dean, A. (2007) A positive role for NLI/Ldb1 in long-range beta-globin locus control region function. *Mol Cell*, **28**, 810-822.

22. Kim, S.I., Bultman, S.J., Kiefer, C.M., Dean, A. and Bresnick, E.H. (2009) BRG1 requirement for long-range interaction of a locus control region with a downstream promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 2259-2264.
23. Sawado, T., Halow, J., Bender, M.A. and Groudine, M. (2003) The beta -globin locus control region (LCR) functions primarily by enhancing the transition from transcription initiation to elongation. *Genes Dev*, **17**, 1009-1018.
24. Gribnau, J., de Boer, E., Trimborn, T., Wijgerde, M., Milot, E., Grosveld, F. and Fraser, P. (1998) Chromatin interaction mechanism of transcriptional control in vivo. *EMBO J*, **17**, 6020-6027.
25. Johnson, K.D., Grass, J.A., Park, C., Im, H., Choi, K. and Bresnick, E.H. (2003) Highly restricted localization of RNA polymerase II within a locus control region of a tissue-specific chromatin domain. *Mol Cell Biol*, **23**, 6484-6493.
26. Romano, G. and Giordano, A. (2008) Role of the cyclin-dependent kinase 9-related pathway in mammalian gene expression and human diseases. *Cell Cycle*, **7**, 3664-3668.
27. Saunders, A., Core, L.J. and Lis, J.T. (2006) Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 557-567.
28. Meier, N., Krpic, S., Rodriguez, P., Strouboulis, J., Monti, M., Krijgsveld, J., Gering, M., Patient, R., Hostert, A. and Grosveld, F. (2006) Novel binding partners of Ldb1 are required for haematopoietic development. *Development*, **133**, 4913-4923.
29. Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C. and Keller, G. (1999) Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, **126**, 5073-5084.
30. Sankaran, V.G., Xu, J., Ragozy, T., Ippolito, G.C., Walkley, C.R., Maika, S.D., Fujiwara, Y., Ito, M., Groudine, M., Bender, M.A. *et al.* (2009) Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature*, **460**, 1093-1097.

31. Strouboulis, J., Dillon, N. and Grosveld, F. (1992) Developmental regulation of a complete 70-kb human beta-globin locus in transgenic mice. *Genes Dev*, **6**, 1857-1864.
32. Harju-Baker, S., Costa, F.C., Fedosyuk, H., Neades, R. and Peterson, K.R. (2008) Silencing of Agamma-globin gene expression during adult definitive erythropoiesis mediated by GATA-1-FOG-1-Mi2 complex binding at the -566 GATA site. *Mol Cell Biol*, **28**, 3101-3113.
33. Liu, L.R., Du, Z.W., Zhao, H.L., Liu, X.L., Huang, X.D., Shen, J., Ju, L.M., Fang, F.D. and Zhang, J.W. (2005) T to C substitution at -175 or -173 of the gamma-globin promoter affects GATA-1 and Oct-1 binding in vitro differently but can independently reproduce the hereditary persistence of fetal hemoglobin phenotype in transgenic mice. *J Biol Chem*, **280**, 7452-7459.
34. Lopez, R.A., Schoetz, S., DeAngelis, K., O'Neill, D. and Bank, A. (2002) Multiple hematopoietic defects and delayed globin switching in Ikaros null mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 602-607.
35. Tanabe, O., Katsuoka, F., Campbell, A.D., Song, W., Yamamoto, M., Tanimoto, K. and Engel, J.D. (2002) An embryonic/fetal beta-type globin gene repressor contains a nuclear receptor TR2/TR4 heterodimer. *EMBO J*, **21**, 3434-3442.
36. Sankaran, V.G., Menne, T.F., Xu, J., Akie, T.E., Lettre, G., Van Handel, B., Mikkola, H.K., Hirschhorn, J.N., Cantor, A.B. and Orkin, S.H. (2008) Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*, **322**, 1839-1842.
37. Wang, J.H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A.H., Bigby, M. and Georgopoulos, K. (1996) Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity*, **5**, 537-549.
38. Nakatani, Y. and Ogryzko, V. (2003) Immunoaffinity purification of mammalian protein complexes. *Methods Enzymol*, **370**, 430-444.

39. Ferreira, R., Ohneda, K., Yamamoto, M. and Philipsen, S. (2005) GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol*, **25**, 1215-1227.
40. O'Neill, D., Yang, J., Erdjument-Bromage, H., Bornschlegel, K., Tempst, P. and Bank, A. (1999) Tissue-specific and developmental stage-specific DNA binding by a mammalian SWI/SNF complex associated with human fetal-to-adult globin gene switching. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 349-354.
41. Bultman, S.J., Gebuhr, T.C. and Magnuson, T. (2005) A Brg1 mutation that uncouples ATPase activity from chromatin remodeling reveals an essential role for SWI/SNF-related complexes in {beta}-globin expression and erythroid development. *Genes Dev*.
42. Griffin, C.T., Brennan, J. and Magnuson, T. (2008) The chromatin-remodeling enzyme BRG1 plays an essential role in primitive erythropoiesis and vascular development. *Development*, **135**, 493-500.
43. Palstra, R.J., Tolhuis, B., Splinter, E., Nijmeijer, R., Grosveld, F. and de Laat, W. (2003) The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat Genet*, **35**, 190-194.
44. Miccio, A., Wang, Y., Hong, W., Gregory, G.D., Wang, H., Yu, X., Choi, J.K., Shelat, S., Tong, W., Poncz, M. *et al.* NuRD mediates activating and repressive functions of GATA-1 and FOG-1 during blood development. *EMBO J*, **29**, 442-456.
45. Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Kolodziej, K.E., Guyot, B., Heck, A.J., Vyas, P., de Boer, E., Grosveld, F. and Strouboulis, J. (2005) GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *Embo J*, **24**, 2354-2366.
46. Hegde, M.L., Hazra, T.K. and Mitra, S. (2008) Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res*, **18**, 27-47.

47. Fujiwara, T., O'Geen, H., Keles, S., Blahnik, K., Linnemann, A.K., Kang, Y.A., Choi, K., Farnham, P.J. and Bresnick, E.H. (2009) Discovering hematopoietic mechanisms through genome-wide analysis of GATA factor chromatin occupancy. *Mol Cell*, **36**, 667-681.
48. Ko, L.J. and Engel, J.D. (1993) DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol*, **13**, 4011-4022.
49. Merika, M. and Orkin, S.H. (1993) DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol*, **13**, 3999-4010.
50. Fujiwara, Y., Chang, A.N., Williams, A.M. and Orkin, S.H. (2004) Functional overlap of GATA-1 and GATA-2 in primitive hematopoietic development. *Blood*, **103**, 583-585.
51. Johnson, K.D., Kim, S.I. and Bresnick, E.H. (2006) Differential sensitivities of transcription factor target genes underlie cell type-specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15939-15944.
52. Tevosian, S.G., Deconinck, A.E., Cantor, A.B., Rieff, H.I., Fujiwara, Y., Corfas, G. and Orkin, S.H. (1999) FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 950-955.
53. Lahlil, R., Lecuyer, E., Herblot, S. and Hoang, T. (2004) SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A expression. *Mol Cell Biol*, **24**, 1439-1452.
54. Song, S.H., Kim, A., Ragozy, T., Bender, M.A., Groudine, M. and Dean, A. Multiple functions of Ldb1 required for  $\beta$ -globin activation during erythroid differentiation. *Blood*.

55. Elagib, K.E., Mihaylov, I.S., Delehanty, L.L., Bullock, G.C., Ouma, K.D., Caronia, J.F., Gonias, S.L. and Goldfarb, A.N. (2008) Cross-talk of GATA-1 and P-TEFb in megakaryocyte differentiation. *Blood*, **112**, 4884-4894.
56. Nichogiannopoulou, A., Trevisan, M., Neben, S., Friedrich, C. and Georgopoulos, K. (1999) Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J Exp Med*, **190**, 1201-1214.
57. Gregory, G.D., Raju, S.S., Winandy, S. and Brown, M.A. (2006) Mast cell IL-4 expression is regulated by Ikaros and influences encephalitogenic Th1 responses in EAE. *J Clin Invest*, **116**, 1327-1336.
58. Quirion, M.R., Gregory, G.D., Umetsu, S.E., Winandy, S. and Brown, M.A. (2009) Cutting edge: Ikaros is a regulator of Th2 cell differentiation. *J Immunol*, **182**, 741-745.
59. Bultman, S., Gebuhr, T., Yee, D., La Mantia, C., Nicholson, J., Gilliam, A., Randazzo, F., Metzger, D., Chambon, P., Crabtree, G. *et al.* (2000) A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell*, **6**, 1287-1295.
60. Kim, S.I., Bultman, S.J., Jing, H., Blobel, G.A. and Bresnick, E.H. (2007) Dissecting molecular steps in chromatin domain activation during hematopoietic differentiation. *Mol Cell Biol*, **27**, 4551-4565.
61. Armstrong, J.A., Bieker, J.J. and Emerson, B.M. (1998) A SWI/SNF-related chromatin remodeling complex, E-RC1, is required for tissue-specific transcriptional regulation by EKLF in vitro. *Cell*, **95**, 93-104.
62. Brand, M., Ranish, J.A., Kummer, N.T., Hamilton, J., Igarashi, K., Francastel, C., Chi, T.H., Crabtree, G.R., Aebersold, R. and Groudine, M. (2004) Dynamic changes in transcription factor complexes during erythroid differentiation revealed by quantitative proteomics. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 73-80.

63. Kadam, S. and Emerson, B.M. (2003) Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes. *Mol Cell*, **11**, 377-389.
64. Yao, X., Kodeboyina, S., Liu, L., Dzandu, J., Sangerman, J., Ofori-Acquah, S.F. and Pace, B.S. (2009) Role of STAT3 and GATA-1 interactions in gamma-globin gene expression. *Exp Hematol*, **37**, 889-900.
65. Ikonomi, P., Noguchi, C.T., Miller, W., Kassahun, H., Hardison, R. and Schechter, A.N. (2000) Levels of GATA-1/GATA-2 transcription factors modulate expression of embryonic and fetal hemoglobins. *Gene*, **261**, 277-287.
66. Snow, J.W., Trowbridge, J.J., Fujiwara, T., Emambokus, N.E., Grass, J.A., Orkin, S.H. and Bresnick, E.H. A single cis element maintains repression of the key developmental regulator Gata2. *PLoS Genet*, **6**.
67. Koipally, J. and Georgopoulos, K. (2002) Ikaros-CtIP interactions do not require C-terminal binding protein and participate in a deacetylase-independent mode of repression. *J Biol Chem*, **277**, 23143-23149.
68. Bottardi, S., Ross, J., Pierre-Charles, N., Blank, V. and Milot, E. (2006) Lineage-specific activators affect beta-globin locus chromatin in multipotent hematopoietic progenitors. *Embo J*, **25**, 3586-3595.
69. Zhou, Z., Li, X., Deng, C., Ney, P.A., Huang, S. and Bungert, J. USF and NF-E2 cooperate to regulate the recruitment and activity of RNA polymerase II in the beta-globin gene locus. *J Biol Chem*, **285**, 15894-15905.
70. Johnson, K.D., Grass, J.A., Boyer, M.E., Kiekhäfer, C.M., Blobel, G.A., Weiss, M.J. and Bresnick, E.H. (2002) Cooperative activities of hematopoietic regulators recruit RNA polymerase II to a tissue-specific chromatin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11760-11765.

71. Price, D.H. (2008) Poised polymerases: on your mark...get set...go! *Mol Cell*, **30**, 7-10.
72. Garriga, J. and Grana, X. (2004) Cellular control of gene expression by T-type cyclin/CDK9 complexes. *Gene*, **337**, 15-23.
73. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.

## Supplementary data

### Supplementary Figure S1: Primer set sequences

#### For ChIP assays

##### *Mouse CD4 enhancer 1 region*

M-CD4-1 F: GGCCTAGATTTCCCTTCTGAG

M-CD4-1 R: TACTTTCTGTGACTTACAAAGGC

##### *Mouse GPA promoter*

M-GPA pr F: GTCCTCGCAGTTATGCAGACC

M-GPA pr R: AGCCAATGTGTGTCAACGGA

##### *Mouse THP promoter*

M-THP pr F: GGTGGATGGTGTGGTCACAAC

M-THP pr R: GGTCTTGACACACCAGCTTT

##### *Mouse HS2*

M-HS2 F: CCTTGCCTGTTCCCTGCTCA

M-HS2 R: CACATGTGACCTGTCTGCCAG

##### *Mouse $\beta$ major promoter*

M-beta maj pr F: CAGTGAGTGGCACAGCATCC

M-beta maj pr R: CAGTCAGGTGCACCATGATGT

##### *Human HS3*

H-HS3 F: ACCAGCTATCAGGGCCCAGA



H-HS3 R:AATGCTGCTATGCTGTGCCTC

*Human HS2*

H-HS2 F: CCTCCCATAGTCCAAGCATGA

H-HS2 R: GTGCTTGAGCCAGAAGGTTTG

*Human  $\epsilon$  promoter*

H-epsilon pr F: TTTGGAAGATGATGAAGAGGG

H-epsilon pr R: GCTGTGTCGGAAGCAGATATG

*Human  $\gamma$  promoter*

H-gamma pr F: GCCTTGACCAATAGCCTTGACA

H-gamma pr R: GAAATGACCCATGGCGTCTG

*Human  $\gamma$  gene*

H-gamma gene F: CCTTGGGAGATGCCATAAAGC

H-gamma gene R: TCAAACAGCTCACACCCTGC

*Human  $\beta$  promoter*

H-beta pr F: GGCTGTCATCACTTAGACCTC

H-beta pr R: GGTTGCTAGTGAACACAGTTG

*Human  $\delta$  promoter*

H-delta pr F: GGGCAAGTTAAGGGAAGAGTGG

H-delta pr R: GTGTCTGTTTGAGGTTGCTAGTGA

*Mouse Gata-2 -2.8 region: Gras , JA et al. (2003) PNAS 100; 8811-8816.*

**For RTqPCR assays***Mouse Ikaros cDNA*

M-Ik RT F: AACCTGAAAGACAATGGATGTCGATGAGG

M-Ik RT R: AGTGGGGCCTGGCTGGGTTTAGC

*Mouse Actin cDNA*

M-Actin RT F: ATCGTGGGCCCGCCCTAGGCACCA

M-Actin RT R: TCCATGTCGTCCCAGTTGGTAACAA

*Mouse Gpa cDNA*

M-GPA RT F: GCCGAATGACAAAGAAAAGTTCA

M-GPA RT R: TCAATAGAACTCAAAGGCACACTGT

*Mouse Gata-1 cDNA*

M-GATA-1 RT F: GCCCCTTGTGAGGCCAGAGAG

M-GATA-1 RT R: CGCTCCAGCCAGATTCGACCC

*Mouse Scl/Tal-1 cDNA*

M-Scl RT F: TCCCCATATGAGATGGAGATTT

M-Scl RT R: ATTGATGTACTTCATGGCAAGG

*Mouse Mi-2 cDNA*

M-Mi-2 RT F: CAAGCGGAAGCCACGCCTGA

M-Mi-2 RT R: GCGAGAACCACGGCCGAACA

*Mouse Brg1 cDNA*

M-BRG1 RT F: CAAGCGGAAGCCCCTGA

M-BRG1 RT R: GCGAGAACCACGGCCGAACA

*Mouse Gata-2 cDNA*

M-GATA-2 RT F: GCCAGAAGAGCGGGCACCTG

M-GATA-2 RT R: AGAGGCCACAGGCGTTGCAC

*Mouse Fog-1 cDNA*

M-FOG-1 RT F: AGCAGCCTGTCCACTTTCAT

M-FOG-1 RT R: AAGTGTC AAGGGTCCTGGTG

*Mouse EklF cDNA*

M-EKLF RT F: ACCACCCTGGGACAGTTTCT

M-EKLF RT R: GAAGGGTCCTCCGATTTTCAG

*Mouse  $\zeta$ -globin cDNA*

M-zeta RT F: GCGAGCTGCATGCCTACAT

M-zeta RT R: GCCATTGTGACCAGCAGACA

*Mouse  $\epsilon\gamma$  cDNA*

M- $\epsilon\gamma$  RT F: CAAGCTACATGTGGATCCTGAGAA

M- $\epsilon\gamma$  RT R: TGCCGAAGTGACTAGCCAAA

*Mouse  $\beta h1$  cDNA*

M- $\beta h1$  RT F: AGGCAGCTATCACAAGCATCTG

M- $\beta H1$  RT R: AACTTGTCAAAGAATCTCTGAGTCCAT

*Mouse  $\beta maj/min$  cDNA*

M- $\beta maj$  RT F: GGTGGTCTACCCTTGGACCC

M- $\beta maj$  RT R: GATACTTGTGGGCCAGGGCA

*Human  $\epsilon$  cDNA*

Hu- $\epsilon$  RT-F: AGGAGAAGGCTGCCGTCCT

Hu- $\epsilon$  RT-R: AGGGAGACGACAGGTTTCCA

*Human  $\gamma$  cDNA*

Hu- $\gamma$  RT-F: CATTTCACAGAGGAGGACAA

Hu- $\gamma$  RT-R: GTAGACAACCAGGAGCCTT

Qiagen QuantiTect probes (FAM-labelled): GTGGAAGATGCTGGAGG

*Human  $\beta$  cDNA*

Hu $\beta$ RT-F: CTCGGTGCCTTTAGTGATGG

Hu $\beta$ RT-R: ACACAGACCAGCACGTTG

IDT PrimeTime<sup>TM</sup> probe (FAM-labelled): CTTGAGGTTGTCCAGGTGAGCCA

*Human  $\gamma$  primary start*

Hu- $\gamma$  start F: CCTAGTCCAGACGCCATGGGTC

Hu- $\gamma$  start R: TCACCAGAGCCTACCTTCCCAGGG

*Human  $\gamma$  primary end*

Hu- $\gamma$  end F: TCTGGGTGGAAGCTTGGTG

Hu- $\gamma$  end R: ACCAGCACATTTCCCAGGAG

*Mouse primary gapdh*

Mo-gapdh F: GAAGGTTGGTGTGAACGGATT

Mo-gapdh R: GAATTTGCCATGGGTGGAGT

**For 3C assay**

*LCR- $\varepsilon$*

3C-LCR: ATAGCTTGTCTATTTCTCTCTCTAACATAGTTG

3C-hu $\varepsilon$ : AGAAACATAGGAAGAACCAAGAGCTT

*LCR-i $\varepsilon$ /G $\gamma$*

3C-LCR: ATAGCTTGTCTATTTCTCTCTCTAACATAGTTG

3C-i $\varepsilon$ /G $\gamma$ : GGCAGATAACTGGTTGGTGAATT

*LCR-A $\gamma$*

3C-LCR: ATAGCTTGTCTATTTCTCTCTCTAACATAGTTG

3C-A $\gamma$ : TTCTCTGAAAGTGATCCATGATCTCT

*LCR- $\beta$*

3C-LCR: ATAGCTTGTCTATTTCTCTCTCTAACATAGTTG

3C- $\beta$ : CATGTCCCATCCAGGTGATG

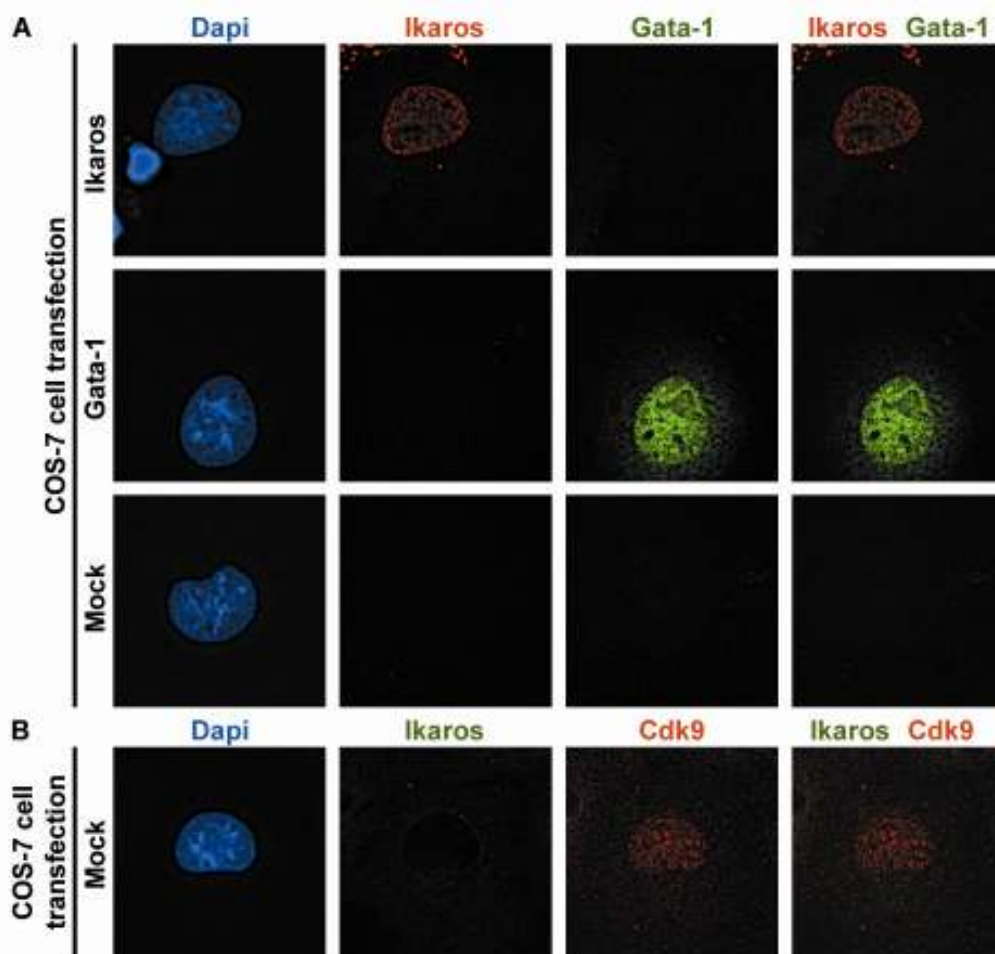
<b>Antibody</b>	<b>Application</b>	<b>Provider</b>	<b>Cat #</b>
GATA-1	ChIP, WB, IP, IF	SantaCruz Biotechnology	N6
GATA-1	WB, IP	SantaCruz Biotechnology	M20
BRG1	ChIP, WB, IP	SantaCruz Biotechnology	H88
Ikaros	ChIP, WB	SantaCruz Biotechnology	E20
Ikaros	ChIP, WB	Abcam	ab26083
FOG-1	ChIP	SantaCruz Biotechnology	M20
Mi-2	ChIP, WB, IP	SantaCruz Biotechnology	H242
P45/NF-E2	ChIP	SantaCruz Biotechnology	C19
TBP	ChIP	SantaCruz Biotechnology	S11
Pol II	ChIP	SantaCruz Biotechnology	N20
GATA-2	ChIP	SantaCruz Biotechnology	CG296
Cdk9	ChIP, WB, IP, IF	SantaCruz Biotechnology	C20
Ser2 phosphorylated Pol II (PCTD)	ChIP	Covance	H5
Anti-FLAG-conjugated agarose beads	IP	Sigma	A2220
Anti-hemagglutinin (anti- HA)	WB, IF	SantaCruz Biotechnology	Y11, F7
Actin	WB	Labvision corporation	ACTN05
Mouse anti-HA	IF	SantaCruz Biotechnology	F7
Mouse anti-Apel	IF	R&D Systems	MAB10 44

ChIP: Chromatin Immunoprecipitation

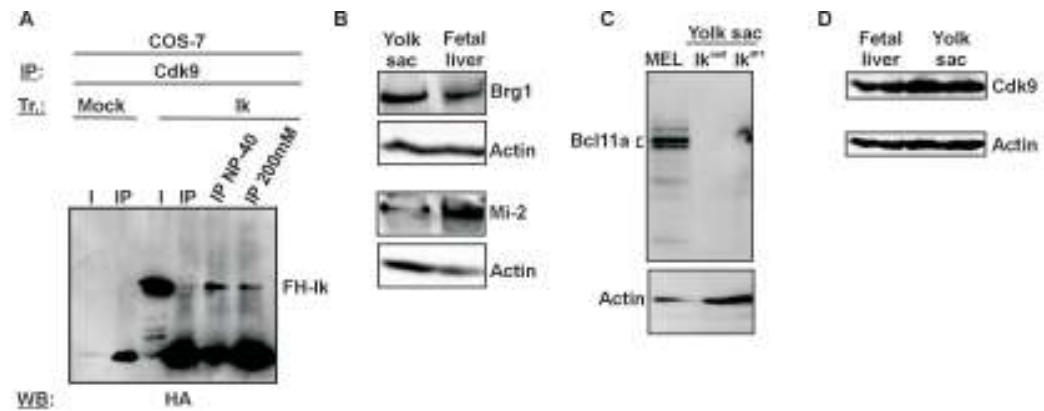
WB: Western Blot

IP: Protein immunoprecipitation

IF: Immunofluorescence



**Supplementary Fig. S2. Deconvolution immunofluorescence of COS-7 transfected cells: A)** COS-7 cells expressing Flag/HA-Ikaros (Ikaros) or Gata-1 or empty vector (Mock) were stained with mouse antibodies to the HA tag and with rat antibodies to Gata-1; the secondary staining was carried out with TR-conjugated anti-mouse as well as FITC-conjugated anti-rat antibodies; single COS-7 cells are shown where Ikaros is detected as red signals and Gata-1 as green signals; **B)** COS-7 cells transfected with empty vector (Mock) were stained with mouse antibodies to the HA tag; the secondary staining was carried out with FITC-conjugated anti-mouse antibodies; a representative COS-7 cell is shown to demonstrate undetectable levels of green signals in Mock-transfected cells.



**Supplementary Fig. S3. A) Ikaros-Cdk9 interaction:** protein co-IP of total cell lysates prepared from COS-7 cells transfected (Tr) with empty vector (Mock) or Flag/HA-Ikaros (FH-Ik); cell lysates were immunoprecipitated with Cdk9 antibodies or isotype-matched Ig (Ig) and WB were carried out with anti-HA antibodies; IP NP-40: lysis buffer containing 1% NP-40; IP 200mM: lysis buffer containing 200mM NaCl; **B, C, D) Representative examples of Western Blot (WB) assays performed on equal number of EryC:** total cell lysates were resolved on SDS-PAGE and immunoblots were probed with Brg1, Mi-2, Bcl11a, Cdk9 or Actin (used as a loading control) antibodies; Brg1, Mi-2, Bcl11a, Cdk9 and Actin specific bands are indicated on the side of each panel.

