

酵母组蛋白乙酰转移酶 Elp3 多克隆抗体的制备、鉴定及应用

李芬, 田树娟, 张帅, 孔艳, 王艳芳

河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007

摘要: 酵母 Elp3(Yeast elongation protein 3, yElp3)是组蛋白乙酰转移酶复合物 Elongator 的催化亚基, 通过组蛋白乙酰化参与基因转录延伸。近来证实胞质中也存在的 Elp3 还参与胞外分泌、tRNA 修饰等重要生物学过程。为深入研究 Elp3 的复杂功能, PCR 法克隆 pYES2-yElp3 质粒中编码 yElp3N 末端亲水区段(22~94aa), 构建原核表达载体 pMXB10-yElp3-219, 经 IPTG 诱导表达和几丁质柱纯化后免疫制备多克隆抗体。ELISA 检测显示该抗体有较高的效价(不低于 1:2500), 免疫印迹结果表明该抗体可特异性识别表达纯化及酵母细胞中的 Elp3 蛋白, 运用该抗体进行的染色质免疫沉淀揭示转入 *elp3Δ* 菌株的酵母/人融合的 yhElp3 之所以可补偿突变株的基因表达延迟缺陷, 是因其直接参与 *SSA3* 基因的转录延伸。

关键词: Elp3, 原核表达, 多克隆抗体, 染色质免疫沉淀实验

Identification and application of yeast histone acetyltransferases Elp3 polyclonal antibody

Fen Li, Shujuan Tian, Shuai Zhang, Yan Kong, and Yanfang Wang

College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract: Yeast Elongation protein 3 (yElp3), the catalytic subunit of the multi-subunit histone acetyltransferase elongator complex, is involved in histone acetylation and transcription, exocytosis and tRNA modification. To study the complex function of yElp3 in yeast, we amplified the yElp3 gene fragment encoding 73aa in the N-terminal from plasmid pYES2-yElp3, and then cloned it into pMXB10 to construct the recombinant plasmid pMXB10-yElp3-219. We expressed the fusion protein in *E. coli* BL21 (DE3), then purified it by chin affinity column, and finally obtained the soluble purified protein (8.0 kD), which was used to immune the rabbits for acquiring antiserum. ELISA and Western blotting indicated that the polyclonal antibody was of high titration and specificity. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay with this antibody suggested that yhElp3 exerted the transcriptional regulatory function directly through its presence on the *SSA3* gene; this might be the reason that it can rescue the delay activation of *SSA3* in *elp3Δ* cells.

Keywords: Elp3, prokaryotic expression, polyclonal antibody, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

酵母 Elp3(Yeast elongation protein 3, yElp3)拥有组蛋白乙酰转移酶活性, 是酵母 Elongator 复合

Received: March 21, 2009; **Accepted:** July 2, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30600343), Natural Science Foundation of Henan Educational Committee (No. 2007180030), the Construct Program of the Key Discipline in Henan Province.

Corresponding author: Fen Li. Tel: +86-373-3326340; E-mail: lifen2001@yahoo.com

国家自然科学基金(No. 30600343), 教育厅自然科学基金(No. 2007180030), 河南省重点学科建设项目资助。

物的催化亚基。Elongator 于 1999 年由 Otero 等从酵母染色质的 RNAPII/DNA/RNA 三元复合物中分离得到^[1], 是目前发现的第一个参与转录延伸的组蛋白乙酰转移酶(Histone acetyltransferase, HAT)复合物, 由 6 个亚基组成, 在从古细菌到人物种间高度保守^[2]。研究表明 Elp3 在细胞核和细胞质中均有分布^[3-4], 在核中通过对组蛋白尾部特定赖氨酸残基的乙酰化修饰参与基因的转录延伸, 其主要的乙酰化位点是组蛋白 H3 的 14 位赖氨酸和组蛋白 H4 的第 8 位赖氨酸^[5]; 在细胞质中与胞外分泌和 tRNA 的修饰有关。Elp3 能与裸露及核小体中的 DNA 结合^[5]; 也能与新生的 mRNA 结合^[6]; 来自不同物种的研究表明胞质中微管蛋白是 Elp3 乙酰转移酶的靶蛋白, 暗示复合物在细胞骨架动力学方面可能有新的作用^[7-8]; 生物信息学分析表明, 除 HAT 结构域外, Elp3 亚基中还有一个保守的与 SAM Radical Superfamily 家族成员相似的结构域, 内含铁硫簇结构域, 可能拥有组蛋白去甲基酶活性^[9]。Paraskevopoulou 等发现 Elp3 的铁硫簇结构域能够结合 SAM, 参与胞内甲基化反应^[10]。但 Greenwood 等研究发现 Elp3 的该结构域没有组蛋白去甲基酶活性, 而是 Elongator 复合物结构完整性所必需^[11]。Elp3 该结构域的功能有待于进一步研究。本研究构建了 yElp3 N 端的原核表达载体, 诱导表达了重组片段, 纯化出目的蛋白并制备了效价较高、特异性较好的 yElp3 多克隆抗体, 运用该抗体进行的染色质免疫沉淀结果表明, 转入 *elp3Δ* 菌株的 yhElp3 之所以可以补偿 *elp3Δ* 菌株的 *SSA3* 等基因表达延迟的缺陷, 是因为它直接参与 *SSA3* 基因转录延伸。该抗体的成功制备及其在染色质免疫沉淀和免疫印迹等实验中的应用有利于深入研究拥有双功能域的 Elp3 的复杂功能及其通过表观遗传修饰参与基因转录调控的精确机制。

1 材料与与方法

1.1 菌株、质粒和试验动物

大肠杆菌超级感受态 DH5 α 和 BL21(DE3)细胞, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) W303 菌株; *elp3Δ* 菌株 (JSY130: *MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15, leu2-3, 112 trp1-1 can1-100 elp3Δ::LEU2*) (由英国癌

症研究所 Svejstrup 教授赠送), 大肠杆菌 DH5 α 菌株及质粒 pYES2-yelp3 和 pMXB10 及经原核表达载体 pET-30a-yElp3 表达的纯化 yElp3 蛋白为本室保存。pGEM-T easy Vector 购自 Promega 公司。实验兔购自湖北省疾病预防控制中心动物房。

1.2 主要试剂

PCR 用 KOD-plus 高保真酶、10 \times KOD-plus buffer、dNTPs (2 mmol/L each)、25 mmol/L MgSO₄ 均购自 ToYoBo 公司。各种 DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 标准分子量 Marker、几丁质亲和柱均购自 NEB 公司。蛋白标准分子量 Marker 购自 MBI 生物公司。PCR 产物及酶反应产物纯化试剂盒以及 DNA 凝胶回收试剂盒均购自 TIANGEN 公司。IPTG、卡那霉素购自 Sigma 公司。硝酸纤维素薄膜为 Osmonics 公司产品; 丽春红 S 购自 Amresco 公司。HRP 标记的羊抗兔抗体购自北京晶美生物公司; DAB 及其他试剂购自上海生工生物工程公司。引物合成及序列测定由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

1.3 质粒制备、基因操作、大肠杆菌转化、SDS-PAGE

主要参照 Sambrook 的方法^[12]。

1.4 引物的设计和 Elp3 片段的扩增

根据酵母 *ELP3* 基因全长 DNA 序列, 设计原核表达引物, 序列如下: sense: 5'-catatgtttatacaatgttgctgat-3' (含 *Nde* I 酶切位点), antisense: 5'-gaattccgatgctgttcttact-3' (含 *EcoR* I 酶切位点), 以质粒 pYES2-yelp3 为模板进行 PCR 扩增, 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 克隆载体的构建

凝胶回收的 PCR 产物在 72 °C、30 min 条件下进行加 A 反应, 重新回收后在 T4 DNA 连接酶作用下克隆入 pGEM-T easy, 双酶切鉴定重组质粒并测序。

1.6 表达载体的构建

将 pMXB10 和经测序确认的含目的基因的 pGEM-T easy 载体分别用 *EcoR* I 和 *Nde* I 双酶切, 凝胶回收 6667 bp 的 pMXB10 片段和 219 bp 目的片段, 在 T4 DNA 连接酶作用下 16 °C 连接 16 h 后, 转化大肠杆菌 DH5 α 超感细胞, 重组质粒用 *EcoR* I 和 *Nde* I 双酶切验证。

1.7 蛋白的诱导表达

重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞, 在含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板上挑取单克隆, 37 °C 过夜培养, 次日按 1:100 稀释培养菌液, 培养 4 h 至菌液 OD_{600} 为 0.8, 分别加入不同浓度的 IPTG(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 mmol/L), 37 °C 诱导培养 4 h 后, 取菌液 2 mL, 1 000 r/min、4 °C 离心 1 min, 弃上清, 加入还原型 2×SDS 上样缓冲液和去离子水各 100 μ L, 振荡混匀后, 煮沸 10 min, 取 15 μ L 样品进行 SDS-PAGE 分析。

1.8 蛋白的纯化

目的蛋白的纯化主要通过以下几个步骤进行: 1) 细胞粗提物的制备; 2) Chitin 柱的平衡; 3) 上样; 4) 洗柱; 5) intein 的自我裂解活性的诱导; 6) 目标蛋白的洗脱释放; 7) Chitin 树脂的再生。纯化后的目的蛋白 -70 °C 储存备用。

1.9 多克隆抗体的制备及效价测定

纯化过的蛋白(45 μ g, 100 μ L)用 15%凝胶分离, CuCl_2 负染胶条后切下透明的目的条带称重后, 与等体积弗氏完全佐剂混合并充分研磨, 皮下多点注射兔, 第 2、3 次免疫目的蛋白与弗氏不完全佐剂混合, 每次间隔 10 d 加强免疫 1 次, 共免疫 4 次。4 次免疫后耳动脉采血, 分离血清, 分装后置 -20 °C 冻存。制备的抗 Elp3 多克隆抗体的效价用 ELISA 方法测定。用纯化的重组 yElp3 包被酶标板, 0.5 μ g/孔, 按 1:20~1:20 000 系列倍比稀释血清, 以 HRP 标记的羊抗兔抗体标记, TMB 显色, 酶标仪 (SERIAL RS2232C) 630 nm 和 575 nm 双波长检测其 OD 值, 进行 ELISA 检测。

1.10 Western blotting 分析

蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后转移至 NC 膜。5%脱脂牛奶(溶于 TBST 中) 封闭 2 h, 入抗 Elp3 多克隆抗体(1:1000), 室温反应 2 h。TBST (25 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5, 50 mmol/L NaCl, 0.1 % Tween 20) 洗涤 3 次, 1: 15000 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体, 室温孵育 2 h, 洗去二抗后在 DAB/ H_2O_2 底物中显色检测抗体的特异性。

1.11 染色质免疫沉淀

采用乙酸锂转化法将 pRS316-yhelp3 转入 *elp3* Δ 细胞, SD/-Ura 筛选含 yhElp3 阳性菌株, 热激条件参

照 Li 等^[13]的方法, 即将转化株接种于适量 SD/-Ura 培养基中, 26 °C、200 r/min 培养至指数中期, 即 $OD_{600}=1.0$, 取适量作为对照, 其余的于 37 °C 振荡培养 10 min, 取样, 用 1%甲醛、37 °C 交联 10 min, 然后用裂解液(140 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.5, 1% Tritone X-100, 0.1% Na-deoxycholate)裂解, 裂解物的 ChIP 实验按照 ChIP assay 试剂盒(Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)说明书进行。抗体用本实验制备的抗酵母 Elp3 N 端的多克隆抗体, Input DNA(总 DNA)和 immunoprecipitated DNA (免疫沉淀 DNA)用 PCR 进行分析。所用的引物序列如下 *SS43* ORF(Forward: 5'-cgtattatcaatgaaccactg-3'; Reverse: 5'-gtctcctgcggtagcctta-3'); *SSA3* 3'-UTR(Forward: 5'-tgctacgggaggtgag-3'; Reverse: 5'-cgtgctgcggaaacaa-3')。

2 结果

2.1 yELP3 基因片段的获得和重组质粒的构建

以质粒 pYES2-yelp3 为模板进行 PCR 扩增, 经 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 得到 219 bp 的扩增带, 与预期结果相符, 回收 PCR 产物与 PGEM-Teasy 连接。凝胶回收 pMXB10 载体双酶切约 6667 bp 片段,

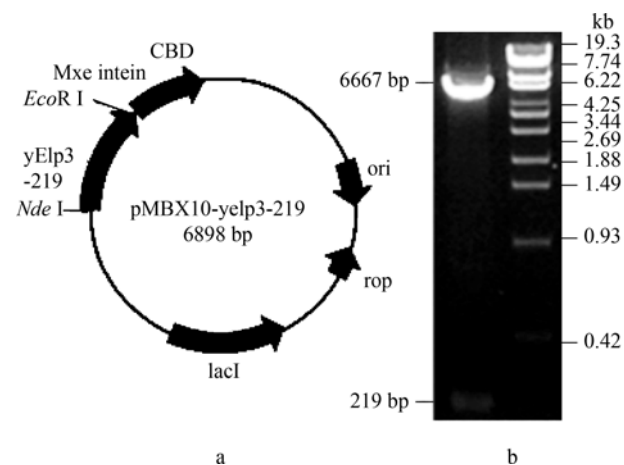


图 1 原核表达载体的构建及酶切鉴定

Fig. 1 Construction and digestion analysis of pMXB10-yELP3-219 recombinant plasmids. (a) Diagrammatic illustration of the recombinant vector pMXB10-yElp3-219, showing the insertion site of yELP3-219 fragment into the pMXB10 vector. (b) Digestion analysis of pMXB10-yELP3-219 recombinant plasmids. 1: DNA marker (λ -Eco T14); 2: recombinant plasmid pMXB10-yELP3-219 restricted by *EcoR* I and *Nde* I.

与同样双酶切的 PGEM-T-yElp3-219 得到的目的片段连接, 连接产物转化 DH5 α 超级感受态细胞, 提取质粒经 *EcoR* I 和 *Nde* I 双酶切鉴定, 分别得到了 6667 bp 的载体片段和 219 bp 的目的基因片段(图 1b)。测序结果显示无插入片段移码与突变, 验证正确的质粒命名为 pMXB10-yELP3-219。

2.2 yElp3-219 的诱导表达和纯化

重组质粒 pMXB10-yElp3-219 转化 BL21(DE3) 感受态, 37 °C 振荡培养至 OD_{600} 在 0.4~0.7, 加入不同浓度的 IPTG, 37 °C 继续诱导培养 4 h, 收集菌体, 煮沸, 12% SDS-PAGE 检测蛋白表达。结果发现, 大于 0.4 mmol/L IPTG 浓度诱导后表达的蛋白量几乎相当, 都可高效表达约 36 kD 的蛋白质(图 2a)。

由于 yElp3-219 与原核表达载体 pMXB10 上的内含肽(Intein)形成融合蛋白, 通过 DTT(1,4-dithiothreitol) 诱导内含肽的肽键裂解活性, 在几丁质介质上将目标蛋白释放出来, 而内含肽与几丁质结合蛋白仍结合在几丁质介质上。12% SDS-PAGE 分析结果显示, 酵母 yElp3-219 经几丁质柱纯化得到单一的约 8.0 kD 的蛋白(图 2b), 与预期的大小相符。

2.3 Elp3 抗体的制备

纯化后的目的蛋白(45 μ g, 100 μ L)经 15%凝胶分离, CuCl_2 负染后切下透明目的条带与等体积的弗氏佐剂混合后研磨, 选取 2 只健康兔子进行免疫,

经 3 次免疫, 于 10 周后从兔子的耳动脉取血用 ELISA 的方法初测抗体效价; 然后加强免疫 1 次, 得到满意的效价后取兔子的耳动脉血, 待血清析出后, 离心收集上清作为抗血清。分别得到 A1 和 A2 抗血清。

2.4 ELISA 法检测抗体效价

用纯化的 yElp3 蛋白包被酶标板, 利用 ELISA 技术测定抗体效价, 结果如图 3 所示, A1 的效价略高于 A2, 选 A1 抗血清进行后续 Western blotting 和免疫沉淀实验, 所用抗体稀释度分别为 1:2500 和 1:1000。

2.5 抗体特异性的检测

根据测定的效价将制备的抗体稀释后, 采用 Western blotting 对酵母总蛋白中的 yElp3 抗原进行杂交, 用敲除酵母 *ELP3* 基因的 *elp3 Δ* 菌株总蛋白提取物作为阴性对照, 以纯化的 yElp3 蛋白作为阳性对照, 以检测抗体的特异性。上述样品经 SDS-PAGE 分离后, 将抗原转移到硝酸纤维素薄膜上, 用制备好的抗体进行杂交, 与辣根过氧化物酶标记的二抗共孵育并显色后, 野生型酵母总蛋白和纯化蛋白样品在约 60 kD 处均检测到了 yElp3 抗原与制备的抗体进行杂交的特异条带(图 4), 而缺失 Elp3 的酵母突变株总蛋白无杂交带, 说明制备的抗体特异性较强, 能与酵母 Elp3 蛋白发生特异性结合, 可以用于染色质免疫沉淀、免疫组化等实验。

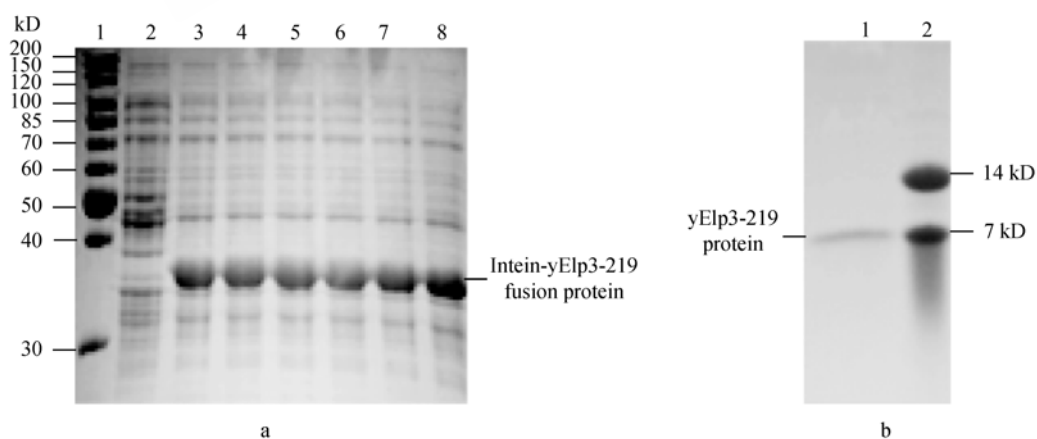


图 2 yElp3-219 的诱导表达和纯化

Fig. 2 Induced expression and purification of yElp3-219 protein. (a) Induced expression of yElp3-219. 1: protein marker; 2: the protein of BL21(DE3) transformed with recombinant plasmid without induced by IPTG; 3-8: the protein of 0.2 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.6 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1.0 mmol/L, 2.0 mmol/L IPTG-induced BL21(DE3) transformed with recombinant plasmid. (b) Purification of yElp3-219 by chitin affinity chromatography. 1: the purified protein; 2: protein marker.

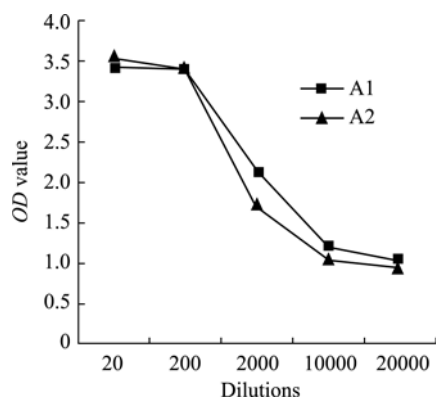


图3 yElp3N 抗血清的 ELISA 检测

Fig. 3 ELISA analysis of anti-yElp3-N antiserum with recombinant yElp3. ELISA plates were coated with recombinant yElp3, anti-yElp3-N antiserum were serially diluted and dispensed, in triplicates into the wells. HRP-labeled goat anti-rabbit IgG was used as second Ab.

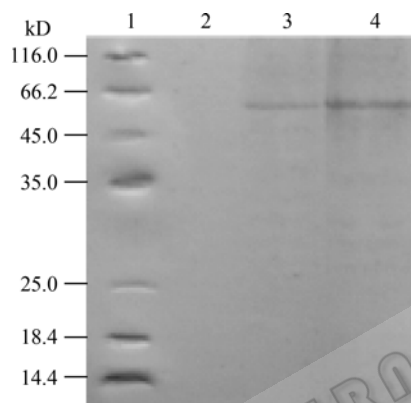


图4 抗 yElp3 抗体特异性的鉴定

Fig. 4 Identification of the specificity of yElp3 N polyclonal antibody. 1: protein marker; 2: total protein extracts of *elp3Δ* cells as negative control; 3: total protein extracts of wild type W303 cells; 4: purified yElp3 expressed through prokaryotic system as positive control.

2.6 转入酵母 *elp3Δ* 菌株的 yhElp3 的 ChIP 实验

已知酵母 Elp3 可参与 *SSA3* 和 *SSA4* 基因的转录延伸^[9]。本室曾以酵母功能互补实验表明酵母非 HAT 区和人 HAT 区融合的 Elp3(yhElp3)可显著补偿酵母 *elp3Δ* 菌株的生长和诱导基因表达延迟的缺陷^[10]。推测转入的 yhElp3 很可能与酵母 Elp3 一样参与了 *SSA3* 等基因的转录延伸。为证实该推测采用染色质免疫沉淀(ChIP)技术,用制备的抗酵母 Elp3 N 端的多克隆抗体对转入 *elp3Δ* 菌株的 yhElp3 是否参与 *SSA3* 转录延伸进行了检测,结果如图 5 所示。未热激时 yhElp3 在 *SSA3* 的 ORF 和 3'UTR 均出现,

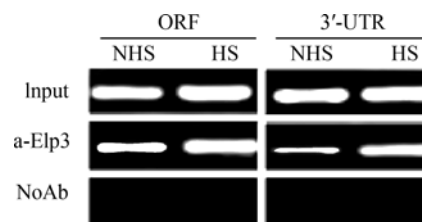


图5 yhElp3 参与酵母 *SSA3* 基因的转录调控

Fig. 5 yhElp3 regulated *SSA3* gene transcription in yeast. Yeast cells were heat-shocked for 10 min at 37 °C (HS), or left at 26 °C (NHS). ChIP analyses of the relative amounts of yhElp3 in ORF and 3'-UTR regions of *SSA3* gene were performed.

但量较少。热激后,两区域中 yhElp3 均明显增加,尤其是 ORF 区,表明热激后 yhElp3 可以被快速招募到 *SSA3* 的整个编码区,参与转录延伸。因而认为转入酵母 *elp3Δ* 菌株的 yhElp3 之所以能补偿酵母 *elp3Δ* 菌株的 *SSA3* 基因表达延迟缺陷,是因为直接促进了酵母 *SSA3* 基因的转录延伸。

3 讨论

酵母 Elp3 基因全长为 1674 bp,编码 557 个氨基酸。其中 88~331aa 和 448~557aa 两个区段分别是其保守的 SAM Radical Superfamily 家族成员相似结构域和 HAT 结构域(图 6)。为了制备酵母 Elp3 特异的多克隆抗体,避开上述 2 个保守的功能域,选取可溶性较好的 N 端 73 个氨基酸(22~94aa)进行原核表达和纯化,并免疫兔子制备多克隆抗体。ELISA 法测定抗体效价结果显示本实验制备了效价较高的抗体。运用 Western blotting 方法在酵母总蛋白提取物和纯化的酵母 Elp3 样品中均检测到了酵母 Elp3 抗原与制备抗体杂交的特异性单一条带,但在酵母 Elp3 缺失突变株的总蛋白提取物中则未出现阳性条带,说明所制备的抗体特异性较强,能与 yElp3 蛋白特异的结合。

市售的酵母 Elp3 抗体均为抗羧基末端的,不能识别酵母非 HAT 区与人 HAT 区融合的 yhElp3 蛋白。运用本研究制备的抗酵母 Elp3N 端的抗体对 yhElp3 的 *elp3Δ* 转化株的免疫沉淀实验表明,该抗体可识别 yhElp3,并发现热激后 yhElp3 可迅速被招募到 *SSA3* 基因的编码区和 3'UTR,表明转入酵母 *elp3Δ* 菌株的 yhElp3 之所以能够补偿 *elp3Δ* 菌株 *SSA3* 基因表达延迟的缺陷,是因为它可以与酵母 Elp3 一样,

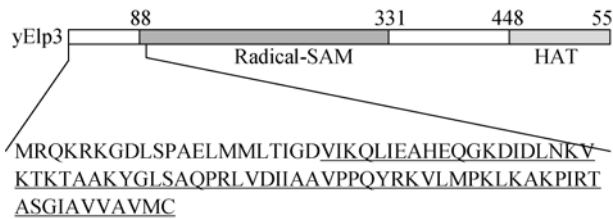


图 6 yElp3 的主要功能域及多克隆抗体的识别区

Fig. 6 Main Function domains of yElp3 and regions polyantibody against. Radical-SAM: N-terminal domain similar to the catalytic domain of S-adenosylmethionine-radical enzymes; HAT: histone acetyltransferase domain; the amino acid sequences underlined show regions polyantibody against.

直接促进 *SSA3* 基因的转录延伸。

日益增多的研究结果表明, Elp3 及其所在的 Elongator 复合物参与胞质和核内多种复杂的生物学功能^[5-11,13-15]。Simpson 等研究发现 Elp3 变异 (Variants of the elongator protein 3) 与运动神经元退化和肌萎缩侧索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 相关, 而且在斑马鱼胚胎中反义下调 Elp3 蛋白水平可导致剂量依赖的运动神经元异常^[16]。以上研究结果表明, 在胞质和核中均有分布的该复合物有非常复杂的功能, 对其功能进行深入研究有助于揭示人类家族神经性疾病及肌萎缩侧索硬化症等的发病机理。效价较高、特异性较好、ChIP 级别的酵母 Elp3 多克隆抗体的成功制备以及 yhElp3 参与酵母 *SSA3* 转录延伸的证实, 不仅进一步证明了高度保守的酵母和人 Elp3 HAT 活性功能的相似性, 也为将来运用酵母双杂交、免疫共沉淀、染色质免疫沉淀等手段深入研究 Elp3 和 Elongator 复合物参与转录延伸的精确机制及其在胞质的功能奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Otero G, Fellows J, Li Y, *et al.* Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell*, 1999, **3**(1): 109–118
- [2] Wittschieben BO, Otero G, de Bizemont T, *et al.* A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell*, 1999, **4**(1): 123–128.
- [3] Pokholok DK, Hannett NM, Young RA. Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression *in vivo*. *Mol Cell*, 2002, **9**(4): 799–809.
- [4] Fichtner L, Frohloff F, Jablonowski D, *et al.* Protein interactions within *Saccharomyces cerevisiae* Elongator, a complex essential for *Kluyveromyces lactis* zymocinity. *Mol Microbiol*, 2002, **45**(3): 817–826.
- [5] Winker SG, Kristjuhan A, Hediye EB, *et al.* Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(6): 3517–3522.
- [6] Gilbert C, Kristjuhan A, Winkler GS, *et al.* Elongator interactions with nascent mrna revealed by RNA immunoprecipitation. *Mol Cell*, 2004, **14**(4): 457–464.
- [7] Gardiner J, Barton D, Marc J. Potential role of tubulin acetylation and microtubule-based protein trafficking in familial dysautonomia. *Traffic*, 2007, **8**(9): 1145–1149.
- [8] Creppe C, Malinouskaya L, Volvert ML, *et al.* Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell*, 2009, **136**(3): 393–394.
- [9] Chinenov YA. Second catalytic domain in the ELP3 histone acetyltransferases: a candidate for histone demethylase activity? *Trends Biochem Sci*, 2002, **27**: 115–117.
- [10] Paraskevopoulou C, Fairhurst SA, Lowe DJ, *et al.* The Elongator subunit Elp3 contains a Fe4S4 cluster and binds S-adenosylmethionine. *Mol Microbiol*, 2006, **59**(3): 795–806.
- [11] Greenwood C, Selth LA, Dirac-Svejstrup AB, *et al.* An iron-sulfur cluster domain in Elp3 important for the structural integrity of elongator. *J Biol Chem*, 2009, **284**(1): 141–149.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 19–20, 55–56, 880–885.
- [13] Li F, Lu J, Han Q, *et al.* The Elp3 subunit of human elongator complex is functionally similar to its counterpart in yeast. *Mol Gen Genomics*, 2005, **273**(3): 264–272
- [14] Han Q, Hou X, Su D, *et al.* hELP3 subunit of the elongator complex regulates the transcription of *HSP70* gene in human cells. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2007, **39**(6): 453–461.
- [15] Han Q, Lu J, Duan J, *et al.* Gcn5- and Elp3-induced histone H3 acetylation regulates hsp70 gene transcription in yeast. *Biochem J*, 2008, **409** (3): 779–788.
- [16] Simpson CL, Lemmens R, Miskiewicz K, *et al.* Variants of the elongator protein 3 (ELP3) gene are associated with motor neuron degeneration. *Hum Mol Genet*, 2009, **18**(3): 472–481.